

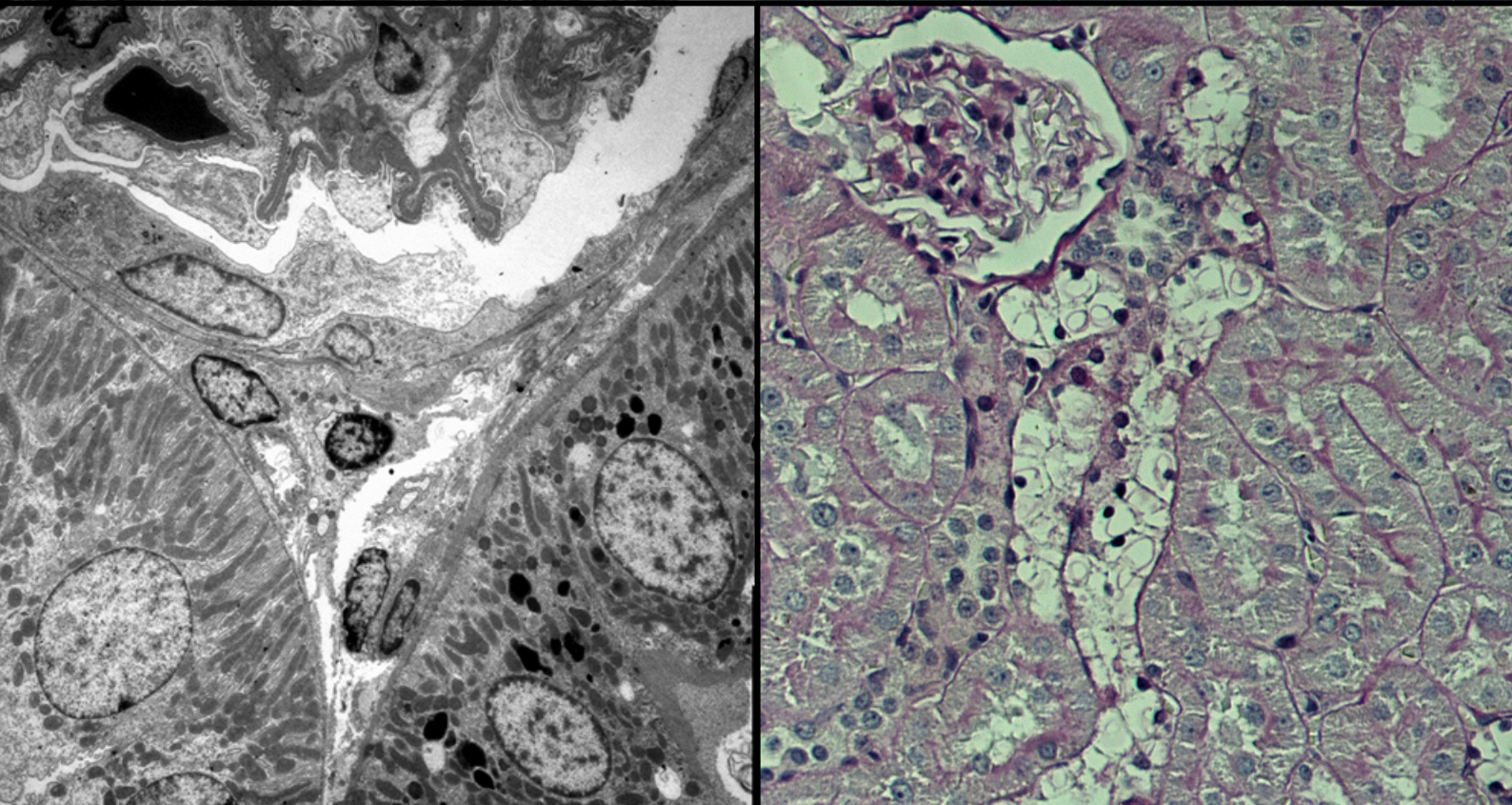


UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

TESIS DOCTORAL

Efecto de la Hipoxia sobre la Eficacia Terapéutica de Células Mesenquimales Derivadas de Tejido Adiposo sobre la Regeneración Renal en un Modelo Experimental de Nefropatía Diabética. Estudios In vitro e In vivo.

Effect of Hypoxia on Therapeutic Efficacy of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells on Kidney Regeneration in an Experimental Model of Diabetic Nephropathy. In vitro and In vivo Studies.



LUIS MIGUEL PACO MEZA
CÓRDOBA, 2022

TITULO: *Efecto de la Hipoxia sobre la Eficacia Terapéutica de Células Mesenquimales Derivadas de Tejido Adiposo sobre la Regeneración Renal en un Modelo Experimental de Nefropatía Diabética. Estudios In Vitro e In Vivo*

AUTOR: *Luis Miguel Paco Meza*

© Edita: UCOPress. 2023
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>

**INSTITUTO MAIMÓNIDES DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DE CÓRDOBA**



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Título de la Tesis doctoral

Efecto de la Hipoxia sobre la Eficacia Terapéutica de Células Mesenquimales Derivadas de Tejido Adiposo sobre la Regeneración Renal en un Modelo Experimental de Nefropatía Diabética. Estudios *In vitro* e *In vivo*.

The doctoral thesis title

Effect of Hypoxia on Therapeutic Efficacy of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells on Kidney Regeneration in an Experimental Model of Diabetic Nephropathy. *In vitro* and *In vivo* Studies.

Autor:

Lic. Luis Miguel Paco Meza

Directoras:

Dra. Begoña María Escribano Durán

Dra. Inmaculada Concepción Herrera Arroyo

Programa de doctorado:

Biociencias y ciencias agroalimentarias

Fecha:

12 de Noviembre de 2022



TÍTULO DE LA TESIS: Efecto de la Hipoxia sobre la Eficacia Terapéutica de Células Mesenquimales Derivadas de Tejido Adiposo sobre la Regeneración Renal en un Modelo Experimental de Nefropatía Diabética. Estudios In vitro e In vivo. / Effect of Hypoxia on Therapeutic Efficacy of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells on Kidney Regeneration in an Experimental Model of Diabetic Nephropathy. In vitro an In Vivo Studies.

DOCTORANDO/A: Luis Miguel Paco Meza

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La tesis doctoral presenta un estudio concienzudo sobre una posibilidad terapéutica en la nefropatía diabética, enfermedad muy grave y con un curso conducente a un trasplante renal, en la mayoría de los casos. Las células mesenquimales se están usando como recurso actual en muchas de las enfermedades que cursan con degeneración celular y apoptosis. En este estudio se hace evaluación de su cultivo "in vitro" bajo las condiciones de normoxia e hipoxia, tras su origen de tejido adiposo de ratas control y ratas con nefropatía diabética, determinando las mejores condiciones para su desarrollo y contrastando su funcionalidad. Además, se comparan los distintos tipos celulares obtenidos para la sub y sobre-expresión de genes y proteínas asociadas a rutas metabólicas concretas. Para finalizar el estudio, se hace una comparación morfológica, estructural y ultraestructural de los tejidos dañados por la nefropatía diabética, en ratas, tras la inyección intravenosa de células mesenquimales obtenidas bajo diferentes condiciones de cultivo, y derivadas de tejido adiposo sano y de animales con nefropatía diabética.

La tesis doctoral muestra, por tanto, una nueva posibilidad para tratar la nefropatía diabética, menos invasiva y peligrosa que el trasplante renal, sin dejar elementos al azar, puesto que recurre al estudio in vitro e in vivo del poder funcional de las células mesenquimales. El doctorando ha usado en todo momento la tecnología más actual para su estudio gracias a que este se ha llevado a cabo en las instalaciones del Hospital Universitario Reina Sofía, en la Unidad de Terapia Celular y en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica. No se han escatimado medios para la realización de esta tesis incluyendo entre los mismos una estancia internacional que va a permitir la lectura de la tesis con mención internacional. Además, el doctorando presenta dos trabajos publicados en las mejores revistas del área de conocimiento y que le dan el sello de calidad a esta tesis doctoral.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 17 de octubre de 2022

Firma del/de los directores/es

ESCRIBANO
DURAN BEGOÑA
MARIA -
30545918D

Firmado digitalmente por ESCRIBANO
DURAN BEGOÑA MARIA - 30545918D
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES,
serialNumber=IDCES-30545918D,
givenName=BEGOÑA MARIA,
sn=ESCRIBANO DURAN, cn=ESCRIBANO
DURAN BEGOÑA MARIA - 30545918D
Fecha: 2022.10.17 07:52:25 +02'00'

HERRERA ARROYO
INMACULADA
CONCEPCION -
30459164B

Firmado digitalmente por
HERRERA ARROYO
INMACULADA
CONCEPCION - 30459164B
Fecha: 2022.10.16 13:02:43
+02'00'

Fdo.: Begoña María Escribano Durán

Fdo.: Inmaculada Concepción Herrera Arroyo

*No tengas miedo, pues yo estoy contigo;
no temas, pues yo soy tu Dios.
Yo te doy fuerzas, yo te ayudo,
yo te sostengo con mi mano victoriosa.*

Isaías 41:10

*So do not fear, for I am with you;
do not be dismayed, for I am your God.
I will strengthen you and help you;
I will uphold you with my righteous right
hand.*

Isaiah 41:10

*La sabiduría comienza por
honrar al Señor;
conocer al Santísimo es tener
inteligencia*

Proverbios 9:10

*The fear of the LORD is the
beginning of wisdom,
and knowledge of the Holy
One is understanding.*

Proverbs 9:10

*Dedicado a mi familia y
amigos, especialmente a mis
tíos Jhony y Vladimir, quienes
van a hacernos mucha falta.*

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Todavía recuerdo bien el primer día que visité el laboratorio de Terapia Celular del Hospital Universitario Reina Sofía. Era una mañana de septiembre, mi cuerpo estaba empapado en sudor, aunque no por el calor cordobés que para variar aún se hacía patente, sino porque en la espalda cargaba dudas, timidez, inexperiencia, y por qué no decirlo, también algunas inseguridades. Aquel fue el prolegómeno que me condujo a escribir estas líneas.

Como cualquier otro, este derrotero estuvo lleno de sus grandes luces y sus grandes sombras. Sin embargo, en las manos adecuadas la sumatoria total de ambas, siempre, no solo en este caso, favorecen a la primera. A lo largo de este trayecto tuve el acompañamiento y apoyo de muchas personas y aunque quisiera expresar mi agradecimiento con algo más que un gesto convencional, será la palabra el recurso con el que pondré todo mi empeño en reconocer su apoyo.

Voy a comenzar expresando mi agradecimiento a la Dra. Begoña María Escribano Durán, por haber aceptado el desafío de dirigir la tesis aún cuando el panorama era algo complejo, y no tengo dudas que el haberla conocido fue una serendipia que emergió de aquellas circunstancias. Así mismo, gracias por el tiempo invertido, la orientación que me brindo y por haberme inspirado a terminar la tesis con el mismo ánimo con el que pisé la universidad el primer día. Gracias también por todas las gestiones que llevó a cabo para que este proceso avance con fluidez.

He de agradecer ahora a la Dra. Inmaculada Concepción Herrera Arroyo, gracias por aceptarme para formar parte de su equipo de investigación a pesar de ser un completo desconocido y totalmente bisoño en el campo de la investigación. También por la paciencia que me mostró especialmente al final del recorrido. Del mismo modo, gracias por siempre estar predispuesta a ayudarme con todas las gestiones y trámites que fueron necesarios. Gracias por sus enseñanzas, y por permitirme ayudarle en algunas de sus clases prácticas, fue una experiencia que difícilmente olvidaré y de la que aprendí mucho.

Quiero reconocer ahora a María Dolores Carmona, debo confesar que cuando inicié la tesis no creí que terminaríamos trabajando tan estrechamente, pero así son las inflexiones de la abstracta línea a la que llamamos vida que la hacen más emocionante. Gracias por ayudarme a terminar este proyecto y por dedicarle el tiempo que a lo mejor le restabas a tu familia o

proyectos personales. Gracias por tenerme paciencia y por ayudarme a recobrar la calma cuando la perdía. Jamás olvidaré tu amabilidad desde el primer día que llegué al laboratorio.

No puedo continuar, sin expresarle mi gratitud a Sagrario Cañadillas por haber confiado en mí desde el comienzo. Gracias por guiarme en los primeros pasos que di en este camino y por permitirme ayudarte con algunos estudiantes de máster. Tengo la impresión que creías que era una carga para mí, pero no lo era, de hecho lo disfrutaba y aquello afirma mi deseo personal de algún día incursionar en la enseñanza.

Este proyecto tampoco hubiera sido posible sin la participación de todo el personal del grupo de Terapia Celular siempre dispuestos a darme una mano. Además, hacían que incluso los días grises de otoño e invierno tengan toque de calor y fundamentalmente de humor. Estos años he aprendido y disfrutado mucho siendo parte de ustedes. Es por eso que quiero expresarles mi eterno agradecimiento a Charito, Charete, Sonia, Lourdes, Vanessa, Miguel y María del Mar. Del mismo modo, a todos aquellos que en su momento fueron parte del equipo. Gracias a María Luque, María Muñoz, Laura, Jesús, Cristina Trujillo, Marta, Ana, Aurora, Luisa, Toñi y Teresa. Y aunque solamente hayamos compartido un tiempo muy breve gracias también a Cristina Pavlovic.

Quiero agradecer también al Dr. Javier Caballero y a Rosa Ortega por todo el tiempo y las enseñanzas que me brindaron.

A pesar de los años que llevó en Córdoba me resistí a usar algunos modismos típicos y es cuando menos interesante, que mis cuerdas vocales hayan comenzado a articularlos en otras latitudes. De ese modo, quiero recordar y agradecer a todo el equipo de Trasplante Renal del Erasmus Medical Center en Róterdam, particularmente a Carla Baan, Martin Hoogduijn y a Ana Merino. Muchas gracias por haberme acogido esos casi cuatro meses, por todo lo que me enseñaron y por todas las muestras de afecto que quedaron grabadas en mi corazón. No tengo dudas que mi estancia con ustedes fue una de las mejores experiencias de mi vida. En Róterdam, también pude hacer amigos fuera del laboratorio, y es aquí cuando quiero agradecer a mi amado Life Group y mencionar a Albert, Anneloes, Rubén y a Sarne, gracias por aquel tiempo que pasamos. Además, muchas gracias a Richard. Espero volver pronto a Róterdam y visitarlos a todos.

Despite the years I have been living in Córdoba, I resisted using Spanish idioms from Spain. Nonetheless, interestingly, I found myself unable to resist using them abroad, in The Netherlands to be specific. This way, I want to remember and express my gratefulness to The

Nephrology and Transplantation Laboratory of Erasmus Medical Center in Rotterdam, in particular to Carla Baan, Martin Hoogduijn and Ana Merino. Thank you all so much for making me feel a part of your team, and the demonstration of affection as well as support during my internship, they were unforgettable and I also really appreciate all you taught me. I do not have any doubt that that experience was one of the best of my life. During my internship I also gained other friends, hence, I want to thank my lovely Life Group specially to Albert, Anneloes, Ruben and Sarne. The time we spent together was wonderful. I am looking forward to visiting you all.

Después de este breve paréntesis lingüístico, y esperando la licencia de Don Miguel de Unamuno, quiero mencionar también a la Dra. Carmen Michán, y agradecerle el tal vez ser la primera persona que me hizo creer, contra todo pronóstico, que podía quedarme a hacer la tesis doctoral después de terminado el máster, y aunque hicimos un trato y quedamos que le debería una gaseosa si lo conseguía, cosa que pagué, aquello no tiene valor, por ello muchas gracias.

También quiero expresar mi agradecimiento a mi amigo el Dr. Fermín Galán. Muchas gracias por todos sus consejos, su tiempo, su paciencia y hasta por los regaños. Nunca olvidaré la presión que a veces me imprimía para no quedarme quieto, seguir adelante, abrir mi espectro cultural y librarme de mis cargas de provincianismo; presión que al final me trajo a su Andalucía. No puedo parar de agradecer que el periplo de su vida se haya cruzado con la mía cuando yo solamente era un estudiante de medicina y usted mi profesor de psiquiatría; pero agradezco mucho más que aquel día gané un gran amigo.

Tampoco puedo pasar por alto al Dr. Arturo Chica, y la Dra. Inmaculada Luque, gracias por todo el apoyo y la asesoría que me dieron cuando visitaba sus oficinas con algún problema.

Otro amigo al que quiero recordar es a Christian Lafuente, muchas gracias por el soporte y los ánimos que me diste, gracias por ser el primer rostro conocido que pude ver cuando apenas bajaba del avión en mi primera llegada.

Llegado a este punto, quiero reconocer a personas y amigos que fueron apareciendo a lo largo de mi estancia en España y que me dieron un apoyo invaluable para poder concluir esta tesis.

Gracias al Dr. Pablo de Felipe, por sus consejos, el tiempo que invirtió en mí, y por las charlas tan interesantes que compartimos. Gracias también porque me ayudó a comprender que se pueden articular dos itinerarios de vida que para muchos parecerían ser irreconciliables.

Sin duda una de las sorpresas que me llevé fue el de a las pocas semanas de mi llegada a Córdoba conocer a un pacheño llegado de Santa Cruz. Nelson, gracias por darme tu sincera

amistad, por las conversaciones que solíamos compartir, y porque en cierto momento cuando nos tocó compartir piso aplaudías los domingos por la mañana cuando regresaba de la congregación. Me alegra mucho que hayas podido hacer el diplomado ese del que tanto hablábamos.

Muchas gracias también a mi amiga Dora y su familia, por animarme, por incluirme en su círculo de amigos y por sus regaños.

Mi estancia en Córdoba, así mismo, me regaló otros grandes amigos, de aquellos que uno quisiera tener cerca toda la vida, y que además se convierten en confidentes y consejeros. Es por eso que quiero mencionar a mis amigos Samuel Rubio y Mari Carmen, gracias por estar ahí para escucharme cuando lo necesitaba, me vieron reír, hacer el payaso, enojarme e incluso llorar, gracias por los consejos, por arrancarme algunas carcajadas cuando me veían triste y el sostén que siempre estuvieron dispuestos a darme.

Quiero reconocer y agradecer también al pastor Esteban Muñoz de Morales por abrirme las puertas de la congregación CAC, por su apoyo irrestricto y por la oportunidad que me dio para poder colaborar en la congregación. Oportunidad que, entre otras cosas, fue vital para a mi crecimiento personal, y me enseñó el valor del servicio. Y quiero extenderme aquí para agradecer además al que fue mi grupo de hogar, al que me acogió en este último tiempo, al grupo de Jóvenes Love, a mi grupo Nokia Team (Sam, Nef Noise, Pedro, Manu, Nathan y Josu) a Flavio, Noemí (tú serás la siguiente), Celia, Tomas, Ruth C., Eva, Natalia T., Sandra R., Rafi C., Ahmed, Rafa A., Inma, Paco, Marye, Lizzet, Katy, Enrique y Carlos por el respaldo constante que sentí de ustedes.

Otra persona que fue un importante soporte es mi amiga Gloria, gracias por darme el primer impulso para comenzar este camino, por todo el apoyo que a lo lejos me sigues dando. Pero sobre todo por tu sincera amistad y el tiempo que compartimos juntos.

Una de las cosas de las que traté, por todos los medios, de escapar durante este tiempo fue a mi vinculación a Young Life. Sin embargo, el destino de los hombres es insondable y la vida me tenía preparada una sorpresa. Es por eso que quiero agradecer a Marina, Juan, Minye, Alba, Jona Banegas, Luis Alarcón, y Caroline Witt por haber sido un soporte al cual asirme cuando pasaba la borrasca, por ayudarme a comprender el verdadero valor de las cosas y por darme su sincera amistad.

Justamente aquella vinculación me llevo a construir un grupete de amigos que han cambiado mi vida, y me han ayudado a verla de manera diferente. Además, son la prueba viviente que puedo ser capaz de cosas que antes me parecían ilusorias. Es así que quiero

agradecer a Moha, Reda, Rubén, Dani, Fecho, Xavi, Jonatan, Jordan, Lucas y Manu. Espero que este solo sea el inicio de un largo recorrido y claro que nuestro grupete siga creciendo.

Gracias también a mi espacio de vida encarnado en Chritine Miller, Ester Miller, Joel Miller, Cristina Dobinson, SeanTottman, Rachel Tottman, José, Janeth, Rafa, Ivana, Rodrigo, Vania, Lucas y Tomas por el amor incondicional que recibí de ustedes desde que los conocí, por el tiempo que pasamos juntos, y por las charlas y reflexiones tan interesantes que teníamos, sobre todo cuando sonaba un poco de Rock en el fondo. Son todos sin duda un regalo importante en mi vida. Antes de continuar, quiero subrayar que no me he olvidado de ti, Terry Miller, solo te he dajado al final porque quiero además agradecerte que estos últimos años fuiste no solamente un consejero para mí, sino ante todo un maestro. ¡Gracias amigo!.

No puedo no mencionar y agradecer a Soco y de igual modo a mis amigas y amigos Inma Moreno, María Ángeles, Ana Blancas, Alberto Rey y su esposa Virginia. Así como también a Suly y Ricardo. Gracias por el tiempo que me regalaron, por los consejos y por lo mucho que aprendí de ustedes.

Casi en el epílogo quiero agradecer a mi familia, sin ellos esto nunca hubiese sido posible. A mi padre José Luis, a mi madre Rosmery, a Remberto que nunca dejó de estar pendiente de todo lo que sucedía en Córdoba y a mis hermanas Anaí y Mariel (pienso todos los días en ustedes), gracias por el amor y apoyo incondicional que recibí, también por creer en mí y en mis proyectos locos. Soy un privilegiado de tenerlos. Así mismo, quiero agradecer a todos mis tíos y a mi abuela Victoria que no dejan de preocuparse por mí. Tengo muchas ganas de ir a verlos a todos en especial a mis sobrinos Romina, Matías y Aarón ¡Siempre soñé con ser tío!. Siento mucho haberme perdido sus primeros años. ¡Los amo familia!

Finalmente, quiero agradecer al arquitecto que planificó este andamio incluso antes de que se me pasase por la cabeza salir de mi país para hacer un doctorado. Gracias Dios por hacer que en mi camino haya encontrado a personas maravillosas, como las que acabo de mencionar. Personas en las que pude ver tu amor de diversas formas. Gracias porque todo esto es parte de un plan y porque durante este tiempo no solo me ayudaste a hacer una tesis, sino formaste además mi carácter, y ahora no soy la misma persona que llegó a esta ciudad. Gracias por haberme fortalecido cuando ya no tenía fuerzas. Gracias por haber estado a mi lado aun cuando no te sentía. Gracias por el regalo de la vida, por mi familia, por mis amigos, por esta experiencia que poco a poco llega a su fin. Gracias por todo lo que hiciste y todo lo que harás. Toda la gloria, toda la honra y toda la alabanza siempre serán para ti.

Índice

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT	11
LISTA DE ABREVIACIONES	17
INTRODUCCIÓN	25
1. Medicina regenerativa y células troncales.....	25
2. Células Troncales Mesenquimales (MSCs).....	26
3. Criterios de identificación de las Células Troncales Mesenquimales	27
4. Fuentes de obtención de las Células Troncales Mesenquimales	27
5. Mecanismos de acción de las Células Troncales Mesenquimales.....	29
5.1. Capacidad de diferenciación de las Células Troncales Mesenquimales	30
5.2. Actividad paracrina de las Células Troncales Mesenquimales.....	31
5.2.1. Inmunomodulación.....	31
5.2.2. Activación de las células troncales propias del tejido lesionado	32
5.2.3. Homing.....	32
5.2.4. Efectos antimicrobianos	33
5.2.5. Angiogénesis	33
5.2.6. Efecto antiapoptótico.....	33
5.3. Interacción célula a célula mediante nanotubos.....	34
5.4. Transferencia de moléculas mediante vesículas extracelulares	34
6. Las Células Troncales Mesenquimales en medicina regenerativa	35
7. Las Células Troncales Mesenquimales como tratamiento de la Nefropatía Diabética	36
8. Efecto del preacondicionamiento en hipoxia sobre las Células Troncales Mesenquimales..	38
JUSTIFICACIÓN.....	43
HIPÓTESIS	47
OBJETIVOS.....	51
1. Objetivo general	51
2. Objetivos específicos	51
MATERIALES Y MÉTODOS	55
1. Metodología general	55
1.1. Diseño experimental	55

2. Metodología específica: Estudio <i>In vitro</i>	56
2.1. Modelo animal de inducción de Diabetes Mellitus tipo 2 para el aislamiento y cultivo de ASCs	56
2.2. Caracterización fenotípica por citometría de flujo	58
2.3. Caracterización funcional de las ASCs.....	60
2.3.1. Diferenciación adipogénica.....	60
2.3.2. Diferenciación osteogénica	60
2.4. Determinación de la tasa de duplicación celular	61
2.5. Estudio de la capacidad angiogénica	61
2.6. Estudio de la actividad paracrina de las ASCs	62
2.7. Estudio de la capacidad migratoria.....	65
2.8. Perfil de expresión génica mediante hibridación en microarrays.....	66
2.8.1. Estudio de enriquecimiento funcional y de vías moleculares para los DEGs.....	67
2.8.2. Análisis con ClusterProfiler	68
2.8.3. Construcción de redes de interacción de proteica (PPI, Protein-Protein Interaction Network)	69
3. Metodología específica: Estudio <i>In Vivo</i>	70
3.1. Modelo animal de Nefropatía Diabética.....	70
3.2. Análisis de parámetros bioquímicos	71
3.3. Trasplante de células a ratas con daño renal.....	72
3.4. Estudio morfológico semicuantitativo	73
3.5. Análisis ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión	75
4. Análisis estadístico (Excepto microarrays)	75
RESULTADOS.....	79
1. Resultados estudio <i>In Vitro</i>	79
1.1. Caracterización fenotípica de las ASCs.....	79
1.2. Caracterización funcional de las ASCs.....	79
1.3. Tasa de duplicación de las ASCs.....	80
1.4. Capacidad Angiogénica	81
1.5. Cuantificación de la secreción de factores de crecimiento en sobrenadantes	82
1.6. Estudio de la capacidad migratoria de las ASCs	86
1.7. Estudio vías moleculares	88
1.7.1. Expresión génica global e identificación de los DEGs	88
1.7.2. Análisis de enriquecimiento y construcción de las PPI	89
A.- Resultados análisis del grupo 1 (ASCs-CH vs. ASCs-CN).....	89

a) Análisis de enriquecimiento con Interfaz web DAVID.....	89
b) Análisis de enriquecimiento con clusterProfiler.....	90
c) Construcción de las redes de PPI.....	90
B.- Resultados análisis del grupo 2 (ASCs-DH vs. ASCs-DN).....	91
a) Análisis de enriquecimiento con el interfaz web DAVID.....	91
b) Análisis de enriquecimiento con clusterProfiler.....	91
c) Construcción de las redes de PPI.....	91
C.- Resultados análisis del grupo 3 (ASCs-DN vs. ASCs-CN).....	93
a) Análisis de enriquecimiento con el interfaz DAVID.....	93
b) Análisis de enriquecimiento con clusterProfiler.....	95
c) Construcción de las redes de PPI.....	95
D.- Resultados análisis del grupo 4 (ASCs-DH vs. ASCs-CH).....	96
a) Análisis de enriquecimiento con interfaz web DAVID.....	96
b) Análisis de enriquecimiento con ClusterProfiler.....	98
c) Construcción de las redes de PPI.....	98
2. Resultados estudio <i>In vivo</i>	100
2.1. Peso corporal y marcadores bioquímicos	100
2.2. Estudio morfológico semicuantitativo	106
2.3. Análisis ultraestructural del tejido renal	113
DISCUSIÓN.....	119
CONCLUSIONES	139
CONCLUSIONS.....	143
BIBLIOGRAFÍA.....	147
ANEXO 1	161
ANEXO 2.....	194
ANEXO 3.....	204
ANEXO 4.....	210

Resumen

RESUMEN

1. Antecedentes

La Nefropatía Diabética (ND) constituye una de las complicaciones más severas de la diabetes mellitus (DM), y es la principal causa de insuficiencia renal crónica en el mundo.

Los métodos convencionales de tratamiento de la ND, solo son capaces de retrasar su evolución, por lo tanto el paciente llegará a requerir alguna terapia de sustitución renal. En ese contexto el uso de células troncales mesenquimales (MSCs) ha emergido como una alternativa prometedora para el tratamiento de la ND.

La DM es una alteración metabólica sistémica que está estrechamente relacionada con el deterioro de la funcionalidad de las MSCs limitando su posible administración autóloga. Por tal motivo, se hace imprescindible establecer técnicas que permitan restaurar o reducir las alteraciones sobre la funcionalidad de las MSCs provocadas por la DM.

La mayoría de los protocolos de cultivo de las MSCs mantienen a las células a una concentración de oxígeno igual a la atmosférica, del 20% al 21% (normoxia). No obstante, *in vivo* éstas residen en un microambiente hipóxico entre el 1% al 5% de concentración de oxígeno.

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que el cultivo de MSCs en concentraciones de oxígeno cercanas a las fisiológicas mejora su funcionalidad, por lo tanto, el preacondicionamiento de MSCs en hipoxia, previo a su trasplante, podría mejorar los resultados de su aplicación.

Los resultados obtenidos de la presente tesis doctoral pretenden contribuir al conocimiento del efecto del preacondicionamiento hipóxico sobre la funcionalidad de MSCs derivadas de tejido adiposo (ASCs), procedentes de ratas diabéticas inducidas, y evaluar su efectividad terapéutica en un modelo animal inducido de ND.

2. Objetivos

Evaluar el efecto, *in vitro*, del preacondicionamiento hipóxico sobre la funcionalidad de las ASCs obtenidas de ratas diabéticas y sanas; y su eficacia terapéutica *in vivo*, en un modelo murino de ND inducida por estreptozotocina (STZ).

3. Materiales y métodos

Para el estudio *in vitro* se aislaron ASCs de ratas Wistar isogénicas sanas (ASCs-C), y diabéticas (ASCs-D). Ambas poblaciones celulares fueron expandidas hasta el pase 2 en normoxia (N=21% O₂). En ese punto las células fueron divididas en dos grupos. Uno fue mantenido en normoxia y el otro fue preacondicionado en hipoxia (H=3% O₂) durante 48h, generándose así cuatro grupos experimentales de células: ASCs-CN, ASCs-CH, ASCs-DN y ASCs-DH.

Las poblaciones celulares fueron caracterizadas fenotípica y funcionalmente por citometría de flujo y por ensayos de diferenciación, respectivamente. Así mismo, se llevaron a cabo estudios de duplicación celular, angiogénesis, secreción de factores paracrinos y migración. Con la finalidad de identificar los cambios genómicos de cada uno de los cuatro tipos de células, se desarrolló un estudio de microarrays, para lo que se establecieron cuatro grupos comparativos: grupo 1. ASCs-CH vs. ASCs-CN, grupo 2. ASCs-DH vs. ASCs-DN, grupo 3. ASCs-DN vs. ASCs-CN y grupo 4. ASCs-DH vs. ASCs-CH. Una vez identificada la expresión diferencial de genes (DEGs) de cada grupo comparativo, se llevó a cabo un estudio bioinformático de enriquecimiento con el interfaz web DAVID y la herramienta clusterProfiler. Además, se construyeron redes de interacción proteica (PPI) con la herramienta STRING.

En el punto de partida del experimento *in vivo* (día 0), los animales fueron divididos aleatoriamente en un grupo control conformado por ratas sanas (C) y otro formado por ratas a las que se les indujo ND.

El día 15 del estudio los animales pertenecientes al grupo de ratas ND fueron randomizados y divididos en cinco subgrupos de tratamiento por lo que el estudio *in vivo* quedó formado por seis grupos experimentales: grupo 1. Ratas sanas control que recibieron placebo (Solución fisiológica) (C+P), grupo 2. Ratas ND que recibieron placebo (ND+P), grupo 3. Ratas ND tratadas con ASCs-CN (ND+ASCs-CN), grupo 4. Ratas ND tratadas con ASCs-CH (ND+ASCs-CH), grupo 5. Ratas ND tratadas con ASCs-DN (ND+ASCs-DN) y grupo 6. Ratas ND tratadas con ASCs-DH (ND+ASCs-DH).

Durante todo el estudio se monitorizó el peso, la glucosa, urea y creatinina en sangre, y la albúmina en orina. Esta última fue corregida por la creatinina (ratio albúmina/creatinina). También se calculó el incremento/decremento neto de estos parámetros el día 30 respecto al día 15 y el día 45 respecto del día 30.

Finalmente, el día 45 se sacrificaron a los animales y se extrajeron muestras de tejido renal para la realización de un estudio histológico con microscopía óptica y electrónica de transmisión.

4. Resultados

Respecto a la caracterización los resultados mostraron que tanto las ASCs-C como las ASCs-D cultivadas en normoxia o hipoxia mantuvieron su perfil citométrico y su capacidad de diferenciación a adipocitos y osteoblastos.

La cuantificación de la tasa de duplicación no fue alterada en las ASCs-C o las ASCs-D por las condiciones de cultivo.

Respecto a la capacidad angiogénica de las ASCs, los resultados mostraron que la exposición a la hipoxia incrementó significativamente la capacidad de formación de estructuras tubulares, tanto en las ASCs-C como en las ASCs-D. Se observó también una menor capacidad angiogénica en las ASCs-D, independientemente de las condiciones de cultivo, en comparación con sanas.

En general la cuantificación de factores de secreción demostró que el precondicionamiento en hipoxia no modificó significativamente la secreción de VEGF, IL-6, EGF, HGF,IDO e IGF-1 por las ASCs-D respecto a sus homólogas cultivadas en condiciones normoxia. Sin embargo, la secreción de VEGF por parte de las ASCs-D fue menor en relación a las ASCs-C cuando ambas fueron cultivadas en hipoxia. Por otro lado, la secreción de IL-6 fue significativamente mayor por parte de las ASCs-D en comparación a las ASCs-C, en ambas condiciones de cultivo. También, se encontró una reducción significativa de la secreción de EGF por las ASCs-D en relación a las ASCs-C en normoxia.

Los ensayos de migración hacia el VEGF no mostraron diferencias significativas ni por las condiciones de cultivo, ni por el estado de salud de las células. Al contrario, las ASCs-D mostraron una capacidad de migración hacia el SDF-1 significativamente menor respecto a las ASCs-C tras el precondicionamiento en hipoxia. De los resultados derivados del ensayo de migración al factor EPO no se obtuvieron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones realizadas.

El análisis bioinformático del grupo 1 (ASCs-CH vs. ASCs-CN) arrojó un total de 498 DEGs, un enriquecimiento de términos relacionados con la membrana celular y una infrarrepresentación de términos vinculados con la mitosis. Además, las interacciones proteicas

entre el Abcc9-Kcnj8 y el Cenpk-Cenpn fueron las más representativas en la construcción de sus PPIs con los DEGs sobre y subexpresados, respectivamente.

El estudio bioinformático del grupo 2 (ASCs-DH vs. ASCs-DN) mostró un total de 201 DEGs y el único resultado significativo derivó de la construcción de PPI con los DEGs sobreexpresados donde la interacción entre Ntrk1-Adora2a fue la más representativa.

Respecto al estudio realizado en el grupo 3 (ASCs-DN vs. ASCs-CN) los resultados mostraron un total de 444 DEGs, así como, el enriquecimiento y la infrarrepresentación de términos relacionados con la glicosilación proteica y la regulación positiva de la expresión génica, respectivamente. En cuanto a la construcción de PPIs, las interacciones entre Blnk-Dapp1 y Hist1h3c-Hist2h4 fueron las más significativas de los DEGs sobre y subexpresados, respectivamente.

La comparación con herramientas bioinformáticas del grupo 4 (ASCs-DH vs. ASCs-CH) reveló un total de 2213 DEGs. Además del enriquecimiento y la infrarrepresentación de términos vinculados con la glicosilación proteica y la regulación positiva de la expresión génica, respectivamente. También el uso de la herramienta clusterProfiler mostró el enriquecimiento de la vía de interacción ligando-receptor neuroactivo de la vía del ribosoma y de la vía del calcio y la infrarrepresentación de la vía de infección por virus linfotrófico humano de células T tipo 1, de la vía de desregulación transcripcional en cáncer y de la vía del factor de necrosis tumoral. Respecto a la construcción de PPIs, las interacciones entre Rpl11-Rps5 y Kdr-Vegfa fueron las más significativas para los DEGs sobre y subexpresados, respectivamente.

El estudio *in vivo* mostró que el día 0 del modelo, el peso y los parámetros bioquímicos de todos los animales incluidos en el trabajo se encontraban dentro de valores normales. También se evidenció que entre el día 15 y el día 45, las ratas pertenecientes a los grupos ND inducidos con STZ (ND+P, ND+ASCs-CN, ND+ASCs-CH, ND+ASCs-DN y ND+ASCs-DH) mostraron una reducción significativa y constante de la ganancia de peso, así como un incremento significativo y sostenido de sus valores de glucosa en sangre y albúmina en orina, que no se vieron afectados por ninguno de los tratamientos suministrados.

Los resultados derivados de la cuantificación de urea y creatinina en sangre, así como del cálculo del incremento/decremento neto de los parámetros bioquímicos no mostraron cambios significativos a lo largo de todo el estudio.

En general, el análisis semicuantitativo realizado en el tejido renal de los diferentes grupos experimentales mostró una reducción significativa de lesiones renales claramente

identificadas como expansión mesangial, mesangiolisis, necrosis tubular aguda, presencia de microaneurismas y depósitos tubulares, cambio a células claras, engrosamiento de la membrana basal tubular y glomerulomegalia en el grupo de ratas con ND inducida que habían recibido alguno de los tratamientos celulares, independientemente del tipo celular administrado. Pero también se observó que el grupo tratado con ASCs-CH presentó una mayor reducción de ciertas lesiones como el cambio a células claras y la glomerulomegalia. Además, la reducción de lesiones renales como la presencia de quistes tubulares, de fibrosis intersticial y de infiltrado inflamatorio resultó estadísticamente significativa en el grupo de ratas ND tratadas con ASCs-CH respecto al grupo ND-placebo.

Los resultados de la microscopía electrónica mostraron la ultraestructura del intenso daño renal causado por la ND e identificó las lesiones más características de este cuadro.

5. Conclusiones

El presente estudio demuestra que el preconditionamiento en hipoxia no afecta al fenotipo ni a la funcionalidad de las ASCs *in vitro*. Además, con el modelo experimental de ND se ha demostrado que la inyección intravenosa de ASCs derivadas de ratas sanas y preconditionadas durante 48 horas en hipoxia posee un efecto beneficioso sobre la recuperación del daño renal.

Abstract

ABSTRACT

1. Background

Diabetic Nephropathy (DN) is one of the most severe complications of diabetes mellitus (DM), and it is the leading cause of chronic kidney disease all over the world.

Unfortunately, the current treatments of DN are just effective in delaying the progression of diabetic kidney disease to the subsequent establishment of end stage renal disease where patients would require renal replacement therapy. With the emergence of cell-based therapy, mesenchymal stem cells (MSCs) hold remarkable potential for modifying the evolution of DN and even in repairing injured kidney tissue.

DM is a metabolic disorder which is associated with functional abnormalities of MSCs. Thus, the use of autologous MSCs in diabetic patients might be limited. Therefore, it is required to establish techniques which restore diabetes-dependent alterations on MSCs functionality.

The physiological microenvironment where MSCs are located *in vivo* present a lower oxygen concentration ranging from 1% to 5% (hypoxia) than most of the best practice for cellular culture, commonly performed under normoxia (20-21% O₂). Several *in vitro* studies have reported that the culture of MSCs under hypoxia conditions increase their capabilities. Therefore, hypoxic preconditioning of MSCs prior to their transplantation could generate better therapeutic outcomes.

The results obtained from this doctoral thesis are intended to determine the effects of hypoxia preconditioning in the adipose-derived MSCs (ASCs) capacities isolated from diabetic-induced rats and to analyze their therapeutic effectiveness in a murine model of DN.

2. Objectives

To evaluate the effects of hypoxic preconditioning on the functionality, *in vitro*, of ASCs obtained from diabetic and healthy rats, and their therapeutic efficacy in a murine model of streptozotocin (STZ)-induced DN.

3. Materials and methods

Firstly, in the *in vitro* study, ASCs were obtained from healthy isogenic Wistar rats (ASCs-C) and diabetic rats (ASCs-D). ASCs-C and ASCs-D were isolated and cultured to

passage 2 under normoxia (N=21% O₂): In this point, ASCs were divided into two groups: The N group continued at the same culture conditions but the hypoxia group were preconditioned under hypoxia (H=3% O₂) for 48h. As a result, four *in vitro* study groups were established: ASCs-CN, ASCs-CH, ASCs-DN and ASCs-DH.

All ASCs were characterized phenotypically and functionally by flow cytometry and differentiation assays, respectively. With the purpose of analyze their *in vitro* capacities population doubling (PD), angiogenesis, paracrine activity and migration assays were carried out.

To identify the molecular changes of each study group, a microarray study was developed. Thus, four comparative groups were established: group 1. ASCs-CH vs. ASCs-CN, group 2. ASCs-DH vs. ASCs-DN, group 3. ASCs-DN vs. ASCs-CN and group 4. ASCs-DH vs. ASCs-CH. After differentially expressed genes (DEGs) identification from each comparative group, a bioinformatics enrichment study was carried out using DAVID and clusterProfiler tools. In addition, the protein-protein interaction networks (PPIs) were constructed using STRING.

On day 0, considered as the starting point of the *in vivo* study, the animals were randomly divided in two groups: healthy rats (C) and DN rats. 15 days after diabetic induction, all animals included in ND group were randomized into 5 groups according to the specific treatment to receive. So, finally, 6 experimental groups were formed: Group 1. Healthy control rats which received placebo (saline solution) (C+P), Group 2. DN rats which received placebo (DN+P), Group 3. DN rats treated with ASCs-CN (DN+ASCs-CN), Group 4. DN rats treated with ASCs-CH (DN+ASCs-CH), Group 5. DN rats treated with ASCs-DN (DN+ASCs-DN) and Group 6. DN rats treated with ASCs-DH (DN+ASCs-DH).

Throughout the *in vivo* study weight, blood parameters (glucose, urea and creatinine) levels, as well as urinary albumin were measured. The levels of urine albumin were normalized by creatinine (albumin/creatinine ratio). It was also calculated the net increase/decrease of these parameters on day 30 with compared to day 15 and day on 45 with compared to day 30.

Finally, on day 45 all animals were sacrificed, and samples of renal tissue were extracted for the development of a histological study on the basis of optical and electronic microscopy.

4. Results

Regarding phenotypic and functional characterization, the results showed that ASCs-C and ASCs-D cultured in normoxia or hypoxia conditions maintained their cytometric profile and their capacity to differentiate into adipocytes and osteoblasts.

The results derived from PD quantification of ASCs showed that culture conditions did not significantly affect any of both cell types, regardless of the culture conditions.

The angiogenic capacity of ASCs showed that hypoxia preconditioning significantly increased the number of tubular structures formed by both cell types, and besides that, in both culture conditions, the ASCs-D showed a significantly lower capacity to form tubular structures than healthy ASCs.

The quantification of growth factors secreted by ASCs showed that hypoxia preconditioning did not modify the secretion capacity of VEGF, IL-6, EGF, HGF, IDO and IGF-1 by ASCs-D in relation to their counterparts cultured in normoxia. Moreover, it was observed a significant reduction of VEGF and EGF secretion by ASCs-D in relation to ASCs-C in hypoxia and normoxia conditions, respectively. On the contrary, ASCs-D secreted higher levels of IL-6 in both culture conditions.

Regarding to the migration assays performed with the VEGF, SDF-1 and EPO chemoattractants, the migratory capacity analyzed in ASCs-D showed that hypoxia preconditioning did not improve this capacity in relation to ASCs-C, regardless the culture conditions. But a lower migration capacity in ASCs-D toward SDF-1 in comparison to ASCs-C, after hypoxic preconditioning was observed.

The bioinformatics analysis of group 1 (ASCs-CH vs. ASCs-CN) revealed a total of 498 DEGs, the overrepresentation (OR) of cell membrane-related terms and the underrepresentation (UR) of mitosis-related terms. In addition, the protein interactions between Abcc9-Kcnj8 and Cenpk-Cenpn were the most significant in the construction of their PPIs with up- and down-regulated DEGs, respectively.

The bioinformatics study of group 2 (ASCs-DH vs. ASCs-DN) showed a total of 201 DEGs and just a significant results in the construction of PPIs with up-regulated DEGs, where the interaction between Ntrk1-Adora2a was the most significant.

The enrichment study of group 3 (ASCs-DN vs. ASCs-CN) showed a total of 444 DEGs, terms related to protein glycosylation and positive regulation of gene expression for OR and UR terms, respectively. Regarding the construction of PPIs, the interactions between Blnk-Dapp1 and Hist1h3c-Hist2h4 were the most significant of the up- and down-regulated DEGs, respectively.

The study of group 4 (ASCs-DH vs. ASCs-CH) revealed a total of 2213 DEGs. and terms linked to protein glycosylation and positive regulation of gene expression as OR and UR terms,

respectively. In addition, the clusterProfiler tool showed OR the ligand-receptor neuroactive interaction pathway, the ribosome pathway and the calcium pathway, and the UR of the human lymphotropic virus type 1 infection pathway, the transcriptional deregulation pathway in cancer, and the tumor necrosis factor pathway. Furthermore, the PPIs construction revealed that interactions between Rpl11-Rps5 and Kdr-Vegfa as the most significant for up and down regulated DEGs, respectively.

The *in vivo* study showed that on day 0, the body weight and the levels of the biochemical markers were corresponded to values of healthy animals. Furthermore, 15, 30 and 45 days after STZ-injection, ND-induced rats' groups (DN+P, DN+ASCs-CN, DN+ASCs-CH, DN+ASCs-DN and DN+ASCs-DH) showed a significant reduction of their weight gain, and a significant increase in blood glucose levels and urine albumin excretion, regardless of the treatment administrated.

The results derived from the measurement of blood and creatinine levels, as well as, of the quantification of the net increase/decrease of biochemical parameters did not suffer substantial changes during all study.

Results derived from semiquantitative study performed on renal tissue showed a significant reduction of the mesangial expansion, mesangiolysis, microaneurysms, acute tubular necrosis, tubular deposits, clear cells change, and glomerulomegaly in DN-rat groups after cellular treatment, regardless the cell type administered, in comparison to DN-induced rats treated with placebo. The most significant reduction was observed in DN-rat groups treated with ASCs-CH for the clear cells changes and glomerulomegaly. All cellular treatments produced a reduction of tubular cysts, interstitial fibrosis and inflammatory infiltration, however these semiquantitative results were not statistically significant. Nonetheless, ASCs-CH showed greater effectiveness in reducing these lesions achieving significance in all cases.

The ultrastructural analysis performed by electron microscopy displayed the severe damaged produced by DN and identified its most characteristics histological lesions.

5. Conclusions

The current study demonstrates that hypoxia preconditioning affects neither phenotype nor functionality of *in vitro* cultured ASCs. Furthermore, the experimental model of diabetic nephropathy reveals that intravenous administration of hypoxia-preconditioned ASCs for 48 hours isolated from healthy rats possesses a beneficial effect on renal recovery.

Lista de abreviaciones

LISTA DE ABREVIACIONES

Abcc9	Transportador dependiente de ATP subfamilia C miembro 9.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	ADN complementario.
Adora2a	Receptor de adenosina A2A.
AGEs	Productos finales de glicosilación avanzada.
Ang-1	Angiopoetina-1.
APC	Aloficocianina.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNc	ARN complementario.
ASCs	Células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo.
ASCs-CH	ASCs controles preacondicionadas en hipoxia.
ASCs-CN	ASCs controles cultivadas en normoxia.
ASCs-DH	ASCs diabéticas preacondicionadas en hipoxia.
ASCs-DN	ASCs diabéticas cultivadas en normoxia.
ATN*	Acute tubular necrosis.
ATP	Adenosín trifosfato.
BH	Benjamini-Hochberg.
Blnk	Proteína adaptadora Blnk.
BMMSCs	Células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea.
BS*	Bowman's space.
BUN	Nitrógeno ureico en sangre.
BW*	Body weight.
C	Controles.
C+P	Ratas control a las que se les aplicó solución salina.
C+P*	Control rats which received placebo (saline solution).
CCR7	Receptor de quimiocinas C-C tipo 7.
CE	Célula endotelial.
CENP	Proteína centromérica.
Cenpk	Proteína centromérica K.
CENPN	Proteína centromérica N.

CG	Capilar Glomerular.
CHEK1	Serina/treonina quinasa Chek1.
CI	Célula Inflamatoria.
CS	Puntuación combinada.
CT	Célula tubular.
CXCR4	Receptor de quimiocinas CXC tipo 4.
D	Diabéticas.
Dapp1	Adaptador dual de fosfotirosina y 3 fosfoinosítidos 1.
DAVID	The database for annotation, visualization and integrated discovery.
DEGs	Expresión diferencial de genes.
DM	Diabetes mellitus.
DM1	Diabetes mellitus tipo 1.
DM2	Diabetes mellitus tipo 2.
DN*	Diabetic Nephropathy.
DN+ASCs-CH*	ND rats which were treated with ASCs-CH.
DN+ASCs-CN*	ND rats which were treated with ASCs-CN.
DN+ASCs-DH*	ND rats which were treated with ASCs-DH.
DN+ASCs-DN*	ND rats which were treated with ASCs-DN.
DN+P*	ND rats which received placebo (saline solution).
E	Eritrocito.
E*	Erythrocyte.
EB	Espacio de Bowman.
EC*	Endothelial cell.
ECh	Canal de evidencia.
EF	Endotelio fenestrado.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
EM	Expansión mesangial.
EMBT	Engrosamiento membrana basal tubular.
EPO	Eritropoyetina.
ESAM	Molécula de adhesión selectiva de células endoteliales.
ETs	Estructuras tubulares.
FBS	Suero bovino fetal.
FC	Cambios de proporción.

FDR	Tasa de descubrimientos falsos.
FE	Fenestrated endothelium.
FGFb	Factor de crecimiento fibroblástico básico.
Fgfr4	Receptor 4 del factor de crecimiento fibroblástico.
FITC	Isocianato de fluoresceína.
FS	Pérdida pedicelar: Fusión segmentaria.
FSC	Forward scatter (Tamaño celular).
G	Glomérulo.
G*	Glomerulus.
GC*	Glomerular capillary.
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos.
GLUT4	Proteína transportadora de glucosa tipo 4.
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.
GO	Gene ontology.
H	Hipoxia.
H&E	Tinción hematoxilina-eosina.
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos.
HIF	Factor inducible por hipoxia.
HIF-1 α	Factor inducible por hipoxia uno alfa.
HIF-2 α	Factor inducible por hipoxia dos alfa.
HIF-3 α	Factor inducible por hipoxia tres alfa.
HIF- α	Factor inducible por hipoxia alfa.
HIF- β	Factor inducible por hipoxia beta.
Hist1h3c	Histona H3.1.
Hist2h4	Histona H4.
HLA	Antígeno leucocitario humano.
HLA-II	Antígeno leucocitario humano tipo 2.
HRE	Elemento de respuesta a hipoxia.
HRP	Peroxidasa de rábano picante.
HTLV-1	Virus linfotrófico humano de células T tipo 1.
IC*	Inflammatory cell.
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa.
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico-1.
IL-10	Interleucina 10.

IL-1R2	Receptor de IL-1 tipo 2.
IL-6	Interleucina 6.
IL-8	Interleucina 8.
IP	Intraperitoneal.
IPr	Ioduro de propidio.
iPSCs	Células troncales pluripotentes inducidas.
IRC	Insuficiencia renal crónica.
ISCT	Sociedad internacional de terapia celular.
IV	Intravenosa.
Kcnj8	Canal de potasio dependiente de voltaje, subfamilia J miembro 8.
Kdr	Receptor de dominio de inserto quinasa.
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes.
KGF	Factor de crecimiento queratinocítico.
LL-37	Catelidina.
LT	Luz tubular.
M	Microaneurisma.
M*	Microaneurysm.
MC	Medio condicionado.
MCN*	Mesangial cell nucleus.
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1.
MCP-3	Proteína quimiotáctica de monocitos 3.
MDM2	Doble minuto murino.
Me	Mesangio.
ME*	Mesangial expansion.
Me*	Mesangium.
Mir15a	MicroRNA 15a.
Mir16	MicroRNA 16.
MMPs	Enzimas metaloproteinasas.
MO	Médula ósea.
MSCs	Células troncales mesenquimales.
N	Normoxia.
NCM	Núcleo célula mesangial.
ND	Nefropatía diabética.
ND+ASCs-CH	Ratas ND a las que se les aplicó ASCs-CH.

ND+ASCs-CN	Ratas ND a las que se les aplicó ASCs-CN.
ND+ASCs-DH	Ratas ND a las que se les aplicó ASCs-DH.
ND+ASCs-DN	Ratas ND a las que se les aplicó ASCs-DN.
ND+P	Ratas ND a las que se les aplicó solución salina.
NEK2	Serina/treonina quinasa Nek2.
NF- κ B	Factor nuclear kappa B.
NGF	Factor de crecimiento nervioso.
NK	Células asesinas naturales.
NO	Óxido nítrico.
NOS	Óxido nítrico sintasa.
NR4A1	Receptor nuclear huérfano 4A1.
NTA	Necrosis tubular aguda.
Ntrk1	Receptor de tirosina quinasa 1.
O ₂	Oxígeno.
OR*	Overrepresented.
P	Podocito.
P*	Podocyte.
PAC	Células proangiogénicas.
PAS	Tinción con ácido peryódico de Schiff.
PBS	Tampón fosfato salino.
PD	Tasa de duplicación.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
Pe	Pedícelos.
Pe*	Pedícel.
PET	Tereftalato de polietileno.
PGE2	Prostaglandina E2.
PIGF	Factor de crecimiento placentario.
PPI	Red de interacción proteica.
RAGE	Receptor de los productos finales de glicosilación avanzada.
RD	Retinopatía diabética.
Rpl11	Proteína ribosomal L11.
Rps5	Proteína ribosomal S5.
SAEX	Servicio de animales de experimentación.
SCAI	Servicio central de apoyo a la investigación.

SDF-1	Factor derivado de células estromales-1.
SEM	Error estándar de la media.
SFPE*	Segmental foot process effacement.
SMART	Simple Modular Architecture Research Tool.
SSC	Side scatter (complejidad o granulosidad celular).
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins.
STZ	Estreptozotocina.
TA	Tejido adiposo.
TC*	Tubular cell.
TGF α	Factor de crecimiento transformante alfa.
TGF β	Factor de crecimiento transformante beta.
TL*	Tubular lumen.
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa.
TRE	Elemento sensible al Tax.
TSR	Terapia de sustitución renal.
TTBM*	Thickening of tubular basement membrane.
UR*	Underrepresented.
US	The United States.
VCAM-1	Proteína de adhesión celular vascular 1.
VE	Vesículas extracelulares.
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular.
Vegfa	Factor de crecimiento endotelial vascular A.

** Estos acrónimos son utilizados en la sección de anexos 1; donde figuran los gráficos, tablas e imágenes de resultados derivados de la presente tesis en idioma inglés.*

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Medicina regenerativa y células troncales

La medicina regenerativa es la rama de las ciencias médicas que plantea alternativas terapéuticas para patologías en las que no se dispone de tratamiento, o bien, las terapias disponibles son poco efectivas [1]. Se trata de un área multidisciplinar que emplea genes, proteínas o células con la finalidad de restaurar o reemplazar tejidos dañados debido a traumas, enfermedades subyacentes o envejecimiento. El estudio y aplicación terapéutica de células troncales constituyen su base principal [2].

Las células troncales se definen como un grupo de células no especializadas o indiferenciadas que presentan dos propiedades principales que las diferencian del resto de tipos celulares, que son las siguientes: capacidad de autorrenovación, es decir, degenerar una copia exacta de sí mismas, y la capacidad de producir células maduras especializadas bien definidas [1, 3].

Las células troncales pueden ser clasificadas según su potencialidad o capacidad de diferenciación en:

- Células troncales totipotentes: Son aquellas que aparecen en las etapas iniciales del desarrollo embrionario previas a la fase de blastocisto. Poseen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo celular derivado de una de las tres capas germinales del tejido embrionario (endodermo, mesodermo y ectodermo), y también en estructuras embrionarias como placenta y el cordón umbilical [1]. Por lo tanto, son capaces de generar un individuo completo [4].
- Células troncales pluripotentes: Son aquellas capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular derivado de las tres capas germinales, pero no en células de estructuras embrionarias como placenta y cordón umbilical [1].
- Células troncales multipotentes: Este tipo celular posee la capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares derivados de una única capa germinal [5]. Estas células se encuentran parcialmente diferenciadas [1].

- Células troncales oligopotentes: Son aquellas que pueden diferenciarse en unos pocos linajes celulares [6].
- Células troncales unipotentes: Son células progenitoras que solamente pueden diferenciarse en un único linaje celular. Este grupo celular se encuentra en diferentes tejidos del organismo y su función es la de actuar como reservorio de células troncales durante la vida del mismo [1].

Otra forma de clasificación de las células troncales es según su origen:

- Células troncales embrionarias: Son células totipotentes que se obtienen en las primeras etapas del desarrollo del embrión previas al blastocisto [1], y pueden diferenciarse en linajes celulares de las tres capas germinales (ectodermo, endodermo y mesodermo) [6].
- Células troncales germinales: Son células que pueden aislarse de la línea embrionaria de producción de óvulos y espermatozoides [1].
- Células troncales fetales: Son aquellas que se pueden aislar de órganos y tejidos fetales. Presentan características similares a sus homologas encontradas en tejidos adultos [1].
- Células troncales adultas: Son células multipotenciales que persisten en el individuo adulto, en calidad de reservorio natural, y están disponibles a lo largo de la vida del organismo [1]. Juegan un rol fundamental en la regeneración y reparación de tejidos lesionados. A este grupo pertenecen las células troncales mesenquimales [6].

2. Células Troncales Mesenquimales (MSCs)

Entre las décadas de los 60s y 70s del siglo XX comenzó el estudio de las células troncales mesenquimales, siendo la médula ósea (MO) el primer reservorio identificado de este tipo celular en organismos adultos [7]. Friedenstein y colaboradores fueron los primeros en aislar y describir esta población celular como células adherentes con morfología fibroblastoide, y con la habilidad de crecer rápidamente *in vitro* formando colonias [7-11].

Considerando que esta población celular tiene la capacidad de diferenciarse en varios tipos celulares del tejido conectivo de diversos órganos, el profesor de biología de la Universidad Case Western Reserve, Arnold I. Caplan propuso el término en inglés "mesenchymal stem cells" (MSCs) para su denominación, término que en español ha sido traducido, entre otros, como células troncales mesenquimales [7, 12, 13]. Sin embargo, años después el propio Arnold I. Calpan haciendo énfasis en su actividad señalizadora paracrina, sugirió renombrarlas como

"Medical Signaling Cells" puesto que se considera a esta cualidad como la principal responsable de su acción terapéutica [7, 14, 15].

Actualmente, dentro de la literatura científica la abreviación en inglés MSCs también se puede interpretar como *multipotent stromal cells*, *mesenchymal stromal cells*, *marrow stromal cells*, *mesodermal stem cells*, entre otros [14].

3. Criterios de identificación de las Células Troncales Mesenquimales

Hoy en día, todavía existe algo de controversia relacionada con la nomenclatura y las características de las células troncales mesenquimales. En este contexto, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, International Society for Cellular Therapy) estableció en 2006 los criterios mínimos que debían cumplir las células troncales mesenquimales para su identificación. Estos criterios fueron ampliamente aceptados por la comunidad científica [7] y son los siguientes [15, 16]:

- Capacidad de adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo (5% de CO₂ y 37°C de temperatura).
- El total de la población de las células en cultivo debe expresar positividad para los antígenos de superficie CD73, CD90 y CD105 en un porcentaje igual o mayor al 95% y negatividad para los antígenos de superficie CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79α o CD19 y el antígeno leucocitario humano (HLA, Human Leukocyte Antigen) de clase II en un porcentaje igual o mayor al 98%.
- Capacidad *in vitro* de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condrocitos en condiciones de diferenciación estándar. La diferenciación debe ser demostrada con el uso de tinciones específicas para cada grupo celular, siendo aceptadas las técnicas de Alizarín Red y de Von Kossa para osteoblastos, Oil Red O para adipocitos y Alcian blue e inmunquímica para condroblastos.

4. Fuentes de obtención de las Células Troncales Mesenquimales

La MO fue la fuente primaria de obtención y aislamiento de MSCs. En este órgano linfóide las MSCs se ubican en nichos adyacentes al endotelio sinusoidal, y se desarrollan en estrecha relación con las células troncales hematopoyéticas [15]. No obstante, actualmente se ha demostrado su presencia en una amplia variedad de tejidos y secreciones del organismo adulto como el tejido adiposo (TA), la sangre periférica, la pulpa dental, los ligamentos amarillos, la sangre menstrual, el endometrio y la leche materna, entre otros. También se han podido aislar

MSCs de secreciones y tejidos fetales tales como el líquido amniótico, las membranas fetales, las vellosidades coriónicas, la placenta, el cordón umbilical, la gelatina de Wharton y la sangre del cordón umbilical [7].

Aunque en términos generales, las MSCs de origen adulto y fetal poseen características similares, las MSCs derivadas del feto parecen presentar una mayor tasa de proliferación respecto a las procedentes de tejidos adultos [17].

A la fecha, las MSCs obtenidas de MO (BMMSCs, Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells) son las más ampliamente estudiadas y caracterizadas, sin embargo, debido a que su obtención implica procedimientos altamente invasivos (aspiración de MO a través de punción de la cresta ilíaca) y a su limitado número dentro de la misma, entre el 0.001% al 0.01% del total de células mononucleadas, las MSCs derivadas del TA (ASCs, Adipose Tissue-derived Stromal Cells) se han convertido en una de las alternativas más prometedoras debido a la gran cantidad de tejido adiposo presente en diversos puntos anatómicos, que, además, son fácilmente accesibles [18], y a la alta concentración de MSCs presentes en el TA, aproximadamente 500 veces más que en MO [12]. En 2001, Zuk y colaboradores fueron los primeros en identificar y caracterizar las ASCs [11, 12, 19, 20].

Aunque se ha documentado que las BMMSCs y las ASCs comparten numerosas características biológicas, se han observado también algunas diferencias entre ambas poblaciones celulares [12]. Por ejemplo ha sido descrito que las características genéticas de las ASCs son más estables en condiciones estándar de cultivo, incluso cuando estos son de larga duración [12, 21], y, además, las ASCs presentan una capacidad proliferativa aumentada y retardación del proceso de senescencia respecto a las BMMSCs [12].

Por otro lado, en relación con la capacidad de diferenciación, aún no ha sido definido si alguno de estos dos tipos celulares presenta mayor capacidad de diferenciarse hacia algún linaje en particular. Existen estudios que indican que las BMMSCs tienen una mayor habilidad para diferenciarse a osteoblastos y las ASCs a adipocitos [22-24], no obstante, otros estudios no observaron tales diferencias [25, 26]. Strioga y colaboradores, adjudican estas discrepancias a los diferentes métodos de obtención de las MSCs y a los distintos protocolos de diferenciación usados por cada equipo de investigación [12]. La tabla 1 muestra las principales diferencias entre BMMSCs y ASCs.

	BMMSCs	ASCs
Invasividad del procedimiento de obtención	Alta (Intraósea)	Baja (subcutánea)
Concentración en el tejido de origen	Baja (0.001% al 0.01%)	500 veces más que en la médula ósea.
Estabilidad genética	Menos estable	Más estable
Capacidad proliferativa	Reducida	Aumentada
Senescencia	Adelantada	Retardada

Tabla 1. Principales diferencias entre BMMSCs y ASCs: Datos extraídos de la revisión bibliográfica de Strioga y colaboradores. *Stem cell and development*, 2012 [12].

5. Mecanismos de acción de las Células Troncales Mesenquimales

En un inicio se pensaba que el principal mecanismo de acción terapéutica de las MSCs consistía en su capacidad de diferenciarse hacia células funcionales del órgano lesionado, promoviendo así su regeneración. Sin embargo, varios estudios demostraron que una vez infundidas, la supervivencia y la capacidad de diferenciación de las MSCs en células funcionales era bastante reducida, por ello se dedujo que este mecanismo por sí solo no era suficiente para explicar la eficacia terapéutica que se había observado hasta ese momento [27, 28].

Dexter y colaboradores [29], mediante estudios de cocultivo *in vitro*, por primera vez demostraron que las MSCs eran capaces de promover el crecimiento, viabilidad y multipotencialidad de células troncales hematopoyéticas, y concluyeron que estas observaciones reflejaban una acción paracrina de las MSCs. Actualmente, se acepta que además de su capacidad de diferenciación y su función paracrina, las MSCs poseen otras propiedades que podrían tener un efecto regenerativo como la interacción con otras células mediante nanotubos y la liberación de microvesículas o vesículas extracelulares (VE) [27], constituyendo en su conjunto los mecanismos de acción terapéutica de las MSCs (Figura 1).

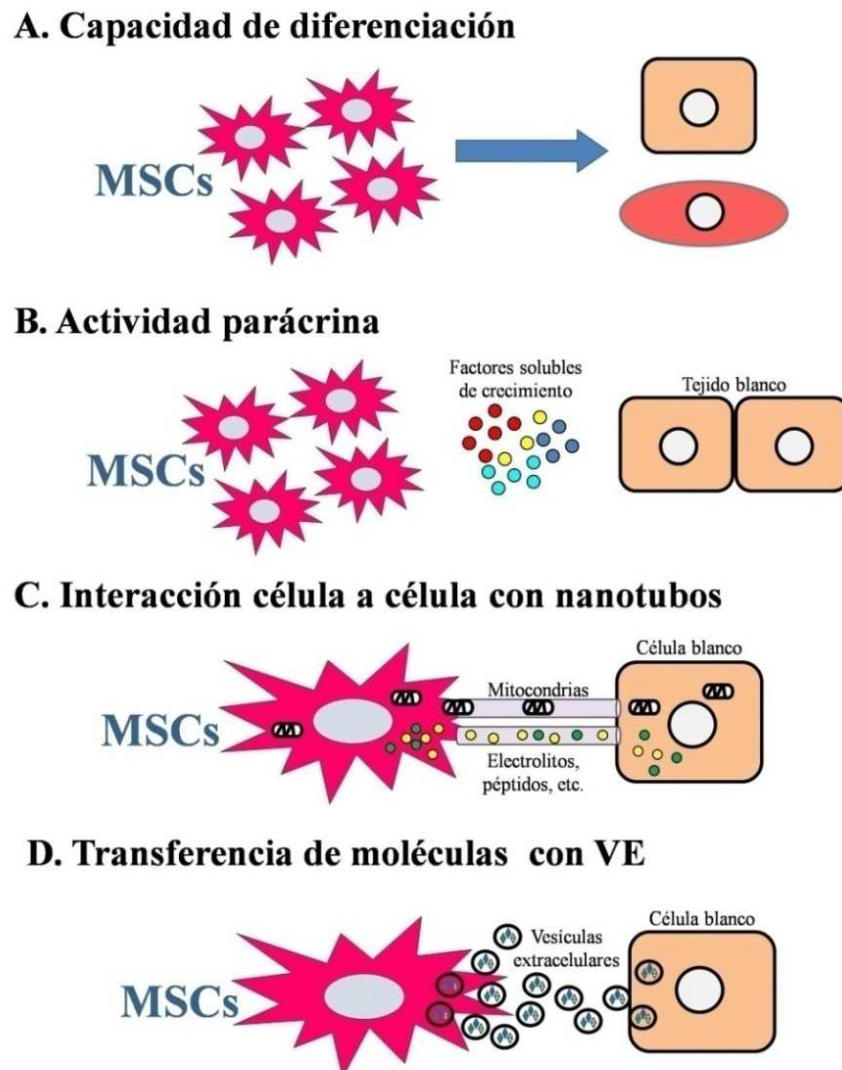


Figura 1. Mecanismos de acción de las MSCs: Adaptado de la revisión bibliográfica de Spees y colaboradores. *Stem cell research and therapy*, 2016, 7:15 [27].

5.1. Capacidad de diferenciación de las Células Troncales Mesenquimales

Como se mencionó previamente en el apartado de "Criterios de identificación de las Células Troncales Mesenquimales", las MSCs expandidas *in vitro* en condiciones estándar tienen un potencial innato de diferenciación hacia osteoblastos, adipocitos y condrocitos [7, 15, 16]. Se ha observado, además, que las MSCs sometidas a ciertas condiciones específicas de cultivo

pueden diferenciarse incluso a otros tipos celulares [7]. Como muestran los estudios realizados por Caplan y Dennis, donde las MSCs son capaces de diferenciarse en mioblastos, células del estroma de la MO y fibroblastos mediante un proceso que denominaron "mesengénesis" [30]. Otros estudios han demostrado la capacidad de las MSCs para diferenciarse a hepatocitos, células de los islotes pancreáticos y neuronas. Según estos resultados, las MSCs presentan capacidad de diferenciación a linajes celulares de las tres capas germinales: ectodermo, endodermo y mesodermo [7]. A pesar de estos estudios y la probada gran plasticidad celular de las MSCs, sigue existiendo un cierto escepticismo respecto a la funcionalidad que pueden tener las MSCs diferenciadas a linajes no mesodérmicos como a células de tejido nervioso, dado que aún no se tiene claro si las MSCs diferenciadas a neuronas son capaces de generar un potencial de acción comparable al de una neurona madura [15].

5.2. Actividad paracrina de las Células Troncales Mesenquimales

Las MSCs secretan una amplia variedad de moléculas bioactivas relacionadas con el proceso regenerativo y terapéutico. De hecho, varios autores consideran este mecanismo como el principal por el cual las MSCs ejercen su efecto terapéutico [31, 32].

Los factores secretados son capaces de producir diferentes efectos y algunos de ellos solo son liberados en condiciones específicas [33] (Figura 2).

5.2.1. Inmunomodulación

Las MSCs sintetizan una serie de citoquinas con capacidad inmunomoduladora entre las que se encuentran el factor de crecimiento transformante beta ($TGF\beta$, Transforming Growth Factor β), la interleucina 10 (IL-10, Interleukin 10), la prostaglandina E2 (PGE2, Prostaglandin E2), la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO, Indoleamine 2,3-dioxygenase), el óxido nítrico (NO, Nitric Oxide) y los miembros de la familia del factor de necrosis tumoral FAS y su ligando FASL [34] que actúan inhibiendo la función y la proliferación de linfocitos B y T, de células dendríticas, células asesinas naturales (NK, Natural Killer), monocitos, neutrófilos y macrófagos.

Es interesante el hecho que el efecto inmunomodulador de la MSCs sobre los macrófagos además de provocar su inhibición en ciertos momentos puede también estimular su expresión de genes vinculados con la fagocitosis macrófágica lo que incrementa su capacidad de eliminar agentes bacterianos [35].

Por otro lado, las MSCs son responsables también de la secreción de factores involucrados en la reducción del proceso fibrótico. Entre éstos se encuentran el factor de crecimiento queratinocítico (KGF, Keratinocyte Growth Factor), el factor de crecimiento de

hepatocitos (HGF, Hepatocyte Growth Factor), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor), la angioproteína-1 (Ang-1, Angioproten-1), el factor derivado de células estromales-1 (SDF-1, Stromal Cell-derived Factor-1), el factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1, Insulin-like Growth Factor), el factor de crecimiento epidérmico (EGF, Epidermal Growth Factor), el factor de crecimiento nervioso (NGF, Nerve Growth Factor) y el factor de crecimiento transformante α (TGF α , Transforming Growth Factor α) [7].

5.2.2. Activación de las células troncales propias del tejido lesionado

A través de la secreción de múltiples factores de crecimiento y citoquinas, las MSCs son capaces de estimular cambios favorables en el microambiente celular estimulando la proliferación, movilización y activación de células troncales residentes en el tejido lesionado. Entre estos factores los más destacables son el VEGF, IGF-1 y el HGF [35].

5.2.3. Homing

Para que las MSCs desempeñen su rol regenerativo de forma más efectiva deben aproximarse al tejido dañando [28]. El adjetivo en inglés "Homing", que se traduce al español como "buscador" [36], es usado con frecuencia para referirse al proceso que consiste en la migración selectiva de las MSCs hacia un tejido lesionado, y a su secreción sostenida de factores quimiotácticos. Se puede dividir a este proceso en tres etapas. La primera consiste en la migración selectiva de las MSCs hacia el tejido diana mediante la acumulación de factores quimiotácticos y citoquinas como son EGF, IGF, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF, Platelet-derived Growth Factor), VEGF, SDF-1, el factor de necrosis tumoral α (TNF α , Tumor Necrosis Factor α), las ILs-1, 6 y 8. Otros factores que son capaces de estimular la migración de las MSCs son la proteína de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1, Vascular cell Adhesion Molecule 1), la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1, Monocyte Chemoattractant Protein 1), la proteína quimiotáctica de monocitos 3 (MCP-3, Monocyte Chemoattractant Protein 3), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, Granulocyte Colony-stimulating Factor) y la hipoxia, factor físico comúnmente presente en el microambiente de los tejidos lesionados. Es importante destacar que el SDF-1 y el TNF α además de estimular la migración de las MSCs, inducen la expresión de receptores específicos como el receptor de quimioquinas CXC tipo 4 (CXCR4, CX Chemokine Receptor 4) y el receptor de quimioquinas C-C tipo 7 (CCR7, C-C Chemokine Receptor 7), respectivamente, potenciando aún más la movilización de las MSCs.

En la segunda etapa las MSCs se adhieren al tejido mediante selectinas e integrinas y en la tercera y última etapa, se infiltran en el tejido diana a través de la secreción de las enzimas metaloproteinasas (MMPs, Matrix Metalloproteinases) y de sus inhibidores [35].

5.2.4. Efectos antimicrobianos

En respuesta a agentes patógenos las MSCs secretan péptidos capaces de provocar la disrupción de la pared bacteriana. Entre estos encontramos a la catelidina (LL-37) y la lipocalina 2 [35].

5.2.5. Angiogénesis

Las MSCs secretan una amplia gama de factores solubles angiogénicos. Entre éstos se encuentran el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF, Basic Fibroblast Growth Factor), VEGF, TGF- β , PDGF, la angiopoyetina 1 (ANG-1, Angiopoyetin 1), el factor de crecimiento placentario (PIGF, Placental Growth Factor), IL-6, HGF, MCP-1 [37] y SDF-1. Estos factores contribuyen al mantenimiento del sistema vascular y a la formación de nuevos vasos [35].

5.2.6. Efecto antiapoptótico

Otro de los efectos de la actividad paracrina de las MSCs es la inhibición de la muerte celular programada en el tejido a regenerar con el fin de preservar su funcionalidad. Entre los factores vinculados a la inhibición de la apoptosis están el VEGF, HGF, IGF, TGF- β , FGF, IL-6 y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Estos factores estimulan los mecanismos de reparación del ADN, reducen la expresión de vías moleculares de muerte mitocondrial y regulan la expresión de proteínas anti y pro apoptóticas [35].

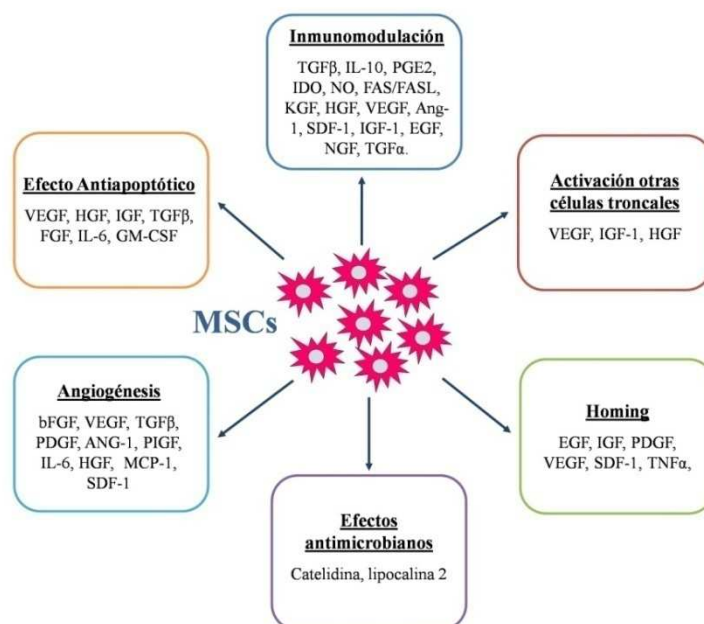


Figura 2. Factores bioactivos secretados por MSCs.

5.3. Interacción célula a célula mediante nanotubos

Los nanotubos son estructuras membranosas de 50 a 200 nm de diámetro capaces de interconectar y transferir componentes celulares a células adyacentes [38].

Spees y colaboradores [39] en 2005 describieron la capacidad de las MSCs de transferir mitocondrias funcionales a células que presentaban defectos en su cadena respiratoria mitocondrial. Actualmente, se ha demostrado que las MSCs son capaces de llevar a cabo este proceso *in vivo* transfiriendo también moléculas como péptidos, electrolitos y ácidos nucleicos, dando como resultado una reducción del daño en el tejido lesionado [27].

5.4. Transferencia de moléculas mediante vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares son estructuras membranosas derivadas de la membrana celular liberadas por un gran número de células somáticas. El término "vesículas extracelulares", engloba a una población heterogénea de estructuras que pueden categorizarse según su tamaño y origen. Se denominan "exosomas" cuando presentan un diámetro de 30 a 100 nm y son de origen endocítico, "microvesículas" cuando presentan un diámetro de 50 a 1000 nm y no son de origen endocítico, y "cuerpos apoptóticos" cuando miden entre 1 y 5 μm de diámetro y son liberados durante el proceso de apoptosis [27].

Las vesículas extracelulares pueden contener, y, por tanto transferir, una amplia variedad de factores de crecimiento, proteínas, lípidos y material genético que favorecen la regeneración tisular, la recuperación y la reperfusión de tejidos y órganos lesionados [37].

De forma particular, los exosomas derivados de las MSCs están generando un gran interés dentro de la comunidad científica debido a que ha sido demostrado que poseen la capacidad de reducir la inflamación y de estimular la proliferación celular durante el proceso de reparación tisular [27].

6. Las Células Troncales Mesenquimales en medicina regenerativa

Desde su descubrimiento en la década de los 70s, las técnicas de extracción, cultivo e inducción para la diferenciación de las MSCs han mejorado considerablemente. Además, se han producido importantes avances en el área de la biología molecular y las técnicas de trasplante celular. Todo esto, ha impulsado y facilitado su uso como herramienta terapéutica en medicina regenerativa [20].

Las vías de administración de las MSCs varían según el efecto deseado. La administración sistémica se ha utilizado cuando el objetivo es conseguir un efecto de amplio espectro y simultáneo en varias partes del organismo como en patologías autoinmunes. Por el contrario, la administración local ha sido seleccionada cuando es necesaria una acción más específica y localizada como la revascularización posterior al infarto agudo de miocardio. La ingeniería de tejidos también se ha utilizado como mecanismo complementario en la administración de MSCs [15].

El material usado para la conformación del producto celular a trasplantar es otro punto importante referente al uso de MSCs en terapia celular. El trasplante autólogo implica la administración de células aisladas del mismo individuo por lo que no genera respuesta inmunitaria y garantiza la no transmisión de enfermedades infecciosas. Sin embargo, el trasplante autólogo generalmente hace uso de células aisladas de pacientes aquejados por alguna comorbilidad (enfermedad subyacente, medicación o senilidad) lo que dificulta la obtención de un número suficiente de células para obtener el efecto terapéutico deseado dado que la capacidad proliferativa de estas células suele ser reducida. En ese contexto y considerando que ciertas patologías requieren un trasplante urgente, el uso terapéutico de células alogénicas de donantes sanos, sometidas a múltiples controles de calidad y previamente criopreservadas, son una fuente de la que se podría disponer rápidamente para la obtención de una mejor calidad del producto celular así como una cantidad suficiente de células [32].

Aunque se ha demostrado que la transfusión de un producto celular de MSCs alogénicas genera cierta respuesta inmunitaria, esta reacción inmunológica no suele ser importante y está más relacionada con el proceso de cultivo y expansión de las MSCs que con el producto celular en sí. Actualmente se consideran a las MSCs como células immuno-privilegiadas por su capacidad de evadir y/o suprimir el sistema inmunitario al carecer, como ya se ha mencionado, del antígeno HLA-II responsable de la inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa. Según la bibliografía publicada, aproximadamente en el 40% de los ensayos clínicos relacionados con distintas patologías, las MSCs de origen alogénico han sido seleccionadas para su infusión y tratamiento de las distintas patologías, según la base de datos del US National Institute of Health (www.clinicaltrials.gov) [32].

La tabla 2 muestra un resumen de las principales ventajas y desventajas del trasplante autólogo y alogénico.

Trasplante autólogo		Trasplante alogénico	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
No necesita estudios de compatibilidad de HLA.	Procedimientos invasivos adicionales para el paciente.	Disponibilidad inmediata.	Requiere donantes sanos.
No presenta riesgos de enfermedad de injerto contra huésped.	Costo adicional para el paciente.	Posibilidad de suministrar múltiples dosis.	Riesgo de generar respuesta inmunitaria.
No presenta riesgos de contagio de patología trasmisible.	Demoras en la aplicación de la terapia celular.	Pocos efectos adversos.	Riesgo de rechazo del producto celular.
Sin riesgo de reacción inmunitaria.	Imposibilidad de suministrar múltiples dosis.	Bajo costo para el paciente.	Riesgo de enfermedad de injerto contra huésped.
	Capacidades celulares reducidas debido a comorbilidades.	Evita procedimientos invasivos adicionales al paciente.	

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los trasplantes celulares autólogos y alogénicos: Adaptación de la revisión bibliográfica de Marta Kot y colaboradores. *International Journal of Molecular Science*. 2019, 20, 5680 [32].

7. Las Células Troncales Mesenquimales como tratamiento de la Nefropatía Diabética

La diabetes mellitus (DM) es una patología metabólica caracterizada por la elevación de glucosa en sangre y comúnmente se clasifica en dos tipos. La DM tipo 1 (DM1) se asocia con alteraciones en la producción de insulina como consecuencia de la destrucción de las células β del páncreas a causa de un proceso autoinmune mediado por células T. Por otro lado, la DM tipo

2 se caracteriza por la reducción celular de la sensibilidad a la insulina (resistencia a la insulina) y por alteraciones en su producción [40].

La nefropatía diabética (ND) es una de las complicaciones vasculares más severas de las DM [41] y representa la principal causa de insuficiencia renal crónica (IRC) en el mundo, incrementando además la mortalidad en pacientes diabéticos [42, 43].

Aproximadamente el 30% de pacientes con DM1 y entre el 30% al 40% de pacientes con DM2 sufren o sufrirán ND [44].

En seres humanos, este trastorno se caracteriza por la presencia de albuminuria elevada y persistente (>300mg/24h), hipertensión arterial sistémica, hipertensión intraglomerular y alteraciones sustanciales macro y microscópicas en la estructura del riñón como hipertrofia renal, engrosamiento de la membrana basal tubular, atrofia tubular, glomeruloesclerosis [41, 45, 46] e infiltrado inflamatorio [46, 47].

Debida a su alta concentración sistémica la glucosa tiende a formar uniones no enzimáticas con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Los productos resultantes de esta unión son los denominados productos finales de glicosilación avanzada (AGEs, Advanced Glycation End-products), responsables principales del desarrollo de la ND [46].

La acumulación de AGEs produce cambios degenerativos y alteraciones funcionales en el glomérulo a través de la sobreexpresión de su receptor RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products) en células mesangiales, tubulares y podocitos, desencadenando una intensa reacción inflamatoria que dará lugar a la fibrosis del tejido renal [48].

Los métodos disponibles en la actualidad para tratar la ND están orientados en su mayoría al control de las alteraciones metabólicas y hemodinámicas que acompañan este cuadro, es decir, a mantener los niveles de glucosa en sangre y presión arterial dentro de rangos cercanos a los fisiológicos. Por lo tanto, estos tratamientos solo retardan la evolución de la ND y el establecimiento posterior de la IRC [46, 49], estado en el que los pacientes pueden llegar a requerir terapia de sustitución renal (TSR) [49]. Lamentablemente, la TSR está ligada a costes elevados y es de difícil acceso en países en vías de desarrollo. Se estima que aproximadamente 5.4 millones de personas requerirán de la TSR en el año 2030 [50]. Por todo ello, existe una necesidad imperiosa de desarrollar nuevos métodos terapéuticos para preservar el normal funcionamiento renal, detener la evolución de la ND a IRC e incluso revertir los efectos lesivos de la glucosa sobre el riñón. Este hecho sin duda repercutiría en la calidad de vida de los pacientes y en la reducción de los costes sanitarios. Por todo ello, la terapia celular basada en la

administración de MSCs representa una estrategia atractiva para lograr estos objetivos como se ha demostrado con numerosos estudios realizados en diferentes modelos animales en los que se ha observado que la aplicación de MSCs previene y/o revierte la evolución de la ND [10, 41, 43, 49, 51-53] a través de sus propiedades inmunomoduladoras, antiapoptóticas [10, 53] y de su capacidad de promover directamente la proliferación de las células del parénquima renal [53]. Estas observaciones destacan el importante rol de la señalización paracrina dependiente de las MSCs sobre el tejido renal lesionado.

Desafortunadamente, la diabetes está estrechamente asociada con la alteración en la homeostasis de las MSCs [11, 54-57] debida a la producción de AGEs y al incremento del estrés oxidativo como consecuencia de la elevación sistémica de la concentración de glucosa [11, 54]. En este sentido, las MSCs derivadas de pacientes diabéticos presentan una mayor susceptibilidad a sufrir senescencia celular y apoptosis además de tener una menor capacidad de diferenciación a linajes mesodérmicos [10, 11]. Estos hechos podrían limitar el uso autólogo de las MSCs. Por lo tanto, futuras investigaciones deberían estar orientadas a desarrollar técnicas para restaurar la funcionalidad de las MSCs y de ese modo no descartar completamente el trasplante autólogo en pacientes diabéticos.

8. Efecto del precondicionamiento en hipoxia sobre las Células Troncales Mesenquimales

El metabolismo celular aeróbico es un proceso esencial de la fisiología celular que participa en la transformación de carbohidratos en energía. Proceso en el que el oxígeno constituye el sustrato esencial, por ello, todas las células requieren un adecuado suministro de oxígeno [58].

Para su aplicación en clínica, las MSCs deben ser inicialmente aisladas y posteriormente expandidas *in vitro*. La mayoría de los incubadores convencionales de laboratorio mantienen los cultivos celulares a una concentración de oxígeno igual a la atmosférica, entre el 20% al 21%, condición de cultivo que puede definirse como normoxia [59].

La normoxia genera un ambiente poco fisiológico para el crecimiento y desarrollo celular y puede llegar incluso a provocar estrés en las MSCs cultivadas *in vitro*. Existen evidencias que este estrés puede provocar senescencia prematura, daño en el ADN, reducción de la capacidad de duplicación de la población celular y una menor biodisponibilidad posterior al trasplante de las MSCs [9].

La tensión de oxígeno fisiológica en seres humanos es considerablemente más baja que la tensión atmosférica, es decir, es un microambiente hipóxico y varía entre un 1% en el cartílago y

médula ósea, y un 12% en sangre periférica [31]. En el tejido adiposo las ASCs residen en un microambiente hipóxico de entre el 1% y el 5% de O₂ [59]. En ese marco, el cultivo celular en normoxia podría ser un factor limitante en la efectividad y el uso de las ASCs como agentes terapéuticos.

La maquinaria celular está capacitada para responder a los cambios de oxígeno en su microambiente [58]. A nivel molecular el mayor regulador de la respuesta celular a la hipoxia es el factor inducible por hipoxia (HIF, Hypoxia Inducible Factor). El HIF controla la expresión de varios genes actuando como factor de transcripción mediante su unión al elemento de respuesta a hipoxia (HRE, Hypoxia Response Element) que es un componente presente en los promotores de sus genes diana. Estos genes están involucrados en una amplia variedad de funciones celulares como el metabolismo, la inflamación y la regulación hormonal, entre otros [60].

El complejo HIF está constituido por dos subunidades proteicas el HIF- α y HIF- β . Dentro de la subunidad HIF- α existen al menos tres subtipos HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α , siendo la primera la más activa y predominante [60]. De hecho, la sobreexpresión del HIF-1 α incrementa la viabilidad, proliferación, capacidad migratoria y biodisponibilidad de las MSCs [59]. La subunidad HIF- β tiene carácter constitutivo y no se suele ver afectada por las concentraciones de oxígeno [60].

Estudios publicados han demostrado que las ASCs precondicionadas en hipoxia tienen un menor riesgo de sufrir daño genómico además de presentar un menor potencial tumorigénico [59].

En cuanto a la actividad paracrina de las MSCs, existen trabajos que acreditan el rol de la hipoxia como modulador de su acción secretora, incrementando la síntesis y liberación de factores como el VEGF, bFGF, HGF, IGF y TGF- β por parte de las MSCs [37].

A pesar de todo lo mencionado, es evidente y necesario desarrollar más estudios con el fin de determinar las condiciones óptimas para el cultivo de MSCs y el posible efecto que puede tener la hipoxia en la restauración de las capacidades que presenten algún tipo de alteración en las MSCs derivadas de pacientes con comorbilidades.

Justificación

JUSTIFICACIÓN

La ND es una de las complicaciones más invalidantes de la DM; es caracterizada por la pérdida progresiva de la función renal hasta la IRC, estado en el que las terapias de sustitución renal (diálisis y trasplante renal) son los únicos tratamientos disponibles, que implican altos costes para el sistema de salud.

En los últimos años se han llevado a cabo numerosas investigaciones preclínicas y clínicas para determinar el grado de eficacia y seguridad de la administración de MSCs como tratamiento en una amplia variedad de patologías. La primera fuente de obtención de MSCs fue la MO, sin embargo, hoy en día, se ha demostrado la presencia de estas células troncales en distintos órganos y tejidos entre los cuales el TA representa una alternativa atractiva puesto que se puede obtener una gran cantidad de MSCs con procedimientos poco invasivos para el donante.

Son numerosos los estudios que han demostrado que la administración de MSCs logra prevenir o ralentizar el daño renal en modelos murinos de diabetes. En general estos trabajos sugieren que el tratamiento con MSCs supone una reducción de marcadores bioquímicos como la creatinina y la urea plasmática, y una remodelación glomerular sugestiva de regeneración tisular y/o funcional.

Una alteración de la homeostasis de las MSCs debida a un repetido y constante estímulo lesivo, como es el caso de la hiperglicemia, puede provocar un desequilibrio persistente en las MSCs desencadenando de ese modo alteraciones en su funcionalidad. Es de vital importancia buscar estrategias que permitan minimizar y/o revertir estas alteraciones.

Para su uso clínico, las MSCs deben ser aisladas y expandidas *in vitro*. Los protocolos de cultivo más habituales implican el uso de incubadores que mantienen los cultivos bajo unas condiciones de oxígeno (21% O₂ atmosférica) muy elevadas en comparación a las fisiológicas. En tal sentido, con el fin de replicar las concentraciones de oxígeno *in vivo* es necesario el uso de incubadores especiales que generen un ambiente hipóxico. Trabajos publicados en la literatura demuestran que MSCs derivadas de individuos sanos cultivadas bajo concentraciones de oxígeno similares a las fisiológicas (hipoxia, 1% al 5%), incrementan su capacidad angiogénica, migratoria y paracrina. Estos son los tres mecanismos por los que las MSCs ejercen un efecto terapéutico. Sin embargo, en la actualidad, no se registran estudios realizados en un modelo de

ND que evalúen el efecto de la hipoxia sobre la funcionalidad de las MSCs derivadas del TA de individuos diabéticos ni su eficacia terapéutica tras ser preconditionadas en hipoxia en un modelo de ND.

La justificación principal de este trabajo es, por tanto, analizar *in vitro* el efecto del preconditionamiento hipóxico sobre la funcionalidad de las MSCs derivadas del TA de individuos diabéticos y determinar *in vivo* su capacidad terapéutica en un modelo experimental de nefropatía diabética.

Hipótesis

HIPÓTESIS

El efecto del preconditionamiento en hipoxia sobre ASCs procedentes de ratas sanas y de ratas diabéticas podría inducir cambios a nivel funcional tanto *in vitro* como *in vivo* incrementando su eficacia tras ser administradas como tratamiento de la nefropatía diabética, potenciando y/o restaurando las propiedades regenerativas fisiológicas de las ASCs que se han podido ver reducidas por el microambiente patológico propio de la diabetes, o por los efectos de la manipulación *ex vivo*.

Objetivos

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar el efecto del preconditionamiento hipóxico sobre la funcionalidad y la eficacia terapéutica de ASCs en un modelo experimental de nefropatía diabética inducida por estreptozotocina.

2. Objetivos específicos

2.1 Objetivo específico 1:

Comparar el efecto *in vitro* del preconditionamiento hipóxico sobre el fenotipo, la funcionalidad y la expresión de determinadas rutas moleculares de las ASCs derivadas de ratas diabéticas y ratas sanas, respecto al cultivo en condiciones de normoxia.

2.1.1. Caracterizar fenotípica y funcionalmente las ASCs diabéticas y sanas preconditionadas en hipoxia.

2.1.2. Analizar la capacidad angiogénica, paracrina y migratoria de las ASCs diabéticas y sanas, en hipoxia.

2.1.3. Identificar las principales rutas moleculares implicadas en el preconditionamiento hipóxico en las ASCs derivadas de ratas diabéticas y sanas.

2.1.4. Identificar las rutas moleculares afectadas por la diabetes de las ASCs preconditionadas en hipoxia.

2.2. Objetivo específico 2:

Evaluar *in vivo* el efecto del preconditionamiento hipóxico sobre la eficacia terapéutica de las ASCs derivadas de ratas diabéticas y sanas en un modelo murino de nefropatía diabética inducida por estreptozotocina.

2.2.1. Analizar la capacidad de recuperación de la función renal tras la administración de ASCs derivadas de ratas diabéticas y sanas preconditionadas en hipoxia mediante la cuantificación de parámetros bioquímicos en sangre y orina.

2.2.2. Evaluar la capacidad de regeneración del tejido renal a través de un análisis histológico a nivel óptico y ultraestructural tras la administración de ASCs derivadas de ratas diabéticas y sanas preacondicionadas en hipoxia.

Materiales y métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Metodología general

1.1. Diseño experimental

El presente estudio ha sido realizado en dos fases:

✓ En la primera fase se desarrolló un estudio comparativo *in vitro* de caracterización inmunofenotípica, y un análisis funcional y de expresión génica de ASCs derivadas de ratas Wistar macho diabéticas tipo 2, inducidas con estreptozotocina (STZ) respecto a ASCs derivadas de ratas Wistar macho sanas, cultivados ambos tipos celulares bajo condiciones de normoxia (21% O₂) o preacondicionadas durante 48 horas en hipoxia (3% O₂) (Figura 3).

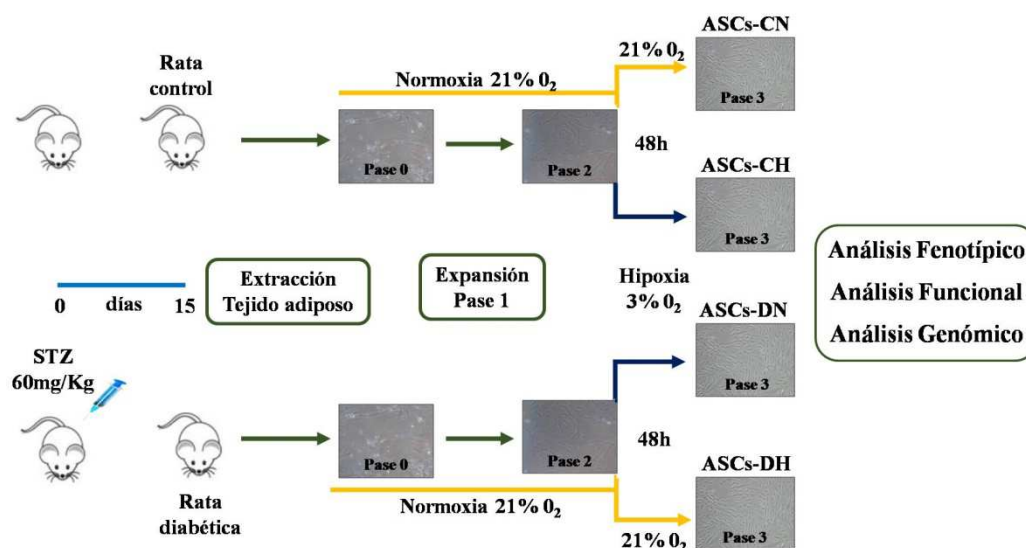


Figura 3. Diseño experimental estudio *in vitro*.

✓ En la segunda fase se comparó *in vivo* la eficacia terapéutica de las ASCs analizadas en el estudio *in vitro*, en un modelo experimental de nefropatía diabética inducida por STZ en ratas Wistar macho isogénicas. Con el fin de evaluar el efecto del tratamiento sobre la función renal se analizaron marcadores bioquímicos en sangre y orina, y se realizó un estudio histopatológico mediante microscopía óptica y electrónica (Figura 4). Las comparaciones se llevaron a cabo usando como referencia un grupo de animales sanos a los que se les administró un placebo como tratamiento.

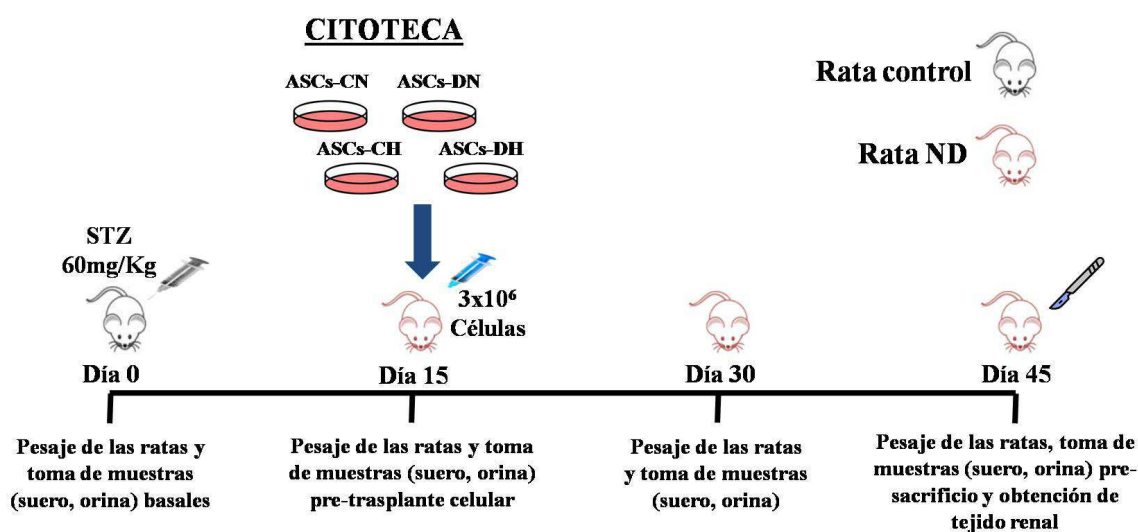


Figura 4. Diseño experimental estudio *in vivo*.

Todos los procedimientos experimentales llevados a cabo en este estudio fueron previamente aprobados por el Comité Andaluz de Experimentación Animal bajo la Dirección General de Producción Agrícola y Ganadera de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, según lo dispuesto en la normativa legal vigente, RD 223/1988 sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, con número de registro 06-08-15-266. Esta resolución de aprobación fue posteriormente revisada, según el RD 53/2013, por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba como órgano habilitado por la Dirección General de Producción Agrícola y Ganadera de la Junta de Andalucía para la evaluación de proyectos de experimentación animal.

2. Metodología específica: Estudio *In vitro*

2.1. Modelo animal de inducción de Diabetes Mellitus tipo 2 para el aislamiento y cultivo de ASCs

Para la realización del estudio *in vitro* se utilizaron un total de 30 ratas Wistar macho de dos meses de edad con un peso inicial de entre 180 a 200 gramos, estabuladas a una temperatura constante de 20°-22°C, con ciclos de luz/oscuridad de 17/7 horas con agua y comida *ad libitum*, en el animalario dependiente del Servicio de Experimentación Animal (SAEX) de la Universidad de Córdoba. Finalizado el periodo de aclimatación de 15 días, los animales fueron randomizados en dos grupos: Grupo ratas sanas (n=15) y Grupo ratas diabéticas (n=15). A las ratas incluidas en el grupo diabéticas se les administró una dosis de STZ de 60mg/kilogramo peso [61, 62] diluida

en 200 μ L de solución fisiológica (cloruro de sodio al 0.9%) por vía intraperitoneal (IP). La STZ es un compuesto de acción antibiótica caracterizado por presentar un efecto citotóxico similar al de la glucosa sobre las células β pancreáticas, muy utilizado como inductor de diabetes tipo I y II en determinadas especies de animales de laboratorio [63]. Transcurridos 15 días desde la administración de la STZ se confirmó el estado de diabetes cuantificando la concentración de glucosa en sangre con un glucómetro automático capaz de medir la glucosa en un rango de 20-500 mg/dL (FreeStyle Whitney, Oxon, UK). Todas las ratas presentaron niveles de glicemia >300 mg/dL, confirmando así el estado de diabetes inducido [64].

En este punto, a todas las ratas incluidas en el estudio (sanas y diabéticas) se les extrajo entre 1 y 2g de tejido graso de la almohadilla inguinal con la finalidad de aislar las ASCs para la realización de los estudios *in vitro* y generar una citoteca para el estudio *in vivo*.

Una vez extraído el TA, los animales fueron sacrificados mediante inyección de una dosis letal de tiopental sódico 50mg/kg IP, y posterior exanguinación a través la sección de la arteria aorta abdominal del animal. Se accedió a esta arteria mediante una incisión longitudinal en la línea media del abdomen de la rata.

El TA se homogenizó con la ayuda de un bisturí n° 4 sobre una placa de Petri estéril. La suspensión obtenida de este proceso, con las células de interés, fue centrifugada a 761 g durante 5 minutos en una centrífuga multifunción (Thermo Electron Corporation, BR4) con el fin de separar las células del estroma (pellet) de los adipocitos (sobrenadante). Posteriormente, el pellet fue resuspendido en una solución de colagenasa tipo I (Sigma-Aldrich) e incubado durante 60 min a 37°C en agitación constante. El tejido estromal ya digerido fue nuevamente centrifugado a 761 g durante 5 minutos y el pellet resultante se resuspendió en medio de cultivo α -MEM (BioWhittaker® LONZA, Verviers, Belgium) suplementado con suero fetal bovino (FBS, Fetal Bovine Serum; Gibco, Thermo Fisher Scientific) al 15%, 2mM de Ultra-Glutamina (BioWhittaker® LONZA, Verviers, Belgium), 0.1mg/mL de estreptomina, 100UI/mL de penicilina y 1ng/mL de factor de crecimiento fibroblástico-2 de rata (FGF-2, Fibroblast Growth factor-2), (Sigma-Aldrich) y, se cultivó en un ambiente humidificado al 21% de O₂, 5% de CO₂ y 37°C (condiciones estándar de cultivo). Este cultivo primario fue incubado durante 24h tras las cuales el medio de cultivo fue renovado y el cultivo fue mantenido hasta alcanzar el 80% de confluencia, realizando cambios de medio cada 2 o 3 días. Una vez alcanzada dicha confluencia, las células fueron tripsinizadas, lavadas y sembradas de nuevo en cultivo a una densidad de siembra de 6.67×10^4 células/cm² en frascos de cultivo (Thermo Fischer Scientific Nunc, Denmark) considerando este cultivo celular como pase 0. El nuevo cultivo se realizó bajo las

mismas condiciones hasta alcanzar el 80% de confluencia. En este punto, las células fueron de nuevo tripsinizadas y lavadas y se consideró éste como pase 1 del cultivo. Una parte de las suspensiones celulares resultantes fueron sembradas y cultivadas en las mismas condiciones de cultivo anteriormente descritas hasta el pase 2 de cultivo para la realización de los estudios *in vitro*, y otra parte fueron resuspendidas en solución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% en albúmina para su congelación (CRYOMED) y criopreservación a -196°C en nitrógeno líquido conformando así la citoteca destinada a los tratamientos celulares que serían posteriormente administrados en el estudio *in vivo*.

Las células mantenidas en cultivo en pase 2, tanto las derivadas de ratas sanas (ASC-C) como las de ratas diabéticas (ASCs-D), fueron categorizadas en dos grupos según las condiciones de cultivo en las que continuaron su expansión hasta el pase 3 de cultivo: el grupo normoxia (N), en el que las ASCs fueron mantenidas durante 7 días en cultivo en condiciones estándar de normoxia, y el grupo hipoxia (H), en el cual las ASCs fueron cultivadas durante 5 días en normoxia y dos días más (48 horas) en condiciones de hipoxia (3% de O_2) en el interior de una cabina hipóxica Biospherix (LTD I-glove/microscopechamber) a 37°C , 5% de CO_2 y atmósfera humidificada. Los cuatro grupos celulares experimentales resultantes fueron:

- Grupo 1. ASCs derivadas de ratas sanas (controles) cultivadas en normoxia (ASCs-CN).
- Grupo 2. ASCs derivadas de ratas sanas (controles) preacondicionadas 48h en hipoxia (ASCs-CH).
- Grupo 3. ASCs derivadas de ratas diabéticas cultivadas en normoxia (ASCs-DN).
- Grupo 4. ASCs derivadas de ratas diabéticas preacondicionadas 48h en hipoxia (ASCs-DH).

Una vez que todos los cultivos alcanzaron el 80% de confluencia, las ASCs fueron tripsinizadas y lavadas, obteniendo el pase 3 de cultivo en el cual se realizaron los experimentos del estudio *in vitro*.

2.2. Caracterización fenotípica por citometría de flujo

La caracterización inmunofenotípica de las ASCs de cada grupo experimental se analizó mediante identificación y cuantificación de marcadores de membrana por citometría de flujo con la utilización de un citómetro de flujo MACsQuant (Miltenyi Biotec).

Para el marcaje de los distintos tipos celulares, las ASCs cultivadas en pase 3 fueron resuspendidas en tampón fosfato salino (PBS, Phosphate Buffered Saline) a una concentración de 5×10^5 células/100 μL , y se repartieron en siete tubos de polipropileno (NAFVSM, Nijmegen,

The Netherlands). Las células fueron marcadas con 5 μ l de anticuerpos monoclonales anti-rata conjugados con los fluorocromos Isocianato de fluoresceína (FITC) y alofococianina (APC) del siguiente modo:

- Tubo 1: Control isotópico (negativo).
- Tubo 2: Control negativo, anticuerpo secundario IgG-FITC (IgG negativa).
- Tubo 3: Anticuerpo CD34-FITC (Santa Cruz, Biotechnology, Dallas, Texas, USA).
- Tubo 4: Anticuerpo CD29-FITC (BD Pharmingen, Bioscience, San Diego, California).
- Tubo 5: Anticuerpo CD90-APC (BD Pharmingen, Bioscience, San Diego, California).
- Tubo 6: Anticuerpo primario CD73 y anticuerpo secundario IgG-FITC (BD Pharmingen, Bioscience, San Diego, California).
- Tubo 7: Anticuerpo CD45-FITC (BD Pharmingen, Bioscience, San Diego, California).

Una vez añadidos los distintos marcadores, las ASCs se incubaron durante 15 minutos en un ambiente oscuro a 4°C. Finalizada la incubación, se añadieron 2mL de PBS a cada tubo y se centrifugaron durante 5 minutos a 761 g en una centrifuga multifunción (Thermo Electron Corporation, BR4). Seguidamente se decantó el sobrenadante con el exceso de anticuerpo y se añadieron 200 μ L de PBS a cada tubo.

En el tubo 6, al tratarse de un marcaje secundario, una vez incubado el anticuerpo primario (CD73 ligado a IgG) la muestra fue marcada con el anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo FITC, repitiendo el proceso de incubación y centrifugación realizado en el paso anterior.

Para determinar la viabilidad celular se añadieron 5 μ L de yoduro de propidio (IPr, Sigma, St. Louis, USA) a cada tubo, siendo consideradas como células vivas aquellas que resultaron IPr negativas. Finalmente, las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo analizando al menos 10000 eventos para cada marcador.

El tamaño celular (FSC, Forward Scatter) y la complejidad del citoplasma (SSC, Side Scatter) fueron identificados con la medición de la dispersión frontal y lateral respectivamente, del haz de luz (láser) que incide sobre las células durante la adquisición en el citómetro de flujo.

Los resultados fueron analizados con el software MACS Quantify, Versión 2.5.

2.3. Caracterización funcional de las ASCs

La caracterización funcional de las ASCs se llevó a cabo a través del análisis de su potencial de diferenciación hacia linajes adipogénico y osteogénico con el uso de medios de cultivo específicos para cada caso.

2.3.1. Diferenciación adipogénica

Para analizar el potencial de diferenciación adipogénico, las ASCs de cada uno de los 4 grupos de estudio fueron sembradas en pase 3 en placas de cultivo de seis pocillos (BD Falcon™ Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) a una densidad de 1×10^5 células en 2 mL de medio de diferenciación adipocítico (Differentiation Media Bullet Kit-Adipogenic, Lonza).

El medio de diferenciación adipocítico fue renovado cada 72h durante unos 15-20 días hasta evidenciar la aparición de vacuolas de grasa intracelulares en las ASCs diferenciadas a adipocitos. Estas células diferenciadas fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y teñidas con Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), para identificar las vesículas de grasa intracitoplasmáticas. Además, para el reconocimiento de los núcleos, las células fueron teñidas con hematoxilina y lavadas posteriormente para eliminar todos los restos de colorante.

Las células teñidas fueron analizadas en un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE2000-S), cuyo objetivo está acoplado a una cámara fotográfica (Nikon DS-U2) con la que se obtuvieron al menos 10 imágenes por muestra a un aumento de 200X. El análisis cualitativo de las imágenes digitalizadas adquiridas fue realizado con el software NIS-Elements 3.2.

2.3.2. Diferenciación osteogénica

Para realizar el ensayo de diferenciación osteogénica, las ASCs en pase 3 de cultivo fueron sembradas en placas de seis pocillos (BD Falcon™ Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) a una densidad de 1×10^5 células en 2 mL de medio de diferenciación osteogénico (Differentiation Media Bullet Kit-Osteogenic, Lonza). El medio de cultivo específico de diferenciación fue renovado cada 72h y el cultivo fue mantenido entre 15 y 20 días hasta observar en el cultivo de las ASCs diferenciadas una desorganización de la matriz ósea y depósitos de calcio. Para confirmar el proceso de diferenciación, las células fueron fijadas con etanol frío al 70% y los depósitos de calcio fueron teñidos con Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Se realizó un análisis cualitativo observacional con un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE2000-S) cuyo objetivo está acoplado a una cámara fotográfica (Nikon DS-U2) con la

que se obtuvieron al menos 10 imágenes por muestra a un aumento de 200X. Las imágenes fueron digitalizadas y analizadas con el software NIS-Elements 3.2.

2.4. Determinación de la tasa de duplicación celular

El estudio de la tasa de duplicación (PD, Population Doubling) de las ASCs se realizó usando la siguiente fórmula [65]:

$$PD = \text{Log}_{10} \frac{N^{\circ} \text{de células sembradas}}{N^{\circ} \text{de células obtenidas}} \times 3.33$$

Para el cálculo de la tasa de duplicación se consideró en el numerador de la fórmula el número de células sembradas al inicio del pase 3, y en el denominador al número de células obtenidas tras el proceso tripsinización, finalizado el cultivo del pase 3.

En todos los cultivos realizados, independientemente del grupo de estudio, el número inicial de células sembradas fue 5×10^5 , suspendidas en 15mL de medio de cultivo completo α MEN en frascos de 75 cm².

El número final de ASCs obtenidas una vez concluido el cultivo se realizó mediante recuento celular en cámara de Neubauer y la viabilidad celular se determinó con la tinción celular por exclusión del Azul Tripán. Se excluyeron del cálculo las células muertas identificadas por su tinción positiva con el colorante Azul Tripán.

2.5. Estudio de la capacidad angiogénica

La capacidad angiogénica de las ASCs fue analizada mediante la utilización de un kit comercial (Endothelial Tube Formation Assay Kit, Cell Biolabs) siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. De forma resumida, el matrigel (ECM gel solution) suministrado en el kit fue descongelado lentamente a 4°C. Posteriormente se añadieron 50µL del matrigel a cada uno de los pocillos seleccionados en una placa de 96 pocillos y se incubó durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂ para favorecer la solidificación del matrigel. Finalizada la incubación, las ASCs procedentes de cada grupo experimental, en pase 3 de cultivo, se sembraron sobre el matrigel solidificado a una densidad de 4×10^4 células, resuspendidas en 150µL de medio α -MEM completo sin FGF-2, y se volvieron a incubar a 37°C y 5% de CO₂ durante 3h. Finalizada la incubación, se realizó el conteo de las estructuras tubulares formadas en el matrigel, observando

cada uno de los pocillos de la placa de 96 en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-S, a un aumento de 200X (Figura 5).

Todos los experimentos se realizaron por duplicado y se calculó el promedio de ambos conteos.

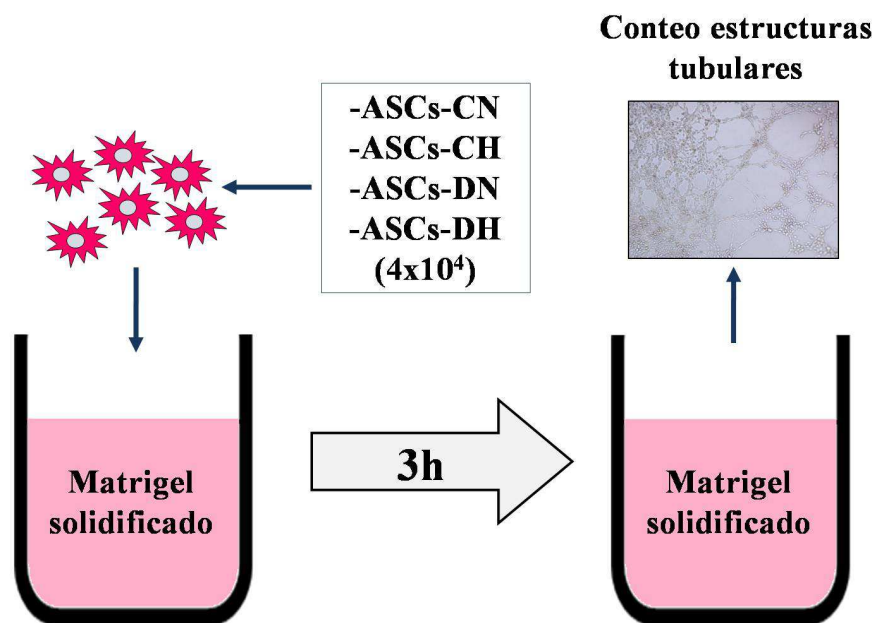


Figura 5. Esquema ensayo angiogénesis.

2.6. Estudio de la actividad paracrina de las ASCs

Para analizar la actividad paracrina de los distintos tipos de ASCs incluidos en el estudio, cultivados bajo diferentes condiciones de cultivo, fueron cuantificados los siguientes factores de crecimiento en el sobrenadante de los distintos cultivos celulares: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor), Interleucina-6 (IL-6, Interleukin 6), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF, Epidermal Growth Factor), Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF, Hepatocyte Growth Factor), Indoelamina 2,3 dioxigenasa (IDO, Indoelamine 2,3 Dioxygenase) y Factor de Crecimiento Insulínico tipo 1 (IGF-1, Insulin-like Growth Factor 1).

Estos factores solubles fueron cuantificados mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay) tipo "sándwich" usando los kits

comerciales disponibles (VEGF-A, RayBio® Rat VEGF-A ELISA kit; IL-6, RayBio® Rat IL-6 ELISA kit; EGF, RayBio® Rat EGF ELISA kit; HGF, RayBio® Rat HGF ELISA kit;IDO, MyBioSource® Rat Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 ELISA kit e IGF-1, RayBio® Rat IGF-1 ELISA kit).

El fundamento de esta técnica es un principio cuantitativo inmunoenzimático estratificado que hace uso de anticuerpos monoclonales frente a una molécula/antígeno a cuantificar. El anticuerpo monoclonal de interés se encuentra fijado sobre la superficie de una microplaca de 96 pocillos incluida en el kit comercial específico. Para la realización del ensayo, los sobrenadantes de los cultivos celulares que contenían los distintos factores a cuantificar fueron añadidos a la microplaca para su unión al anticuerpo monoclonal específico de cada ensayo, siendo incubados en agitación constante.

Posteriormente se añadió a cada pocillo una solución con el anticuerpo específico al factor a cuantificar, ligado a una molécula de biotina. Tras la unión del anticuerpo biotinilado al factor de interés, y retirado su exceso, se adicionó a la placa una solución con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano picante (HRP, Horseradish Peroxidase), y se incubó para permitir su fijación al anticuerpo biotinilado. Finalizada dicha incubación, y tras eliminar el excedente de enzima, se añadió un sustratocromogénico ABTS que al ser metabolizado por la HRP generó un color azul. La coloración azulada viró al amarillo tras la adición de un compuesto ácido (ácido sulfúrico) en cada pocillo para detener la reacción enzimática y evitar errores en la medición.

La intensidad del color amarillo resultante fue proporcional a la cantidad de factor a cuantificar (VEGF-A, IL-6, EGF, HGF, IDO e IGF-1). Esta intensidad de luz fue medida en un lector de placas Optic IVYMEN® System (Mod. 2100C) a través de la absorbancia media a una longitud de onda de 450nm (λ_{450nm}) (Figura 6).

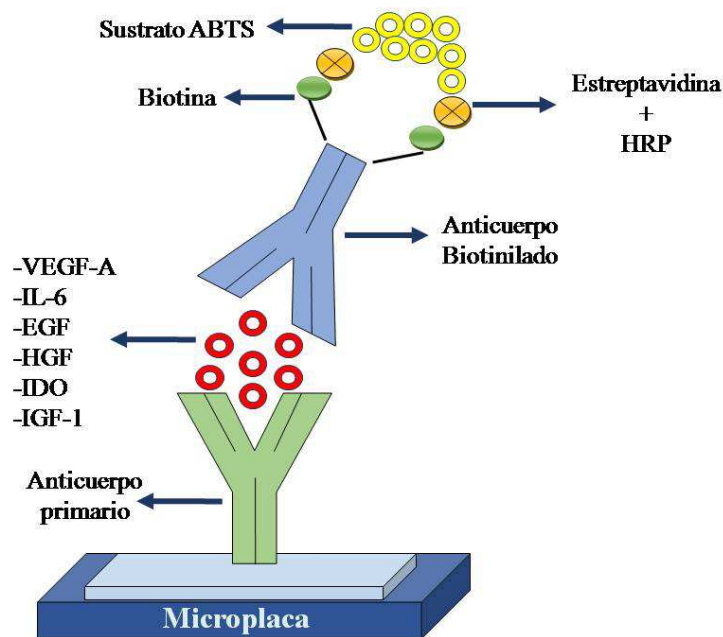


Figura 6. Fundamento ensayo ELISA.

Para la recolección de los sobrenadantes de cultivo utilizados en este ensayo, las ASCs en pase 3 de cultivo de cada uno de los 4 grupos de estudio, fueron sembradas en placas de seis pocillos (BD Falcon™ Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) a una densidad de 1×10^5 células resuspendidas en 2mL de medio de cultivo α -MEM completo sin FGF-2. A las 48h de la siembra el medio fue renovado y 24h después los sobrenadantes fueron recolectados y criopreservados a -80°C en alícuotas de 1mL hasta su utilización. Las ASCs cultivadas en cada uno de los pocillos de la placa de cultivo fueron tripsinizadas y se realizó el recuento celular con cámara de Neubauer determinando la viabilidad celular mediante tinción celular con Azul Tripán (Figura 7).

El cambio de medio previo a la recolección del sobrenadante, y el recuento celular se llevó a cabo con el fin de cuantificarla secreción de cada uno de los factores por un número determinado de células, durante un periodo de tiempo de 24h.

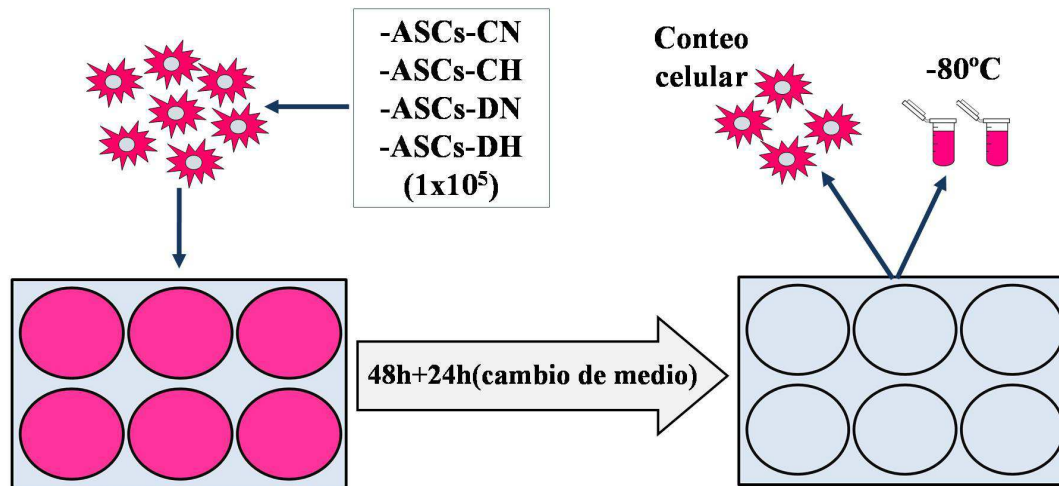


Figura 7. Esquema preparación de los sobrenadantes para la cuantificación de factores de crecimiento mediante ELISA.

2.7. Estudio de la capacidad migratoria

Para evaluar la capacidad migratoria de las ASCs, se usaron insertos (BD FalconTM Cell Culture Insert System, Franklin Lakes, NJ, USA) cuya membrana PET (Polyethylene Terephthalate) con poros de $8\mu\text{m}$ permite el paso celular entre dos compartimientos superpuestos en placas de 24 pocillos (BD FalcomTM Labware, Franklin Lakes, NJ, USA). La cantidad de células capaces de migrar del compartimiento superior al inferior a través de la membrana porosa y adherirse en la cara inferior de la misma fue cuantificada (Figura 8).

Para realizar el ensayo de migración se depositaron $500\mu\text{L}$ de medio de cultivo α -MEM completo (15% FBS) en cada uno de los pocillos seleccionados de la placa de 24 (compartimientos inferiores). A continuación, se añadió en cada pocillo "experimento" un quimioatrayente (VEGF, SDF-1 o EPO) a una concentración final de 100ng/mL que permitió evaluar el grado de estimulación migratoria mediada por cada uno de los quimioatrayentes. Seguidamente, en cada uno de los pocillos "experimento" se colocó un inserto y en su interior se sembraron las ASCs a una densidad de siembra de 1×10^4 células resuspendidas en $500\mu\text{L}$ de medio de cultivo α -MEM completo y libre de FBS. Todos los experimentos se realizaron con un pocillo control en el cual no se añadió ningún factor de atracción para poder cuantificar el número de células migradas sin efecto de ningún quimioatrayente.

Una vez completas, las placas de cultivo fueron incubadas durante 24h en normoxia. Finalizada la incubación, el inserto de cada uno de los pocillos fue retirado y la cara superior de la membrana del inserto fue limpiada con una torunda para eliminar de su superficie las células adheridas que no habían migrado. Las células que sí habían atravesado los poros de la membrana y se habían adherido a la cara inferior del inserto fueron fijadas con etanol absoluto y teñidas con Giemsa (Merk, Whitehouse Station, NJ, USA). Finalizada la tinción, la membrana PET de cada uno de los insertos fue recortada y colocada en un portaobjetos bajo aceite de inmersión para su observación al microscopio óptico (NIKON ECLIPSE Ci.) con el objetivo 200X, con el cual se realizó el recuento de células teñidas y adheridas en la cara inferior de la membrana.

El resultado del recuento celular final fue expresado como la diferencia entre el número de células migradas en cada uno de los pocillos “experimento”, con quimioatrayentes, y el número de células migradas en el pocillo control, sin quimioatrayente, es decir, como el incremento neto respecto a los controles.

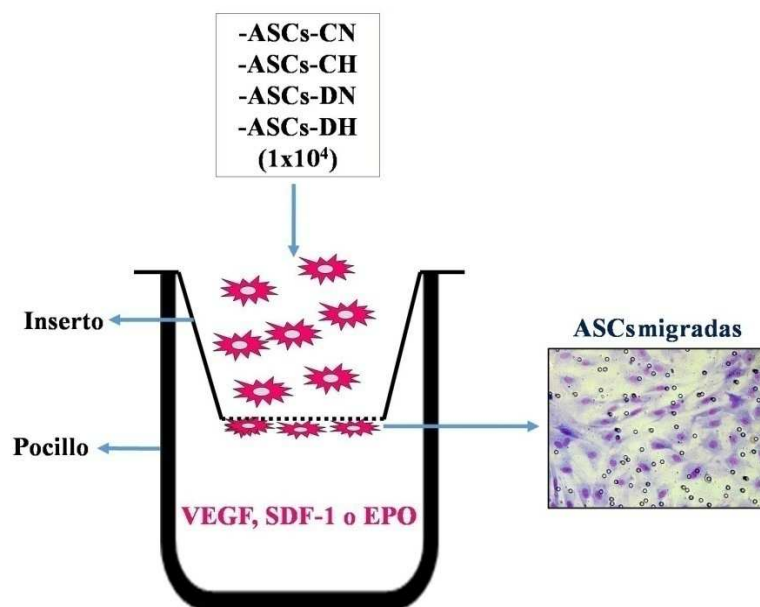


Figura 8. Esquema ensayo migración.

2.8. Perfil de expresión génica mediante hibridación en microarrays

Una vez concluido el periodo de preacondicionamiento en hipoxia o en su caso el cultivo en normoxia, se recolectaron muestras de pellet seco celular de cada uno de los grupos de

estudio en fase 3. Este pellet fue usado para la obtención de ARN mediante la utilización de un kit comercial (RNeasy Mini Kit, Quiagen) siguiendo las indicaciones de los proveedores.

A partir del ARN obtenido de cada una de las muestras se procedió a la construcción del ADN complementario (ADNc), y a su vez, con este último, a la síntesis del ARN complementario (ARNc) siguiendo el protocolo de "un color" de Agilent Technologies. La calidad y la concentración de las muestras de ARNc fueron analizadas con un NanoDrop (ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer version 3.2.1).

Como paso siguiente, el ARNc fue hibridado en un chip, modelo Sureprint G3 Rat GE 8x60K Gene Expression Microarray, AMADID 74036 (Agilent Technologies) durante 17h en constante rotación activa a 6g, y una temperatura de 65°C.

La señal emitida por la hibridación del ARNc fue detectada por un escáner modelo G2565CA (Agilent Technologies) y los resultados fueron normalizados mediante la plataforma digital SubioPlatform (<http://www.subioplatform.com>) [66].

Para determinar la expresión diferencial de genes (DEGs, Differentially Expressed Genes) entre muestras se llevó a cabo un análisis asintótico de t-student.

Para ello se consideraron significativos los valores que presentaron un p-valor <0.01 , y los cambios de proporción (FC, Fold Change) >2.0 para los genes sobreexpresados y <0.5 para los genes subexpresados.

Respecto a los ensayos *in vitro* previos, el número de muestras analizadas en este estudio se redujo con el fin de optimizar los resultados. La selección de muestra se realizó de forma aleatoria.

El análisis de los DEGs se realizó en cuatro grupos comparativos:

- Grupo 1. ASCs-CH (n=5) vs. ASCs-CN (n=7).
- Grupo 2. ASCs-DH (n=6) vs. ASCs-DN (n=6).
- Grupo 3. ASCs-DN (n=6) vs. ASCs-CN (n=7).
- Grupo 4. ASCs-DH (n=6) vs. ASCs-CH (n=5).

2.8.1. Estudio de enriquecimiento funcional y de vías moleculares para los DEGs

Para llevar a cabo el análisis de enriquecimiento de los DEGs se usó el interfaz web DAVID versión 6.8 (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <https://david.ncifcrf.gov/>). DAVID es una plataforma digital que ofrece varias herramientas para el estudio y mapeo de una amplia lista de genes [67, 68]. Una de las características de esta

herramienta web es el uso de p-valores ligeramente diferentes a los convencionales, que son más conservativos. Estos p-valores denominados EASE score se obtienen con la realización de una prueba similar a la de Fisher [69].

Dentro del interfaz DAVID se usó la herramienta "Functional annotation toll" que reporta los resultados según un formato denominado "Functional annotation chart" expresando finalmente los términos más enriquecidos. Se consideraron significativos aquellos términos que presentaron un EASE score <0.1 .

DAVID no es un banco de datos autónomo, sino que integra para su uso otras bases de datos como:

- KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <https://genome.jp/kegg>): Provee vías de genes para la comprensión de sistemas biológicos [70, 71].
- GO (The Gene Ontology, <http://www.geneontology.org>): Suministra un vocabulario controlado para la descripción de genes y sus atributos biológicos [72, 73].
- UniProt (<https://www.uniprot.org>): Suministra información de secuencias proteicas [74, 75].
- InterPro knowledge database (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>): Contiene información acerca de familias y dominios proteicos [76, 77].
- SMART database (Simple Modular Architecture Research Tool, <http://smart.embl.de>): Permite la identificación, comparación y análisis de dominios proteicos [78, 79].

En todos los análisis los p-valores (EASE Score) se corrigieron mediante el método de la tasa de descubrimientos falsos (FDR, False Discovery Rate) y se consideraron significativos a los valores corregidos con un $FDR < 0.05$.

Los términos resultantes del estudio de enriquecimiento para los DEGs sobreexpresados y subexpresados se denominarán términos enriquecidos e infrarrepresentados, respectivamente.

2.8.2. Análisis con ClusterProfiler

Para la identificación de los términos biológicos más enriquecidos en las muestras analizadas se usó el paquete R clusterProfiler en el marco de la base datos KEGG [80].

ClusterProfiler se caracteriza por obtener resultados más restrictivos respecto a otros servidores.

Los p-valores obtenidos con este análisis fueron corregidos con la prueba de Benjamini-Hochberg (BH), y se consideraron significativos todos aquellos que presentaron un valor <0.05 .

2.8.3. Construcción de redes de interacción de proteica (PPI, Protein-Protein Interaction Network)

Para la construcción de las PPI se usó la plataforma web STRING 11.0 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, <https://string-db.org>) capaz de realizar predicciones concernientes a interacciones físicas y funcionales entre proteínas [81, 82]. STRING puntúa las interacciones proteicas con valores que van del 0.0 al 1.0. Esta valoración resulta de la combinación de los siete canales de evidencia que evalúan la probabilidad de interrelación entre proteínas. Estos canales de evidencia son:

- Canal de proximidad (Conserved Neighborhood Channel): Proximidad de los genes que codifican la proteína. Se fundamenta en los genomas procarióticos conocidos.
- Canal de incidencia simultánea (Co-occurrence Channel): Presencia de proteínas homólogas entre especies.
- Canal de fusión (Fusion Channel): Referido a un par de proteínas asociadas y sus respectivos ortólogos siendo codificados por un mismo gen.
- Canal de expresión simultánea (Coexpression Channel): Basado en genes que codifican proteínas expresadas simultáneamente.
- Canal de experimentos (Experiments Channel): Datos recopilados de experimentos bioquímicos, biofísicos y genéticos que se llevan a cabo actualmente.
- Canal de bases de datos (Database Channel): Interacciones documentadas en bases de datos.
- Canal de minería de textos (Textmining Channel): Interacciones recopiladas de los resúmenes disponibles de trabajos científicos.

Se consideraron como significativos los valores superiores a 0.7, tanto para la puntuación combinada (CS, Combined Score) como para cada uno de los canales de evidencia (ECh, Evidence Channel).

Los resultados obtenidos de las PPI fueron presentados en mapas de proteínas en los cuales cada uno de los nodos representa una proteína y cada línea representa una interacción entre proteínas.

3. Metodología específica: Estudio *In Vivo*

3.1. Modelo animal de Nefropatía Diabética

El estudio se llevó a cabo en ratas macho isogénicas Wistar de dos meses de edad con un peso inicial de entre 180 a 200 gramos, que se mantuvieron alojadas en jaulas individuales a lo largo de todo el estudio.

Los animales fueron estabulados a una temperatura constante de 20°-22°C, con ciclos de luz/oscuridad de 17/7h. La fase de experimentación comenzó después de un periodo de aclimatación de 15 días. Excepto el tiempo en el que los animales permanecieron en jaulas metabólicas en condiciones de ayuno, solo con acceso a agua, el resto de tiempo los animales fueron estabulados con suministro de agua y dieta estándar *ad libitum*, en el animalario dependiente del SAEX ubicado en el Campus Universitario de Rabanales de la Universidad de Córdoba. Finalizado el periodo de aclimatación, los animales fueron aleatoriamente divididos en dos grupos experimentales: 1. Grupo de ratas sanas (n=13) como grupo control y 2. Grupo de ratas diabéticas (n=52).

El día 0 del estudio se llevó a cabo la inducción de la DM2, considerándolo como punto inicial del experimento. Dicha inducción se realizó inyectando una única dosis por vía intraperitoneal (IP) de STZ dosificada a 60mg/kilogramo peso [61, 62] diluida en 200 µL de solución fisiológica (cloruro de sodio al 0.9%) a todas las ratas incluidas en el grupo 2 (diabéticas).

A las ratas incluidas en el grupo 1 (control) se les administró un volumen de 200µL de solución fisiológica por vía IP.

Tanto el día 0 como los días 15, 30 y 45 posteriores a la inyección de STZ se realizó el pesaje de los animales así como recolecciones de muestras de sangre, extraída de la vena subclavia, y de orina para confirmar el establecimiento de la DM2 (día 15), evaluar el punto temporal de inicio de la aparición del daño renal (día 15), y hacer un seguimiento en la evolución del daño renal así como de los efectos terapéuticos de los diferentes tratamientos administrados sobre dicho daño renal inducido (días 30 y 45). De forma previa a la recolección de muestras los animales fueron introducidos en jaulas metabólicas por un periodo de 4 horas en condiciones basales de ayuno (sólo acceso a agua), para así facilitar la recolección de la diuresis y la obtención de valores de glucosa preprandiales. Además, la concentración de glucosa en sangre fue medida in situ en el momento de la recolección de las muestras, usando un glucómetro automático (FreeStyle Whitney, Oxon, UK) con un rango de medición de 20 a 500 mg/dL, para

poder descartar los animales que no cumplieran criterios en cada punto temporal del desarrollo experimental. Fueron considerados animales diabéticos aquellos que presentaron niveles de glucemia iguales o superiores a 300mg/dL en sangre en tres tomas repetidas. Las ratas que no cumplieron este criterio fueron separadas del estudio [64].

Las muestras de sangre extraídas para la cuantificación de factores bioquímicos fueron centrifugadas (Centrifriger-BLII) a 2876 g para separar las células hemáticas del suero, y éste último fue congelado a -80°C hasta su análisis.

El día 45 del estudio, inmediatamente después de la obtención de la última muestra de sangre, se procedió al sacrificio de todos los animales. Para este fin, se inyectó una dosis de tiopental sódico 50mg/kg por vía IP a todas las ratas. Posteriormente, con el animal en posición decúbito supino, se realizó una incisión longitudinal en la línea media del abdomen y se procedió a la evisceración manual y a la ubicación de la arteria aorta abdominal para su sección con el objetivo de exanguinar al animal. Como siguiente paso se introdujo un catéter en el extremo distal, respecto al corazón, de la arteria seccionada, y con una jeringa se hizo la perfusión de solución fisiológica fría con el objetivo de lavar los vasos sanguíneos renales. Finalmente, se extrajeron ambos riñones para el estudio anatomopatológico.

Para reducir al máximo el sufrimiento del animal, todas las extracciones de muestra de sangre realizadas por venopunción subclavia se llevaron a cabo con el animal en estado de pérdida de sensibilidad por anestesia inhalatoria con sevoflurano al 3%.

3.2. Análisis de parámetros bioquímicos

El análisis de los parámetros bioquímicos en la sangre y orina de los animales tratados, se realizó mediante técnicas espectrofotométricas basadas en métodos enzimáticos colorimétricos. Para la cuantificación de la glucosa el método utilizado fue el de la hexoquinasa, para la cuantificación de la urea se utilizó el método colorimétrico de Berthelot [83] y para la detección de la creatinina se utilizó el método de Jaffé [84, 85]. Todas estas determinaciones se realizaron en el suero de las ratas.

La albúmina en orina se determinó mediante inmunoturbidimetría con anticuerpos de ratón específicos (SIEMENS ADVIA Chemistry Karlsruhe, Germany) y se calculó la ratio de los niveles de albúmina en orina respecto a la creatinina urinaria.

El incremento o decremento neto de las magnitudes bioquímicas en suero y orina del día 45 respecto al día 30 y del día 30 respecto al día 15 fueron calculados para interpretar la

diferencia en los niveles de los distintos parámetros bioquímicos entre los distintos puntos de tiempo analizados en el estudio.

Todas las determinaciones fueron realizadas en un autoanalizador modelo ADVIA-ChemistryXPT de SIEMENS (Healthcare Diagnostics[®] Karlsruhe, Alemania) ubicado en las instalaciones del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba. En cada magnitud bioquímica se emplearon los calibradores y reactivos propios de la casa comercial correspondiente. Todos los parámetros fueron sometidos al programa de control de calidad interno (CCI) diario UNITY de Bio-Rad[®] (Hercules, CA, EE. UU.) y al programa de control de calidad externo (CCE) mensual de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC).

3.3. Trasplante de células a ratas con daño renal

En el estudio *in vivo* de ND inducido en ratas Wistar con la administración de STZ, se evaluó el potencial terapéutico de cada grupo de ASCs analizadas en los distintos ensayos *in vitro*: ASCs-CN, ASCs-CH, ASCs-DN y ASCs-DH.

Los grupos experimentales establecidos para la realización del estudio *in vivo* fueron los siguientes:

- Grupo 1. Ratas sanas control (C) + tratamiento placebo (C+P) n= 16.
- Grupo 2. Ratas ND + tratamiento placebo (ND+P) n= 7.
- Grupo 3. Ratas ND + tratamiento ASCs-CN (ND+ASCs-CN) n= 6.
- Grupo 4. Ratas ND + tratamiento ASCs-CH (ND+ASCs-CH) n= 9.
- Grupo 5. Ratas ND + tratamiento ASCs-DN (ND+ASCs-DN) n= 9.
- Grupo 6. Ratas ND + tratamiento ASCs-DH (ND+ASCs-DH) n= 10.

Un total de 10 muestras de las ASCs criopreservadas (ASCs-C, n=5; ASCs-D, n=5) fueron seleccionadas aleatoriamente para su descongelación y utilización como tratamiento celular en el estudio *in vivo*.

Los criotubos con las células congeladas en pase 1 de cultivo y seleccionadas para ser infundidas, fueron descongeladas en un baño de inmersión a 37°C, lavadas para eliminar los restos de crioprotector y resuspendidas en 1mL de solución fisiológica para la realización del recuento celular en cámara de Neubauer y determinación de su viabilidad por el método de tinción con Azul Tripán. Las células descongeladas y viables fueron sembradas en cultivo para su expansión en normoxia o preacondicionadas en hipoxia, según el grupo celular, siguiendo el protocolo detallado anteriormente en el apartado titulado “Modelo animal de inducción de Diabetes Mellitus tipo 2 para el aislamiento y cultivo de ASCs”. Una vez alcanzado el pase 3 de

cultivo de cada uno de los grupos de tratamiento, las células fueron tripsinizadas, lavadas y resuspendidas en 200 μ L de solución fisiológica a una concentración final de 3×10^6 células. La suspensión celular final fue inyectada por vía IV en las ratas Wistar con ND inducida 15 días después de la administración de la STZ y una vez confirmado el estado de diabetes inducido (niveles de glucosa en sangre > 300mg/dL sangre). Los grupos de ratas con ND inducida que recibieron los distintos tratamientos celulares fueron los grupos 3, 4, 5 y 6. En los grupos de tratamiento 1 y 2 el tratamiento administrado fueron 200 μ L de solución fisiológica administrando por vía IV, como placebo.

Cada rata receptora fue tratada con células procedentes de una única rata donante.

Durante el procedimiento de inyección celular las ratas se mantuvieron anestesiadas por vía inhalatoria con una mezcla de oxígeno y sevoflurano del 3% y colocadas en posición decúbito supino sobre la mesa de trabajo. Para facilitar la venoclisis se aplicó un torniquete en el extremo craneal del rabo del animal y se identificó la vena central de la cola. La venopunción se realizó con un catéter N° 27G con el bisel hacia arriba y formando un ángulo de 30° respecto a la cola. La inyección del tratamiento se llevó a cabo lentamente para evitar la formación de trombos o la extravasación del mismo.

3.4. Estudio morfológico semicuantitativo

Todas las muestras de tejido renal fueron fijadas en formalina al 4%, embebidas en parafina y cortadas en secciones de 3 μ m de espesor. Posteriormente estos cortes fueron extendidos en portaobjetos y teñidos con tinción de hematoxilina-eosina (H&E) o ácido peryódico de Schiff (PAS, Periodic Acid-Schiff). Finalmente, las preparaciones fueron examinadas con un microscopio óptico Nikon 115401-Eclipse 50i.

El estudio morfológico semicuantitativo se desarrolló analizando lesiones glomerulares y túbulo-intersticiales.

Las distintas lesiones renales asociadas a la nefropatía diabética se estudiaron por separado y fueron categorizadas según el porcentaje de afectación glomerular o del área túbulo intersticial que presentaba cada lesión. Esta gradación se realizó siguiendo los siguientes criterios:

- 0=Glomérulos y túbulos con características normales; intersticio sin lesión significativa.
- 1=Total del número de glomérulos y túbulos afectados por la lesión menor al 25%.
- 2=Total del número de glomérulos y túbulos afectados por la lesión o cantidad del intersticio que refiere la misma entre el 26 y 50%.

- 3=Total del número de glomérulos y túbulos afectados por la lesión o cantidad del intersticio que refiere la misma entre el 51 y 75%.
- 4=Total del número de glomérulos y túbulos afectados por la lesión o cantidad del intersticio que refiere la misma mayor al 75%.

Para confirmar el establecimiento de la ND inducida tras la administración de STZ, se comparó el resultado obtenido en el estudio semicuantitativo entre las ratas control que recibieron placebo (C+P) y las ratas inducidas con STZ a las que se les suministró también placebo (ND+P). Una vez confirmado el modelo experimental, se evaluó el efecto de los diferentes tratamientos celulares mediante la comparación de las puntuaciones obtenidas entre las ratas inducidas con STZ que recibieron placebo y las ratas con ND inducida que recibieron algún tratamiento celular (ND+ASCs-CN, ND+ASCs-CH, ND+ASCs-DN o ND+ASCs-DH).

Las lesiones renales analizadas en el presente trabajo fueron:

- Expansión mesangial: Definida como la acumulación de material eosinofílico y homogéneo dentro del mesangio [86].
- Mesangiolisis: Es la degeneración de las células mesangiales, acompañada de la desintegración de la matriz mesangial. Microscópicamente, esta lesión se reconoce por la ampliación y tinción pálida del mesangio [87].
- Microaneurismas: Definida como la dilatación aneurismática de los capilares glomerulares [87].
- Glomerulomegalia: Es el crecimiento anormal del glomérulo relacionado con un incremento del riesgo de sufrir glomeruloesclerosis [88].
- Signos de necrosis tubular aguda (NTA): La NTA es la simplificación del epitelio del túbulo contorneado proximal sin la alteración de la membrana celular basal tubular [89, 90]. Al microscopio óptico la NTA se caracteriza por el aplanamiento y la pérdida del borde en cepillo del epitelio tubular [91].
- Depósitos tubulares eosinofílicos PAS positivos: Definidos como la acumulación subnuclear de material PAS positivo, como el glucógeno, en las células tubulares [86].
- Cambio a células claras: Son células que presentan un citoplasma de aspecto claro, causado por la acumulación lipídica intracelular [92].
- Engrosamiento de la membrana basal tubular (EMBT): Se define como el engrosamiento de la membrana basal de las células tubulares acompañado de la reducción del diámetro de la luz tubular [90].

- Quistes tubulares: Son las dilataciones de la luz de los túbulos renales que llegan a tomar forma de quiste [93].
- Fibrosis intersticial: Es el incremento de la matriz extracelular que separa a los túbulos en la corteza renal [90].
- Infiltrado inflamatorio: Es la presencia de células inflamatorias en el intersticio de la corteza renal [90].

3.5. Análisis ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión

Las muestras de tejido renal de rata obtenidas el día 45 del estudio, fueron cortadas en secciones de 2mm^3 y fijadas en solución tamponada de glutaraldehído al 2.5% y tetróxido de osmio al 1%. Posteriormente las muestras se deshidrataron con distintas soluciones de etanol en concentraciones crecientes, se aclararon en óxido de propileno y se incluyeron en resina epoxi para su polimerización. Al bloque de resina polimerizado, con la muestra de tejido incluida, se le realizaron cortes ultrafinos de $0.1\mu\text{m}$ de grosor que fueron colocados sobre rejillas de cobre y níquel para ser contrastados con uranilo saturado y citrato de plomo. El análisis ultraestructural del tejido renal procesado se realizó en un microscopio electrónico Jeol Jem 1400 (Jeol, Japón) de alta resolución ubicado en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) del campus de Rabanales en Córdoba. Todas las observaciones se realizaron de manera ciega y, al menos, por dos investigadores independientes.

4. Análisis estadístico (Excepto microarrays)

Los análisis estadísticos fueron realizados con el software PASW Statistic 18 (IBM SPSS). Se calcularon los valores de las medias y el error estándar de la media (SEM, Standard error of the mean).

Tras analizar si existía una distribución normal de los valores mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks y debido a que el tamaño de todas las muestras fue inferior a 30 ($n < 30$) se definió un análisis estadístico no paramétrico para todos los resultados del estudio. Las comparaciones de parámetros entre los distintos grupos de tratamiento se realizaron aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las comparaciones 2 a 2 mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Todos los gráficos de barras del estudio se realizaron con el software GraphPad Prism 5.0 (Graphpad Software Inc, San Diego, CA, USA).

Los resultados estadísticos fueron representados como la media \pm SEM, y un p-valor ≤ 0.05 fue aceptado como significativo.

Resultados

RESULTADOS

1. Resultados estudio *In Vitro*

1.1. Caracterización fenotípica de las ASCs

El preacondicionamiento en hipoxia de las ASCs no modificó el perfil inmunofenotípico de ninguna de las poblaciones celulares estudiadas. Se observó que independientemente de las condiciones de cultivo, un porcentaje de aproximadamente el 95% o más de la población de células derivadas de animales sanos (controles, n=15) y de diabéticos (n=15), presentaban en su superficie los marcadores CD29, CD90 y CD73, y un porcentaje inferior al 2% de la población los marcadores de superficie CD34 y CD45 (Tabla 3).

Población Celular	% CD29	% CD90	% CD73	% CD34	% CD45
ASCs-CN	94.99±1.58	98.93±0.38	93.53±1.57	0.46±0.15	0.43±0.12
ASCs-CH	96.89±1.16	99.37±0.17	94.87±0.95	0.44±0.11	0.40±0.07
ASCs-DN	94.48±1.53	95.07±0.92	93.26±1.34	0.53±0.10	1.10±0.32
ASCs-DH	97.51±0.51	96.21±0.88	93.46±1.24	0.51±0.14	0.67±0.16

Tabla 3. Inmunofenotipo de ASCs aisladas de ratas sanas (C) y diabéticas (D) cultivadas en condiciones normoxia (N) o de hipoxia (H): Los datos representan la media±SEM.

1.2. Caracterización funcional de las ASCs

En el estudio cualitativo de diferenciación se observó que las células de animales sanos (controles, n=15) y diabéticos (n=15) se diferenciaron a adipocitos y osteoblastos. Por lo tanto, todas las ASCs incluidas en el estudio cumplían el criterio de diferenciación establecido para células mesenquimales (Figura 9).

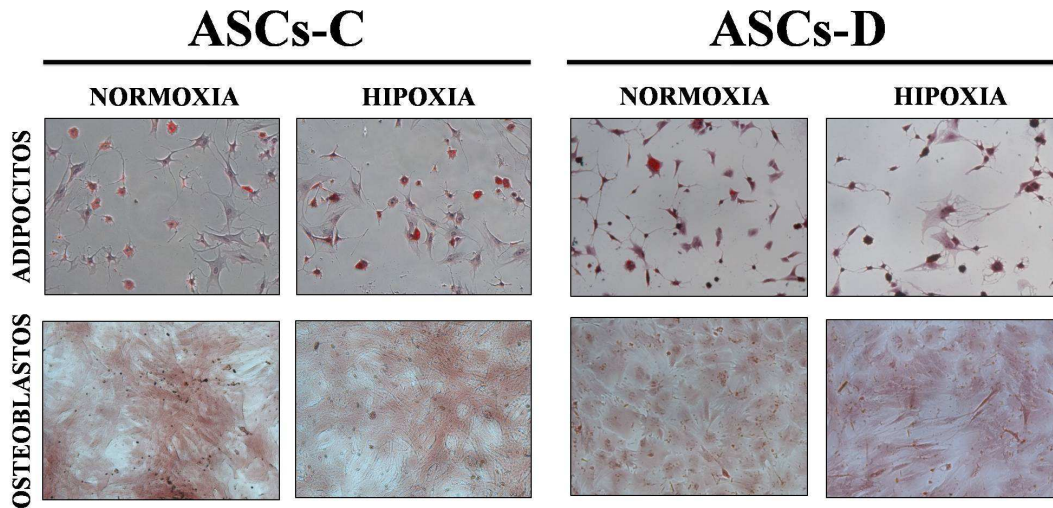


Figura 9. Diferenciación adipocítica y osteocítica de cada uno de los cuatro grupos de ASCs analizados X200.

1.3. Tasa de duplicación de las ASCs

Según los resultados obtenidos, el precondicionamiento en hipoxia no modifica la tasa de duplicación de las ASCs, independientemente del origen ($p=ns$), (ASCs-CN: 2.95 ± 0.16 DC; ASCs-DN: 2.64 ± 0.18 DC; ASCs-CH: 3.14 ± 0.16 DC; ASCs-DH: 2.75 ± 0.16 DC) (Figura 10).

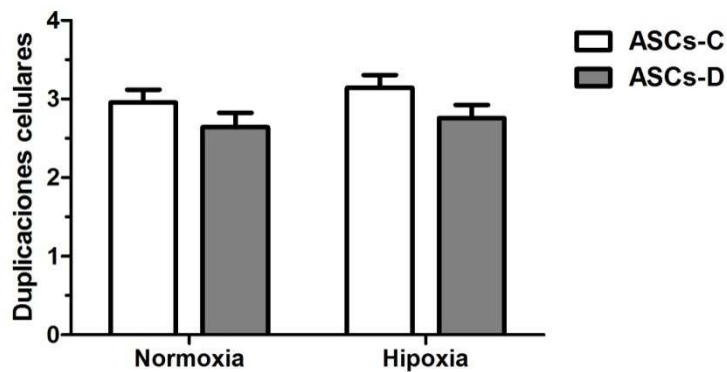


Figura 10. Representación gráfica del número de duplicaciones celulares correspondientes a ASCs procedentes de los cuatro grupos experimentales: Valores de $p \geq 0.05$ (ns). Los datos representan la media \pm SEM.

1.4. Capacidad Angiogénica

Los resultados mostraron que la exposición a la hipoxia incrementó significativamente la formación de estructuras tubulares (ETs) respecto al cultivo en normoxia tanto en las ASCs derivadas de animales sanos (n=15) (ASCs-CH, 106.75 ± 15.50 ETs; ASCs-CN, 56.42 ± 5.66 ETs; $p \leq 0.01$) como en las ASCs derivadas de animales diabéticos (n=15) (ASCs-DH, 60.40 ± 3.96 ETs; ASCs-DN, 37.00 ± 6.10 ETs; $p \leq 0.01$) (Figura 11).

Además, en los resultados se observó que el potencial angiogénico de las células derivadas de animales diabéticos fue significativamente menor al potencial angiogénico de las ASCs derivadas de animales sanos, independientemente de las condiciones de cultivo (Normoxia: $p \leq 0.05$; Hipoxia: $p \leq 0.05$) (Figura 11).

La figura 12 muestra imágenes representativas de las estructuras tubulares formadas por cada uno de los grupos experimentales *in vitro*.

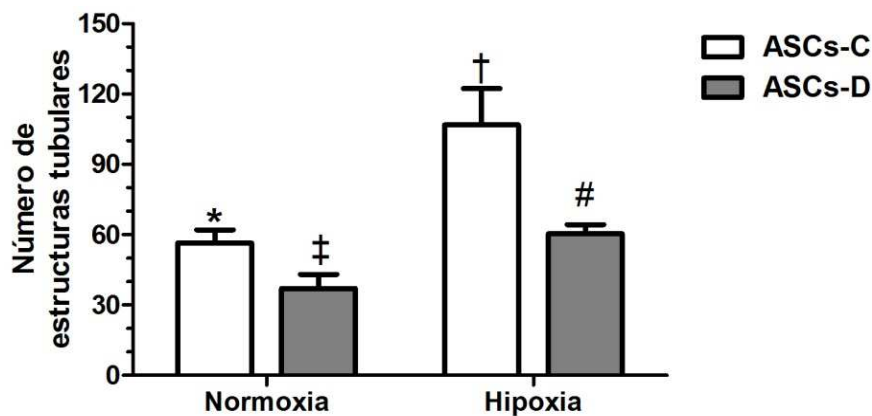


Figura 11. Representación gráfica del número de estructuras tubulares formadas por las ASCs pertenecientes a cada grupo experimental: * $p \leq 0.01$ vs. ASCs-C Hipoxia. ‡ $p \leq 0.05$ vs. ASCs-C Normoxia. † $p \leq 0.05$ vs. ASCs-D Hipoxia. # $p \leq 0.01$ vs. ASCs-D Normoxia. Los datos representan la media \pm SEM.

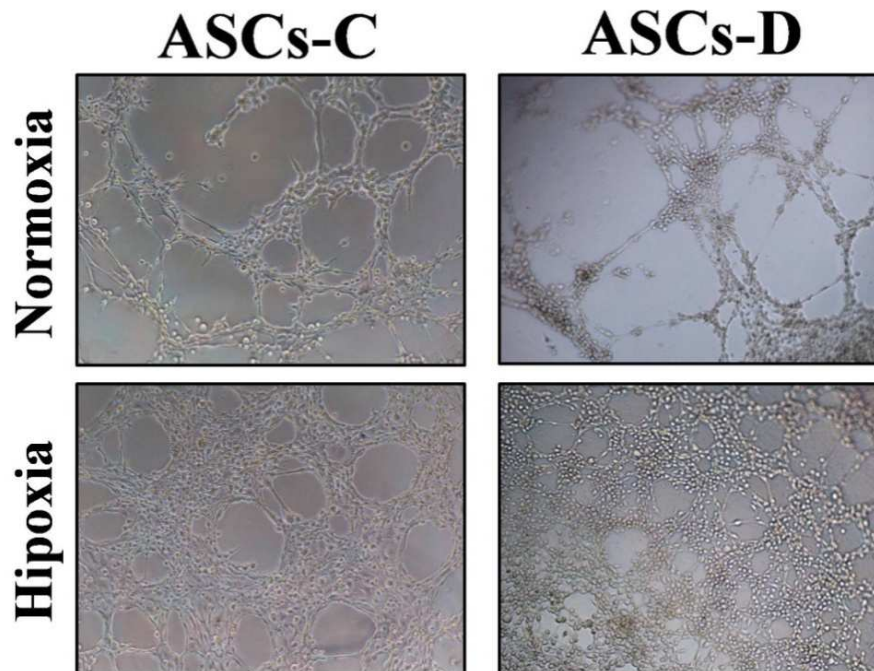


Figura 12. Imágenes representativas de los ensayos de angiogénesis realizados en las ASCs incluidas en el estudio pertenecientes a los cuatro grupos experimentales X200: Estructuras tubulares formadas por las distintas ASCs analizadas.

1.5. Cuantificación de la secreción de factores de crecimiento en sobrenadantes

La concentración de VEGF en el sobrenadante de los cultivos de ASCs no presentó cambios debidos al preacondicionamiento en hipoxia en ninguna de las poblaciones de ASCs analizadas (ASCs sanas, $n=15$; ASCs diabéticas, $n=15$; $p=ns$).

Analizando en detalle los resultados, se observó que las ASCs derivadas de ratas diabéticas mostraron una menor capacidad de secreción de VEGF en comparación con las ASCs derivadas de ratas sanas. Sin embargo, esta diferencia sólo resultó estadísticamente significativa cuando ambos tipos celulares fueron preacondicionados durante 48h en hipoxia ($p \leq 0.01$) (Figura 13).

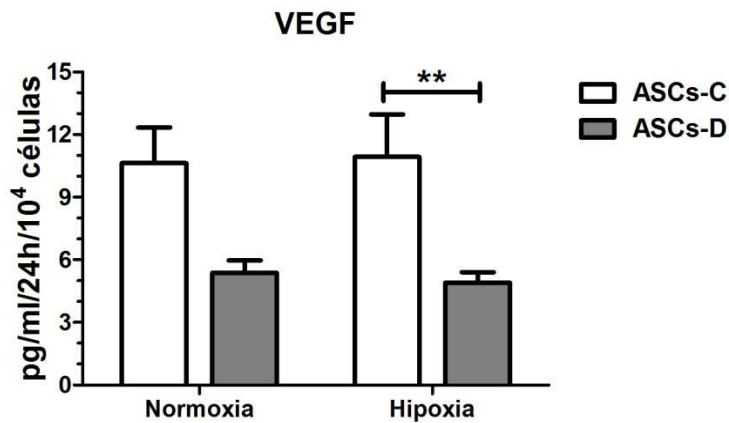


Figura 13. Representación gráfica de los niveles de secreción de VEGF en las ASCs procedentes de los cuatro grupos experimentales: ASCs-CH vs. ASCs-DH (** $p \leq 0.01$). Resto de valores de $p \geq 0.05$ (ns). Los datos representan la media \pm SEM.

De igual modo, el preconditionamiento en hipoxia no afectó a la secreción de IL-6 en ninguna de las poblaciones de ASCs analizadas, sin embargo, se observó una mayor concentración de IL-6 en el sobrenadante del cultivo de todas las ASCs derivadas de ratas diabéticas en comparación con las ASCs sanas. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa en ambas condiciones de cultivo ($p \leq 0.01$) (Figura 14).

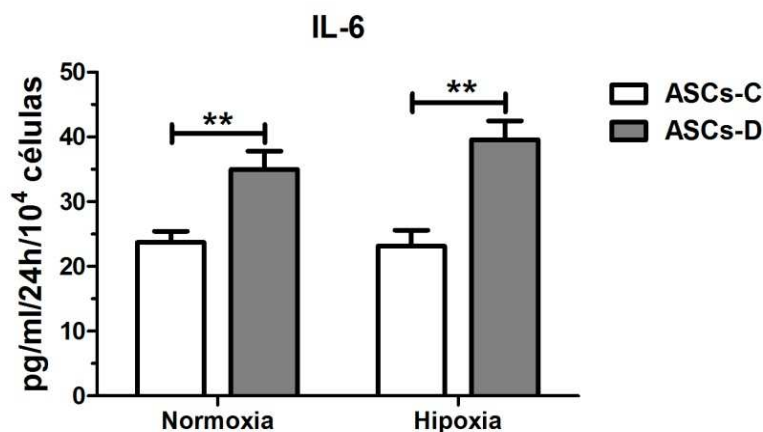


Figura 14. Representación gráfica de los niveles de secreción de IL-6 en las ASCs procedentes de los cuatro grupos experimentales: ASCs-CN vs. ASCs-DN (** $p \leq 0.01$), ASCs-CH vs. ASCs-DH (** $p \leq 0.01$). Resto de valores de $p \geq 0.05$ (ns). Los datos representan la media \pm SEM.

Respecto a los niveles de EGF secretados en los sobrenadantes del cultivo de las ASCs, los resultados mostraron que el preconditionamiento en hipoxia no modificó la secreción de EGF en ninguna de las muestras de sobrenadante analizadas. Además, evidenció una tendencia a la reducción en la capacidad de secreción de EGF por parte de las ASCs derivadas de individuos diabéticos en ambas condiciones de cultivo, que resultó significativa en el cultivo realizado en condiciones de normoxia ($p \leq 0.05$) (Figura 15).

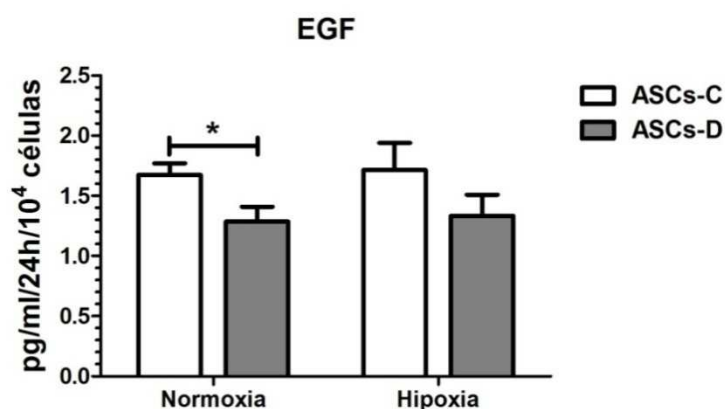


Figura 15. Representación gráfica de los niveles de secreción de EGF en las ASCs procedentes de los cuatro grupos experimentales: ASCs-CN vs. ASCs-DN (* $p \leq 0.05$). Resto de valores de $p \geq 0.05$ (ns). Los datos representan la media \pm SEM.

La concentración de los factores HGF, IDO e IGF-1 en el sobrenadante del cultivo de las ASCs no mostró cambios significativos tras el preconditionamiento en hipoxia de las todas las poblaciones de ASCs analizadas ($p = ns$). Se observó que las ASCs derivadas de ratas diabéticas parecían poseer una menor capacidad de secreción de estos tres factores en ambas condiciones de cultivo, sin embargo, esta reducción no resultó significativa ($p = ns$) (Figura 16).

La tabla 4 muestra los valores obtenidos en el estudio de secreción paracrina.

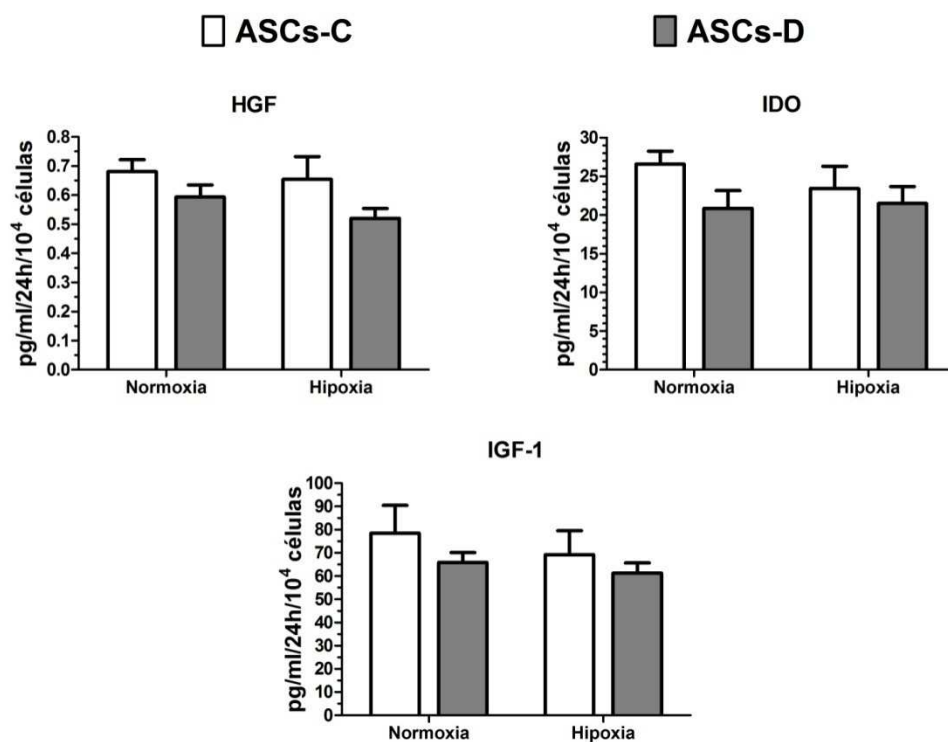


Figura 16. Representación gráfica de los niveles de secreción de HGF, IDO e IGF-1 en las ASCs procedentes de los cuatro grupos experimentales: Valores de $p \geq 0.05$ (ns). Los datos representan la media \pm SEM.

	Factor	ASCs-CN	ASCs-CH	ASCs-DN	ASCs-DH	Valor de p
Cuantificación de factores de crecimiento en sobrenadante celular (pg/mL/24h/10 ⁴ células)	VEGF	10.62 \pm 1.71	10.93 \pm 2.03	5.38 \pm 0.57	4.9 \pm 0.5#	# ≤ 0.01
	IL-6	23.71 \pm 1.72	23.13 \pm 2.48	34.96 \pm 2.85†	39.58 \pm 2.87#	# ≤ 0.01 † ≤ 0.01
	EGF	1.67 \pm 0.09	1.71 \pm 0.22	1.28 \pm 0.12†	1.33 \pm 0.17	† ≤ 0.05
	HGF	0.68 \pm 0.04	0.65 \pm 0.07	0.59 \pm 0.04	0.52 \pm 0.03	
	IDO	26.59 \pm 1.67	23.44 \pm 2.86	20.87 \pm 2.29	21.49 \pm 2.2	
	IGF-1	78.55 \pm 11.91	69.22 \pm 10.29	65.9 \pm 4.23	61.27 \pm 4.44	

Tabla 4. Valores secreción paracrina: Los datos representan la media \pm SEM.

P versus ASCs-Control Hipoxia (ASCs-CH).

† P versus ASCs-Control Normoxia (ASCs-CN).

Resto de valores de $p \geq 0.05$ (ns).

1.6. Estudio de la capacidad migratoria de las ASCs

En el análisis de la capacidad de migración de las ASCs en presencia del factor VEGF se observó que el preacondicionamiento en hipoxia parece favorecer la capacidad migratoria de las ASCs, tanto derivadas de ratas sanas ($n=15$) como diabéticas ($n=15$), sin embargo, esta diferencia observada respecto al cultivo en normoxia no resultó estadísticamente significativa ($p=ns$) (Figura 17).

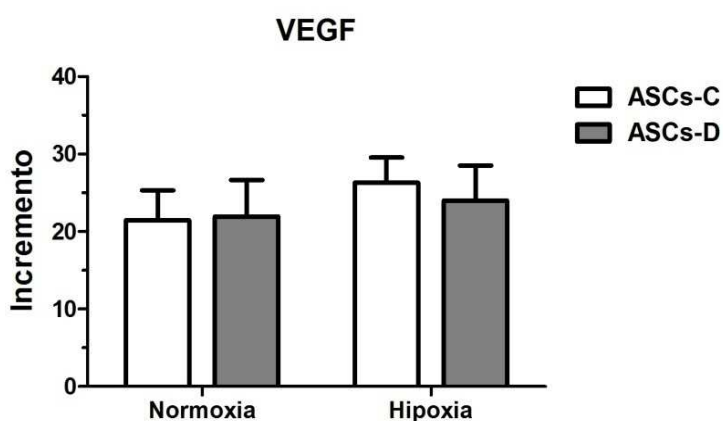


Figura 17. Representación gráfica de la migración hacia el VEGF de las ASCs procedentes de los cuatro grupos experimentales: Las barras expresan el incremento ⁽¹⁾ de la capacidad de migración de las ASCs. ⁽¹⁾Incremento= diferencia entre el porcentaje de ASCs migradas con VEGF (pocillos experimento) y el porcentaje de ASCs migradas sin estímulo (pocillos controles). Valores de $p \geq 0.05$ (ns). Los datos representan la media \pm SEM.

Los ensayos de migración realizados en presencia del factor SDF-1 mostraron que el preacondicionamiento en hipoxia no afectaba de un modo significativo a la capacidad de migración de ninguna de las poblaciones de ASCs analizadas. Además, se observó que las ASCs derivadas de ratas diabéticas poseían una menor capacidad de migración en presencia de dicho factor, respecto a las células derivadas de animales sanos, resultando esta diferencia significativa tras el preacondicionamiento en hipoxia de ambas poblaciones celulares ($p \leq 0.05$) (Figura 18).

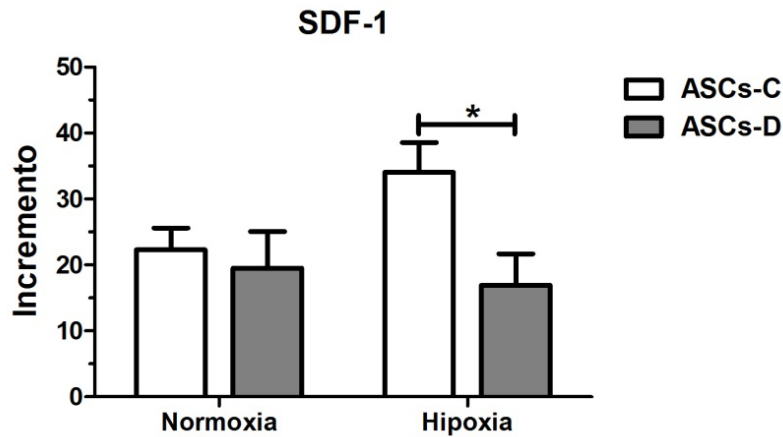


Figura 18. Representación gráfica de la migración hacia el SDF-1 de las ASCs procedentes de los cuatro grupos experimentales: Las barras expresan el incremento ⁽¹⁾ de la capacidad de migración de las ASCs. ⁽¹⁾Incremento= diferencia entre el porcentaje de ASCs migradas con SDF-1 (pocillos experimento) y el porcentaje de ASCs migradas sin estímulo (pocillos controles). ASCs-CH vs. ASCs-DH (* $p \leq 0.05$). Resto de valores de $p \geq 0.05$ (ns). Los datos representan la media \pm SEM.

En el análisis de la capacidad de migración de las ASCs en presencia de EPO parece observarse una mayor capacidad de ambos tipos de ASCs tras su preacondicionamiento en hipoxia, y una mayor capacidad de migración de las ASCs derivadas de ratas diabéticas en ambas condiciones de cultivo, normoxia e hipoxia. Sin embargo, ninguna de estas observaciones resultó estadísticamente significativa ($p=ns$) (Figura 19).

La tabla 5 muestra los valores obtenidos en el estudio de migración celular.

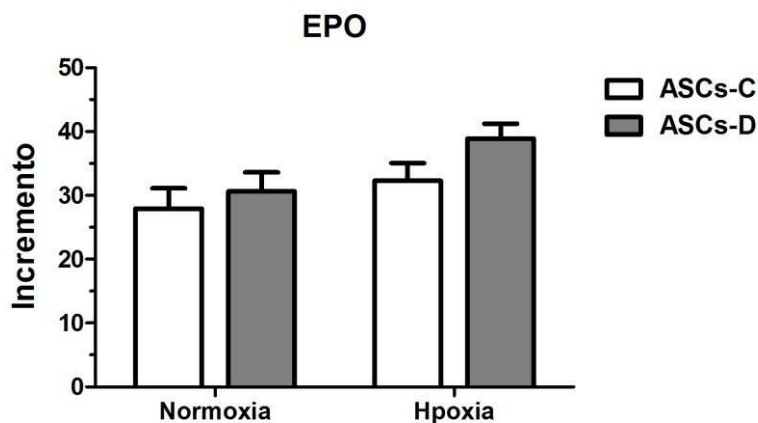


Figura 19. Representación gráfica de la migración hacia el EPO de las ASCs procedentes de los cuatro grupos experimentales: Las barras expresan el incremento ⁽¹⁾ de la capacidad de migración de las ASCs. ⁽¹⁾Incremento= diferencia entre el porcentaje de ASCs migradas con EPO (pocillos experimento) y el porcentaje de ASCs migradas sin estímulo (pocillos controles). Valores de $p \geq 0.05$ (ns). Los datos representan la media \pm SEM.

	Factor	ASCs-CN	ASCs-CH	ASCs-DN	ASCs-DH	Valor de p
Migración (Incremento)	VEGF	21.44±3.85	26.3±3.24	21.95±4.71	23.98±4.51	
	SDF-1	22.95±3.31	34.06±4.51	19.52±5.55	16.92±4.74*	*≤0.05
	EPO	27.93±3.18	32.32±2.75	30.65±2.94	38.88±2.34	

Tabla 5. Valores capacidad migratoria:*p≤0.05 vs. ASCs-CH. Resto de valores de p≥0.05 (ns). Los datos representan la media±SEM.

1.7. Estudio vías moleculares

1.7.1. Expresión génica global e identificación de los DEGs

El proceso de normalización de los datos obtenidos en el análisis de los microarrays permitió obtener un número bien definido de genes sobre y subexpresados (DEGs) encada uno de los grupos comparativos establecidos para este análisis (Grupo 1. ASCs-CH vs. ASCs-CN; Grupo 2. ASCs-DH vs. ASCs-DN; Grupo 3. ASCs-DN vs. ASCs-CN y Grupo 4. ASCs-DH vs. ASCs-CH). Tras analizar dichos resultados se observó que el grupo comparativo 4, en el cual se analizaban ASCs derivadas de ratas diabéticas y de ratas sanas, ambas preacondicionadas en hipoxia, mostró el mayor número de genes diferencialmente expresados (total DEGs=2213 genes) de los cuales 1354 genes se presentaban sobreexpresados y 859 genes subexpresados. Por otro lado, el grupo comparativo 2, en el cual las ASCs comparadas habían sido cultivadas en condiciones de normoxia y preacondicionadas en hipoxia, todas derivadas de ratas diabéticas, se observó un menor número de genes diferencialmente expresados (total DEGs=201 genes) de los cuales 160 genes se presentaban sobreexpresados y 41 genes subexpresados. El número total de DEGs en todos los grupos comparativos analizados ha sido representado gráficamente en la figura 20.

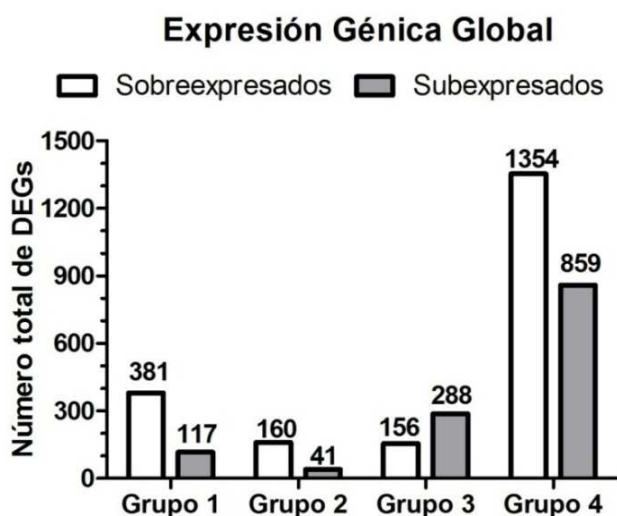


Figura 20. Expresión génica global: Número total de genes sobre y subexpresados que fueron identificados en cada grupo experimental. (Grupo 1: ASCs-CH vs. ASCs-CN; Grupo 2: ASCs-DH vs. ASCs-DN; Grupo 3: ASCs-DN vs. ASCs-CN; Grupo 4: ASCs-DH vs. ASCs-CH).

1.7.2. Análisis de enriquecimiento y construcción de las PPI

A.- Resultados análisis del grupo 1 (ASCs-CH vs. ASCs-CN)

a) Análisis de enriquecimiento con Interfaz web DAVID

Este análisis mostró un total de seis términos enriquecidos para el grupo 1 (ASCs-CH vs. ASCs-CN) (Tabla 6).

Grupo 1. /Enriquecidos Categoría	Término	Nº Genes	Valor de p	Proporción de enriquecimiento	FDR
UP_KEYWORDS	Hélice transmembrana	90	0.000832634	1.34	0.01013062
UP_KEYWORDS	Transmembrana	90	0.000961382	1.34	0.01168866
UP_KEYWORDS	Membrana	102	0.001091802	1.30	0.01326463
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005912~Unión adherente	5	0.00202355	9.26	0.02481824
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0016021~Componente integral de la membrana	79	0.003953422	1.31	0.04795872
INTERPRO	IPR000276~Receptor acoplado a proteína G, similar a la rodopsina	30	0.003555624	1.74	0.04880395

Tabla 6. Términos enriquecidos para el grupo 1 (ASCs-CH vs. ASCs-CN):

UP_KEYWORDS= UniProt.

GOTERM_CC_DIRECT= Gene Ontology, Componente celular.

INTERPRO=InterPro.

Por otro lado, este estudio reveló también siete términos infrarrepresentados (Tabla 7).

Grupo 1. /Infrarrepresentados Categoría	Término	Nº Genes	Valor de p	Proporción de infrarrepresentación	FDR
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0007059~Segregación cromosómica	6	1.18x10 ⁻⁰⁵	19.92	0.0001731
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0009615~Respuesta a virus	6	3.40x10 ⁻⁰⁵	16.02	0.00049955
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0051607~Respuesta antiviral	6	0.00028037	10.27	0.00411574
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0000794~Cromosoma nuclear condensado	4	0.00081532	21.53	0.00976897
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0000785~Cromatina	5	0.00195287	9.33	0.02325281
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0010212~Respuesta a la radiación ionizante	4	0.0034272	13.08	0.04923912
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005524~Unión al ATP	14	0.00351448	2.44	0.04093453

Tabla 7. Términos infrarrepresentados, para el grupo 1 (ASCs-CH vs. ASCs-CN):

GOTERM_CC_DIRECT= Gene Ontology, Componente celular.

GOTERM_BP_DIRECT= Gene Ontology, Proceso Biológico.

GOTERM_MF_DIRECT=Gene Ontology, Función Molecular.

b) Análisis de enriquecimiento con clusterProfiler

Este estudio no mostro resultados significativos para este grupo.

c) Construcción de las redes de PPI

Un total de 30 nodos y 24 asociaciones proteicas fueron identificadas en la construcción de la red de PPI para los DEGs sobreexpresados del grupo 1 donde la interacción proteica entre Abcc9-Kcnj8 alcanzó el mayor CS de 0.99, y dos EChs con valores de 0.9 en el canal de bases de datos, y 0.88 en el canal de minería de textos (Figura 21A).

En el caso de la red de PPI de los DEGs subexpresados un total de 31 nodos y 49 interacciones fueron identificadas siendo la interacción Cenpk-Cenpn la que presentó un mayor CS de 0.99 y dos EChs con un valor de 0.9, tanto en el canal de bases de datos como en el canal de minería de textos (Figura 21B).

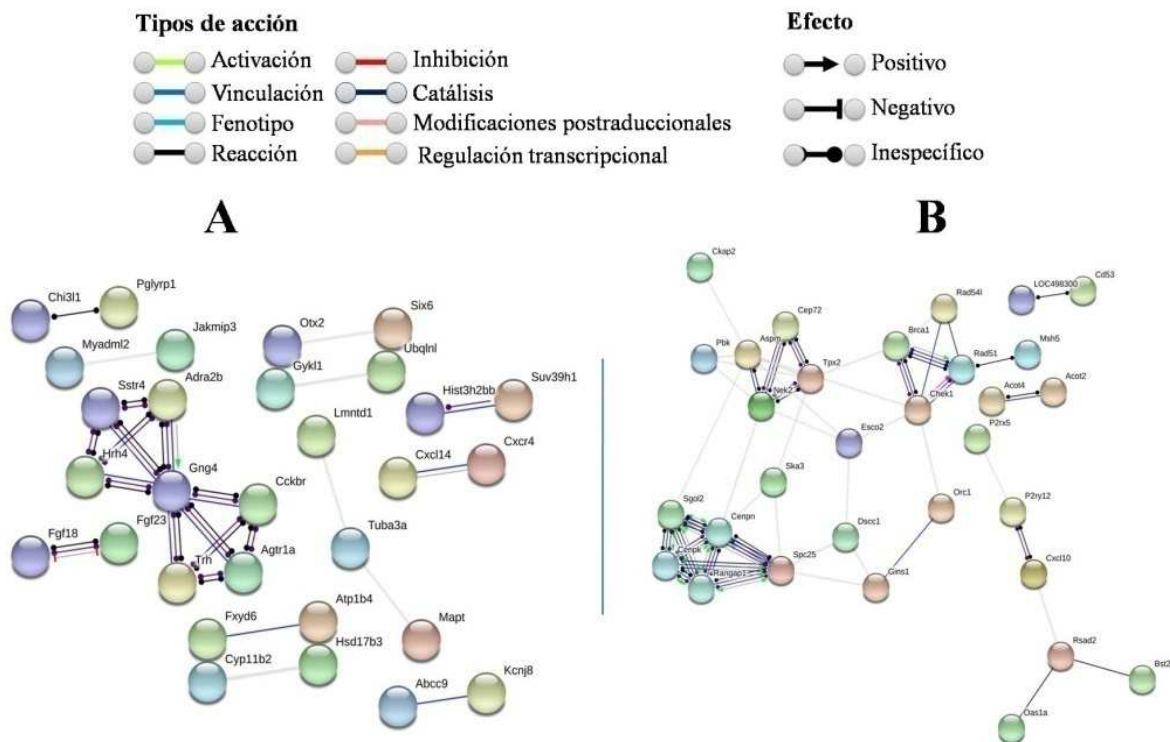


Figure 21. Red de interacciones proteicas (PPI) grupo 1 (ASCs-CH vs. ASCs-CN): A, B.- Red de interacciones proteicas (PPI) para los DEGs sobre y subexpresados, respectivamente. El color de la línea representa el tipo de acción y su forma el efecto.

B.- Resultados análisis del grupo 2 (ASCs-DH vs. ASCs-DN)

a) Análisis de enriquecimiento con el interfaz web DAVID

Este estudio no mostró resultados significativos para este grupo.

b) Análisis de enriquecimiento con clusterProfiler

Este estudio no mostró resultados significativos para este grupo.

c) Construcción de las redes de PPI

En la construcción de redes de PPI del grupo 2 (ASCs-DH vs. ASCs-DN) sólo se obtuvieron resultados significativos para DEGs sobreexpresados, a partir de los cuales se obtuvo una red compuesta por 19 nodos y 14 interacciones proteicas, siendo la interacción Ntrk1-

Adora2a la que obtuvo el mayor CS, de 0.92, y un ECh de 0.9 en el canal de bases de datos (Figura 22).

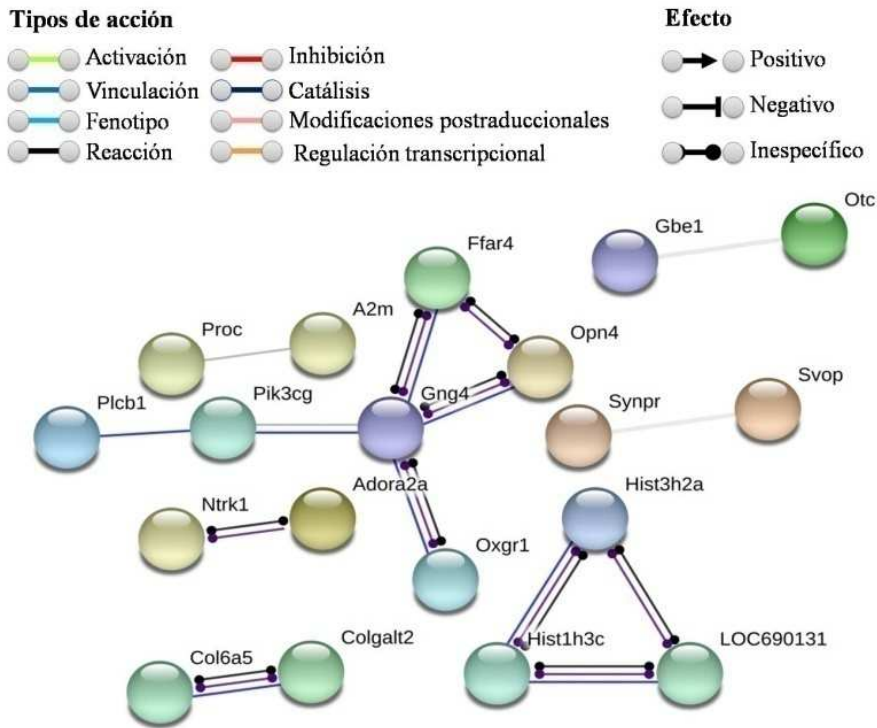


Figure 22. Red de interacciones proteicas (PPI) grupo 2 (ASCs-DH vs. ASCs-DN): Red de interacciones proteicas (PPI) para los DEGs sobreexpresados. El color de la línea representa el tipo de acción y su forma el efecto.

C.- Resultados análisis del grupo 3 (ASCs-DN vs. ASCs-CN)

a) Análisis de enriquecimiento con el interfaz DAVID

Este análisis arrojó 15 términos enriquecidos, y 32 infrarrepresentados para el grupo 3 (ASCs-DN vs. ASCs-CN). Las tablas 8 y 9 muestran los 12 términos más enriquecidos e infrarrepresentados, respectivamente.

Grupo 3. /Enriquecidos Categoría	Término	Nº Genes	Valor de p	Proporción de enriquecimiento	FDR
UP_KEYWORDS	Enlace disulfuro	27	0.00011884	2.22	0.00139051
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0016324~Membrana plasmática apical	9	0.00033711	5.17	0.00397037
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0030308~Regulación negativa del crecimiento celular	6	0.00066736	8.54	0.00994059
INTERPRO	IPR003961~Fibronectina tipo III	7	0.00095989	6.14	0.01259704
INTERPRO	IPR013783~Dominio similar a inmunoglobulina	13	0.00097148	3.08	0.0127482
UP_KEYWORDS	Señal	33	0.00122709	1.74	0.01427316
UP_SEQ_FEATURE	Dominio topológico:Extracelular	16	0.00167415	2.31	0.02097847
UP_SEQ_FEATURE	Glicosilación N-ligado (GlcNAc,,)	21	0.00168434	1.93	0.02110485
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005887~Componentes integrales de la membrana plasmática	14	0.00197636	2.67	0.02307183
KEGG_PATHWAY	mo04512~Interacción MEC- receptor	5	0.00198985	9.07	0.02206395
SMART	SM00060~FN3	6	0.00238948	6.30	0.02466187
UP_KEYWORDS	Glicoproteína	23	0.00247716	1.96	0.02862179

Tabla 8. Los 12 términos más enriquecidos para el grupo 3 (ASCs-DN vs. ASCs-CN):

UP_KEYWORDS= UniProt;
 GOTERM_CC_DIRECT= Gene Ontology, Componente celular.
 GOTERM_BP_DIRECT= Gene Ontology, Proceso biológico.
 INTERPRO=InterPro.
 UP_SEQ_FEATURE=Uniprot.
 KEGG_PATHWAY= Base de datos KEGG.
 SMART= Base de datos SMART.

Grupo 3. /Infrarrepresentados Categoría	Término	Nº Genes	Valor de p	Proporción de infrarrepresentación	FDR
UP_SEQ_FEATURE	Región de interés: Unión del ligando	5	0.00012411	18.64	0.00164958
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0007623~Ciclo circadiano	8	0.00014233	7.03	0.00227805
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0045944~Regulación positiva de la transcripción del promotor de la ARN polimerasa II	23	0.00022585	2.39	0.00361262
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0030522~Receptor intracelular de la vía de señalización	5	0.00024428	16.10	0.00390673
INTERPRO	IPR003070~Receptor nuclear huérfano	3	0.00025286	107.69	0.00350554
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004879~Actividad del factor de transcripción ARN polimerasa II, secuencia específica de unión al ADN, activación del ligando	5	0.00036585	14.50	0.00481052
INTERPRO	IPR026052~Inhibidor de la proteína de unión al ADN	3	0.00050264	80.77	0.00695722
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0071376~Respuesta celular a la corticotropina	3	0.00051527	79.70	0.00822394
UP_KEYWORDS	Ciclos biológicos	6	0.00072626	8.42	0.00887571
UP_SEQ_FEATURE	Dedo de zinc: Tipo NR C4	5	0.0007363	11.91	0.00974931
UP_SEQ_FEATURE	Unión al ADN: Receptores nucleares	5	0.0007363	11.91	0.00974931
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0043153~Cambios del ciclo circadiano mediados por el fotoperiodo	4	0.00081462	21.25	0.01297265

Tabla 9. Los 12 términos más infrarrepresentados para el grupo 3 (ASCs-DN vs. ASCs-CN):

UP_KEYWORDS= UniProt.

GOTERM_BP_DIRECT= Gene Ontology, Proceso biológico.

INTERPRO = InterPro.

GOTERM_MF_DIRECT = GeneOntology, Función molecular.

UP_SEQ_FEATURE = Uniprot.

b) Análisis de enriquecimiento con clusterProfiler

Este estudio no mostró resultados significativos para este grupo.

c) Construcción de las redes de PPI

La red de PPI para los DEGs sobreexpresados del grupo 3 resultó estar constituida por 17 nodos y 9 interacciones proteicas, donde la interacción Blnk-Dapp1 alcanzó una CS de 0.92 y un ECh con puntuación de 0.9, en el canal de bases de datos (Figura 23A).

En el caso de la red de PPI construida para los DEGs subexpresados, esta presentó 26 nodos y 21 asociaciones proteicas. La interacción Hist1h3c-Hist2h4 alcanzó el mayor CS de 0.98, y dos ECh con puntuación de 0.88 en el canal de experimentos, y 0.87 en el canal de minería de textos (Figura 23B).

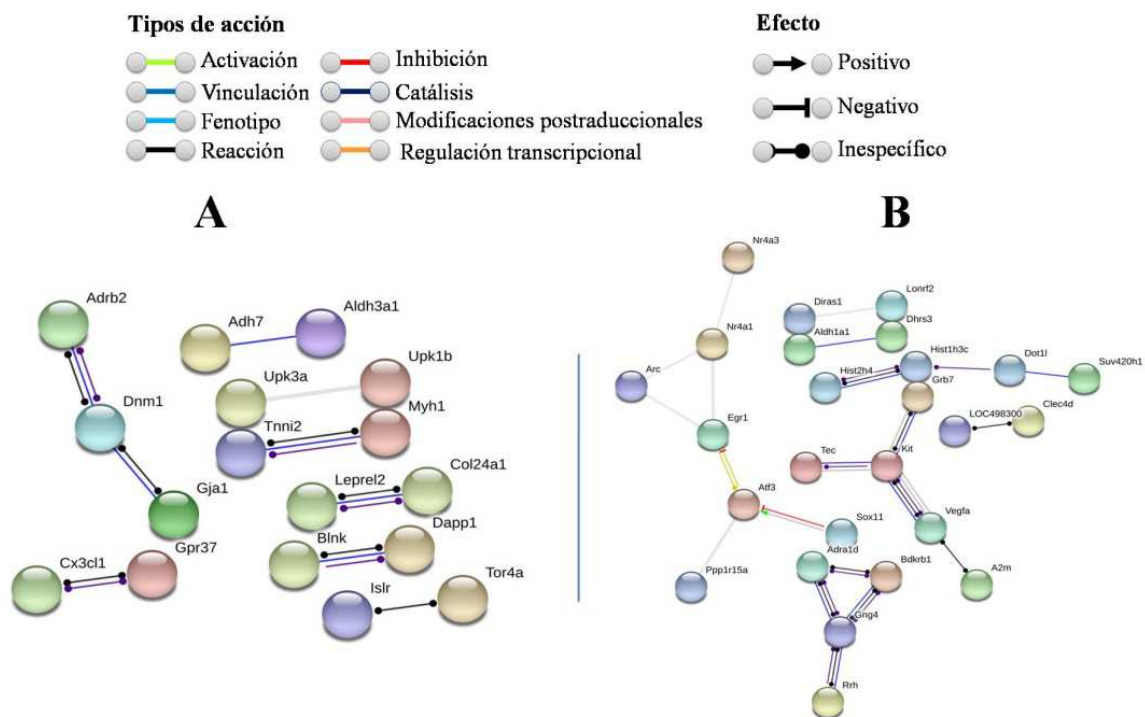


Figura 23. Red de interacciones proteicas (PPI) grupo 3 (ASCs-DN vs. ASCs-CN): A, B.- Red de interacciones proteicas (PPI) para los DEGs sobre y subexpresados, respectivamente. El color de la línea representa el tipo de acción y su forma el efecto.

D.- Resultados análisis del grupo 4 (ASCs-DH vs. ASCs-CH)**a) Análisis de enriquecimiento con interfaz web DAVID**

El análisis de enriquecimiento del grupo 4 mostró 45 términos enriquecidos y 133 términos infrarrepresentados. Los 12 términos con más significación se muestran en las tablas 10 y 11 para los DEGs sobre y subexpresados, respectivamente.

Grupo 4. /Enriquecidos Categoría	Término	Nº Genes	Valor de p	Proporción de enriquecimiento	FDR
UP_SEQ_FEATURE	Dominio topológico: Citoplasma	121	2.96x10 ⁻¹¹	1.76	4.73x10 ⁻¹⁰
UP_SEQ_FEATURE	Dominio topológico: Extracelular	98	7.10x10 ⁻¹⁰	1.83	1.14x10 ⁻⁰⁸
KEGG_PATHWAY	mo03010:Ribosoma	28	2.50x10 ⁻⁰⁸	3.46	3.27x10 ⁻⁰⁷
UP_KEYWORDS	Enlace disulfuro	148	2.63x10 ⁻⁰⁸	1.57	3.54x10 ⁻⁰⁷
UP_SEQ_FEATURE	Región transmembrana	143	4.53x10 ⁻⁰⁸	1.48	7.24x10 ⁻⁰⁷
UP_KEYWORDS	Glicoproteína	140	2.37x10 ⁻⁰⁷	1.53	3.18x10 ⁻⁰⁶
UP_KEYWORDS	Señal	204	4.12x10 ⁻⁰⁷	1.39	5.55x10 ⁻⁰⁶
UP_SEQ_FEATURE	Glicosilación N- ligado (GlcNAc,,)	125	6.25x10 ⁻⁰⁷	1.48	1.00x10 ⁻⁰⁵
UP_SEQ_FEATURE	Enlace disulfuro	95	1.08x10 ⁻⁰⁶	1.60	1.73x10 ⁻⁰⁵
UP_KEYWORDS	Proteína ribosomal	28	1.66x10 ⁻⁰⁵	2.54	0.00022411
UP_SEQ_FEATURE	Péptido señal	103	2.75x10 ⁻⁰⁵	1.46	0.00043938
UP_KEYWORDS	Hélice transmembrana	319	6.33x10 ⁻⁰⁵	1.20	0.00085207

Tabla 10. Los 12 términos más enriquecidos para el grupo 4 (ASCs-DH vs. ASCs-CH):

UP_SEQ_FEATURE=Uniprot.

KEGG_PATHWAY= Base de datos KEGG.

UP_KEYWORDS= UniProt.

Grupo 4. /Infrarrepresentados Categoría	Término	Nº Genes	Valor de p	Proporción de infrarrepresentación	FDR
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0045944~Regulación positiva de la transcripción del promotor de la ARN polimerasa II	72	1.39x10 ⁻¹³	2.61	2.49x10 ⁻¹²
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000122~Regulación negativa de la transcripción del promotor de la ARN polimerasa II	51	2.54x10 ⁻⁰⁹	2.54	4.53x10 ⁻⁰⁸
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005634~Núcleo	189	4.61x10 ⁻⁰⁹	1.45	6.32x10 ⁻⁰⁸
UP_KEYWORDS	Núcleo	110	8.54x10 ⁻⁰⁹	1.73	1.12x10 ⁻⁰⁷
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006366~Transcripción del promotor de la ARN polimerasa II	34	1.06x10 ⁻⁰⁸	3.17	1.88x10 ⁻⁰⁷
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005737~Citoplasma	198	1.83x10 ⁻⁰⁸	1.41	2.51x10 ⁻⁰⁷
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0043565~Secuencia específica de unión al ADN	41	7.21x10 ⁻⁰⁸	2.59	1.08x10 ⁻⁰⁶
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0008284~Regulación positiva de la proliferación celular	37	9.80x10 ⁻⁰⁸	2.73	1.75x10 ⁻⁰⁶
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0010628~Regulación positiva de la expresión génica	30	2.92x10 ⁻⁰⁷	3.00	5.22x10 ⁻⁰⁶
INTERPRO	IPR004827~ Dominio cremallera de leucina	11	1.25x10 ⁻⁰⁶	7.71	1.95x10 ⁻⁰⁵
UP_KEYWORDS	Regulación de la transcripción	47	1.65x10 ⁻⁰⁶	2.15	2.17x10 ⁻⁰⁵
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003700~Actividad del factor de transcripción de la secuencia específica de unión al ADN	45	2.50x10 ⁻⁰⁶	2.15	3.73x10 ⁻⁰⁵

Tabla 11. Los 12 términos más infrarrepresentados para el grupo 4 (ASCs-DH vs. ASCs-CH):

UP_KEYWORDS= UniProt.

INTERPRO=InterPro.

GOTERM_MF_DIRECT = Gene Ontology, Función molecular.

GOTERM_BP_DIRECT = Gene Ontology, Proceso biológico.

GOTERM_CC_DIRECT = Gene Ontology, Componente celular.

b) Análisis de enriquecimiento con ClusterProfiler

El análisis con clusterProfiler para el grupo 4 (ASCs-DH vs. ASCs-CH) reveló 3 vías enriquecidas: la vía de interacción ligando-receptor neuroactivo, la vía del ribosoma y la vía del calcio (Figura 24A). A su vez este análisis mostró 3 vías infrarrepresentadas: la vía de infección por virus linfotrófico humano de células T tipo 1 (HTLV-1, Human T Lymphotropic Virus Type 1), la vía de desregulación transcripcional en cáncer y la vía del TNF (Figura 24B).

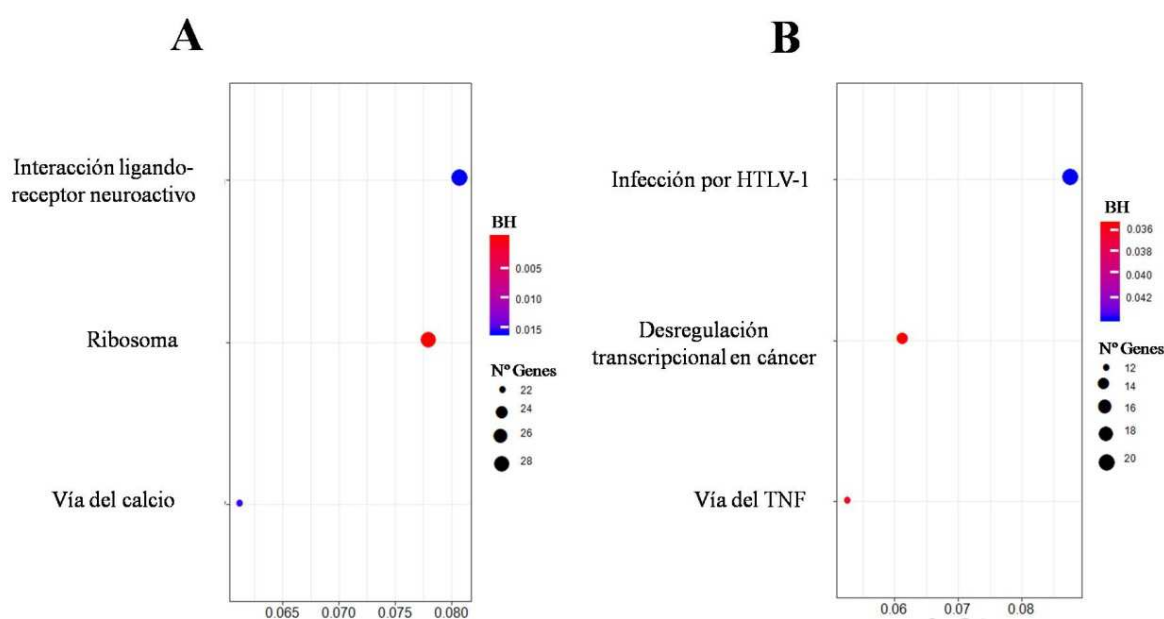
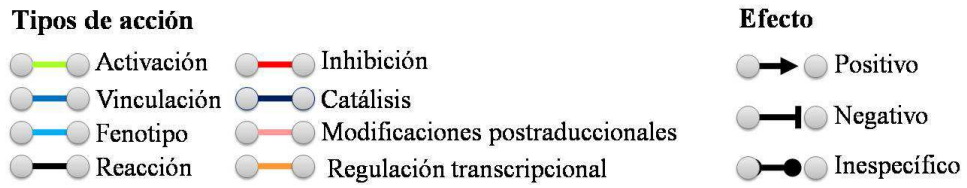


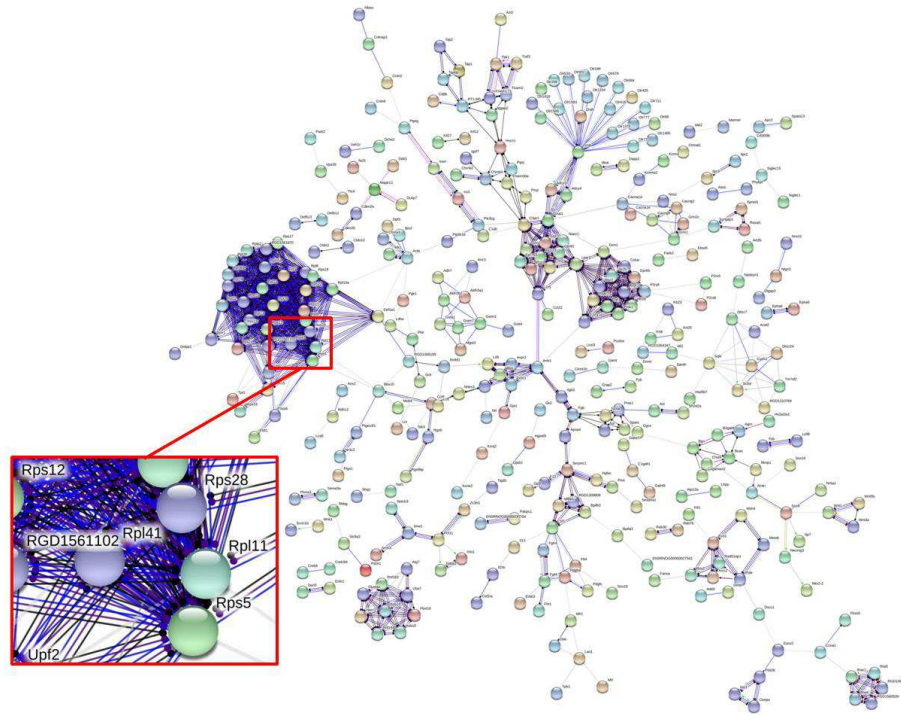
Figura 24. Análisis con clusterProfiler: A, B.- Diagrama de puntos para las vías enriquecidas e infrarrepresentadas para el grupo 4 (ASCs-DH vs. ASCs-CH), respectivamente. El tamaño del punto es proporcional al número de genes involucrados en la vía. Los p valores fueron corregidos con el método de Benjamini-Hochberg (BH), y fueron ordenados de menos (azul) a más (rojo) significativo.

c) Construcción de las redes de PPI

La red de PPI obtenida estaba compuesta por un total de 355 nodos y 891 asociaciones proteicas para los DEGs sobreexpresados, siendo la interacción proteica entre Rpl11-Rps5 la que obtuvo el mayor CS de 0.99, y dos EChs con valores de 0.92 en el canal de expresión simultánea, y 0.97 en el canal de experimentos (Figura 25A). Respecto a la red de PPI construida para los DEGs subexpresados, ésta presentó 185 nodos y 314 asociaciones proteicas, donde la interacción Kdr-Vega obtuvo el más alto CS de 0.99 y dos EChs con valores de 0.95 en el canal de minería de textos, y 0.9 en el canal de bases de datos (Figura 25B).



A



B

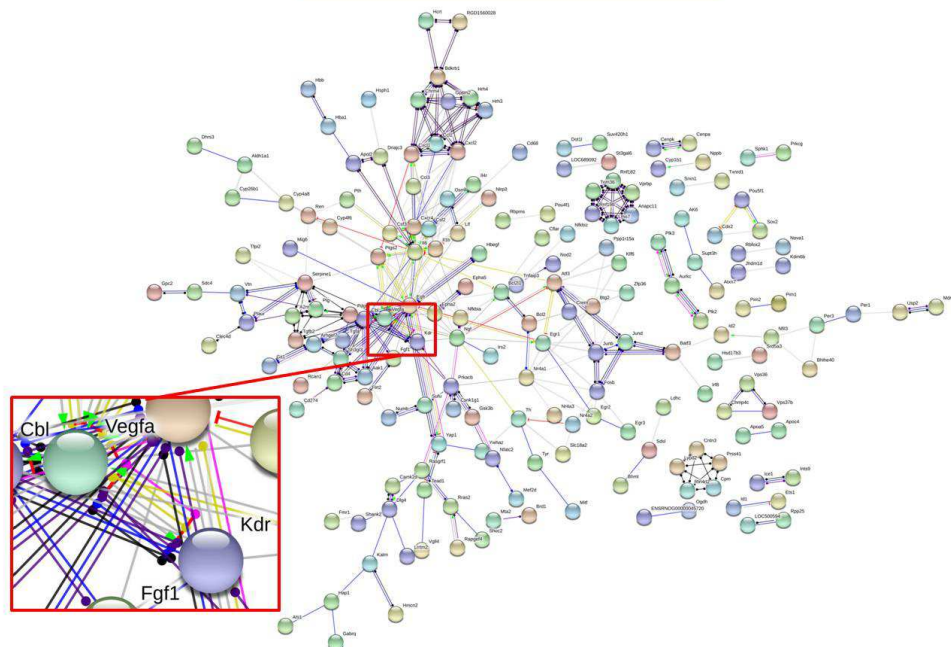


Figura 25. Red de interacciones proteicas (PPI) grupo 4 (ASCs-DH vs. ASCs-CH): A, B.- Red de interacciones proteicas (PPI) para los DEGs sobre y subexpresados, respectivamente. En recuadro se muestra la interacción proteica más significativa de cada grupo. El color de la línea representa el tipo de acción su forma el efecto.

2. Resultados estudio *In vivo*

2.1. Peso corporal y marcadores bioquímicos

El día 0 del estudio *in vivo* previo a la inducción de la ND en las ratas Wistar incluidas en el estudio, el peso corporal y los marcadores bioquímicos de todos los animales se encontraban dentro del rango de valores normales, correspondientes a animales sanos (Tabla 12).

Quince días después de la inyección de STZ (día 15), se constató el establecimiento del cuadro de diabetes en las ratas que habían sido inducidas con STZ, puesto que los resultados permitieron observar que el peso corporal de las ratas de los 5 grupos de animales a los que se les había administrado STZ era significativamente inferior al peso corporal de las ratas sanas ($p \leq 0.05$) (Figura 26A), y además que la concentración de glucosa en sangre de las ratas inducidas con STZ fue significativamente mayor a la que presentaban las ratas sanas control ($p \leq 0.001$).

Esta tendencia del peso corporal y de la concentración de glucosa en sangre se mantuvo a lo largo de todo el estudio, observándose los días 30 y 45 del estudio que las ratas sanas seguían manteniendo un peso corporal significativamente mayor y una concentración de glucosa en sangre significativamente menor al de las ratas con ND inducida, incluidas en los 5 grupos de tratamiento ND (Figura 26B).

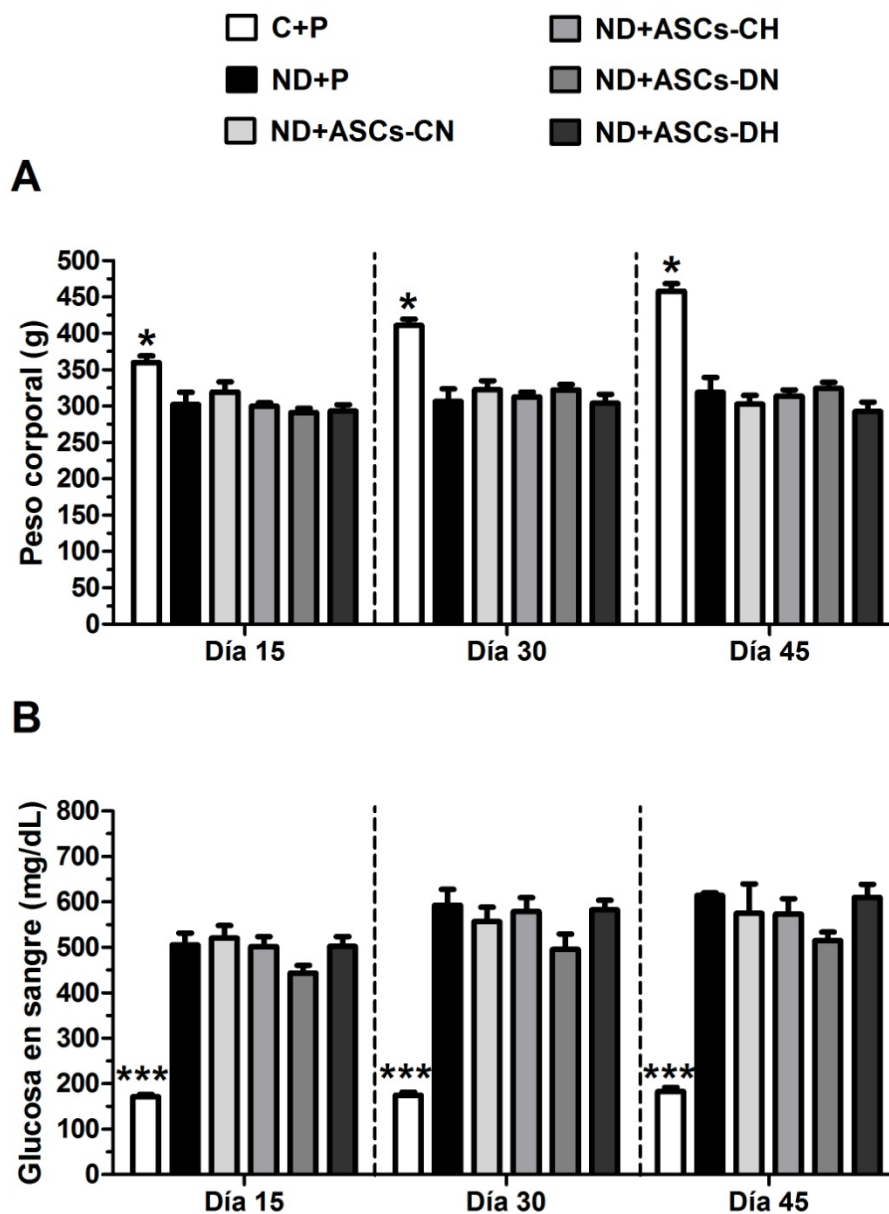


Figura 26. Peso corporal y glucosa en sangre días 15, 30 y 45: A.- **Peso corporal:** * $p \leq 0.05$ vs. ND+P, ND+ASCs-CN, ND+ASCs-CH, ND+ASCs-DN y ND+ASCs-DH en su respectivo día de estudio. B.- **Glucosa en sangre:** *** $p \leq 0.001$ vs. ND+P, ND+ASCs-CN, ND+ASCs-CH, ND+ASCs-DN y ND+ASCs-DH en su respectivo día de estudio. Resto de valores de $p \geq 0.05$ (ns). Los datos representan la media \pm SEM.

Respecto a la concentración de urea y creatinina en sangre, cuantificada los días 15, 30 y 45 del estudio, los resultados mostraron que todos los grupos de ratas con ND inducida presentaban una mayor concentración de ambos parámetros en sangre respecto a las ratas sanas, sin embargo, estas diferencias no resultaron significativas para ninguno de los dos parámetros ($p=ns$). Tampoco se observaron diferencias en los resultados obtenidos entre los distintos grupos de ratas con ND inducida ($p=ns$) (Figura 27A y B).

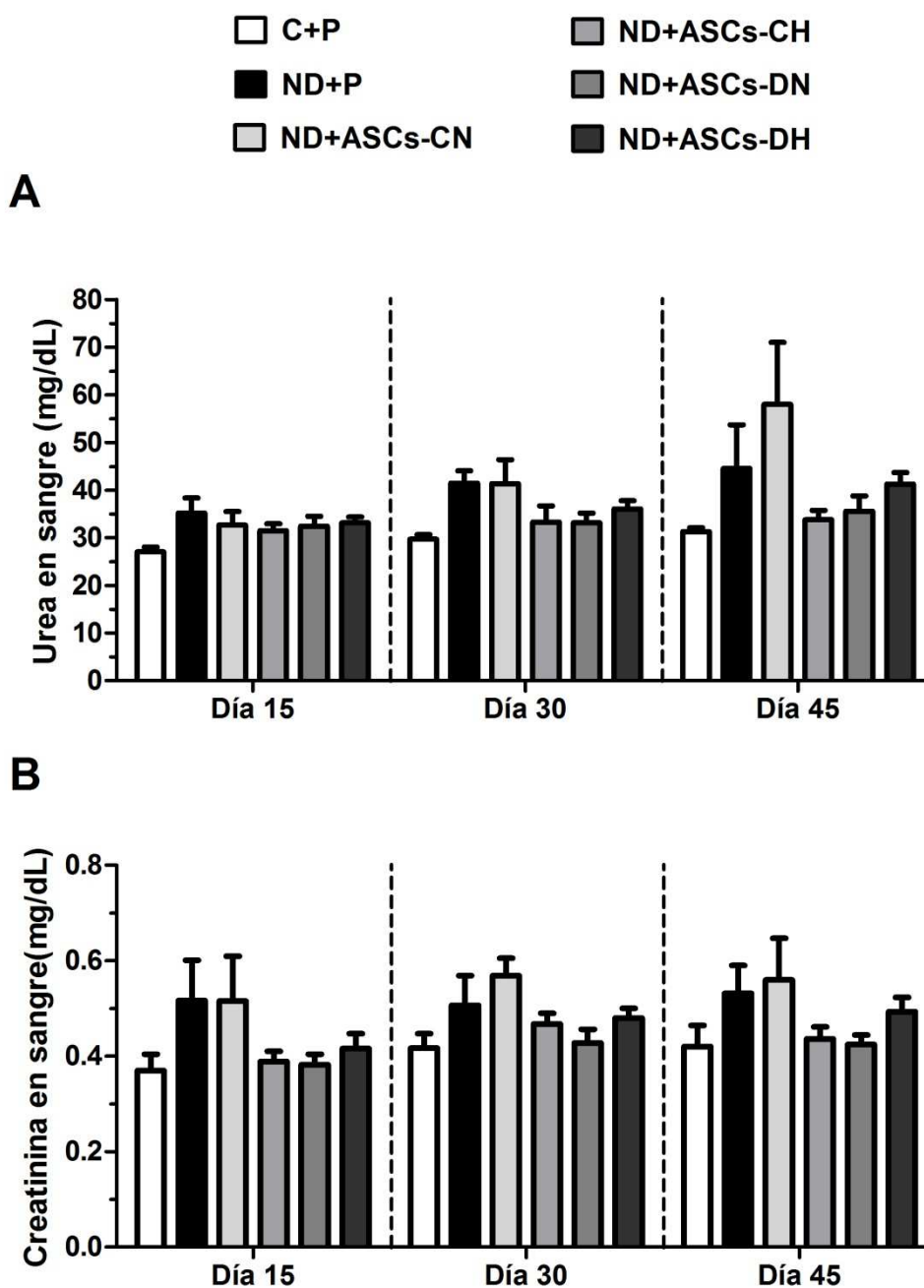


Figura 27. Urea y creatinina en sangre días 15, 30 y 45: A.- Urea: Valores de $p \geq 0.05$ (ns). B.- Creatinina: Valores de $p \geq 0.05$ (ns). Los datos representan la media \pm SEM.

A partir de los resultados obtenidos de las concentraciones en sangre de glucosa, urea y creatinina, en cada uno de los tiempos analizados, se realizó el cálculo del incremento/decremento neto de cada uno de los parámetros en el día 30 del estudio respecto al día 15, y en el día 45 respecto al día 30 del estudio (Figura 28A, B y C). A partir de los resultados obtenidos de estos incrementos/decrementos se realizaron las comparaciones entre los distintos grupos de tratamientos y no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas

entre los distintos tratamientos administrados en las ratas con ND inducida ($p=ns$). Como resultado más relevante, se observó que el día 45 del estudio los niveles de glucosa y creatinina en las ratas con ND inducida que habían sido tratadas con ASCs derivadas de ratas sanas y precondicionadas en hipoxia habían reducido su concentración en sangre respecto a la concentración observada en ambos parámetros el día 30 del estudio, sin embargo, esta reducción no resultó estadísticamente significativa ($p=ns$).

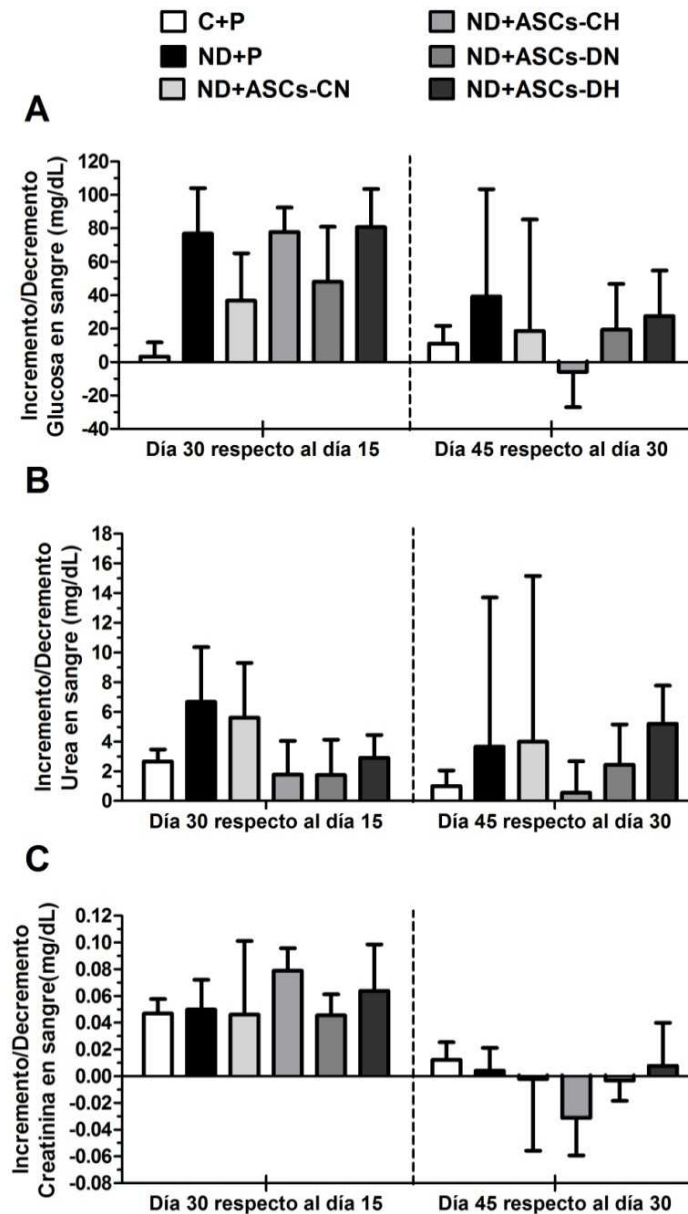


Figura 28. Incremento/decremento marcadores bioquímicos en sangre: A.- Glucosa en suero día 30 respecto al día 15, y día 45 respecto al día 30 ($p=ns$). B.- Urea en suero día 30 respecto al día 15, y día 45 respecto al día 30 ($p=ns$). C.- Creatinina en suero día 30 respecto al día 15, y día 45 respecto al día 30. Valores de $p \geq 0.05$ (ns). Los datos representan la media \pm SEM.

A partir de los resultados obtenidos de la concentración de albúmina y creatinina en orina los días 15, 30 y 45, se calculó la ratio albúmina/creatinina. Los resultados de dicho cálculo mostraron una elevación significativa de la ratio entre ambos parámetros los días 15, 30 y 45 ($p \leq 0.001$). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones realizadas entre los distintos grupos de tratamiento ($p = ns$) (Figura 29A). Este análisis también reveló un decremento neto no significativo de la ratio albúmina/creatinina en orina el día 45 respecto al día 30 en las ratas tratadas con ASCs-DH respecto a los otros grupos de tratamientos (Figura 29B).

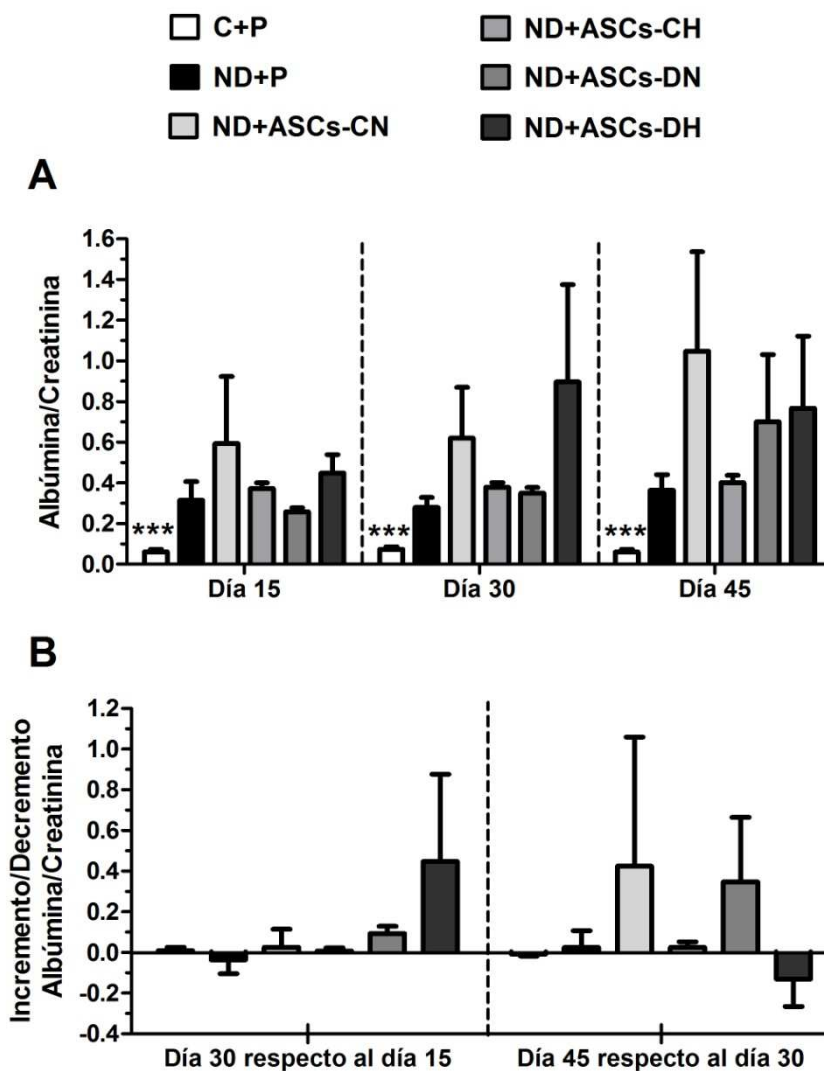


Figura 29. Marcadores bioquímicos en orina: A.- Ratio Albúmina/Creatinina días 15, 30 y 45: $***p \leq 0.001$ vs. ND+P, ND+ASCs-CN, ND+ASCs-CH, ND+ASCs-DN y ND+ASCs-DH en su respectivo día de estudio. **B.- Incremento/decremento ratio albúmina/creatinina:** Valores de $p \geq 0.05$ (ns). Los datos representan la media \pm SEM.

La tabla 12 muestra los resultados obtenidos en la cuantificación de los parámetros bioquímicos y del peso corporal de los grupos experimentales analizados en el estudio *in vivo*. En la tabla 13 se muestran los valores del cálculo del incremento/decremento neto de los parámetros bioquímicos estudiados en el presente trabajo.

Tiempo	Grupo de estudio	Peso Corporal (g)	En sangre			En orina
			Glucosa (mg/dL)	Urea (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Albúmina/Creatinina (Ratio)
Día 0	C+P	281.99±10.3	176.81±5.91	26.6±0.8	0.35±0.03	0.14±0.02
	ND+P	289.05±18.37	189.71±15.04	24.43±1.36	0.33±0.06	0.14±0.06
Día 15	C+P	360.24±8.79*	171.9±4.51***	27±1	0.37±0.03	0.06±0.01***
	ND+P	302.3±16.82	505.5±26.22	35.17±3.13	0.52±0.09	0.32±0.09
	ND+ASCs-CN	319.33±14.15	520.7±28.4	32.66±2.83	0.52±0.09	0.59±0.33
	ND+ASCs-CH	399.87±5.11	501.33±22.22	31.44±1.46	0.39±0.02	0.37±0.03
	ND+ASCs-DN	291.1±6.22	443.6±16.92	32.38±2.1	0.38±0.02	0.26±0.02
	ND+ASCs-DH	293.1±8.76	502.1±21.52	33.1±1.26	0.42±0.03	0.45±0.09
Día 30	C+P	411.01±8.6*	175.2±6.81***	29.67±1	0.42±0.03	0.07±0.01***
	ND+P	306.4±17.56	593.2±34.61	41.43±2.6	0.51±0.06	0.28±0.05
	ND+ASCs-CN	322.61±12.17	556.67±31.95	41.33±5.05	0.57±0.04	0.62±0.25
	ND+ASCs-CH	312.82±6.7	579.11±30.44	33.22±3.46	0.47±0.02	0.38±0.02
	ND+ASCs-DN	322.11±7.5	495.4±34.14	33.11±2.01	0.43±0.03	0.35±0.03
	ND+ASCs-DH	303.8±12.82	582.8±20.68	36±1.82	0.48±0.02	0.1±0.48
Día 45	C+P	458.11±10.3*	182.8±9.66***	31.23±0.82	0.42±0.04	0.06±0.01***
	ND+P	318.99±20.37	614.3±5.66	44.5±9.2	0.53±0.06	0.36±0.07
	ND+ASCs-CN	302.62±12.2	575.33±64.35	58±13	0.56±0.09	1.04±0.49
	ND+ASCs-CH	313.68±8.53	573.33±33.77	33.78±1.95	0.42±0.03	0.4±0.04
	ND+ASCs-DN	324.26±8.57	514.9±18.64	35.56±3.24	0.42±0.02	0.7±0.33
	ND+ASCs-DH	292.6±13.1	610.4±28.93	41.2±2.47	0.49±0.03	0.77±0.35

Tabla 12. Valores obtenidos en la cuantificación de marcadores bioquímicos los días 15, 30 y 45: Peso corporal: * $p \leq 0.05$ vs. ND+P, ND+ASCs-CN, ND+ASCs-CH, ND+ASCs-DN, ND+ASCs-DH, en su día correspondiente. **Glucosa en sangre:** *** $p \leq 0.001$ vs. ND+P, ND+ASCs-CN, ND+ASCs-CH, ND+ASCs-DN, ND+ASCs-DH, en su día correspondiente. **Ratio albúmina/creatinina:** *** $p \leq 0.001$ vs. ND+P, ND+ASCs-CN, ND+ASCs-CH, ND+ASCs-DN, ND+ASCs-DH, en su día correspondiente. Resto de valores de $p \geq 0.05$ (ns). Los datos representan la media±SEM.

Grupo de estudio	En sangre Incremento/Decremento						En orina Incremento/Decremento	
	Glucosa (mg/dL)		Urea (mg/dL)		Creatinina (mg/dL)		Albúmina/Creatinina (Ratio)	
	30-15	45-30	30-15	45-30	30-15	45-30	30-15	45-30
C+P	3.15±8.49	11±10.62	2.67±0.8	1±1.04	0.05±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	-0.01±0.01
ND+P	76.8±27.3	39.33±64.04	6.67±3.69	3.67±10.04	0.05±0.02	0.004±0.02	-0.04±0.07	0.02±0.08
ND+ASCs-CN	36.67±28.44	18.67±66.58	5.6±3.7	4±11.14	0.05±0.05	-0.002±0.05	0.03±0.09	0.42±0.63
ND+ASCs-CH	77.78±14.65	-5.79±21.18	1.78±2.27	0.56±2.13	0.08±0.02	-0.03±0.01	0.01±0.01	0.02±0.03
ND+ASCs-DN	48±33.06	19.44±27.28	1.75±2.39	2.44±2.7	0.05±0.02	-0.003±0.01	0.09±0.03	0.35±0.32
ND+ASCs-DH	80.7±22.79	27.6±27.07	2.9±1.54	5.2±2.55	0.06±0.03	0.01±0.03	0.45±0.43	-0.13±0.13

Tabla 13. Valores obtenidos en el cálculo del incremento/decremento neto de los marcadores bioquímicos: Valores de $p \geq 0.05$ (ns). Los datos representan la media±SEM.

2.2. Estudio morfológico semicuantitativo

Una vez concluido el estudio *in vivo*, los riñones derivados de todas las ratas sacrificadas fueron procesados y sometidos a tinción para la realización del estudio histopatológico por microscopía óptica y su análisis semicuantitativo.

El análisis morfológico semicuantitativo de las muestras de tejido renal procedentes de los dos grupos experimentales tratados con placebo (grupo control-sano y grupo ND) permitieron establecer el grado mínimo y máximo, respectivamente, de las distintas lesiones renales asociadas a ND.

Las muestras de tejido derivadas de ratas sanas tratadas con placebo (grupo control sano-placebo) mostraron una morfología renal normal sin presencia de hiper celularidad o expansión mesangial, capilares glomerulares sin dilataciones, células tubulares con borde en cepillo en su membrana apical y grosor normal en su membrana basal, y ausencia de signos de inflamación o necrosis en el intersticio (Figura 30).

Por otra parte, en las muestras procedentes de ratas con ND inducida y tratadas con placebo (grupo ND-placebo) se observaron importantes cambios estructurales y morfológicos en el tejido renal. A nivel glomerular se observó la presencia de expansión mesangial y dilataciones capilares glomerulares. En el compartimiento tubular se apreciaron signos de necrosis aguda en el epitelio tubular con pérdida del borde en cepillo en membrana su apical y aplanamiento celular;

además, se evidenció la presencia de células de aspecto claro. Y en el intersticio se observó la presencia de un intenso infiltrado inflamatorio (Figura 31).

Tras comparar estadísticamente los resultados del análisis semicuantitativo realizado en ambos grupos experimentales tratados con placebo (control-sano y ND) se obtuvieron diferencias significativas respecto al grado de daño observado en el tejido renal en todas las lesiones analizadas (p entre 0.01 y ≤ 0.001) excepto en la presencia del infiltrado inflamatorio ($p=ns$) (Figura 32).

Control + Placebo

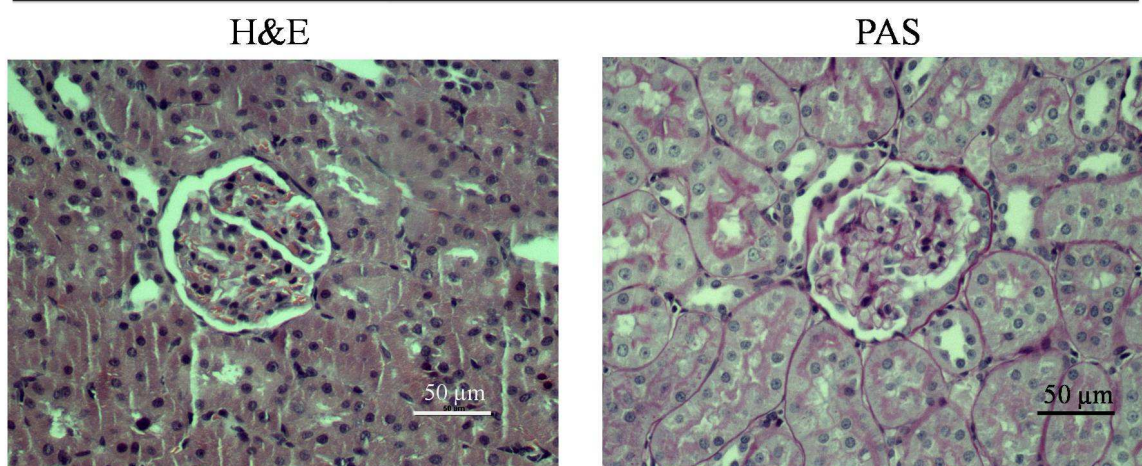


Figura 30. Morfología renal ratas control en H&E y PAS X200: No se observa ninguna lesión.

Nefropatía diabética + Placebo

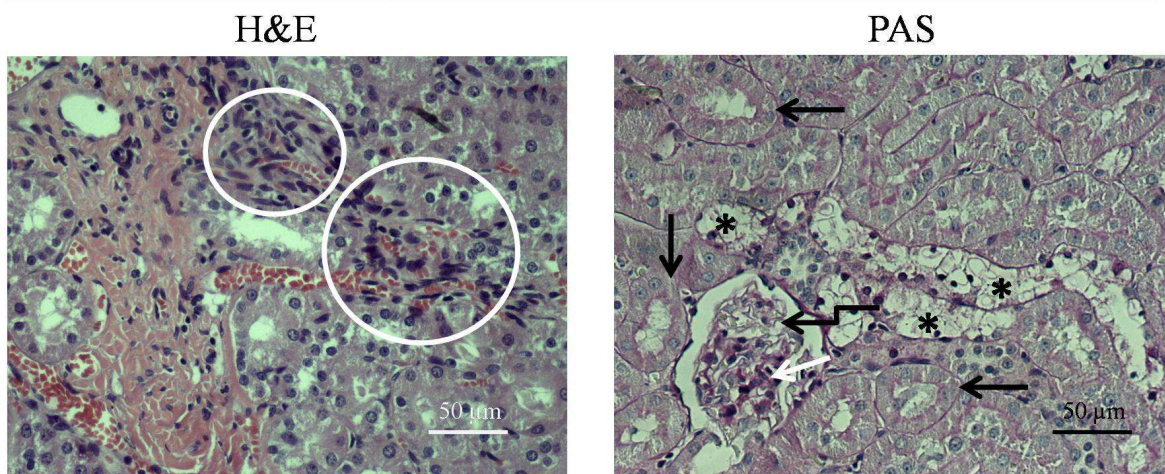


Figura 31. Morfología renal ratas con nefropatía diabética incluidas en el grupo tratado con placebo H&E y PAS X200: H&E: Intenso infiltrado inflamatorio (círculos blancos); PAS: Cambio a células claras (asteriscos negros), Signos de necrosis tubular aguda (NTA) (flechas negras), Expansión mesangial (flecha blanca), dilataciones capilares (flecha negra angulada).

Por otro lado, en las muestras de tejido renal procedentes de los grupos experimentales con ND inducida se observó que las ratas tratadas con ASCs de animales sanos y preacondicionadas en hipoxia (ASCs-CH) presentaban un menor grado de daño en todas las lesiones renales analizadas en comparación con las tratadas con placebo. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa, resultando valores de p entre 0.05 y ≤ 0.001 (Figura 32).

Además, entre los grupos experimentales con ND inducida que habían recibido tratamiento celular, las muestras de ratas tratadas con ASCs de animales sanos preacondicionadas en hipoxia (ASCs-CH) mostraron un menor grado de daño renal en todas las lesiones analizadas excepto en la presencia de depósitos de tubulares respecto al resto de grupos tratados con células. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa para las lesiones de glomerulomegalia ($p \leq 0.01$), cambio a células claras ($p \leq 0.05$), engrosamiento de la membrana basal tubular ($p \leq 0.05$), y presencia de infiltrado inflamatorio ($p \leq 0.01$) en la comparación realizada con el grupo de ratas tratado con células derivadas de animales sanos expandidas en normoxia (ASCs-CN) (Figura 32 D, G, H y K), y para las lesiones glomerulomegalia ($p \leq 0.01$), presencia de fibrosis intersticial ($p \leq 0.05$) e infiltrados inflamatorios ($p \leq 0.01$) en la comparación realizada con el grupo de ratas tratadas con ASCs derivadas de animales diabéticos preacondicionadas en hipoxia (ASCs-DH) (Figura 32 D, J y K).

Para analizar el efecto del preacondicionamiento sobre las ASCs derivadas de animales diabéticos (ASCs-D) se realizó una comparativa del grado de lesión observado entre los dos grupos experimentales tratados con ASCs-D (ASC-DH vs. ASCs-DN) y se observó que sólo dos lesiones presentaban diferencias estadísticamente significativas, depósitos tubulares ($p \leq 0.05$) y quistes tubulares ($p \leq 0.01$). Sin embargo, este resultado no fue homogéneo pues el grado de la lesión de depósitos tubulares eosinofílicos fue mayor y el de quistes tubulares menor en el grupo de ratas tratadas con ASCs-DH respecto al grupo tratado con ASCs-DN (Figura 32 F e I).

Las figuras 33, 34 y 35 muestran las imágenes de las lesiones más representativas del estudio.

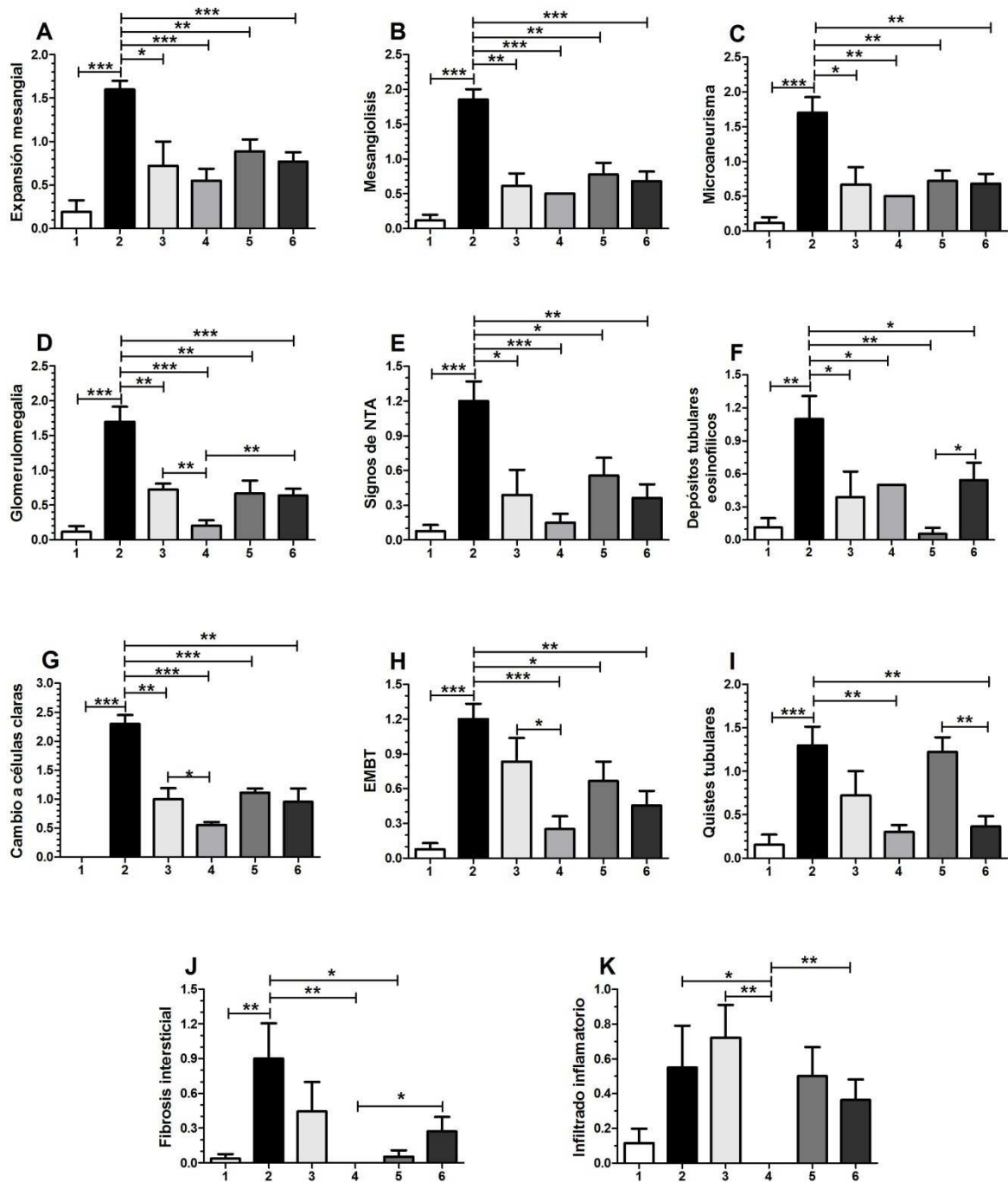


Figura 32. Análisis semicuantitativo del tejido renal: A.- Expansión mesangial. B.- Mesangiolisis. C.- Microaneurismas. D.- Glomerulomegalia. E.- Signos de necrosis tubular aguda (NTA). F.- Depósitos eosinofílicos tubulares. G.- Cambio a células claras. H.- Engrosamiento de la membrana basal tubular (EMBT). I.- Quistes tubulares. J.- Fibrosis intersticial. K.- Infiltrado inflamatorio.: 1. C+P, 2. ND+P, 3. ND+ASCs-CN, 4. ND+ASCs-CH, 5. ND+ASCs-DN, 6. ND+ASCs-DH. $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**) y $p \leq 0.001$ (***). Resto de valores de $p \geq 0.05$ (ns). Los datos representan la media \pm SEM.

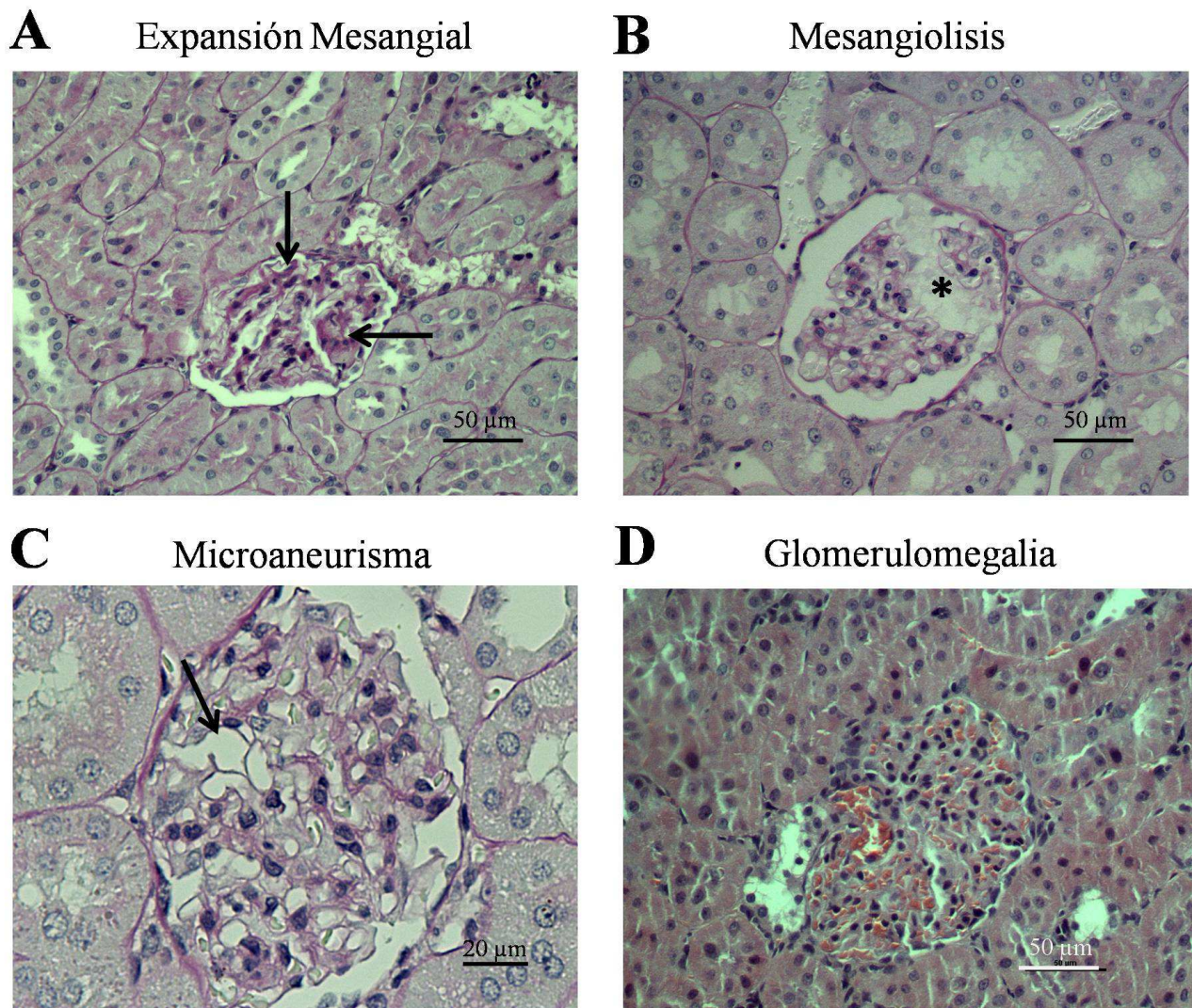


Figura 33. A.- Expansión mesangial en tinción PAS X200 (ND+ASCs-CN): Flechas negras. B.- Mesangiolisis en tinción PAS X200 (ND+ASCs-CN): Disolución de la matriz mesangial y pérdida de células mesangiales (asterisco negro). C.- Microaneurisma en tinción PAS X400 (ND+ASCs-CN): Flecha negra. D.- Glomerulomegalia en tinción H&E X200 (ND+ASCs-DN): Escala 50 μ m.

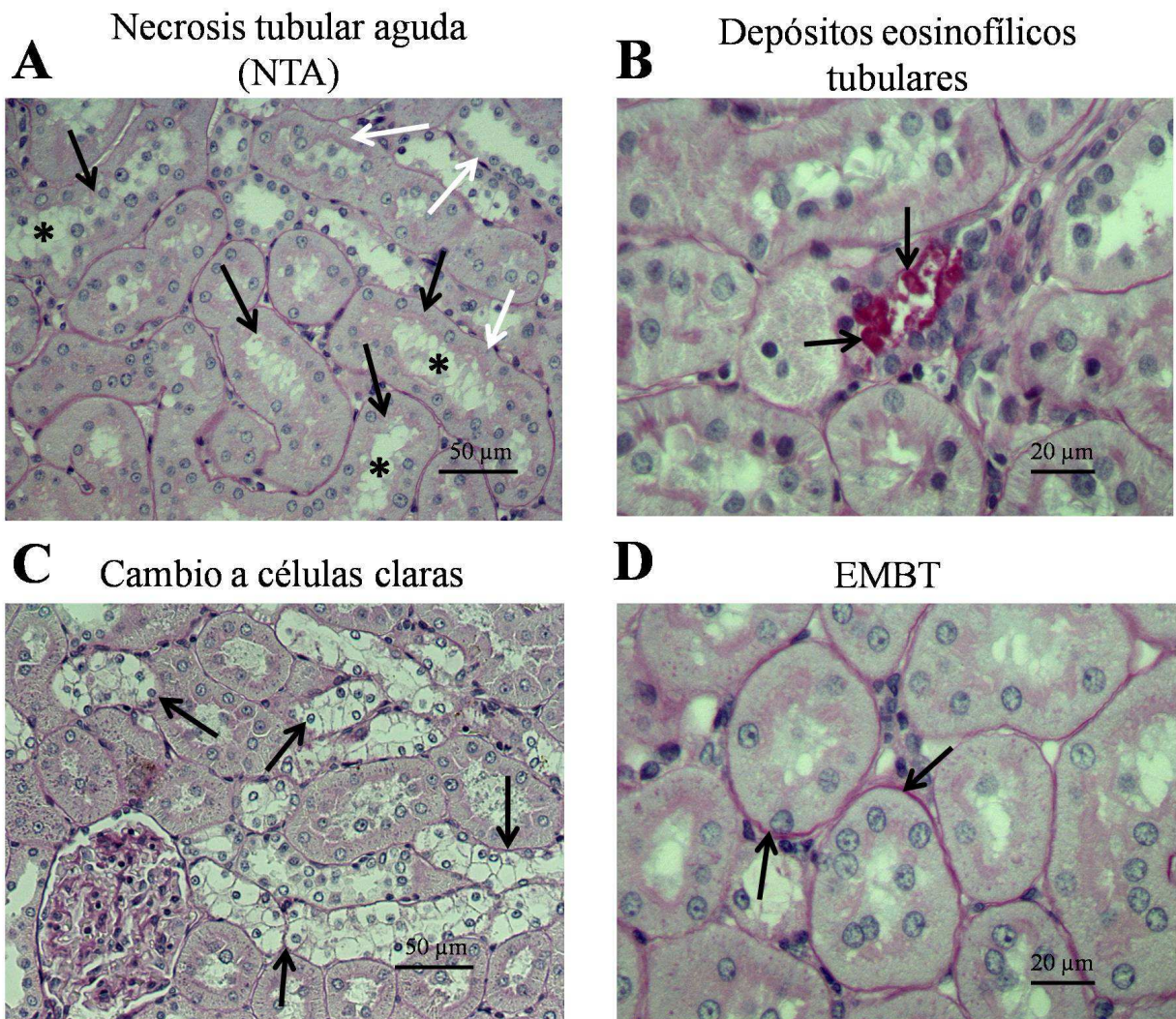


Figura 34. A.- Signos de necrosis tubular aguda (NTA) en tinción PAS X200 (ND+ASCs-CN): Pérdida del borde en cepillo (flechas negras), dilataciones de las luces tubulares (asteriscos negros) y aplanamiento del epitelio (flechas blancas). B.- Depósitos eosinofílicos tubulares en tinción PASX400 (ND+ASCs-DN): Flechas negras. C.- Cambio a células claras en tinción PAS X200 (ND+ASCs-CN): Células con citoplasma claro y membrana plasmática bien definida (Flechas negras). D.- Engrosamiento membrana basal tubular (EMBT) en tinción PAS X400 (ND+ASCs-CN): (Flechas negras).

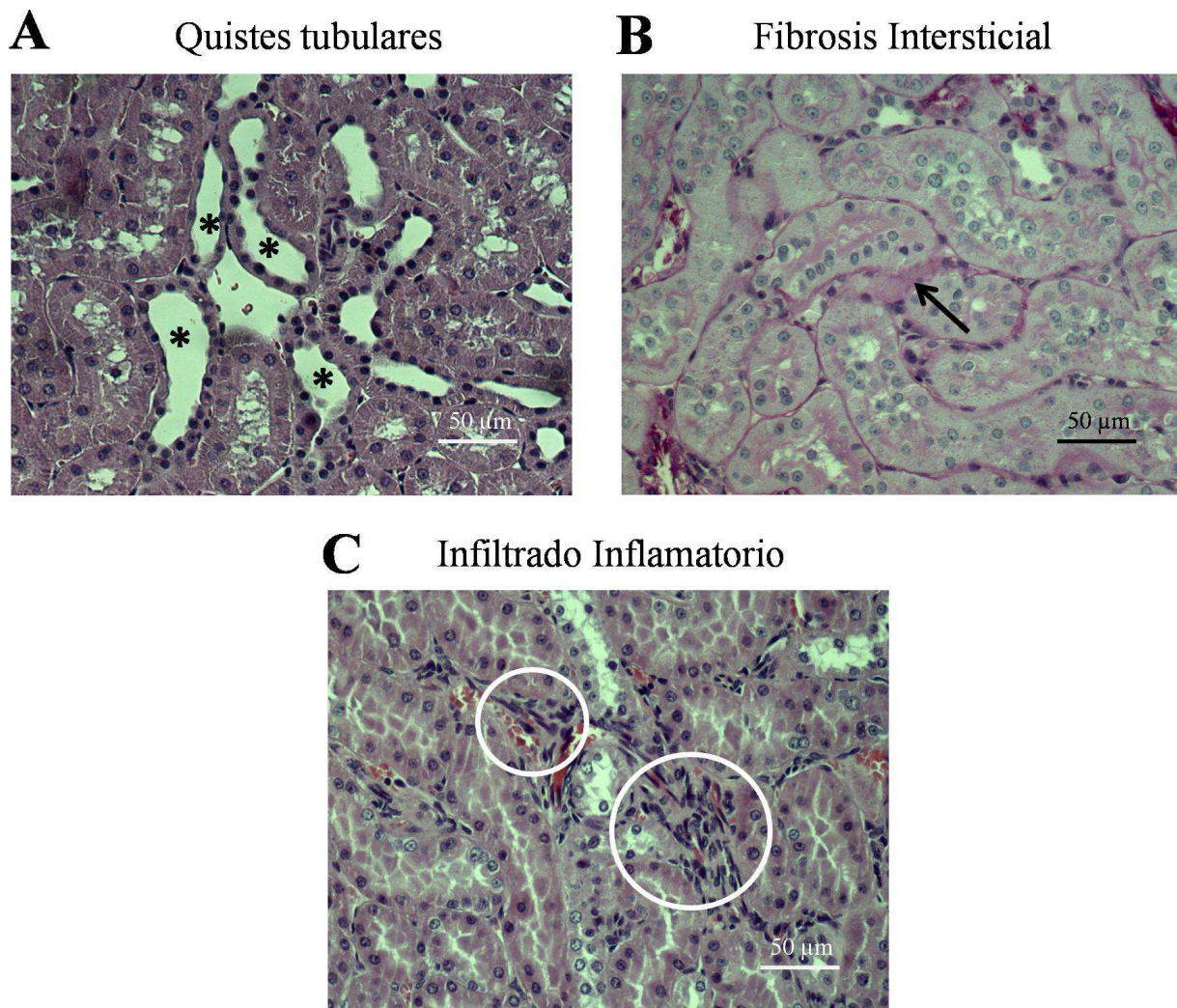


Figura 35. A.- Quistes tubulares en tinción H&E X200 (ND+ASCs-CH): Asteriscos negros. B.- Fibrosis intersticial en tinción PAS X200 (ND+ASCs-CN): Flecha negra. C.- Infiltrado inflamatorio en tinción H&E (ND+ASCs-DN): Círculos blancos.

La tabla 14 muestra los valores obtenidos en el estudio semicuantitativo de todas las lesiones estudiadas en el presente trabajo.

Lesión	C+P	ND+P	ND+ASCs-CN	ND+ASCs-CH	ND+ASCs-DN	ND+ASCs-DH
Expansión mesangial	0.19±0.13	1.6±0.1	0.72±0.28	0.55±0.14	0.88±0.14	0.77±0.1
Mesangiolisis	0.11±0.08	1.85±0.15	0.61±0.18	0.5±0.0	0.77±0.17	0.68±0.13
Microaneurismas	0.11±0.08	1.7±0.23	0.67±0.25	0.5±0.0	0.72±0.15	0.68±0.14
Glomerulomegalia	0.11±0.08	1.7±0.21	0.72±0.09	0.2±0.08	0.66±0.19	0.63±0.1
Signos de NTA	0.08±0.05	1.2±0.17	0.39±0.22	0.15±0.08	0.55±0.15	0.36±0.12
Depósitos eosinofílicos tubulares	0.11±0.08	1.1±0.2	0.39±0.23	0.5±0.0	0.05±0.05	0.54±0.16
Cambio a células claras	0	2.3±0.15	1±0.19	0.55±0.05	1.11±0.07	0.95±0.23
EMBT	0.08±0.05	1.2±0.13	0.83±0.2	0.25±0.11	0.66±0.16	0.45±0.12
Quistes tubulares	0.15±0.12	1.3±0.21	0.72±0.27	0.3±0.08	1.22±0.17	0.36±0.12
Fibrosis intersticial	0.04±0.04	0.9±0.3	0.44±0.25	0	0.05±0.05	0.27±0.12
Infiltrado inflamatorio	0.11±0.08	0.55±0.24	0.72±0.19	0	0.5±0.17	0.36±0.12

Tabla 14. Valores obtenidos en el análisis semicuantitativo del estudio histopatológico: Necrosis tubular aguda (NTA), Engrosamiento membrana basal tubular (EBTM). Los datos representan la media±SEM.

2.3. Análisis ultraestructural del tejido renal

Del total de riñones extraídos a las ratas, 6 fueron procesados (uno por grupo) para el análisis del tejido renal por microscopía electrónica de transmisión.

Este estudio permitió la observación a nivel ultraestructural del tejido renal sano derivado del grupo de ratas control tratadas con placebo, confirmando su estado fisiológico normal (Figura 36B).

El análisis mediante microscopía electrónica de transmisión permitió además identificar las lesiones más características del tejido renal lesionado debido a la nefropatía diabética en el grupo experimental con ND inducida tratado con placebo. Las lesiones más relevantes analizadas asociadas a la ND fueron la expansión mesangial, la presencia de microaneurismas, de necrosis tubular aguda y de infiltrado inflamatorio. Además, el análisis ultraestructural de dichas lesiones permitió determinar que el grado de lesión en los riñones procedentes de ratas con ND tratadas

con placebo era mucho mayor que el observado en las muestras renales derivadas de ratas que habían sido tratadas con ASCs, independientemente del tipo de tratamiento celular administrado (Figura 37). Como se observa en las figuras 38, 39, 40 y 41, las lesiones renales que caracterizan el daño renal provocado por la ND inducida fueron claramente identificadas en el análisis de las distintas muestras mediante microscopía electrónica de transmisión.

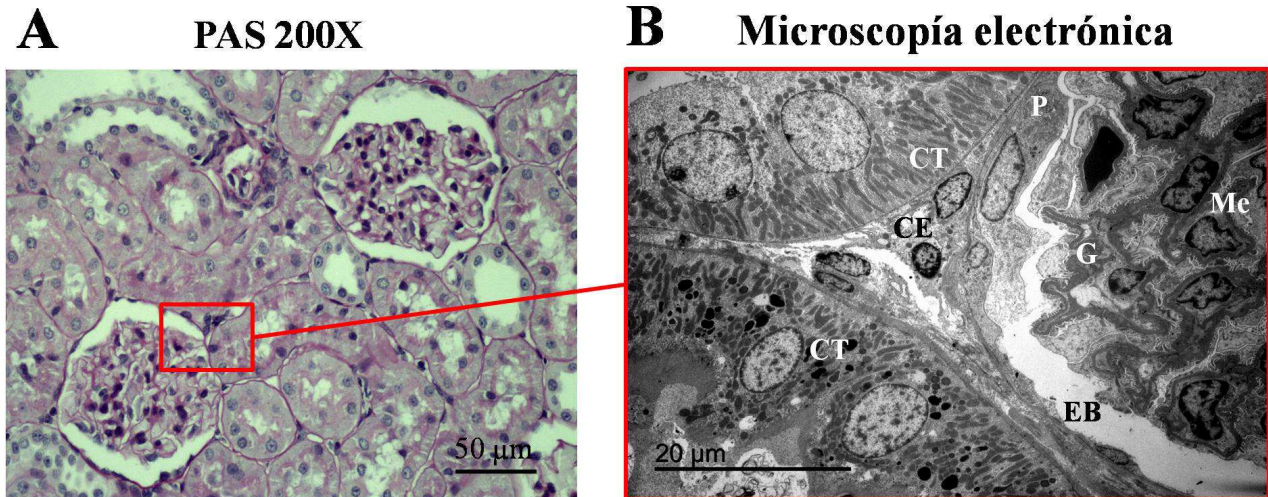


Figura 36. Ultraestructura tejido renal sano (C+P): A.- Microscopía óptica: Morfología renal sin alteraciones en tinción PAS X200. B.- Microscopía electrónica de transmisión: X1,500. Podocito (P), Célula tubular (CT), Célula endotelial (CE), Glomérulo (G), Espacio de Bowman (EB) y Mesangio (Me).

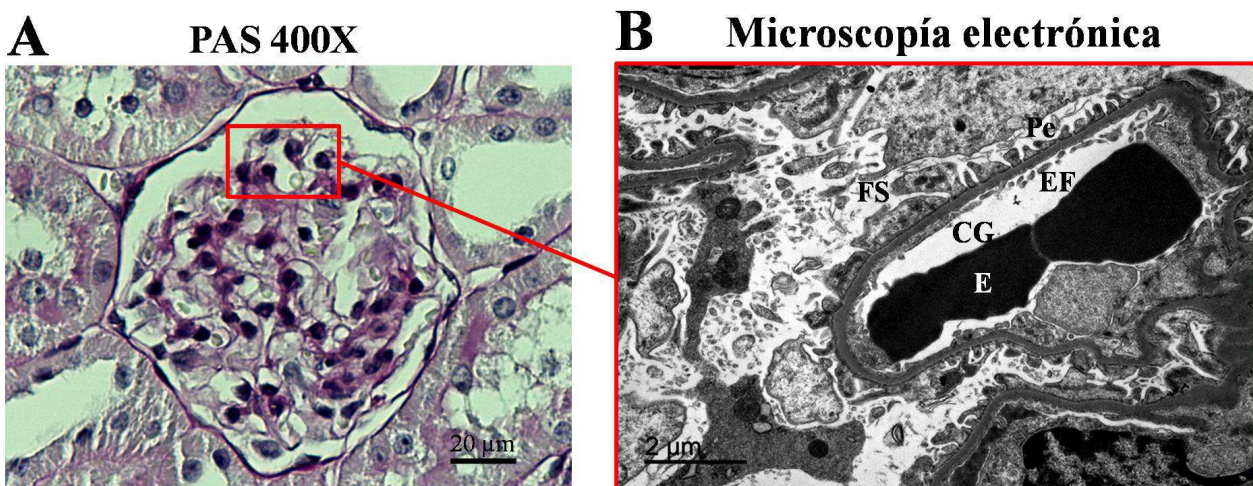


Figura 37. Ultraestructura tejido renal rata ND: A.- Microscopía óptica: Glomérulo rata ND (ND+P) en tinción PAS X400. B.- Microscopía electrónica de transmisión: X8,000. Pedicelos (Pe), Pérdida pedicular: Fusión segmentaria (FS), Endotelio fenestrado (EF), Capilar glomerular (CG), Eritrocito (E).

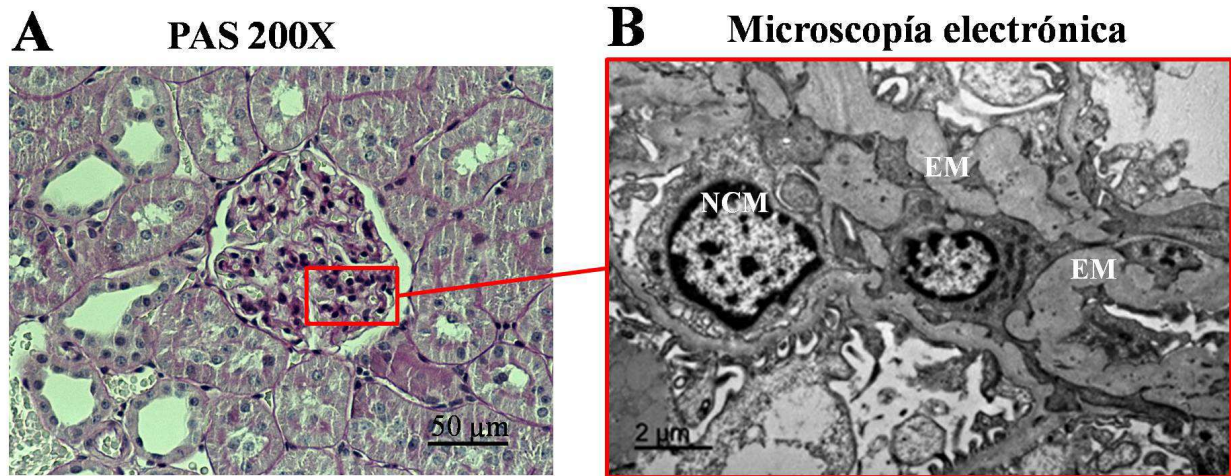


Figura 38. Ultraestructura expansión mesangial tejido renal rata ND: A.- Microscopía óptica: Glomérulo rata ND (ND+P) en tinción PAS X200. **B.- Microscopía electrónica de transmisión:** X9,000. Núcleo célula mesangial (NCM), Marcada expansión mesangial (EM).

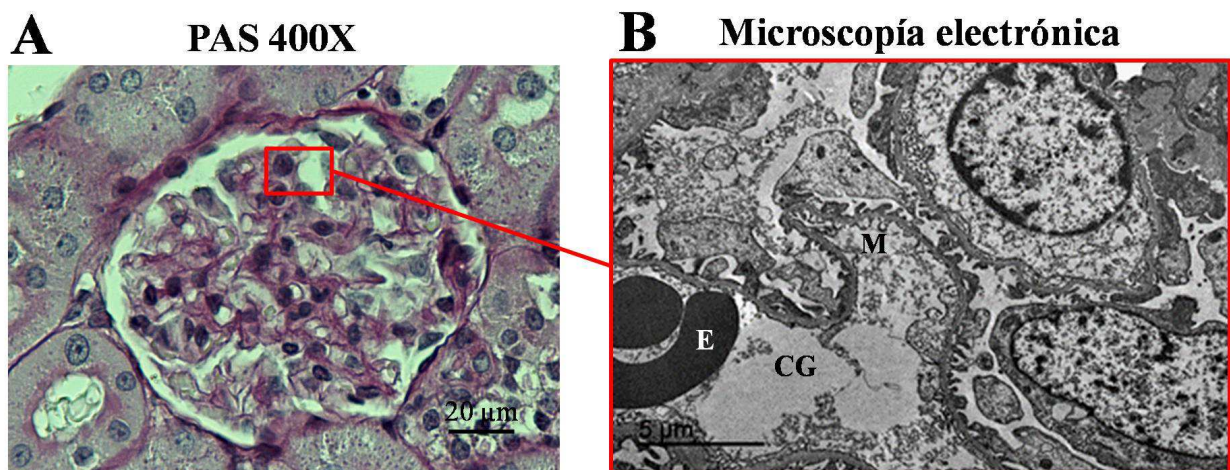


Figura 39. Ultraestructura microaneurisma tejido renal rata ND: A.- Microscopía óptica: Glomérulo rata ND (ND+ASCs-CH) en tinción PAS X400. **B.- Microscopía electrónica de transmisión:** X,8000. Microaneurisma (M), Eritrocito (E), Capilar glomerular (CG).

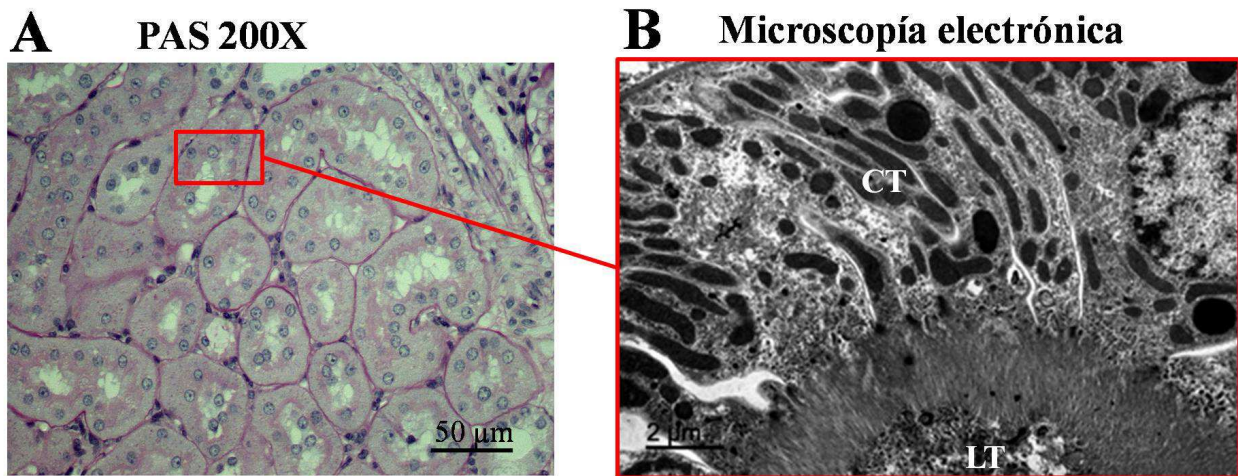


Figura 40. Ultraestructura necrosis tubular aguda tejido renal rata ND: A.- Microscopía óptica: Túbulos renales rata ND (ND+ASCs-CN) en tinción PAS X200. **B.- Microscopía electrónica de transmisión:** X6,900 Célula tubular (CT), Luz tubular (LT).

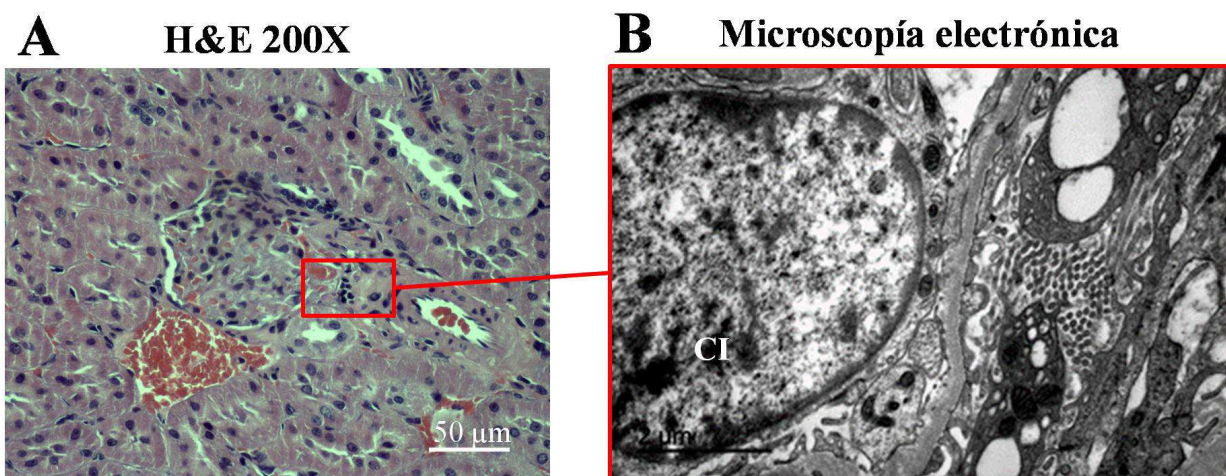


Figura 41. Ultraestructura infiltrado inflamatorio en tejido renal rata ND: A.- Microscopía óptica: Infiltrado inflamatorio rata ND (ND+ASCs-DN) en tinción H&E X200. **B.- Microscopía electrónica de transmisión:** X15,000. Célula inflamatoria (CI).

Discusión

DISCUSIÓN

Las MSCs han demostrado su efecto terapéutico en el tratamiento de una amplia gama de patologías [7, 15, 20, 21, 27, 35], incluida la ND [10, 49, 51-53]. Para su estudio y posterior aplicación las MSCs deben primero ser extraídas de sus nichos fisiológicos, cultivadas y expandidas *ex vivo* en el laboratorio. La mayoría de los protocolos de cultivo mantienen las células en condiciones diferentes a las fisiológicas [9, 31, 59, 60, 94, 95], siendo la concentración de oxígeno uno de los parámetros que más varía, presentando un valor estándar igual al de la atmosférica cuya concentración de oxígeno es aproximadamente cuatro veces mayor a la existente en el nicho fisiológico [59].

El efecto beneficioso del precondicionamiento en hipoxia sobre las MSCs ha sido ampliamente estudiado [9, 31, 59, 96, 97], demostrando su capacidad para incrementar el efecto angiogénico [31, 94] y paracrino de las MSCs [31, 98]. En un estudio reciente Wobma y colaboradores demostraron que las ASCs respondían a la hipoxia sobreexpresando proteínas implicadas en el metabolismo anaerobio, autofagia, migración y angiogénesis, como mecanismos de adaptación [99].

La diabetes está asociada con anomalías en la funcionalidad de las MSCs [11, 54-57] y se ha documentado que las ASCs obtenidas de pacientes diabéticos presentan una senescencia prematura y mayor riesgo de apoptosis [10, 11], así como una capacidad angiogénica, secretora, proliferativa y de diferenciación reducidas [57].

Hoy por hoy, se han experimentado diferentes estrategias con la finalidad de restaurar las capacidades de las MSCs deterioradas por la diabetes [56, 100, 101], sin embargo, aún no se conoce el rol específico de la hipoxia sobre las MSCs obtenidas de pacientes diabéticos.

En el presente trabajo se han analizado las características funcionales *in vitro* y, en un modelo experimental de nefropatía diabética, de ASCs derivadas de ratas diabéticas, expandidas en condiciones de normoxia y precondicionadas durante 48 horas en hipoxia, y se han comparado sus resultados con los obtenidos de células diabéticas expandidas sin exposición a hipoxia. Además, se han analizado comparativamente con los resultados obtenidos de ASCs derivadas de ratas sanas expandidas en ambas condiciones de cultivo.

Para dicho análisis se han desarrollado estudios *in vitro* de caracterización fenotípica y funcional, ensayos de angiogénesis, migración y de cuantificación de secreción de factores. Además, se han realizado análisis genómicos para la identificación de vías moleculares implicadas en el precondicionamiento hipóxico, en la diabetes y los posibles efectos a nivel molecular de la interacción de ambos factores. El análisis *in vivo* se ha desarrollado en un modelo de rata de nefropatía diabética inducida mediante STZ en el que ha sido evaluada la capacidad de recuperación de la función renal de los distintos tratamientos celulares administrados en las ratas con ND a través de la cuantificación de determinados marcadores bioquímicos relacionados con la función renal, y del análisis anatomopatológico y ultraestructural del tejido renal.

Los resultados del trabajo demuestran que las ASCs conservan su inmunofenotipo y capacidad de diferenciación tras el precondicionamiento en hipoxia.

El análisis de la tasa de duplicación celular de las ASCs ha demostrado que no existen diferencias significativas en el número de las duplicaciones celulares de las ASCs sanas y diabéticas precondicionadas en hipoxia respecto a las cultivadas en normoxia. No obstante, las ASCs diabéticas muestran una leve reducción, aunque, no significativa de sus duplicaciones celulares tanto en normoxia como en hipoxia. Este resultado confirma lo publicado por Cianfarini y colaboradores quienes han demostrado que la diabetes reduce significativamente la capacidad proliferativa de las ASCs [102].

En cuanto al estudio de la función celular, los resultados obtenidos muestran que el precondicionamiento en hipoxia no modifica la capacidad migratoria de las ASCs en los quimioatrayentes estudiados. Un gran número de estudios publicados ha demostrado el incremento de la capacidad migratoria de las MSCs aisladas de individuos sanos como efecto secundario al precondicionamiento en hipoxia [96, 103-105]. No obstante, en la bibliografía revisada hemos encontrado un estudio en el que se ha observado una reducción en la capacidad migratoria de las MSCs causada por la acción directa del HIF-1 en el citoesqueleto [106]. No se han hallado publicaciones respecto al efecto de la hipoxia en ASCs procedentes de individuos diabéticos, aunque basados en nuestros resultados se puede sugerir que la hipoxia no produce cambios en la capacidad migratoria de las ASCs-D, al menos según las condiciones experimentales que hemos utilizado en nuestro trabajo.

En un estudio Spinetti y colaboradores demostraron que células proangiogénicas (PAC, pro-angiogenic cells) derivadas de MO de pacientes con DM2 presentan una reducción

significativa en su capacidad migratoria hacia el SDF-1, y justifican esta reducción por la sobreexpresión del miR-15a y del miR-16. También observaron que la hipoxia incrementa la sobreexpresión de estos dos microRNAs [107]. Estas observaciones concuerdan con nuestros resultados de migración *in vitro*, lo que permite sugerir que la reducción de la migración hacia el SDF-1 por parte de las ASCs diabéticas preacondicionadas en hipoxia podría deberse en parte a un mecanismo similar al observado en las PACs.

En cuanto a la actividad paracrina, un resultado destacable es el incremento significativo de la secreción de IL-6 por parte de las ASCs-D en ambas condiciones de cultivo. Estos resultados concuerdan con un estudio publicado según el cual las BMMSCs derivadas de ratas diabéticas presentan una sobreexpresión génica de IL-6 [57, 108]. Además, en la literatura existen evidencias que demuestran que los pacientes diabéticos padecen inflamación crónica de bajo grado caracterizada por un incremento sistémico de IL-6, entre otros factores [109-111]. Este incremento está estrechamente asociado con la patogénesis de las complicaciones microvasculares que acompañan la diabetes [111]. Por lo tanto, los resultados sugieren que la diabetes estimula la secreción de IL-6 en las ASCs de ratas, y que esta secreción podría contribuir al incremento sistémico de esta citoquina en pacientes diabéticos [57].

El resto de resultados obtenidos en el estudio del análisis de la secreción paracrina de las ASCs sanas y diabéticas ha demostrado que el preacondicionamiento en hipoxia no afecta de un modo significativo a la capacidad de secreción de los factores VEGF, HGF, IDO, IGF-1 y EGF en las ASCs derivadas de animales diabéticos. Contrario a estos resultados, existen estudios publicados que han demostrado un efecto estimulador de la hipoxia sobre la capacidad de secreción de las MSCs en general [98]. No obstante, se ha observado también que el cultivo de ASCs derivadas de donantes sanos a concentraciones de oxígeno de entre el 1% al 2% favorece su secreción de VEGF pero no de otros factores como el PDGF, KGF, TGF β 1 y HGF [94, 95, 112], pudiendo incluso reducir significativamente la secreción de éste último factor [95]. La disparidad entre los resultados obtenidos en el presente trabajo respecto a las publicaciones revisadas podría deberse a las diferentes concentraciones de oxígeno usadas en el desarrollo de cada estudio.

Con el análisis de la capacidad angiogénica se ha demostrado que la hipoxia mejora significativamente la habilidad de formar vasos *in vitro* en ambas poblaciones de ASCs, sanas y diabéticas. Un amplio número de publicaciones respaldan estas observaciones [9, 31, 59, 60, 94].

Sobre la base de los estudios de funcionalidad celular se puede sugerir que el preacondicionamiento en hipoxia es por sí solo un método limitado para la finalidad de restaurar la funcionalidad deteriorada por la diabetes en las ASCs, puesto que solo reproduce una de las variables que componen su nicho *in vivo*. No obstante, sí es una herramienta útil para evidenciar las profundas alteraciones que produce la diabetes en la funcionalidad de las ASCs.

Otro de los objetivos del presente trabajo ha sido identificar los cambios genómicos provocados por la diabetes, la hipoxia y la interacción de ambas sobre la funcionalidad de las ASCs. Para este fin se llevaron a cabo ensayos de microarrays y estudios bioinformáticos.

El primer ensayo de microarray se propuso estudiar las diferencias existentes entre las ASCs obtenidas de ratas sanas en hipoxia, respecto a las cultivadas en normoxia (ASCs-CH vs. ASCs-CN). El análisis de enriquecimiento de los DEGs sobreexpresados mostró que cinco de los seis términos enriquecidos significativamente tienen directa relación con la membrana celular y contienen el gen ESAM. Este gen es codificante de la proteína de membrana denominada molécula de adhesión celular selectiva endotelial (ESAM, Endothelial Cell-selective Adhesion Molecule), y al contribuir en la formación de uniones entre CE tiene un rol en la formación y consolidación de vasos sanguíneos en procesos angiogénicos patológicos [113]. Respecto al análisis bioinformático de los DEGs subexpresados del primer microarray, éste mostró que el término más infrarrepresentado "Segregación cromosómica" contiene el gen CENPN, y que los términos "Cromosoma nuclear condensado" y "Cromatina", también significativamente infrarrepresentados, contienen en sus listas a los genes NEK2 y CHEK1, respectivamente. Basciano y colaboradores observaron que el cultivo prolongado (21 días) en hipoxia de las MSCs reducía su expresión de genes implicados en la replicación del ADN y la división celular; entre los que encontraron al CENPN [97], miembro de la familia de las proteínas centroméricas (CENP) [114]. Del mismo modo, se ha descrito el importante rol que tienen el NEK2 y el CHEK1 en la regulación del ciclo y la división celular [115, 116].

Las redes de PPI generadas en este análisis de microarray han mostrado que la interacción proteica entre Abcc9-Kcnj8 y Cenpk-Cenpn alcanzan los valores más representativos para los DEGs sobre y subexpresados, respectivamente. De acuerdo a la literatura, la proteínas Abcc9 y Kcnj8 son componentes importantes de los canales de potasio sensibles al ATP [117]. Estos canales tienen la capacidad de contribuir a la sobreexpresión del VEGF, lo que resulta en el incremento de la actividad angiogénica de las CEs según ensayos *in vitro* e *in vivo* [118].

Estos resultados además de estar en consonancia con el incremento de la angiogénesis observada en nuestros ensayos *in vitro*, permiten sugerir que la hipoxia tiene un rol regulador sobre las vías moleculares del ESAM y de Abcc9-Kcnj8 en las ASCs, que se traduce en el incremento de su capacidad angiogénica. Además, considerando que la subexpresión de genes vinculados con la división celular es una característica inherente a la quiescencia celular [97] y que ésta, entre otras propiedades, constituye un estado protector a las células troncales adultas frente el estrés genotóxico [119], se puede afirmar que la exposición de las ASCs sanas a periodos cortos de hipoxia (48h) es suficiente para estimular su quiescencia y su consecuente protección contra el estrés ambiental.

El segundo estudio de microarray evaluó los efectos de la hipoxia en células diabéticas respecto a sus pares cultivados en normoxia (ASCs-DH vs. ASCs-DN). El único resultado significativo del análisis de este microarray se ha observado en la construcción de las redes de PPI con los DEGs sobreexpresados, donde la interacción entre Ntrk1-Adora2a ha resultado la más significativa. Liu y colaboradores demostraron que la hipoxia induce la expresión del receptor de adenosina A2A (Adora2a, Adenosine A2A Receptor) en CEs, participando en la regulación del VEGF y en la transcripción HIF-1 α asociado a rutas glicolíticas, incrementando su capacidad angiogénica [120]. Estos hallazgos explican, al menos en parte, el incremento de la capacidad angiogénica de las ASCs-D preacondicionadas en hipoxia que hemos observado en los estudios *in vitro*, identificando la sobreexpresión del gen Adora2a como uno de los factores responsables de este efecto.

Tras realizar una profunda búsqueda bibliográfica, no se han encontrado trabajos publicados que hayan analizado el efecto de la hipoxia en células derivadas de pacientes diabéticos. Un estudio realizado por Beltrano y colaboradores analiza el efecto de un cultivo en condiciones de hipoxia y altas concentraciones de glucosa sobre ASCs humanas. Según sus resultados, las VE derivadas de estas células provocan un incremento significativo de la respuesta angiogénica de cocultivos realizados con CE y pericitos retinianos, sin embargo, los vasos formados presentaron una mayor permeabilidad y menor estabilidad [121].

El tercer microarray estudió las diferencias en la expresión génica de las ASCs-D en relación a las ASCs-C, ambas cultivadas en normoxia (ASCs-DN vs. ASCs-CN). Dentro de los 12 términos más enriquecidos, dos tienen directa relación con la glicosilación proteica: “Glicosilación N-ligado” y “Glicoproteína”. Un estudio reciente ha demostrado que el control inadecuado de los niveles de glucosa produce cambios en el perfil de glicosilación N-ligado en el suero de pacientes con DM1 [122]. Por otro lado, se ha reportado también que el perfil de

glicosilación N-ligado de la membrana celular de las MSCs experimenta modificaciones en el transcurso de su desarrollo [123], y que estos cambios pueden modular su capacidad de diferenciación [124]. Estas observaciones sugieren que la diabetes puede influir en la funcionalidad de las MSCs a través de los cambios inducidos en su perfil de glicosilación N-ligado, entre otras causas.

Otro resultado a destacar dentro del análisis del tercer microarray es la presencia del gen IL-1R2 en seis de los 12 términos más enriquecidos. Este gen codifica a la glicoproteína receptor de IL-1 tipo 2 (IL-1R2). El IL-1R2 es considerado un regulador negativo de la señalización de la IL-1 puesto que su interacción con este ligando no desencadena ningún efecto y es un competidor directo del receptor de IL-1 tipo 1 [125]. Según la literatura, el eje ligando/receptor IL-1/IL-1R1 promueve el efecto antiinflamatorio de las MSCs [126, 127], así como su capacidad migratoria hacia el SDF-1, mediante la sobreexpresión de su receptor CXCR4 [127]. Estas observaciones sugieren que a través del enriquecimiento de vías moleculares vinculadas con el IL-1R2 la diabetes afecta negativamente el efecto antiinflamatorio de las ASCs y a su capacidad de migración en presencia del factor SDF-1. Este último se constató también con nuestros resultados *in vitro*.

Dentro de los doce términos más infrarrepresentados obtenidos en el análisis del tercer microarray se encuentran dos términos ligados a la regulación positiva de la regulación génica, denominados “Regulación positiva de la transcripción del promotor de la ARN polimerasa II” y “Actividad del factor de transcripción ARN polimerasa II, secuencia específica de unión al ADN, activación del ligando”. Estos resultados corroboran las observaciones de Meugnier y colaboradores quienes demostraron que las células del tejido adiposo y músculo esquelético de individuos sanos respondían a la hiperglicemia aguda con una subexpresión génica generalizada de aproximadamente un "80%" de todas sus vías biológicas moleculares [128].

Otro resultado a destacar del análisis del tercer microarray es la presencia del gen codificante del receptor nuclear huérfano 4A1 (NR4A1, Orphan Nuclear Receptor 4A1) en ocho de los doce términos más infrarrepresentados. Se ha descrito que la sobreexpresión de este gen estimula la capacidad angiogénica de las CE [129] y la migración hacia el SDF-1 por parte de las MSCs [130]. Estos resultados vuelven a poner de manifiesto el efecto deletéreo de la diabetes sobre la capacidad angiogénica y migratoria de las ASCs, en este caso a través de la infrarrepresentación de vías relacionadas con el NR4A1.

La construcción de las redes de PPI derivadas del tercer microarray con los genes sobreexpresados revelaron que la interacción entre Blnk-Dapp1 alcanzó la puntuación más significativa. El gen DAPP1 codifica la proteína adaptadora dual de fosfotirosina y 3 fosfoinosítidos 1 (Dapp1, Dual Adaptor of Phosphotyrosine and 3-phosphoinositides 1) que promueve la interacción entre linfocitos B y T, además de estimular la adhesión linfocítica mediante la activación de las integrinas [131]. Hosokawa y colaboradores en un estudio reciente observaron la sobreexpresión del gen DAPP1 en células β productoras de insulina diferenciadas de células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs, Induced Pluripotent Stem Cells) obtenidas de pacientes con diabetes tipo 1 fulminante. Este subtipo de diabetes se caracteriza por la rápida destrucción de las células β del páncreas, causando así un aumento repentino de los valores de glucosa en sangre. En tal sentido, los autores de este estudio sugieren que la sobreexpresión de Dapp1 podría explicar la fisiopatología de la lisis de las células β en la diabetes fulminante tipo 1 [132]. En ese contexto, y sobre la base de las observaciones del presente trabajo se puede sugerir que la presencia del Dapp1 en las ASCs-D les podría conferir una mayor susceptibilidad de sufrir lisis celular frente a la respuesta inmunitaria.

Respecto a la red de PPI de los genes subexpresados del tercer microarray, la interacción entre Hist1h3c-Hist2h4 ha resultado ser la más significativa. Un estudio desarrollado por Gatta y colaboradores han concluido que MSCs derivadas de la gelatina de Wharton cultivadas por un periodo prolongado de 12 semanas para su envejecimiento, muestran subexpresados genes vinculados con la proliferación y la pluripotencialidad celular, entre los que se encuentra el gen HIST1H3C, codificante de un miembro de la familia de histonas H3 [133]. Estos hallazgos identifican otra ruta molecular por la cual la diabetes podría afectar la funcionalidad de las ASCs provocando su envejecimiento prematuro.

Con el cuarto microarray se identificaron los efectos de la diabetes en ASCs cultivadas en hipoxia, en relación a ASCs sanas también precondicionadas en hipoxia (ASCs-DH vs. ASCs-CH). Un resultado destacable es que dentro de los 12 términos más enriquecidos encontramos los términos "Glicoproteína" y "Glicosilación N-ligada", y del mismo modo la presencia del gen IL-1R2 en diez de los términos más enriquecidos. Estos datos están en consonancia con las observaciones del tercer microarray, y vienen a confirmar la presencia de estas huellas moleculares en células diabéticas, incluso tras su precondicionamiento en hipoxia.

Otro gen que presenta recurrencia dentro de los términos más enriquecidos es el FGFR4, gen codificante de la proteína glicosilada que se desempeña como el receptor 4 del factor de crecimiento fibroblástico (Fgfr4, Fibroblast Growth Factor Receptor 4) [134] cuya

sobreexpresión tiene un rol destacado en el metabolismo de la glucosa en células tumorales [135]. Considerando que las células troncales, al igual que las células tumorales, dependen principalmente de la glicolisis para la generación de energía [136, 137], el enriquecimiento de vías vinculadas con el FGFR4 sugeriría el rol de este gen con el metabolismo de la glucosa en ASCs-D.

Del estudio de enriquecimiento con la herramienta clusterProfiler solo se han obtenido resultados significativos en este cuarto análisis de microarray. Dentro de los términos más destacados, el denominado "Ribosoma" que se ha obtenido también entre los 12 términos más enriquecidos derivados del análisis realizado con la herramienta DAVID. De acuerdo con la bibliografía los niveles altos de glucosa promueven la biogénesis ribosomal, desencadenando el metabolismo de la síntesis proteica como la laminin α 1 en células epiteliales glomerulares [138]. Este incremento genera un desbalance entre la síntesis y la degradación proteica capaz de producir cambios estructurales en la matriz mesangial renal en DM2 [139].

En relación con los términos infrarrepresentados del cuarto microarray, entre los 12 más destacados se encuentran tres relacionados con la regulación positiva de la expresión génica como son "Regulación positiva de la transcripción del promotor de la ARN polimerasa II", "Transcripción del promotor de la ARN polimerasa II" y "Regulación positiva de la expresión génica", además el gen NR4A1 se presenta en siete de los 12 términos más significativos. Dado que estos resultados son similares a los obtenidos en el tercer análisis de microarray, se puede sugerir que la diabetes no solo afecta a las ASCs a través del enriquecimiento de vías moleculares, sino también mediante la infrarrepresentación de las mismas. Yoo y colaboradores estudiaron el efecto de la hipoxia en el gen NR4A1 y observaron que cumplía un rol importante en la estabilización del HIF-1 [140]. Además, se ha descrito que la estabilidad y funcionamiento del HIF-1 puede ser alterada por la sobreproducción de anión superóxido y la acumulación de metabolitos glucolíticos en la diabetes [141]. En base a estas observaciones se puede sugerir que las ASCs-D responden a la hipoxia en menor grado que las células derivadas de animales sanos.

Los resultados del análisis con el clusterProfiler para los DEGs subexpresados del cuarto microarray mostraron la infrarrepresentación del término "Infección por HTLV-1. El HTLV-1 es el agente responsable de la aparición de un tipo agresivo de leucemia/linfoma de células T en el adulto a través de la oncoproteína Tax que promueve la expresión de genes de diversas rutas moleculares. Una ruta de particular interés es la del factor nuclear kappa B (NF- κ B, nuclear factor-kappa B), que es capaz de inducir la expresión de genes implicados en la proliferación, migración y angiogénesis en MSCs [142]. Min y colaboradores identificaron un elemento

sensible al Tax (TRE, Tax-responsive Element) dentro del promotor de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS, Nitric Oxide Synthase) en células endoteliales sometidas a hipoxia que no estaban infectadas por el HTLV-1 [143]. Según estas observaciones, se puede afirmar que las MSCs podrían poseer en su genoma un gen TRE cuya expresión se vería alterada debido al estado de diabetes.

La construcción de la red PPI a partir de los DEGs sobreexpresados del cuarto microarray mostró que la interacción más significativa fue Rpl11-Rps5. El Rpl11 es una proteína ribosomal capaz de inducir la apoptosis cuando se asocia en estado libre con el MDM2, dando lugar a la estabilización y activación de p53. Por su acción proapoptótica se considera al eje Rpl11-MDM2-p53 como un protector de la estabilidad genómica frente a una amplia variedad de factores inductores de estrés celular y de alteraciones en la biogénesis ribosomal [144-146]. No se han encontrado estudios que relacionen la proteína Rpl11 con la diabetes, sin embargo, a la vista de los resultados presentados la hiperglicemia podría ser un inductor del estrés celular y de alteraciones de la biogénesis ribosomal provocando que las ASCs sean más susceptibles a sufrir apoptosis.

La red de interacciones proteicas derivadas de los DEGs subexpresados del cuarto microarray reveló que la interacción entre Kdr-Vegfa alcanzó la mayor significación. En la literatura científica está ampliamente descrito que el eje ligando/receptor Kdr-Vegfa constituye la interacción más importante en la vía del VEGF, siendo capaz de regular la proliferación celular, migración celular y la formación de nuevos vasos [147]. Este resultado evidencia una vez más las profundas alteraciones celulares provocadas por la diabetes como la reducción de la capacidad angiogénica de las ASCs diabéticas.

Una visión general y conjunta del estudio molecular revela que los resultados obtenidos del cuarto microarray (ASCs-DH vs. ASCs-CH) además de identificar una mayor cantidad de DEGs, de términos enriquecidos o infrarrepresentados y de interacciones proteicas, también arroja valores más significativos que los otros tres análisis de microarrays realizados. Por el contrario, los resultados del segundo microarray (ASCs-DH vs. ASCs-DN) mostraron una menor cantidad de DEGs generando un único resultado significativo tras el análisis bioinformático.

Sada y colaboradores, demostraron que la hiperglicemia genera hipoxia celular real a través del incremento del consumo mitocondrial de oxígeno y alteraciones en la función de la acuaporina 1 [148], proteína responsable del transporte de oxígeno [149]. Además, un estudio previo demostró que la hiperglicemia y la hipoxia tienen un efecto aditivo en el funcionamiento

celular [150]. Según estos resultados, sugerimos que el efecto aditivo entre la hiperglicemia y la hipoxia podría ser más dependiente de la hiperglicemia, y que esta interacción es la responsable de las grandes diferencias cuantitativas y cualitativas entre los resultados del cuarto y segundo microarray. No obstante, son necesarios más estudios para corroborar estas observaciones.

Para determinar el efecto de la hipoxia sobre la eficacia terapéutica de las ASCs analizadas en el estudio *in vivo*, se ha desarrollado un modelo experimental de ND mediante inducción con STZ. En la literatura existen varios modelos murinos para el estudio de la ND, ampliamente aceptados por la comunidad científica pues mimetizan en gran medida las características funcionales y morfológicas descritas en pacientes diagnosticados con ND [151-153].

En primera instancia los resultados del análisis de funcionalidad renal confirmaron de un modo significativo el incremento de los niveles de glucosa en sangre y de la excreción de albúmina en orina (ratio albúmina/creatinina) transcurridos 15 días desde la inyección de STZ en todas las ratas inducidas. Estos resultados ratifican el establecimiento de la diabetes en las ratas inducidas con STZ y además la presencia de daño renal incipiente y concuerdan, en parte, con la literatura revisada [43, 44, 49, 53, 151-153] según la cual se observa además un incremento de urea y creatinina en los modelos murinos de ND inducida con STZ [43, 44]. Las discrepancias observadas entre los resultados expuestos en la presente tesis y los disponibles en la literatura científica podrían deberse al tiempo que se ha considerado como inicio del daño renal en este estudio (15 días). Dado que según la literatura, los marcadores de función renal en sangre como el nitrógeno ureico (BUN, Blood Urea Nitrogen) y la creatinina solo se elevan significativamente después de un importante daño de la masa epitelial del riñón [154]. Estos estudios desarrollaron el modelo murino a lo largo de 63 y 112 días [43, 44] y cuantificaron los marcadores bioquímicos en sangre los días 42 y 84, respectivamente, tras la administración de STZ. Es importante destacar que en el trabajo desarrollado por Li y colaboradores [49] estos observan un incremento de los niveles de BUN después del día 14 de administración de STZ. La urea y el BUN son valores equivalentes para el estudio de la funcionalidad renal aunque no se presentan en la misma proporción en sangre [155].

En la literatura publicada existe un gran número de estudios en los que se ha realizado la administración sistémica de MSCs derivadas de individuos sanos, cultivadas en condiciones estándar de normoxia como tratamiento para la ND, y se ha demostrado que este tratamiento incrementa la funcionalidad renal, identificada por la reducción de los niveles de parámetros bioquímicos en sangre y orina como la urea, creatinina y albúmina, respectivamente. Estos

estudios han señalado también que la administración de MSCs es capaz de reparar y reducir las alteraciones morfológicas del riñón propias de los modelos de ND [10, 43, 44, 49, 53]. Adicionalmente, se ha observado que el tratamiento celular produce la recuperación de la actividad pancreática reflejada en la reducción de los niveles de glucosa en sangre [10, 43]. Respecto a este último parámetro, en el presente trabajo se ha observado que todos los grupos de ratas han mantenido un incremento en los niveles de glucosa en sangre a lo largo de todo el estudio, observándose un mayor incremento en el grupo de ratas con ND inducida tratados con placebo respecto a las tratadas con ASCs. No obstante, esta diferencia no ha resultado estadísticamente significativa. Respecto al peso, los resultados muestran que las ratas con ND inducida presentan una reducción estadísticamente significativa del peso corporal en relación al grupo de ratas sanas, y además que las ratas con ND inducida tratadas con placebo parecen presentar un peso más reducido a lo largo de todo el estudio que las ratas con ND inducida tratadas con células, sin embargo, esta diferencia no ha resultado significativa en ninguno de los tiempos analizados.

Según la literatura publicada, la aplicación de MSCs en sujetos diabéticos es capaz de regular la concentración de glucosa en sangre a través de la regeneración de las células β del páncreas y de la reducción de la resistencia a la insulina. Un estudio publicado por Si y colaboradores, desarrollado en un modelo de ratas diabéticas tipo 2 inducidas por STZ y dieta alta en grasa, demostró que estos dos mecanismos inciden directamente en la reducción de los niveles de glucosa en sangre en etapas tempranas posteriores a la inducción de diabetes, sin embargo en etapas tardías (21 días después de la inducción) el único mecanismo presente en la regulación de la glucosa era el de la reducción de resistencia a la insulina mediante la restauración de la expresión de la proteína transportadora de glucosa tipo 4 (GLUT4, Glucose Transporter Type 4) en músculo esquelético y TA [156]. También se ha publicado que animales diabéticos inducidos por STZ presentan una reducción significativa en la ganancia del peso corporal pudiendo incluso presentar pérdida de mismo [151, 157, 158] y justifican esta reducción por la pérdida de masa muscular y de proteínas tisulares [157, 158]. Por tanto, la ausencia de ganancia de peso corporal por parte de las ratas inducidas con STZ en este estudio podría estar reflejando emaciación y pérdida del tejido muscular, reduciendo así la capacidad de respuesta del tejido muscular al efecto paracrino de las ASCs que favorecería el control de la resistencia a la insulina y como consecuencia la reducción de los niveles de glucosa en sangre.

Puesto que las nefronas son de origen mesenquimal [159], inicialmente, se pensaba que el principal efecto protector y reparador de las MSCs sobre el riñón era su capacidad de

diferenciación a células tubulares, reemplazando así a las células que presentaban algún daño. Sin embargo, actualmentese está considerando su actividad paracrina y de secreción de microvesículas como los principales mecanismos responsables de su efecto renoprotector [160]. En ese contexto, cada vez más son los estudios que están utilizando algún derivado del cultivo de MSCs, como el medio condicionado (MC) o exosomas purificados, para el tratamiento de la ND [53, 161, 162]. En esta línea Jiang y colaboradores han demostrado que la administración de exosomas derivados de células similares a MSCs, aisladas de orina, reduce la expansión mesangial glomerular y los niveles de albúmina urinaria de ratas con ND inducida [161]. Estas observaciones son similares a las derivadas de otro estudio desarrollado en ratones por Nagaishi y colaboradores, donde además han observado una reducción del infiltrado inflamatorio en el tejido renal y han comparado el efecto terapéutico de BMMSCs y de su MC, encontrando resultados similares entre ambos tratamientos [53].

En relación con la medición de los marcadores bioquímicos de funcionalidad renal es de destacar que nuestros resultados muestran un leve decremento neto, aunque no significativo, de los valores de glucosa y creatinina en sangre el día 45 respecto al día 30 para las ratas que recibieron como tratamiento células sanas preconditionadas en hipoxia. Por otro lado, en seres humanos un signo casi patognomónico para el diagnóstico de la ND es la excreción anormal de albúmina con la orina [151]. Según los resultados de la presente tesis, las ratas inducidas con STZ presentaron una excreción significativa de albúmina en orina que fue sostenida durante todo el estudio y no fue modificada significativamente por ninguno de los tratamientos celulares administrados. Aunque, se observa también un decremento neto no significativo en la ratio albúmina/creatinina en los animales que recibieron células diabéticas preconditionadas en hipoxia. Estos datos contrastan con los hallados en la bibliografía revisada, donde se ha demostrado que la mera infusión de MSCs sanas cultivadas en normoxia genera una reducción de los marcadores de daño renal en sangre y orina [43, 44, 49, 53] en modelos de ND. En este trabajo solo se ha observado una reducción de estos parámetros en el cálculo del decremento neto, respecto a otros estudios publicados [49, 53], sin embargo, con nuestros resultados se puede justificar el efecto beneficioso que la hipoxia induce sobre las células preconditionadas cuando son administradas como tratamiento de la ND.

El desarrollo y evolución de la ND está fuertemente ligada con alteraciones morfológicas macro y microscópicas en el riñón [151, 163, 164], que incluso pueden anteceder a la aparición de manifestaciones clínicas propias de la ND [46, 165]. Se han descrito varios mecanismos fisiopatológicos implicados en el daño del tejido renal que generalmente son desencadenados por

la hiperglicemia. Concretamente, en la diabetes tipo 2, la hiperlipidemia y la resistencia a la insulina juegan un rol patogénico adicional. Entre estos mecanismos encontramos al incremento del estrés oxidativo, una elevada respuesta inflamatoria y una secreción aberrante de factores de crecimiento. La acumulación de matriz extracelular en el mesangio (expansión mesangial) es posiblemente el hallazgo histológico más frecuente en la ND [164].

En este trabajo se ha observado que las ratas con ND inducida tratadas con ASCs presentan un menor grado de daño en lesiones renales como la expansión mesangial, la presencia de microaneurismas, de necrosis tubular aguda y depósitos tubulares, cambio a células claras, engrosamiento de la membrana basal tubular y glomerulomegalia. Estos resultados están de acuerdo con derivados de estudios publicados en los que se ha demostrado que la infusión de MSCs provoca la restauración glomerular y del epitelio tubular [10, 43, 49, 53]. No obstante, es importante mencionar que en estos estudios se ha evaluado el efecto de la inyección de células derivadas de individuos sanos y expandidas en condiciones estándar de normoxia.

Como dato interesante, tras realizar una amplia búsqueda bibliográfica [152, 153, 163, 164, 166-168], solo se ha encontrado un estudio que describió la presencia de células tubulares de aspecto claro en ratas diabéticas [169]. Además, dos trabajos publicados asociaron la aparición de células claras en glándulas ecrinas con la diabetes, identificadas mediante la tinción PAS [92, 170]. Uno de estos estudios, realizado por Signoretti y colaboradores, concluye que la apariencia clara de estas células es debida a la acumulación de glucógeno o lípidos en su citoplasma [92]. Actualmente se sabe que los riñones son importantes reguladores de la homeostasis de la glucosa en sangre, puesto que, además de su capacidad de reabsorción de la glucosa filtrada hacia el torrente sanguíneo, son capaces de sintetizar este monosacárido vía gluconeogénesis. De hecho, se estima que los riñones son responsables de aproximadamente el 40% del total de la gluconeogénesis en el organismo. Lamentablemente, existe una gran acumulación de glucógeno en los riñones de individuos diabéticos que puede incluso provocar la muerte del paciente [171]. Sobre la base de estos datos se puede sugerir que esta lesión es al menos en parte causada por la acumulación de glucógeno en las células del parénquima renal y que puede representar otro signo de ND en modelos inducidos por STZ.

Otra lesión vinculada a la acumulación de glucógeno renal en la ND es la presencia de depósitos tubulares [166, 171], también conocidos en seres humanos como lesiones de Armani-Ebstein causados principalmente por hiperglicemias severas [166].

Lesiones renales también observadas en nuestro trabajo como la presencia de quistes tubulares, de fibrosis intersticial e infiltrado inflamatorio han mostrado un menor grado de daño en las ratas con ND inducida que recibieron alguno de los cuatro tratamientos celulares. Sin embargo, este descenso no es estadísticamente significativo respecto al grupo tratado con placebo pues solo hemos observado una reducción significativa en todas las lesiones analizadas del grupo de ratas con ND inducida tratadas con ASC-CH.

El hecho de que el preconditionamiento en hipoxia genere un efecto positivo en la funcionalidad de las MSCs [94, 99] está produciendo un interés cada vez mayor para su aplicación en estudios preclínicos. Se ha reportado que la aplicación de ASCs preconditionadas en hipoxia es altamente efectiva en el tratamiento de patologías isquémicas y alteraciones cartilagosas [59]. Recientemente, Kojima y colaboradores, en un modelo murino de cirrosis hepática, han demostrado que la aplicación de MSCs obtenidas de la médula ósea cultivadas a 5% O₂ produce un mejor resultado terapéutico que aquellas cultivadas en normoxia [172].

Otros estudios han evaluado los efectos en el tratamiento de daño renal agudo de las ASCs preconditionadas en hipoxia bajo concentraciones de oxígeno entre 0.5% y 1%. Estos ensayos preclínicos concluyen que el preconditionamiento en hipoxia mejora sustancialmente la capacidad terapéutica de las ASCs en relación a sus controles cultivados en normoxia, mediante el incremento de la expresión de VEGF [173, 174] y de sus propiedades antioxidantes, antiapoptóticas y angiogénicas [174]. Un trabajo reciente de Ishiuchi y colaboradores desarrollado en un modelo con características de enfermedad renal crónica demuestra que MSCs derivadas de médula ósea cultivadas a una concentración de O₂ del 1% induce una mayor reducción de la inflamación y fibrosis renal, en comparación con MSCs cultivadas en normoxia [175].

Estos trabajos van en línea con los resultados expuestos en este trabajo donde se ha demostrado una cierta superioridad terapéutica de las ASCs-C preconditionadas en hipoxia, respecto al resto de tratamientos celulares administrados, en la reducción de las lesiones de cambio a células claras, EMBT, glomerulomegalia e infiltrado inflamatorio y en la recuperación de los niveles en sangre de los parámetros bioquímicos analizados, aunque en estos últimos las diferencias no han sido estadísticamente significativas.

Es de destacar que las ASCs-D preconditionadas en hipoxia mostraron una ventaja terapéutica significativa respecto a sus pares cultivadas en normoxia en la reducción de los quistes tubulares. No obstante, esta población celular fue menos eficaz que las células sanas

preacondicionadas en hipoxia para reducir la glomerulomegalia, la fibrosis intersticial y el infiltrado inflamatorio.

En nuestro estudio hemos observado que las ASCs-DN reducen más eficazmente la lesión renal de los depósitos tubulares que las ASCs-DH. Este resultado puede justificarse, en parte, afirmando que la interacción hipoxia/hiperglicemia incrementa el metabolismo celular de la glucosa por la vía del sorbitol [150] favoreciendo la acumulación intracelular del sorbitol y la fructosa [176].

Aunque se han propuesto a las alteraciones en las células mesangiales y podocitos como principales mediadores en la patogenia de la ND, se ha observado que los daños en la microvasculatura dependientes de la diabetes también tienen un rol importante en su progresión [177]. Se ha reportado que uno de los mecanismos nefroprotectores de las ASCs consiste en la preservación de la densidad vascular renal [160, 178]. Nuestros resultados *in vitro* a nivel celular y molecular han demostrado que el preacondicionamiento en hipoxia mejora significativamente las cualidades angiogénicas de las ASCs sanas y diabéticas. En ese contexto, los resultados de la presente tesis sugieren que la ventaja terapéutica propuesta por su modelo, y observada en las células tras su preacondicionamiento en hipoxia, se debe en parte al incremento de su capacidad angiogénica.

Por otro lado, con el análisis de los microarrays hemos demostrado que las ASCs-D preacondicionadas en hipoxia presentan un enriquecimiento de términos vinculados con la glicosilación, incluido el gen que expresa la proteína glicosilada IL-1R2 regulador negativo de la vía de la IL-1 [125] que mejora las cualidades antiinflamatorias de las MSCs [126, 127]. Estos datos concuerdan con los derivados del nuestro análisis semicuantitativo histopatológico en el que hemos observado que el tejido renal derivado de ratas con ND inducida y tratadas con ASCs diabéticas preacondicionadas en hipoxia presentan un menor grado de reducción del infiltrado inflamatorio y la fibrosis intersticial respecto al tejido renal derivado de ratas ND tratadas con ASCs de donantes sanos preacondicionadas en hipoxia.

Están ampliamente descritas, y ya hemos discutido, las importantes alteraciones provocadas por la diabetes en la funcionalidad de las MSCs [10, 54-57]. Sin embargo, aún es muy reducido el número de estudios publicados que han analizado la restauración de las alteraciones funcionales presentadas por MSCs causadas por la diabetes [56, 100, 101, 179]. En un estudio *in vitro* realizado por Khan y colaboradores en el que han evaluado el efecto del preacondicionamiento celular con factores de crecimiento demostraron que las BMMSCs

derivadas de ratones diabéticos cultivadas con un suplemento de FGF-2 e IGF-1 presentaban un incremento en su tasa de proliferación celular y de su expresión de proteínas de supervivencia respecto a las cultivadas sin esos factores. Sin embargo, este incremento no llegó a ser comparable con el mostrado por células derivadas de ratones sanos [101]. En otro estudio publicado se ha analizado el efecto de la oxitocina sobre las BMMSCs diabéticas en un modelo de murino de infarto agudo de miocardio y se ha revelado que las células sometidas a esta estrategia de precondicionamiento reducen la fibrosis ventricular en un nivel casi equiparable al de las células sanas [179]. Finalmente, Nagaishi y colaboradores han observado que el cultivo de BMMSCs suplementado con factores de crecimiento, matrices extracelulares y exosomas derivados del cordón umbilical poseen la capacidad de reducir ciertas alteraciones morfológicas propias de la ND de forma similar a las células sanas [56].

Sobre la base de los resultados de este estudio y de la literatura discutida podemos concluir que a pesar de la mejora observada en las ASCs diabéticas precondicionadas en hipoxia, este método de precondicionamiento parece ser insuficiente para restaurar su funcionalidad y efecto terapéutico en el modelo de ND desarrollado en la presente tesis.

No son muchos los estudios que han evaluado el efecto terapéutico de las MSCs diabéticas *in vivo*, como el estudio clínico desarrollado en pacientes diabéticos por Gu y colaboradores, quienes analizaron la efectividad del trasplante autólogo de MSCs en paciente con retinopatía diabética (RD) y han demostrado que la administración de este tipo celular es segura y eficaz para el tratamiento de la RD. Sin embargo, una limitación de este estudio, respecto al presente trabajo, es que Gu y colaboradores no analizaron el efecto de las células derivadas de donantes sanos [180].

Como comentario general en relación al estudio *in vivo* desarrollado, destacar el diferente grado de mejoría observado en las distintas lesiones analizadas dentro de un mismo grupo experimental de tratamiento. En la literatura científica, se ha reportado la existencia de diferentes subpoblaciones de MSCs dentro de una colonia derivada de una única célula, considerándose a esta heterogeneidad celular como un proceso inevitable, incluso después de la purificación de una sola subpoblación. Además, a pesar de que estas diferentes subpoblaciones de MSCs comparten un mismo inmunofenotipo, sí muestran importantes diferencias funcionales a nivel de la secreción paracrina y de expresión génica; cambios que pueden tener una directa implicación en sus efectos terapéuticos. Aún no se conoce con certeza la causa principal que da origen esta heterogeneidad en los cultivos de MSCs, no obstante, se sugiere que están implicados varios factores como la densidad de cultivo, el inicio de un proceso de diferenciación espontánea y la

división desigual de las proteínas durante la mitosis [181]. Basados en estas observaciones se podría sugerir que las condiciones de cultivo generadas en este trabajo sumado a las posibles pequeñas variaciones en la densidad de cultivo en uno u otro momento en el proceso de expansión celular podrían haber estimulado o inhibido la prosperidad de alguna o algunas subpoblaciones de ASCs por encima de otras. Subpoblaciones que podrían haber tenido alguna variación en su efecto terapéutico sobre las lesiones morfológicas renales, lo que se vería reflejado en las variaciones del efecto de las diferentes ASCs de este estudio sobre las lesiones morfológicas.

En el presente estudio es importante destacar la ausencia de mejora de los parámetros bioquímicos analizados, en particular el de la excreción de albúmina en orina posterior al tratamiento con ASCs pese a una reducción ostensible de las lesiones renales a nivel anatomopatológico. Según un estudio realizado por Comai y colaboradores [165], las alteraciones morfológicas en la ND preceden a las manifestaciones clínicas que la caracterizan, tal el caso de la excreción de albúmina en orina, motivo que provoca su diagnóstico tardío. En ese contexto se sugiere que al igual que hay una asimetría en el desarrollo de las manifestaciones clínicas y anatomopatológicas en el desarrollo de la ND, podría también existir un proceso similar en la regeneración renal, es decir que el tratamiento con ASCs en primera instancia produjera mejoras en la morfología renal que posteriormente se reflejarían en la estabilización de los valores bioquímicos de funcionalidad renal.

Finalmente, el intenso daño renal causado por la diabetes en nuestro modelo también se ha observado en el análisis ultraestructural realizado en el tejido renal en el cual hemos identificado lesiones que definen a la ND como la expansión mesangial, microaneurismas, NTA e infiltrado inflamatorio. Según la literatura revisada, la expansión mesangial constituye una de las características más destacables para la identificación de la ND por microscopía electrónica [163, 164, 182], además de ser una lesión característica de la glomeruloesclerosis diabética [182]. Por otro lado, las prolongaciones que emergen de los podocitos (pedicelos) en el riñón normal al entrecruzarse con pedicelos de células adyacentes forman una barrera física que evita la excreción proteica [183, 184]. Como consecuencia de la diabetes, los pedicelos suelen retraerse, ensancharse y acortarse, lo que da como resultado la pérdida de esta barrera física y la excreción de proteínas por la orina [184]. Además, el estudio de microscopía electrónica llevado a cabo en este trabajo ha mostrado una evidente pérdida pedicelar en las muestras de tejido de renal derivadas de ratas con ND que recibieron placebo como tratamiento. Estos resultados además de poner de manifiesto el intenso daño renal presente en las ratas que no recibieron

tratamiento celular, podría explicar, al menos en parte, la presencia de albúmina en la orina de las ratas incluidas en nuestro modelo experimental de ND.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Observando los resultados obtenidos en nuestro estudio, se puede concluir que:

1. Las ASCs derivadas de ratas sanas y diabéticas preconditionadas en hipoxia son similares a las cultivadas en normoxia en cuanto a fenotipo celular, potencial de diferenciación, duplicación de la población celular y capacidad de migración a VEGF, SDF-1 y EPO.

2. La secreción de los factores tróficos estudiados por parte de las ASCs se ve afectada por la diabetes, y el preconditionamiento en hipoxia no produce cambios significativos importantes en la capacidad secretora de ASC diabéticas ni en las procedentes de ratas sanas.

3. La capacidad angiogénica *in vitro* de las ASCs procedentes de ratas diabéticas es inferior a la de las ASCs procedentes de rata sanas. El preconditionamiento en hipoxia aumenta la capacidad angiogénica de ambas, pero sin llegar a normalizarla en el caso de ratas diabéticas en relación con las ASCs de ratas sanas. Estos efectos son causados, en parte, por la estimulación o inhibición, mediados por la hipoxia y la diabetes, de vías moleculares proangiogénicas como las relacionadas con la membrana celular. Este efecto también podría deberse a la implicación de genes como el NR4A1 y a la actividad e interacción de proteínas tales como Abcc9-Kcnj8, Ntrk1-Adora2a y Kdr-Vegfa.

4. El número de genes expresados diferencialmente por ASCs diabéticas y no-diabéticas se ve incrementado mediante el preconditionamiento en hipoxia que simula las condiciones fisiológicas, y por tanto es orientativo de las profundas diferencias en la expresión génica en ASCs inducidas por la diabetes.

5. La inyección intravenosa de ASCs derivadas de ratas sanas preconditionadas en hipoxia mejora de un modo significativo todas las lesiones histopatológicas de daño renal producido por la nefropatía diabética en comparación con las ratas tratadas con placebo.

6. En el modelo de nefropatía diabética estudiado estos cambios morfológicos no se traducen en mejora significativa de la función renal, aunque el grupo de ratas tratado con ASCs derivadas de ratas sanas y preconditionadas en hipoxia parece presentar un menor incremento en los niveles de urea y una mayor reducción de los niveles de creatinina en sangre al final del estudio, respecto al resto de grupos de ratas tratados con ASCs.

7. Considerados de forma global, nuestros resultados permiten concluir que la hipoxia es un método valioso para revelar las profundas alteraciones provocadas por la diabetes en las ASCs, y que la administración de ASCs obtenidas de ratas sanas preacondicionadas en hipoxia muestran una clara ventaja terapéutica en la nefropatía diabética, lo que hace cuestionable el uso autólogo de este tipo celular en terapias celulares dirigidas a esta patología.

Conclusions

CONCLUSIONS

Observing the results obtained in our study, it can be concluded that:

1. The hypoxia-preconditioned ASCs isolated from healthy and diabetic rats are similar to those cultured in standard conditions on the subject of cellular phenotype, differentiation potential, population doubling and migration capacity towards VEGF, SDF-1 and EPO.

2. The secretion of the studied growth factors by ASCs is affected diabetes, and hypoxia preconditioning does not produce significant changes in the secretory capacity of diabetic ASCs or those isolated from healthy rats.

3. The *in vitro* angiogenic capacity of diabetic ASCs is lower than that of ASCs isolated from healthy rats. The hypoxia preconditioning enhances the angiogenic capacity of both healthy and diabetic ASCs, however without normalizing it in the case of diabetic ASCs in relation to ASCs isolated from healthy rats. These effects are caused, in part, by the stimulation or inhibition provoked by hypoxia and diabetes of proangiogenic molecular pathways such as those linked to cell membrane. This effect could also be mediated by genes for instance NR4A1, as well as, the activity and interaction of proteins such as Abcc9-Kcnj8, Ntrk1-Adora2a y Kdr-Vegfa.

4. The number of differentially expressed genes by diabetic and non-diabetic ASCs is increased by hypoxia preconditioning which mimics physiological conditions, and is therefore an indicative of profound diabetes-induced differences in gene expression profile of ASCs.

5. Intravenous administration of hypoxia-preconditioned ASCs derived from healthy rats reduces significantly all renal histopathological lesions produced by diabetes nephropathy in relation to rats treated with placebo.

6. In the diabetic nephropathy model studied, the morphological changes do not translate into a significant improvement of renal function, although the group of rats treated with hypoxia-preconditioned ASCs derived from healthy rats appears to present a lower increase of blood urea levels and a higher reduction of blood creatinine levels at the end of the study, compared to the rest of groups of rats treated with ASCs.

7. Taken as a whole, our results allow us to conclude that hypoxia is a valuable method for revealing the profound alterations caused by diabetes in ASCs, and that the administration of hypoxia preconditioned ASCs obtained from healthy rats shows a clear therapeutic advantage in diabetic nephropathy which makes the autologous use of this cell type in cell therapies aimed at diabetic nephropathy questionable.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Ruiz, G., G.R. Moreno, and G. España, *Medicina regenerativa y terapia celular: informe de vigilancia tecnológica*. 2008: Genoma España.
2. Mironov, V., R.P. Visconti, and R.R. Markwald, *What is regenerative medicine? Emergence of applied stem cell and developmental biology*. Expert Opinion on Biological Therapy, 2004. **4**(6): p. 773-781.
3. Chagastelles, P.C. and N.B. Nardi, *Biology of stem cells: an overview*. Kidney Int Suppl (2011), 2011. **1**(3): p. 63-67.
4. Verfaillie, C.M., M.F. Pera, and P.M. Lansdorp, *Stem cells: hype and reality*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2002: p. 369-91.
5. Prósper, F. and C.M. Verfaillie, *Células madre adultas*. Anales del Sistema Sanitario de Navarra, 2003. **26**: p. 345-356.
6. El Barky, A., E. Ali, and T. Mohamed, *Stem Cells, Classifications and their Clinical Applications*. 2017. **1**: p. 001-007.
7. Andrzejewska, A., B. Lukomska, and M. Janowski, *Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost*. Stem Cells, 2019. **37**(7): p. 855-864.
8. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet, 1970. **3**(4): p. 393-403.
9. Wahyu Widowati, D.D.R., Khie Khiong, M. Aris and S.B.S.a.I.B. Widodo, *Hypoxia in Mesenchymal Stem Cell, Hypoxia and Human Diseases*, ed. J.Z.a.C. Zhou. February 1st 2017: IntechOpen.
10. Paulini, J., et al., *Mesenchymal Stem Cells as Therapeutic Candidates for Halting the Progression of Diabetic Nephropathy*. Stem cells international, 2016. **2016**: p. 9521629-9521629.
11. Kornicka, K., J. Houston, and K. Marycz, *Dysfunction of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetic Patients as Result of Oxidative Stress and Autophagy may Limit Their Potential Therapeutic Use*. Stem cell reviews and reports, 2018. **14**(3): p. 337-345.
12. Strioga, M., et al., *Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells*. Stem Cells and Development, 2012. **21**(14): p. 2724-2752.
13. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
14. Caplan, A.I., *Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!* Stem Cells Transl Med, 2017. **6**(6): p. 1445-1451.
15. Fitzsimmons, R.E.B., et al., *Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. Stem Cells Int, 2018. **2018**: p. 8031718.

16. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.* Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-317.
17. Hass, R., et al., *Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC.* Cell Commun Signal, 2011. **9**: p. 12.
18. Mohamed-Ahmed, S., et al., *Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison.* Stem Cell Res Ther, 2018. **9**(1): p. 168.
19. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.* Tissue Eng, 2001. **7**(2): p. 211-28.
20. Han, Y., et al., *Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine.* Cells, 2019. **8**(8).
21. Kim, E.-H. and C.Y. Heo, *Current applications of adipose-derived stem cells and their future perspectives.* World journal of stem cells, 2014. **6**(1): p. 65-68.
22. Sakaguchi, Y., et al., *Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source.* Arthritis & Rheumatism, 2005. **52**(8): p. 2521-2529.
23. Bochev, I., et al., *Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro.* Cell Biol Int, 2008. **32**(4): p. 384-93.
24. Pachon-Pena, G., et al., *Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles.* J Cell Physiol, 2011. **226**(3): p. 843-51.
25. Kern, S., et al., *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.* Stem Cells, 2006. **24**(5): p. 1294-301.
26. De Ugarte, D.A., et al., *Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow.* Cells Tissues Organs, 2003. **174**(3): p. 101-9.
27. Spees, J.L., R.H. Lee, and C.A. Gregory, *Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function.* Stem Cell Res Ther, 2016. **7**(1): p. 125.
28. Wang, Y., et al., *Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications.* Nat Immunol, 2014. **15**(11): p. 1009-16.
29. Dexter, T.M., et al., *Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures.* Biomedicine, 1977. **27**(9-10): p. 344-9.
30. Caplan, A.I. and J.E. Dennis, *Mesenchymal stem cells as trophic mediators.* Journal of Cellular Biochemistry, 2006. **98**(5): p. 1076-1084.
31. Ferreira, J.R., et al., *Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-conditioning.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 2837.
32. Kot, M., et al., *The Importance of HLA Assessment in "Off-the-Shelf" Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Based-Therapies.* Int J Mol Sci, 2019. **20**(22).
33. Eleuteri, S. and A. Fierabracci, *Insights into the Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Applications.* International journal of molecular sciences, 2019. **20**(18): p. 4597.

34. Volpe, E., et al., *Fas–Fas Ligand: Checkpoint of T Cell Functions in Multiple Sclerosis*. *Frontiers in Immunology*, 2016. **7**(382).
35. Saeedi, P., R. Halabian, and A.A. Imani Fooladi, *A revealing review of mesenchymal stem cells therapy, clinical perspectives and Modification strategies*. *Stem Cell Investig*, 2019. **6**: p. 34.
36. Press, C.U. *Cambridge Dictionary, Diccionario Inglés-Español*. 2020 [cited 2020 21/12/2020]; Available from: <https://dictionary.cambridge.org/es/diccionario/ingles-espanol/>.
37. Maacha, S., et al., *Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stromal Cells in Angiogenesis*. *Stem Cells Int*, 2020. **2020**: p. 4356359.
38. Gerdes, H.H., A. Rustom, and X. Wang, *Tunneling nanotubes, an emerging intercellular communication route in development*. *Mech Dev*, 2013. **130**(6-8): p. 381-7.
39. Spees, J.L., et al., *Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(5): p. 1283-1288.
40. Tan, S.Y., et al., *Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention*. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 2019. **13**(1): p. 364-372.
41. Li, H., et al., *Paracrine effect of mesenchymal stem cell as a novel therapeutic strategy for diabetic nephropathy*. *Life Sciences*, 2018. **215**: p. 113-118.
42. Sharaf El Din, U.A.A., M.M. Salem, and D.O. Abdulazim, *Diabetic nephropathy: Time to withhold development and progression - A review*. *J Adv Res*, 2017. **8**(4): p. 363-373.
43. Abdel Aziz, M.T., et al., *The role of bone marrow derived-mesenchymal stem cells in attenuation of kidney function in rats with diabetic nephropathy*. *Diabetol Metab Syndr*, 2014. **6**(1): p. 34.
44. Hamza, A.H., et al., *Mesenchymal stem cells: a future experimental exploration for recession of diabetic nephropathy*. *Ren Fail*, 2017. **39**(1): p. 67-76.
45. Ayodele, O.E., C.O. Alebiosu, and B.L. Salako, *Diabetic nephropathy--a review of the natural history, burden, risk factors and treatment*. *J Natl Med Assoc*, 2004. **96**(11): p. 1445-54.
46. Lim, A., *Diabetic nephropathy - complications and treatment*. *Int J Nephrol Renovasc Dis*, 2014. **7**: p. 361-81.
47. Navarro-Gonzalez, J.F., et al., *Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy*. *Nat Rev Nephrol*, 2011. **7**(6): p. 327-40.
48. Daroux, M., N. Gross, and E.i. Boulanger. *Diabetic Nephropathy AGE , RAGE and Diabetic Nephropathy*. 2012.
49. Li, Y., et al., *Early intervention with mesenchymal stem cells prevents nephropathy in diabetic rats by ameliorating the inflammatory microenvironment*. *Int J Mol Med*, 2018. **41**(5): p. 2629-2639.
50. Liyanage, T., et al., *Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review*. *Lancet*, 2015. **385**(9981): p. 1975-82.
51. An, X., et al., *Intervention for early diabetic nephropathy by mesenchymal stem cells in a preclinical nonhuman primate model*. *Stem Cell Res Ther*, 2019. **10**(1): p. 363.

52. Bai, Y., et al., *Mesenchymal Stem Cells Reverse Diabetic Nephropathy Disease via Lipoxin A4 by Targeting Transforming Growth Factor β (TGF- β)/smad Pathway and Pro-Inflammatory Cytokines*. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research, 2019. **25**: p. 3069-3076.
53. Nagaishi, K., et al., *Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic nephropathy via the paracrine effect of renal trophic factors including exosomes*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 34842.
54. Saki, N., et al., *Adverse effect of high glucose concentration on stem cell therapy*. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res, 2013. **7**(3): p. 34-40.
55. Liu, Y. and S.C. Tang, *Recent Progress in Stem Cell Therapy for Diabetic Nephropathy*. Kidney Dis (Basel), 2016. **2**(1): p. 20-7.
56. Nagaishi, K., et al., *Umbilical cord extracts improve diabetic abnormalities in bone marrow-derived mesenchymal stem cells and increase their therapeutic effects on diabetic nephropathy*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 8484-8484.
57. Fijany, A., et al., *Mesenchymal stem cell dysfunction in diabetes*. Mol Biol Rep, 2019. **46**(1): p. 1459-1475.
58. *Hypoxia Responses: How Different Cells and Tumors React to Oxygen Shortage*. PLoS Medicine, 2006. **3**(3): p. e105.
59. Choi, J.R., K.W. Yong, and W.K.Z. Wan Safwani, *Effect of hypoxia on human adipose-derived mesenchymal stem cells and its potential clinical applications*. Cell Mol Life Sci, 2017. **74**(14): p. 2587-2600.
60. Alijani, N., et al., *A review on transcriptional regulation responses to hypoxia in mesenchymal stem cells*. Cell Biol Int, 2019.
61. Abdalfattah, A., *Effect of Renin Angiotensin System Blockade on Renal Dysfunction in Experimentally Induced Diabetic Nephropathy*. Vol. 84. 2016. 139-147.
62. Al-Qattan, K., M. Thomson, and M. Ali, *Garlic (*Allium sativum*) and ginger (*Zingiber officinale*) attenuate structural nephropathy progression in streptozotocin-induced diabetic rats*. e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism, 2008. **3**(2): p. e62-e71.
63. Eleazu, C.O., et al., *Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans*. Journal of diabetes and metabolic disorders, 2013. **12**(1): p. 60-60.
64. Hikmah, N., A.D.P. Shita, and H. Maulana, *Diabetic Blood Glucose Level Profile with Stratified Dose Streptozotocin (SD-STZ) and Multi Low Dose Streptozotocin (MLD-STZ) Induction Methods*. 2015, 2015. **5**(1): p. 5.
65. Gala, K., et al., *Characterization of bone-marrow-derived rat mesenchymal stem cells depending on donor age*. Cell Biol Int, 2011. **35**(10): p. 1055-62.
66. Subio. 2008 Accessed December 2016; Available from: <https://www.subioplatform.com/>.
67. Huang, D.W., et al., *DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(Web Server issue): p. W169-75.

68. *The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)*. 2003-2020 Accessed January 2019; Available from: <https://david.ncifcrf.gov/>.
69. Hosack, D.A., et al., *Identifying biological themes within lists of genes with EASE*. *Genome biology*, 2003. **4**(10): p. R70-R70.
70. Kanehisa, M., et al., *KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs*. *Nucleic Acids Res*, 2017. **45**(D1): p. D353-D361.
71. *KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. 1995-2020 Accessed January 2019; Available from: <https://www.genome.jp/kegg/>.
72. Ashburner, M., et al., *Gene ontology: tool for the unification of biology*. *The Gene Ontology Consortium*. *Nat Genet*, 2000. **25**(1): p. 25-9.
73. *The Gene Ontology (GO)*. 1999-2020 Accessed January 2019; Available from: <http://geneontology.org/>.
74. UniProt Consortium, T., *UniProt: the universal protein knowledgebase*. *Nucleic Acids Res*, 2018. **46**(5): p. 2699.
75. *The UniProt Consortium*. 2019 Accessed January 2019; Available from: <https://www.uniprot.org/>.
76. Finn, R.D., et al., *InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations*. *Nucleic Acids Res*, 2017. **45**(D1): p. D190-D199.
77. *InterPro*. 2017 Accessed January 2019; Available from: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/about/interpro/>.
78. Letunic, I., et al., *SMART 4.0: towards genomic data integration*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(Database issue): p. D142-4.
79. *SMART (Simple Modular Architecture Research Tool)*. 2020 Accessed January 2019; Available from: http://smart.embl.de/help/smart_about.shtml.
80. Yu, G., et al., *clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters*. *Omics : a journal of integrative biology*, 2012. **16**(5): p. 284-287.
81. Szklarczyk, D., et al., *The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible*. *Nucleic acids research*, 2017. **45**(D1): p. D362-D368.
82. *STRING CONSORTIUM*. 2020 Accessed January 2019; Available from: <https://string-db.org/>.
83. Taylor, A.J. and P. Vadgama, *Analytical Reviews in Clinical Biochemistry: The Estimation of Urea*. *Annals of Clinical Biochemistry*, 1992. **29**(3): p. 245-264.
84. Jaffe, M., *Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins*. 1886. **10**(5): p. 391-400.
85. Delanghe, J.R. and M.M. Speeckaert, *Creatinine determination according to Jaffe—what does it stand for?* *NDT Plus*, 2011. **4**(2): p. 83-86.
86. Jennette, J.C. and R.H. Heptinstall, *Heptinstall's Pathology of the Kidney*. *Heptinstall's Pathology of the Kidney*. 2007: Lippincott Williams & Wilkins.
87. Morita, T. and J. Churg, *Mesangiolytic*. *Kidney Int*, 1983. **24**(1): p. 1-9.
88. Hughson, M.D., et al., *Towards a definition of glomerulomegaly: clinical-pathological and methodological considerations*. *Nephrology, dialysis, transplantation : official*

- publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 2011. **26**(7): p. 2202-2208.
89. JABLONSKI, P., et al., *AN EXPERIMENTAL MODEL FOR ASSESSMENT OF RENAL RECOVERY FROM WARM ISCHEMIA*. Transplantation, 1983. **35**(3): p. 198-204.
90. Network, A.W.G.o.t.I.I.N., et al., *The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility*. Kidney International, 2009. **76**(5): p. 546-556.
91. Fogo, A.B., et al., *AJKD Atlas of Renal Pathology: Ischemic Acute Tubular Injury*. American Journal of Kidney Diseases, 2016. **67**(5): p. e25.
92. Signoretti, S., et al., *Papular clear cell hyperplasia of the eccrine duct in a diabetic*. Br J Dermatol, 1996. **135**(1): p. 139-43.
93. Sugimoto, H., et al., *Renal fibrosis and glomerulosclerosis in a new mouse model of diabetic nephropathy and its regression by bone morphogenic protein-7 and advanced glycation end product inhibitors*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1825-33.
94. Liu, L., et al., *Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF*. Cell Biol Int, 2013. **37**(6): p. 551-60.
95. Schive, S.W., et al., *Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Respond to Short-Term Hypoxia by Secreting Factors Beneficial for Human Islets In Vitro and Potentiate Antidiabetic Effect In Vivo*. Cell Med, 2017. **9**(3): p. 103-116.
96. Lee, J.H., Y.M. Yoon, and S.H. Lee, *Hypoxic Preconditioning Promotes the Bioactivities of Mesenchymal Stem Cells via the HIF-1 α -GRP78-Akt Axis*. International journal of molecular sciences, 2017. **18**(6): p. 1320.
97. Basciano, L., et al., *Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status*. BMC Cell Biol, 2011. **12**: p. 12.
98. Madrigal, M., K.S. Rao, and N.H. Riordan, *A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods*. J Transl Med, 2014. **12**: p. 260.
99. Wobma, H.M., et al., *The influence of hypoxia and IFN- γ on the proteome and metabolome of therapeutic mesenchymal stem cells*. Biomaterials, 2018. **167**: p. 226-234.
100. Qi, Y., et al., *Applicability of adipose-derived mesenchymal stem cells in treatment of patients with type 2 diabetes*. Stem Cell Res Ther, 2019. **10**(1): p. 274.
101. Khan, M., et al., *Growth factor preconditioning increases the function of diabetes-impaired mesenchymal stem cells*. Stem Cells Dev, 2011. **20**(1): p. 67-75.
102. Cianfarani, F., et al., *Diabetes impairs adipose tissue-derived stem cell function and efficiency in promoting wound healing*. Wound Repair and Regeneration, 2013. **21**(4): p. 545-553.
103. Hu, X., et al., *Hypoxic preconditioning enhances bone marrow mesenchymal stem cell migration via Kv2.1 channel and FAK activation*. Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **301**(2): p. C362-72.

104. Vertelov, G., et al., *High targeted migration of human mesenchymal stem cells grown in hypoxia is associated with enhanced activation of RhoA*. Stem cell research & therapy, 2013. **4**(1): p. 5-5.
105. Hung, S.-C., et al., *Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo*. PLoS One, 2007. **2**(5): p. e416-e416.
106. Raheja, L.F., et al., *Hypoxic regulation of mesenchymal stem cell migration: the role of RhoA and HIF-1 α* . Cell Biology International, 2011. **35**(10): p. 981-989.
107. Spinetti, G., et al., *MicroRNA-15a and microRNA-16 impair human circulating proangiogenic cell functions and are increased in the proangiogenic cells and serum of patients with critical limb ischemia*. Circ Res, 2013. **112**(2): p. 335-46.
108. Madhira, S.L., et al., *Promise(s) of mesenchymal stem cells as an in vitro model system to depict pre-diabetic/diabetic milieu in WNIN/GR-Ob mutant rats*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e48061-e48061.
109. Nazari A, S.A., Fard ET, Hassanshahi G, Goujani R, et al., *Is IL-6 Increased in Type 2 Diabetes Mellitus Patients Independent of Nephropathic Complication?* J Endocrinol Diabetes Obes, (2017). **5**(2):**1102**.
110. Akbari, M. and V. Hassan-Zadeh, *IL-6 signalling pathways and the development of type 2 diabetes*. Inflammopharmacology, 2018. **26**(3): p. 685-698.
111. Hameed, E., et al., *Serum Interleukin-6 level in children with type 1 diabetes mellitus*. Journal of the Faculty of Medicine, Baghdad, 2012. **Vol. 54**.
112. Lee, E.Y., et al., *Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF*. Wound Repair Regen, 2009. **17**(4): p. 540-7.
113. Ishida, T., et al., *Targeted disruption of endothelial cell-selective adhesion molecule inhibits angiogenic processes in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 34598-604.
114. Lee, Y.-C., et al., *Overexpression of centromere protein K (CENPK) in ovarian cancer is correlated with poor patient survival and associated with predictive and prognostic relevance*. PeerJ, 2015. **3**: p. e1386-e1386.
115. Naro, C., et al., *The centrosomal kinase NEK2 is a novel splicing factor kinase involved in cell survival*. Nucleic acids research, 2014. **42**(5): p. 3218-3227.
116. Matsuyama, M., et al., *Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 13): p. 2113-9.
117. Bryan, J., et al., *ABCC8 and ABCC9: ABC transporters that regulate K⁺ channels*. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, 2007. **453**(5): p. 703-718.
118. Umaru, B., et al., *ATP-sensitive potassium channel activation induces angiogenesis in vitro and in vivo*. J Pharmacol Exp Ther, 2015. **354**(1): p. 79-87.
119. Rumman, M., J. Dhawan, and M. Kassem, *Concise Review: Quiescence in Adult Stem Cells: Biological Significance and Relevance to Tissue Regeneration*. Stem Cells, 2015. **33**(10): p. 2903-12.
120. Liu, Z., et al., *Endothelial adenosine A2a receptor-mediated glycolysis is essential for pathological retinal angiogenesis*. Nature communications, 2017. **8**(1): p. 584-584.

121. Beltramo, E., et al., *Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells induce features of diabetic retinopathy in vitro*. *Acta Diabetol*, 2014. **51**(6): p. 1055-64.
122. Bermingham, M.L., et al., *N-Glycan Profile and Kidney Disease in Type 1 Diabetes*. *Diabetes Care*, 2018. **41**(1): p. 79-87.
123. Hamouda, H., et al., *N-glycosylation profile of undifferentiated and adipogenically differentiated human bone marrow mesenchymal stem cells: towards a next generation of stem cell markers*. *Stem Cells Dev*, 2013. **22**(23): p. 3100-13.
124. Wilson, K.M., et al., *Glycans modify mesenchymal stem cell differentiation to impact on the function of resulting osteoblasts*. *J Cell Sci*, 2018. **131**(4).
125. Peters, V.A., J.J. Joesting, and G.G. Freund, *IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation*. *Brain Behav Immun*, 2013. **32**: p. 1-8.
126. Redondo-Castro, E., et al., *Interleukin-1 primes human mesenchymal stem cells towards an anti-inflammatory and pro-trophic phenotype in vitro*. *Stem Cell Res Ther*, 2017. **8**(1): p. 79.
127. Fan, H., et al., *Pre-treatment with IL-1 β enhances the efficacy of MSC transplantation in DSS-induced colitis*. *Cellular & molecular immunology*, 2012. **9**(6): p. 473-481.
128. Meugnier, E., et al., *Acute hyperglycemia induces a global downregulation of gene expression in adipose tissue and skeletal muscle of healthy subjects*. *Diabetes*, 2007. **56**(4): p. 992-9.
129. Zeng, H., et al., *Orphan nuclear receptor TR3/Nur77 regulates VEGF-A-induced angiogenesis through its transcriptional activity*. *The Journal of experimental medicine*, 2006. **203**(3): p. 719-729.
130. Maijenburg, M.W., et al., *Nuclear receptors Nur77 and Nurr1 modulate mesenchymal stromal cell migration*. *Stem Cells Dev*, 2012. **21**(2): p. 228-38.
131. Zhang, T.-t., et al., *Phosphoinositide 3-kinase-regulated adapters in lymphocyte activation*. *Immunological Reviews*, 2009. **232**(1): p. 255-272.
132. Hosokawa, Y., et al., *Insulin-producing cells derived from 'induced pluripotent stem cells' of patients with fulminant type 1 diabetes: Vulnerability to cytokine insults and increased expression of apoptosis-related genes*. *Journal of diabetes investigation*, 2017. **9**(3): p. 481-493.
133. Gatta, V., et al., *Gene expression modifications in Wharton's Jelly mesenchymal stem cells promoted by prolonged in vitro culturing*. *BMC genomics*, 2013. **14**: p. 635-635.
134. Triantis, V., et al., *Glycosylation of fibroblast growth factor receptor 4 is a key regulator of fibroblast growth factor 19-mediated down-regulation of cytochrome P450 7A1*. *Hepatology*, 2010. **52**(2): p. 656-666.
135. Xu, M., et al., *FGFR4 Links Glucose Metabolism and Chemotherapy Resistance in Breast Cancer*. *Cell Physiol Biochem*, 2018. **47**(1): p. 151-160.
136. Lee, J., et al., *Hypoxia Upregulates Mitotic Cyclins Which Contribute to the Multipotency of Human Mesenchymal Stem Cells by Expanding Proliferation Lifespan*. *Molecules and cells*, 2018. **41**(3): p. 207-213.
137. Mathieu, J., et al., *Hypoxia-inducible factors have distinct and stage-specific roles during reprogramming of human cells to pluripotency*. *Cell stem cell*, 2014. **14**(5): p. 592-605.

138. Mariappan, M.M., et al., *Ribosomal biogenesis induction by high glucose requires activation of upstream binding factor in kidney glomerular epithelial cells*. American journal of physiology. Renal physiology, 2011. **300**(1): p. F219-F230.
139. Mariappan, M.M., *Signaling mechanisms in the regulation of renal matrix metabolism in diabetes*. Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 749812.
140. Yoo, Y.G., et al., *Novel function of orphan nuclear receptor Nur77 in stabilizing hypoxia-inducible factor-1alpha*. J Biol Chem, 2004. **279**(51): p. 53365-73.
141. Rodrigues, M., et al., *Progenitor cell dysfunctions underlie some diabetic complications*. The American journal of pathology, 2015. **185**(10): p. 2607-2618.
142. El-Saghir, J., et al., *ATL-derived exosomes modulate mesenchymal stem cells: potential role in leukemia progression*. Retrovirology, 2016. **13**(1): p. 73.
143. Min, J., et al., *Hypoxia-Induced Endothelial NO Synthase Gene Transcriptional Activation Is Mediated Through the Tax-Responsive Element in Endothelial Cells*. Hypertension, 2006. **47**(6): p. 1189-1196.
144. Kim, T.-H., P. Leslie, and Y. Zhang, *Ribosomal proteins as unrevealed caretakers for cellular stress and genomic instability*. Oncotarget, 2014. **5**(4): p. 860-871.
145. Turi, Z., et al., *Impaired ribosome biogenesis: mechanisms and relevance to cancer and aging*. Aging (Albany NY), 2019. **11**(8): p. 2512-2540.
146. Donati, G. and G. Thomas, *Apoptosis in pluripotent stem cells: RPL11 strikes again*. Cell Cycle, 2012. **11**(5): p. 840.
147. Abhinand, C.S., et al., *VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis*. J Cell Commun Signal, 2016. **10**(4): p. 347-354.
148. Sada, K., et al., *Hyperglycemia Induces Cellular Hypoxia through Production of Mitochondrial ROS Followed by Suppression of Aquaporin-1*. PLoS One, 2016. **11**(7): p. e0158619-e0158619.
149. Zwiazek, J.J., et al., *Significance of oxygen transport through aquaporins*. Scientific reports, 2017. **7**: p. 40411.
150. Nyengaard, J.R., et al., *Interactions Between Hyperglycemia and Hypoxia. Implications for Diabetic Retinopathy*, 2004. **53**(11): p. 2931-2938.
151. Kitada, M., Y. Ogura, and D. Koya, *Rodent models of diabetic nephropathy: their utility and limitations*. International journal of nephrology and renovascular disease, 2016. **9**: p. 279-290.
152. Tesch, G.H. and T.J. Allen, *Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy*. Nephrology (Carlton), 2007. **12**(3): p. 261-6.
153. Betz, B. and B.R. Conway, *Recent advances in animal models of diabetic nephropathy*. Nephron Exp Nephrol, 2014. **126**(4): p. 191-5.
154. Kim, K.-B., et al., *Toxicometabolomics approach to urinary biomarkers for mercuric chloride (HgCl₂)-induced nephrotoxicity using proton nuclear magnetic resonance (1H NMR) in rats*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2010. **249**(2): p. 114-126.
155. Rodríguez de Cossío, A. and R. Rodríguez Sánchez, *Pruebas de laboratorio en atención primaria (II)*. SEMERGEN - Medicina de Familia, 2011. **37**(3): p. 130-135.

156. Si, Y., et al., *Infusion of mesenchymal stem cells ameliorates hyperglycemia in type 2 diabetic rats: identification of a novel role in improving insulin sensitivity*. *Diabetes*, 2012. **61**(6): p. 1616-25.
157. Hikmah, N., A.D.P. Shita, and H. Maulana, *Diabetic Blood Glucose Level Profile with Stratified Dose Streptozotocin (SD-STZ) and Multi Low Dose Streptozotocin (MLD-STZ) Induction Methods*. *Journal of Tropical Life Science*, 2015. **5**: p. 30-34.
158. Emam, M., *Comparative evaluation of antidiabetic activity of Rosmarinus officinalis L. And Chamomile recutita in streptozotocin induced diabetic rats*. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2012. **3**.
159. Anglani, F., et al., *In search of adult renal stem cells*. *J Cell Mol Med*, 2004. **8**(4): p. 474-87.
160. Morigi, M., C. Rota, and G. Remuzzi, *Mesenchymal Stem Cells in Kidney Repair*, in *Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols*, M. Gneccchi, Editor. 2016, Springer New York: New York, NY. p. 89-107.
161. Jiang, Z.-z., et al., *Exosomes secreted by human urine-derived stem cells could prevent kidney complications from type I diabetes in rats*. *Stem Cell Research & Therapy*, 2016. **7**: p. 24-24.
162. Bochon, B., et al., *Mesenchymal Stem Cells-Potential Applications in Kidney Diseases*. *International journal of molecular sciences*, 2019. **20**(10): p. 2462.
163. Alicic, R.Z., M.T. Rooney, and K.R. Tuttle, *Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017. **12**(12): p. 2032-2045.
164. Najafian, B., et al., *AJKD Atlas of Renal Pathology: diabetic nephropathy*. *Am J Kidney Dis*, 2015. **66**(5): p. e37-8.
165. Comai, G., et al., *Histological Evidence of Diabetic Kidney Disease Precede Clinical Diagnosis*. *American Journal of Nephrology*, 2019. **50**(1): p. 29-36.
166. Pourghasem, M., H. Shafi, and Z. Babazadeh, *Histological changes of kidney in diabetic nephropathy*. *Caspian J Intern Med*, 2015. **6**(3): p. 120-7.
167. Fioretto, P. and M. Mauer, *Histopathology of diabetic nephropathy*. *Semin Nephrol*, 2007. **27**(2): p. 195-207.
168. Zafar, M., et al., *Altered Kidney Morphology and Enzymes in Streptozotocin Induced Diabetic Rats*. *International Journal of Morphology*, 2009. **27**: p. 783-790.
169. Rasch, R., *Tubular lesions in streptozotocin-diabetic rats*. *Diabetologia*, 1984. **27**(1): p. 32-37.
170. Saitoh, A., et al., *Clear Cells of Eccrine Glands in a Patient with Clear Cell Syringoma Associated with Diabetes Mellitus*. *The American Journal of Dermatopathology*, 1993. **15**(2): p. 166-168.
171. Sullivan, M.A. and J.M. Forbes, *Glucose and glycogen in the diabetic kidney: Heroes or villains?* *EBioMedicine*, 2019. **47**: p. 590-597.
172. Kojima, Y., et al., *Mesenchymal stem cells cultured under hypoxic conditions had a greater therapeutic effect on mice with liver cirrhosis compared to those cultured under normal oxygen conditions*. *Regenerative therapy*, 2019. **11**: p. 269-281.

173. Overath, J.M., et al., *Short-term preconditioning enhances the therapeutic potential of adipose-derived stromal/stem cell-conditioned medium in cisplatin-induced acute kidney injury*. *Experimental Cell Research*, 2016. **342**(2): p. 175-183.
174. Zhang, W., et al., *Hypoxia-Pre-treated Human MSCs Attenuate Acute Kidney Injury through Enhanced Angiogenic and Antioxidative Capacities*. *BioMed Research International*, 2014. **2014**: p. 462472.
175. Ishiuchi, N., et al., *Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells prevent renal fibrosis and inflammation in ischemia-reperfusion rats*. *Stem Cell Research & Therapy*, 2020. **11**(1): p. 130.
176. Díaz-Flores, M., et al., *Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica*. *Gaceta médica de México*, 2004. **140**: p. 437-447.
177. Zent, R. and A. Pozzi, *Angiogenesis in Diabetic Nephropathy*. *Seminars in Nephrology*, 2007. **27**(2): p. 161-171.
178. Tanaka, S., T. Tanaka, and M. Nangaku, *Hypoxia and Dysregulated Angiogenesis in Kidney Disease*. *Kidney diseases (Basel, Switzerland)*, 2015. **1**(1): p. 80-89.
179. Kim, Y.S., et al., *Restoration of angiogenic capacity of diabetes-insulted mesenchymal stem cells by oxytocin*. *BMC cell biology*, 2013. **14**: p. 38-38.
180. Gu, X., et al., *Efficacy and Safety of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients with Diabetic Retinopathy*. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018. **49**(1): p. 40-52.
181. Rennerfeldt, D.A. and K.J. Van Vliet, *Concise Review: When Colonies Are Not Clones: Evidence and Implications of Intracolony Heterogeneity in Mesenchymal Stem Cells*. *Stem Cells*, 2016. **34**(5): p. 1135-1141.
182. Nishi, S., et al., *Ultrastructural characteristics of diabetic nephropathy*. *Medical Electron Microscopy*, 2000. **33**(2): p. 65-73.
183. Jefferson, J.A., S.J. Shankland, and R.H. Pichler, *Proteinuria in diabetic kidney disease: A mechanistic viewpoint*. *Kidney International*, 2008. **74**(1): p. 22-36.
184. Li, J.J., et al., *Podocyte biology in diabetic nephropathy*. *Kidney International*, 2007. **72**: p. S36-S42.

Anexos

ANEXO 1

Graphs, charts and tables of results.

1. *In vitro* results

1.1 Phenotypic characterization of ASCs

Cell Populations	% CD29	% CD90	% CD73	% CD34	% CD45
ASCs-CN	94.99±1.58	98.93±0.38	93.53±1.57	0.46±0.15	0.43±0.12
ASCs-CH	96.89±1.16	99.37±0.17	94.87±0.95	0.44±0.11	0.40±0.07
ASCs-DN	94.48±1.53	95.07±0.92	93.26±1.34	0.53±0.10	1.10±0.32
ASCs-DH	97.51±0.51	96.21±0.88	93.46±1.24	0.51±0.14	0.67±0.16

Table 3. Phenotype of ASCs-derived from healthy (C) and diabetic (D) rats cultured under standard (N) or hypoxic (H) conditions ($p=ns$): Data represents mean \pm SEM.

1.2. Functional characterization of ASCs

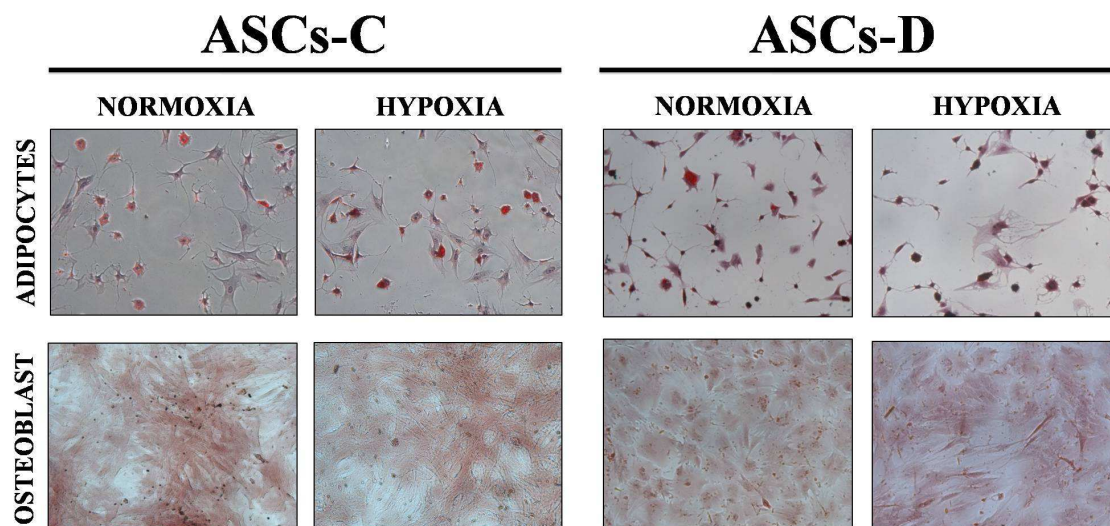


Figure 9. Adipocytes and osteoblast differentiation of ASCs X200.

1.3. Cell Growth: Population Doubling (PD)

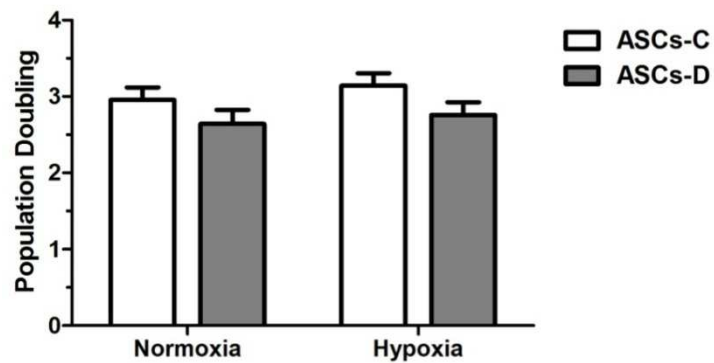


Figure 10. Cell growth of ASCs-derived from healthy (ASCs-C) and diabetic (ASCs-D) rats cultured under standard (N) or hypoxic (H) conditions: P-values ≥ 0.05 (ns). Data represents mean \pm SEM.

1.4. Angiogenesis assay

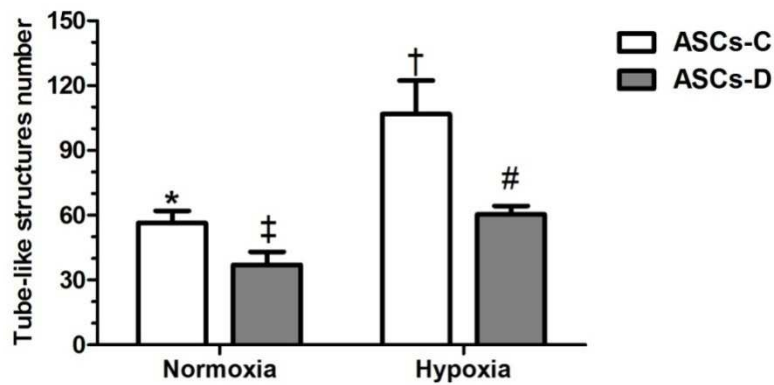


Figure 11. Quantification of tube-like structures of ASCs-derived from healthy (ASCs-C) and diabetic (ASCs-D) rats cultured under standard (N) or hypoxic (H) conditions: * $p \leq 0.01$ vs. ASCs-CH. † $p \leq 0.05$ vs. ASCs-CN. ‡ $p \leq 0.05$ vs. ASCs-DH. # $p \leq 0.01$ vs. ASCs-DN. Data represents mean \pm SEM.

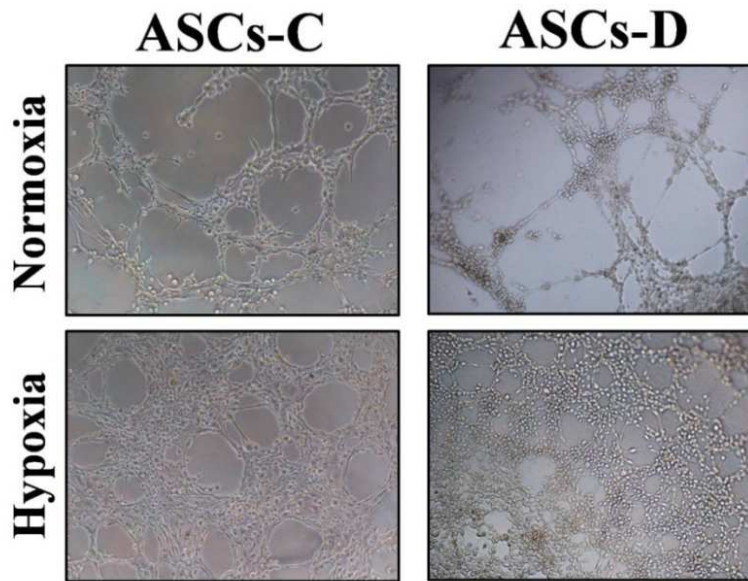


Figure 12. Representative images of tube-like structures obtained from all experimental groups X200.

1.5. Quantification of cytokines in cell culture supernatants

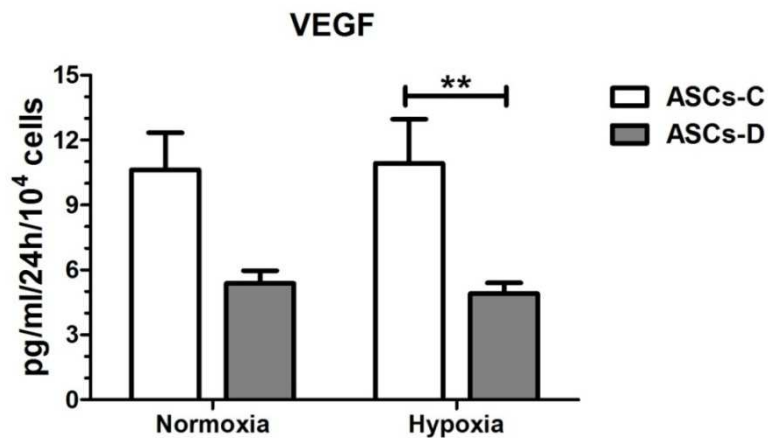


Figure 13. VEGF quantification in supernatant of ASCs-derived from healthy (ASCs-C) and diabetic (ASCs-D) rats cultured under standard (N) or hypoxic (H) conditions: ASCs-CH vs. ASCs-DH (** $p \leq 0.01$). The rest of p -values ≥ 0.05 (ns). Data represents mean \pm SEM.

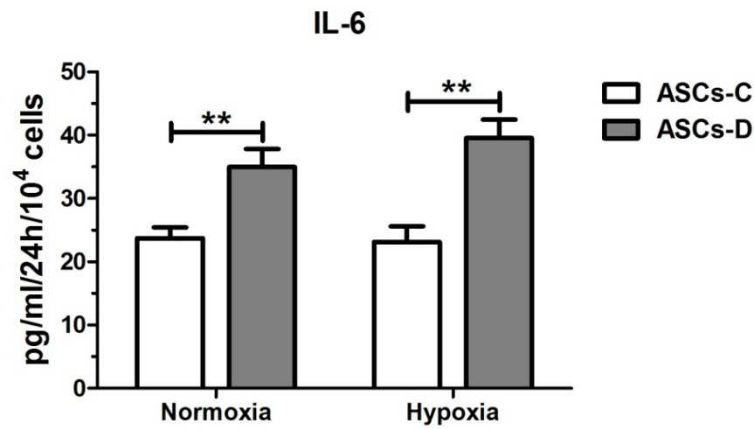


Figure 14. IL-6 quantification in supernatant of ASCs-derived from healthy (ASCs-C) and diabetic (ASCs-D) rats cultured under standard (N) or hypoxic (H) conditions: ASCs-CN vs. ASCs-DN ($p \leq 0.01$), ASCs-CH vs. ASCs-DH (** $p \leq 0.01$). The rest of p -values ≥ 0.05 (ns). Data represents mean \pm SEM.**

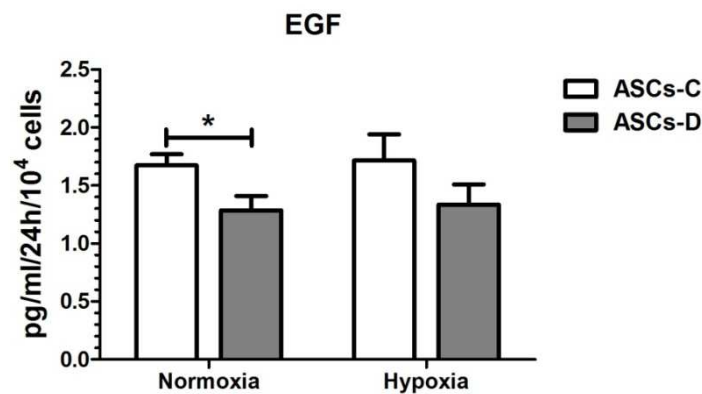


Figure 15. EGF quantification in supernatant of ASCs-derived from healthy (ASCs-C) and diabetic (ASCs-D) rats cultured under standard (N) or hypoxic (H) conditions: ASCs-CN vs. ASCs-DN (* $p \leq 0.05$). The rest of p -values ≥ 0.05 (ns). Data represents mean \pm SEM.

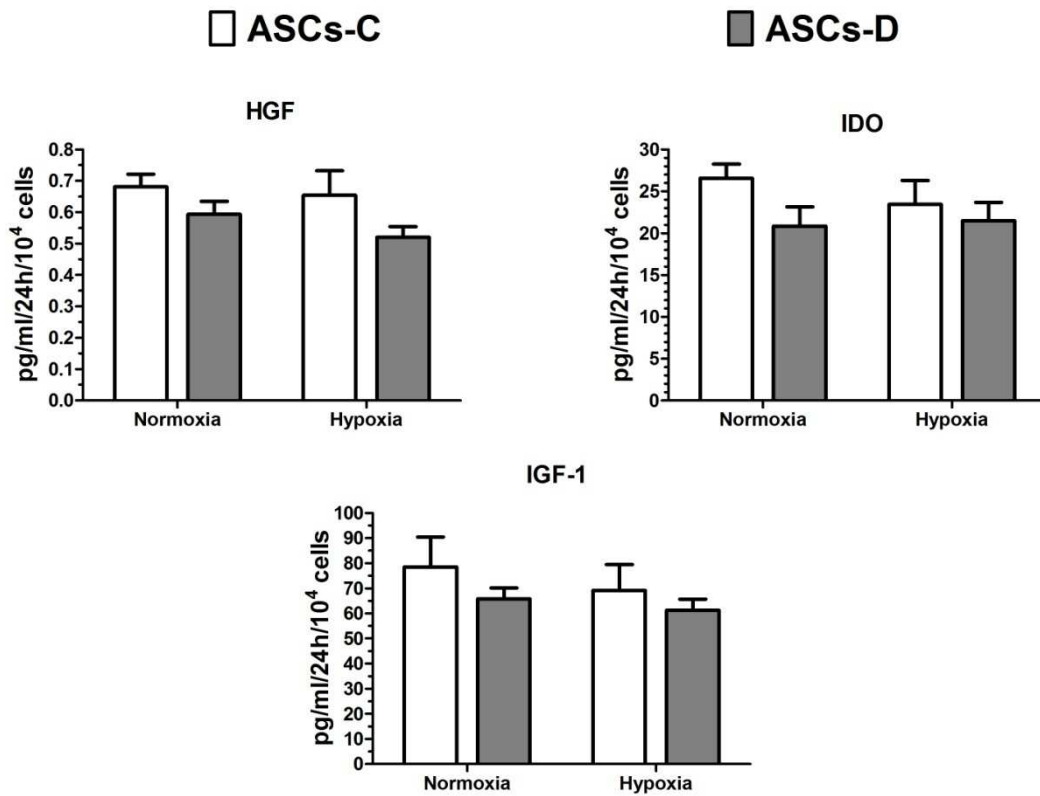


Figure 16. HGF, IDO and IGF-1 quantification in supernatant of ASCs-derived from healthy (ASCs-C) and diabetic (ASCs-D) rats cultured under standard (N) or hypoxic (H) conditions: P-values ≥ 0.05 (ns). Data represents mean \pm SEM.

	Factor	ASCs-CN	ASCs-CH	ASCs-DN	ASCs-DH	p-Value
Paracrine Factor Quantification (pg/ml/24h/10 ⁴ cells)	VEGF	10.62 \pm 1.71	10.93 \pm 2.03	5.38 \pm 0.57	4.9 \pm 0.5#	# ≤ 0.01
	IL-6	23.71 \pm 1.72	23.13 \pm 2.48	34.96 \pm 2.85†	39.58 \pm 2.87#	# ≤ 0.01 † ≤ 0.01
	EGF	1.67 \pm 0.09	1.71 \pm 0.22	1.28 \pm 0.12†	1.33 \pm 0.17	† ≤ 0.05
	HGF	0.68 \pm 0.04	0.65 \pm 0.07	0.59 \pm 0.04	0.52 \pm 0.03	
	IDO	26.59 \pm 1.67	23.44 \pm 2.86	20.87 \pm 2.29	21.49 \pm 2.2	
	IGF-1	78.55 \pm 11.91	69.22 \pm 10.29	65.9 \pm 4.23	61.27 \pm 4.44	

Table 4. Paracrine secretion assay: Data represents mean \pm SEM.

P versus ASCs-Control Hypoxia (ASCs-CH).

† P versus ASCs-Control Normoxia (ASCs-CN).

The rest of p-values ≥ 0.05 (ns).

1.6. Migration assay

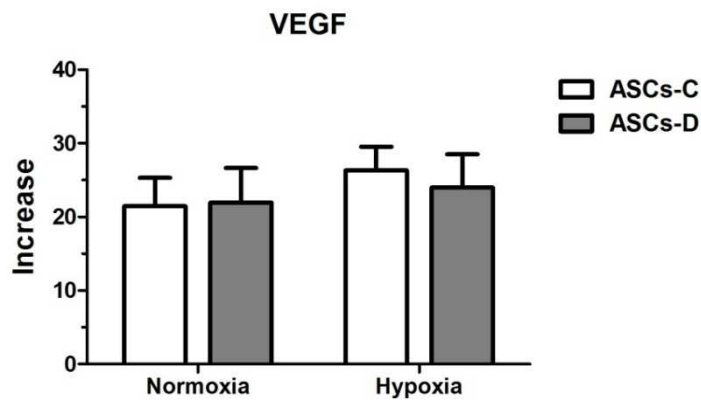


Figure 17. VEGF migration assay of ASCs-derived from healthy (ASCs-C) and diabetic (ASCs-D) rats cultured under standard (N) or hypoxic (H) conditions: The bars represent the increase⁽¹⁾ of migration capacity of ASCs. ⁽¹⁾Increase=the difference between the percentage of ASCs which migrated without stimulation (control wells) and the percentage of ASCs which migrated with VEGF stimulation (experiment well). P-values ≥ 0.05 (ns). Data represents mean \pm SEM.

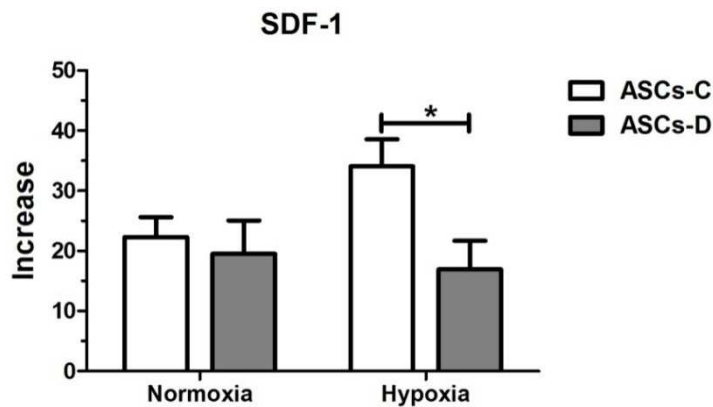


Figure 18. SDF-1 migration assay of ASCs-derived from healthy (ASCs-C) and diabetic (ASCs-D) rats cultured under standard (N) or hypoxic (H) conditions: The bars represent the increase⁽¹⁾ of migration capacity of ASCs. ⁽¹⁾Increase=the difference between the percentage of ASCs which migrated without stimulation (control wells) and the percentage of ASCs which migrated with SDF-1 stimulation (experiment well). ASCs-CH vs. ASCs-DH (* $p \leq 0.05$). The rest of p-values ≥ 0.05 (ns). Data represents mean \pm SEM.

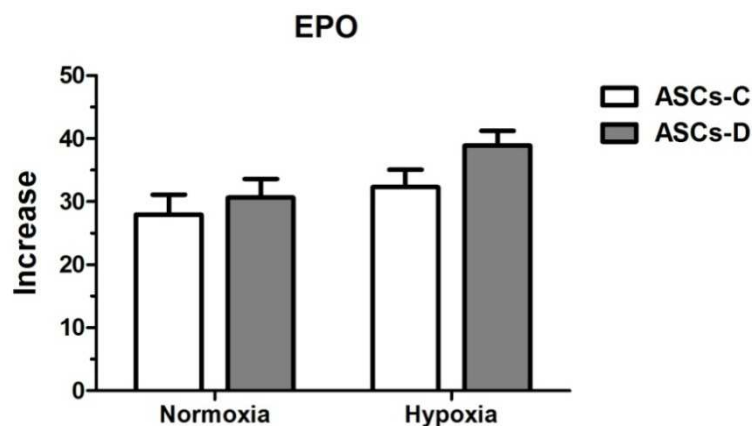


Figure 19. EPO migration assay of ASCs-derived from healthy (ASCs-C) and diabetic (ASCs-D) rats cultured under standard (N) or hypoxic (H) conditions: The bars represent the increase⁽¹⁾ of migration capacity of ASCs. ⁽¹⁾Increase=the difference between the percentage of ASCs which migrated without stimulation (control wells) and the percentage of ASCs which migrated with EPO stimulation (experiment well). P-values ≥ 0.05 (ns). Data represents mean \pm SEM.

	Factor	ASCs-CN	ASCs-CH	ASCs-DN	ASCs-DH	<i>p-Value</i>
Migration (Increase)	VEGF	21.44 \pm 3.85	26.3 \pm 3.24	21.95 \pm 4.71	23.98 \pm 4.51	
	SDF-1	22.95 \pm 3.31	34.06 \pm 4.51	19.52 \pm 5.55	16.92 \pm 4.74*	* ≤ 0.05
	EPO	27.93 \pm 3.18	32.32 \pm 2.75	30.65 \pm 2.94	38.88 \pm 2.34	

Table 5. Migration assay: * $p \leq 0.05$ vs. ASCs-CH. The rest of p-values ≥ 0.05 (ns). Data represents mean \pm SEM.

1.7. Molecular pathways and bioinformatics study

1.7.1. Global gene-expression profile and identification of DEGs

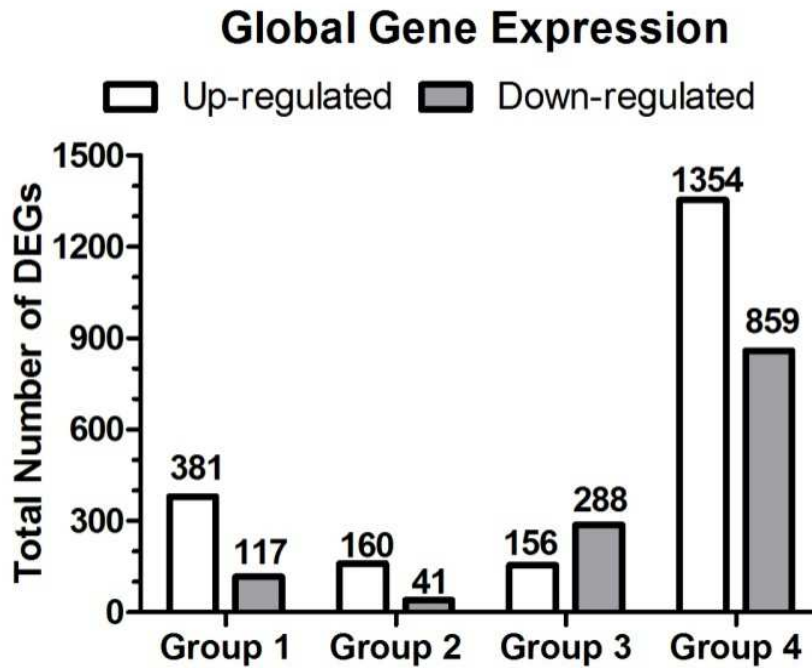


Figure 20. Global Gene Expression: Total Number of Differential Expression Genes (DEGs) identified in each compared group to microarray analyze. Group 1 (ASCs-CH vs. ASCs-CN), Group 2 (ASCs-DH vs. ASCs-DN), Group 3 (ASCs-DN vs. ASCs-CN), Group 4 (ASCs-DH vs. ASCs-CH).

1.7.2. Enrichment analysis and PPI construction

A.- Results of group 1 (ASCs-CH vs. ASCs-CN)

a) Enrichment analysis using DAVID bioinformatics resource

Group 1. /Overrepresented Category	Term	Gene count	P-value	Fold enrichment	FDR
UP_KEYWORDS	Transmembrane helix	90	0.000832634	1.34	0.01013062
UP_KEYWORDS	Transmembrane	90	0.000961382	1.34	0.01168866
UP_KEYWORDS	Membrane	102	0.001091802	1.30	0.01326463
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005912~Adherens junction	5	0.00202355	9.26	0.02481824
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0016021~Integral component of membrane	79	0.003953422	1.31	0.04795872
INTERPRO	IPR000276~G protein-coupled receptor, rhodopsin-like	30	0.003555624	1.74	0.04880395

Table 6. Significant overrepresented terms for microarray compared group 1: (ASCs-CH vs. ASCs-CN):

UP_KEYWORDS= UniProt.

GOTERM_CC_DIRECT= Gene Ontology, Cellular component.

INTERPRO=InterPro.

Group 1. /Underrepresented Category	Term	Gene count	P-value	Fold enrichment	FDR
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0007059~Chromosome segregation	6	1.18x10 ⁻⁰⁵	19.92	0.0001731
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0009615~Response to virus	6	3.40x10 ⁻⁰⁵	16.02	0.00049955
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0051607~Defense response to virus	6	0.00028037	10.27	0.00411574
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0000794~Condensed nuclear chromosome	4	0.00081532	21.53	0.00976897
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0000785~Chromatin	5	0.00195287	9.33	0.02325281
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0010212~Response to ionizing radiation	4	0.0034272	13.08	0.04923912
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005524~ATP binding	14	0.00351448	2.44	0.04093453

Table 7. Significant underrepresented terms for microarray compared group 1 (ASCs-CH vs. ASCs-CN):

GOTERM_CC_DIRECT= Gene Ontology, Cellular component.

GOTERM_BP_DIRECT= Gene Ontology, Biological processes.

GOTERM_MF_DIRECT=Gene Ontology, Molecular function.

b) Enrichment analysis using clusterProfiler

This study did not show any significant result.

c) PPI construction

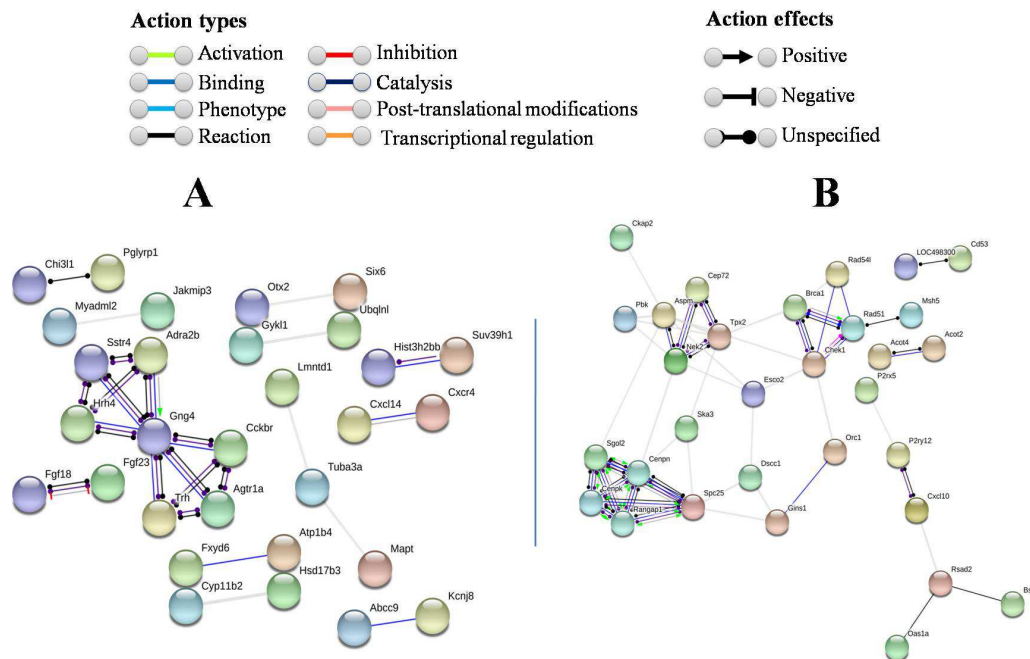


Figure 21. Networking analysis of Protein-Protein Interaction (PPI) of microarray group 1 (ASCs-CH vs. ASCs-CN): A, B.- The PPI network of up- and down-regulated DEGs, respectively. The color of the line represents action types and the line configuration indicates molecular action.

B.- Results of group 2 (ASCs-DH vs. ASCs-DN)

a) Enrichment analysis using DAVID bioinformatics resource

This study did not show any significant result.

b) Enrichment analysis using clusterProfiler

This study did not show any significant result.

c) PPI construction

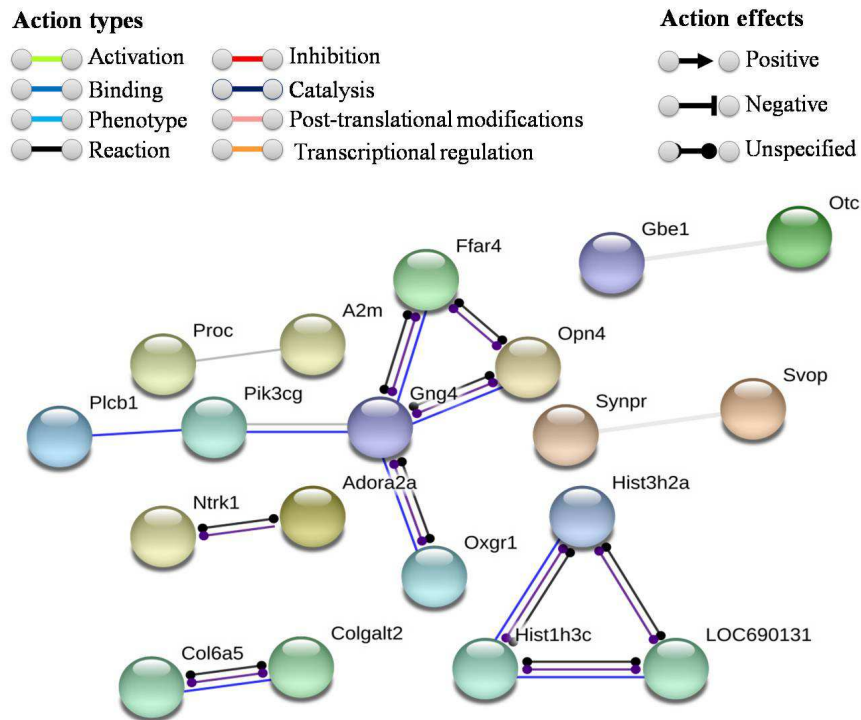


Figure 22. Networking analysis of Protein-Protein Interaction (PPI) of microarray group 2 (ASCs-DH vs. ASCs-DN): The PPI network of up-regulated DEGs. The color of the line represents action types and the line configuration indicates molecular action.

C.- Results of group 3 (ASCs-DN vs. ASCs-CN)

a) Enrichment analysis using DAVID bioinformatics resource

Group 3. /Overrepresented Category	Term	Gene count	P-value	Fold enrichment	FDR
UP_KEYWORDS	Disulfide bond	27	0.00011884	2.22	0.00139051
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0016324~Apical plasma membrane	9	0.00033711	5.17	0.00397037
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0030308~Negative regulation of cell growth	6	0.00066736	8.54	0.00994059
INTERPRO	IPR003961~Fibronectin, type III	7	0.00095989	6.14	0.01259704
INTERPRO	IPR013783~Fibronectin, type III	13	0.00097148	3.08	0.0127482
UP_KEYWORDS	Signal	33	0.00122709	1.74	0.01427316
UP_SEQ_FEATURE	Topological domain:Extracellular	16	0.00167415	2.31	0.02097847
UP_SEQ_FEATURE	Glycosylation site:N-linked (GlcNAc,,)	21	0.00168434	1.93	0.02110485
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005887~Integral component of plasma membrane	14	0.00197636	2.67	0.02307183
KEGG_PATHWAY	mo04512~ECM-receptor interaction	5	0.00198985	9.07	0.02206395
SMART	SM00060~FN3	6	0.00238948	6.30	0.02466187
UP_KEYWORDS	Glycoprotein	23	0.00247716	1.96	0.02862179

Table 8. Top 12 significant overrepresented terms for microarray compared group 3 (ASCs-DN vs. ASCs-CN):

UP_KEYWORDS= UniProt;

GOTERM_CC_DIRECT= Gene Ontology, Cellular component.

GOTERM_BP_DIRECT= Gene Ontology, Biological processes.

INTERPRO=InterPro;

UP_SEQ_FEATURE=Uniprot;

KEGG_PATHWAY= KEGG pathway database.

SMART= SMART database.

Group 3. /Underrepresented Category	Term	Gene count	P-value	Fold enrichment	FDR
UP_SEQ_FEATURE	Region of interest:Ligand-binding	5	0.00012411	18.64	0.00164958
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0007623~Circadian rhythm	8	0.00014233	7.03	0.00227805
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0045944~Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	23	0.00022585	2.39	0.00361262
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0030522~Intracellular receptor signaling pathway	5	0.00024428	16.10	0.00390673
INTERPRO	IPR003070~Orphan nuclear receptor	3	0.00025286	107.69	0.00350554
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004879~RNA polymerase II transcription factor activity, ligand-activated sequence-specific DNA binding	5	0.00036585	14.50	0.00481052
INTERPRO	IPR026052~DNA-binding protein inhibitor	3	0.00050264	80.77	0.00695722
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0071376~Cellular response to corticotropin-releasing hormone stimulus	3	0.00051527	79.70	0.00822394
UP_KEYWORDS	Biological rhythms	6	0.00072626	8.42	0.00887571
UP_SEQ_FEATURE	Zinc finger region:NR C4-type	5	0.0007363	11.91	0.00974931
UP_SEQ_FEATURE	DNA-binding region:Nuclear receptor	5	0.0007363	11.91	0.00974931
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0043153~Entrainment of circadian clock by photoperiod	4	0.00081462	21.25	0.01297265

Table 9. Top 12 significant underrepresented terms for microarray compared group 3 (ASCs-DN vs. ASCs-CN):

UP_KEYWORDS= UniProt;

GOTERM_BP_DIRECT= Gene Ontology, Biological processes.

INTERPRO=InterPro;

GOTERM_MF_DIRECT= Gene Ontology, Molecular function.

UP_SEQ_FEATURE=Uniprot;

b) Enrichment analysis using clusterProfiler

This study do not show any significant result.

c) PPI construction

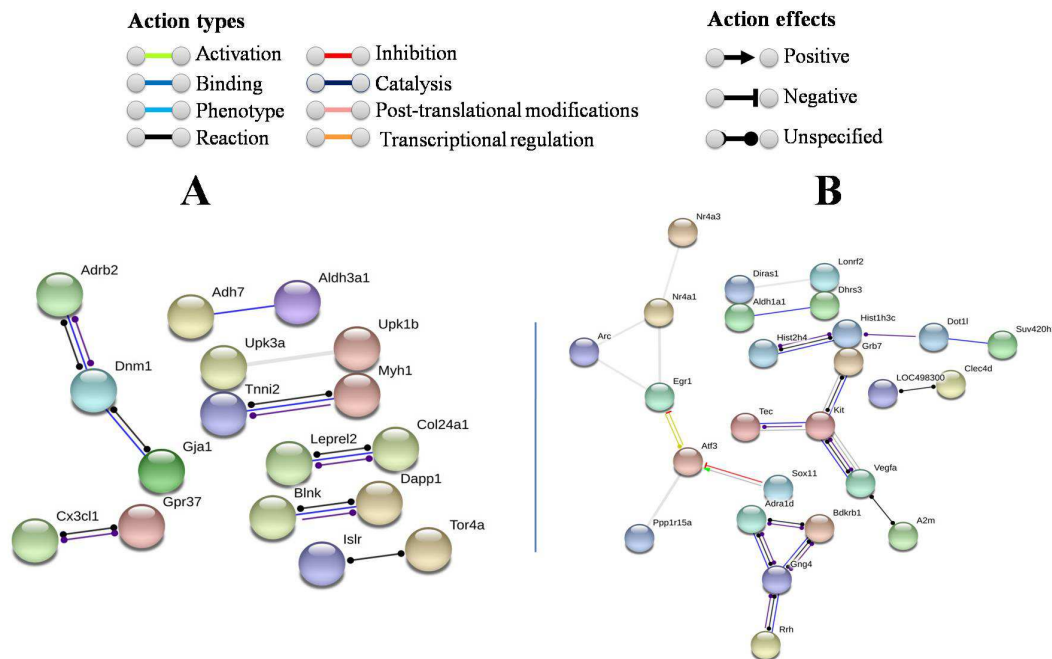


Figure 23. Networking analysis of Protein-Protein Interaction (PPI) of microarray group 3 (ASCs-DN vs. ASCs-CN): A, B,- The PPI network of up- and down-regulated DEGs, respectively. The color of the line represents action types and the line configuration indicates molecular action.

D.- Results of group 4 (ASCs-DH vs. ASCs-CH)**a) Enrichment analysis using DAVID bioinformatics resource**

Group 4. /Overrepresented Category	Term	Gene count	P-value	Fold enrichment	FDR
UP_SEQ_FEATURE	Topological domain:Cytoplasmic	121	2.96x10 ⁻¹¹	1.76	4.73x10 ⁻¹⁰
UP_SEQ_FEATURE	Topological domain:Extracellular	98	7.10x10 ⁻¹⁰	1.83	1.14x10 ⁻⁰⁸
KEGG_PATHWAY	rno03010:Ribosome	28	2.50x10 ⁻⁰⁸	3.46	3.27x10 ⁻⁰⁷
UP_KEYWORDS	Disulfide bond	148	2.63x10 ⁻⁰⁸	1.57	3.54x10 ⁻⁰⁷
UP_SEQ_FEATURE	Transmembrane region	143	4.53x10 ⁻⁰⁸	1.48	7.24x10 ⁻⁰⁷
UP_KEYWORDS	Glycoprotein	140	2.37x10 ⁻⁰⁷	1.53	3.18x10 ⁻⁰⁶
UP_KEYWORDS	Signal	204	4.12x10 ⁻⁰⁷	1.39	5.55x10 ⁻⁰⁶
UP_SEQ_FEATURE	Glycosylation site:N-linked (GlcNAc,,)	125	6.25x10 ⁻⁰⁷	1.48	1.00x10 ⁻⁰⁵
UP_SEQ_FEATURE	Disulfide bond	95	1.08x10 ⁻⁰⁶	1.60	1.73x10 ⁻⁰⁵
UP_KEYWORDS	Ribosomal protein	28	1.66x10 ⁻⁰⁵	2.54	0.00022411
UP_SEQ_FEATURE	Signal peptide	103	2.75x10 ⁻⁰⁵	1.46	0.00043938
UP_KEYWORDS	Transmembrane helix	319	6.33x10 ⁻⁰⁵	1.20	0.00085207

Table 10. Top 12 significant overrepresented terms for microarray compared group 4 ASCs-DH vs. ASCs-CH:

UP_SEQ_FEATURE=Uniprot.

KEGG_PATHWAY= Base de datos KEGG

UP_KEYWORDS= UniProt;

Group 4./Underrepresented Category	Term	Gene count	P-value	Fold enrichment	FDR
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0045944~Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	72	1.39x10 ⁻¹³	2.61	2.49x10 ⁻¹²
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000122~Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	51	2.54x10 ⁻⁰⁹	2.54	4.53x10 ⁻⁰⁸
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005634~Nucleus	189	4.61x10 ⁻⁰⁹	1.45	6.32x10 ⁻⁰⁸
UP_KEYWORDS	Nucleus	110	8.54x10 ⁻⁰⁹	1.73	1.12x10 ⁻⁰⁷
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006366~Transcription from RNA polymerase II promoter	34	1.06x10 ⁻⁰⁸	3.17	1.88x10 ⁻⁰⁷
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005737~Cytoplasm	198	1.83x10 ⁻⁰⁸	1.41	2.51x10 ⁻⁰⁷
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0043565~Sequence-specific DNA binding	41	7.21x10 ⁻⁰⁸	2.59	1.08x10 ⁻⁰⁶
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0008284~Positive regulation of cell proliferation	37	9.80x10 ⁻⁰⁸	2.73	1.75x10 ⁻⁰⁶
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0010628~Positive regulation of gene expression	30	2.92x10 ⁻⁰⁷	3.00	5.22x10 ⁻⁰⁶
INTERPRO	IPR004827~ Basic-leucine zipper domain	11	1.25x10 ⁻⁰⁶	7.71	1.95x10 ⁻⁰⁵
UP_KEYWORDS	Transcription regulation	47	1.65x10 ⁻⁰⁶	2.15	2.17x10 ⁻⁰⁵
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003700~Transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	45	2.50x10 ⁻⁰⁶	2.15	3.73x10 ⁻⁰⁵

Table 11. Top 12 significant underrepresented terms for microarray compared group 4 ASCs-DH vs. ASCs-CH:

UP_KEYWORDS= UniProt;

INTERPRO=InterPro;

GOTERM_MF_DIRECT= Gene Ontology, Molecular Function;

GOTERM_BP_DIRECT= Gene Ontology, Biological process;

GOTERM_CC_DIRECT= Gene Ontology, Cellular Component;

b) Enrichment analysis using clusterProfiler

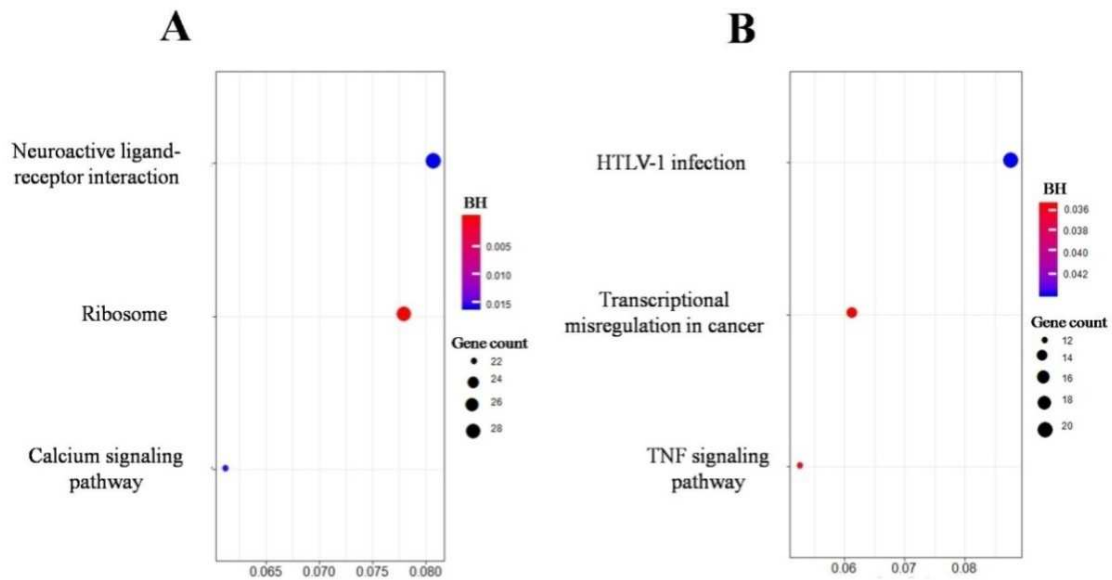


Figure 24. KEGG pathways analysis using clusterProfiler: The dot charts stand for the enriched pathways for up-regulated (A) and down-regulated (B) DEGs in the microarray study group 4 (ASCs-DH vs. ASCs-CH), respectively. The dot size is according to the number of genes linked with its respective pathway. The Benjamini-Hochberg (BH) adjusted p-values were arranged from less (blue) to more (red) significant.

c) PPI construction

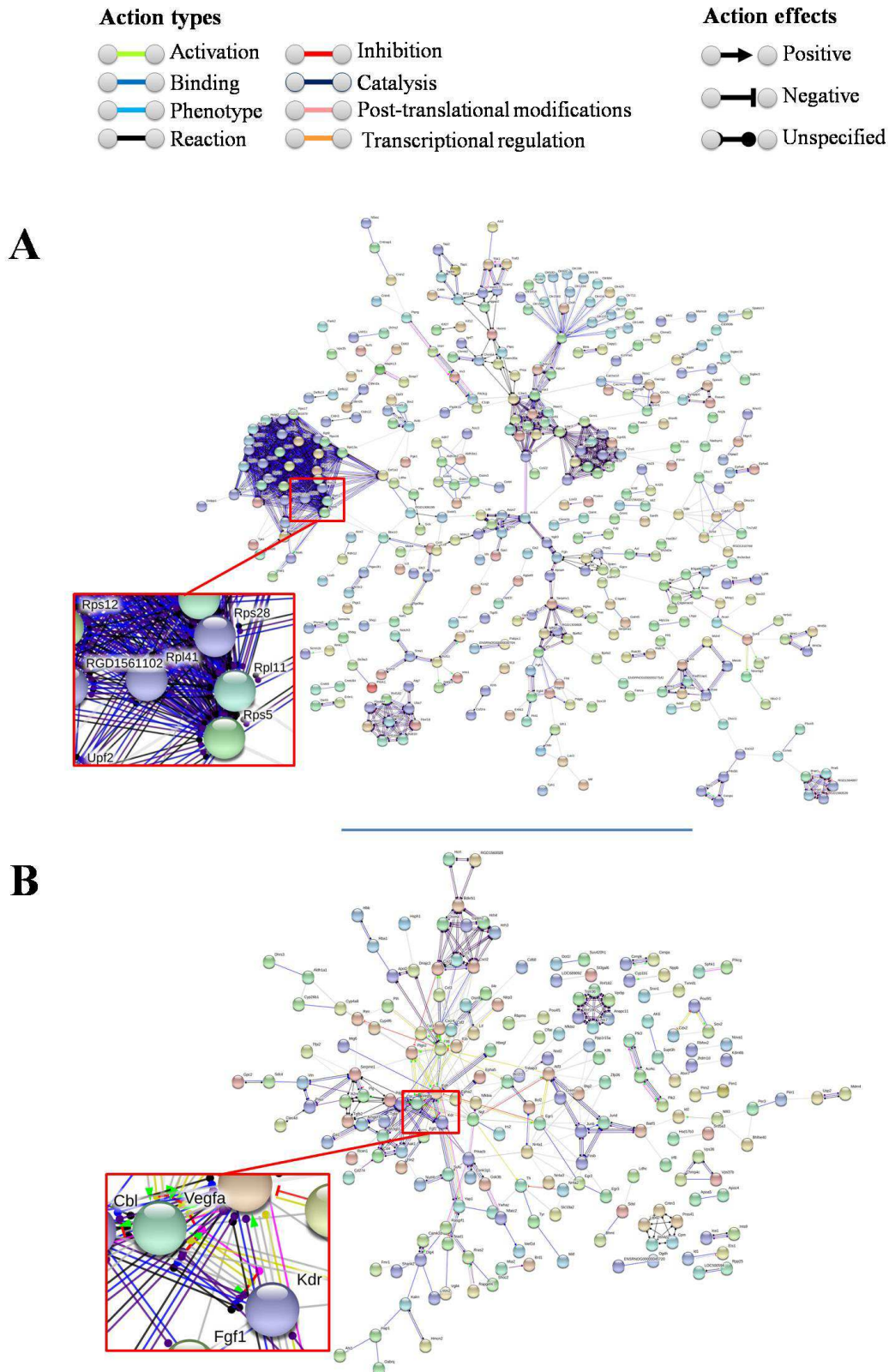


Figure 25. Networking analysis of Protein-Protein Interaction (PPI) of microarray group 4 (ASCs-DH vs. ASCs-CH): A, B.- The PPI network of up- and down-regulated DEGs, respectively. The most significant protein interaction of each group is shown in the box. The color of the line represents action types and the line configuration indicates the molecular action.

2. *In vivo* results

2.1. Body weight (BW) and biochemical analysis

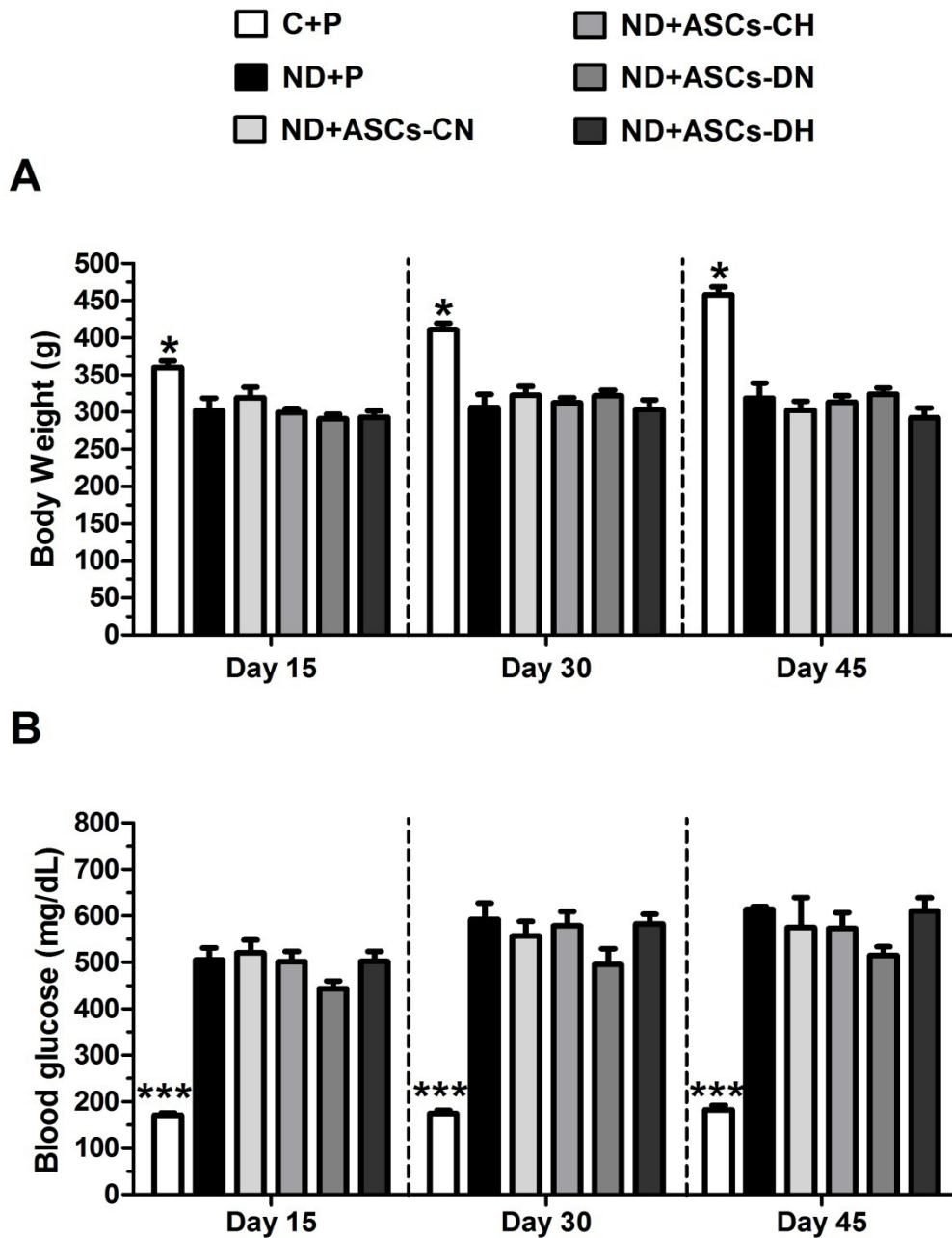


Figure 26. Body weight and blood glucose on days 15, 30 y 45: A.- Body weight: C+P vs. DN+P, DN+ASCs-CN, DN+ASCs-CH, DN+ASCs-DN and DN+ASCs-DH (* $p \leq 0.05$). **B.- Blood glucose:** C+P vs. DN+P, ND+ASCs-CN, DN+ASCs-CH, DN+ASCs-DN and DN+ASCs-DH (** $p \leq 0.001$). The rest of p-values ≥ 0.05 (ns). Data represents mean \pm SEM.

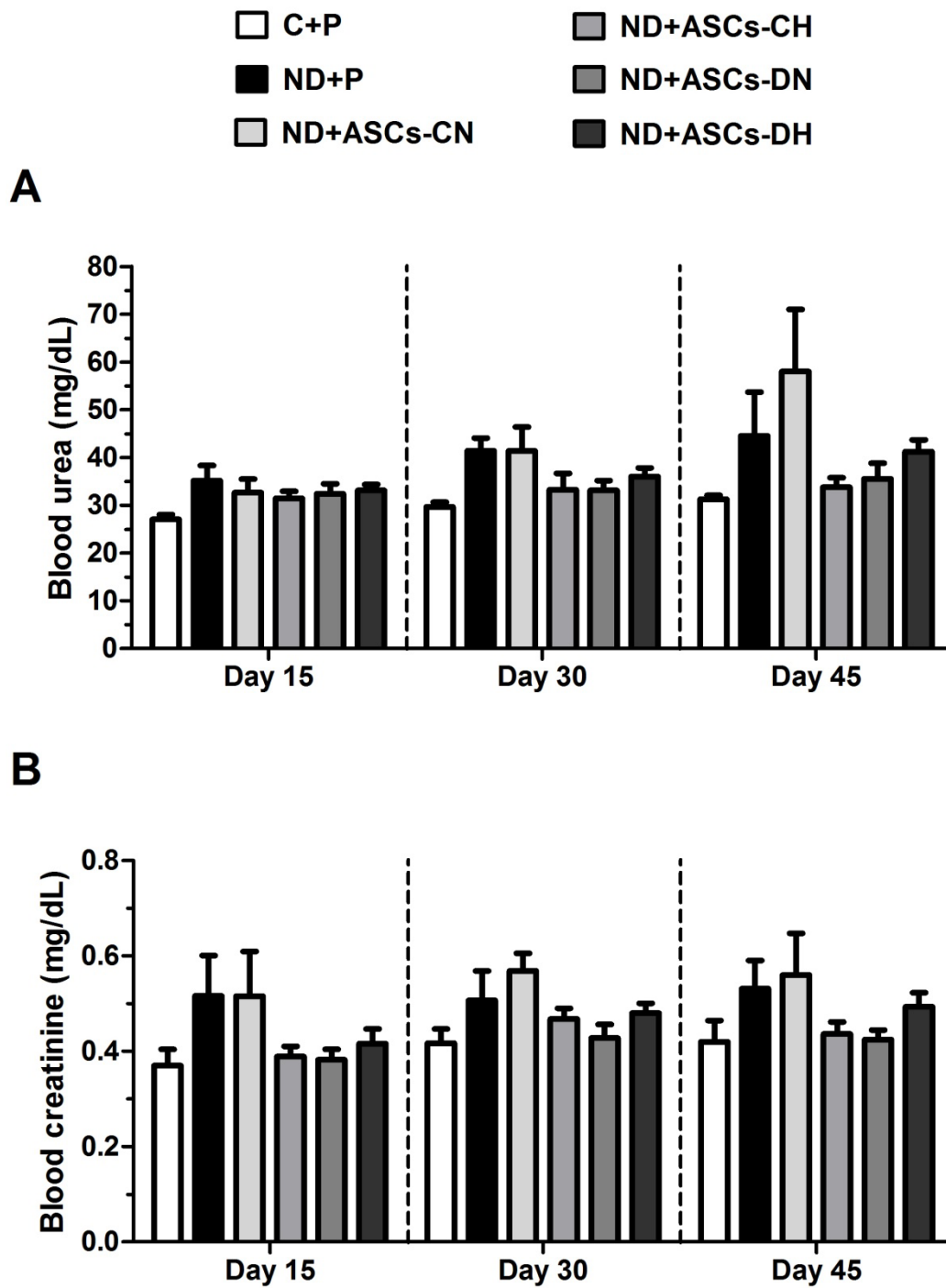


Figure 27. Blood urea and creatinine on days 15, 30 y 45: A.- Urea: P-values ≥ 0.05 (ns). B.- Creatinine: P-values ≥ 0.05 (ns). Data represents mean \pm SEM.

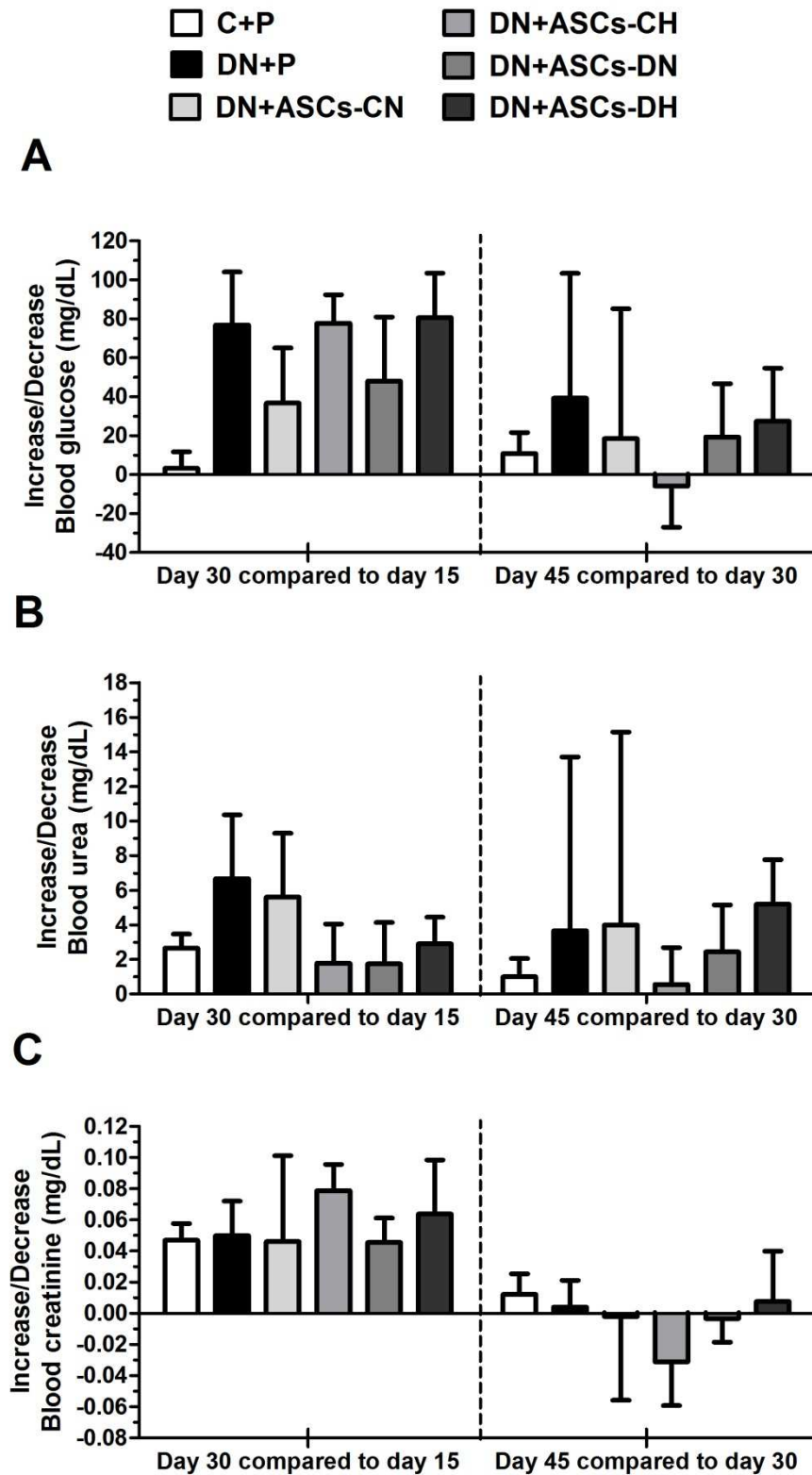


Figure 28. The net increase/decrease of biochemical markers in serum: A.- Blood glucose on day 30 compared to day 15 and on day 45 compared to day 30. B.- Blood urea on day 30 compared to day 15 and on day 45 compared to day 30. C.- Blood creatinine on day 30 compared to day 15 and on day 45 compared to day 30. P-values ≥ 0.05 (ns). Data represents mean \pm SEM.

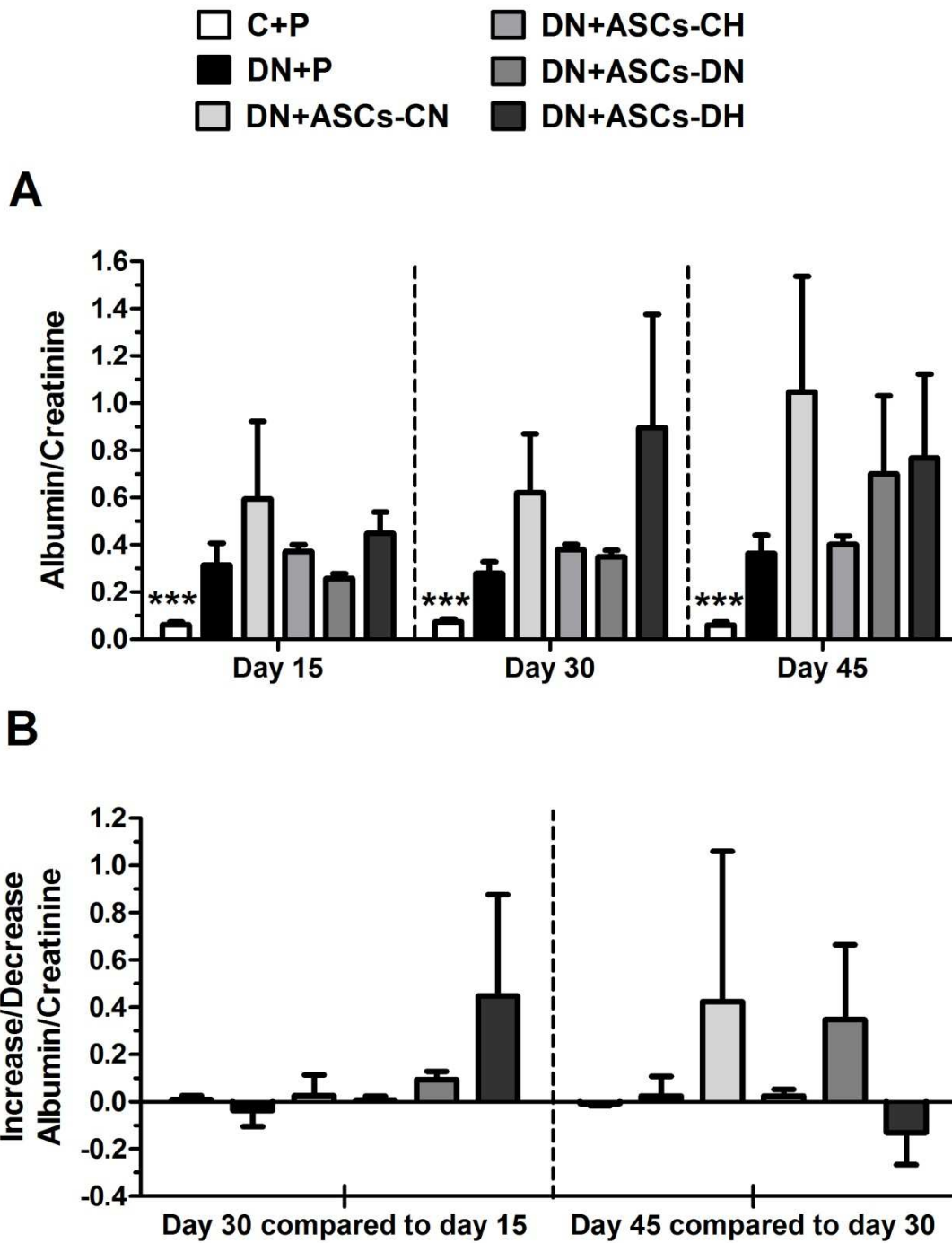


Figure 29. Urine biochemical markers: A.- Albumin/creatinine ratio on days 15, 30 and 45: *** $p \leq 0.001$ vs. DN+P, DN+ASCs-CN, DN+ASCs-CH, DN+ASCs-DN and DN+ASCs-DH. B.- The net increase/decrease of albumin/creatinine ratio: P-values ≥ 0.05 (ns). Data represents mean \pm SEM.

Time	In vivo study group	Body weight (g)	Blood			Urine
			Glucose (mg/dL)	Urea (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Albumin/Creatinine (Ratio)
Day 0	C+P	281.99±10.3	176.81±5.91	26.6±0.8	0.35±0.03	0.14±0.02
	ND+P	289.05±18.37	189.71±15.04	24.43±1.36	0.33±0.06	0.14±0.06
Day 15	C+P	360.24±8.79*	171.9±4.51***	27±1	0.37±0.03	0.06±0.01***
	ND+P	302.3±16.82	505.5±26.22	35.17±3.13	0.52±0.09	0.32±0.09
	ND+ASCs-CN	319.33±14.15	520.7±28.4	32.66±2.83	0.52±0.09	0.59±0.33
	ND+ASCs-CH	399.87±5.11	501.33±22.22	31.44±1.46	0.39±0.02	0.37±0.03
	ND+ASCs-DN	291.1±6.22	443.6±16.92	32.38±2.1	0.38±0.02	0.26±0.02
	ND+ASCs-DH	293.1±8.76	502.1±21.52	33.1±1.26	0.42±0.03	0.45±0.09
Day 30	C+P	411.01±8.6*	175.2±6.81***	29.67±1	0.42±0.03	0.07±0.01***
	ND+P	306.4±17.56	593.2±34.61	41.43±2.6	0.51±0.06	0.28±0.05
	ND+ASCs-CN	322.61±12.17	556.67±31.95	41.33±5.05	0.57±0.04	0.62±0.25
	ND+ASCs-CH	312.82±6.7	579.11±30.44	33.22±3.46	0.47±0.02	0.38±0.02
	ND+ASCs-DN	322.11±7.5	495.4±34.14	33.11±2.01	0.43±0.03	0.35±0.03
	ND+ASCs-DH	303.8±12.82	582.8±20.68	36±1.82	0.48±0.02	0.1±0.48
Day 45	C+P	458.11±10.3*	182.8±9.66***	31.23±0.82	0.42±0.04	0.06±0.01***
	ND+P	318.99±20.37	614.3±5.66	44.5±9.2	0.53±0.06	0.36±0.07
	ND+ASCs-CN	302.62±12.2	575.33±64.35	58±13	0.56±0.09	1.04±0.49
	ND+ASCs-CH	313.68±8.53	573.33±33.77	33.78±1.95	0.42±0.03	0.4±0.04
	ND+ASCs-DN	324.26±8.57	514.9±18.64	35.56±3.24	0.42±0.02	0.7±0.33
	ND+ASCs-DH	292.6±13.1	610.4±28.93	41.2±2.47	0.49±0.03	0.77±0.35

Table 12. Values obtained of body weight and biochemical markers on day 0, 15, 30 and 45: Body weight: *p≤0.05 vs. DN+P, DN+ASCs-CN, DN+ASCs-CH, DN+ASCs-DN, DN+ASCs-DH. **Blood glucose:** ***p≤0.001 vs. DN+P, DN+ASCs-CN, DN+ASCs-CH, DN+ASCs-DN, DN+ASCs-DH. **Albumin/creatinine ratio:** ***p≤0.001 vs. DN+P, DN+ASCs-CN, DN+ASCs-CH, DN+ASCs-DN, DN+ASCs-DH. The rest of p-values ≥0.05 (ns). Data represents mean±SEM.

In vivo study group	Blood Increase/Decrease						Urine Increase/Decrease	
	Glucose (mg/dL)		Urea (mg/dL)		Creatinine (mg/dL)		Albumin/Creatinine (Ratio)	
	30-15	45-30	30-15	45-30	30-15	45-30	30-15	45-30
C+P	3.15±8.49	11±10.62	2.67±0.8	1±1.04	0.05±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	-0.01±0.01
DN+P	76.8±27.3	39.33±64.04	6.67±3.69	3.67±10.04	0.05±0.02	0.004±0.02	-0.04±0.07	0.02±0.08
DN+ASCs-CN	36.67±28.44	18.67±66.58	5.6±3.7	4±11.14	0.05±0.05	-0.002±0.05	0.03±0.09	0.42±0.63
DN+ASCs-CH	77.78±14.65	-5.79±21.18	1.78±2.27	0.56±2.13	0.08±0.02	-0.03±0.01	0.01±0.01	0.02±0.03
DN+ASCs-DN	48±33.06	19.44±27.28	1.75±2.39	2.44±2.7	0.05±0.02	-0.003±0.01	0.09±0.03	0.35±0.32
DN+ASCs-DH	80.7±22.79	27.6±27.07	2.9±1.54	5.2±2.55	0.06±0.03	0.01±0.03	0.45±0.43	-0.13±0.13

Table 13. Values obtained of quantification of the net increase/decrease of biochemical markers: P-values ≥ 0.05 . Data represents mean±SEM.

2.2. Semiquantitative morphological study

Control + Placebo

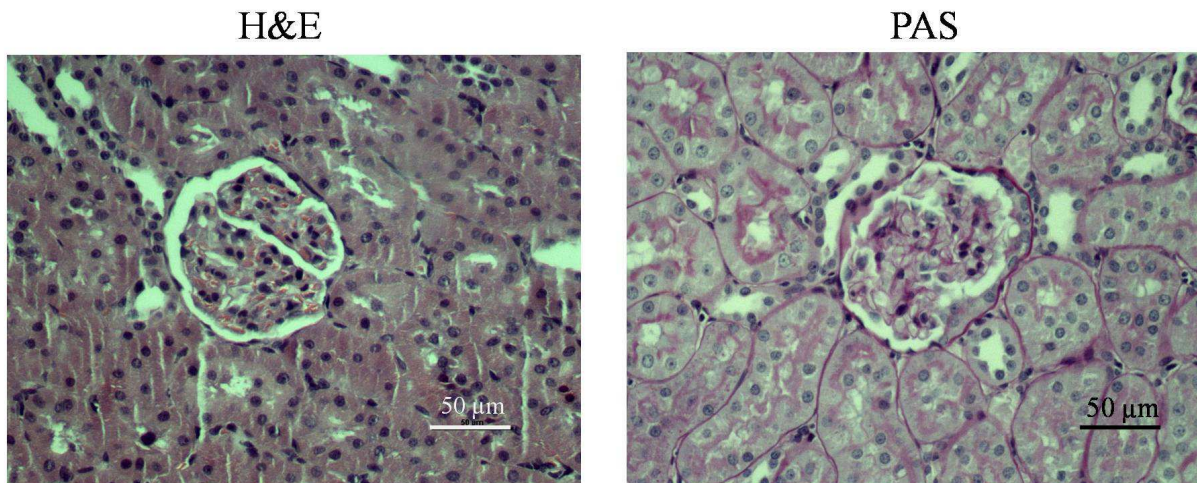


Figure 30. Renal morphology of control rats in H&E and PAS X200: No lesions were observed.

Diabetic nephropathy + Placebo

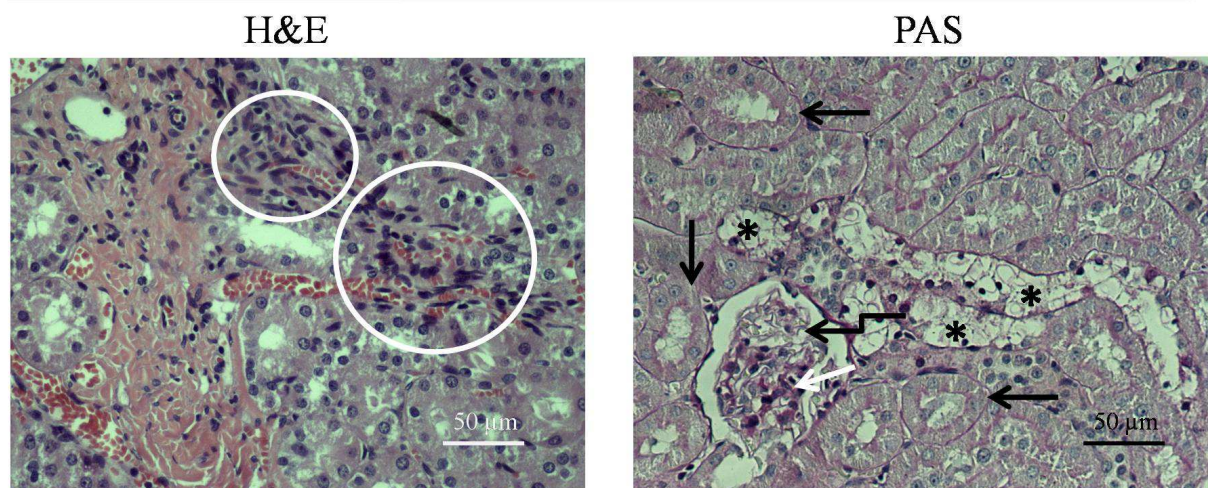


Figure 31. Renal morphology of diabetic nephropathy (DN) rats in H&E and PAS X200: H&E: Intense inflammatory infiltrate (white circles); PAS: Clear cell changes (black asterisks), Signs of acute tubular necrosis (ATN) (black arrows), mesangial expansion (white arrow), capillary dilatation (black angular arrow).

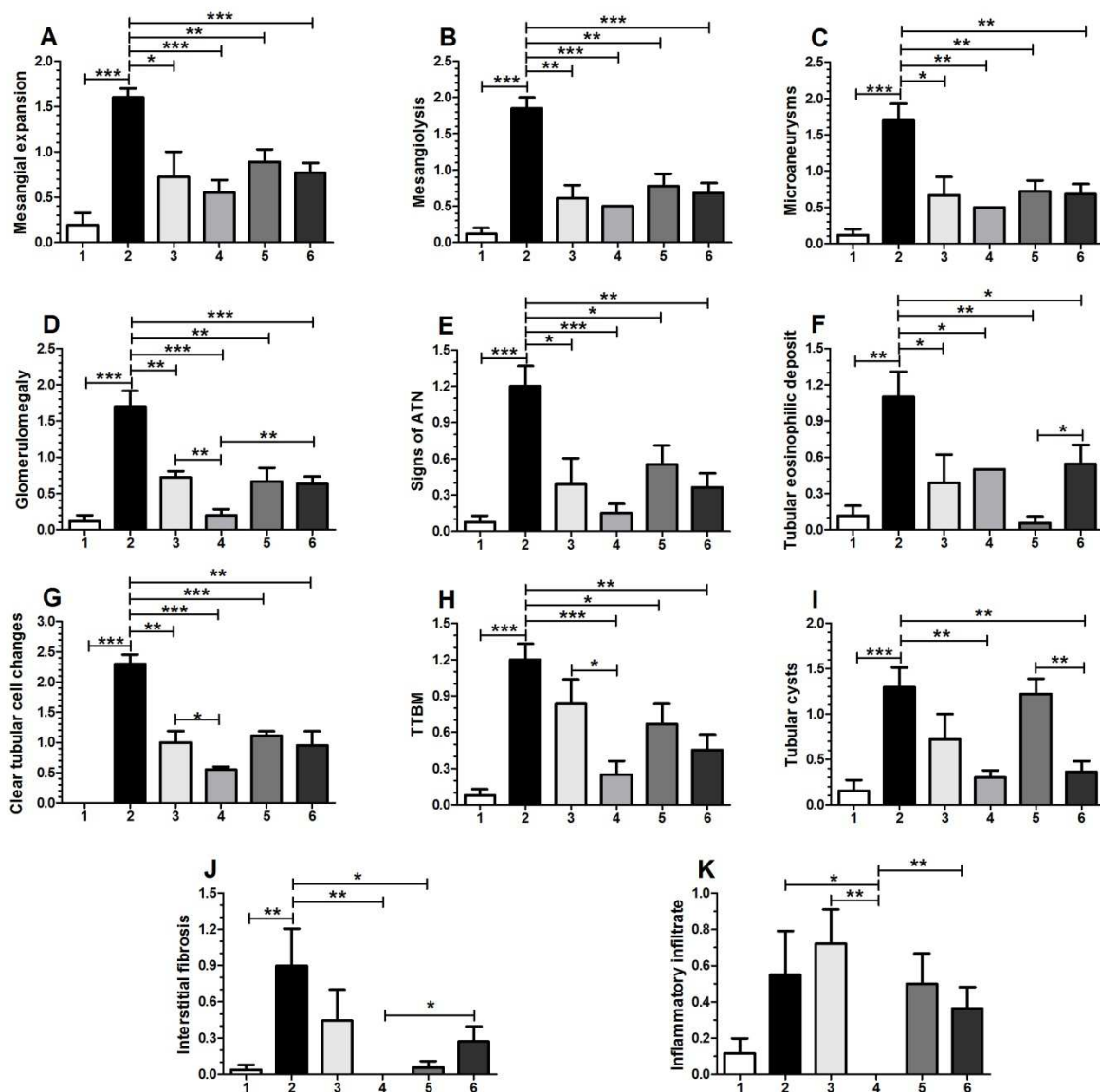


Figure 32. Semiquantitative morphological analysis of renal tissue: A.- Mesangial expansion. B.- Mesangiolytic. C.- Microaneurysms. D.- Glomerulomegaly. E.- Signs of acute tubular necrosis (ATN). F.- Tubular eosinophilic deposits. G.- Clear cell changes. H.- Thickening of tubular basement membrane (TTBM). I.- Tubular cysts. J.- Interstitial fibrosis. K.- Inflammatory infiltrate. 1. C+V, 2. DN+V, 3. DN+ASCs-CN, 4. DN+ASCs-CH, 5. DN+ASCs-DN, 6. DN+ASCs-DH. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (), $p < 0.001$ (***). The rest of p -values ≥ 0.05 (ns). Data represents mean \pm SEM.**

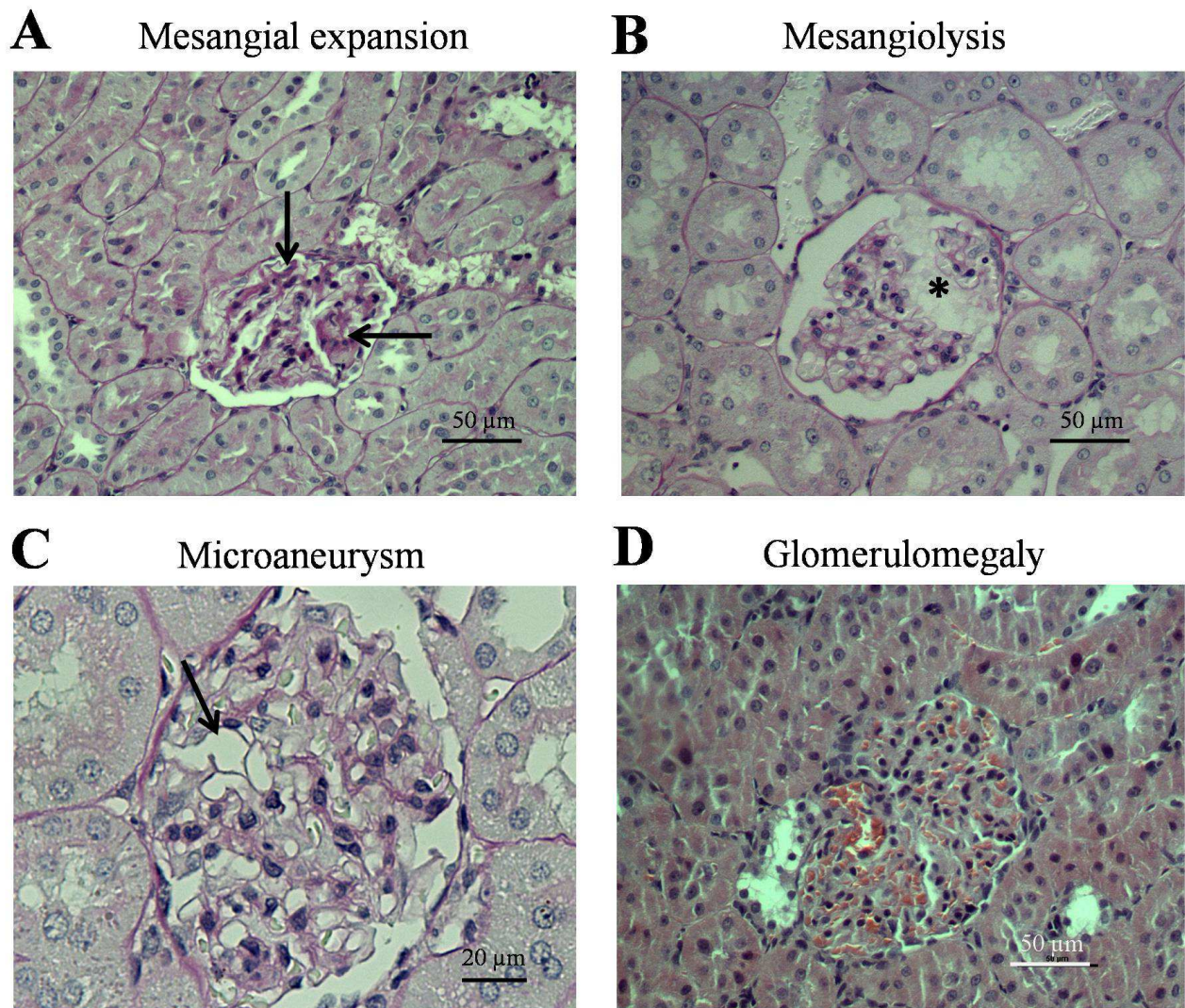


Figure 33. A.- Mesangial expansion lesion of a DN+ASCs-CN sample in PAS X200: White arrows. B.- Mesangiolytic lesion of a DN+ASCs-CN sample in PAS X200: Loss of mesangial cells and dissolution of mesangial matrix (black asterisk). C.- Microaneurysm lesion of a DN+ASCs-CN sample in PAS X400: Black arrow. D.- Glomerulomegaly lesion of DN+ASCs-DN sample in H&E X200: Scale 50μm.

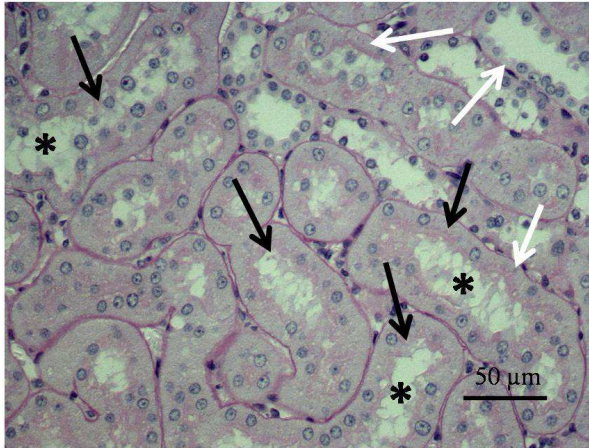
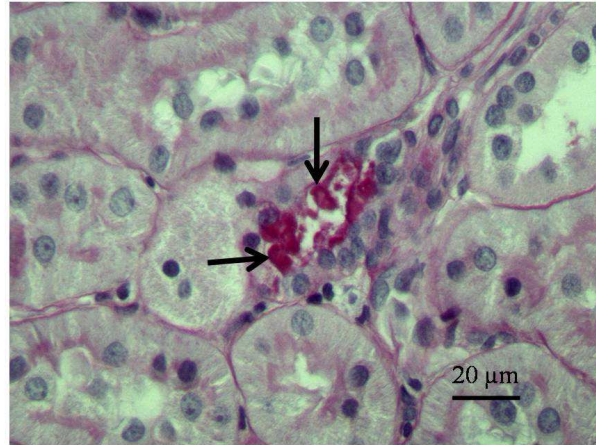
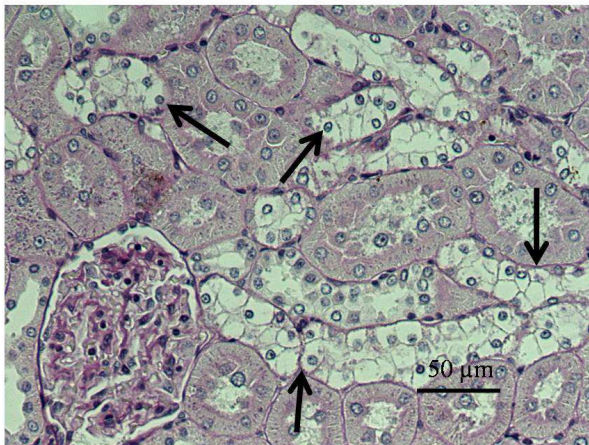
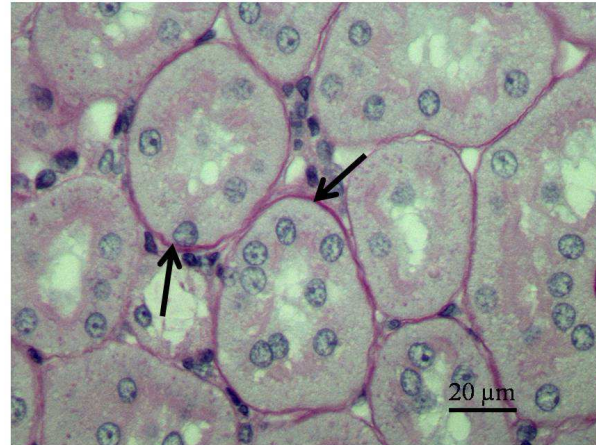
A Acute tubular necrosis (ATN)**B** Tubular eosinophilic deposits**C** Clear cell changes**D** TTBM

Figure 34. A.- Signs of acute tubular Necrosis (ATN) lesion of DN+ASCs-CN sample in PAS X200: Loss of brush border (black arrows), dilatation of tubular lumens (black asterisks) and flattening of epithelium (white arrows). **B.- Tubular eosinophilic deposit lesion of DN+ASCs-DN sample in PAS X400:** Black arrows. **C.- Clear cell changes lesion of DN+ASCs-CN sample in PAS X200:** Cells which possess clear cytoplasm and well-defined cell plasma membrane (black arrows). **D.- Thickening of tubular basement membrane (TTBM) lesion of DN+ASCs-CN sample in PAS X400:** Black arrows.

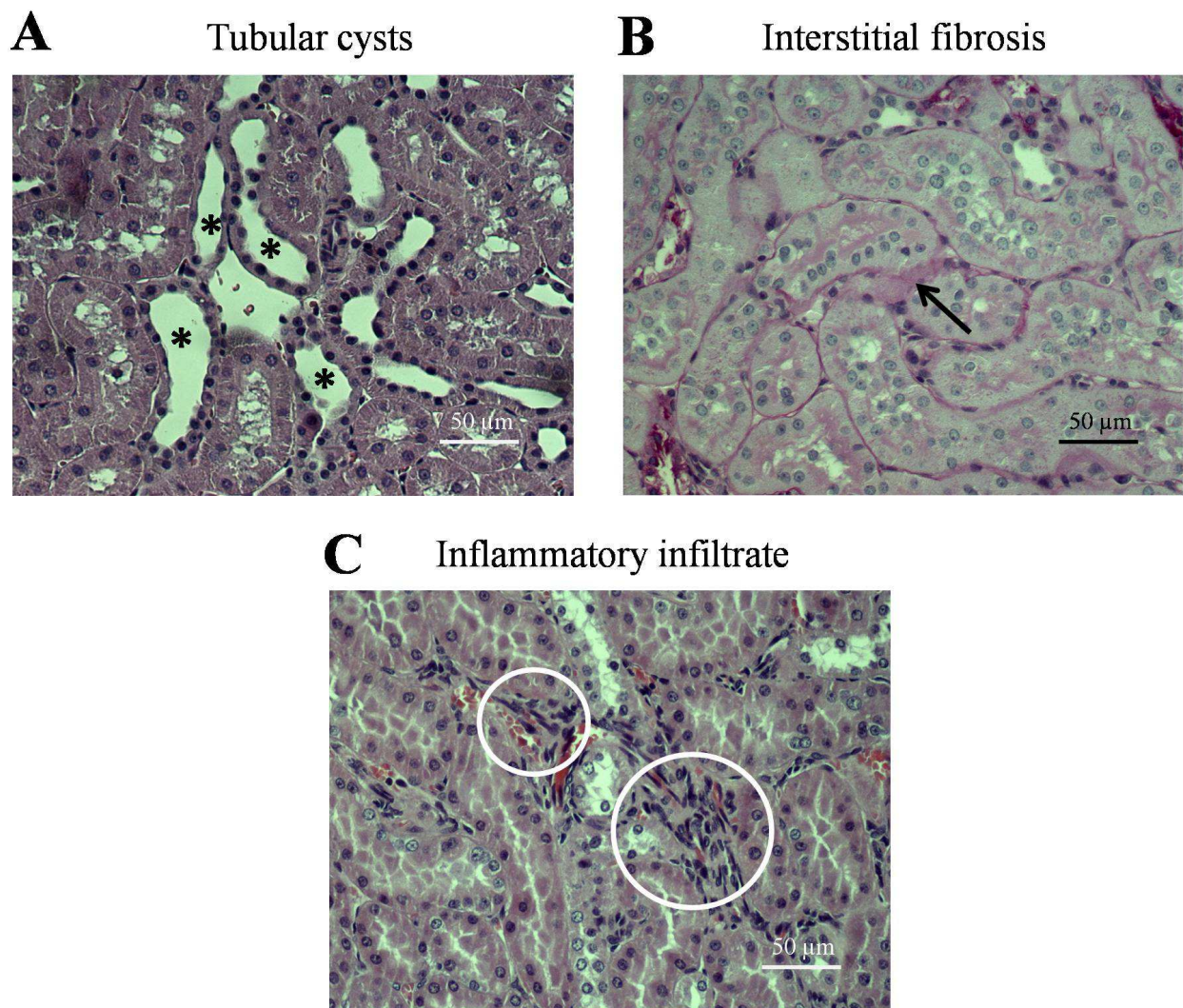


Figure 35. A.- Tubular cysts lesions of DN+ASCs-SH sample in H&E X200: Black asterisks. B.- Interstitial fibrosis lesion of DN+ASCs-CN sample in PAS X200: Black arrow. C.- Inflammatory infiltrate lesion of DN+ASCs-DN sample in H&E X200: White circles.

Lesion	C+P	DN+P	DN+ASCs-CN	DN+ASCs-CH	DN+ASCs-DN	DN+ASCs-DH
Mesangial expansion	0.19±0.13	1.6±0.1	0.72±0.28	0.55±0.14	0.88±0.14	0.77±0.1
Mesangiolytic	0.11±0.08	1.85±0.15	0.61±0.18	0.5±0.0	0.77±0.17	0.68±0.13
Microaneurysm	0.11±0.08	1.7±0.23	0.67±0.25	0.5±0.0	0.72±0.15	0.68±0.14
Glomerulomegaly	0.11±0.08	1.7±0.21	0.72±0.09	0.2±0.08	0.66±0.19	0.63±0.1
Signs of ATN	0.08±0.05	1.2±0.17	0.39±0.22	0.15±0.08	0.55±0.15	0.36±0.12
Tubular eosinophilic deposits	0.11±0.08	1.1±0.2	0.39±0.23	0.5±0.0	0.05±0.05	0.54±0.16
Clear cell changes	0	2.3±0.15	1±0.19	0.55±0.05	1.11±0.07	0.95±0.23
TTBM	0.08±0.05	1.2±0.13	0.83±0.2	0.25±0.11	0.66±0.16	0.45±0.12
Tubular cysts	0.15±0.12	1.3±0.21	0.72±0.27	0.3±0.08	1.22±0.17	0.36±0.12
Interstitial fibrosis	0.04±0.04	0.9±0.3	0.44±0.25	0	0.05±0.05	0.27±0.12
Inflammatory infiltrate	0.11±0.08	0.55±0.24	0.72±0.19	0	0.5±0.17	0.36±0.12

Table 14. The semiquantitative morphological analysis: Acute tubular necrosis (ATN), Thickening of tubular basement membrane (TTBM). Data represents mean±SEM.

2.3. Ultrastructure of renal tissue

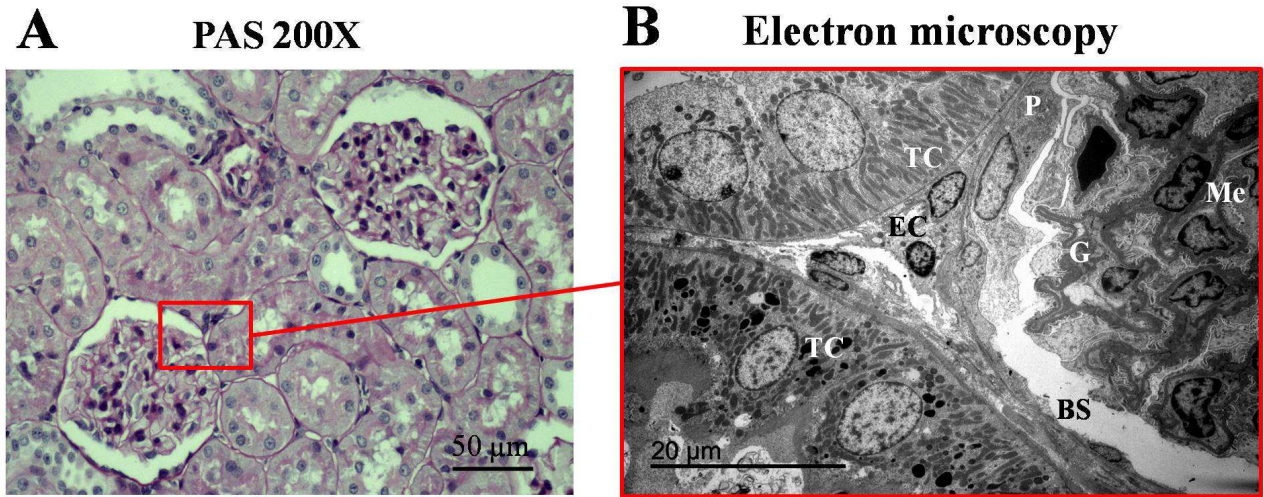


Figure 36. Ultrastructure of healthy renal tissue (C+P): A.- **Optical microscopy:** No alterations in renal morphology in PAS staining X200. B.- **Transmission electron microscopy:** X1,500. Podocyte (P), Tubular cell (TC), Endothelial cell (EC), Glomerulus (G), Bowman's space (BS), Mesangium (Me).

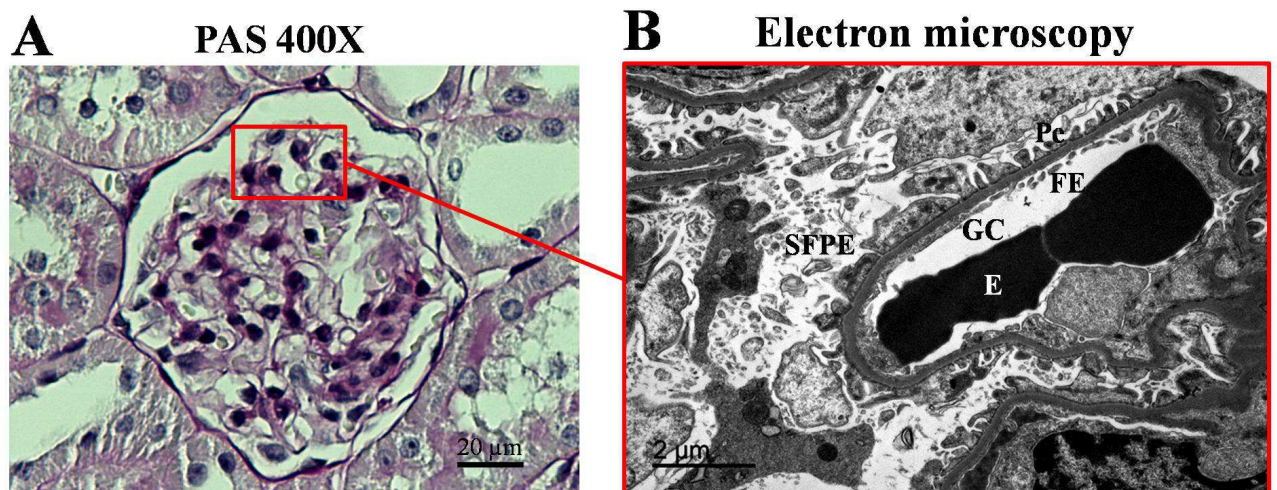


Figure 37. Ultrastructure of DN renal tissue: A.- **Optical microscopy** ND rat glomerulus (DN+P) in PAS staining X400. B.- **Transmission electron microscopy:** X8,000. Pedicels (Pe), Segmental foot process effacement (SFPE), Fenestrated endothelium (FE), Glomerular capillary (GC), Erythrocyte (E).

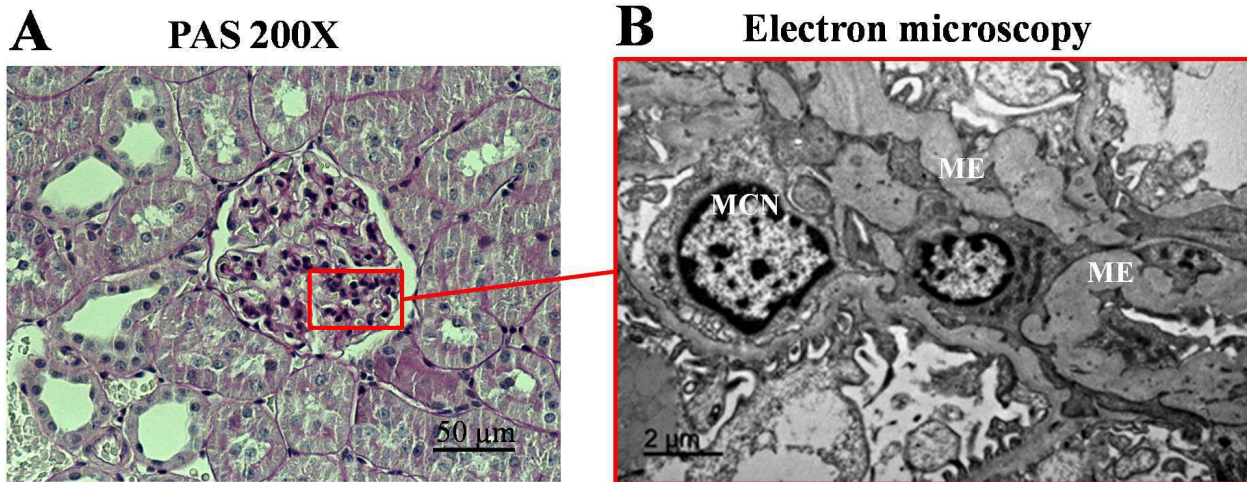


Figure 38. Ultrastructure of mesangial expansion in ND rat: A.- Optical microscopy: DN rat glomerulus (DN+P) in PAS staining X200. B.- Transmission electron microscopy: X9,000. Mesangial cell nucleus (MCN), Mesangial expansion (ME).

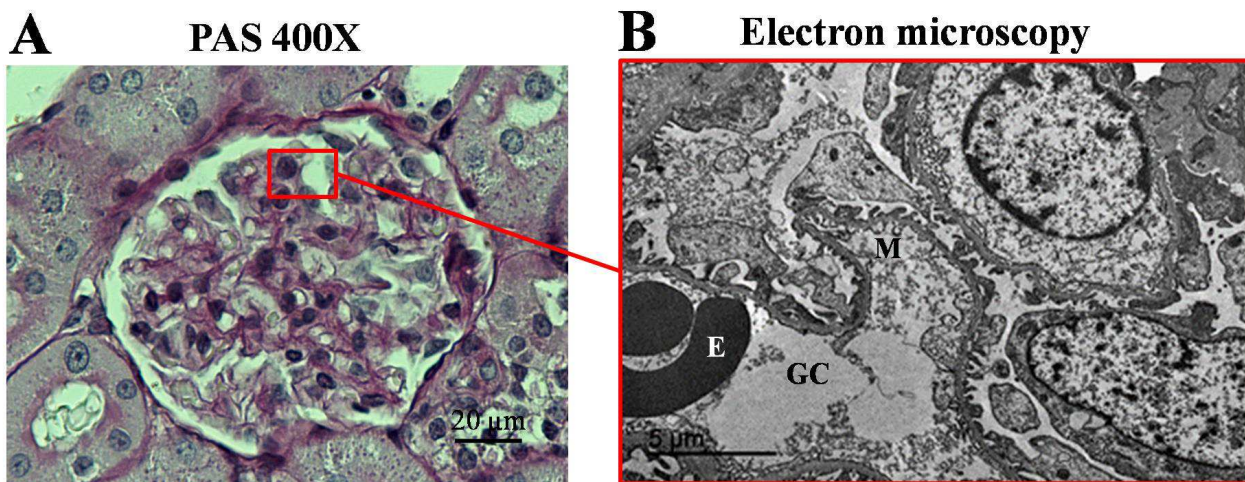


Figure 39. Ultrastructure of microaneurysm in ND rat: A.- Optical microscopy: DN rat glomerulus (DN+ASCs-CH) in PAS staining X400. B.- Transmission electron microscopy: X8,000. Microaneurysm (M), Erythrocyte (E), Glomerular capillary (GC).

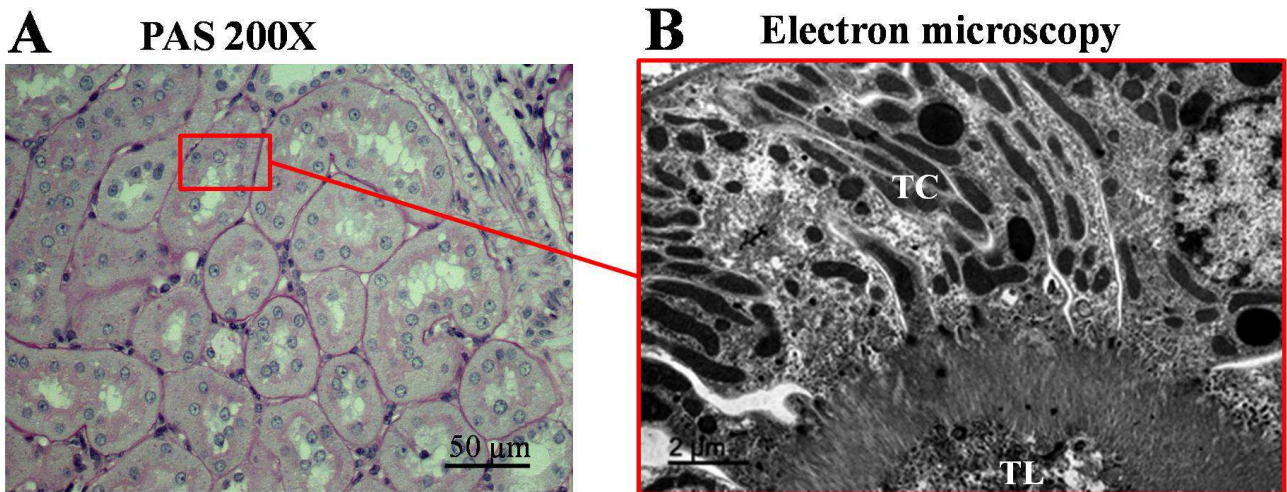


Figure 40. Ultrastructure of acute tubular necrosis (ATN) in DN rat: A.- Optical microscopy: Renal tubules DN rat (DN+ASCs-CN) in PAS staining X200. **B.- Transmission electron microscopy:** X6,900. Tubular cell (TC), Tubular lumen (TL).

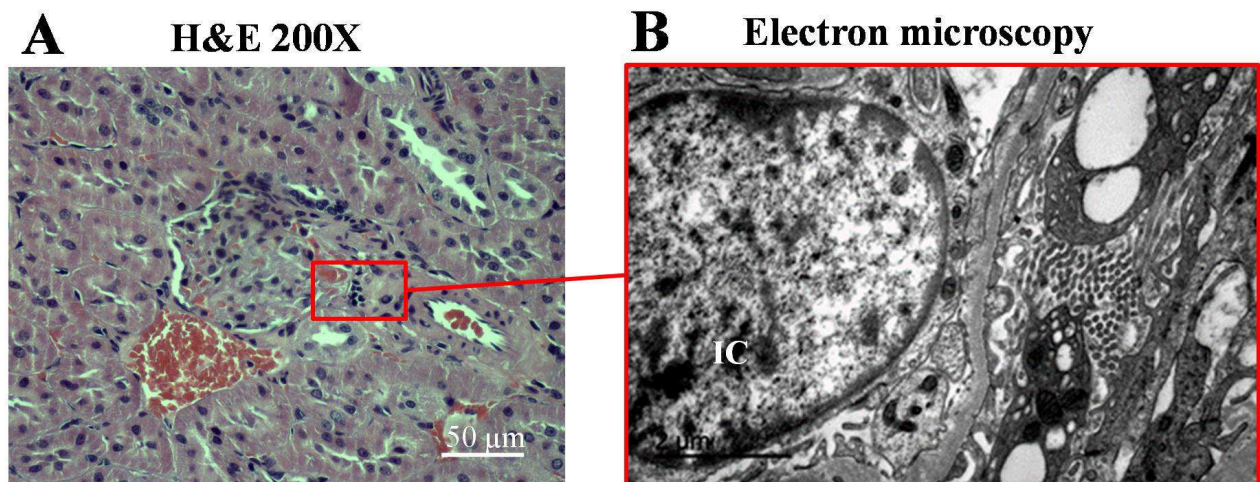


Figure 41. Ultrastructure of inflammatory infiltrate in ND rat (ND+ASCs-DN): A.- Optical microscopy: Inflammatory infiltrate DN rat (DN+ASCs-DN) in H&E staining X200. **B.- Transmission electron microscopy:** X15,000. Inflammatory cell (IC).

ANEXO 2

Lista de genes por término enriquecido o infrarrepresentado

1. Términos enriquecidos grupo 1 (ASCs-CH vs. ASCs-CN).

Término	Genes
Hélice transmembrana	PCDHA2, GRIK3, ATP1B4, OLR1445, OLR259, CNGB1, LTC4S, INSRR, OLR611, OLR1399, OLR1393, PTGES, CXCR4, OLR1407, OLR657, SLC35D3, NSG1, ESAM, SLC51A, KLRD1, MLANA, SPN, KCNG2, KLRB1, MRGPRB4, C5AR2, C2CD2, CCKBR, CMKLR1, CAR12, TAAR8A, SPINT1, OLR1020, CECR6, BTNL5, OLR1169, VOM1R83, SSTR4, VOM2R-PS45, LHFPL4, SLC26A5, KLRG2, PGR15L, HAS1, AGTR1A, TMEM106A, OLR1490, OLR507, OLR1748, PIANP, OLR84, PTH1R, MRAP2, ABCA4, FXYD6, OLR1461, FAM19A5, OLR1229, MPPE1, VOM2R19, RGD1561145, OPALIN, HRH4, LRRTM1, OLR285, CD2, OLR828, OLR1278, ADRA2B, OACYL, ATP8B5P, SLC39A2, OLR80, FCER1A, FAM26E, NDUFA4L2, SLC12A5, MYADML2, OC90, EPHA5, ABCC9, CLGN, TMEM8B, KCNJ8, TMEM163, DSG3, NTRK1, CEND1, TMEM89, NXPE2
Transmembrana	PCDHA2, GRIK3, ATP1B4, OLR1445, OLR259, CNGB1, LTC4S, INSRR, OLR611, OLR1399, OLR1393, PTGES, CXCR4, OLR1407, OLR657, SLC35D3, NSG1, ESAM, SLC51A, KLRD1, MLANA, SPN, KCNG2, KLRB1, MRGPRB4, C5AR2, C2CD2, CCKBR, CMKLR1, CAR12, TAAR8A, SPINT1, OLR1020, CECR6, BTNL5, OLR1169, VOM1R83, SSTR4, VOM2R-PS45, LHFPL4, SLC26A5, KLRG2, PGR15L, HAS1, AGTR1A, TMEM106A, OLR1490, OLR507, OLR1748, PIANP, OLR84, PTH1R, MRAP2, ABCA4, FXYD6, OLR1461, FAM19A5, OLR1229, MPPE1, VOM2R19, RGD1561145, OPALIN, HRH4, LRRTM1, OLR285, CD2, OLR828, OLR1278, ADRA2B, OACYL, ATP8B5P, SLC39A2, OLR80, FCER1A, FAM26E, NDUFA4L2, SLC12A5, MYADML2, OC90, EPHA5, ABCC9, CLGN, TMEM8B, KCNJ8, TMEM163, DSG3, NTRK1, CEND1, TMEM89, NXPE2
Membrana	GRIK3, ATP1B4, OLR259, CNGB1, OLR1407, OLR657, NSG1, SLC51A, GNG4, KLRD1, SPN, KLRB1, MRGPRB4, C5AR2, C2CD2, MAGI1, TAAR8A, OLR1020, CECR6, OLR1169, SSTR4, LHFPL4, HAS1, AGTR1A, PGR15L, TMEM106A, OLR1490, OLR507, OLR1748, PTH1R, MRAP2, ABCA4, FXYD6, FAM19A5, OLR1461, VOM2R19, OPALIN, OLR285, NDRG1, ADRA2B, FCER1A, NDUFA4L2, MYADML2, EPHA5, CLGN, TMEM8B, DSG3, KCNJ8, NTRK1, CEND1, TMEM89, NXPE2, PRX, PCDHA2, CYP11B2, OLR1445, LTC4S, INSRR, OLR611, MBP, OLR1399, OLR1393, PTGES, CXCR4, MAPT, SLC35D3, ESAM, LBP, DLG2, MLANA, KCNG2, CCKBR, CMKLR1, CAR12, DHRS9, SPINT1, BTNL5, VOM1R83, VOM2R-PS45, SLC26A5, KLRG2, CNTN1, PIANP, OLR84, OLR1229, MPPE1, RGD1561145, HRH4, LRRTM1, CD2, OLR828, OLR1278, OACYL, ATP8B5P, SLC39A2, OLR80, FAM26E, SLC12A5, OC90, ABCC9, TMEM163, LIPI
GO:0005912~Unión adherente	EPHA5, MTSS1, MAGI1, ESAM, PIANP
GO:0016021~Componente integral de la membrana	OLR84, OLR1445, OLR259, OLR1461, OLR611, OLR1229, OLR1399, OLR1393, OLR1407, CXCR4, OLR657, OLR285, HRH4, OLR828, OLR1278, ADRA2B, OLR80, MRGPRB4, C5AR2, CCKBR, CMKLR1, TAAR8A, OLR1020, OLR1169, SSTR4, PGR15L, AGTR1A, OLR1490, OLR507, OLR1748
IPR000276~Receptor acoplado a proteína G, similar a la rodopsina	PCDHA2, GRIK3, OLR1445, OLR259, LTC4S, OLR611, OLR1399, OLR1393, PTGES, CXCR4, OLR1407, SLC35D3, OLR657, NSG1, ESAM, SLC51A, KLRD1, MLANA, SPN, KCNG2, KLRB1, C5AR2, C2CD2, CCKBR, CMKLR1, CAR12, TAAR8A, SPINT1, OLR1020, CECR6, BTNL5, OLR1169, VOM1R83, VOM2R-PS45, LHFPL4, KLRG2, PGR15L, AGTR1A, TMEM106A, OLR1490, CHST9, OLR507, OLR859, OLR1748, PIANP, OLR84, MRAP2, FXYD6, OLR1461, FAM19A5, OLR1229, MPPE1, VOM2R19, RGD1561145, OPALIN, HRH4, LRRTM1, OLR285, CD2, OLR828, OLR1278, ADRA2B, OACYL, ATP8B5P, SLC39A2, OLR80, FCER1A, NDUFA4L2, MYADML2, OC90, EPHA5, ABCC9, CLGN, TMEM8B, KCNJ8, DSG3, CEND1, TMEM89, NXPE2

2. Términos infrarrepresentados grupo 1 (ASCs-CH vs. ASCs-CN).

Término	Genes
GO:0007059~Segregación cromosómica	CENPN, SPC25, NEK2, SKA3, ESCO2, BRCA1
GO:0009615~Respuesta a virus	BST2, RSAD2, CDK6, OAS1A, TLR9, CXCL10
GO:0051607~Respuesta antiviral	NLRC5, BST2, RSAD2, OAS1A, TLR9, CXCL10
GO:0000794~Cromosoma nuclear condensado	NEK2, CHEK1, BRCA1, RAD51
GO:0000785~Cromatina	OIP5, CHEK1, ESCO2, DSCC1, RAD51
GO:0010212~Respuesta a la radiación ionizante	STAR, RAD54L, BRCA1, RAD51
GO:0005524~Unión al ATP	NEK2, MSH5, CHEK1, CDK6, PBK, MAPK10, RAD54L, RAD51, P2RX5, NLRC5, ABCC4, DYRK3, OAS1A, ORC1

3. Los 12 términos más enriquecidos grupo 3 (ASCs-DN vs. ASCs-CN).

Término	Genes
Enlace disulfuro	IL1R2, SUS2, CSPG4, GJA1, CX3CL1, GREM1, NETO1, IGSF10, ISLR, LAMB3, ACAN, DEFB13, TNN, NT5E, RT1-T24-4, HYAL1, CNTN6, GABRA3, SLC3A1, COLEC11, LAMA2, SIGLEC1, ADRB2, P2RX6, GPR37, C1RL, CNTN2
GO:0016324~Membrana plasmática apical	FAM65B, KCNN4, ADRB2, UPK1B, ANO1, CSPG4, GJA1, UPK3A, AQP1
GO:0030308~Regulación negativa del crecimiento celular	LOC100302465, HYAL1, RRAD, GJA1, GREM1, SESN1
IPR003961~Fibronectina tipo III	LRRN4CL, IL20RB, LRRN4, CNTN6, CNTN2, TNN, NDNF
IPR013783~Dominio similar a inmunoglobulina	IL1R2, LRRN4CL, LRRN4, CNTN6, NDNF, ISLR, IGSF10, SIGLEC1, IL20RB, ACAN, CNTN2, TNN, RT1-T24-4
Señal	IL1R2, CTF2, SUS2, CSPG4, CX3CL1, GREM1, FXD6, NETO1, IGSF10, ISLR, LAMB3, TAP2, SLC24A1, ACAN, DEFB13, TNN, PI16, NT5E, HYAL1, LRRN4, CNTN6, GABRA3, OLFML2A, COLEC11, UPK3A, LAMA2, SIGLEC1, RNF150, GPR37, IL20RB, ZG16, CNTN2, C1RL
Dominio topológico: Extracelular	IL1R2, GABRA3, CSPG4, GJA1, MRGPRF, SLC3A1, CX3CL1, AQP1, FXD6, GGT5, ADRB2, P2RX6, GPR37, LTB4R, SLC24A1, UPK1B
Glicosilación N-ligado (GlcNAc,,)	HYAL1, IL1R2, GABRA3, CNTN6, CSPG4, MRGPRF, SLC3A1, CX3CL1, GREM1, AQP1, IGSF10, GGT5, ADRB2, P2RX6, GPR37, LTB4R, SLC24A1, ACAN, CNTN2, C1RL, NT5E
GO:0005887~Componentes integrales de la membrana plasmática	SLC7A15, LRRN4, SLC16A12, CSPG4, GJA1, MRGPRF, SLC3A1, AQP1, TLR7, ADRB2, P2RX6, LTB4R, SLC24A1, UPK1B
mo04512~Interacción MEC-receptor	LAMA2, LAMB3, COL6A3, TNN, COL24A1
SM00060:FN3	LRRN4CL, LRRN4, CNTN6, CNTN2, TNN, NDNF
Glicoproteína	HYAL1, IL1R2, GABRA3, CNTN6, B3GALT4, CSPG4, MRGPRF, SLC3A1, CX3CL1, GREM1, AQP1, IGSF10, GGT5, ADRB2, P2RX6, GPR37, LTB4R, SLC24A1, UPK1B, ACAN, CNTN2, C1RL, NT5E

4. Los 12 términos más infrarrepresentados grupo 3 (ASCs-DN vs. ASCs-CN).

Término	Genes
Región de interés: Unión del ligando	AR, NR4A2, NR4A1, RORB, NR4A3
GO:0007623~Ciclo circadiano	EGR1, ID2, ID1, SFTPC, PER1, RORB, ID4, BHLHE40
GO:0045944~Regulación positiva de la transcripción del promotor de la ARN polimerasa II	EGR1, AR, ZBTB7C, EGR4, SOX11, ABLIM3, ARID5A, CCNL1, NR4A2, ARID3A, NR4A1, GRHL3, NR4A3, MYBL2, DOT1L, ATF3, SGSM1, CSRNP1, VEGFA, PER1, ID4, FOSL1, BMP5
GO:0030522~Receptor intracelular de la vía de señalización	AR, NR4A2, NR4A1, RORB, NR4A3
IPR003070~Receptor nuclear huérfano	NR4A2, NR4A1, NR4A3
GO:0004879~Actividad del factor de transcripción ARN polimerasa II, secuencia específica de unión al ADN, activación del ligando	AR, NR4A2, NR4A1, RORB, NR4A3
IPR026052~Inhibidor de la proteína de unión al AND	ID2, ID1, ID4
GO:0071376~Respuesta celular a la corticotropina	NR4A2, NR4A1, NR4A3
Ciclos biológicos	ID2, ID1, PER1, RORB, BHLHE40, SIK1
Dedo de zinc: Tipo NR C4	AR, NR4A2, NR4A1, RORB, NR4A3
Unión al ADN: Receptores nucleares	AR, NR4A2, NR4A1, RORB, NR4A3
GO:0043153~Cambios del ciclo circadiano mediados por el fotoperiodo	ID2, PER1, BHLHE40, SIK1

5. Los 12 términos más enriquecidos grupo 4 (ASCs-DH vs. ASCs-CH).

Término	Genes
Dominio topológico: Citoplasma	ADCY3, F2RL3, ADCY4, TAAR7B, SLC9A3, TNFSF15, LPAR3, SYT6, CDH20, GRIN2C, GALR3, RPN1, CREB3L4, PTGDRL, CDHR1, HTR4, PROKR1, MRGPRF, PIK3IP1, NTSR2, TMEM132D, IGSF6, CRHR2, CCR5, PDGFRA, GGCX, C3AR1, IL1R2, FGFR4, ERBB3, DRD5, KCNJ2, ATP12A, FXYD6, P2RY6, UPK1B, CNR2, SREBF1, GPR156, GABRA2, GABRA1, GABRA3, IL1RL2, TGFBR2, GRIN1, MRC2, ABCB4, ABCG2, P2RX5, NOTCH3, EPHA5, GGT5, OLR1867, SLC4A10, EPHA6, P2RX6, GPR37, KCNJ9, CHRN4, NKR-P1C, CACNA1E, CHRN2, CACNA1D, CLCN4, ATP7B, CCKAR, GPR85, LDLR, CLDN3, CD8B, CLSTN1, ATL3, GJA1, TAS1R3, LTC4S, KCNK13, STRA6, CNTNAP1, ANO7, SV2C, KCNMA1, NRXN3, TRPM7, MMP16, SLC3A1, M6PR, GRM1, ACVR2A, GRM2, KCNH3, TM4SF4, CR1L, LCT, AOC3, AVPR2, ECEL1, GALNT7, CSF1, GALNT5, RHBG, GJC2, GPR3, MIP, FAT3, TAP2, TAP1, SLC4A8, KCNE2, SCNN1B, C1GALT1, IL2RB, GIMAP5, FLT4, NFASC, FADS2, NLGN3, ITPR3, NIACR1, ITPR2, SLC18A3, HTR2B
Dominio topológico: Extracelular	ADCY4, F2RL3, TAAR7B, SLC9A3, TNFSF15, LPAR3, CDH20, GRIN2C, GALR3, CDHR1, PTGDRL, HTR4, MRGPRF, PROKR1, PIK3IP1, NTSR2, TMEM132D, IGSF6, CRHR2, CCR5, PDGFRA, C3AR1, IL1R2, FGFR4, ERBB3, DRD5, KCNJ2, FXYD6, P2RY6, CNR2, UPK1B, GPR156, GABRA2, GABRA1, GABRA3, IL1RL2, GRIN1, TGFBR2, MRC2, ABCG2, EPHA5, NOTCH3, P2RX5, GGT5, SLC4A10, OLR1867, P2RX6, EPHA6, KCNJ9, GPR37, CHRN4, CHRN2, NKR-P1C, CACNA1E, CACNA1D, ATP7B, CCKAR, GPR85, LDLR, CLDN3, CD8B, CLSTN1, GJA1, TAS1R3, CNTNAP1, STRA6, ANO7, SV2C, KCNMA1, TRPM7, NRXN3, MMP16, SLC3A1, GRM1, ACVR2A, GRM2, TM4SF4, LCT, CR1L, AOC3, AVPR2, CSF1, RHBG, GJC2, GPR3, MIP, FAT3, SLC4A8, SCNN1B, IL2RB, GIMAP5, FLT4, NFASC, NLGN3, ITPR3, NIACR1, ITPR2, HTR2B
rno03010:Ribosoma	RPL36A, MRPS15, RPL13, RPLP2, RPL39, RPS28, RPL7, RPL32, RPL31, RPL9, RPL8, RPL11, RPS20, RGD1561102, RPL35A, RPL24, RPS5, RPL29, RPS18, RPL23, RPL41, RPL13A, RPS17, RPL21, RPS15, RPS12, RPS10, RN5-8S
Enlace disulfuro	ASPN, F2RL3, PLXNA3, HFE2, TAAR7B, GDF7, WNT3A, PTGS1, TNFSF15, IL13, SYT6, MMP1, WNT1, SEZ6L2, GALR3, ROBO4, DEFB13, PDGFC, UNC5D, CPA1, ADAM9, F12, RET, PTGDRL, MATN1, HTR4, PROKR1, PIK3IP1, NTSR2, IGSF6, C1QB, CRHR2, CCR5, PDGFRA, RELN, ACR, GGCX, ENPP6, C3AR1, IL1R2, FGFR4, WNT5B, ERBB3, DRD5, VEGP2, RGD1561246, P2RY6, CLPSL2, FGB, IFNA4, NAGA, NPM1, ANGPTL1, AGRN, OLFM1, GABRA2, GABRA1, LY6G5B, GABRA3, IL1RL2, TGFBR2, GRIN1, MRC2, UTS2B, NTN3, ABCG2, P2RX5, NOTCH3, LAMA2, OLR1867, EPHA6, P2RX6, GPR37, LCN5, CHRN4, NKR-P1C, CACNA1E, CHRN2, CACNA1D, CCKAR, GPR85, ART2B, LDLR, REG4, CD8B, BCAN, GJA1, MMP28, INSR, DGCR2, CNTNAP1, LOXL3, SEMA3A, GPHB5, ADAM11, RT1-M5, NRXN3, CNTN6, PRG2, MMP16, SLC3A1, SEZ6L, GRM1, PROC, SIGLEC1, ACVR2A, BGN, GRM2, PROK1, CNTN2, SEMA4B, SUS4, NRG1, PRL3D4, PROS1, CR1L, AOC3, GALNT7, SPOCK2, CSF1, CD248, GALNT5, OXT, PCOLCE, ISLR, IGSF10, LINGO4, FAT3, ACAN, SLC4A8, CD6, HGFAC, C1GALT1, THBS4, FLRT1, IL2RB, LOC100912990, FLT4, AXL, NFASC, NLGN3, SPARC, SLC1A6, NIACR1, C1RL, PRSS27, IGFBP1, HTR2B

Continuación.

Término	Genes
Región transmembrana	ADCY3, F2RL3, ADCY4, TAAR7B, SLC9A3, TNFSF15, LPAR3, SYT6, CDH20, ELOVL5, GRIN2C, GALR3, RPN1, CREB3L4, PTGDRL, CDHR1, HTR4, MRGPRF, PROKR1, PIK3IP1, NTSR2, TMEM132D, IGSF6, CRHR2, CCR5, PDGFRA, TMEM184A, GG CX, C3AR1, FX YD2, IL1R2, FGFR4, SLC38A9, ERBB3, DRD5, ATP12A, KCNJ2, FX YD6, P2RY6, UPK1B, CNR2, TMEM30A, SREBF1, GPR156, GABRA2, SCD2, GABRA1, GABRA3, IL1RL2, TGFB R2, GRIN1, MRC2, ABCB4, ABCG2, P2RX5, NOTCH3, EPHA5, GGT5, SLC4A10, OLR1867, EPHA6, P2RX6, KCNJ9, GPR37, CHRN B4, NKR-P1C, CHRN B2, CACNA1E, CACNA1D, CLCN4, ATP7B, CCKAR, GPR85, LDLR, CD8B, CLDN3, CLSTN1, ATL3, GJA1, TAS1R3, LTC4S, KCNK13, SLN, STRA6, CNTNAP1, ANO7, COX6C-PS1, SV2C, DHCR24, KCNMA1, NRXN3, TRPM7, CACNG8, MMP16, SLC3A1, M6PR, GRM1, ACVR2A, GRM2, SQLE, KCNH3, LCT, TM4SF4, CR1L, AOC3, CYP51, AVPR2, ECEL1, GALNT7, HSD3B7, CSF1, GALNT5, RHBG, GJC2, GPR3, MIP, ZDHHC22, FAT3, DHCR7, TAP2, TMEM252, TAP1, SLC4A8, KCNE2, ARMCX3, SCNN1B, ARMCX6, C1GALT1, IL2RB, GIMAP5, FLT4, NFASC, FADS2, NLGN3, CYP4V3, ITPR3, SLC01A6, NIACR1, ITPR2, KCNN4, TMEM43, SLC18A3, HTR2B
Glicoproteína	ADCY3, F2RL3, ADCY4, PLXNA3, HFE2, TAAR7B, SLC9A3, B3GALT4, PTGS1, TNFSF15, LPAR3, IL13, CD48, CDH20, GRIN2C, GALR3, ROBO4, RPN1, CREB3L4, PDGFC, UNC5D, F12, RET, PTGDRL, CDHR1, HTR4, PROKR1, MRGPRF, C1QB, CRHR2, CCR5, PDGFRA, RELN, LOC100909648, ACR, ENPP6, C3AR1, IL1R2, FGFR4, SLC38A9, ERBB3, DRD5, P2RY6, KDEL C2, FGB, NAGA, UPK1B, CNR2, AGRN, OLFM1, TMEM30A, GPR156, GABRA2, GABRA1, LY6G5B, GABRA3, IL1RL2, TGFB R2, GRIN1, MRC2, ABCB4, ABCG2, P2RX5, NOTCH3, EPHA5, GGT5, OLR1867, EPHA6, P2RX6, GPR37, CHRN B4, CHRN B2, CACNA1E, CACNA1D, CCKAR, GPR85, ART2B, LDLR, REG4, NAAA, CD8B, CLSTN1, BCAN, TAS1R3, KCNK13, LOC299282, INSR, STRA6, CNTNAP1, SERPINA1, SEMA3A, ANO7, SV2C, CTBS, NRXN3, CNTN6, MMP16, SLC3A1, CACNG2, M6PR, GRM1, PROC, ACVR2A, BGN, GRM2, CNTN2, PRL3D4, PROS1, KCNH3, THEM6, TM4SF4, CR1L, AOC3, AVPR2, LOC102549542, ECEL1, CSF1, GALNT5, RHBG, PCOLCE, GPR3, IGSF10, C1QTNF6, LRRTM4, FAT3, KRT8, ACAN, KCNE2, SCNN1B, THBS4, IL2RB, FLT4, NFASC, NLGN3, SPARC, SLC01A6, PRSS27, C1RL, SLC18A3, HTR2B
Señal	GDF7, SLC9A3, PTGS1, CD48, CDH20, GRIN2C, CDH26, ADAM9, PTPRJ, F12, CDHR1, MATN1, PIK3IP1, TMEM132D, CRHR2, C1QB, PDGFRA, MILL1, ACR, IL1R2, ENPP6, ERBB3, NAGA, IFNA4, TCTN1, OLFM1, LY6G5B, IL1RL2, LAO1, TGFB R2, FOXRED2, UTS2B, SLAMF7, EMILIN3, PCDH19, LAMA2, EPHA5, NOTCH3, EPHA6, PSORS1C2, CHRN B4, CHRN B2, ART2B, LDLR, NAAA, BPIFA2F, LRRC17, TAS1R3, MMP28, LOC299282, MCF2L, INSR, FCRL3, FLT3LG, GPX3, CEACAM6, SERPINA1, GPHB5, SEMA3A, DHCR24, FGF4, LY96, PRG2, MMP16, GRM1, CSN1S1, BGN, GRM2, LOC100364523, IL20RB, PROK1, SEMA4B, PRL3D4, PLA2G3, FKBP10, CR1L, THEM6, RGD1559588, CSF1, OXT, PCDHB10, PCOLCE, LRRC38, IGSF10, CCL22, COL6A6, LRRTM4, FAT3, SPAG11B, COL6A4, SERPINC1, HGFAC, THBS4, LRRN4, AXL, NLGN3, PRSS27, F2RL3, PLXNA3, HFE2, WNT3A, IL13, MMP1, TLR9, TAPBP, GP9, APOA4, WNT1, SEZ6L2, IDS, PGLYRP4, RPN1, ROBO4, DEFB13, UNC5D, PDGFC, CPA1, CSN1S2B, RET, BPIFA3, KRTDAP, RGD1560398, IGSF6, GNS, DEFA9, LYNX1, PRCP, RELN, DEFB24, CD300LB, TMEM210, FGFR4, WNT5B, BPIFB2, GSAP, VEGP2, ASTN2, ITGB3, FX YD6, KDEL C2, FOLR2, CLPSL2, FGB, B3GNT4, SFTA2, ANGPTL1, GABRA2, GABRA1, GABRA3, GRIN1, MRC2, NTN3, RNF150, GPR37, THSD1, LCN5, DOXL1, LOC688126, CD8B, REG4, CLSTN1, BCAN, PDCD1, DGCR2, CNTNAP1, LOXL3, CTBS, CSF2RA, RT1-M5, CNTN6, NRXN3, CYP2T1, LOC100909505, SEZ6L, SIGLEC15, FCAMR, M6PR, PROC, IFNAR1, SIGLEC1, ACVR2A, RGD1559532, CNTN2, PROS1, LCT, LOC688335, SPOCK2, CD248, ISLR, C1QTNF6, TAP2, TAP1, ACAN, CD6, RNASE13, DPT, LOC100912990, IL2RB, FLT4, NFASC, SPARC, RDH12, C1RL, IGFBP1

Continuación.

Término	Genes
Glicosilación N-ligado (GlcNAc,,)	ADCY3, F2RL3, ADCY4, HFE2, TAAR7B, SLC9A3, PTGS1, TNFSF15, LPAR3, IL13, CD48, CDH20, GRIN2C, GALR3, ROBO4, RPN1, PDGFC, CREB3L4, PTGDRL, CDHR1, HTR4, PROKR1, MRGPRF, CRHR2, PDGFRA, RELN, ACR, C3AR1, IL1R2, FGFR4, ERBB3, DRD5, CIART, P2RY6, KDELC2, FGB, NAGA, CNR2, AGRN, OLFM1, TMEM30A, GPR156, GABRA2, GABRA1, LY6G5B, GABRA3, IL1RL2, TGFBR2, GRIN1, MRC2, ABCB4, ABCG2, P2RX5, NOTCH3, EPHA5, GGT5, OLR1867, EPHA6, P2RX6, GPR37, CHRN4, CACNA1E, CHRN2, CACNA1D, CCKAR, GPR85, ART2B, LDLR, NAAA, CD8B, REG4, CLSTN1, BCAN, TAS1R3, KCNK13, LOC299282, INSR, STRA6, CNTNAP1, SERPINA1, SEMA3A, SV2C, CTBS, NRXN3, CNTN6, MMP16, SLC3A1, M6PR, GRM1, PROC, ACVR2A, GRM2, BGN, CNTN2, PRL3D4, KCNH3, PROS1, TM4SF4, CR1L, THEM6, AOC3, AVPR2, ECEL1, CSF1, GALNT5, RHBG, PCOLCE, GPR3, IGSF10, C1QTNF6, FAT3, ACAN, KCNE2, SCNN1B, THBS4, IL2RB, FLT4, NFASC, NLGN3, SPARC, SLC18A3, PRSS27, C1RL, SLC18A3, HTR2B
Enlace disulfuro	F2RL3, CCKAR, GPR85, ART2B, TAAR7B, LDLR, CD8B, REG4, PTGS1, TNFSF15, BCAN, GJA1, IL13, INSR, GALR3, ROBO4, DEFB13, PDGFC, CNTNAP1, SEMA3A, CPA1, NRXN3, CNTN6, PTGDRL, PRG2, HTR4, PROKR1, MMP16, PIK3IP1, NTSR2, GRM1, PROC, IGSF6, CRHR2, ACVR2A, C1QB, BGN, CCR5, PROK1, CNTN2, PDGFRA, RELN, PRL3D4, NRG1, PROS1, CR1L, AOC3, GGCX, ACR, IL1R2, C3AR1, FGFR4, GALNT7, ERBB3, OXT, GALNT5, DRD5, VEGP2, PCOLCE, IGSF10, P2RY6, FAT3, FGB, NAGA, ACAN, AGRN, OLFM1, THBS4, GABRA2, IL2RB, GABRA1, LY6G5B, GABRA3, FLT4, IL1RL2, GRIN1, MRC2, TGFBR2, NFASC, UTS2B, NLGN3, SPARC, NIACR1, ABCG2, NOTCH3, OLR1867, GPR37, LCN5, CHRN4, PRSS27, C1RL, NKR-P1C, CHRN2, IGFBP1, HTR2B
Proteína ribosomal	RPL36A, MRPS33, MRPS15, RPL13, RPLP2, RPL39, RPS28, RPL7, RPL32, RPL31, RPL9, RPL8, RPL11, RPS20, RGD1561102, RPL35A, RPL24, RPS5, RPL29, RPS18, RPL23, RPL41, RPL13A, RPS17, RPL21, RPS15, RPS12, RPS10
Péptido señal	F2RL3, HFE2, PTGS1, IL13, APOA4, CD48, CDH20, GRIN2C, RPN1, ROBO4, DEFB13, PDGFC, CPA1, CSN1S2B, CDHR1, KRTDAP, PIK3IP1, TMEM132D, IGSF6, C1QB, CRHR2, PDGFRA, RELN, ACR, IL1R2, FGFR4, ERBB3, CIART, VEGP2, FXYD6, KDELC2, FGB, NAGA, AGRN, OLFM1, GABRA2, GABRA1, LY6G5B, GABRA3, IL1RL2, TGFBR2, GRIN1, MRC2, UTS2B, EPHA5, NOTCH3, EPHA6, GPR37, LCN5, CHRN4, CHRN2, ART2B, LDLR, NAAA, CD8B, REG4, BPIFA2F, CLSTN1, BCAN, TAS1R3, LOC299282, INSR, GPX3, CNTNAP1, SERPINA1, SEMA3A, CTBS, DHCR24, NRXN3, CNTN6, PRG2, MMP16, GRM1, CSN1S1, M6PR, PROC, ACVR2A, GRM2, BGN, PROK1, CNTN2, PRL3D4, PROS1, CR1L, THEM6, LCT, OXT, CSF1, PCOLCE, IGSF10, C1QTNF6, FAT3, ACAN, RNASE13, THBS4, IL2RB, FLT4, NFASC, NLGN3, SPARC, C1RL, PRSS27, IGFBP1

6. Los 12 términos más infrarrepresentados grupo 4 (ASCs-DH vs. ASCs-CH).

Término	Genes
GO:0045944~Regulación positiva de la transcripción del promotor de la ARN polimerasa II	BACH1, MITF, ARID4B, ZEB2, HSPH1, NOD2, POU5F1, IL1B, POU4F1, YAP1, FGF1, WWOX, EGR1, EGFR, EGR2, EGR4, MTA2, OTX1, ARID5A, CCNL1, GRHL3, FOSB, NLRP3, PROX1, JUNB, HES1, HHEX, MSX1, VEGFA, KDM6B, CSF3, CCL3, CREM, SOX2, NFKBIA, SOX4, DUXBL1, LIF, BCL11B, JUND, PTH, ZC3H12A, PER1, BCAS3, NFATC2, MAF, MAFG, KLF6, IL6, IKZF3, EPAS1, KLF13, NR4A2, AHI1, NR4A1, TEAD1, NR4A3, CENPK, MAFK, ZFP746, DOT1L, MEF2D, ATF3, ETS1, CSRNP1, DLX5, GSK3B, ATXN7, HEYL, ID4, BMP5, NHLH1
GO:0000122~Regulación negativa de la transcripción del promotor de la ARN polimerasa II	BACH1, CDX2, MITF, ZEB2, POU5F1, IL1B, POU4F1, SIK1, NFIL3, EGR1, BATF3, ZFP36, MTA2, MXD1, PROX1, JUNB, HES1, HHEX, MSX1, BTG2, VEGFA, MDM4, USP2, SOX2, SUFU, NRARP, PTH, JUND, PER1, SKIL, PER3, BHLHE40, NFATC2, MAF, AEBP2, TBX3, EPAS1, KLF11, SAMD11, NR4A2, NR4A3, ZFP746, FNIP1, PLK3, ATF3, ID2, ID1, IRF8, HEYL, ID4, RBM15
GO:0005634~Núcleo	LDHC, DLC1, CDX2, PTGS2, ATP1B4, FGF13, LOC102550416, LOC681766, MUTYH, DDX11, PRKACB, TFPI2, MTUS1, WWOX, EGFR, RBFOX2, TNK1, CSNK1G1, DTL, MTA2, FMR1, ENC1, PIM1, PKIB, GRHL3, CDKL3, PROX1, FOXN3, JUNB, PTHLH, HES1, HHEX, MSX1, BAZ1B, VEGFA, HSPB2, TNFAIP3, UNCX, CYP1B1, EID3, NFKBID, MIPOL1, SOX2, BEX1, SOX4, BEX2, NFKBIA, PXX, TIMP3, ZMYND8, TP53TG5, ZFP819, NUMB, JUND, SKIL, SSSX2IP, BHLHE40, LHX8, OLFM2, HAP1, NOVA1, MAFG, KLF6, AEBP2, PELI1, IKZF3, TESB, EPAS1, KLF10, SPHK1, NR4A2, NR4A1, TEAD1, NR4A3, MAFK, AK6, KDR, TRIM55, SYNE1, ATF3, PLK3, RGS2, DMRTC2, ETS1, DLX5, CSRNP1, HIVEP3, RGS8, BACH1, FOXK1, CPEB2, NUA1, LYAR, MITF, ARID4B, BAP1, SHOC2, ZEB2, CXADR, HSPH1, TYR, POU5F1, TGFA, ATP8B2, POU4F1, YAP1, NFIL3, FGF1, SIK1, ERFFI1, INO80D, KDM5C, BATF3, EGR1, ZFP36, NFKBIZ, EGR3, EGR2, SOX13, EGR4, RBM46, OTX1, ARID5A, CCNL1, PRKCG, FOSB, NLRP3, SPDYA, ZFP655, ZFAND2A, NPPB, PHF11B, BRDT, TXNRD1, MDM4, KDM6B, ARL4A, SUPT3H, YWHAZ, USP2, CREM, TIPARP, TH, SMTNL1, DUXBL1, SUFU, MLF1, TRIB1, ALDH1A1, ZFP36L2, TSPYL2, CENPA, BCL2, BCL11B, CAMK2D, SPATA2, ZC3H12A, PER1, FAM71A, ZFP521, PER3, NFATC2, BCAS3, VPS36, MAF, BRD1, ERG, ADARB1, TBX3, SAMD11, CBL, LOC103694554, AFF3, RCAN1, CENPK, DUSP5, DOT1L, MEF2D, SH3BP4, ID2, ID1, GSK3B, ATXN7, HEYL, IRF8, ID4, TSSK4, RBM15, NHLH1
Núcleo	MORF4L1, CDX2, ATP1B4, FGF13, ITPKC, CIAPIN1, MUTYH, DDX11, PRKACB, MTUS1, RPP25, RBFOX2, MTA2, FMR1, PIM1, CDKL3, JUNB, HES1, PTHLH, HHEX, MSX1, HSPB2, UNCX, EID3, BEX1, NFKBIA, BEX2, BCL2L1, TFEC, JUND, BHLHE40, SSSX2IP, LHX8, OLFM2, NOVA1, HAP1, MAFG, KLF6, EPAS1, KLF10, SPHK1, NR4A2, TEAD1, NR4A1, NR4A3, AK6, KDR, TRIM55, PLK3, ATF3, RGS2, ETS1, DLX5, RGS8, LYAR, ARID4B, MITF, SHOC2, BAP1, ZEB2, POU5F1, POU4F1, YAP1, SIK1, FGF1, NFIL3, ERFFI1, KDM5C, ZFP36, EGR1, BATF3, EGR3, EGR2, EGR4, OTX1, CCNL1, SPDYA, ZFAND2A, BRDT, PHF11B, MDM4, ARL4A, FKBP6, USP2, CREM, LOC684797, DUXBL1, SUFU, CENPA, BCL2, CAMK2D, PER1, ZC3H12A, PER3, VPS36, PHLDA1, MAF, ERG, ADARB1, TBX3, LOC103694554, DOT1L, DUSP5, SH3BP4, MEF2D, RASL11A, ID2, ID1, GSK3B, HEYL

Continuación.

Término	Genes
GO:0006366~Transcripción del promotor de la ARN polimerasa II	BACH1, SUPT3H, SOX2, MITF, ZEB2, POU5F1, BCL11B, JUND, POU4F1, NFATC2, NFIL3, EGR1, MAFG, MAF, IKZF3, EGR2, EPAS1, KLF13, OTX1, NR4A2, NR4A1, GRHL3, NR4A3, FOSB, MAFK, JUNB, MEF2D, MSX1, ETS1, CSRNP1, DLX5, HEYL, HIVEP3, NHLH1
GO:0005737~Citoplasma	LDHC, DLC1, PTGS2, LOC102550416, CIAPIN1, ACBD6, SERPINE1, RAPGEF4, WWOX, SH3GL3, TNIK, PIM1, PIM2, PROX1, MARK1, MCPT10, HES1, MSX1, HAS1, VEGFA, BHMT, RBP1, FARS2, NFKBIA, PDK1, BCL2L1, LIF, SPATS2, OLFM2, HAP1, GIT1, KLF6, IKZF3, SPHK1, CNKSR3, ZFP746, FNIP1, KDR, SYNE1, RGS2, ETS1, DLX5, RGS8, BACH1, CPEB2, NUA1, VPS37B, SHOC2, RNF182, HSPH1, TYR, NOD2, SLMAP, FGF1, SIK1, ERRFI1, ZFP36, ARHGEF7, GZMB, GZMC, MCPT8, LRRC26, CDR2, PLEKHH2, NPPB, ARL4C, ARL4A, USP2, CREM, BDP1, TH, SMTNL1, SUFU, SEC14L1, MLF1, ZFP36L2, BCL2, SPATA2, PER1, PER3, BCAS3, AFAP1, ABCA12, FLRT2, IL6, TRIM26, AFF3, MEF2D, GSK3B, RNF19B, BAMBI, FGF13, VTN, ITPKC, TGFB2, LOC681766, PRKACB, DNAJC3, MTUS1, EGFR, RBF2, CSNK1G1, DTL, ENC1, FMR1, PKIB, GRHL3, CDKL3, PTHLH, HHEX, RBPM5, RASGRF1, HSPB2, TNFAIP3, ERC1, SRXN1, CCL3, EID3, SOX2, PEAK1, BEX1, SOX4, BEX2, TIMP3, ZMYND8, SBK1, TFEC, NUMB, PPIL4, SKIL, BHLHE40, CFLAR, EPAS1, FSCN3, NR4A2, NR4A1, EVL, DOCK5, AK6, TRIM55, PLK3, PLK2, BAP1, CXADR, SPRY4, MCTP2, POU5F1, CXCR4, DLG4, ATP8B2, YAP1, EGR1, EGR2, CAMK1G, TRPM7, PRKCG, MAN1A1, NLRP3, DAPK2, CEP44, ZFP655, CHRM4, TTLL10, IPO7, ZFAND2A, TXNRD1, PPP1R15A, HCRT, FKBP6, TPM3, TRIB1, ALDH1A1, TSPYL2, CCDC124, REN, CYP26B1, CAMK2D, GPSM2, ZC3H12A, RTN4RL2, NFATC2, MAF, ADARB1, CBL, SDSL, AHI1, RCAN1, RGS16, RUFY3, SH3BP4, ID2, ID1, ATXN7, LOC102553861, HEYL, SLC18A2, ID4, TSSK4
GO:0043565~Secuencia específica de unión al ADN	CDX2, FOXK1, CREM, SOX2, POU5F1, BCL2, BCL11B, JUND, POU4F1, NFATC2, LHX8, MAF, MAFG, EGR1, ERG, IKZF3, TBX3, SOX13, EPAS1, OTX1, NR4A2, NR4A1, GRHL3, NR4A3, FOSB, MAFK, NLRP3, PROX1, FOXN3, JUNB, HES1, HHEX, MSX1, DMRTC2, ETS1, CSRNP1, DLX5, HEYL, HIVEP3, KDM6B, UNCX
GO:0008284~Regulación positiva de la proliferación celular	CSF3, CSF2, CDX2, PTGS2, OSMR, PDGFA, SOX4, BCL2L1, TGFB2, LIF, NOD2, CLCF1, BCL2, TGFA, YAP1, FGF1, EGFR, IL6, IRS2, TBX3, SPHK1, PROX1, KDR, PTHLH, HES1, SPDYA, DOT1L, ATF3, ID2, ETS1, VEGFA, HBEGF, ID4, MDM4, BAMBI, TSHR, NGF

Continuación.

Término	Genes
GO:0010628~Regulación positiva de la expresión génica	CSF2, CCL3, MITF, TGFB2, LIF, POU5F1, CYP26B1, SERPINE1, ZC3H12A, IL1B, ATP8B2, POU4F1, NFATC2, NFIL3, EGR1, MAFG, MAF, IL6, AHI1, GRHL3, PLAUR, HES1, ATF3, ID2, ID1, GSK3B, VEGFA, ID4, PPP1R15A, NGF
IPR004827~ Dominio cremallera de leucina	MAF, MAFG, BATF3, BACH1, ATF3, CREM, JUND, FOSB, MAFK, NFIL3, JUNB
Regulación de la transcripción	BACH1, MORF4L1, EID3, CREM, ATP1B4, MITF, ARID4B, TFEC, JUND, PER1, POU4F1, YAP1, PER3, BHLHE40, NFIL3, VPS36, BATF3, MAF, MAFG, EGR1, KLF6, EGR3, EGR2, EPAS1, TBX3, EGR4, KLF10, CCNL1, NR4A2, LOC103694554, NR4A1, TEAD1, NR4A3, MAFK, JUNB, HES1, MEF2D, ATF3, RASL11A, BTG2, ID2, ETS1, ID1, DLX5, HEYL, BRDT, UNCX
GO:0003700~Actividad del factor de transcripción de la secuencia específica de unión al ADN	BACH1, CDX2, CREM, SOX2, MITF, SOX4, POU5F1, JUND, POU4F1, NFATC2, NFIL3, MAF, EGR1, KLF6, ERG, IKZF3, KLF7, EGR2, TBX3, EPAS1, MTA2, OTX1, KLF11, NR4A2, LOC103694554, TEAD1, GRHL3, FOSB, MAFK, ZFP746, JUNB, FOXN3, HES1, MEF2D, HHEX, ZFP655, ATF3, DMRTC2, ETS1, ID1, CSRNP1, DLX5, IRF8, HEYL, HIVEP3

ANEXO 3

1. Interacciones proteicas obtenidas con los DEGs sobreexpresados del grupo 1 (ASCs-CH vs. ASCs-CN).

Nodo 1	Nodo 2	Canales de evidencia (ECh)					Bases de datos	Minería de textos	Puntuación combinada (CS)
		Proximidad	Fusión	Incidencia simultánea	Expresión simultánea	Experimentos			
Abcc9	Kcnj8	0	0	0	0.239	0.181	0.900	0.887	0.992
Fgf18	Fgf23	0	0	0	0	0	0.900	0.524	0.950
Gng4	Cckbr	0	0	0	0.154	0.177	0.900	0	0.924
Sstr4	Hrh4	0	0	0	0	0	0.900	0.520	0.921
Agr1a	Trh	0	0	0	0	0.056	0.900	0.230	0.920
Chi311	Pglyrp1	0	0	0	0.050	0	0.900	0.218	0.919
Sstr4	Gng4	0	0	0	0.066	0.177	0.900	0	0.916
Gng4	Agr1a	0	0	0	0	0.177	0.900	0	0.914
Gng4	Hrh4	0	0	0	0	0.177	0.900	0	0.914
Cckbr	Trh	0	0	0	0	0.056	0.900	0.169	0.914
Gng4	Adra2b	0	0	0	0	0.177	0.900	0	0.914
Cyp11b2	Hsd17b3	0	0	0	0	0	0.900	0.161	0.912
Hist3h2bb	Suv39h1	0	0	0	0	0.123	0.900	0.067	0.911
Sstr4	Adra2b	0	0	0	0.049	0	0.900	0.152	0.905
Gng4	Trh	0	0	0	0.064	0	0.900	0.042	0.902
Agr1a	Cckbr	0	0	0	0	0	0.900	0.077	0.901
Hrh4	Adra2b	0	0	0	0	0	0.900	0.049	0.900
Cxcl14	Cxcr4	0	0	0	0	0.181	0.600	0.640	0.871
Gykl1	Ubqln1	0	0	0	0.334	0.210	0	0.717	0.838
Otx2	Six6	0	0	0	0.064	0.159	0	0.720	0.761
Fxyd6	Atp1b4	0	0	0	0.063	0	0	0.754	0.759
Tuba3a	Lmntd1	0	0	0	0.085	0.057	0	0.711	0.729
Myadml2	Jakmip3	0	0	0	0.063	0	0	0.717	0.723
Tuba3a	Mapt	0	0	0	0.063	0.641	0	0.221	0.715

2. Las 25 interacciones proteicas más significativas obtenidas con los DEGs subexpresados del grupo 1 (ASCs-CH vs. ASCs-CN).

		Canales de evidencia (ECh)							Puntuación combinada (CS)
Nodo 1	Nodo 2	Proximidad	Fusión	Incidencia simultánea	Expresión simultánea	Experimentos	Bases de datos	Minería de textos	
Cenpk	Cenpn	0	0	0	0.220	0.061	0.900	0.900	0.991
Tpx2	Nek2	0	0	0	0.719	0	0.900	0.484	0.984
Cenpn	Sgol2	0	0	0	0.551	0	0.900	0.113	0.956
Cenpn	Spe25	0	0	0	0.562	0	0.900	0	0.954
Rad51	Chek1	0	0	0	0.569	0.434	0	0.827	0.954
Cenpk	Spe25	0	0	0	0.557	0	0.900	0	0.953
Sgol2	Spe25	0	0	0	0.509	0	0.900	0.104	0.952
Cenpk	Sgol2	0	0	0	0.413	0	0.900	0.190	0.948
Rad51	Rad54l	0	0	0	0.444	0.685	0	0.722	0.947
Rad51	Bracl	0	0	0	0.237	0.610	0	0.815	0.940
P2ry12	Cxcl10	0	0	0	0.063	0	0.900	0.163	0.914
Cep72	Nek2	0	0	0	0.139	0	0.900	0	0.910
Acot4	Acot2	0	0	0.440	0.105	0	0.900	0.677	0.909
Cep72	Tpx2	0	0	0	0.093	0	0.900	0	0.905
Cenpn	Rangap1	0	0	0	0.063	0	0.900	0	0.902
Rangap1	Spe25	0	0	0	0.063	0	0.900	0	0.902
Cenpk	Rangap1	0	0	0	0.062	0	0.900	0	0.902
Aspm	Tpx2	0	0	0	0.882	0	0	0.194	0.901
Rangap1	Sgol2	0	0	0	0	0	0.900	0	0.900
LOC498300	Cd53	0	0	0	0	0	0.900	0	0.900
Bracl	Chek1	0	0	0	0.219	0.167	0	0.797	0.856
Aspm	Nek2	0	0	0	0.845	0.057	0	0.094	0.856
Oas1a	Rsad2	0	0	0	0.608	0	0	0.582	0.829
Pbk	Aspm	0	0	0	0.711	0.054	0	0.411	0.825

3. Interacciones proteicas obtenidas con los DEGs sobreexpresados del grupo 2 (ASCs-DH vs. ASCs-DN).

Nodo 1	Nodo 2	Canales de evidencia (ECh)							Puntuación combinada (CS)
		Proximidad	Fusión	Incidencia simultánea	Expresión simultánea	Experimentos	Bases de datos	Minería de textos	
Ntrk1	Adora2a	0	0	0	0	0.057	0.900	0.253	0.923
Hist3h2a	Hist1h3c	0	0.001	0	0.271	0.602	0	0.742	0.918
Gng4	Opn4	0	0	0	0	0.177	0.900	0	0.914
Gng4	Ffar4	0	0	0	0	0.177	0.900	0	0.914
Col6a5	Colgalt2	0	0	0	0	0.136	0.900	0	0.909
Gng4	Pik3cg	0	0	0	0	0.057	0.900	0	0.901
Gng4	Oxgr1	0	0	0	0	0	0.900	0	0.900
Ffar4	Opn4	0	0	0	0	0	0.900	0	0.900
Hist3h2a	LOC690131	0	0	0	0.123	0.858	0	0.223	0.870
Proc	A2m	0	0	0	0.117	0.054	0.800	0.164	0.841
Hist1h3c	LOC690131	0	0.001	0	0.352	0.602	0	0.158	0.764
Gbe1	Otc	0.155	0	0	0.537	0	0	0.391	0.741
Synpr	Svop	0	0	0	0.207	0	0	0.658	0.717
Pik3cg	Plcb1	0	0	0	0.063	0.149	0.650	0.080	0.708

4. Interacciones proteicas obtenidas con los DEGs sobreexpresados del grupo 3 (ASCs-DN vs. ASCs-CN).

		Canales de evidencia (ECh)							
Nodo 1	Nodo 2	Proximidad	Fusión	Incidencia simultánea	Expresión simultánea	Experimentos	Bases de datos	Minería de textos	Puntuación combinada (CS)
Blnk	Dapp1	0	0	0	0.064	0	0.900	0.303	0.929
Leprel2	Col24a1	0	0	0	0	0.087	0.900	0.159	0.916
Cx3c1l	Gpr37	0	0	0	0.099	0	0.900	0	0.906
Dnm1	Gja1	0	0	0	0.077	0	0.900	0.064	0.906
Dnm1	Adrb2	0	0	0	0	0.069	0.900	0.066	0.905
Tnni2	Myh1	0	0	0	0.703	0.274	0	0.595	0.905
Upk3a	Upk1b	0	0	0	0.063	0.318	0	0.862	0.904
Islr	Tor4a	0	0	0	0	0.050	0.900	0	0.900
Adh7	Aldh3a1	0.065	0	0	0.064	0.114	0.650	0.508	0.842

5. Interacciones proteicas obtenidas con los DEGs subexpresados grupo 3 (ASCs-DN vs. ASCs-CN).

		Canales de evidencia (ECh)							
Nodo 1	Nodo 2	Proximidad	Fusión	Incidencia simultánea	Expresión simultánea	Experimentos	Bases de datos	Minería de textos	Puntuación combinada (CS)
Hist1h3c	Hist2h4	0	0.008	0	0.148	0.877	0	0.885	0.987
Gng4	Bdkrb1	0	0	0	0	0.177	0.900	0.319	0.939
Aldh1a1	Dhrs3	0.042	0	0	0.064	0.158	0.900	0.253	0.933
Gng4	Adra1d	0	0	0	0	0.177	0.900	0.221	0.930
Egr1	Atf3	0	0	0	0.500	0.087	0	0.852	0.926
Grb7	Kit	0	0	0	0	0.181	0.900	0.151	0.924
Tec	Kit	0	0	0	0	0.181	0.900	0.279	0.922
Vegfa	Kit	0	0	0	0	0.219	0.600	0.766	0.920
Gng4	Rrh	0	0	0	0	0.177	0.900	0	0.914
Ppp1r15a	Atf3	0	0	0	0.757	0	0	0.660	0.913
Vegfa	A2m	0	0	0	0	0	0.900	0.132	0.909
Egr1	Nr4a1	0	0	0	0.626	0.068	0	0.739	0.901
Adra1d	Bdkrb1	0	0	0	0	0	0.900	0	0.900
LOC498300	Clec4d	0	0	0	0	0	0.900	0	0.900
Dot1l	Suv420h1	0	0	0	0.064	0	0	0.828	0.832
Sox11	Atf3	0	0	0	0	0.109	0	0.785	0.801
Arc	Egr1	0	0	0	0.140	0	0	0.710	0.739
Diras1	Lonrf2	0	0	0	0.178	0	0	0.691	0.735
Arc	Nr4a1	0	0	0	0.552	0	0	0.391	0.715
Nr4a1	Nr4a3	0	0	0	0.685	0	0	0.812	0.706
Hist1h3c	Dot1l	0	0	0	0	0.218	0	0.637	0.704

6. Las 25 interacciones proteicas más significativas obtenidas con los DEGs sobreexpresados del grupo 4 (ASCs-DH vs. ASCs-CH).

Nodo 1	Nodo 2	Canales de evidencia (ECh)							Puntuación combinada (CS)
		Proximidad	Fusión	Incidencia simultánea	Expresión simultánea	Experimentos	Bases de datos	Minería de textos	
Rpl11	Rps5	0.116	0	0	0.929	0.970	0	0.671	0.999
Rpl11	Rps12	0.053	0	0	0.929	0.918	0.900	0.117	0.999
Rps5	Rps12	0.063	0	0	0.930	0.925	0.900	0.350	0.999
Rps10	Rps15	0	0	0	0.918	0.907	0.900	0.610	0.999
Rps10	Rps5	0	0	0	0.829	0.924	0.900	0.677	0.999
Rps28	Rps15	0.044	0	0	0.766	0.920	0.900	0.602	0.999
Rps5	Rpl29	0	0	0	0.914	0.841	0.900	0.476	0.999
Rps28	Rps5	0	0	0	0.691	0.966	0.900	0.697	0.999
Rps15	Rps12	0.045	0	0	0.829	0.911	0.900	0.537	0.999
Rps28	Rps12	0.045	0	0	0.841	0.917	0.900	0.600	0.999
Rps15	Rps5	0.098	0	0	0.940	0.956	0.900	0.575	0.999
Rps10	Rps28	0	0	0	0.641	0.915	0.900	0.587	0.998
Rps5	Rpl23	0.095	0	0	0.691	0.949	0.900	0.285	0.998
Rpl31	Rps12	0	0	0	0.891	0.878	0.900	0.130	0.998
Rps10	Rps12	0	0	0	0.817	0.885	0.900	0.563	0.998
Rpl11	Rpl31	0	0	0	0.831	0.907	0.900	0.365	0.998
Rps10	Rpl11	0	0	0	0.929	0.918	0	0.626	0.997
Rpl11	Rpl23	0.095	0	0	0.639	0.923	0.900	0.288	0.997
Rps5	Rps20	0.085	0	0	0.932	0.922	0	0.577	0.997
Traf3	Tbk1	0	0	0	0.062	0.821	0.900	0.861	0.997
Rpl13a	Rps12	0.044	0	0	0.928	0.603	0.900	0.139	0.997
Rps28	Rpl23	0	0	0	0.598	0.919	0.900	0.089	0.996
Tm7sf2	Cyp51	0	0	0	0.524	0.588	0.900	0.820	0.996
Rpl11	Rpl29	0	0	0	0.867	0.622	0.900	0.323	0.996
Rps12	Rpl29	0	0	0	0.884	0.612	0.900	0.226	0.996

7. Las 25 interacciones proteicas más significativas obtenidas con los DEGs subexpresados del grupo 4 (ASCs-DH vs. ASCs-CH).

Nodo 1	Nodo 2	Canales de evidencia (ECh)							Puntuación combinada (CS)
		Proximidad	Fusión	Incidencia simultánea	Expresión simultánea	Experimentos	Bases de datos	Minería de textos	
Kdr	Vegfa	0	0	0	0.076	0.420	0.900	0.956	0.997
Cbl	Egfr	0	0	0	0	0.902	0.900	0.692	0.996
Vtn	Serpine1	0	0	0	0.063	0.801	0.900	0.846	0.996
Yap1	Tead1	0	0	0	0.188	0.850	0.900	0.760	0.996
Plg	Serpine1	0	0	0	0	0.169	0.900	0.927	0.993
Git1	Arhgef7	0	0	0	0.064	0.801	0.800	0.738	0.988
Hbegf	Egfr	0	0	0	0	0.181	0.900	0.858	0.987
Fosb	Jund	0	0	0	0.064	0.457	0.800	0.886	0.986
Per1	Per3	0	0	0	0.086	0.910	0.800	0.856	0.984
Plaur	Serpine1	0	0	0	0.168	0	0.900	0.812	0.983
Il1b	Nlrp3	0	0	0	0.145	0	0.800	0.897	0.980
Plaur	Plg	0	0	0	0	0.153	0.900	0.788	0.980
Vps36	Vps37b	0	0	0	0.064	0	0.900	0.794	0.979
Il6	Il1b	0	0	0	0.518	0	0	0.957	0.978
Vegfa	Serpine1	0	0	0	0.063	0	0.900	0.737	0.973
ENSRNOG0000045720	Ogdh	0.089	0	0	0.130	0.159	0.900	0.599	0.968
Shank2	Dlg4	0	0	0	0.043	0.048	0.900	0.696	0.968
Mig6	Egfr	0	0	0	0.082	0.917	0	0.579	0.965
Rnf19b	Rnf182	0	0	0	0	0.068	0.900	0.640	0.963
Cenpk	Cenpa	0	0	0	0.173	0.054	0.900	0.572	0.962
Vps36	Chmp4c	0	0	0	0.063	0.259	0.900	0.528	0.962
Il6	Cxcl1	0	0	0	0.345	0	0	0.944	0.962
Hsd17b3	Srd5a3	0	0	0	0.080	0	0.900	0.608	0.960
Vegfa	Egfr	0	0	0	0.063	0	0.600	0.900	0.959
Ccl1	Cxcl1	0	0	0	0.077	0	0.900	0.590	0.958

ANEXO 4

Iranian Journal of Basic Medical Sciences

ijbms.mums.ac.ir



Identification of molecular pathways and protein-protein interactions in adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (ASCs) under physiological oxygen concentration in a diabetic rat model

Luis-Miguel Paco-Meza ^{1#}, MDolores Carmona ^{1, 2, 3#}, Sagrario Cañadillas ¹, Ana Lopez-Diaz ¹, Francisco Muñoz-López ⁴, Alvaro Jimenez-Arranz ¹, Ipek Guler ¹, Concha Herrera ^{1, 2, 3*}

¹ Maimonides Institute of Biomedical Research in Cordoba (IMIBIC), Spain. Avenida Menéndez Pidal s/n, CP 14004 Córdoba, Spain

² Cellular Therapy Unit, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain. Avenida Menéndez Pidal s/n, CP 14004 Córdoba, Spain

³ University of Cordoba, Spain. Avenida Menéndez Pidal s/n, CP 14004 Córdoba, Spain

⁴ Bio-Knowledge Lab, Glorieta de los Países Bálticos, s/n. Edificio Baobab 1, Oficina 15, Polígono Tecnocórdoba, 14014 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article type:

Original article

Article history:

Received: Jul 16, 2021

Accepted: Jan 24, 2022

Keywords:

Cell-based therapy
Diabetes
Enrichment analysis
Microarray
Physioxia

ABSTRACT

Objective(s): Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (ASCs) are useful in cell-based therapy. However, it is well known that diabetes mellitus (DM) alters ASCs' functionality. The majority of *in vitro* studies related to ASCs are developed under non-physiological oxygen conditions. Therefore, they may not reflect the full effects of DM on ASCs, *in vivo*. The main aim of the current study is to identify molecular pathways and underlying biological mechanisms affected by diabetes on ASCs in physiological oxygen conditions.

Materials and Methods: ASCs derived from healthy (ASCs-C) and diabetic (ASCs-D) rats were expanded under standard culture conditions (21% O₂) or cultured in physiological oxygen conditions (3% O₂) and characterized. Differential gene expressions (DEGs) of ASCs-D with respect to ASCs-C were identified and analyzed with bioinformatic tools. Protein-protein interaction (PPI) networks, from up- and down-regulated DEGs, were also constructed.

Results: The bioinformatic analysis revealed 1354 up-regulated and 859 down-regulated DEGs in ASCs-D, with 21 and 78 terms over and under-represented, respectively. Terms linked with glycosylation and ribosomes were over-represented and terms related to the activity of RNA-polymerase II and transcription regulation were under-represented. PPI network disclosed RPL11-RPS5 and KDR-VEGFA as the main interactions from up- and down-regulated DEGs, respectively.

Conclusion: These results provide valuable information about gene pathways and underlying molecular mechanisms by which diabetes disturbs ASCs biology in physiological oxygen conditions. Furthermore, they reveal, molecular targets to improve the use of ASCs in autologous transplantation.

► Please cite this article as:

Paco-Meza LM, Carmona MD, Cañadillas S, Lopez-Diaz A, Muñoz-López F, Jimenez-Arranz A, Guler I, Herrera C. Identification of molecular pathways and protein-protein interactions in adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (ASCs) under physiological oxygen concentration in a diabetic rat model. Iran J Basic Med Sci 2022; 25:155-163. doi: <https://dx.doi.org/10.22038/IJBMS.2022.59004.13107>

Introduction

Mesenchymal stromal cells (MSCs) have been proposed as a valuable tool in cell therapy due to their therapeutic effects and potential for tissue regeneration in a wide range of diseases (1-4). MSCs are undifferentiated multi-potent adult stromal cells that are self-renewable and show the capacity to differentiate into specialized lineages (5, 6). Bone marrow has been the source most evaluated and used (7) but MSCs can be isolated from other sources including adipose tissue (AT), umbilical cord blood, and periosteum, among others (5). It is well known that MSCs harvested from adipose tissue (ASCs) have some advantages such as being obtained by less invasive methods and greater proliferative capacity; moreover, they present a stable phenotype in long-term culture. Thus, their use in clinical approaches is increasing (4). But unfortunately, many studies have shown that environmental and pathologic factors impair their functionality (3, 8-10).

Diabetes Mellitus (DM) is one of the most common metabolic diseases (11). In 2017, 425 million people were affected worldwide by DM (12), and it is estimated that this figure is going to increase to 439 million people in 2030 (11, 13). Currently, pharmacological approaches to DM treatment are mainly targeted to ameliorate hyperglycemia (1, 2, 14) and improve symptoms (14) but they are ineffective in avoiding DM complications (1) and even alterations in cell functionality (15, 16). Therefore, it appears to be unavoidable that the therapeutic abilities of ASCs will be damaged by this pathological condition. For instance, it has been documented that DM impairs the gene expression profile of ASCs (17, 18), as well as, strongly disturbing their features and functionality (3, 13) due to production and accumulation of advanced glycosylated end products and the increase of oxidative stress induced by high glucose levels (8, 13), so ASCs derived from diabetic patients could be less effective in autologous cell therapies.

*Corresponding author: Concha Herrera. Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC) and Reina Sofia University Hospital, Department of Hematology. Avenida Menéndez Pidal s/n, CP 14004 Córdoba, Spain. Tel: +34-957736518; Fax: +95-7012972; email: gc14terapiacelular@gmail.com

These authors contributed equally to this work

Physiologically, ASCs reside in a low oxygen environment (physioxia) (9) in AT (1%-5% O₂), far from atmospheric oxygen concentration (normoxia, 21% O₂) commonly used in most ASCs culture protocols (5). Normoxia is a non-physiological condition and may disturb cell biology and activity (9). Therefore, the experimental studies developed under such conditions could not reflect the whole characteristics of ASCs and the full impact of other factors such as diabetes on ASCs *in vivo*. Furthermore, Nyengaard *et al.* carried out a study that unveiled the additive effects of hyperglycemia and physioxia (5% O₂) on metabolic pathways in rat retinas (19). However, there is no knowledge about the role of culturing diabetic ASCs under physioxia.

The gene-expression microarray is a powerful tool to measure the expression levels of a lot of genes simultaneously or to genotype multiple regions of a genome (10). Thus, DNA microarray analysis may enable the understanding and characterization of the diabetic-related ASCs dysfunction and the role of physioxia as a driver of ASCs function.

The present work aimed to reveal the molecular pathways and underlying biological mechanisms altered by diabetes in ASCs cultured under physioxia in order to enhance understanding of the effects of both factors in them *in vivo* providing new targets for improving their use in autologous cell transplantation.

Materials and Methods

Experimental design and DM model

Pathogen-free 2-month-old male Wistar rats were purchased from the Experimental Animals Service (SAEX) of Cordoba University and housed at a constant temperature (20 °C-22 °C) with a 17/7-hr light-dark cycle. Initial rat weights were 180–200 g. On day 0, twelve rats were randomly divided into two groups (n=6 per group): healthy group (C) and DM group (D). DM was induced through intraperitoneal (IP) injection of 200 µl streptozotocin (STZ) at a dose of 60 mg/kg (20) and rats included in the healthy group were injected with 200 µl saline.

Blood samples were taken from subclavian veins after 4 hr under fasting conditions for determination of glucose levels with a Blood Glucose Test Strip (FreeStyle Witney, Oxon UK) on day 0 and day 15 to verify the establishment of diabetes. Rats with a glycemia higher than 250 mg/dl were considered diabetic (21).

Animal protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Cordoba University and developed under European (86/609 / EEC, 24 November 1986) and Spanish (DOG 214/1997, of July 30) regulations for animal stabling, handling, experimentation, and other scientific purposes. All animals were treated humanely in accordance with the Guidelines established by University of Cordoba and IMIBIC and accepted by the institutional animal care and use committee of the Cordoba University.

Isolation and expansion of ASCs

Fifteen days after diabetes induction, AT was isolated from 6 healthy and 6 diabetic rats. For this purpose, all animals were anesthetized by IP injection of thiopental (LD₅₀: 50 mg/kg) and humanely sacrificed by exsanguination through aortic puncture.

Subcutaneous AT was extracted from inguinal fat, cut into small pieces, minced, and digested in a Collagenase Type I solution (Sigma-Aldrich) at 37 °C under constant agitation. The digested tissue was washed with fetal bovine

serum (FBS, Gibco) to neutralize collagenase action, filtered, and centrifuged. The final cell suspension was resuspended in α-MEM (BioWhittaker® LONZA, Verviers, Belgium) supplemented with FBS 15% (Gibco), ultra-Glutamine (Bio Whittaker®), 0.1 mg/ml of streptomycin, 100 IU/ml of penicillin, and 1 ng/ml of rat-derived fibroblast growth factor-2 (rat FGF-2, Sigma-Aldrich); cell suspensions were seeded in 75 cm² culture flasks and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 21% O₂ and 5% CO₂. Non-adherent cells were removed after three days and the culture medium was refreshed twice a week until ASCs reached 80%–90% confluence. At that moment, adherent cells were harvested by trypsinization, re-seeded in new flasks, and expanded up to passage three. At this moment flasks with ASCs derived from healthy rats (ASCs-C) and ASCs derived from diabetic rats (ASCs-D) were subjected to physiological oxygen conditions for 48 hr (3% O₂) in a hypoxic chamber (Hypoxia Chamber Biospherix). Finally, when all cell cultures reached 80% confluence, cells were harvested by trypsinization and washed by centrifugation to conduct their characterization and genomic analysis.

ASC phenotype and differentiation ability

ASCs were characterized phenotypically and functionally. The phenotype analysis was performed using the following conjugated mouse monoclonal antibodies: anti-rat CD34 (Santa Cruz, Biotechnology, Dallas, Texas, USA), CD45, and CD90 (BD Pharmigen™), and hamster monoclonal antibody anti-rat CD29 (BD Pharmigen™). Cell samples were acquired on a MACSQUANT flow cytometer (Miltenyi-Biotech, Bergisch Gladbach) and analyzed using MACS Quantify software, Version 2.5. At least 100000 events were analyzed for each marker.

The functional characterization of ASCs was performed through differentiation potential analysis to adipocytes and osteoblasts for two weeks. For this, ASCs were seeded at a density of 100000 cells per well in a 6-well plate (BD Falcon™ Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) and cultured with a specific culture medium (Differentiation Media Bullet Kit®-Adipogenic, LONZA; Differentiation Media BulletKits®-Osteogenic, LONZA) to stimulate adipogenic and osteogenic differentiation, respectively. Differentiated cells were fixed and stained with Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) for adipocytes and with Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) for osteoblasts. Differentiated cells were observed under a light microscope (Nikon Eclipse TE2000-S). Images were digitalized by NIS-Element software, version 3.2, and five digitalized images were analyzed from each stained culture.

Microarray analysis

The total cellular RNA was extracted from ASCs-C and ASCs-D, cultured under physiological oxygen conditions, using RNeasy Mini Kit (Qiagen) following their provided protocols. RNA quantity and quality were measured using a Nanodrop ND-1000 UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Inc.), and RNA integrity was assessed using the Bioanalyzer RNA 6000 Nano kit and the Agilent 2100 Bioanalyzer system, according to the manufacturer instructions (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Total RNA from each sample was amplified and labeled following a one-color protocol (Agilent Technologies). The labeled cRNA was purified using an RNeasy Mini Kit (Qiagen

Group) and cRNA concentration was measured using a NanoDropND-1000 UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Inc.). The microarray slide (Ref: G4858A-074036, Agilent Technologies) was hybridized using a gene expression hybridization kit (Ref: p/n 5188-5242, Agilent Technologies) following the manufacture protocol and incubated for 17 hr in constant rotation at 20 rpm and 65 °C. Hybridization signals were detected using an Agilent Microarray Scanner G2565C (Agilent Technologies, Inc.). The SubioPlatform software (<https://www.subioplatform.com/>) (22) was used to analyze the acquired microarray images, carry out the normalization, and the subsequent data processing to identify the differentially expressed genes (DEGs). An asymptotic t-student analysis was performed with a P -value < 0.01 and a fold-change (FC) > 2.0 for up-regulated genes and < 0.5 for down-regulated genes considered as significantly differentially expressed.

Functional enrichment analysis

To identify the biological relevance and pathways of DEGs, a functional enrichment analysis was performed using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) version 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) (23, 24). This functional annotation tool expresses the most enriched terms. The threshold to the enrichment terms was established with an EASE score of 0.1. To identify the main functions of DEGs, Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org>) analysis was performed to classify genes into different hierarchical categories based on their molecular function, biological process, and cellular component (25, 26). Additionally, significant pathways of the DEGs were obtained on the basis of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<https://genome.jp/kegg>) in order to understand the biological system functions (27, 28), and information and annotations concerning proteins were obtained from UniProt (<https://www.uniprot.org>) (29, 30). The Benjamini-Hochberg (BH) correction method was applied, and P -values were adjusted in a 0.05 cut-off.

Additionally, functional enrichment analysis was performed using clusterProfiler (31). Only enriched KEGG pathways were considered, and results were adjusted by the Benjamini-Hochberg method. P -value < 0.05 was set as cut-off criteria.

Protein-Protein Interaction (PPI) networks construction

The interaction networks of the proteins identified were further explored by bioinformatics analysis. The Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING; v11.0) (<https://string-db.org>) (32, 33) was used to construct the PPI network. An extended network was constructed by setting the required combined score (CS) to > 0.7. The number and values > 0.7 of evidence channels (EC) related

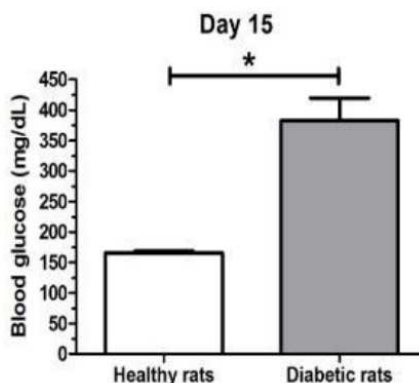


Figure 1. Blood glucose levels
Blood glucose serum concentration after fifteen days of saline or streptozotocin injection in healthy and diabetic rat groups, respectively. * P =0.05. Data represent mean ± SEM

to its respective CE were considered to support CE. There are seven ECs: experiments channel, database channel, text mining channel, coexpression channel, neighborhood channel, fusion channel, and the co-occurrence channel. In the network, proteins were represented by nodes, and interactions between proteins were represented by edges.

Statistical analysis (except microarray and enrichment analysis)

All data were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Because of the small sample size, non-parametric statistical analysis was used. Comparisons between two groups were made with the Mann-Whitney U test. Statistical significance was accepted when the P -value was ≤ 0.05. PASW Statistic 18 (IBM SPSS) software package was used to perform statistical analysis of the *in vitro* assays.

Results

Induction of diabetes

On day 0, blood glucose levels corresponded with values of healthy animals (172.8 ± 12.48 mg/dl). Fifteen days after STZ-injection, blood glucose levels of diabetic rats (382.6 ± 37.15 mg/dl) were significantly higher than healthy rats (166 ± 2.67 mg/dl) (P =0.05) (Figure 1).

Phenotypic and functional characterization of ASCs

ASCs-D and ASCs-C cultured under physiological oxygen conditions were phenotypically homogeneous to both positive (CD29 and CD90) and negative markers (CD34 and CD45) (Table 1). Figure 2 shows a representative

Table 1. Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell (ASC) immunophenotypic characterization by flow cytometry. Data represent mean ± SEM

Cell populations	% CD29	% CD90	% CD34	% CD45
ASCs-C*	98.35 ± 1.23	99.78 ± 0.04	0.15 ± 0.03	0.52 ± 0.17
ASCs-D*	98.88 ± 0.3	98.14 ± 0.63	0.12 ± 0.04	0.45 ± 0.16

*ASCs derived from healthy (C) and diabetic (D) Wistar rats (p=ns)

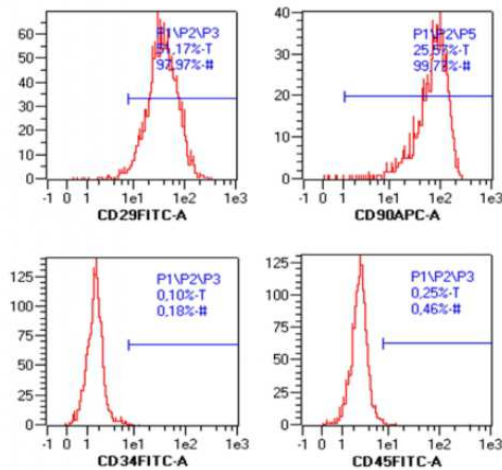


Figure 2. Flow cytometry analysis of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (ASC): Histogram graphs derived from immunophenotypic analysis of ASCs

histogram of the flow cytometry analysis.

Functional characterization of ASCs showed that both ASCs-D and ASCs-C were able to differentiate into adipocytes and osteoblasts after two weeks of culture in

adipogenic or osteogenic inductive media (data not shown).

Functional and pathway enrichment analysis

The microarray analysis unveils that under physiological oxygen conditions there are as many as 2213 DEGs (1354 up-regulated and 859 down-regulated) in ASC-D in comparison to ASC-C. A total of 21 and 78 terms were significantly enriched for up-regulated and down-regulated DEGs, respectively, based on the setting threshold of Benjamini-Hochberg <0.05. The 12 most significant over- and under-represented terms are shown in Tables 2 and 3, respectively.

Results derived from the functional enrichment analysis performed with clusterProfiler tool recognized significant pathways based on the KEGG database according to DEGs interactions and functions. A total of 3 over-represented and 3 under-represented significant pathways were identified (Figure 3).

PPI networks

The network derived from the up-regulated DEGs comprised 355 nodes, each of which represents a protein, and 891 interactions (Figure 4). RPL11-RPS5 interaction obtained the highest combined score reaching 0.99 and two evidence channels (EC) that attained values of 0.92 (coexpression channel) and 0.97 (experiments channel). The network derived from the down-regulated DEGs showed 185 nodes and 314 interactions (Figure 5) where KDR-VEGFA interaction was on the top with a CS=0.99 and two EC with values of 0.95 (text mining channel) and

Table 2. Over-represented terms derived from the functional enrichment analysis

Category	Term	Gene count	P-value	Fold enrichment	BH
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0045944~Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	72	1.39E-13	2.61	3.86E-10
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000122~Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	51	2.54E-09	2.54	3.51E-06
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005634~Nucleus	189	4.61E-09	1.45	1.63E-06
UP_KEYWORDS	Nucleus	110	8.54E-09	1.73	2.31E-06
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006366~Transcription from RNA polymerase II promoter	34	1.06E-08	3.17	9.73E-06
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005737~Cytoplasm	198	1.83E-08	1.41	3.24E-06
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0043565~Sequence-specific DNA binding	41	7.21E-08	2.59	4.69E-05
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0008284~Positive regulation of cell proliferation	37	9.80E-08	2.73	6.78E-05
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0010628~Positive regulation of gene expression	30	2.92E-07	3.00	0.000161789
UP_KEYWORDS	Transcription regulation	47	1.65E-06	2.15	0.000223086
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003700~Transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	45	2.50E-06	2.15	0.000811934
UP_KEYWORDS	Transcription	48	3.40E-06	2.07	0.00030701

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Uniprot (UP), Benjamini-Hochberg (BH).

Table 3. Under-represented terms derived from the functional enrichment analysis

Category	Term	Gene count	P-value	Fold Enrichment	BH
UP_SEQ_FEATURE	Topologicaldomain: Cytoplasmic	121	2.96E-11	1.76	3.28E-08
UP_SEQ_FEATURE	Topologicaldomain: Extracellular	98	7.10E-10	1.83	3.94E-07
KEGG_PATHWAY	rno03010: Ribosome	28	2.50E-08	3.46	6.50E-06
UP_KEYWORDS	Disulfide bond	148	2.63E-08	1.57	8.29E-06
UP_SEQ_FEATURE	Transmembrane region	143	4.53E-08	1.48	1.67E-05
UP_KEYWORDS	Glycoprotein	140	2.37E-07	1.53	3.73E-05
UP_KEYWORDS	Signal	204	4.12E-07	1.39	4.33E-05
UP_SEQ_FEATURE	Glycosylation site: N-linked (GlcNAc)	125	6.25E-07	1.48	0.00017335
UP_SEQ_FEATURE	Disulfide bond	95	1.08E-06	1.60	0.00023935
UP_KEYWORDS	Ribosomal protein	28	1.66E-05	2.54	0.00131022
UP_SEQ_FEATURE	Signal peptide	103	2.75E-05	1.46	0.0050655
UP_KEYWORDS	Transmembrane helix	319	6.33E-05	1.20	0.0039812

Annotation of Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Uniprot (UP), Benjamini-Hochberg (BH). GO Term: CC: Cellular Component, BP: Biological Process, MF: Molecular Function

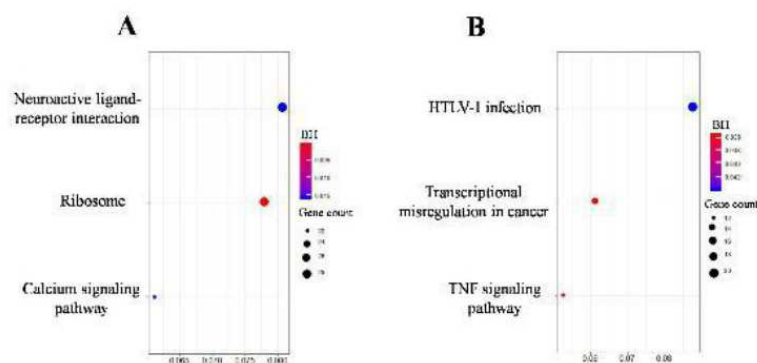


Figure 3. ClusterProfile derived from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) over-represented (A) and under-represented (B) pathways carried out with diabetic-induced adipose-tissue derived mesenchymal stromal cells regarding healthy adipose-tissue derived mesenchymal stromal cells (ASCs-D vs ASCs-C). The dot size is according to the number of genes linked with its respective pathway. The Benjamini-Hochberg (BH) adjusted P-values were arranged from less (blue) to more (red) significant. HTLV-1 (Human T- cell leukemia virus type 1), TNF (Tumor necrosis factor)

0.9 (database channel).

Discussion

In vitro expanded MSCs have been widely used in a broad range of clinical trials in regenerative medicine (4). It is well documented that diabetes induces failure in MSCs functionality and alters their gene expression profile (3, 17). However, little is still known about the effects of DM in ASCs biology under physiological oxygen conditions. Therefore, in this study, we evaluated the gene expression profile of diabetic ASCs in relation to healthy ones under

physiological oxygen conditions through DNA microarray. In this sense, the results obtained in the current study provide new insights into the understanding of ASCs' biology at the molecular level in order to optimize their clinical outcomes.

Nonetheless, as with the majority of studies, the experimental design of the current work is subjected to limitations. The major limitation of this research is the lack of molecular validation through a specific technique. However, despite this, our study offers new useful information for the scientific community and could address future investigations.

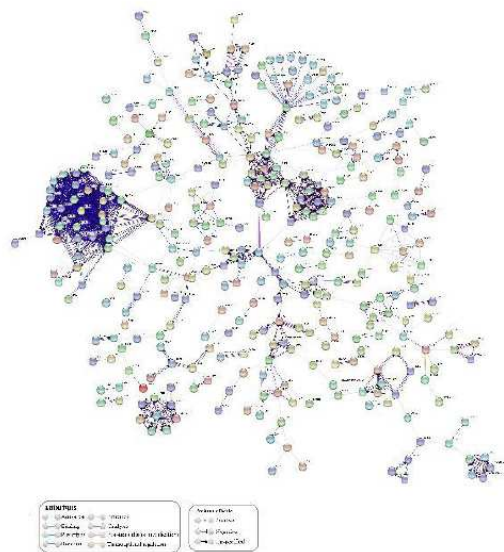


Figure 4. Protein-Protein Interaction (PPI) analysis of up-regulated differential gene expression (DEGs) performed in diabetic-induced adipose-tissue derived mesenchymal stromal cells regarding healthy adipose-tissue derived mesenchymal stromal cells (ASCs-D vs ASCs-C). The color of the line represents action types and the line configuration indicates action effects

Our results confirm the establishment of diabetes in STZ-induced rats (21) and the cellular identity of ASCs analyzed in the current study (i.e., immunophenotype and differentiation ability) (5) as expected.

The functional enrichment analysis showed 99 significant terms identified through GO, KEGG, and UniProt databases: 21 terms over-represented and 78 terms under-represented in ASC-D. One term of particular interest among the 21 over-represented terms is the “Glycosylation site N-linked”. Recent studies have shown that inadequate glycemic control is directly associated with N-glycan profile modifications in sera of type 1 diabetic patients (34). Furthermore, the N-glycosylation profile of MSCs surface is modified throughout their development stages (35), and changes in N-glycan processing in MSCs might affect their functional fate and differentiation capacity (36). According to these observations, based on the fact that high glucose levels produce alterations in colony formation and differentiation capacities of MSCs (8), we might suggest that diabetes could affect the behavior of ASCs through modification of the surface N-glycosylation profile and processing of N-glycans.

Interestingly, ten of the top 12 over-represented terms in ASC-D contain in their gene list, provided by enrichment analysis, two N-glycosylated genes, *Fgfr4* (37) and *Il-1r2* (38). *Fgfr4* codifies the fibroblast growth factor receptor 4 whose up-regulation has been demonstrated to have a role in glucose metabolism in cancer cells (39) suggesting that *Fgfr4* could also play a role in ASCs-D glucose metabolism. On the other hand, *Il-1r2* gene encodes the interleukin 1 receptor 2. IL-1 is the ligand to both IL-1R2 and IL-1R1 that acts as negative and positive effectors over the IL-1 signaling pathway, respectively (40). IL-1 promotes the anti-inflammatory effects of MSCs by binding IL-1R1 (41, 42). Moreover, it has been also described that ASCs

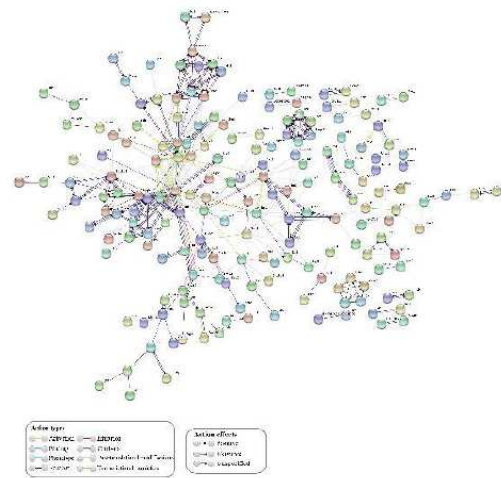


Figure 5. Protein-Protein Interaction (PPI) analysis of down-regulated differential gene expression (DEGs) performed in diabetic-induced adipose-tissue derived mesenchymal stromal cells regarding healthy adipose-tissue derived mesenchymal stromal cells (ASCs-D vs ASCs-C). The color of the line represents action types and the line configuration indicates action effects

derived from type 2 diabetic patients have a reduction in their immunomodulatory effects through less effectiveness in suppressing B-cell and T-cell proliferation, among other mechanisms (18). According to these published data, we suggest that dysregulation of IL-1R2 is involved in the reduction of anti-inflammatory properties of diabetic ASCs under physiological oxygen conditions.

In relation to the over-represented terms “Ribosome” and “Ribosomal protein”, and the over-represented “Ribosome Pathway”, identified in the functional enrichment analysis performed in ASC-D, and as has been reported by published studies, high glucose levels increase the capacity of mRNA translation and protein synthesis by inducing ribosome biogenesis in kidney glomerular epithelial cells (43). This increment of mRNA activity induces a misbalance between synthesis and degradation of proteins thus producing accumulation of proteins in the extracellular matrix and leading to structural and functional alterations in the kidney culminating in diabetic renal complications (44). Diabetes might disrupt stem cells’ homeostasis and negatively alter their niche (16). In this scenario, we speculate that diabetes could induce microenvironmental alterations in the ASCs niche and disturbance in ribosomes and protein synthesis.

Regarding the 78 significantly under-represented terms, “Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter”, “Transcription from RNA polymerase II promoter” and “Positive regulation of gene expression” resulted among the most significant terms after functional enrichment analysis of DEGs. All of them share the common characteristic of being actively involved in the positive regulation of the transcription process. These observations are in line with the results obtained from a study developed by Meugnier *et al.* where it was demonstrated that acute hyperglycemia modifies the adipose tissue and skeletal muscle gene expression in healthy subjects and that down-regulation of genes related to almost all biological pathways

represented more than 80% of these changes (45).

Among the significantly under-represented terms, the *Nr4a1* gene (*orphan nuclear receptor 4A1*), was found in seven terms: “Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter”, “Nucleus”, “Transcription from RNA polymerase II promoter”, “Cytoplasm”, “Sequence-specific DNA binding”, “Transcription regulation” and “Transcription”. NR4A1 is, among others, a pro-angiogenic protein that is known for being a modulator of the vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) (46). Moreover, Yoo *et al.* after exposing tumor cells under low oxygen conditions (0.1% O₂) unveiled the important role of NR4A1 in stabilizing the hypoxia-inducible factor (HIF) (47), which in turn, plays a pivotal role as a cell regulator in response to a low oxygen environment. In fact, it is thought that the beneficial effects of low oxygen tension on ASCs activity, such as expression of antiapoptotic proteins and enhancement of angiogenic paracrine secretion, are mainly attributed to HIF action (5, 9). Several studies carried out under atmospheric environment have revealed that diabetic MSCs possess impaired angiogenic properties since their expression of vessel formation factors, for instance, Vegfa and angioprotein-2 are lower than in cells isolated from healthy donors (6) furthermore, *in vitro* experiments showed their weaknesses in forming vessels (6, 48). Therefore, we speculate that dysregulation of *Nr4a1* could be another mechanism responsible for the disturbances of ASCs properties mediated by diabetes, and because of its action over HIF the alterations in *Nr4a1* expression may be more notorious under physioxia and could represent a useful target to improve angiogenesis capacity of ASCs *in vivo*.

From the functional enrichment analysis performed with the clusterProfiler tool, the “HTLV-1 Infection” pathway resulted in one of the significantly under-represented pathways. It is documented that HTLV-1 (Human T-cell leukemia virus type 1) is an oncovirus responsible for an aggressive CD4 T cell malignancy in which the oncoprotein Tax besides inducing its pathogenicity, also promotes the expression of genes related to migration and angiogenesis in MSCs (49). Moreover, a study identified a Tax-responsive element (TRE), located within the nitric oxide synthase (NOS) promoter, which induces the response to hypoxia stimuli in endothelial cells by augmenting NOS production even in uninfected cells (50). These observations might unveil another possible mechanism by which diabetes alters the normal ASCs functionality and angiogenic properties.

Aiming to demonstrate the interaction of the proteins encoded by the DEGs and to analyze their biologic function, PPI networks were constructed from up-regulated and down-regulated DEGs using STRING analysis. The PPI network derived from the up-regulated DEGs showed the RPL11-RPS5 protein interaction as the most representative. RPL11 is a ribosomal protein that induces apoptosis via p53, by directly associating with its physiological repressor mouse double minute 2 (MDM2). The ribosomal protein – MDM2-p53 axis has been described as a protector against genomic instability, cancer, and alterations of ribosome-impaired biogenesis triggered by cellular stress (51, 52). It has not been studied in the case of DM, but we can hypothesize that DM provokes disturbances in ribosome biogenesis, as a consequence of hyperglycemia, inducing ASCs stress which in turn produces an accumulation of free fractions of RPL11, and their increased susceptibility to

undergo apoptosis.

The PPI network derived from the down-regulated DEGs showed the KDR-VEGFA protein interaction as the most representative. It is well known that this axis constitutes the main ligand-receptor interaction that regulates cell proliferation, migration process, and angiogenesis (53) in some cellular types. This result at the protein interaction level is in agreement with the study carried out by Kin *et al.* who observed a down-regulation of Vegfa in diabetic MSCs isolated from rat bone marrow (6).

Conclusion

In summary, the present work provides remarkable previously unpublished information regarding the diabetic-derived ASC gene expression modifications induced by hyperglycemia in physiological oxygen conditions and shows potential targets to improve the autologous transplantation use of ASC in cell-based therapy. Some important biological processes and pathways involved in glycosylation, ribosomes, positive regulation of the transcription process HTLV-1 Infection, as well as protein interactions such as RPL11-RPS5 and KDR-VEGFA could be closely associated with diabetes regarding the functionality of ASC in physiological oxygen conditions. Nonetheless, specific additional molecular studies are required to substantiate our observations and to establish whether these results are replicated in humans.

Acknowledgment

This study was supported by a program grant (no. PI14/00087) from the Carlos III Health Institute, Ministry of Health, Social Services and Equality, Spain. We thank the Cellular Therapy Unit staff of Reina Sofia Hospital Cordoba (Spain) for their support during the development of this study. The results presented in this paper were part of a student thesis.

Authors' Contributions

LMPM, MDC, SC, and CH provided study conception or design; LMPM, MDC, SC, and ALD analyzed the data and prepared the draft manuscript; AJA, IG, and CH critically revised the paper; CH supervised the research; LMPM, MDC, SC, ALD, FMML, AJA, IG, and CH approved the final version to be published.

Conflicts of Interest

The authors declare there are no conflicts of interest.

References

- Zang L, Hao H, Liu J, Li Y, Han W, Mu Y. Mesenchymal stem cell therapy in type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr* 2017; 9:36.
- Cho J, D'Antuono M, Glicksman M, Wang J, Jonklaas J. A review of clinical trials: mesenchymal stem cell transplant therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Am J Stem Cells* 2018; 7:82-93.
- Kornicka K, Houston J, Marycz K. Dysfunction of mesenchymal stem cells isolated from metabolic syndrome and type 2 diabetic patients as result of oxidative stress and autophagy may limit their potential therapeutic use. *Stem Cell Rev Rep* 2018; 14:337-345.
- Zhang J, Liu Y, Chen Y, Yuan L, Liu H, Wang J, *et al.* Adipose-derived stem cells: current applications and future directions in the regeneration of multiple tissues. *Stem Cells Int* 2020; 2020:8810813.

5. Choi JR, Yong KW, Wan Safwani WKZ. Effect of hypoxia on human adipose-derived mesenchymal stem cells and its potential clinical applications. *Cell Mol Life Sci*. 2017; 74:2587-2600.
6. Kim H, Han JW, Lee JY, Choi YJ, Sohn YD, Song M, et al. Diabetic mesenchymal stem cells are ineffective for improving limb ischemia due to their impaired angiogenic capability. *Cell Transplant* 2015; 24:1571-1584.
7. Mohamed-Ahmed S, Fristad I, Lie SA, Suliman S, Mustafa K, Vindenes H, et al. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Res Ther* 2018; 9:168.
8. Saki N, Jalalifar MA, Soleimani M, Hajizamani S, Rahim F. Adverse effect of high glucose concentration on stem cell therapy. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2013; 7:34-40.
9. Samal JRK, Rangasami VK, Samanta S, Varghese OP, Oommen OP. Discrepancies on the role of oxygen gradient and culture condition on mesenchymal stem cell fate. *Adv Healthc Mater* 2021; 10:e2002058.
10. Wu Y, Yang J, Ai Z, Yu M, Li J, Li S. Identification of key genes and transcription factors in aging mesenchymal stem cells by DNA microarray data. *Gene* 2019; 692:79-87.
11. Ko KI, Coimbra LS, Tian C, Alblowi J, Kayal RA, Einhorn TA, et al. Diabetes reduces mesenchymal stem cells in fracture healing through a TNF α -mediated mechanism. *Diabetologia* 2015; 58:633-642.
12. Li L, Pan Z, Yang S, Shan W, Yang Y. Identification of key gene pathways and coexpression networks of islets in human type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2018; 11:553-563.
13. Liu Y, Tang SC. Recent progress in stem cell therapy for diabetic nephropathy. *kidney dis (Basel)* 2016; 2:20-27.
14. Roberto Pontarolo, Andréia Cristina Conegero Sanches, Astrid Wiens, Cássio Marques Perlin, Fernanda Stumpf Tonin (April 1st 2015). *Pharmacological Treatments for Type 2 Diabetes*, Treatment of Type 2 Diabetes, Colleen Croniger, IntechOpen. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/47557>
15. Mahmoud M, Abu-Shahba N, Azmy O, El-Badri N. Impact of diabetes mellitus on human mesenchymal stromal cell biology and functionality: implications for autologous transplantation. *Stem Cell Rev Rep* 2019; 15:194-217.
16. Rodrigues M, Wong VW, Rennert RC, Davis CR, Longaker MT, Gurtner GC. Progenitor cell dysfunctions underlie some diabetic complications. *Am J Pathol*. 2015; 185:2607-2618.
17. de Lima KA, de Oliveira GL, Yaochite JN, Pinheiro DG, de Azevedo JT, Silva WA Jr, et al. Transcriptional profiling reveals intrinsic mRNA alterations in multipotent mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow of newly-diagnosed type 1 diabetes patients. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7:92.
18. Qi Y, Ma J, Li S, Liu W. Applicability of adipose-derived mesenchymal stem cells in treatment of patients with type 2 diabetes. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10:274.
19. Nyengaard JR, Ido Y, Kilo C, Williamson JR. Interactions between hyperglycemia and hypoxia: implications for diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2004; 53:2931-2938.
20. Balakumar P, Chakkarwar VA, Kumar V, Jain A, Reddy J, Singh M. Experimental models for nephropathy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2008; 9:189-195.
21. Jayaprasad, B., P.S. Sharavanan, and R. Sivaraj. Antidiabetic effect of Chloroxylon swietenia bark extracts on streptozotocin induced diabetic rats. *Beni-Suef University J Basic Appl Sci* 2016; 5: 61-69.
22. Subio. 2008 Accessed Dec 2016; Available from: <https://www.subioplatform.com/>.
23. Huang DW, Sherman BT, Tan Q, Kir J, Liu D, Bryant D, et al. DAVID bioinformatics resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res* 2007; 35:W169-175.
24. The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID). 2003-2020 Accessed Jan 2019; Available from: <https://david.ncifcrf.gov/>.
25. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000; 25:25-29.
26. The Gene Ontology (GO). 1999-2020 Accessed Jan 2019; Available from: <http://geneontology.org/>.
27. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res* 2017; 45:D353-D361.
28. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. 1995-2020 Accessed Jan 2019; Available from: <https://www.genome.jp/kegg/>.
29. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 2017; 45:D158-D169.
30. The UniProt Consortium. 2019 Accessed Jan 2019; Available from: <https://www.uniprot.org/>.
31. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*. 2012; 16:284-287.
32. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* 2017; 45:D362-D368.
33. STRING CONSORTIUM. 2020 Accessed Jan 2019; Available from: <https://string-db.org/>.
34. Bermingham ML, Colombo M, McGurnaghan SJ, Blackburn LAK, Vučković F, PučićBaković M, et al. N-Glycan profile and kidney disease in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2018; 41:79-87.
35. Hamouda H, Ullah M, Berger M, Sittinger M, Tauber R, Ringe J, et al. N-glycosylation profile of undifferentiated and adipogenically differentiated human bone marrow mesenchymal stem cells: towards a next generation of stem cell markers. *Stem Cells Dev* 2013; 22:3100-3113.
36. Wilson KM, Jagger AM, Walker M, Seinkmane E, Fox JM, Kröger R, et al. Glycans modify mesenchymal stem cell differentiation to impact on the function of resulting osteoblasts. *J Cell Sci* 2018; 131:jcs209452.
37. Triantis V, Saeland E, Bijl N, Oude-Elferink RP, Jansen PL. Glycosylation of fibroblast growth factor receptor 4 is a key regulator of fibroblast growth factor 19-mediated down-regulation of cytochrome P450 7A1. *Hepatology* 2010; 52:656-66.
38. Wang D, Zhang S, Li L, Liu X, Mei K, Wang X. Structural insights into the assembly and activation of IL-1 β with its receptors. *Nat Immunol* 2010; 11:905-911.
39. Xu M, Chen S, Yang W, Cheng X, Ye Y, Mao J, et al. FGFR4 Links Glucose Metabolism and Chemotherapy Resistance in Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem* 2018; 47:151-160.
40. Peters VA, Joesting JJ, Freund GG. IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation. *Brain Behav Immun*. 2013; 32:1-8.
41. Redondo-Castro E, Cunningham C, Miller J, Martuscelli L, Aoulad-Ali S, Rothwell NJ, et al. Interleukin-1 primes human mesenchymal stem cells towards an anti-inflammatory and pro-trophic phenotype *in vitro*. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8:79.
42. Fan H, Zhao G, Liu L, Liu F, Gong W, Liu X, et al. Pre-treatment with IL-1 β enhances the efficacy of MSC transplantation in DSS-induced colitis. *Cell Mol Immunol* 2012; 9:473-481.
43. Mariappan MM, D'Silva K, Lee MJ, Sataranatarajan K, Barnes JL, Choudhury GG, et al. Ribosomal biogenesis induction by high glucose requires activation of upstream binding factor in kidney glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 300:F219-230.
44. Mariappan MM. Signaling mechanisms in the regulation of renal matrix metabolism in diabetes. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012:749812.
45. Meugnier E, Faraj M, Rome S, Beauregard G, Michaut A, Pelloux V, et al. Acute hyperglycemia induces a global downregulation of gene expression in adipose tissue and skeletal muscle of healthy subjects. *Diabetes* 2007; 56:992-999.
46. Zeng H, Qin L, Zhao D, Tan X, Manseau EJ, Van Hoang M, et al. Orphan nuclear receptor TR3/Nur77 regulates VEGF-A-induced angiogenesis through its transcriptional activity. *J Exp Med* 2006; 203:719-729.

47. Yoo YG, Yeo MG, Kim DK, Park H, Lee MO. Novel function of orphan nuclear receptor Nur77 in stabilizing hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* 2004; 279:53365-53373.
48. Kim YS, Kwon JS, Hong MH, Kang WS, Jeong HY, Kang HJ, et al. Restoration of angiogenic capacity of diabetes-insulted mesenchymal stem cells by oxytocin. *BMC Cell Biol* 2013; 14:38.
49. El-Saghir J, Nassar F, Tawil N, El-Sabban M. ATL-derived exosomes modulate mesenchymal stem cells: potential role in leukemia progression. *Retrovirology* 2016;13:73.
50. Min J, Jin YM, Moon JS, Sung MS, Jo SA, Jo I. Hypoxia-induced endothelial NO synthase gene transcriptional activation is mediated through the tax-responsive element in endothelial cells. *Hypertension* 2006;47:1189-1196.
51. Kim TH, Leslie P, Zhang Y. Ribosomal proteins as unrevealed caretakers for cellular stress and genomic instability. *Oncotarget* 2014;5:860-871.
52. Turi Z, Lacey M, Mistrik M, Moudry P. Impaired ribosome biogenesis: mechanisms and relevance to cancer and aging. *Aging (Albany NY)* 2019; 11:2512-2540.
53. Abhinand CS, Raju R, Soumya SJ, Arya PS, Sudhakaran PR. VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *J Cell Commun Signal* 2016; 10:347-354.



Contents lists available at ScienceDirect

Pathology - Research and Practice

journal homepage: www.elsevier.com/locate/prp

Hypoxia preconditioning increases the ability of healthy but not diabetic rat-derived adipose stromal/stem cells (ASC) to improve histological lesions of streptozotocin-induced diabetic nephropathy

MDolores Carmona^{a,b,f,1}, Luis-Miguel Paco-Meza^{a,1}, Rosa Ortega^{a,d}, Sagrario Cañadillas^a,
Javier Caballero-Villarraso^{a,e,f}, Alfonso Blanco^c, Concha Herrera^{a,b,f,*}

^a Maimonides Institute of Biomedical Research in Cordoba (IMIBIC), Avenida Menéndez Pidal s/n, CP 14004 Cordoba, Spain

^b Cellular Therapy Unit and Hematology Department, Reina Sofia University Hospital, Avenida Menéndez Pidal s/n, CP 14004 Cordoba, Spain

^c Anatomy and Comparative Pathological Anatomy Department, University of Cordoba, Carretera Nacional IV Km. 396, CP 14014 Cordoba, Spain

^d Anatomy Pathology Department, Reina Sofia University Hospital, Avenida Menéndez Pidal s/n, CP 14004 Cordoba, Spain

^e Clinical Analysis Department, Reina Sofia University Hospital, Avenida Menéndez Pidal s/n, CP 14004 Cordoba, Spain

^f University of Cordoba, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Diabetic nephropathy
Adipose-derived mesenchymal stromal cells
Hypoxia preconditioning
Regenerative therapy
Renal injury
ASC dysfunction

ABSTRACT

Background: Mesenchymal stromal cells (MSC) have demonstrated ability to improve diabetic nephropathy (DN) in experimental models, as well as by improving kidney endogenous progenitor cells proliferation and differentiation. Many studies have demonstrated the effect of hypoxia on MSC improving their functionality but the potential enhancement of the nephroprotective properties of MSC cultured under low oxygen concentration has been explored in few studies, none of them in the context of DN. On the other hand, diabetes is associated with abnormalities in MSCs functionality. These findings related to the hypoxia preconditioning ability to enhance adipose-tissue derived-MSC (ASC) performance have led us to wonder if hypoxia could increase the known beneficial effect of normal ASC in DN and if it could correct the expected inability of diabetic rat-derived ASC to exert this effect in vivo. To answer these questions, in the present study we have used ASC from healthy and diabetic-induced rats, cultured under standard conditions or hypoxia preconditioned, in a DN rat model induced by streptozotocin (STZ).

Methods: Diabetes was induced in Wistar-rats by 60 mg/kg streptozotocin (STZ) intraperitoneal injection. Fifteen days thereafter, five diabetic-induced rats and five healthy, previously injected with saline, were sacrificed and used as ASC donors. Both healthy and diabetic rat-derived ASC (cASC and dASC, respectively) were cultured under standard conditions (21%O₂)(N) or were subjected to a 48 h conditioning period in hypoxia (3%O₂)(H). Thus, four types of cells were generated depending on their origin (healthy or diabetic-induced rats) and the culture conditions (N or H): cASC-N, cASC-H, dASC-N and dASC-H. DN experimental study were carried out fifteen days after STZ induction of diabetes in fifty-two healthy rats. DN-induced-animals were randomly assigned to be injected with 200 µL saline as placebo or with 3 × 10⁶ cASC-N, cASC-H, dASC-N or dASC-H, according to the study group. Serum glucose, urea and creatinine, and urine albumin levels were measured at 2-weeks intervals until day+ 45 after ND-induction. Animals were sacrificed and kidneys extracted for histopathological and transmission electron microscopy analysis.

Results: None of the four study groups that received cell treatment showed significant changes in serum glucose, urea and creatinine levels, urine albumin concentration and body weight compared to placebo ND-induced group. Interestingly, only the group that received cASC-H showed a reduction in glucose and creatinine levels although it did not reach statistical significance. All DN-induced groups treated with ASC reduced significantly renal lesions such as mesangial expansion, mesangiolysis, microaneurysms and acute tubular necrosis compared

* Correspondence to: Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC) and Reina Sofia University Hospital, Department of Hematology, University of Cordoba, Avenida Menéndez Pidal s/n, CP 14004 Cordoba, Spain.

E-mail addresses: mariadolores.carmona@imibic.org (M. Carmona), z22pamel@uco.es (L.-M. Paco-Meza), rosan.ortega.sspa@juntadeandalucia.es (R. Ortega), sagrira99@gmail.com (S. Cañadillas), bc2eavij@uco.es (J. Caballero-Villarraso), an1blroa@uco.es (A. Blanco), inmaculada.herrera.sspa@juntadeandalucia.es, gc14terapiacelular@gmail.com (C. Herrera).

¹ These two authors have contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153756>

Received 22 September 2021; Received in revised form 24 December 2021; Accepted 28 December 2021

Available online 31 December 2021

0344-0338/© 2021 The Author(s).

Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

to ND-induced placebo group ($p \leq 0.05$). Renal injuries such as clear tubular cell changes, thickening of tubular basement membrane, tubular cysts and interstitial fibrosis significantly showed reduction in ND-induced rats treated with cASC-H regarding to their received cASCN ($p \leq 0.05$). Non statistical differences were observed in the improvement capacity of cASC and dASC culture under standard condition. However, hypoxia preconditioning reduces the presence of tubular cysts ($p \leq 0.01$).

Conclusions: Hypoxia preconditioning enhances the ability of healthy rat-derived ASC to improve kidney injury in a rat model of DN. Moreover, diabetic-derived ASC exhibits a similar ability to healthy ASC which is clearly more than expected, but it is not significantly modified by hypoxia preconditioning.

1. Introduction

Diabetic nephropathy (DN) is a severe microvascular complication of diabetes mellitus (DM) [1] that increases the mortality in diabetic patients and represents the main cause of end-stage renal disease (ESRD) [2,3]. Approximately 30% of DM type 1 and 30–40% of DM type 2 patients develop DN [4].

DN is associated with a proinflammatory microenvironment [5,6] and characterized by albuminuria, systemic and intraglomerular hypertension, as well as macro and microstructural alterations such as renal hypertrophy, glomerular basement membrane thickening, tubular atrophy and glomerulosclerosis [1,5,7]. Nowadays, pharmacological DN approaches are mainly targeted to get an adequate control of glycemic levels and blood pressure which is effective to delay the progression of diabetic kidney disease [5,8] but not in the subsequent establishment of ESRD, where DN patients require hemodialysis or renal transplantation [8]. Therefore, novel therapeutic alternatives are needed to preserve renal function in diabetic patients.

Mesenchymal stromal cells (MSCs) have demonstrated ability to improve DN in multiple experimental *in vivo* models [1,3,8–12] through their immunomodulatory and anti-apoptotic effects, as well as by improving kidney parenchymal cells proliferation [11,12] and endogenous progenitor cells proliferation and differentiation [12]. MSCs can be isolated from several tissues including bone marrow (BM), adipose tissue (AT) and umbilical cord blood. Many published studies have demonstrated that MSCs derived from different sources show different properties [13]. In this context, MSCs derived from AT (ASCs) are more stable in their genetic and morphological features, display lower senescence rate in advanced culture passages and may be harvested from AT through minimal invasive methods [13,14]. All these ASCs characteristics have done that this cell type has been widely analyzed and used in cell therapy.

Diabetes is associated with abnormalities in MSCs functionality due to the production of advanced glycosylated end products and the increase of oxidative stress induced by high glucose levels [15,16]. Moreover, it has been reported that ASCs isolated from diabetic patients are more susceptible to cellular senescence and apoptosis [12] which means that, theoretically, its therapeutic possibilities are limited.

The ASCs physiological microenvironment present lower oxygen concentration in comparison to *in vitro* culture conditions, commonly atmospheric conditions (20–21% O_2) [17]. Many studies have demonstrated the effect of hypoxia on ASCs improving their functionality and enhancing their capacities [18], therefore ASCs cultured under hypoxia conditions may constitute a relevant strategy to optimize and improve their clinical applications.

These findings related to the hypoxia preconditioning ability to enhance ASC performance have led us to wonder, on the one hand, if hypoxia could increase the known beneficial effect of ASC in DN and, on the other, if it could correct the expected inability of diabetic rat-derived ASC to exert this effect *in vivo*. To answer these questions, in the present study we have used ASC from healthy and diabetic-induced rats, both cultured under standard conditions or preconditioned in hypoxia, in a model of DN induced by streptozotocin (STZ).

2. Material and methods

2.1. Animals

Experiments were performed using pathogen-free eight-week-old male isogenic Wistar rats that served as donor or recipients of ASCs. Animals were housed in the facilities of the Experimental Animals Service (SAEX) of Cordoba University in an air-conditioned room with constant temperature (20–22 °C) and light-dark cycles of 7 / 17 h.

The Ethical Committee for Bioethics and Biosafety of the University of Cordoba approved this study. All animal protocols were developed under European (86/609 / EEC, 24 November 1986) and Spanish (DOG 214/1997, of July 30) regulations for animal stabling, handling, experimentation, and other scientific purposes. All animals were treated humanely in accordance with Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

2.2. Diabetes induction

Type 1 diabetes was induced through a single intraperitoneal (IP) injection of STZ at a dose of 60 mg per kg of body weight (BW) diluted in 200 μ L of saline solution [19]. Rats included in the control group received an IP injection of saline solution (200 μ L).

2.3. Isolation and expansion of ASCs

ASC were obtained from 5 healthy (cASCs) and 5 STZ-induced diabetic (dASCs) Wistar rats. For this purpose, fifteen days after saline or STZ injection, all surviving donor rats ($n = 10$) were anesthetized with an IP injection of thiopental (50 mg/kg) and humanely sacrificed by exsanguination to collect the AT.

Subcutaneous AT was extracted as previously described [20]. In brief, AT was obtained from inguinal fat, digested with type III collagenase and washed in saline. The stromal fraction resulting was suspended in a minimum essential medium (α -MEM, Lonza) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), antibiotics, ultra-glutamine and rat-fibroblast growth factor-2 (FGF-2), seeded in 25 cm^2 culture flasks (Nunc®, Thermo Scientific) and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 . Culture medium was refreshed twice a week until cell culture reached 80% of confluence (passage 0). Then, adherent cells were harvested by trypsinization and re-seeded in new flasks to expand them up to passage 1. At this point, ASCs were cryopreserved in a FBS + 10% DMSO solution at –196 °C in liquid nitrogen until their use. One week before starting the *in vivo* study, cryopreserved ASCs were thawed and seeded to expand them to passage 2. Both cASCs and dASCs were randomly divided into two groups: normoxia group (N), in which ASCs were cultured seven days under standard conditions (21% O_2 , 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2), and hypoxia group (H), in which ASCs were cultured five days under standard conditions and two more days (48 h) under hypoxia condition (3% O_2 , 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2) in a hypoxic culture chamber (Hypoxia Chamber Biospherix®). Finally, the four cell treatment groups were identified as: cASCs-N, dASCs-N, cASCs-H and dASCs-H.

2.4. ASCs characterization

cASCs-N, dASCs-N, cASCs-H and dASCs-H were immunophenotypically and functionally characterized.

The phenotype was analyzed using conjugated mouse monoclonal antibodies anti-rat CD34 (Santa Cruz Biotechnology®), CD45 and CD90 (BD Pharmingen®), and hamster monoclonal antibody anti-rat CD29 (BD Pharmingen®). Cell samples were acquired on a MACSQuant flow cytometer (Miltenyi Biotech®) and analyzed with the MACSQuantify software, Version 2.5. At least 10,000 events were analyzed from each marker.

The cell functional characterization was performed to evaluate the ASC differentiation capacity using specific adipocyte and osteoblast differentiation media (Lonza). The differentiation process was carried out for two weeks according to the manufacturer's instructions. The differentiated cells were stained with Oil-Red (Sigma Aldrich®) for adipocytes and Alizarin-Red for osteoblasts and observed using a 10 × objective from Nikon Eclipse TE2000-S inverted microscope. Ten digitalized images were acquired per sample with a Nikon DS-U2 camera and analyzed with NIS-Element AR 3.2 software.

2.5. DN experimental study

Initially, to carry out the in vivo study, on day 0, sixty-eight healthy Wistar rats were randomly assigned to two groups: control group (group A, n = 16), that received 200 µL of saline solution through an IP injection as placebo, and DN-induced group (group B, n = 52), that received STZ through a single IP injection at a dose of 60 mg per kg of BW, diluted in 200 µL of saline solution [19] for diabetes induction.

The checkpoints throughout the study were days 0, +15, +30 and +45. The parameters measured at each checkpoint were BW serum glucose, urea and creatinine levels in blood samples and creatinine and albumin in urine. The blood samples were taken from subclavian vein. Animals were kept under fasting conditions for four hours before every blood and urine collection.

Additionally, fifteen days after STZ injection, glycemia was determined in 50 surviving rats of the DN-induced group to confirm the diabetes induction, and urea and creatinine serum concentrations were quantified to verify the incipient renal impairment through the increase of both biochemical parameters on day 15 compared to day 0 [8]. Nine STZ-injected rats shown blood glucose levels lower than 300 mg/dL. These animals were excluded from the study. In this time point, day 15, all other surviving DN-induced rats (n = 41) were randomly assigned to be injected through the central tail vein with 200 µL saline as placebo (placebo group B0, n = 7) or with cASC-N (group B1, n = 6), cASC-H (group B2, n = 9), dASC-N (group B3, n = 9) or dASC-H (group B4, n = 10) respectively. Cellular suspensions were identical in dose (3 × 10⁶ cells) and vehicle (200 µL saline).

On day 30 the body weight of the surviving rats was measured, and blood samples were taken to quantify the glucose, urea and creatinine serum levels. Urine samples were collected to measure creatinine and albumin as control time point. Finally, all surviving rats were humanely sacrificed on day + 45 after DN-induction (30 days after cell suspension or placebo injection). Kidneys were collected for either histopathologic or electron microscopy study.

The experimental design is shown in Fig. 1.

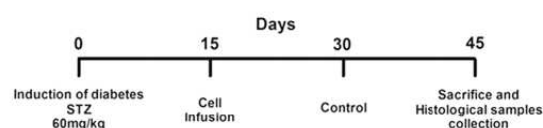


Fig. 1. Animal model experimental design.

2.6. Biochemical analysis

Serum glucose, urea, and creatinine concentrations and urine creatinine levels were quantified by spectrophotometric technics and urine albumin levels were quantified by immunoturbidimetry using a specific antibody (SIEMENS ADVIA Chemistry Karlsruhe, Germany). All quantification were carried out in an automated analyzer (ADVIA-Chemistry XPT, SIEMENS Healthcare Diagnostics®, Karlsruhe, Germany) according to the specific manufacturer's recommendations.

Serum and urine samples were processed in the Clinical Analysis Department of Reina Sofia Hospital in Cordoba and subjected to an internal (UNITY Bio-Rad® Hercules, CA, EEUU) and external (Spanish Society of Clinical Biochemistry and Molecular Pathology) quality control programs. The increase/decrease (Δ) of each biochemical parameter was expressed as the difference of the serum concentration on day 30 compared to day 15, and on day 45 compared to day 30.

2.7. Histopathological analysis

Immediately after sacrifice on day 45, saline was infused into the distal part of the sectioned abdominal aorta to clean the kidney's blood vessels before kidneys were surgically exposed and extracted.

Renal tissues were fixed in 4% formalin, processed, and embedded in paraffin. Three-micrometer paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin (H&E) and periodic acid-Schiff (PAS). Samples were randomly selected by the authors who were unaware of the group from which they came, and a semiquantitative morphological study of glomerular and tubulo-interstitial lesions was performed on 40 high power objective fields using a light microscope (Nikon 115401-Eclipse 50i).

A total of ten lesions characteristic of DN, affecting the glomerular or tubulointerstitial compartments, were independently analyzed. The lesions were defined as follows:

1. Mesangial expansion: Defined as accumulations of homogeneous eosinophilic material within the mesangium [21].
2. Mesangiolysis: Defined as degeneration of mesangial cell and dissolution or attenuation of mesangial matrix characterized by widening and poor staining of the mesangial area [22].
3. Microaneurysm: Defined as dilatation of the capillary lumen which attain aneurysmatic proportions in the glomerular compartment [22].
4. Signs of acute tubular necrosis (ATN): Defined as simplification of the epithelium of the proximal convoluted tubules without tubular basement membrane thickening [23,24]. Moreover, ATN is characterized also by flattening of epithelium and loss of brush border [25].
5. Tubular eosinophilic deposits: Defined as subnuclear accumulations PAS positive material (glycogen) [21].
6. Clear tubular cell changes: Characterized by a clear aspect of the cell cytoplasm caused by deposition of lipids [26].
7. Thickening of tubular basement membrane (TTBM): Defined as thick irregular basement membrane of tubular cells, with decreased diameter of tubules [24].
8. Tubular cysts: Defined as cyst-like enlargement of tubular lumen [27].
9. Interstitial fibrosis: Defined as an increment of extracellular matrix separating tubules in the cortical area [24].
10. Inflammatory infiltrate: Defined as the presence of inflammatory cells within the cortical interstitium [24].

All images were taken with a Nikon Camera Control Unit DS-U2 and digitalized with the software NIS-Element 3.0.

Each type of injury was independently analyzed to assign a specific grade. For this, a semi-quantitative score was constructed based on the percentage in which the lesion affected the glomerular or

tubulointerstitial compartment. Thus, zero points were awarded if the glomeruli, tubules or interstitium were normal, without presenting lesions; and one, two, three or four points respectively if $\leq 25\%$, 26–50%, 51–75% or $\geq 75\%$ of glomeruli, tubules or interstices showed lesions. The study was conducted by two expert pathologists who were blinded to the origin of the sample and to the results of the analysis performed by the other.

2.8. Transmission electron microscopy analysis

Kidneys derived from every experimental group were subjected to electron microscopy examination. For this purpose, kidneys were washed with a saline buffer phosphate (PBS) solution and fixed with a 2.5% glutaraldehyde solution in 0.1 mol/L of phosphate buffer pH 7.4 (Sigma Aldrich®) at 4 °C immediately after their extraction. Excised kidneys were cut into thin slices and immersed in fresh fixative solution for an additional 24 h at 4 °C. Kidney sections were washed several times with PBS and post-fixed in 1% (mass/volume) osmium tetroxide (OsO₄) in distilled water, dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in epoxy resin. The embedded sections were sliced into ultrathin sections of 100 nm with a LKB III ultramicrotome and stained with saturated uranyl acetate and lead citrate for microscopic examination. Ultrastructural analysis of kidney samples was performed using a Jeol Jem 1400 high-resolution transmission electron microscope (TEM). Thirty photomicrographs per sample were observed to analyze the ultramorphological characteristics of renal tissue from each experimental group to supplement the results derived from the histological analysis. This study was performed by two experts in renal pathology and electron microscopy blinded to treatments.

2.9. Statistical analysis

The software PASW Statistic 18 (SPSS®, IBM) was used for statistical analysis. The values of the variables did not follow a normal distribution (according to the Shapiro-Wilks test), so non-parametric tests were performed. The Kruskal-Wallis test was applied to perform multiple group comparisons at the same time points. U Mann-Whitney test was used for the pairwise comparison of variables. Results were expressed as Mean \pm Standard Error (SEM) and statistical significance was accepted at $p \leq 0.05$. Statistical Graphs were carried out using GraphPrism 5.0 (GraphPad Software®, Inc., San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Characterization of the ASCs

The four ASCs populations studied were homogeneously positive (> 95%) for CD29 and CD90 and negative (< 5%) for CD34 and CD45, regardless their origin (healthy or diabetic rats) and whether or not they were pre-conditioned in hypoxia.

Similarly, all of them showed ability to differentiate into adipocytes and osteoblasts demonstrated by homogeneous lipid-laden adipocytes and calcium deposits, respectively (*data not shown*).

3.2. Body weight and biochemical analysis

On day 0, the BW, serum glucose, urea and creatinine concentrations, urine albumin levels and urine albumin/creatinine ratio corresponded with normal values for all healthy rats initially included in the study. Fifteen days after STZ-injection, the BW of the rats included in the DN-induced group was significantly lower (299.54 ± 4.48 vs. 360.24 ± 8.79 g, $p \leq 0.05$) and serum glucose values were significantly higher than those observed in control group (493.2 ± 10.53 vs. 171.93 ± 4.51 mg/dL, $p \leq 0.001$).

Serum urea and creatinine concentrations were higher in DN-induced group than in control group, but the differences were not

statistically significant (urea: 32 ± 1.18 vs. 27 ± 1 mg/dL, $p = ns$; creatinine: 0.43 ± 0.02 vs. 0.37 ± 0.03 mg/dL, $p = ns$).

The results showed that on day 15 the albumin/creatinine ratio was significantly higher in DN-induced group than in control group (0.39 ± 0.05 vs. 0.06 ± 0.01 , $p \leq 0.001$).

On days +30 and +45 none of the four DN-induced groups that received cell treatment showed significant changes in body weight, serum glucose, urea and creatinine levels, urine albumin concentration or urine albumin/creatinine ratio compared to the DN-induced group that received placebo.

Interestingly, only the group that received ASC isolated from healthy rats preconditioned in hypoxia showed a reduction in glucose and creatinine levels between day +30 and +45 although it did not reach statistical significance.

Fig. 2 shows the BW (A), the glucose (B), urea (D) and creatinine (F) levels, and the urine albumin concentration (H) measured on days 15, 30 and 45. In addition, Fig. 2 shows the net increase/decrease (Δ) observed in each serum biochemical parameter (glucose: C, urea: E and creatinine: G) between days +15 and +30, and between days +30 and +45 as well as the urine albumin/creatinine ratio (I).

3.3. Semiquantitative histopathological study

The samples of renal tissue derived from control rats showed a normal unaltered morphology, both at glomerular and tubulointerstitial levels (Fig. 3A).

In sharp contrast, kidneys from diabetic rats that received placebo, exhibited intense histological damage secondary to DN both at the glomerular level (mesangial expansion, mesangiolysis, and microaneurysms) and in the tubules (eosinophilic deposits, changes to clear cells and signs of acute tubular necrosis). An important inflammatory infiltrate associated to DN was also evidenced at the interstitial compartment (Fig. 3B).

Histological samples from rats treated with any of the four types of ASCs showed the same types of lesions characteristic of DN, although in a much smaller proportion as shown in the semi-quantitative analysis that demonstrated a perceptible improvement at the histological level in the four groups treated with ASC (Fig. 3C).

The semiquantitative analysis of the kidneys of controls and DN-induced rats receiving placebo allowed to establish the minimum and maximum score respectively for each lesion.

The individualized analysis of each type of lesion showed that animals treated with any of the four cell types significantly reduced the presence of mesangial expansion, mesangiolysis, microaneurysms and ATN compared to the group that received placebo ($p \leq 0.05$ to ≤ 0.001) (Fig. 4A–D) without any significant differences between the groups receiving different cell types.

The rest of the lesions showed overall significant improvement in the DN-induced rats treated with ASC compared to those treated with placebo, although this improvement was somewhat less uniform between the different ASC types.

In particular, DN-induced rats treated with cASC-H reduce four types of lesions (clear tubular cell changes, TTBM, tubular cysts and interstitial fibrosis) significantly more than those treated with their non-preconditioned counterparts (cASC-N) demonstrating a better performance of cASC attributable to hypoxia preconditioning. The reduction in clear tubular cell changes is significantly better in rats receiving cASC-H than in those receiving cASC-N ($p \leq 0.05$), although both groups show significant improvement compared to those treated with placebo. Interestingly, in the case of TTBM, tubular cysts and interstitial fibrosis only DN-induced rats receiving cASC-H show differences with placebo group ($p \leq 0.01$), while those treated with cASC-N did not.

Regarding the *in vivo* functionality of ASC isolated from diabetic rats, remarkably we did not find statistically significant differences in their regenerative capacity compared to ASC derived from healthy rats, when both were cultured under standard condition in none of the lesions

M. Carmona et al.

Pathology - Research and Practice 230 (2022) 153756

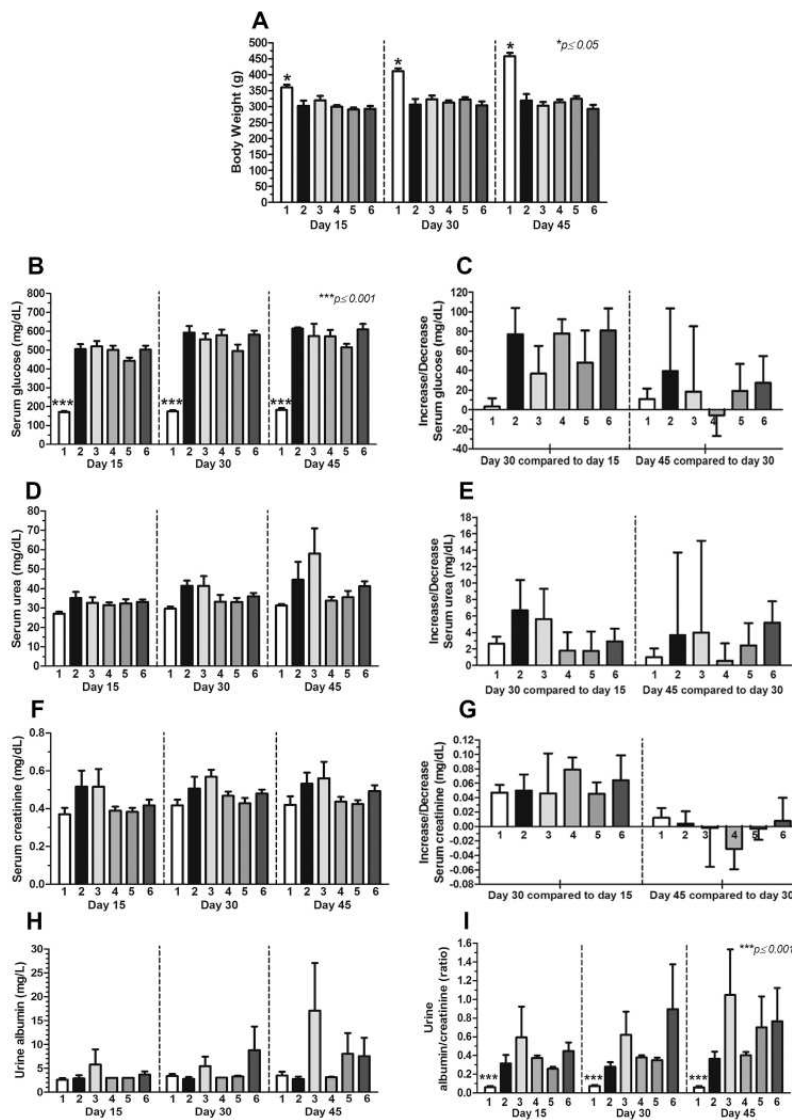


Fig. 2. Body weight, biochemical parameters at days 15, 30 and 45 and comparison between different checkpoints. A: Body weight; B: Serum glucose concentration; C: Increases/decreases of glucose serum concentration on day 30 and day 45⁽¹⁾; D: Serum urea concentration; E: Increases/decreases of urea serum concentration on day 30 and day 45⁽¹⁾; F: Serum creatinine concentration; G: Increases/decreases of creatinine serum concentration on day 30 and day 45⁽¹⁾; H: Urine albumin concentration; I: Urine albumin-creatinine ratio. *Experimental rat groups*: 1, Control group; 2, Placebo group(B0); DN-induced rats treated with saline (placebo); 3, Group B1: DN-induced rats treated with ASCs derived from healthy donors expanded under normoxia condition; 4, Group B2: DN-induced rats treated with ASCs derived from healthy donors 48 h hypoxia preconditioned; 5, Group B3: DN-induced rats treated with ASCs derived from diabetic-induced donors expanded under normoxia condition; 6, Group B4: DN-induced rats treated with ASCs derived from diabetic-induced donors 48 h hypoxia preconditioned. Data are expressed as mean \pm SEM. **p-Value* \leq 0.05, ****p-Value* \leq 0.001. ⁽¹⁾Bars represent the net increase/decrease calculated as the difference between values on day 30 or 45 compared to day 15 or 30.

studied (Fig. 4A–J). Contrary to the marked differences between ASCs isolated from healthy rats due to the preconditioning, the regenerative capacity of ASCs derived from diabetes-induced rats did not change after hypoxia preconditioning with the sole exception of the increased ability to reduce the presence of tubular cysts ($p \leq 0.01$).

Finally, it is striking that only the administration of healthy ASCs hypoxia preconditioned could significantly reduce the inflammatory infiltrate compared to placebo injection ($p \leq 0.05$), without any significant reduction after treatment with diabetic ASCs ($p = 0.92$) or healthy ones ($p = 0.39$) without preconditioning.

The renal ultrastructure was evaluated by means of electron microscopy that allows to confirm the histopathology findings. DN-induced rats that received placebo showed the most deteriorated renal tissue including segmental foot process effacement (SFPE) in the glomerular structure (Fig. 3B), an injury that was only observed in this group. DN-

induced rats treated with ASC, regardless of cell type, exhibited intermediate ultrastructural characteristics between control and placebo groups with variable presence of mesangial expansion, microaneurysms, ATN signs, and inflammatory infiltrate (Fig. 3C).

4. Discussion

Our results demonstrate that ASC infusion isolated from healthy and diabetes-induced rats attenuates diabetic nephropathy injuries, although superior efficacy of healthy ASCs is observed particularly when they are preconditioned in hypoxia.

In this study, we have used a well-known and validated model [3,8, 28–30] that resembles human DN characterized by severe microvascular complications associated with a proinflammatory microenvironment [5, 6], intraglomerular hypertension, macro and microstructural renal

M. Carmona et al.

Pathology - Research and Practice 230 (2022) 153756

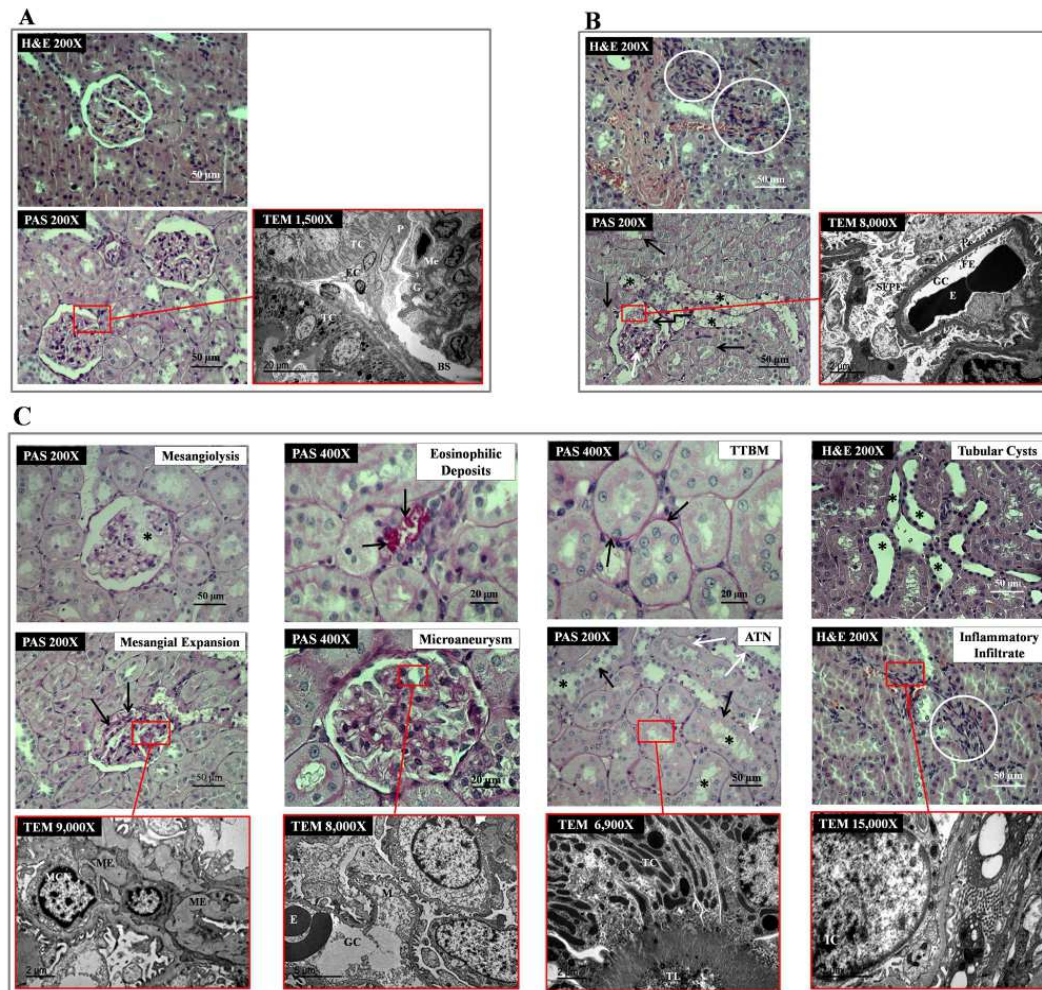


Fig. 3. Renal morphology (*Hematoxylin & Eosin (H&E) / Periodic Acid-Schiff (PAS) staining*) and ultrastructure study (*Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis*). A, Control group. *H&E and PAS (200x)*: No lesions were observed. *TEM (1500x)*: Podocyte (P); Tubular cell (TC); Endothelial cell (EC); Glomerulus (G); Bowman's space (BS); Mesangium (Me). B, Placebo group. *H&E (200x)*: Inflammatory infiltrate (white circles). *PAS (200x)*: Mesangial expansion (white arrow); capillary dilatation (black angular arrow); clear cell changes (black asterisks); ATN (black arrows). *TEM (8000x)*: Segmental foot process effacement (SFPE); Pedicels (Pe); Fenestrated endothelium (FE); Glomerular capillary (GC); Erythrocyte (E). C, DN-induced groups ASC received *PAS*: Mesangiolytic (black asterisk) (200x); Tubular eosinophilic deposits (black arrows) (400x); Thickened tubular basement membrane (TTBM) (black arrows) (400x); Mesangial expansion (black arrows) (200x); Microaneurysm (400x); Signs of acute tubular necrosis (ATN) (black arrows: brush border loosed; black asterisks: tubular lumens dilated; white arrows: epithelium flattened) (200x). *H&E*: Tubular cysts (black asterisks) (200x); Inflammatory infiltrate (white circles) (200x). *TEM (Red rectangles)*: Mesangial expansion (ME) and Mesangial cell nucleus (MCN) (9000x); Microaneurysm (M), Erythrocyte (E) and Glomerular capillary (GC) (8000x); Tubular cell (TC) and Tubular lumen (TL) (6900x); Inflammatory cell (IC) (15,000x).

hypertrophy, glomerular and tubular basement membrane thickening, tubular atrophy and glomerulosclerosis [1,5,7]. We chose to administer the cellular products on the fifteenth day after the induction of diabetes because at this time the evolution of the incipient renal damage had been demonstrated through the increase of creatinine and urea serum levels, and renal histopathology confirmed by TEM mimicked the established human DN (*data not shown*).

The use of MSCs in DN is not new. Several authors have reported the potential application of MSCs derived from healthy subjects to recover renal functionality and histological injuries through their immunosuppressive and anti-inflammatory properties [1,3,8–12]. Moreover, it has

even been shown in two models in mice that MSCs can regenerate the pancreatic islets in addition to the glomeruli, contributing even more to the recovery of kidney function through the normalization of hyperglycemia. Both the MSCs themselves [3,8,29] and their cytokines and growth factors, secreted in soluble form [11] or through exosomes [31,32], have shown beneficial effects on DN in STZ-induced diabetic rats.

However, the potential enhancement of the nephroprotective properties of expanded MSCs under low oxygen concentration has been explored in only a few studies, none of them in the particular context of DN. Despite different animal models and heterogeneous protocols for hypoxia preconditioning, there is consensus that a short exposure to low

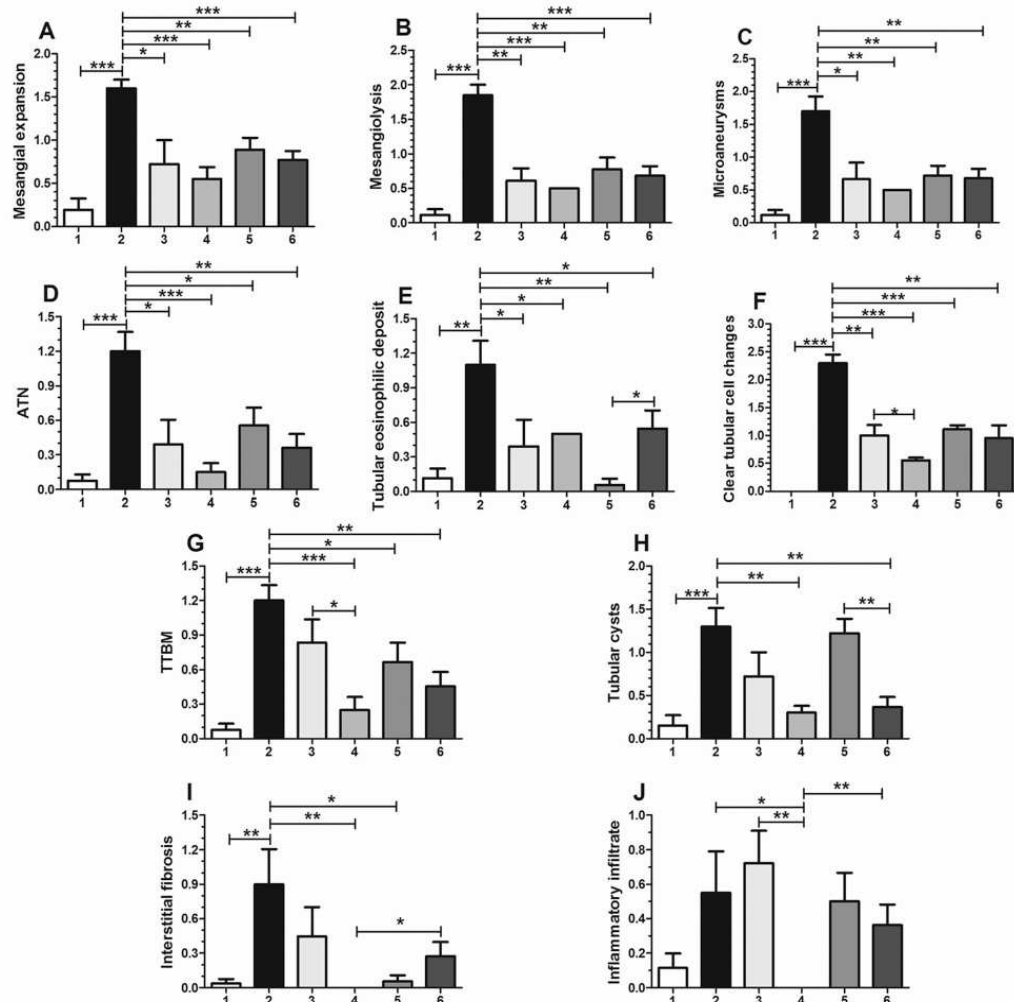


Fig. 4. Semi-quantitative morphological analysis of renal tissue. Renal lesions identified: A, Mesangial expansion, B, Mesangiolyis, C, Microaneurysms, D, Signs of acute tubular necrosis (ATN), E, Tubular eosinophilic deposits, F, Clear tubular cell changes, G, Thickening of tubular basement membrane (TTBM), H, Tubular cysts, I, Interstitial fibrosis and J, Inflammatory infiltrate. Bars represent the experimental rat groups: 1, Control group; 2, Placebo group (B0): DN-induced rats treated with placebo; 3, Group B1: DN-induced rats treated with ASCs derived from healthy donors expanded under normoxia condition; 4, Group B2: DN-induced rats treated with ASCs derived from healthy donors 48 h hypoxia preconditioned; 5, Group B3: DN-induced rats treated with ASCs derived from diabetic-induced donors expanded under normoxia condition; 6, Group B4: DN-induced rats treated with ASCs derived from diabetic-induced donors 48 h hypoxia preconditioned. *p*-Value: $p \leq 0.05$ (*); $p \leq 0.01$ (**); $p \leq 0.001$ (***)). Data are expressed as mean \pm SEM.

oxygen concentration can improve the ability of healthy MSC to regenerate renal integrity after acute and chronic renal injury induced by toxics or ischemia-reperfusion [33–38].

Moreover, *in vitro* studies have demonstrated that the exposure of MSC to hypoxia increases the expression of antiapoptotic and angiogenic factors such as VEGF and FGFb [37], and increases the capacity to secrete extracellular vesicles which induce different antiapoptotic, angiogenic and anti-oxidative stress responses in renal tissue [38]. Regarding the immunomodulatory properties it has been demonstrated that immunosuppressive capacity of MSCs is maintained under hypoxic conditions [36].

The physiological stress of diabetes alters certain properties of MSCs such as changes in angiogenesis/vasculogenesis capacity, altered pro-

inflammatory cytokine secretion, increased oxidative stress markers, impaired cellular proliferation and differentiation, and increased apoptotic and senescence pathways [39–45]. In particular, disturbances in MSC-mediated angiogenesis led to several complications including diabetic nephropathy, so it seems highly unlikely that MSCs isolated from diabetic rats could have a beneficial effect on DN in our model. However, surprisingly we have found that DN-induced rats treated with diabetic ASC improve most DN histological lesions although somewhat less than healthy ASC. There is no precise information in the literature about intravenous injection of diabetic-ASCs as DN-treatment, but Nagaishi et al. [46] found that BM-ASC derived from both type 1 and type 2 diabetes models did not ameliorate renal injury in STZ-induced diabetic mice. Beside the possible differences between ASC and

BM-MSc, this model is different from ours because the cell infusion is performed 4 weeks after the induction of diabetes; it is possible that in our model in which cells are infused at two weeks, kidney damage is more incipient and can be reversed even by diabetic ASC despite their functional alterations, something that cannot occur in more consolidated kidney lesions after 4 weeks. On the other hand, ASCs derived from diabetic animals have shown the ability to improve wound healing and skin graft in diabetic rats, [47–49] which is consistent with our results in the sense that it is possible that the profound functional alterations detected *in vitro* in diabetic ASCs do not necessarily lead to a complete abolition of their functionality *in vivo*.

Concerning the renal function, we have analyzed serum creatinine and urea concentration, two and four weeks after cell infusion (days +30 and +45), measured the net increase/decrease between these two-week intervals (days +15 to +30 and +30 to +45) and calculated the urine albumin/creatinine ratio on day +15, +30 and +45. No significant changes were observed in the renal function of DN-induced rats receiving cell therapy in comparison with placebo receiving rats, but a decrease in serum creatinine level was observed in DN-induced rats treated with cASC-H during the third to fourth week after cell infusion. This aspect is very interesting since DN is a progressive process in which serum urea and creatinine levels increase gradually and irreversibly and a reduction in serum levels is not expected, not even in a non-significant way. The fact that the changes in urea and creatinine levels do not reach significant values may be explained with the observations of Comai et al., who demonstrated that histological evidences of DN precede its clinical and biochemical alterations, therefore DN is commonly underdiagnosed at early stages [50]. In fact, the diabetic-induced rats in our model did not show statistically significant increases in urea and creatinine levels at day + 15, despite DN histological lesions. Hence, we suggest that the asynchrony between the development of clinical and anatomopathological manifestation of DN could also be observed in the kidney improvement process.

Previous studies on STZ-induced diabetic rats have reported that hyperglycemia promotes the development of DN objectified in pathologic features such as gradual thickening of the glomerular and tubular basement membrane, glomerular hypertrophy and mesangial matrix expansion with accumulation of several matrix proteins, such as collagen type I, laminin β 1, and fibronectin in the mesangium [51]. These molecules contribute to an increased kidney and glomerular volume in addition to inducing mesangial expansion with a progressive collapse of the capillary lumen [52]. Mesangiolysis is the dissolution or attenuation of mesangial matrix and degeneration of mesangial cells, and it is associated with the development of microaneurysms involving lysis of the matrix and degeneration in the cell adhesion points of the capillary basement membranes to the mesangium [22]. Moreover, hyperglycemia induces changes in various renal cell types, oxidative stress and inflammation which are linked with DN development [53]. The initial purpose of the inflammatory process is to repair the renal tissue damage; however the interstitial fibrosis is conditioned by the activation of inflammatory cells so fibrosis is an uncompleted and failed wound healing process [54].

The results of the histopathological analysis showed that DN-induced animals receiving placebo displayed all lesions characteristic of DN affecting between 25% and 50% of the glomeruli, tubules or interstitium as average, while the IV injection of any type of ACS (from healthy or diabetic rats, preconditioned or not) improves the DN lesions, to a greater or lesser degree, compared to DN-induced rats that received placebo.

Regarding the group of DN-induced rats treated with cASC-N, these results confirm the previous ones from others who found that the infusion of healthy MSCs improved DN-related tissular injuries at both the glomerular and tubular compartments [3,8,13,14]. In addition to the injuries described in these previous studies, we have also found improvement after treatment with any ASC type in PAS-positive tubular eosinophilic deposits and clear tubular cell changes that are lesions not

widely described in the literature [30,52,55–59]. PAS staining is used to detect and measure glycogen levels [60,61] so we can suggest that the PAS-positive tubular eosinophilic deposits could correspond to Armanni-Ebstein lesions that are related with severe hyperglycemia in humans [52]. On the other hand, clear tubular cells changes, consisting of pale cells with apparently empty cytoplasm mostly caused by accumulation of glycogen deposits or lipids [26], were reported in diabetic rats after 50 days of STZ induction [62], and two case reports showed the association between diabetes and presence of clear cells in eccrine glands after PAS staining [26,63]. Therefore, although clear cells are rare signs of DN induced by STZ they should be considered in STZ animal models and possibly in humans as a sign of DN. In fact, the improvement observed after ASC infusion in these two tubular lesions (tubular eosinophilic deposits and clear cell changes) corresponds to a reduction in tissue glycogen accumulation that could constitute an indirect sign of metabolic improvement in the treated animals.

Although the beneficial effect of MSCs on DN has been previously reported, there are no published data on the impact of hypoxic preconditioning on the ability of ACS to improve DN-associated histological damage. Using our semi-quantitative histological analysis, kidneys from DN-induced rats treated with ASCs derived from healthy rats and hypoxia-preconditioned showed the highest reductions of these renal lesions being the only kind of ASC among the four tested that induces improvement in the ten types of lesions analyzed both at the glomerular and tubulointerstitial level. Interestingly, ASC isolated from healthy rats and hypoxia preconditioned significantly reduced the inflammatory infiltrate within the cortical interstitium which when accompanied by fibrosis interstitial is a well-known adverse prognostic factor for renal survival [21]. Therefore, our results suggest that the infusion of healthy ASCs hypoxia preconditioned could even improve the prediction of renal survival in DN.

Despite the important deleterious effects of diabetes on ASCs functionality, our results reveal that ASCs isolated from STZ-induced diabetic rat maintain the ability to regenerate the histological lesions of diabetic nephropathy although slightly less than healthy-derived ones. Although these results seem surprising at first, it is important to bear in mind that the main mechanism of action of MSCs in the improvement of DN consists of the secretion of soluble cytokines and exosomes that carry immunosuppressive factors [1,11,31,32], and this function has not been well studied in diabetic ASC, so it is not clear to what extent it may be altered.

The hypoxia-dependent improvement in the nephroprotective ability of healthy ASC seen in our study was also minimally observed in diabetic ASCs, in the concrete case of tubular cysts. There is no previous information about the impact of hypoxia preconditioning on diabetic ASCs functionality, but the modest effect observed in our study may lead us to think that hypoxia is insufficient stimulus to restore some potential ASC alterations associated to diabetes.

5. Conclusion

In summary, the present work demonstrates that hypoxia preconditioning enhances the ability of healthy rat-derived ASC to improve kidney injury in a rat model of DN. Moreover, diabetic rat-derived ASC exhibits a similar ability to healthy ASC which is clearly more than expected, but it is not significantly modified by hypoxia preconditioning.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing commercial, proprietary or financial interests nor personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We are grateful to the Department of Pathology of Reina Sofia

M. Carmona et al.

Pathology - Research and Practice 230 (2022) 153756

University Hospital (Cordoba, Spain) for histological samples processing and technical advice, to the Department of Clinical Analysis of Reina Sofia University Hospital (Cordoba, Spain) for serum biochemical analysis, to the Department of Anatomy and Comparative Pathology of University of Cordoba (Spain) for learning and technical advice, and to Central Service of Research Support of University of Cordoba (SCAI) (Spain) for electron microscopy technical support.

This study was supported by a program Grant no. PI14/00087 from the Carlos III Institute of Health (Spanish acronym: ISCIII), which is managed under the Ministry of Science and Innovation, Government of Spain.

References

- [1] H. Li, P. Rong, X. Ma, W. Nie, C. Chen, C. Yang, J. Zhang, Q. Dong, W. Wang, Paracrine effect of mesenchymal stem cell as a novel therapeutic strategy for diabetic nephropathy, *Life Sci.* 215 (2018) 113–118, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.11.001>.
- [2] U.A.A. Sharaf El Din, M.M. Salem, D.O. Abdulazim, Diabetic nephropathy: time to withhold development and progression – a review, *J. Adv. Res.* 8 (4) (2017) 363–373, <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.04.004>.
- [3] M.T. Abdel Aziz, M.A. Wassef, H.H. Ahmed, L. Rashed, S. Mahfouz, M.I. Aly, R. E. Hussein, M. Abdelaziz, The role of bone marrow derived-mesenchymal stem cells in attenuation of kidney function in rats with diabetic nephropathy, *Diabetol. Metab. Syndr.* 6 (1) (2014) 34, <https://doi.org/10.1186/1758-5996-6-34>.
- [4] A.H. Hamza, W.M. Al-Bishri, L.A. Damiani, H.H. Ahmed, Mesenchymal stem cells: a future experimental exploration for recession of diabetic nephropathy, *Ren. Fail.* 39 (1) (2017) 67–76, <https://doi.org/10.1080/0886022X.2016.1244080>.
- [5] A.K.H. Lim, Diabetic nephropathy – complications and treatment, *Int. J. Nephrol. Renov. Dis.* 7 (2014) 361–381, <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S40172>.
- [6] J.F. Navarro-González, C. Mora-Fernández, M. Muros de Fuentes, J. García-Pérez, Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy, *Nat. Rev. Nephrol.* 7 (6) (2011) 327–340, <https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.51>.
- [7] O.E. Ayodele, C.O. Alebiosu, B.L. Salako, Diabetic nephropathy—a review of the natural history, burden, risk factors and treatment, *J. Natl. Med. Assoc.* 96 (11) (2004) 1445–1454.
- [8] Y. Li, J. Liu, G. Liao, J. Zhang, Y. Chen, L. Li, L. Li, F. Liu, B. Chen, G. Guo, C. Wang, L. Yang, J. Cheng, Y. Lu, Early intervention with mesenchymal stem cells prevents nephropathy in diabetic rats by ameliorating the inflammatory microenvironment, *Int. J. Mol. Med.* 41 (5) (2018) 2629–2639, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3501>.
- [9] X. An, G. Liao, Y. Chen, A. Luo, J. Liu, Y. Yuan, L. Li, L. Yang, H. Wang, F. Liu, G. Yang, S. Yi, Y. Li, J. Cheng, Y. Lu, Intervention for early diabetic nephropathy by mesenchymal stem cells in a preclinical nonhuman primate model, *Stem Cell Res. Ther.* 10 (1) (2019) 363, <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1401-z>.
- [10] Y. Bai, J. Wang, Z. He, M. Yang, L. Li, H. Jiang, Mesenchymal stem cells reverse diabetic nephropathy disease via lipoxin A4 by targeting transforming growth factor β (TGF- β)/smad pathway and pro-inflammatory cytokines, *Med. Sci. Monit.* 25 (2019) 3069–3076, <https://doi.org/10.12659/MSM.914860>.
- [11] K. Nagaiishi, Y. Mizue, T. Chikenji, M. Otani, M. Nakano, N. Konari, M. Fujimiya, Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic nephropathy via the paracrine effect of renal trophic factors including exosomes, *Sci. Rep.* 6 (2016) 34842, <https://doi.org/10.1038/srep34842>.
- [12] J. Paulini, E. Higuti, R.M. Bastos, S.A. Gomes, E.B. Rangel, Mesenchymal stem cells as therapeutic candidates for halting the progression of diabetic nephropathy, *Stem Cells Int.* 2016 (2016), 9521629, <https://doi.org/10.1155/2016/9521629>.
- [13] M. Strioga, S. Viswanathan, A. Darinskas, O. Slaby, J. Michalek, Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells, *Stem Cells Dev.* 21 (14) (2012) 2724–2752, <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0722>.
- [14] S. Mohamed-Ahmed, I. Fristad, S.A. Lie, S. Suliman, K. Mustafa, H. Hindenes, S. B. Idris, Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison, *Stem Cell Res. Ther.* 9 (1) (2018) 168, <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0914-1>.
- [15] N. Saki, M.A. Jalalifar, M. Soleimani, S. Hajizamani, F. Rahim, Adverse effect of high glucose concentration on stem cell therapy, *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.* 7 (3) (2013) 34–40.
- [16] Y. Liu, S.C. Tang, Recent progress in stem cell therapy for diabetic nephropathy, *Kidney Dis.* (2016) 20–27, <https://doi.org/10.1159/000441913>.
- [17] L.B. Boyette, O.A. Creasey, L. Guzik, T. Lozito, R.S. Tuan, Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells display enhanced clonogenicity but impaired differentiation with hypoxic preconditioning, *Stem Cells Transl. Med.* 3 (2) (2014) 241–254, <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0079>.
- [18] J.R. Choi, B. Pingguan-Murphy, W.A. Wan Abas, M.A. Noor Azmi, S.Z. Omar, K. H. Chua, W.K. Wan Safwani, Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 448 (2) (2014) 218–224, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.096>.
- [19] P. Balakumar, V.A. Chakkarwar, V. Kumar, A. Jain, J. Reddy, M. Singh, Experimental models for nephropathy, *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 9 (4) (2008) 189–195, <https://doi.org/10.1177/1470320308098343>.
- [20] M.D. Carmona, S. Cañadillas, M. Romero, A. Blanco, S. Noguera, C. Herrera, Intramyocardial bone marrow mononuclear cells versus bone marrow-derived and adipose mesenchymal cells in a rat model of dilated cardiomyopathy, *Cytotherapy* 19 (8) (2017) 947–961, <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.05.006>.
- [21] J.C. Jennette, L. Olson Jean, Fred G. Silva, Vivette D. D'Agati, *Heptinstall's Pathology of the Kidney*, Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- [22] T. Morita, J. Chung, Mesangiolysis, *Kidney Int.* 24 (1) (1983) 1–9, <https://doi.org/10.1038/ki.1983.119>.
- [23] P. Jablonski, B.O. Howden, D.A. Rae, C.S. Birrell, V.C. Marshall, J. Tange, An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia, *Transplantation* 35 (3) (1983) 198–204, <https://doi.org/10.1097/00007890-198303000-00002>.
- [24] Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathological Society, I.S. Roberts, H.T. Cook, S. Troyanov, C.E. Alpers, A. Amore, et al., The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility, *Kidney Int.* 76 (5) (2009) 546–556, <https://doi.org/10.1038/ki.2009.168>.
- [25] A.B. Fogo, M.A. Lusco, B. Najafian, C.E. Alpers, *AJKD atlas of renal pathology: ischemic acute tubular injury*, *Am. J. Kidney Dis.* 67 (5) (2016), e25, <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2016.03.003>.
- [26] S. Signoretti, G. Amnissi, S. Occhiuto, P. Ruatti, T. Faraggiana, Papular clear cell hyperplasia of the eccrine duct in a diabetic, *Br. J. Dermatol.* 135 (1) (1996) 139–143.
- [27] H. Sugimoto, G. Grahovac, M. Zeisberg, R. Kalluri, Renal fibrosis and glomerulosclerosis in a new mouse model of diabetic nephropathy and its regression by bone morphogenic protein-7 and advanced glycation end product inhibitors, *Diabetes* 56 (7) (2007) 1825–1833, <https://doi.org/10.2337/d006-1226>.
- [28] R.H. Lee, M.J. Seo, R.L. Reger, J.L. Spees, A.A. Pulin, S.D. Olson, D.J. Prockop, Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (46) (2006) 17438–17443, <https://doi.org/10.1073/pnas.0608249103>.
- [29] F. Ezquer, M. Giraud-Billoud, D. Carpio, F. Cabezas, P. Conget, M. Ezquer, Progenerative microenvironment triggered by donor mesenchymal stem cells preserves renal function and structure in mice with severe diabetes mellitus, *BioMed Res. Int.* 2015 (2015), 164703, <https://doi.org/10.1155/2015/164703>.
- [30] G.H. Tesch, T.J. Allen, Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy, *Nephrology* 12 (3) (2007) 261–266, <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2007.00796.x>.
- [31] Z.Z. Jiang, Y.M. Liu, X. Niu, J.Y. Yin, B. Hu, S.C. Guo, Y. Fan, Y. Wang, N.S. Wang, Exosomes secreted by human urine-derived stem cells could prevent kidney complications from type I diabetes in rats, *Stem Cell Res. Ther.* 7 (2016) 24, <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0287-2>.
- [32] N. Ebrahim, I.A. Ahmed, N.I. Hussien, A.A. Dessouky, A.S. Farid, A.M. Elshazly, O. Mostafa, W. Gazzar, S.M. Sorour, Y. Selem, A.M. Hussein, D. Sabry, Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorated diabetic nephropathy by autophagy induction through the mTOR signaling pathway, *Cells* 7 (12) (2018) 226, <https://doi.org/10.3390/cells7120226>.
- [33] J.M. Overath, S. Gauer, N. Obermüller, R. Schubert, R. Schäfer, H. Geiger, P. C. Baer, Short-term preconditioning enhances the therapeutic potential of adipose-derived stromal/stem cell-conditioned medium in cisplatin-induced acute kidney injury, *Exp. Cell Res.* 342 (2) (2016) 175–183, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.03.002>.
- [34] W. Zhang, L. Liu, Y. Huo, Y. Yang, Y. Wang, Hypoxia-pretreated human MSCs attenuate acute kidney injury through enhanced angiogenic and antioxidative capacities, *Biomed. Res. Int.* 2014 (2014), 462472, <https://doi.org/10.1155/2014/462472>.
- [35] N. Ishiuchi, A. Nakashima, S. Doi, K. Yoshida, S. Maeda, R. Kanai, Y. Yamada, T. Ike, T. Doi, Y. Kato, T. Masaki, Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells prevent renal fibrosis and inflammation in ischemia-reperfusion rats, *Stem Cell Res. Ther.* 11 (1) (2020) 130, <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01642-6>.
- [36] M. Roemeling-van Rhijn, F.K. Mensah, S.S. Korevaar, M.J. Leijts, G.J. van Osch, J. N. Ijzerman, M.G. Betjes, C.C. Baan, W. Weimar, M.J. Hoogduijn, Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, *Front. Immunol.* 4 (2013) 203, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00203>.
- [37] L. Liu, J. Gao, Y. Yuan, Q. Chang, Y. Liao, F. Lu, Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF, *Cell Biol. Int.* 37 (6) (2013) 551–560, <https://doi.org/10.1002/cbin.10097>.
- [38] F. Collino, J.A. Lopes, S. Corrêa, E. Abdelhay, C.M. Takiya, C.H.C. Wendt, K.R. de Miranda, A. Vieyra, R.S. Lindoso, Adipose-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia: changes in extracellular vesicles secretion and improvement of renal recovery after ischemic injury, *Cell Physiol. Biochem.* 52 (6) (2019) 1463–1483, <https://doi.org/10.33594/00000102>.
- [39] A. Fijany, L.R. Sayadi, N. Khoshab, D.A. Banyard, A. Shaterian, M. Alexander, J. Lakey, K.Z. Paydar, G. Evans, A.D. Widgerow, Mesenchymal stem cell dysfunction in diabetes, *Mol. Biol. Rep.* 46 (1) (2019) 1459–1475, <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4516-x>.
- [40] H. Kim, J.W. Han, J.Y. Lee, Y.J. Choi, Y.D. Sohn, M. Song, Y.S. Yoon, Diabetic mesenchymal stem cells are ineffective for improving limb ischemia due to their impaired angiogenic capability, *Cell Transpl.* 24 (8) (2015) 1571–1584, <https://doi.org/10.3727/096368914X682792>.
- [41] J. Ribot, G. Calipieroumal, J. Paquet, C. Boisson-Vidal, H. Petite, F. Anagnostou, Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition and

M. Carmona et al.

Pathology - Research and Practice 230 (2022) 153756

- angiogenic properties, *J. Cell Mol. Med.* 21 (2) (2017) 349–363, <https://doi.org/10.1111/jcmm.12969>.
- [42] F. Cianfarani, G. Toietta, G. Di Rocco, E. Cesaro, G. Zambruno, T. Odorisio, Diabetes impairs adipose tissue-derived stem cell function and efficiency in promoting wound healing, *Wound Repair Regen.* 21 (4) (2013) 545–553, <https://doi.org/10.1111/wrr.12051>.
- [43] P. Jin, X. Zhang, Y. Wu, L. Li, Q. Yin, L. Zheng, H. Zhang, C. Sun, Streptozotocin-induced diabetic rat-derived bone marrow mesenchymal stem cells have impaired abilities in proliferation, paracrine, antiapoptosis, and myogenic differentiation, *Transpl. Proc.* 42 (7) (2010) 2745–2752, <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.05.145>.
- [44] Y. Meng, J. Ji, W. Tan, G. Guo, Y. Xia, C. Cheng, Z. Gu, Z. Wang, Involvement of autophagy in the procedure of endoplasmic reticulum stress introduced apoptosis in bone marrow mesenchymal stem cells from nonobese diabetic mice, *Cell Biochem. Funct.* 34 (1) (2016) 25–33, <https://doi.org/10.1002/cbf.3161>.
- [45] C. Cramer, E. Freisinger, R.K. Jones, D.P. Slakey, C.L. Dupin, E.R. Newsome, E. U. Alt, R. Izadpanah, Persistent high glucose concentrations alter the regenerative potential of mesenchymal stem cells, *Stem Cells Dev.* 19 (12) (2010) 1875–1884, <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0009>.
- [46] K. Nagaishi, Y. Mizue, T. Chikenji, M. Otani, M. Nakano, Y. Saijo, H. Tsuchida, S. Ishioka, A. Nishikawa, T. Saito, M. Fujimiya, Umbilical cord extracts improve diabetic abnormalities in bone marrow-derived mesenchymal stem cells and increase their therapeutic effects on diabetic nephropathy, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 8484, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08921-y>.
- [47] Y. Sun, L. Song, Y. Zhang, H. Wang, X. Dong, Adipose stem cells from type 2 diabetic mice exhibit therapeutic potential in wound healing, *Stem Cell Res. Ther.* 11 (1) (2020) 298, <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01817-1>.
- [48] R. An, Y. Zhang, Y. Qiao, L. Song, H. Wang, X. Dong, Adipose stem cells isolated from diabetic mice improve cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice, *Stem Cell Res. Ther.* 11 (1) (2020) 120, <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01621-x>.
- [49] A. Zografou, O. Papadopoulos, C. Tsigris, N. Kavantzias, E. Michalopoulos, T. Chatzistamatiou, A. Papassavas, C. Stavropoulou-Gioka, I. Dontas, D. Perrea, Autologous transplantation of adipose-derived stem cells enhances skin graft survival and wound healing in diabetic rats, *Ann. Plast. Surg.* 71 (2) (2013) 225–232, <https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e31826a01a>.
- [50] G. Comai, D. Malvi, A. Angeletti, F. Vasuri, S. Valente, F. Ambrosi, I. Capelli, M. Ravaoli, G. Pasquinelli, A. D'Errico, A. Fornoni, G. La Manna, Histological evidence of diabetic kidney disease precede clinical diagnosis, *Am. J. Nephrol.* 50 (1) (2019) 29–36, <https://doi.org/10.1159/000500353>.
- [51] M.M. Mariappan, Signaling mechanisms in the regulation of renal matrix metabolism in diabetes, *Exp. Diabetes Res.* 2012 (2012), 749812, <https://doi.org/10.1155/2012/749812>.
- [52] M. Pourghasem, H. Shafiq, Z. Babazadeh, Histological changes of kidney in diabetic nephropathy, *Casp. J. Intern. Med.* 6 (3) (2015) 120–127 (Summer).
- [53] A.A. Elmarakby, J.C. Sullivan, Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy, *Cardiovasc. Ther.* 30 (1) (2012) 49–59.
- [54] I. Loeffler, G. Wolf, Mechanisms of interstitial fibrosis in diabetic nephropathy, in: J. Roelofs, L. Vogt (Eds.), *Diabetic Nephropathy*, Springer, Cham, 2019, https://doi.org/10.1007/978-3-319-93521-8_15.
- [55] R.Z. Alicic, M.T. Rooney, K.R. Tuttle, Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 12 (12) (2017) 2032–2045, <https://doi.org/10.2215/CJN.11491116>.
- [56] B. Betz, B.R. Conway, Recent advances in animal models of diabetic nephropathy, *Nephron Exp. Nephrol.* 126 (4) (2014) 191–195, <https://doi.org/10.1159/000363300>.
- [57] B. Najafian, A.B. Fogo, M.A. Lusco, C.E. Alpers, AJKD atlas of renal pathology: diabetic nephropathy, *Am. J. Kidney Dis.* 66 (5) (2015) e37–e38, <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2015.08.010>.
- [58] P. Fioretto, M. Mauer, Histopathology of diabetic nephropathy, *Semin. Nephrol.* 27 (2) (2007) 195–207, <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2007.01.012>.
- [59] M. Zafar, S. Naeem-ul-Hassan Naqvi, M. Ahmed, Z.A. Kaimkhani, Altered kidney morphology and enzymes in streptozotocin induced diabetic rats, *Int. J. Morphol.* 27 (3) (2009) 783–790, <https://doi.org/10.4067/S0717-95022009000300024>.
- [60] M. Tabatabaei Shafiei, C.M. Carvajal Gonczy, M.S. Rahman, A. East, J. François, P. J. Darlington, Detecting glycogen in peripheral blood mononuclear cells with periodic acid schiff staining, *J. Vis. Exp.* 94 (2014) 52199, <https://doi.org/10.3791/52199>.
- [61] S.S. Ravikummar, T.R. Menaka, G. Vasupradha, K. Dhivya, J. Dinakaran, V. Saranya, Cytological intracellular glycogen evaluation using PAS and PAS-D stains to correlate plasma glucose in diabetics, *Indian J. Dent. Res.* 30 (5) (2019) 703–707, https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_815_18.
- [62] R. Rasch, Tubular lesions in streptozotocin-diabetic rats, *Diabetologia* 27 (1) (1984) 32–37, <https://doi.org/10.1007/BF00253498>.
- [63] A. Saitoh, N. Ohtake, S. Fukuda, K. Tamaki, Clear cells of eccrine glands in a patient with clear cell syringoma associated with diabetes mellitus, *Am. J. Dermatopathol.* 15 (2) (1993) 166–168, <https://doi.org/10.1097/0000372-199304000-00012>.



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA