



IDENTIFICACIÓN Y PERFIL DE EXPRESIÓN GENÉTICO DE NUEVOS GENES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DE MESODERMO ANTERIOR Y EN EL CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS (ccRCC)

Bioq. Tamara Eliana Barnes

Directora: Dra. María Victoria Aguirre

Co-Director: Dr. Juan Pablo Rodríguez

Lugares de Trabajo:

- LABORATORIO DE INVESTIGACIONES BIOQUÍMICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA (**LIBIM**) – UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
- LABORATORY OF CELL GENETICS (**CEGE**) – VRIJE UNIVERSITY BRUSSEL

AÑO 2023

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	5
AGRADECIMIENTOS	10
RESUMEN	12
ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓN	17
CELULAS MADRE	18
<i>CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS</i>	20
<i>a. Capacidad ilimitada de autorrenovación mediante división simétrica</i>	20
<i>b. Diferenciación</i>	22
<i>c. Transmisión y colonización de líneas germinales</i>	23
<i>d. Formación de teratoma</i>	23
<i>CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS</i>	24
ACTIVIDADES MOLECULARES Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO	27
<i>REGULADORES GENÉTICOS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO</i>	27
<i>SUPERFAMILIA DEL TGF-β</i>	31
<i>Activina y Nodal</i>	33
<i>Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs)</i>	34
<i>BMP4</i>	35
<i>BMP7</i>	36
<i>BMP7 y su rol en el desarrollo de carcinomas renales</i>	37
CARCINOMAS RENALES	39
<i>CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES DE CÉLULAS CLARAS (ccRCC)</i>	41
MICROAMBIENTE TUMORAL	42
<i>a. Alta presión de líquido intersticial (IFP)</i>	43
<i>b. Acidosis extracelular</i>	44
<i>c. Baja tensión de oxígeno o hipoxia</i>	44
<i>Factores inducibles por hipoxia (HIFs)</i>	44
<i>d. Angiogénesis y proliferación</i>	46
<i>e. Transición epitelial-mesenquimal</i>	47
<i>MICROAMBIENTE TUMORAL DE CCRCC</i>	47
HIPÓTESIS – TIPO DE INVESTIGACIÓN	49

OBJETIVOS	51
MATERIALES Y MÉTODOS	53
<i>PACIENTES, DATOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS Y PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO</i>	54
<i>CULTIVOS CELULARES</i>	
<i>Cultivos de células madre embrionarias de ratón (mESCs) y ensayos de diferenciación</i>	54
<i>Cultivos de células renales humanas</i>	55
<i>Formación de cuerpos embrionarios de ratón (mEBs) en diferentes condiciones de cultivo</i>	55
<i>Formación de esferoides celulares renales en diferentes condiciones de cultivo</i>	56
<i>MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)</i>	56
<i>INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)</i>	57
<i>Análisis de la inmunotinción</i>	57
<i>INMUNOCITOQUÍMICA (ICQ)</i>	58
<i>Índice proliferativo</i>	58
<i>RT-qPCR</i>	
<i>Testeo de cebadores de genes desconocidos y cuantificación</i>	58
<i>Cuantificación de marcadores en líneas celulares renales humanas</i>	61
<i>PROCESAMIENTO DE IMÁGENES</i>	62
<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	
<i>Prueba t de Student</i>	62
<i>Prueba U de Mann-Whitney</i>	63
RESULTADOS- CAPÍTULO 1	64
DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE GENES NOVELES DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS Y SU ROL DURANTE LOS ESTADÍOS TEMPRANOS DEL DESARROLLO MURINO	
<i>PUESTA A PUNTO DE UN MODELO DE DESARROLLO BASADO EN LA FORMACIÓN DE CUERPOS EMBRIONARIOS DE RATÓN (mEBS; MOUSE EMBRYOID BODIES)</i>	66
<i>PATRÓN DE EXPRESIÓN DE GENES CANDIDATOS PARA EL DESARROLLO EN mEBs QUE SE DIFERENCIAN ESPONTÁNEAMENTE EN MEDIO SUPLEMENTADO CON SUERO (SCM)</i>	69
<i>PATRÓN DE EXPRESIÓN DE GENES CANDIDATOS DE DESARROLLO EN mEBs TRATADOS CON FACTORES DE SEÑALIZACIÓN DE LA VÍA TGF-β Y PRIVADOS DE SUERO (SFM)</i>	74
<i>CONCLUSIÓN PARCIAL</i>	78

RESULTADOS- CAPÍTULO 2	79
ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE BMP7 EN CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS (ccRCC)	
<i>CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS</i>	80
<i>BMP7 SE SOBREENPRESA EN EL ccRCC</i>	81
<i>LOS MARCADORES DE HIPOXIA HIF MUESTRAN PATRONES DE EXPRESIÓN DIFERENCIALES ENTRE CORE Y PERIFERIA EN EL ccRCC</i>	86
<i>EXPRESIÓN DE E-CADERINA EN EL ccRCC</i>	89
<i>LAS CÉLULAS TUMORALES CENTRALES PRESENTAN MAYORES TASAS DE PROLIFERACIÓN QUE LAS DE LA PERIFERIA EN EL ccRCC</i>	92
<i>CONCLUSIÓN PARCIAL</i>	94
DISCUSIÓN	96
CONCLUSIONES	104
BIBLIOGRAFÍA	106

LISTA DE ABREVIATURAS

AANE	Aminoácidos no esenciales
ActRIIA	Receptor de Activina A, Tipo II
ActRIIB	Receptor de Activina B, Tipo II
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALK1/ALK4/ALK7	Quinasa 1/4/7 del receptor similar a activina (del inglés: Activin receptor-like kinase-1/4/7)
N	Asparagina
aVE	Endodermo visceral anterior (del inglés: anterior visceral endoderm)
ATP	Adenosín trifosfato
Atp9a/ATP9A	ATPasa transportadora de fosfolípidos 9A (del inglés: ATPase phospholipid transporting 9A)
BMP2/BMP4/BMP7	Proteína morfogenética ósea 2,4,7 (del inglés: bone morphogenetic protein 2, 4, 7)
BMPRII	Receptor de la proteína morfogenética ósea (del inglés: Bone morphogenetic protein receptor II)
Capsl/CAPSL	Proteína similar a calcifosina (del inglés: Calcyphosin-like protein)
Ccpg1os/CCPG1OS	Factor de progresión del ciclo celular 1 (del inglés: Cell cycle progression 1)
CCR	Carcinoma de células renales
ccRCC	Carcinoma renal de células claras
CSC	Células madre cancerígenas (del inglés cancer stem cells)
Ct	Umbral de ciclos (del inglés: cycle threshold)
CTRL	Control
D230030E09Rik	Gen del ADN complementario Riken D230030E09
DE	Desviación estándar
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco (del inglés: Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMGDH/Dmgdh	Dimetil glicin deshidrogenasa

LISTA DE ABREVIATURAS

dpc	Días post coito
dT	Desoxitimina
dVE	Endodermo visceral distal (del inglés: distal visceral endoderm)
DVR-7	Proteína relacionada con la decapentaplejía - Vg (del inglés: decapentaplegic-Vg-related protein)
E-CAD	E-Caderina
EB	Cuerpos embrionarios (del inglés embryoid bodies)
EC	Células de embriocarcinoma
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético (del inglés: ethylenediaminetetraacetic acid)
EEM	Error estándar de la media
ES	Célula madre embrionaria (del inglés: embryonic stem)
Evx1/EVX1	Homeobox 1 de salto uniforme (del inglés: Even-Skipped Homeobox 1)
Fam183b/FAM183B	Miembro B de la familia con similitud de secuencia 183 (del inglés: Family with sequence similarity 183, member B)
FBS	Suero fetal bovino
FCS	Suero fetal de ternera (del inglés: fetal calf serum)
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés fibroblast growth factor)
Flk1/FLK1	Quinasa 1 de hígado fetal (del inglés:Fetal Liver Kinase 1)
Gsc/GSC	Dominio en el ADN del gen Goosecoid
GSK3 β	Glucógeno sintasa quinasa 3 beta (del inglés: Glycogen synthase kinase-3 beta)
H ⁺	Protón
HEK-293	Células de riñón embrionario humano 293 (del inglés: human embryonic kidney 293 cells)
HIF	Factor de transcripción inducible por hipoxia
HIF-1 α /2 α	Factor de transcripción inducible por hipoxia – 1 α /2 α (del inglés: hypoxia inducible factor)
HRE	Elementos de respuesta a hipoxia (del inglés: Hypoxia-Response

LISTA DE ABREVIATURAS

	Element)
HRP	Peroxidasa de rábano picante (del inglés: Horseradish Peroxidase)
ICM	Masa celular interna (del inglés inner cell mass)
ICQ	Inmunocitoquímica
IHQ	Inmunohistoquímica
IFP	Presión del líquido intersticial (del inglés: interstitial fluid pressure)
Josd2/JOSD2	Dominio que contiene al Josefina 2 (del inglés: Josephin domain containing 2)
Kbtbd4/KBTBD4	Repetición de Kelch y dominio que contiene al BTB (POZ) 4 (del inglés: Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 4)
Ki-67	Proteína codificada por el gen MKI67
KO	Knock-Out
Lhx1/LHX1	LIM Homeobox 1
LIF	Factor inhibidor de leucemia (del inglés Leukemia inhibitory factor)
LSAB	Estrepto-Avidina Biotina etiquetada (del inglés: Labeled Strept-Avidin Biotin)
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos (del inglés mitogen-activated protein kinase)
MAT	Microambiente tumoral
MCI	Masa celular interna
MDR-1	Proteína de resistencia a múltiples fármacos (del inglés: multidrug resistance protein 1)
mEB	Cuerpos embrionarios murinos (del inglés mouse embryoid bodies)
MEF	Fibroblastos embrionarios murinos
MEK 1/2	Proteína quinasa activada por mitógenos (del inglés: mitogen-activated protein kinase kinase)
mESC	Células madre embrionarias murinas (del inglés: mouse embryonic stem cells)
Mlf1/MLF1	Factor 1 de leucemia mieloide (del inglés: Myeloid leukemia

LISTA DE ABREVIATURAS

	factor 1)
M-MLV RT	Transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (del inglés: Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase)
Na ⁺	Catión sodio
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica (del inglés: National Center for Biotechnology Information)
Oct4/OCT4	Factor de transcripción 4 de unión a octámeros (del inglés, octamer-binding transcription factor 4)
ODD	Dominio de degradación dependiente del oxígeno (del inglés: oxygen dependent degradation domain)
OP-1	Proteína osteogénica-1 (del inglés: osteogenic protein-1)
P	Prolina
PAS	Dominio Per-Arnt-Sim
pb	Pares de bases
PCNA	Antígeno nuclear de células proliferantes (del inglés: proliferating cell nuclear antigen)
Pcdh19/PCDH19	Protocaderina 19
pH	Potencial de hidrógeno
PPIA	Peptidilproil isomerasa A
Prtg/PRTG	Protogenina
Rbm24/RBM24	Proteína de motivo de unión a ARN 24 (del inglés:RNA binding motif protein 24)
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (del inglés: real time quantitative polymerase chain reaction)
Scara3/SCARA3	Miembro 3 del Receptor recolector de clase A (del inglés: Scavenger receptor class A, member 3)
SFM	Medio libre de suero (del inglés: serum-free media)
SCM	Medio suplementado con suero (del inglés: serum-containing medium)
Ser	Serina
Slc7a3/SLC7A3	Transportador de solutos de la familia 7 (del inglés: Solute carrier family 7 /cationic amino acid transporter, member 3)

LISTA DE ABREVIATURAS

Smad1/Smad2/Smad3/Smad4/Smad5/Smad8	Miembro de la familia SMAD 1,2,3,5,8 (del inglés: SMAD Family Member 1,2,3,4,5,8)
Sox1/SOX1	Factor de transcripción 1 SRY-Box
Sox17/SOX17	Factor de transcripción 17 SRY-Box
T	Factor de transcripción T o Brachyury
TAD	Dominios de transactivación (del inglés: transactivation domain or trans-activating domain)
TEM	Transición epitelial mesenquimal
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta (del inglés Transforming growth factor beta)
Thr	Treonina
Tm	Temperatura de fusión (del inglés: melting temperature)
TNM	Tumor-Nódulo-Metástasis
TRII	Receptor TGF-beta tipo II (del inglés TGF-beta type II receptor)
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés: Vascular Endothelial Growth Factor)
VHL	gen supresor Von Hippel Lindau

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis Padres, María Rosa y Oscar, por creer en mí y apoyarme incondicionalmente durante este doctorado. Se que no fue fácil, hubo mucho tiempo sin compartir con Uds. pero al fin valió la pena.

En segundo lugar, quiero agradecer enormemente a mi directora, Dra Victoria Aguirre, por darme no sólo la oportunidad de terminar mi doctorado sino también las herramientas y el apoyo siempre. Gracias por no dudar en unirme a su equipo, por todas esas horas invertidas conmigo, los consejos y por siempre confiar en mí pese a todo. ¡La aprecio mucho Doc.!

También merece una gran mención mi co-director Dr. Juan Pablo Rodríguez, que tomó el lugar de copiloto de este avión sin saber bien qué ruta tenía planeada y supo encaminarlo en la mejor dirección posible. También me llevo las frases épicas que me has enseñado Juanpa.

No hace falta decir que este doctorado ha requerido mucho trabajo en el laboratorio y, por lo tanto, me gustaría agradecer a los miembros del LIBIM por su contribución a la realización de esta tesis que hicieron de mi estancia en laboratorio sea una de las mejores en mi vida ya que nunca faltó el humor, el compañerismo y las momentos compartidos: Juanpi, Juancho, Flor, Tanu, Gabi, Nare, Lean, Patri y Rudolph. También quisiera mencionar a quien ya no forma parte del equipo pero fue un gran compañero el tiempo que estuvo...¡Te eché mucho de menos cuando te fuiste, Lucas Palomar!

A la elaboración de esta tesis han contribuido no sólo las aportaciones del laboratorio, sino también las fructíferas colaboraciones con otros laboratorios: Laboratorio CEGE Lab (Vrije Univeriteit Brussel) dónde se ha llevado a cabo la primera parte de esta tesis y al servicio de Urología y Departamento de Anatomía Patológica del Hospital José Ramón Vidal de la ciudad de Corrientes por la provisión de muestras de ccRCC y su correspondiente estadificación. También quisiera agradecer al Laboratorio Central de la Provincia de Corrientes, al Laboratorio de Medicina Genómica de la Facultad de Medicina y al IMCIF de la Provincia del Chaco, especialmente a Nadia Filippi por la gran ayuda y buena onda.

Por último, pero no por ello menos importante, me gustaría agradecer a mi familia y amigos, que también son mi familia por elección, su apoyo a lo largo de los años. Gracias por entender mis ausencias, mis momentos de crisis y nunca soltarme la mano, son también mi familia por elección. Cada uno de ustedes sabe lo que significan para mí, pero quiero mencionar especialmente a los que se llevaron la peor parte del proceso (en orden alfabético): Antoniu, Dem, Ingi, Lucas, Mara, Maria, Mariana, Marina, Marta, y Sasha.

Y...también quiero mencionar aquí a Gustavo, no tengo palabras para decir lo agradecida que estoy por tu apoyo. Cuando me sentí más perdida fuiste quien me ayudó a encontrar claridad.

A la Dra. Sgroppo por lograr que mi vuelta y doctorado en Argentina se lleve a cabo.

Realmente me costó expresar todo en palabras así que pido perdón si no fueron las correctas y a todas las personas que pude haber olvidado aquí, ¡Gracias por todo!

RESUMEN-ABSTRACT

RESUMEN

Existen similitudes y paralelismos compartidos entre la embriogénesis y la oncogénesis que involucran varios eventos moleculares y morfológicos. Teniendo presente esto, esta tesis propone como objetivo general describir la expresión de genes novedales y de miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF- β) en la formación del eje anteroposterior y el modelado del mesodermo en las células madre embrionarias (ES) murinas y evaluar su posible implicancia en el desarrollo del carcinoma renal de células claras (ccRCC).

En una primera instancia se identificaron y analizaron quince potenciales genes candidatos que poseen un rol en el desarrollo del mesodermo murino mediante un sistema que combina el uso de cultivos 3D (mEB) con el análisis de una serie de reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (RT-qPCR). Sólo de once de estos genes se evaluó su patrón de expresión génica, posterior a la adición de moléculas estimulantes o inhibitoras con un papel relevante durante el desarrollo murino: Activina A, proteína morfogénica ósea 4 (BMP4) y el inhibidor de Activina A conocido como SB431542. A su vez, los patrones de expresión analizados se compararon con los de genes de referencia del desarrollo embrionario murino (*Nanog*, *Oct4*, *Nodal*, *T*, *Snail1*, *N-cad*, *Evx1*, *E-cad*, *Sox17* y *Sox1*). Es así que, el análisis de los datos permitió reconocer que cinco del total de genes candidatos (*Ccpg1os*, *D230030E09Rik*, *Dmgdh*, *Myf1* y *Pcdh19*), son sensibles a la acción de los factores de crecimiento pertenecientes a la superfamilia del TGF- β y que también se encuentran potencialmente involucrados en la inducción/diseño del mesodermo murino.

La vía del TGF- β tiene un rol importante tanto en la embriogénesis como en la tumorigénesis y comprende a las BMPs. Dentro de esta subfamilia, la isoforma 7 de la proteína morfogenética ósea (BMP7), tiene un importante papel en la fisiología y fisiopatología del riñón pre y postnatal. Adicionalmente, se expresa en muchos tipos de carcinomas e incluso es predominante en los carcinomas de células renales (CCR) en comparación con el tejido normal.

La familia de las BMPs, cómo se mencionó previamente, es un factor común existente entre la embriogénesis y la oncogénesis, pero no es el único. En esta tesis se pone foco en otro elemento compartido por ambos procesos, la hipoxia. Este estado de ausencia de oxígeno, se sabe que desencadena mecanismos adaptativos de supervivencia celular tanto en estados fisiológicos como fisiopatológicos y es por ello que se procede con su estudio.

Es así que, en la segunda parte de los resultados de esta tesis y mediante estudios multiparamétricos (cultivos 3D, RT-qPCR, IHQ e ICT) se describe por primera vez en forma global a nuestro entender la localización de BMP7 y HIF-2 α (factor de transcripción clave de hipoxia) en muestras de core y periferia de ccRCC de acuerdo a los estadios patológicos del tumor (Clasificación

RESUMEN

TNM: I, II y III). De la misma manera se procede con E-CAD (indicativa de TEM) y Ki-67 (marcador de proliferación).

Por otra parte, se pudo evidenciar una expresión de HIF-2 α casi 5 veces mayor a la de HIF-1 α , en muestras de ccRCC la cual fue significativamente mayor en el núcleo respecto a la periferia en todos los grupos experimentales. La determinación de los índices de proliferación (IP) de Ki-67 fueron estadísticamente más altos en el core en comparación con la periferia tumoral en todos los estadios estudiados. Asimismo, al evaluar la expresión de E-CAD en las muestras de ccRCC se comprobó que era de tipo diferencial en las distintas zonas del tumor, siendo mayor en la periferia en comparación con el centro de las mismas.

El análisis de correlación entre BMP7 con Ki67 y HIF-2 α , respectivamente, evidenció su asociación con una elevada proliferación celular e hipoxia en la región del core, proporcional con el aumento de la estadificación tumoral. A su vez, la correlación negativa existente entre BMP7 y E-CAD en la periferia del tumor es indicativa de la disminución del progreso de la transición epitelial-mesenquimal (TEM).

Así, en la primera parte del desarrollo de esta tesis se han identificado cinco nuevos genes sensibles a miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF- β) en las células madre embrionarias (ES) murinas para la formación del eje anteroposterior y el modelado del mesodermo. Y, en la segunda parte se describieron por primera vez las expresiones de BMP-7, Ki-67, HIF-2 α y E-CAD en diferentes zonas de muestras tumorales de ccRCC. En conjunto, este estudio establece nuevas relaciones moleculares entre los eventos embriológicos y oncológicos.

Para finalizar, las conclusiones derivadas de estas tesis podrían aplicarse con el fin de utilizar la determinación conjunta de Ki67, BMP7 y E-CAD en diferentes zonas del tumor como potenciales biomarcadores diagnósticos y/o pronósticos para los ccRCC.

ABSTRACT

There are similarities and shared parallels between embryogenesis and oncogenesis involving several molecular and morphological events. With this in mind, the overall aim of this thesis is to describe the expression of novel genes and members of the transforming growth factor- β superfamily (TGF- β) in the formation of the anteroposterior axis and mesoderm patterning in murine embryonic stem (ES) cells and to assess their possible implication in the development of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC).

Fifteen potential candidate genes that play a role in murine mesoderm development were first identified and analysed using a system that combines the use of 3D culture (mEB) with the analysis of a series of quantitative real-time polymerase chain reactions (RT-qPCR). Only eleven of these genes were evaluated for their gene expression pattern, following the addition of stimulatory or inhibitory molecules with a relevant role during murine development: Activin A, bone morphogenic protein 4 (BMP4) and the Activin A inhibitor known as SB431542. In turn, the expression patterns analysed were compared with those of reference genes in murine embryonic development (Nanog, Oct4, Nodal, Bra, Snail1, N-cad, Evx1, E-cad, Sox17 and Sox1). Thus, data analysis allowed us to recognise that five of the total candidate genes (Ccpg1os, D230030E09Rik, Dmgdh, Mlf1 and Pcdh19) are sensitive to the action of growth factors belonging to the TGF- β superfamily and are also potentially involved in the induction/design of murine mesoderm.

TGF- β pathway has an important role in both embryogenesis and tumorigenesis and comprises the BMPs. Within this subfamily, bone morphogenetic protein isoform 7 (BMP7) plays an important role in pre- and postnatal kidney physiology and pathophysiology. Additionally, it is expressed in many types of carcinomas and is even predominant in renal cell carcinomas (RCC) compared to normal tissue.

The family of BMPs, as previously mentioned, is a common factor existing between embryogenesis and oncogenesis, but it is not the only one. This thesis focuses on another element shared by both processes, hypoxia. This state of absence of oxygen is known to trigger adaptive mechanisms of cell survival in both physiological and pathophysiological states and that is why we proceed with its study.

Thus, in the second part of the results of this thesis and by means of multi-parametric studies (3D culture, RT-qPCR, IHQ and ICT) the localisation of BMP7, HIF-2 α (hypoxia key transcription factor), E-CAD (indicative of EMT) and Ki-67 (proliferation marker) in core and peripheral samples of ccRCC according to the pathological stages of the tumour (TNM classification: I, II and III) is described for the first time in a global way to our knowledge.

ABSTRACT

On the other hand, HIF-2 α expression was almost 5 times higher than HIF-1 α expression in ccRCC samples and was significantly higher in the core than in the periphery in all experimental groups. Likewise, E-CAD expression in the ccRCC samples was found to be differentially expressed in the different areas of the tumour, being higher in the periphery compared to the centre of the tumour. Correlation analysis of BMP7 with Ki67 and HIF-2 α , respectively, showed their association with elevated cell proliferation and hypoxia in the core region, proportional to increased tumour staging. In turn, the negative correlation between BMP7 and E-CAD in the tumour periphery is indicative of decreased epithelial-mesenchymal transition (EMT) progression. Thus, in the first part of the development of this thesis, five new genes sensitive to members of the transforming growth factor- β superfamily (TGF- β) have been identified in murine embryonic stem (ES) cells in the formation of the anteroposterior axis and the modelling of the mesoderm. And, in the second part, the expressions of BMP7, Ki-67, HIF-2 α and E-CAD in different areas of ccRCC tumour samples were described for the first time. Taken together, this study establishes new molecular relationships between embryological and oncological events. Finally, the conclusions derived from these theses could be applied to use the joint determination of Ki67, BMP7 and E-CAD in different tumour sites as potential diagnostic and/or prognostic biomarkers for ccRCC.

INTRODUCCIÓN

CELULAS MADRE

Una *célula madre* puede definirse como aquella que tiene la propiedad de dividirse durante un cierto período de tiempo y madurar o diferenciarse en más de un tipo celular (Willems et al., 2004, Wan Kamarul Zaman et al., 2021).

Para comprender en qué consisten los tipos principales de células madre, es necesario en primera instancia, entender el desarrollo embrionario de los mamíferos (Maemura et al., 2021). Cuyo inicio se da cuando el espermatozoides fertiliza un óvulo para formar el *cigoto* unicelular. Éste, se somete a un proceso de división celular (mitosis), en el que replica sus cromosomas (que transportan el ADN de cada parental) y da lugar a dos células idénticas. Estas células se llaman células madre totipotentes y tienen la capacidad de convertirse en un nuevo organismo ya que pueden diferenciarse en tejidos extraembrionarios como así en tejidos derivados de la capa germinal (Condic, 2014; Baker et al., 2018). El cigoto repite el proceso de mitosis durante aproximadamente 5 o 6 días creando un pequeño acúmulo de unos cientos de células llamado *blastocisto*. Éste último tiene una capa externa de células llamada *trofoblasto*, que eventualmente formará la placenta protectora. Dentro del trofoblasto hay un grupo de células llamado masa celular interna (ICM). Entre el estadio de cigoto y feto se encuentra el embrión (en los murinos es la etapa correspondiente entre la primera división del cigoto y el momento en que se convierte en un feto y para los humanos, es la implantación de óvulos fertilizados en el útero hasta la octava semana de su desarrollo) y sus células se llaman células madre embrionarias (Casser et al., 2017, Chung et al., 2006).

En este punto, las ***células madre embrionarias*** tienen la capacidad de diferenciarse en casi todos los tipos de células del cuerpo (musculares, nerviosas y elementos formes de la sangre, etc.) por lo cual se las llama pluripotentes. La diferencia entre las células totipotentes y pluripotentes recae en que las primeras pueden dan origen a todos los tipos de células de un cuerpo, incluidas las estructuras extraembrionarias (**Figura 1**) A su vez, entre estos dos tipos se encuentra un subtipo, las ***células madre plenipotentes*** que, al igual que las células madre totipotentes, son capaces de producir todas o la mayoría de las células del cuerpo sin lograr una organización celular en un plan corporal integrado (Condic, 2014; Baker et al., 2018).

INTRODUCCIÓN

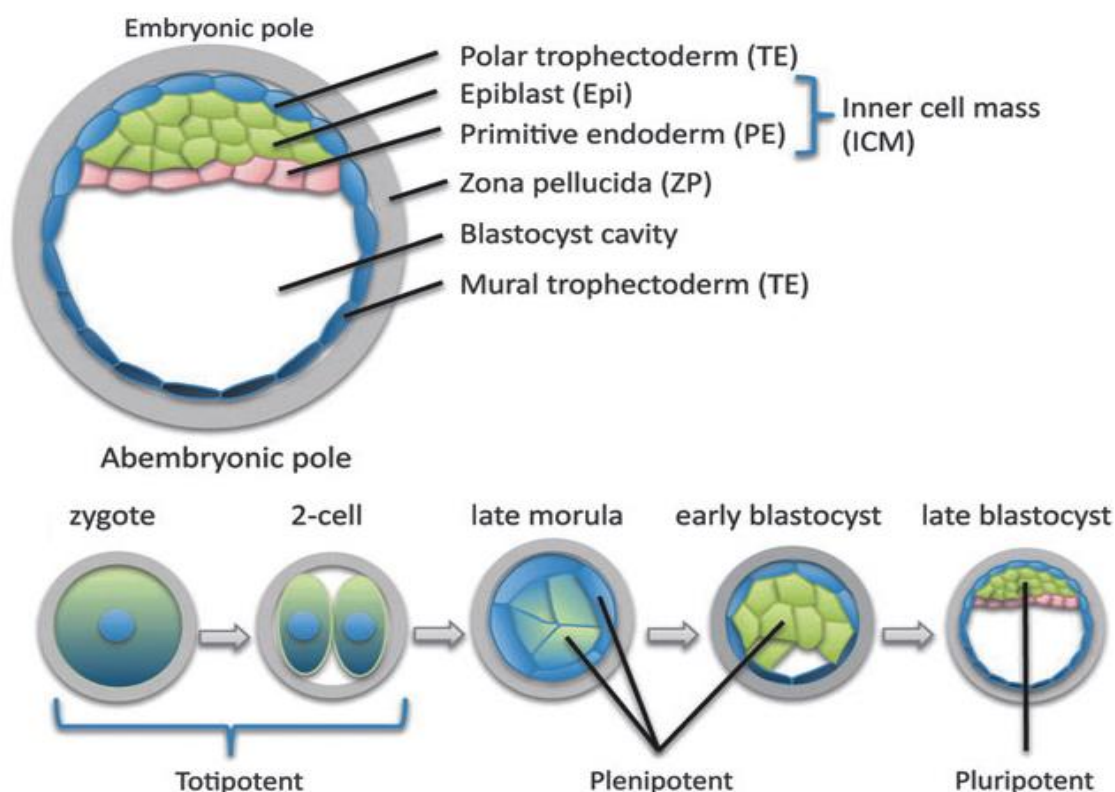


Figura 1. Tipos celulares en diferentes etapas del desarrollo embriogénico. Esta imagen representa, según una sección sagital media, la anatomía y tipos de células del embrión del blastocisto expandido en el desarrollo humano. También se evidencia la diferencia entre los 3 tipos de células: **Totipotentes** (sólo el cigoto y los blastómeros de la etapa de escisión temprana, posiblemente hasta la etapa de cuatro células), **Plenipotentes** (células de la mórula tardía/blastocisto temprano) y **Pluripotentes** (células del epiblasto en la etapa de blastocisto expandido) (Extraído de Condic, Maureen L. 2014).

A medida que el embrión crece, se obtienen **células madre multipotentes** y especializadas que solo pueden formar progenies limitadas, denominadas células diferenciadas terminalmente (Jiang et al, 2002, Johnson et al., 2021). Por ejemplo, una célula madre sanguínea (multipotente) puede convertirse en un glóbulo rojo, glóbulo blanco o plaquetas (todas las células especializadas). Las células madre multipotentes se encuentran, en general, en el mamífero adulto y están presentes en todos los diferentes tipos de tejido en el cuerpo, incluyendo células madre hematopoyéticas que se especializan en varias células sanguíneas, células madre mesenquimales que pueden dar lugar a osteoblastos, miocitos, condrocitos y adipocitos, y células madre neurales que se diferencian en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Subramanian et al., 2010, Um et al., 2020).

Las células madre pluripotentes a menudo se denominan células madre verdaderas, ya que tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo celular. Se clasifican en **células madre embrionarias**, que se obtienen al aislar la ICM de un embrión de mamífero temprano (blastocisto), **células madre perinatales** derivadas de la sangre del cordón umbilical y que incluyen **células madre hematopoyéticas** de la sangre del cordón umbilical humano y **células madre mesenquimales del cordón umbilical** humano y finalmente, las **células madre pluripotentes**

INTRODUCCIÓN

inducidas en función del tejido de origen que son células adultas reprogramadas artificialmente para comportarse como células madre embrionarias (Takahashi et al., 2006; Yang et al., 2017).

La célula madre embrionaria (ES, del inglés embryonic stem), una célula madre verdaderamente pluripotente, no puede derivarse de tejidos adultos. Para obtenerlas, la ICM, debe disociarse después del aislamiento (Thomson et al., 1998; Guo et al., 2021), tal como fue descrito previamente a partir de células individuales aisladas de la mórula y el blastocisto (Evans y Kaufman, 1981; Chung et al., 2006). Después del aislamiento de un embrión, las células ES pueden mantenerse *in vitro* conservando su autorrenovación y su condición de pluripotencia.

Las células ES tienen la capacidad de formar gran parte de las células del cuerpo de los mamíferos, lo que hace que su uso sea atractivo para investigar procesos moleculares y celulares involucrados en la especificación del linaje y la embriogénesis, así como para realizar pruebas de detección de drogas y evaluar aplicaciones potenciales de ingeniería de tejidos y terapia celular (Losino et al., 2011).

CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

La clasificación de las células madre embrionarias se basa en las siguientes características:

a. Capacidad ilimitada de autorrenovación mediante división simétrica

Las células madre pueden replicarse muchas veces y las células resultantes continúan sin estar especializadas, como las células madre originales, por lo que son capaces de autorrenovarse a largo plazo (Sladitschek & Neveu, 2017).

En el caso de las células ES, su cultivo les permite dividirse ilimitadamente y mantener su pluripotencia durante su crecimiento, y a su vez, en cualquier momento del cultivo, pueden ser estimuladas para diferenciarse a distintos tipos celulares. Las células ES no pueden mantener su pluripotencia por sí mismas, por lo tanto, se cultivan generalmente sobre una capa de células alimentadoras dentro de las cuales se encuentran los fibroblastos primarios que son irradiados o tratados químicamente para inactivar su crecimiento (Mulas et al., 2019). Las moléculas secretadas por estas células alimentadoras parecen ser esenciales para mantener las células ES indiferenciadas y divididas. Alternativamente, pueden mantenerse en condiciones libres de alimentación utilizando sistemas de medios especializados en los cuales la superficie del cultivo tisular está recubierta por una matriz (Soto et al., 2021) (**Figura 2**).

En el caso particular de las células madre embrionarias murinas (mESC, del inglés mouse embryonic stem cells) obtenidas de la ICM de los embriones preimplantados del día 3.5, la capa de células alimentadoras suele estar compuesta por fibroblastos embrionarios murinos inactivados mitóticamente (MEF, del inglés mouse embryonic fibroblasts). Estas pueden cultivarse en ausencia

INTRODUCCIÓN

de alimentadores, agregando el factor inhibidor de leucemia (LIF, del inglés leukemia inhibitory factor), o citocinas relacionadas, al medio de cultivo. Éste, es un factor de crecimiento clave ya que es indispensable para que las mESC mantengan su estado pluripotente, proporcionando múltiples ventajas para las aplicaciones de estas células. La retirada de este factor conduce rápidamente a la diferenciación de las mESC dando lugar a estructuras complejas dimensionales llamadas **cuerpos embrionarios** (EB, del inglés embryoid bodies) que pueden ser inducidos a diferenciarse en una variedad de tipos celulares específicos (Losino et al, 2011, Posfai et al., 2021).

Se ha comprobado experimentalmente que el mecanismo molecular para la pluripotencia entre el ratón y el ser humano no está conservado y que muchos factores además de LIF median este proceso (Levenstein et al., 2005). Curiosamente, la mayoría de ellos tienen funciones esenciales durante el proceso de gastrulación del embrión murino. Entre estos, se encuentran miembros de la superfamilia del Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , del inglés Transforming Growth Factor beta) por ejemplo, Proteína morfogénica ósea 4 (BMP4, del inglés Bone morphogenetic protein 4) cuya adición a los cultivos de células ES conduce a la inhibición de la vía de MAPK, lo que resulta en un aumento de los niveles de OCT4 (del inglés, octamer-binding transcription factor 4). Además, se descubrió que este factor se correlaciona con LIF para mantener la pluripotencia (Qi et al., 2004). Activina A y Nodal también están involucrados, con papeles cruciales en este fenómeno (James et al., 2005; Ogawa et al., 2007) y presentan una cooperación con la vía FGF (Vallier et al., 2005).

INTRODUCCIÓN

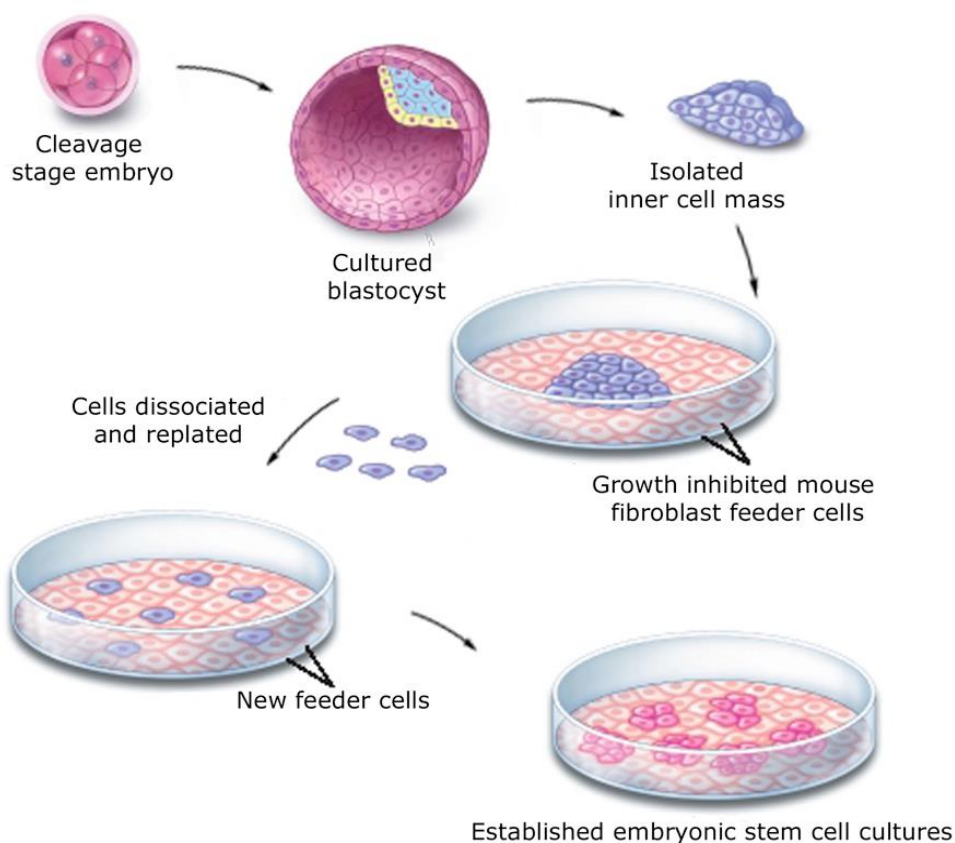


Figura 2. Derivación de células ES de mamíferos. La masa celular interna (ICM) de un blastocisto cultivado se elimina y se expande en las células alimentadoras. El ICM expandido se disocia en células individuales, que formarán una colonia de células ES (Adaptado de Winslow, 2001).

b. Diferenciación

Una de las propiedades fundamentales de la célula madre es la carencia de estructuras celulares específicas de tejido, que le permitan realizar una dada función. El proceso de adquisición de las mismas se llama *diferenciación*, y mientras ocurre la célula generalmente pasa por varias etapas, volviéndose más especializada en cada función (Lynch et al., 2018).

Para inducir la diferenciación de las ES, debe permitirse la agregación de las mismas y lograr eliminar los factores (y/o alimentadores) que las mantienen en su estado pluripotente y así darán origen fácilmente a las tres capas germinales (mesodermo, endodermo y ectodermo) (Tam & Loebel, 2007; Baillie-Benson et al., 2020).

Después de varios días en cultivo, se pueden identificar simultáneamente, tanto células precursoras como células maduras diferenciadas. Cuando se cultivan en suspensión con prevención de fijación, las células ES se adhieren entre sí y forman agregados, llamados cuerpos embrionarios (EB, en inglés embryoid bodies) permitiendo la agregación de, por ejemplo, neuronas o cardiomiocitos, que evidentemente dependen de las condiciones del cultivo.

INTRODUCCIÓN

Los EB se corresponden con un modelo *in vitro* del embrión en desarrollo y, por su parte las células ES representan a la ICM (Coucouvanis y Martin, 1999; Posfai et al., 2021),

Es así que, las tres capas germinales pueden formarse a partir de las células propias del EB. Estos precursores de la capa germinal darán lugar a células precursoras de tejido, que podrían renovarse y formar células funcionales para generar o repoblar tejidos adultos. A lo largo de los años, han sido diversas las alternativas propuestas para inducir la diferenciación de las células ES hacia una dirección determinada (Sagy et al, 2019).

El enfoque más prometedor parece ser la adición de factores de crecimiento a los EB, y hacerlo de manera similar en la que se activan en el embrión. Entre los factores de crecimiento más empleados se encuentran, Activina A y Nodal. La activina A, imitadora de la señalización nodal, se ha estudiado ampliamente demostrándose que está implicada en la inducción del mesodermo, tanto en las células ES de ratón como en las células ES humanas (Willems & Leyns, 2008).

c. Transmisión y colonización de líneas germinales

Las células ES son capaces de diferenciarse en todos los tipos de células embrionarias y adultas (**Figura 3**). En el caso particular de las células ES murinas, pueden ser modificadas “*in vitro*” para generar EB cuyas estructuras tridimensionales imitan los tejidos u órganos fisiológicos en ciertos grados, como se detalla anteriormente. Por otra parte, “*in vivo*” pueden producir quimeras de ratón, es decir, un ratón derivado exclusivamente de las células ES (Nagy et al., 1993). Esto ocurre cuando las células ES se inyectan en un blastocisto o se unen a un embrión en etapa de mórula y contribuyen a los tejidos en desarrollo posteriores.

Se sabe que, las quimeras pueden ocurrir naturalmente en humanos con gemelos fraternos, cuando el embrión muere muy temprano en el embarazo, y algunas de sus células son absorbidas por el otro gemelo. Es decir, el feto restante tendrá dos conjuntos de células, su propio conjunto original, más el de su gemelo, lo que se corresponde con la definición de quimera que es esencialmente un organismo único, que se compone de al menos dos linajes celulares genéticamente distintos (Garry et al., 2020; Kwisda et al., 2020).

d. Formación de teratoma

Otra de las características, no necesariamente beneficiosa, que poseen las células ES es la posibilidad de formar teratomas (tumores benignos), como efecto secundario cuando se inyectan *in vivo* (Martin, 1981; McBlane et al., 2018).

Por lo general, las células ES se inyectan debajo de la cápsula del riñón o los testículos, donde comenzarán a formar tumores que contienen células del linaje ectodérmico (Ej. Células de la piel o neuronas), mesodérmico (Ej. Células musculares, renales o hematopoyéticas), y endodérmico (Ej.

INTRODUCCIÓN

Células pancreáticas o intestinales). Las células derivadas de estos teratomas darán lugar a células de embriocarcinoma (EC), que comparten propiedades con las células ES, pero no dependen de factores de crecimiento para su auto renovación (Smith, 2001).

Una vez que las líneas celulares derivadas de EC fueron aisladas y expandidas clonalmente, se logró evidenciar su propagación continua, así como su capacidad de diferenciación, *in vitro* o mediante la formación de teratocarcinoma, pudiendo producir derivados de las tres capas germinales primarias: ectodermo, mesodermo y endodermo (Kleinsmith & Pierce 1964; Martin & Evans 1975). En el caso de teratocarcinomas derivados de embriones, la presencia y expansión del carcinoma embrionario en ellos, sugirió que las células fundadoras del epiblasto embrionario (Hogan & Lacy, 1995) pueden estar predispuestas para la conversión a células EC y, por lo tanto, para la continua auto-renovación.

CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

Las células EC pueden dar lugar clonalmente a teratocarcinomas que abarcan las tres capas germinales (Kleinsmith & Pierce, 1964; Pierce et al., 1959). Esto, en conjunto con estudios previos sobre teratocarcinomas (Jackson & Brues, 1941) y meduloblastomas (Eisenhardt & Cushing, 1930), **permitió observar similitudes histológicas entre los tejidos embrionarios y tumorales e inferir que los tumores malignos se originan a partir de células con características similares a provenientes del embrión en desarrollo.**

De hecho, en 1937, fue cuando se produjo, con éxito, la transmisión de leucemia a un ratón receptor, a partir de una sola célula leucémica murina (Furth et al., 1937). Por su parte, el tumor resultante mostró la típica heterogeneidad morfológica del tumor original. Es así, que se logró la primera evidencia de células cancerosas similares a las células madre, ahora denominadas ***células madre cancerígenas*** (CSC, del inglés cancer stem cells) (Atlasi et al., 2014).

Una definición temprana del concepto de CSC fue logrado por Pierce & Speers (1988), quien llevó a cabo una serie de experimentos, incorporando el radiomarcado combinado con autorradiografía, permitiendo así evidenciar el ADN marcado en zonas diferenciadas derivadas de células indiferenciadas (Belanger & Leblond, 1946).

Estudios previos utilizaron pruebas experimentales que implican el rastreo del destino del linaje de modelos de ratón para glioma (Chen et al., 2012), tumores de piel (Driessens et al., 2012) y adenomas intestinales (Schepers et al., 2012) descendientes en su contexto natural *in vivo*. Estos lograron confirmar que las células cancerígenas específicas, al diferenciarse, pueden dar lugar a todo tipo de progenies, que constituyen la masa tumoral (Atlasi et al., 2014; Paul et al., 2021).

INTRODUCCIÓN

En general, se propone que las CSC se originan de *células progenitoras* que han adquirido la capacidad de autorrenovarse o de *células madre adulta*s que han perdido el control de la proliferación (Paul et al., 2021) (**Figura 3**). Sin embargo, otra teoría establece que surgen de *células tumorales diferenciadas* que han sufrido un proceso de dediferenciación para volverse más parecidas a las células madre. Además, parece que los reguladores clave en las células ES también contribuyen a la patogénesis de los cánceres al modular la diferenciación y la autorrenovación de las CSC (Rasti et al., 2018).

Al igual que los tejidos normales, las CSC presentan heterogeneidad intratumoral, morfológica y fenotípicamente, lo cual es observado a lo largo de un muy amplio espectro de cánceres. Es así, que los crecimientos malignos se organizan de manera jerárquica reflejando la diversidad funcional entre sus células, con solo un subconjunto de ellas (células madre neoplásicas) capaz de alimentar el crecimiento tumoral al dar lugar a una masa celular más comprometida mediante diferenciación y, al mismo tiempo, mantener la población de CSC por autorrenovación. Al igual que las células madre normales, la alteración del equilibrio entre estas dos características (autorenovación y diferenciación) de las CSC dentro de la masa tumoral, ocurre por cambios sutiles en la tasa de divisiones celulares, migración celular, diferenciación y apoptosis (Valent et al., 2012).

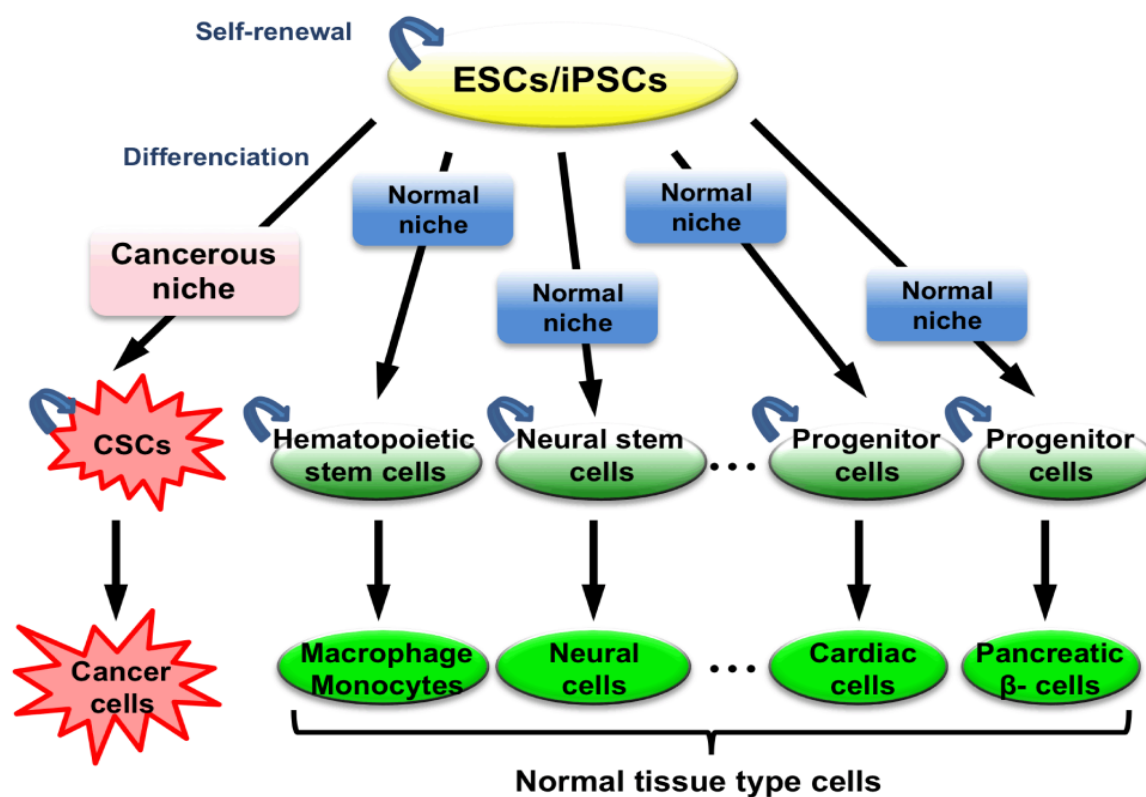


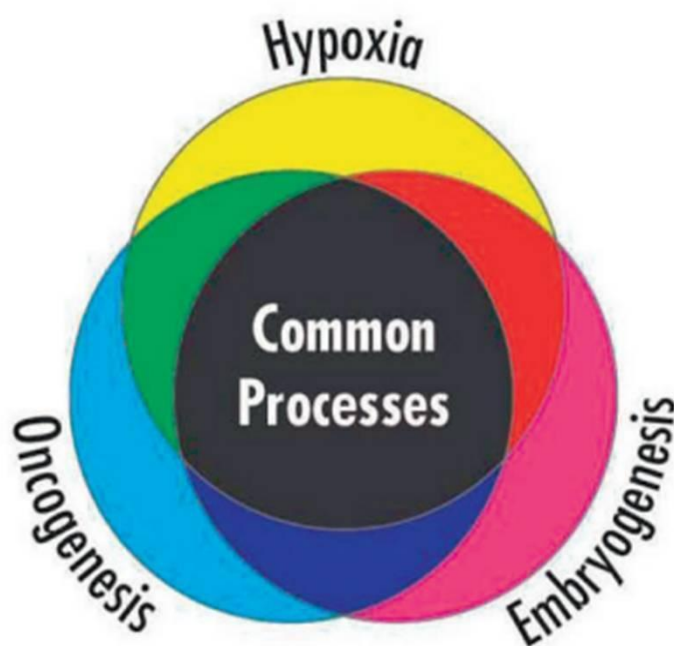
Figura 3. Células madres. Jerarquía de diferenciación de células madre embrionarias (ESC) y células madre inducidas (iPSCs) dependiendo del microambiente único o nicho, así como de la autorrenovación. (Extraído de Kasai et al. 2014).

INTRODUCCIÓN

Desde hace más de un siglo que se considera la existencia de similitudes y paralelismos entre los tumores y los embriones (Müller, 1843; Virchow, 1858; Paget, 1889; Rous, 1910 & 1911), tanto para explicar la capacidad de transformación y crecimiento celular que poseen ambos como también su relación con la metástasis. El fenómeno de la hipoxia es común a la embriogénesis y la oncogénesis y, puede considerarse como punto de intersección de regulaciones genéticas y vías de señalización comunes para ambos procesos (**Figura 4**).

Sin embargo, al evaluar el rol de la hipoxia o reducción de la tensión de oxígeno en el desarrollo embrionario “*in vitro*” de varias especies, entre ellas ratones y humanos, aún está sujeto a controversias en la literatura. Estas discrepancias pueden explicarse en parte por las diferencias en los sistemas de cultivo ya que la reducción del oxígeno puede ser beneficiosa o perjudicial, dependiendo del tipo de células utilizadas para el mismo (Forristal et al., 2010; Olson & Seidel, 2000).

La hipoxia también tiene un rol importante en la transición epitelial-mesenquimal (TEM), esencial para la embriogénesis, para la formación de células madre, la metástasis y la quimiorresistencia del



cáncer (Brown & McGuire, 2012).

Figura 4. Fenómeno de la oncogénesis que recapitula la embriogénesis. Esquema donde se postula el papel de la hipoxia como determinante común de procesos entre la embriogénesis y la oncogénesis (Extraído de Brown & McGuire, 2012).

INTRODUCCIÓN

ACTIVIDADES MOLECULARES Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

La mayoría de los eventos moleculares y morfológicos ocurridos durante el desarrollo embrionario son bien conocidos, sin embargo, la razón por la cual inician o se relacionan los mismos, aún no es completamente comprendida. Gracias a la presencia de ARNm en los diferentes tejidos del embrión, se pudo llevar a cabo la activación y/o inactivación de genes específicos así como otros estudios funcionales y lograr identificar, no sólo el rol de cada gen, sino también determinar dónde se encuentran principalmente, así como reconocer varios factores de crecimiento importantes involucrados, entre ellos, el factor de crecimiento transformante (TGF- β), que a su vez, comprende Nodal y proteínas morfogenéticas óseas (BMP, del inglés Bone Morphogenetic Protein) (Nickel et al., 2018).

REGULADORES GENÉTICOS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

Oct4 es un marcador que se expresa previo a la gastrulación (5,5 días post coito) en las células epiblasticas indiferenciadas y que se seguirá expresando en etapas posteriores.

La expresión de *Oct4* en la ICM de mamíferos y en mESC fue objeto de profundo estudio con el fin de comprender los eventos moleculares que controlan el equilibrio entre la pluripotencia y la diferenciación. Al estudiar el fenotipo *Oct4*^{-/-} en el embrión murino en desarrollo, Nichols et al. (1998) descubrieron que las células del ICM perdían su pluripotencia y que comenzaban a tener un carácter extraembrionario en lugar del carácter embrionario esperado, lo que resultó en una letalidad embrionaria temprana. Su papel *in vitro* se estudió en células ES mutantes (células ES *Oct4*^{-/-}) que se comportaron de manera similar al mutante donde las células ICM se diferenciaban rápidamente en células similares al trofoblasto. Más tarde, la sobreexpresión condicional de *Oct4* mostró que su nivel en una célula ES fue crucial para su potencial de desarrollo (Niwa et al., 2000). Es así que, se lograron definir 3 roles de *Oct4* en las células ES: 1. El aumento de sus niveles da como resultado la diferenciación de mesodermo y ectodermo; 2. La disminución de sus niveles conduce a la formación de células de trofoblasto (similar a las células *Oct4*^{-/-} ES) y 3. Los valores entre ambos niveles representan la cantidad crucial que se necesita para mantener las células ES pluripotentes (Niwa et al., 2000).

Otro gen que mantiene la pluripotencia fue identificado por Chambers et al. (2003), *Nanog*, que tiene patrones de expresión similares a *Oct4*. Cuando se elimina de las células ES, éstas pierden el control sobre la pluripotencia y se diferencian a células extraembrionarias. A diferencia de *Oct4*, la sobreexpresión de *Nanog* aumenta la expansión clonal de las células ES, lo que sugiere diferentes formas de acción para ambos genes (Mitsui et al., 2003).

INTRODUCCIÓN

Posteriormente, al comienzo de la gastrulación (6.0-6.5 días post coito), en el lado posterior del embrión, el mesodermo recién formado está marcado por la expresión de *Brachyury (T)* que permanece expresado durante la expansión del mesodermo. Este gen se encuentra regulado negativamente a nivel de las alas mesodérmicas migratorias y se ha demostrado que está involucrado en el despliegue de las células mesodérmicas a través de la línea primitiva (Rivera-Pérez & Magnuson, 2005; Anlaş et al., 2021).

A medida que avanza la gastrulación y se alarga la línea primitiva (7.0-7.5 días post coito), se pueden distinguir molecularmente diferentes formas en que se presenta el mesodermo. Las células mesodérmicas directamente adyacentes a la región extraembrionaria forman mesodermo posterior y expresan genes como *Evx1* (Bell et al., 2016).

Las células pertenecientes a la línea primitiva y que migran hacia el tejido extraembrionario en esta región proximal contribuirán a la formación del mesodermo extraembrionario, que puede ser marcado por *Flk1* (Zhao & Choi, 2019). En la parte anterior de la línea primitiva, la formación de mesendodermo y mesodermo anterior se caracteriza por marcadores como *Gsc* y *Lhx1* (Ulmer et al., 2017; Boward, 2019). Estas células contribuyen a la formación del nodo, y al desarrollo del endodermo definitivo (que da lugar al intestino), marcado por genes como *Sox17* (Nowotschin et al., 2019). El notocordio y la placa precordial, que derivan del nodo, ambos subyacentes a la placa neural (que se pliega para formar el tubo neural y el cerebro), que se caracteriza por la expresión de *Sox1* (Shparberg et al., 2019).

Estos genes de referencia mencionados se han logrado identificar previamente “*in vitro*” e “*in vivo*” mediante diversas técnicas de localización (Figura 5). Es así que, en los embriones de ratón en sus estadíos tempranos (3-3,5 dpc) se evidenció la expresión de *Oct4* y *Nanog* coincidiendo con su rol a nivel de la pluripotencia (Nichols et al., 1998; Chambers et al., 2003). Por su parte, *T*, *Evx1* y *Gsc* demostraron una clara marcación en la línea primitiva, cuya aparición marca el inicio de la gastrulación en el embrión de ratón, mientras que la expresión de *Lhx1* se evidenció como parches de expresión mesodérmica, sugiriendo todos en conjunto, el inicio de la gastrulación. Finalmente, *Flk1*, *Sox1* y *Sox17* se han expresado a nivel del mesodermo extraembrionario (destinado a dar lugar a los componentes hematopoyéticos y endoteliales de las islas sanguíneas del saco vitelino), en el sistema nervioso central en desarrollo y en el endodermo definitivo de la gástrula, respectivamente (Wood & Episkopou, 1999; Kanai-Azuma et al., 2002; Rodriguez et al., 2017).

INTRODUCCIÓN

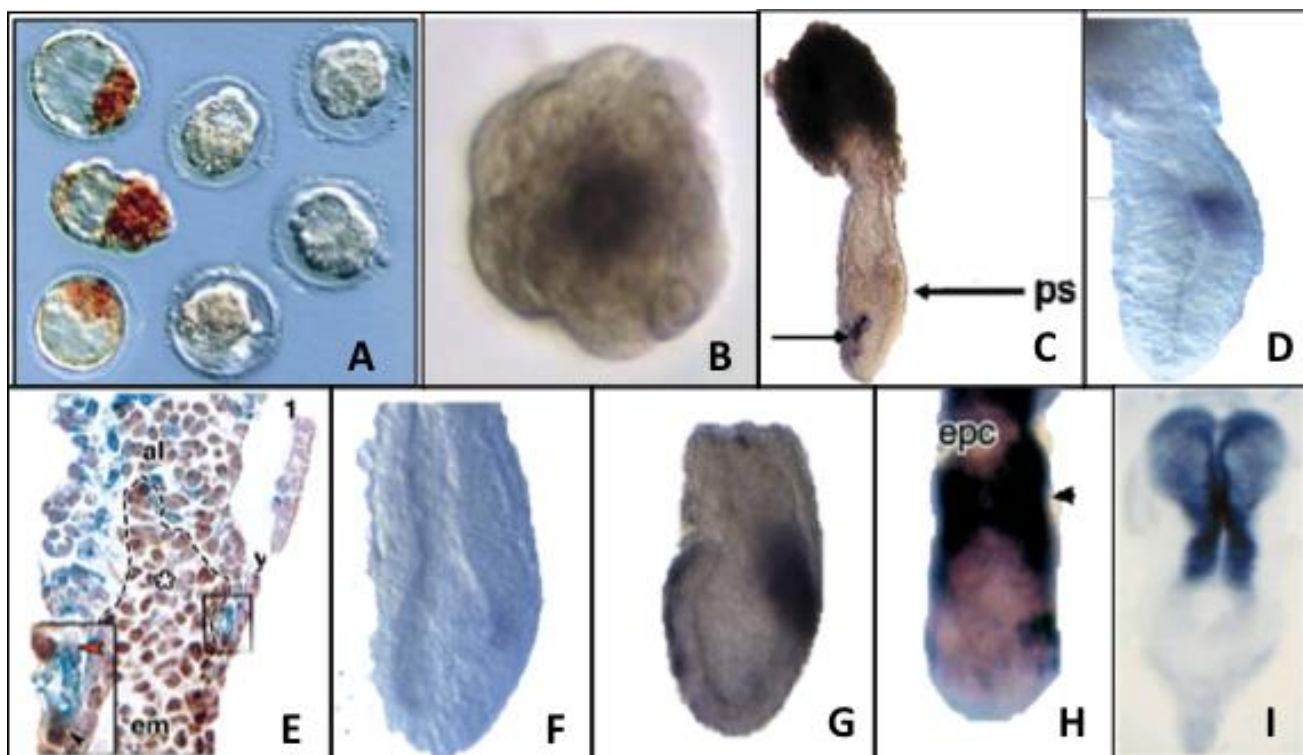


Figura 5. Expresión embrionaria de marcadores del desarrollo embrionario temprano murino in vivo. (A) OCT4: tres embriones (3,5 dpc) con ICM inmunorreactivos (Extraído de Nichols et al., 1998). (B) NANOG: primera señal localizada en las mórulas compactadas (3 dpc)(Extraído de Chambers et al., 2003). (C) T: expresión en la región de la línea primitiva (6.5 dpc) (Extraído de Pearce et al., 1999). (D) EVX1: expresión en el extremo proximal de la línea primitiva (6.25 dpc) (Extraído de Crossley & Martin, 1995). (E) FLK1: Expresión en el vaso de confluencia prospectivo (8 dpc) (Extraído de Rodríguez et al., 2017). (F) GSC: expresión en el extremo distal de la línea primitiva (6.5 dpc)(Extraído de Crossley & Martin, 1995). (G) LHX1: expresión en el mesodermo en la parte posterior del embrión propiamente dicho (6.5dpc) a nivel de mesodermo (Extraído de Biechele et al., 2011). (H) SOX17: fuerte expresión en el endodermo visceral extraembrionario y en el endodermo extremo anterior de la línea primitiva (7 dpc) (Extraído de Kanai-Azuma et al., 2002). (I) SOX1: se expresa en el neuroectodermo desde el inicio de la somitogénesis (8 dpc) (Extraído de Wood & Episkopou, 1999).

Adicionalmente a lo descripto, Willems & Leyns (2008) han logrado detectar la expresión de algunos de estos genes de referencia en EB de ratón tratados con Activina A/Nodal, su inhibidor SB-431542 y BMP4 en diferentes concentraciones, así como en un ambiente libre de ellos. Sólo 5 ng/ml de Activina A indujeron la expresión de *T* y un aumento adicional de la concentración de Activina A redujo sus niveles. El tratamiento con SB-431542 no afectó al dominio de expresión de *T* en el EB. De forma similar a las bajas concentraciones de Activina A, Bmp4 indujo la expresión de *T* en todo el EB, no en parches.

El análisis de la expresión de *Evx1* demostró que la Activina A inducía efectivamente niveles bajos de este gen en las células del EB y la inhibición de su señalización condujo a una menor tinción de *Evx1* en los EB cultivados en SCM en presencia de 10 mM de SB. Por su parte, la señalización de BMP4 aumenta el número de células positivas a *Evx1* en el EB.

La expresión de *Lhx1* aumentó inmediatamente tras el tratamiento con Activina A, dando lugar a una fuerte expresión en todo el EB. Al analizar el efecto de BMP4, la expresión de *Lhx1* no se vio afectada (Figura 6). Este protocolo de tratamiento de cuerpos embrionarios con diferentes

INTRODUCCIÓN

concentraciones de activadores e inhibidores al igual que medios suplementados y libres de suero se utilizó como la técnica de referencia de la primera parte de esta tesis (Willems & Leyns, 2008) en orden de cumplimentar con los objetivos que se presentan en la siguiente sección.

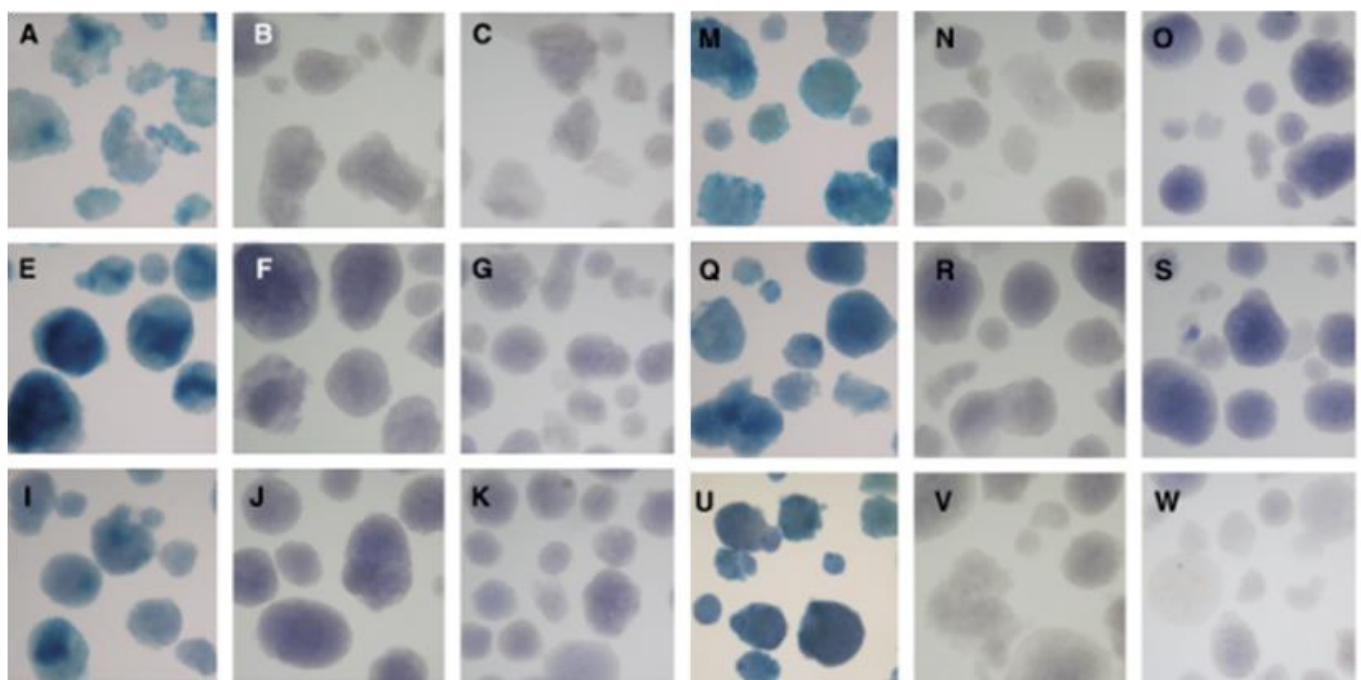


Figura 6. Efectos de la activina A/Nodal, y la proteína morfogenética ósea (BMP) en la formación del mesodermo, analizados mediante WISH. T en medio libre de Suero (**A**), con 5ng/ml de Activina A (**E**), con 50 ng/ml de Activina A (**I**), con 10 ng/ml de BMP4 (**M**), en medio conteniendo Suero (**Q**), con 10 ng/ml de SB-431542 (**U**). **Lhx1** en medio libre de Suero (**B**), con 5ng/ml de Activina A (**F**), con 50 ng/ml de Activina A (**J**), con 10 ng/ml de BMP4 (**N**), en medio conteniendo Suero (**R**), con 10 ng/ml de SB-431542 (**V**). **Evx1** en medio libre de Suero (**C**), con 5ng/ml de Activina A (**G**), con 50 ng/ml de Activina A (**K**), con 10 ng/ml de BMP4 (**O**), en medio conteniendo Suero (**S**), con 10 ng/ml de SB-431542 (**W**) (Extraído de Willems & Leyns, 2008).

Conjuntamente con estos genes de referencia se han podido identificar otros genes de expresión mesodérmica temprana aún no descritos hasta el momento según nuestro conocimiento.

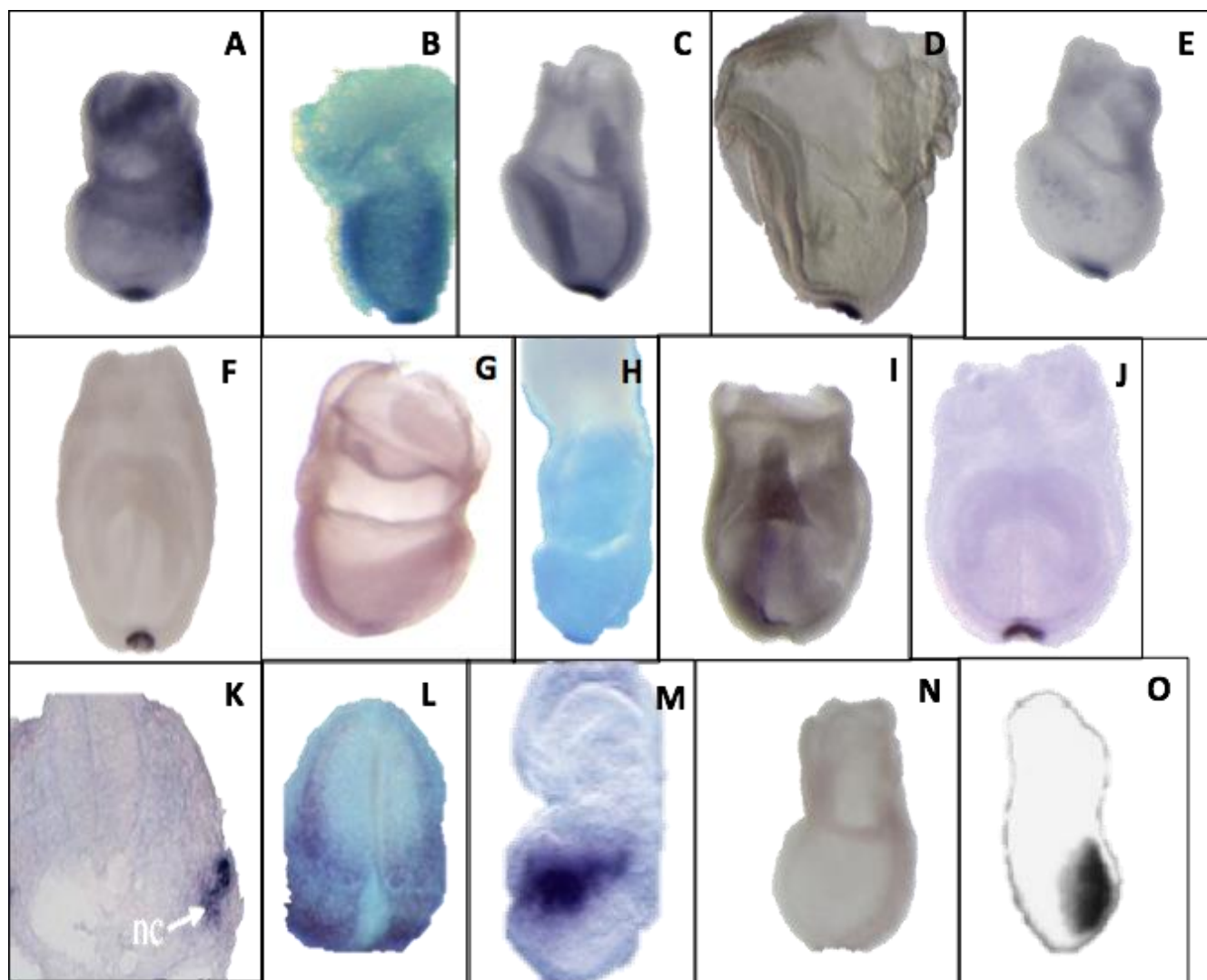


Figura 7. Expresión embrionaria temprana murina de los productos génicos menos conocidos. (A) **ATP9A:** Expresión generalizada en el embrión con una fuerte expresión en el epiblasto proximal posterior (7.5 dpc) (Extraído de Tamplin et al., 2011). (B) **CAPSL:** Expresión en todo el ectodermo extraembrionario y el epiblasto (7.0 dpc) (Extraído de Sousa-Nunes et al., 2003). (C) **CCPG10S:** Fuerte expresión en el nodo (7.5 dpc) (Extraído de Tamplin et al., 2011). (D) **D230030E09RIK:** Expresión limitada a las células centrales de la notocorda posterior (7.5 dpc) (Extraído de Hassan et al., 2010). (E) **DMGDH:** Expresión presente en la región central del nodo (7.5 dpc) (Extraído de Tamplin et al., 2011). (F) **FAM183B:** Expresión restringida al nodo del embrión en gastrulación (7.75 dpc) (Extraído de Tamplin et al., 2011). (G) **JOSD2:** Expresión restringida al nodo del embrión en gastrulación (7.5 dpc) (Extraído de Tamplin et al., 2008). (H) **KBTBD4:** Expresión restringida al nodo del embrión en gastrulación (7.5 dpc) (Extraído de Sousa-Nunes et al., 2003). (I) **MGST:** Expresión en el embrión en gastrulación (7.75 dpc) (Extraído de Tamplin et al., 2008). (J) **MLF1:** Expresión restringida al nodo del embrión en gastrulación (7.5 dpc) (Extraído de Tamplin et al., 2008). (K) **PCDH19:** Expresión restringida al nodo y al notocordio (9.5 dpc) (Extraído de Gaitan & Bouchard, 2006). (L) **PRTG:** Expresión en la región posterior (7.95 dpc) (Extraído de Vesque et al., 2006). (M) **RBM24:** El patrón sugiere la expresión en la región del desarrollo temprano del mesodermo cardíaco (7.0 dpc) (Extraído de Xu et al., 2009). (N) **SCARA3:** Expresión restringida al nodo del embrión en gastrulación (7.0 dpc) (Extraído de Tamplin et al., 2011). (O) **SLC7A3:** Expresión en línea primitiva (7.0 dpc) (Extraído de Ito & Groudine, 1997).

SUPERFAMILIA DEL TGF- β

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) desempeña varios roles a nivel del desarrollo y, a su vez, cumple un papel importante en las células madre embrionarias, principalmente en lo que refiere al compromiso de su destino (Ogawa et al. 2007). En mamíferos, esta superfamilia incluye casi 30 factores de crecimiento y diferenciación, destacándose Activin,

INTRODUCCIÓN

Nodal y las Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) por tener una amplia gama de actividades biológicas (Heldin et al. 1997).

Por otra parte, los miembros de esta familia presentan capacidades para mantener la arquitectura tisular, inducir la apoptosis e inhibir el crecimiento o bien, generar inestabilidad genómica en células o tejidos no transformados, lo que hace que también se comporten como supresores de tumores. En base a esto, Halder et al. (2005) sugieren que las células cancerígenas frecuentemente pierden la respuesta antiproliferativa al TGF- β y aumentan la producción de una o más de sus isoformas. Estos altos niveles pueden favorecer la invasión y metástasis ya que, a través de la supresión de la inmunovigilancia, promueven el crecimiento tumoral de forma autocrina y/o paracrina, estimulan la formación de tejido conectivo y la angiogénesis.

Todas las proteínas TGF- β , se sintetizan como proproteínas inactivas, que se activan por escisión proteolítica de convertasas, existiendo luego en forma de dímero, unidas por un puente disulfuro (Shi y Massague, 2003).

Los miembros de esta superfamilia emiten señales al unirse a un grupo de receptores transmembrana de serina-treonina (Ser-Thr) quinasa que se subdivide en receptores tipo I y tipo II. Los receptores de Tipo I tienen 7 miembros de la quinasa símil-actina (Actin-Like Kinase-ALK) 1 a 7 y los receptores de tipo II tienen 4 miembros: BMPRII, ActRIIA, ActRIIB y TRII. Los dos tipos de receptores son muy similares en estructura, con regiones extracelulares ricas en cisteína y regiones de dominios de quinasa intracelular, ambas necesarias para la señalización. Cada miembro de la superfamilia TGF se une a una combinación específica de receptores tipo I y tipo II y la señal se transduce al núcleo a través de la actividad de las proteínas mediadoras intracelulares Smad (Heldin et al. 1997; Kitisin et al. 2007) (Figura 8). Los ligandos se unen a los receptores de tipo II que inducen un cambio conformacional y la fosforilación y activación resultante del receptor de tipo I. El receptor tipo I luego fosforila las proteínas Smads y se inicia la cascada de señalización dando como resultado final la regulación de la expresión génica a nivel transcripcional (Shi y Massagué, 2003).

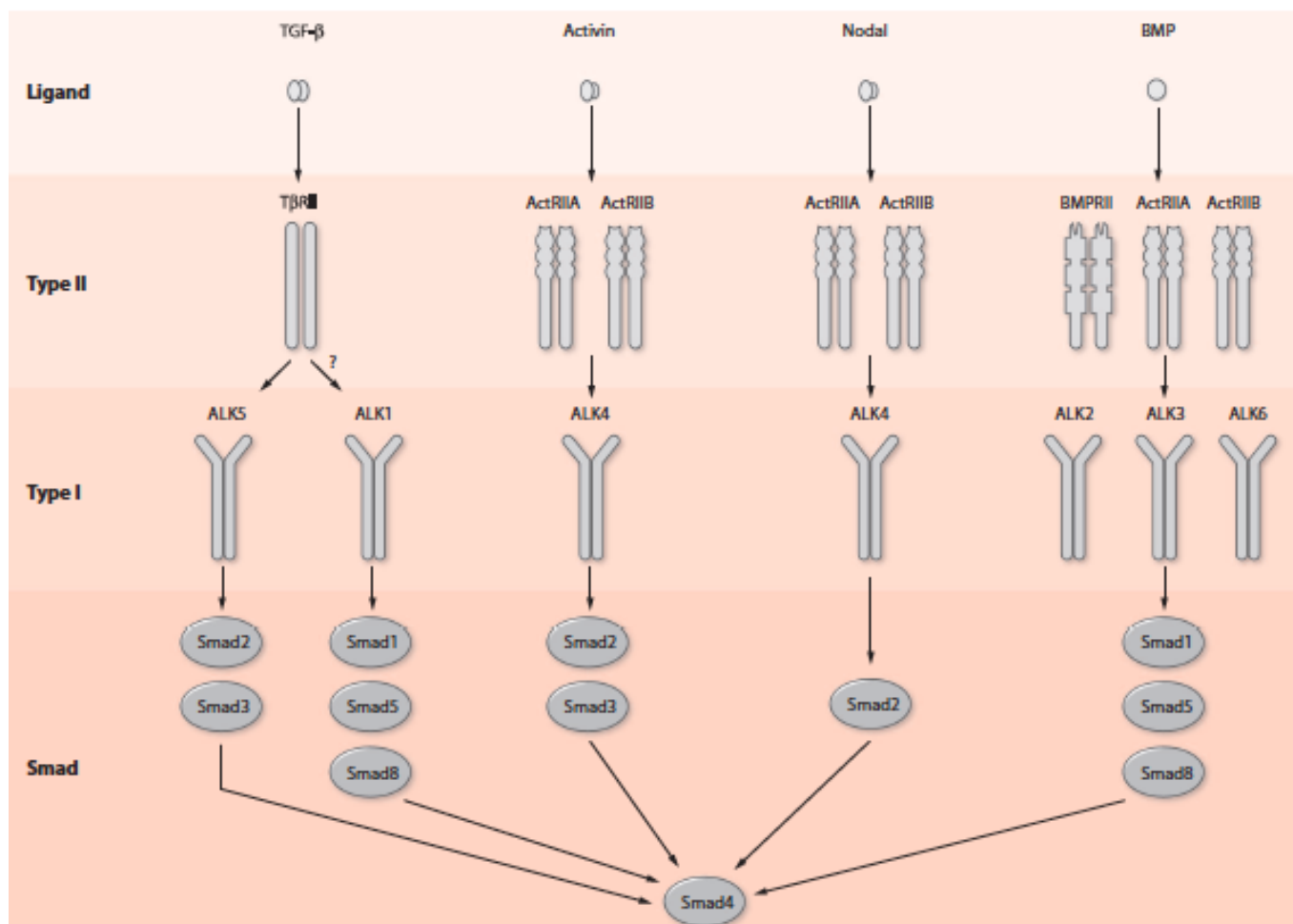


Figura 8. Esquema general de señalización de receptores tipo I y II. Receptores transmembrana de serina-treonina (Ser-Thr) quinasa (receptores tipo I y tipo II). Los receptores de Tipo I tienen 7 miembros de Actin-Like Kinase (ALK) 1 a 7 y los receptores de tipo II tienen 4 miembros: BMPRII, ActRIIA, ActRIIB y TβRII. Los ligandos se unen a los receptores de tipo II que inducen un cambio conformacional y la fosforilación y activación resultante del receptor de tipo I. El receptor tipo I luego fosforila a las proteínas Smad (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 y Smad8 son activados por receptor mientras que Smad4 es el co-mediador o Smad común) (Extraído de Kitisin et al. 2007).

Activina y Nodal

Activina y Nodal son miembros de la superfamilia TGF que juegan un papel en el desarrollo embrionario y la regulación de la pluripotencia en las células madre. En el caso particular de Nodal, pese a que su forma inactiva es muy estable en comparación de su forma activa (Le Good et al., 2005), su conversión es crucial para lograr su función. Esto lo ha conseguido Beck et al., (2002) al demostrar la similitud existente entre su fenotipo de doble mutante de dos convertasas y el mutante *Nodal*^{-/-}. Por su parte, sus dímeros activos activarán las cascadas intracelulares para iniciar la transcripción (Schier y Shen, 2000; Whitman, 2001; Schier, 2003).

Nodal y Activina A funcionan a través de los mismos receptores, los receptores de clase ActRI o clase tipo I (ALK4/7) y los receptores de clase ActRIIA/B o clase tipo II. Se unen inicialmente al receptor de quinasa tipo II ActRIIA y ActRIIB, que luego fosforila el receptor tipo I, ALK4 y ALK7 respectivamente (Inman et al. 2002; Kitisin et al. 2007; Ogawa et al., 2007).

INTRODUCCIÓN

La capacidad autorreguladora de la señalización *Nodal* juega un papel crucial en el desarrollo embrionario pero a su vez, su actividad puede estar restringida por varios antagonistas, cada uno de los cuales tiene un papel exclusivo en el diseño del embrión (Whitman, 2001).

Nodal se expresa en el epiblasto, previo a la gastrulación y activará los genes del endodermo distal visceral (dVE, del inglés distal visceral endoderm) y la región extraembrionaria (*Bmp4*). Sus antagonistas producidos en el endodermo visceral anterior (aVE, del inglés anterior visceral endoderm), restringirán la expresión nodal hacia la región posterior y más proximal del embrión (Whitman, 2001). En este momento, Nodal coincide con los primeros marcadores de la línea primitiva, lo que indica que induce la misma. Basado en el patrón de expresión de Nodal en el 7.0 dpc, se revela su segundo papel importante: Su expresión en la línea primitiva anterior, implica que contribuirá a la formación y especificación del mesendodermo y el nodo.

Mediante un mutante knock-out de Nodal, se logró determinar que el embrión no logra alcanzar la gastrulación y muere poco después de la implantación (Conlon et al., 1994). Esto, junto a la sobreexpresión *Nodal* en células ES, permitió revelar su importante rol como inductor de mesodermo (Pfendler et al., 2005). Adicionalmente también es capaz de inducir endodermo cómo su proteína relacionada, Activina A.

Activina A, es el factor que logra la inducción de mesodermo a nivel de las células ES murinas y humanas, produciendo un aumento en los marcadores musculares y cardíacos (Schuldiner et al., 2000). Entre estos últimos, estimula la expresión del gen *T* y *Gsc* (Johansson & Wiles, 1995). Posteriormente, su papel en la formación de endodermo (principalmente páncreas) fue descrito por varios grupos (Ku et al., 2004; Kubo et al., 2004; Tada et al., 2005; Gadue et al., 2006).

En contraposición al rol de las proteínas mencionadas, se demostró que la adición de SB-431542, podría prevenir la inducción del mesodermo (Gadue et al., 2006), ya que se trata de un bloqueador de la vía de señalización de Activina/Nodal, que suprime los receptores ALK4/7, sin influir en otras vías de señalización de TGF- β , como la vía BMP (Inman et al., 2002). Este inhibidor, tiene otros roles significativos en contra de la superfamilia del TGF- β , tales como impedir la apoptosis, suprimir el crecimiento en varios tipos de células, bloquear la motilidad celular, la migración, la invasión y la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en las líneas celulares de cáncer humano. Estos últimos, son efectos promotores de tumores propios del TGF- β (Halder et al., 2005).

Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs)

Las BMPs, al igual que Nodal y Activina, son miembros de la superfamilia de proteínas secretadas del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y a su vez, es considerada la subfamilia más grande. Las BMPs tienen una función crítica en el desarrollo de mamíferos, con roles clave en el

INTRODUCCIÓN

control del crecimiento celular, la morfogénesis, la proliferación, la diferenciación, la migración, la apoptosis y la organogénesis en general. Además, cumplen un papel importante después del nacimiento en la fisiopatología de varias enfermedades, incluida la osteoporosis, la artritis, las enfermedades renales, la hipertensión pulmonar, las enfermedades cerebrovasculares y el cáncer (Yanagita, 2005; Markić et al., 2011; Xu et al. 2013; Kuzaka et al., 2015). Dentro de las BMPs, existe conservación entre sus distintos subgrupos (Lyons et al., 1995), entre ellos, sólo las funciones de BMP4 y BMP7, serán abordadas en esta tesis (Figura 9).

BMP4

Se identificó a BMP4 dentro de un primer subgrupo dentro las BMPs junto a BMP2 (Lyons et al., 1995). En cuanto a su función, se describió por primera vez su capacidad inductora de mesodermo en la rana (Koster et al., 1991). Posteriormente, en el ratón, se evidenció que la gastrulación ocurre en algunos embriones mutantes resultantes de la eliminación del gen, lo que sugiere que, no es crucial para la inducción del mesodermo (Winnier et al., 1995).

La forma y el procesamiento de la proteína BMP4 es comparable a la de Nodal, excepto que parece ser menos sensible a la degradación que esta última (Constam & Robertson, 1999). Dado que es un miembro de la superfamilia de TGF- β , su cascada de señalización es muy similar a la vía Activin/Nodal (Miyazono et al., 2005). Sus receptores también se pueden subdividir en dos clases y la dimerización de uno de cada tipo es necesaria para activar los componentes posteriores. Se ha demostrado que varios de estos receptores son esenciales durante la gastrulación (Mishina et al., 1995; Beppu et al., 2000; Mishina et al., 2002).

En cuanto a los roles de BMP4 en el desarrollo temprano, se ha demostrado, por la eliminación del gen en sí o de los componentes posteriores de su vía que, podría desempeñar un papel flexible y dependiente del tiempo para determinar el destino celular.

BMP4 se expresa por primera vez en la ICM, en la etapa de blastocisto, con un rol dirigido hacia la implantación y el inicio de la cavitación en el ectodermo del embrión (Coucouvanis & Martin, 1999). Pero se evidenció un papel redundante de BMP2 y BMP4 en este último proceso (Winnier et al., 1995; Coucouvanis & Martin, 1999) ya que al eliminar BMP4 no se evidenciaron problemas (Figura 9).

La expresión de BMP4 vuelve a aparecer alrededor del 5,5 dpc, en el ectodermo extraembrionario, inducida por Nodal. Su posible función en esta etapa temprana se demostró al eliminar el tejido extraembrionario donde se expresa BMP4 y obtener como resultado la incapacidad del dVE de moverse hacia delante así como deteriorar su movimiento anterior (Soares et al., 2005; Richardson et al., 2006).

INTRODUCCIÓN

Bmp4 permanece extraembrionario durante la gastrulación (Coucouvanis & Martin, 1999) y su papel podría ser dual, como lo reflejan los diferentes fenotipos que se observan al realizar una mutación en su gen (Winnier et al., 1995). Algunos embriones no se gastrulan, lo que indica la importancia de *Bmp4* en la inducción y mantenimiento del mesodermo y, por lo tanto, también para la formación de la línea primitiva y el nodo (Winnier et al., 1995; Fujiwara et al., 2002; Ben-Haim et al., 2006). Por otra parte, aquellos embriones mutantes *Bmp4* que se desarrollan hasta aproximadamente el 9,5 dpc con una formación correcta del nodo, carecen de vascularización, estructuras posteriores y un compartimento extraembrionario reducido, lo que sugiere un segundo papel importante de *Bmp4* en la formación y diferenciación de la población de células mesodermo posteriores (Winnier et al., 1995; Chang et al., 1999). Posteriormente, se demostró que la señalización de BMP era necesaria para el desarrollo del mesodermo paraxial y, por lo tanto, de los somitas (Miura et al., 2006), lo que sugiere que, en similitud con Nodal, BMP4 tiene múltiples funciones durante la gastrulación.

En lo que respecta al análisis *in vitro*, la actividad de señalización de BMP4 en la inducción de mesodermo en células ES de ratón, fue demostrada mediante un estudio de Johansson & Wiles (1995). En éste, se evidenció su capacidad para inducir la expresión de *T*, y también marcadores del linaje hematopoyético en una etapa más tardía del desarrollo de los EB. Por otra parte, también se ha demostrado que la adición de BMP4 dañó la expresión de todos los marcadores neurales (Ying et al., 2003; Bouhon et al., 2005), obteniendo así un papel antineural.

BMP7

En cuanto al rol de los miembros de una segunda subclase, se ha demostrado que BMP7 interviene de manera crucial no sólo durante el desarrollo, sino también en la fisiología y fisiopatología renal en adultos (Markić et al., 2010). Se expresa y está asociado con interacciones inductivas en varios tejidos normales, incluidos el cerebro, el bazo, el músculo esquelético, el hígado y el riñón.

BMP7 se expresa en las primeras etapas de desarrollo murino, consistente con un papel en la diferenciación del mismo. A su vez, es el único miembro conocido que se expresa en embriones gastrulantes, y sus sitios de expresión son el mesodermo axial y el endodermo definitivo (Lyons et al., 1995) (Figura 9).

BMP7, se identificó inicialmente como un potente factor osteogénico purificado de hueso y por ello también se denominó proteína osteogénica-1 (OP-1) o DVR-7 (Celeste et al., 1990; Ozkaynak et al., 1990). Posteriormente, se determinó su expresión en las primeras etapas del desarrollo murino, poco después de la implantación y su ulterior localización en tejidos como la notocorda y el ectodermo. Por lo tanto, se pensó que los mutantes deficientes en BMP7 presentarían

INTRODUCCIÓN

anormalidades que afecten el patrón axial, como ha sido el caso de otros miembros de la familia de TGF- β expresados durante la gastrulación, entre ellos Nodal y BMP4 (Zhou et al. 1993; Conlon et al. 1994; Winnier et al., 1995). Sin embargo, pese a la presencia de defectos esqueléticos específicos con penetrancia variable, la formación de ejes, el patrón neuronal y el desarrollo intestinal ocurren normalmente en embriones que carecen de BMP7, mientras que las anormalidades presentes están asociadas con la pérdida del continuo crecimiento y la diferenciación de los sistemas renal y ocular. Esto sugiere que, si bien los defectos oculares y renales se detectan por primera vez después de la inducción, éstos se vuelven progresivamente más graves con el tiempo. Tanto el riñón como el ojo contienen poblaciones celulares que expresan exclusivamente BMP7, dándole a este gen un rol de factor de crecimiento localizado, que regula la supervivencia o el mantenimiento de los tipos de células diferenciadas esenciales para la maduración de ambos órganos (Dudley et al., 1995; Dudley et al., 1997).

Particularmente, en el sistema renal, se sabe que, si bien BMP7 se expresa en cada etapa del aparato urogenital en desarrollo, es el único miembro de la familia BMP expresado en el mesénquima metanéfrico y en la zona inductiva del uréter (Luo et al., 1995; Dudley et al., 1997). Esto lo posiciona como un inductor temprano de nefrogénesis ya que, en su ausencia, las células apoptóticas se detectan por primera vez en el mesénquima a 13,5 dpc y, antes de 14.5 dpc las células mesenquimatosas metanéflicas mueren, un fenómeno que también se observa cuando el mesénquima metanéfrico se cultiva en ausencia de tejidos inductivos adecuados (Saxen, 1987).

El riñón ha sido identificado como sitio principal de síntesis de BMP7 durante la vida postnatal ya que regula la diferenciación del mesénquima renal, preserva la función del órgano, protegiéndolo y regenerándolo en caso de una lesión. En el caso del riñón humano normal, su expresión se detectó en el epitelio de los túbulos proximal y distal así como en los glomérulos (Borovecki et al., 2004; Markić et al., 2011; Xu et al. 2013; Tsujimura et al., 2016).

BMP7 es esencial para promover la ramificación continua y la morfogénesis del brote ureteral, ya que permite mantener la proliferación de poblaciones de células madre mesenquimales que ocupan la zona nefrogénica o afectar la competencia de esta población para convertirse en condensados pretubulares (Dudley et al., 1995). Asimismo, es considerada una molécula inductora temprana del glomérulo (Luo et al., 1995).

BMP7 y su rol en el desarrollo de carcinomas renales

Al igual que otros BMPs, BMP7 tiene relevancia en muchos carcinomas como de células escamosas esofágicas, el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer de pulmón, el melanoma, cáncer gástrico, cáncer hepático y cáncer colorrectal (Bujis et al., 2007; Rothhammer et al., 2007;

INTRODUCCIÓN

Motoyama et al., 2008; Alarmo et al., 2009; Chen et al., 2010; Aoki et al., 2011; Shi et al., 2011; Megumi et al., 2012; Naber et al., 2012; Li et al., 2013; Xu et al., 2013). Sin embargo, en lo que respecta a carcinomas renales, la expresión e importancia clínica de BMP7 aún es limitada. Si bien se ha determinado su mayor expresión en los carcinomas de células renales (CCR) en comparación con el tejido normal, a nivel de los estadios tumorales más avanzados del carcinoma renal de células claras (ccRCC) dicha expresión se pierde o se regula negativamente en comparación con el parénquima renal adyacente sano. Esto implica que BMP7 tiene un papel protector en la preservación de la estructura y función de los riñones maduros y su pérdida puede conducir al desarrollo de neoplasia (Kwak et al., 2007; Markić et al., 2010; Bašić-Jukić et al., 2011; Markić et al., 2011; Furic-Cunko et al., 2015).

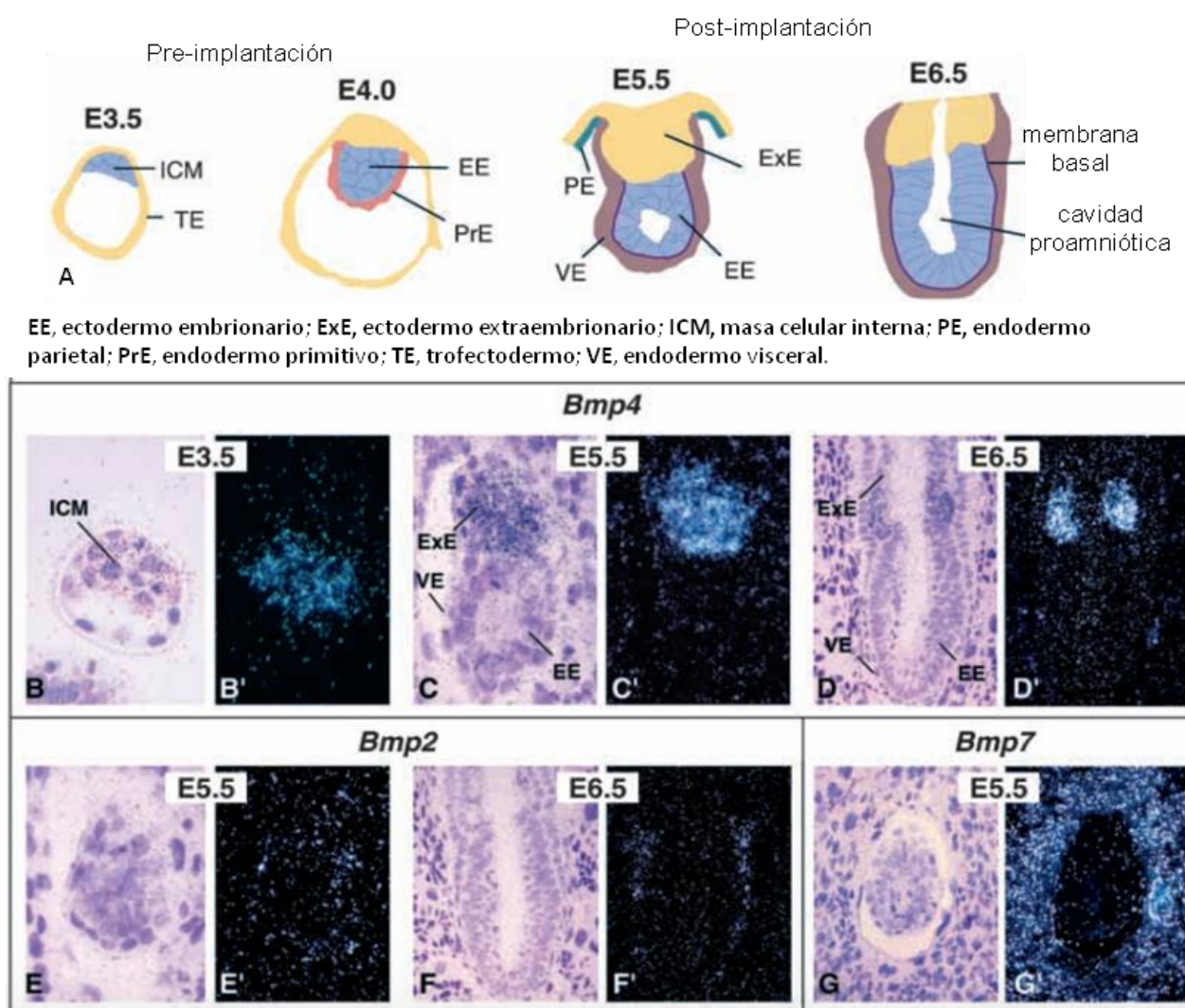


Figura 9. Expresión de los genes BMP en los embriones de peri-implantación. (A) Diagramas esquemáticos del embrión de ratón de 3.5 a 6.5 dpc, que ilustran el desarrollo del endodermo extraembrionario y el proceso de cavitación que conduce a la formación de la cavidad proamniótica. (B-G) Hibridación de sondas antisentido para *Bmp4* (B,B'-D,D'), *Bmp2* (E,E',F,F') o *Bmp7* (G,G') en secciones de embriones en las etapas indicadas. (B-G) imágenes de campo claro; (B'-G') vistas correspondientes de campo oscuro. (C,D,F) Secciones sagitales; (E) la porción embrionaria del conceptous seccionada en un plano intermedio entre el transversal y el sagital. Tiempo de exposición radioautográfica: (B',C',E') 24 días; (D',F') 30 días; (G') 20 días. (Extraído de Coucouvanis & Martin, 1999).

INTRODUCCIÓN

CARCINOMAS RENALES

El carcinoma de células renales (CCR) comprende el 3% de todas las neoplasias humanas en el mundo, variando considerablemente entre las diferentes poblaciones y regiones y convirtiéndolo en el más letal entre los tumores malignos urológicos comunes, con una tasa de supervivencia de aproximadamente 40 a 67% a 5 años en todas las etapas (Lindblad, 2004). Este porcentaje varía ampliamente dependiendo de la diseminación tumoral local. La enfermedad en estadio III tiene una supervivencia a 5 años entre 60 y 70%, mientras que para el RCC metastásico distante el porcentaje es inferior al 10%.

El RCC comprende el 90-95% de las neoplasias que surgen del riñón y a su vez, se compone de muchas categorías diferentes de cáncer renal, cada una con diferente histología, distintivas alteraciones genéticas y moleculares con diferentes cursos clínicos y respuestas a la terapia.

Según su aspecto histológico, están compuestos predominantemente por células con citoplasma claro, aunque son comunes y pueden prevalecer aquellas que posean citoplasma eosinófilo. En cuanto a su anatomía, puede ser sólido, trabecular, tubular y quístico, aunque pueden visualizarse áreas puntuales de crecimiento papilar.

Es importante identificar y diferenciar los subtipos e incluso las variantes de RCC, para así, no sólo proporcionar un análisis en profundidad de los mecanismos que producen estas diferencias, sino también para el manejo y tratamiento de pacientes afectados con esta enfermedad (Ricketts et al., 2018).

Cada subtipo deriva de las distintas áreas del epitelio renal: células convencionales o de células claras (ccRCC), papilares, cromóforas y CCR no clasificables (Pulido et al., 2007). El ccRCC se origina en el epitelio tubular proximal y constituye el principal de los CCR (80% - 85%). El RCC papilar se subdivide en los tipos 1 y 2, es el segundo subtipo más común de cáncer de riñón, con una prevalencia del 10%-15% y se caracteriza por células tumorales dispuestas en una configuración papilar. El cromóforo es un subtipo poco frecuente de CCR ya que posee una prevalencia de aproximadamente el 5% de los tumores malignos renales, se sabe que se desarrolla en la corteza renal y que consta de dos subtipos histológicos, la variedad clásica y la eosinófila (Thoenes et al., 1986). Finalmente, el carcinoma de los conductos de Bellini supone el 0,3-1% de los tumores renales primarios (Valente et al., 2011).

La etiología del CCR aún no se ha identificado, se desarrolla como una forma esporádica o como una enfermedad hereditaria, y cualquiera que sea el subtipo, se describe como altamente resistente a las terapias convencionales. En general, se sabe que el CCR se produce a consecuencia de que el tumor adquiere distintas propiedades siguiendo el modelo de carcinogénesis. Esto le permite resistir a señales inhibitorias de crecimiento exógenas, evadir la apoptosis y perder la capacidad del

INTRODUCCIÓN

control del ciclo celular. Esto último, le permite a la célula proliferar sin límites y metastizar a distancia, entre otros sucesos.

A nivel genético, es posible diferenciar entre dos tipos de CCR, ccRCC y no ccRCC y así explicar sus distintas formas histológicas y su diferente comportamiento e historia natural. Esto radica en que los ccRCC presentan una clara relación con el grado de inactivación del gen del factor von Hippel Lindau (VHL), siendo un evento precoz y necesario en su desarrollo, mientras que esto no sucede en el caso los no-ccRCC (Pulido et al., 2007).

En Argentina, el CCR es la novena causa de muerte por cáncer en varones y la decimotercera en mujeres. A nivel mundial en los últimos años la incidencia de este carcinoma se ha incrementado, en particular en países desarrollados, sin embargo, su mortalidad, con invasión tumoral y metástasis como la principal causa de muerte, no ha sufrido grandes variaciones. Habitualmente el diagnóstico se realiza en pacientes de 60-70 años, aunque últimamente se han registrado casos en pacientes jóvenes.

Se cree que aproximadamente 30% a 40% de los pacientes con localización primaria de RCC desarrollarán enfermedad metastásica si no se detecta temprano, mientras que casi el 25% de los pacientes presentan metástasis cuando acuden al tratamiento. Se ha informado de metástasis en casi todos los órganos del cuerpo humano, incluidos el cerebro, la piel, los huesos, el páncreas, la tiroides, los pulmones y el hígado. Es así como, el pronóstico para pacientes con CCR es pobre, ya que la detección tardía y la rápida propagación de la metástasis tienen un impacto negativo en la supervivencia del paciente. Sumado a esto, se sabe que después de que los tumores se extirpan por completo, el CCR puede reaparecer localmente o como enfermedad metastásica.

Las opciones de tratamiento para el CCR metastásico son restringidas porque muestra respuesta limitada o nula a las terapias convencionales, incluidas la quimioterapia y la radioterapia. (Combe et al., 2015; Dai et al., 2016; Khan et al., 2016; Matak et al., 2017; Matak et al., 2017; Rasti et al., 2018)

El tratamiento de elección en primera instancia es la nefrectomía, total o parcial, puede tener un buen pronóstico a largo plazo y es efectiva en un 90% de los casos si el tumor es de Estadío I y en el 50% si es de Estadío II. Para pacientes en estadíos más avanzados (III, IV o metastásicos) el pronóstico de vida se reduce a 1-3 años (Itoi et al., 2004; Perroud et al., 2006; Badalian et al., 2007). De lo anterior resulta evidente, que el perfil metabólico de los tumores renales puede servir como un biomarcador confiable de transformación maligna y comportamiento biológico y tanto su investigación como su validación es prioritaria y necesaria para este tipo de cáncer (Catchpole et al., 2011).

INTRODUCCIÓN

En última instancia, pero no menos importante, una novedosa investigación ha logrado caracterizar a ciertas líneas celulares renales cancerosas (Caki-1, Caki-2 y ACHN) como células madre. Esto se evidenció teniendo en cuenta ciertas características tales como la sobreexpresión celular de *OCT4* y *NANOG* (genes reguladores clave que mantienen la pluripotencia y las propiedades de autorrenovación de las células madre), la capacidad de formar colonias celulares 3D estables y finalmente la alta expresión del marcador CD105 (marcador de células madre mesenquimales y miembro de la familia del TGF- β) (Khan et al., 2016). A su vez, recientemente también se ha encontrado que una elevada actividad de la vía de señalización del TGF- β está asociada con un acortamiento en la supervivencia de la enfermedad en RCC (Sjölund et al., 2011).

CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES DE CÉLULAS CLARAS (ccRCC)

En cuanto a su origen, se sabe que las células ccRCC derivan de las células lumbinales de los túbulos contorneados proximales de las nefronas, que expresan un alto nivel intrínseco de proteína de resistencia a múltiples fármacos (MDR-1) lo que probablemente le da el carácter quimiorresistente (Combe et al., 2015).

La característica fenotípica más llamativa del ccRCC es su clara morfología celular, que se ha relacionado con la acumulación de lípidos y glucógeno.

En lo que respecta a las alteraciones biológicas estas se pueden resumir en tres principales: Pérdida de la función renal con la consecuente regulación negativa de las vías de excreción y los canales de electrolitos e iones; disfunción de varias vías metabólicas; y la activación de las vías inmunes, particularmente a nivel de presentación y procesamiento de antígenos.

Los ccRCC presentan una profusa vascularización así como áreas de necrosis, especialmente cuando el tumor crece más rápido que el suministro de nutrientes por vía sanguínea (Pulido et al., 2007; Tun et al., 2010).

El ccRCC agrupa un conjunto de tumores con un amplio espectro de alteraciones genéticas y epigenéticas específicas que implican alteraciones en el número de copias y pérdida de heterocigosidad. Algunos de los genes implicados en la patogénesis de los tumores renales y las características de comportamiento histopatológico y clínico, presentan una fuerte correlación entre sí (Lindblad, 2004).

Más del 90% de los carcinomas renales de células claras muestran la típica alteración citogenética del material alélico en el brazo corto del cromosoma 3 (3p), estrechamente asociado con pérdida y/o inactivación del gen supresor de tumores VHL, en particular, en el locus 3p25–26, que se ha implicado en el origen del RCC familiar y esporádico (Bachs et al., 2006; Ricketts & Linehan, 2014; Schökrpur et al., 2016).

INTRODUCCIÓN

El ccRCC ocurre de forma familiar o esporádica, clasificándose de la siguiente manera:

- **ccRCC esporádico:** es el más frecuente de los cánceres renales (aproximadamente el 70 a 75%) y se originan a partir de la célula epitelial de ducto contorneado proximal. Presenta la característica alteración en el cromosoma 3p, con un 30-56% de mutaciones en el gen de VHL y hasta un 19% de silenciamiento del mismo. Su histología es característica con una membrana citoplasmática muy bien definida y un citoplasma ópticamente vacío o en determinados casos débilmente eosinófilos en torno al núcleo.
- **ccRCC de tipo familiar:** Se caracteriza por afectar a dos o más familiares en primer grado y, a diferencia de los casos del grupo anterior, tienden a ser tumores únicos y confinados al riñón. Si bien son muy poco frecuentes, su histología es indistinguible del esporádico. En cuanto a la mutación responsable, reside en diversos puntos de rotura en el cromosoma 3 y son típicamente múltiples y bilaterales.

En su mayoría, las clasificaciones de los tumores renales se basaban fundamentalmente en parámetros histológicos, lo cual resulta insuficiente para proporcionar un análisis en profundidad de los mecanismos que producen estas diferencias. En muchos casos, pese a presentar una morfología muy similar, pueden responder a alteraciones genéticas totalmente diferentes y así ocultar enfermedades específicas (Ricketts et al., 2018; López et al., 2008).

MICROAMBIENTE TUMORAL

En un determinado proceso cancerígeno, el escenario que rodea al tumor constituye el denominado microambiente tumoral (MAT) y es lo que lo determina como una estructura biológica autosuficiente.

El entorno tumoral se compone de células, así como de integrantes no celulares. Al MAT se le asigna un importante papel en el control del crecimiento tisular anormal, la progresión tumoral, el desarrollo de metástasis, la resistencia localizada a quimioterapéuticos, así como en el posterior desarrollo de neoplasias malignas. Es por esto que se apunta al MAT como una opción de tratamiento novedosa y atractiva para encapsular o destruir las células cancerosas (Fernandes et al., 2018).

Dentro de su composición heterogénea y dinámica se encuentra una matriz extracelular (ECM) y una variedad de integrantes celulares entre los que se encuentran: fibroblastos, células neuroendocrinas, adiposas, endoteliales, inmunoinflamatorias y las redes vasculares sanguíneas y linfáticas. El sistema inmunológico es el que está más asociado con el proceso de desarrollo del cáncer por sus funciones de inhibición y promoción del mismo a nivel del MAT (Balkwill et al. 2012; Wang et al. 2017; Heidegger et al. 2019; Zhu et al., 2019) (Figura 10).

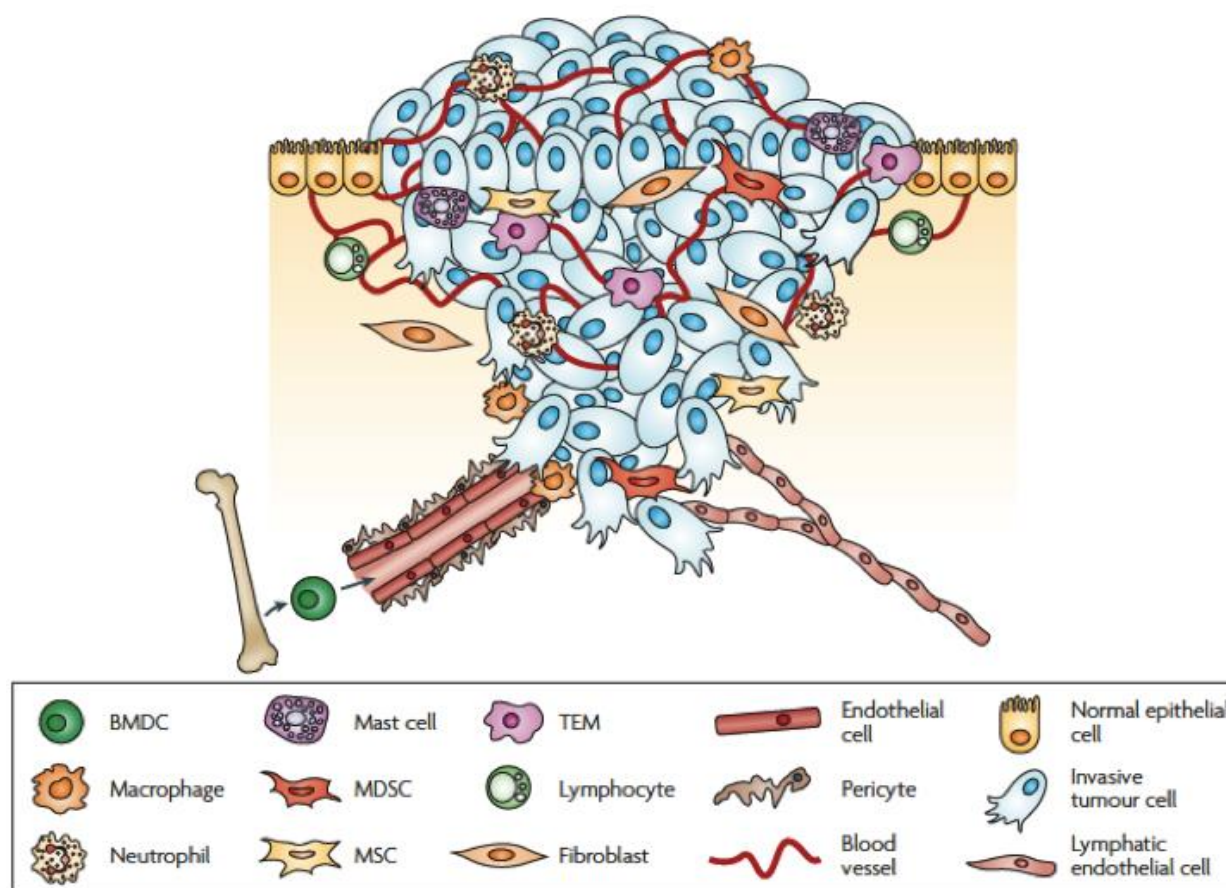


Figura 10. Microambiente tumoral (MAT). Microambiente tumoral complejo (MAT) con características estructurales y biofísicas peculiares que comprende subconjuntos heterogéneos de numerosas células, incluidas las células endoteliales de la sangre y la circulación linfática, los fibroblastos del estroma y una variedad de células derivadas de la médula ósea (BMDC), incluidos los macrófagos, las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), Monocitos que expresan TIE2 (TEM) y células madre mesenquimales (MSC) (Extraído de Joyce & Pollard, 2008).

Las subpoblaciones celulares corrompidas por células neoplásicas malignas constan de una red compleja de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y enzimas inflamatorias, mediante la cual actúan de forma activa y directa sobre la progresión tumoral al promover el crecimiento, la latencia y la invasión, así como la metástasis.

Las propiedades físicas y químicas del MAT del ccRCC se encuentran íntimamente relacionadas, destacándose las siguientes:

a. Alta presión de líquido intersticial (IFP)

Dentro de las principales consecuencias se encuentran las múltiples anomalías estructurales y funcionales del tejido debido a la remodelación de su matriz lo que provoca una desorganización de los vasos sanguíneos y una ausencia total de los linfáticos. Como consecuencia de esto, disminuye el suministro de nutrientes y se acumulan los productos de desecho de forma inadecuada. Además, el revestimiento endotelial es incompleto careciendo de una capa de pericitos o de una membrana basal intacta, haciéndolos más permeables que los de tejidos normales. Esto provoca una fuga de líquido y proteínas osmóticas de la sangre al espacio intersticial debido a la diferencia de presión

INTRODUCCIÓN

existente (presión hidrostática reducida en el vaso y osmótica coloidal aumentada en el intersticio) resultando en una elevación pasiva de la IFP del tumor.

b. Acidosis extracelular

La alteración de los productos del metabolismo a nivel vascular contribuye significativamente a la acidez interna del tumor. Esta disminución del pH se explica mediante el intercambio existente a través de la membrana plasmática, es decir, la variedad de bombeo iónico de las células que proveen de iones H^+ , entre los que se incluyen el cotransportador monocarboxilato H^+ , el H^+ ATPasa vacuolar, el intercambiador Na^+/H^+ y el intercambiador $Cl^-/bicarbonato$ dependiente de Na^+ . Sumado a esto, se sabe que las células cancerosas limitan su metabolismo energético en gran parte a la glucólisis anaeróbica, incluso en presencia de oxígeno. Por lo tanto, la mayor absorción de glucosa y su fermentación a lactato provocan un exceso de protones. El pH extracelular ácido conduce a la salida de iones H^+ hacia el tejido adyacente normal no canceroso, llevándolo a su muerte celular (Cairns et al., 2006; Chen & Pagel, 2015; Fernandes et al., 2018).

c. Baja tensión de oxígeno o hipoxia

El suministro de oxígeno al tumor se ve disminuido como consecuencia de la combinación de anomalías estructurales y funcionales vasculares anteriormente mencionadas junto a una rápida proliferación de células cancerosas. Por lo que, al aumentar el consumo de oxígeno y disminuir el acceso a él por las células presentes en la periferia del tumor surgen grandes regiones de hipoxia tumoral. En general, los componentes celulares del tumor están expuestos a periodos fluctuantes de reoxigenación e hipoxia profunda/moderada y esto atrae o activa más células no tumorales, principalmente las células inmunes (Cairns et al., 2006; Fernandes et al., 2018; Gilkes et al., 2014).

El grado de hipoxia tumoral se correlaciona con su pronóstico en varios tipos de tumores. La capacidad de las células para adaptarse a períodos de hipoxia es importante para su supervivencia tanto en estados fisiológicos como fisiopatológicos. El mecanismo mejor entendido de la regulación de la homeostasis del oxígeno es a través de los factores inducibles por hipoxia (HIFs).

Factores inducibles por hipoxia (HIFs)

El complejo HIF está formado por 2 subunidades: α y β . Ambas subunidades comparten los motivos estructurales PAS (dominio de interacción proteína-proteína) y N terminal bHLH (hélice-giro-hélice básico), necesarios para su dimerización y unión a las secuencias de elementos de respuesta a hipoxia (HRE), respectivamente. Por su parte, la subunidad α presenta 3 isoformas (HIF-1, 2 y 3), sensibles al oxígeno mediante los dominios ODD (oxygen dependent degradation domain) que, a su

INTRODUCCIÓN

vez, son los que dimerizan con la subunidad β o ARNT expresada constitutivamente (Talks et al., 2000).

HIF α interactúa con los co-activadores, a través de los dominios de transactivación (TAD) que contienen a los aminoácidos prolina (P) y asparagina (N), blanco de las hidroxilasas (propil-4-hidroxilasas y el factor inhibidor de HIF-1) en condiciones de normoxia. Una vez hidroxilado, HIF α es reconocido por la E3 ligasa Von Hippel-Lindau (VHL) y degradado por la vía proteosomal, por lo que al detectar el oxígeno resulta en una vida media de aproximadamente 5 minutos. Mientras que, una reducción en los niveles de oxígeno produce estabilización de HIF-1 α , siendo una de las respuestas a la hipoxia (Calle et al, 2019).

En hipoxia, las hidroxilasas se encuentran inhibidas, lo que permite la estabilización de HIF- α . De esta manera HIF- α y HIF- β dimerizan y translocan al núcleo para unirse a las secuencias HRE e iniciar la transcripción génica (Loboda et al., 2012).

En el caso de la subunidad β , esta se expresa a un nivel constante en el citoplasma independientemente de la concentración de oxígeno (Talks et al., 2000).

La mayoría de los ccRCC muestran pérdida y/o inactivación del gen supresor de tumores VHL, el cual es encargado de catalizar la reacción química de ubiquitinización del factor inducible por hipoxia alfa (HIF- α) para su posterior degradación por el proteosoma. Por lo tanto, se evidencia una regulación en alza de los factores inducibles por hipoxia (HIF) en estos tumores. Estudios recientes determinan el rol de esta proteína como mediadora de la reprogramación del metabolismo de la glucosa y la energía, incluida el aumento de la glucólisis y la producción de lactato en las células cancerosas renales (Pulido et al., 2007; Catchpole et al., 2011).

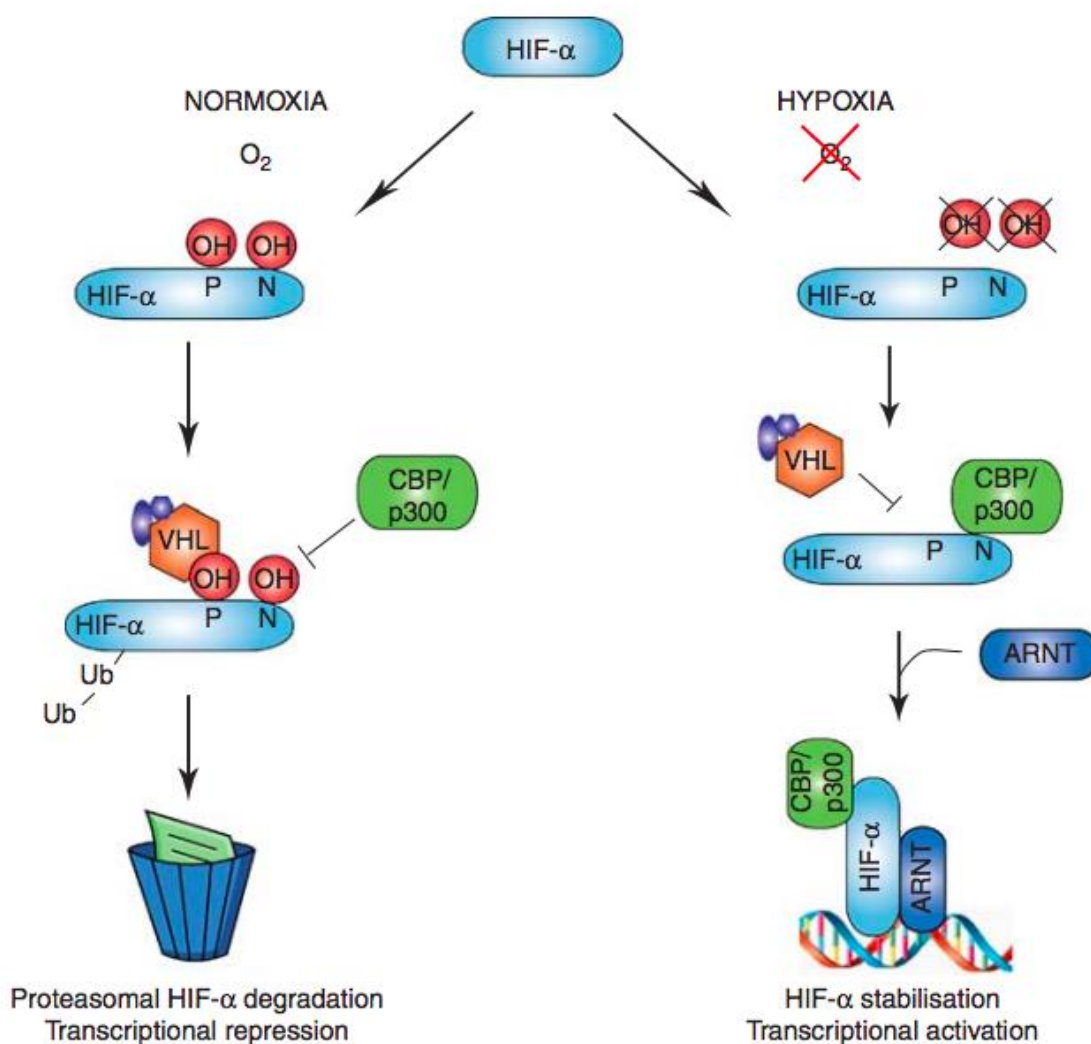


Figura 10. Regulación del complejo HIF dependiente del oxígeno. En condiciones de normoxia, las enzimas dependientes del oxígeno (propil-4-hidroxilasas y el factor inhibidor de HIF-1) hidroxilan los residuos de asparagina y prolina y, así provocan la degradación de las subunidades HIF-α. En hipoxia, la actividad de las enzimas se inhibe, permitiendo que HIF-α y HIF-β dimericen y transloquen al núcleo para unirse a las secuencias HRE (elementos de respuesta a hipoxia) e iniciar la transcripción de génica. HIF, factor de transcripción inducible por hipoxia; VHL, von Hippel-Lindau (Extraído de Martin et al., 2011)

d. Angiogénesis y proliferación

La naturaleza hipervascular del ccRCC a través de la sobreexpresión de factores angiogénicos así como la activación de una gran cantidad de procesos entre los que se encuentra la proliferación de células tumorales se puede explicar por la estabilización antes mencionada de HIF-1α (Baldewijns et al., 2007). La importancia de la angiogénesis como un factor radica en que potencia el crecimiento del tumor, favoreciendo su invasión y diseminación. Es así que una mayor expresión de VEGF-A, junto a los niveles elevados de HIF-1α se han correlacionado con una alta densidad vascular, una mayor tasa de proliferación, un grado nuclear más alto y un estadio tumoral avanzado, lo que determina un mal resultado clínico (Bürgesser et al., 2014). Es posible determinar la proliferación celular mediante la expresión de los siguientes marcadores: el antígeno de

INTRODUCCIÓN

proliferación Ki-67 y el antígeno nuclear de células proliferantes PCNA. El primero de ellos se expresa en las fases G1, G2, G3 y M del ciclo celular, pero no en las células G0. Por su parte, PCNA tiene su expresión máxima en la fase G1/S del ciclo celular (Kayaselçuk et al., 2002).

e. Transición epitelial-mesenquimal

Un paso crucial en la carcinogénesis del ccRCC es la diseminación metastásica a través de la transición epitelial-mesenquimal (TEM). Esta última es inducida por la hipoxia, a nivel de las células epiteliales renales primarias de forma dependiente de HIF-1 α (Cannito et al., 2010).

La TEM define un proceso en el que las células epiteliales pierden su polaridad e integridad, así como las características de adhesión célula-célula y adquieren un fenotipo mesenquimatoso migratorio e invasivo. La pérdida de E-Caderina se considera un evento crucial durante este proceso, lo cual provoca en parte la pérdida de la reorganización del citoesqueleto de actina para promover así el comportamiento migratorio (Gasinska et al., 2018).

Diferentes moléculas y vías de señalización están asociadas al control de la TEM, entre ellas, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el cual induce patrones de expresión génica que favorecen su desarrollo. Por lo tanto, los elementos moleculares involucrados pueden representar una pieza clave para mejorar el resultado de los pacientes con ccRCC (Landolt et al., 2017).

Además, la TEM juega un rol esencial en la patogénesis, invasión y respuesta a terapias del ccRCC, ya que promueve la inmunoresistencia a los fármacos de las células cancerosas, contribuyendo así a la invasión local y la metástasis distal. Es por esto que se correlaciona este proceso con un mayor riesgo de recurrencia y una peor supervivencia global (Piva et al., 2016).

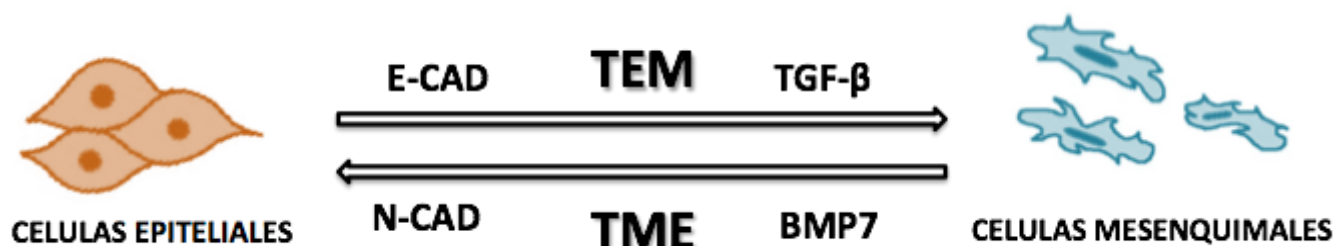


Figura 12. Transición epitelial-mesenquimal (TEM). Durante este proceso las células epiteliales pierden sus características y ganan propiedades mesenquimales. Las células del carcinoma adquieren un estado similar al mesenquimal para facilitar su migración e invasión. El proceso de TEM es inducido y regulado por factores de crecimiento y en este diseño se destaca el TGF- β , mientras que el BMP7 induce el estado opuesto (Imagen propia).

MICROAMBIENTE TUMORAL DE CCRCC

En el caso particular de ccRCC, se observaron grandes diferencias en su composición de células inmunes en comparación con los tejidos normales pero en lo que respecta a otros tipos de tumores, es similar, ya que actúa promoviendo el crecimiento y la metástasis de las células cancerígenas, y a su vez, debilita la capacidad de reconocimiento y erradicación de células neoplásicas por parte del sistema inmune. La principal diferencia del resto, radica en la extensión del infiltrado leucocitario y

INTRODUCCIÓN

del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) lo que puede activar la respuesta inmunitaria y otorgar un resultado a nivel clínico que se puede asociar con un pronóstico favorable o desfavorable (Pulido et al., 2007; Mier, 2019)

El microambiente de los ccRCC es pobre en oxígeno, pese a lo cual logra no sólo desarrollarse sino que además, evade la apoptosis, pierde la capacidad del control del ciclo celular permitiendo que la célula prolifere sin límites (Melana Colavita et al., 2021). Esta resistencia a las señales inhibitorias de crecimiento exógenas de crecimiento, le brindan a este tipo de tumor inmunotolerancia en el huésped, y le permiten generar factores angiogénicos, invadir la membrana basal y por último, metastatizar a distancia (Heidegger et al. 2019; Zhu et al., 2019).

HIPÓTESIS

TIPO DE INVESTIGACIÓN

HIPÓTESIS

- 1- Genes noveles y miembros de la superfamilia TGF- β están involucrados en la formación del eje anteroposterior y el modelado del mesodermo murino.
- 2- La expresión de estos genes típicos de la embriogénesis BMP7 y OCT4, así como E-caderina, representan potenciales biomarcadores de progresión en el carcinoma renal de células claras en el microambiente hipóxico tumoral.

TIPO DE INVESTIGACIÓN

El desarrollo de la presente tesis corresponde a una investigación básica, experimental y descriptiva con el uso de análisis multiparamétricos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Describir la expresión de genes novedales y de miembros de la superfamilia de TGF- β en la formación del eje anteroposterior y el modelado del mesodermo en las células madre embrionarias (ES) murinas y su posible implicancia en el desarrollo del carcinoma de células renales de células claras (ccRCC).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar un perfil de expresión mediante el empleo de RT-qPCR para cada uno de los nuevos genes candidatos y su implicancia en los eventos iniciales y determinantes del desarrollo murino, particularmente la formación del eje anteroposterior y el modelado del mesodermo.
- Desarrollar cultivos 3D a partir de líneas celulares madres murinas y renales humanas (E14tg2a, Caki-1, Caki-2, HEK-293), evaluando la expresión genes diana de la superfamilia del TGF- β con su morfología.
- Evaluar la expresión de BMP7 en muestras de pacientes con ccRCC, así como en líneas celulares primarias y metastásicas renales mediante técnicas de IHQ, ICQ y RT-qPCR.
- Establecer la tasa de proliferación de las células tumorales centrales y periféricas en el ccRCC, a través de la inmunomarcación de Ki-67.
- Estudiar la expresión de HIF-1 α y HIF-2 α como principales marcadores de hipoxia en zonas centrales y periféricas de muestras tumorales ccRCC.
- Evaluar el potencial rol de la adhesión celular como indicador de malignidad a nivel de núcleo y periferia de ccRCC a través de IHC de E-caderina.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

PACIENTES, DATOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS Y PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO

Se obtuvieron muestras quirúrgicas de 44 pacientes con diagnóstico de ccRCC. Estas muestras fueron obtenidas mediante nefrectomía radical en la Unidad de Urología del Hospital J.R. Vidal (Corrientes, Argentina) entre los años 2012 y 2019. Previo a este procedimiento quirúrgico, ningún paciente con ccRCC habían recibido otro tipo de tratamiento.

El promedio de edad de los pacientes en el momento del diagnóstico fue de 59 años con un rango entre 27 y 84 años.

Por su parte, los tumores se clasificaron por grado y estadio según la clasificación patológica Tumor-Nódulo-Metástasis (pTNM), la estadificación patológica se realizó según la sexta edición de la UICC (Sobin y Wittekind eds, 2002) y la clasificación nuclear de Fuhrman (Fuhrman et al., 1982). Los grados de Fuhrman G1, G2, G3 y G4 se registraron en 16 (36,35%), 24 (54,54%) y 3 (6,81%) y 1 (2,27%) casos respectivamente.

En el presente estudio, se seleccionaron 41 tumores según su estadio patológico del NTM y se los reagrupó en los siguientes grupos experimentales Estadio I (30 casos de pT1a N0M0 y PT1b N0M0), Estadio II (6 casos de pT2 N0M0) y Estadio III (5 casos de pT3a N0M0). Las muestras pertenecientes al estadio IV (3 casos totales de PT2A N0M1, pT3a N1M1 y pT4 N0M1) se excluyeron de este análisis.

Se recogieron muestras de especímenes de ccRCC extirpados quirúrgicamente así como de los tejidos distales normales homólogos. Las muestras pertenecientes al centro y periferia de cada espécimen tumoral fueron fijadas y/o procesadas para posteriores estudios.

Este estudio adoptó una ligera modificación del informe de Deniz et al 2015 sobre la definición de periferia y el centro o núcleo del tumor. Las muestras pertenecientes a las áreas infiltradas o fibrosas se clasificaron como "periferia" y las áreas que contenían únicamente células tumorales de ccRCC se clasificaron como el "centro o core" del tumor.

Tanto el diseño como los métodos llevados a cabo durante esta investigación han sido aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste y por el Departamento de Investigación Médica del Hospital J.R. Vidal de Corrientes, Argentina.

CULTIVOS CELULARES

Cultivos de células madres embrionarias de ratón (mESCs) y ensayos de diferenciación

La línea celular murina E14tg2a se cultivó en medio Knock-Out Eagle modificado de Dulbecco (DMEM KO, Thermo Fisher Scientific) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FCS) (Hyclone), β -mercaptoetanol 0,1 mM (GIBCO), aminoácidos no esenciales al 1% (AANE) (GIBCO), L-glutamina 2 mM (Sigma), 1000 U/ml de factor inhibidor de la leucemia humana (LIF; Sigma) ,

MATERIALES Y MÉTODOS

penicilina (100 UI/ml) y estreptomina (100 µg/ml (GIBCO) en placas de cultivo celular recubiertas de gelatina al 0.1%. Las placas fueron incubadas de acuerdo con los protocolos estándar de cultivo de tejidos de mamíferos en condiciones normóxicas con una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ a 37°C. Se realizó el pasaje de mESCs al menos una vez después de descongelar, hasta alcanzar aproximadamente el 80% de confluencia como monocapa y fue recolectada por tripsinización (solución de tripsina-EDTA al 0.25%; GIBCO) antes de ser utilizada en los experimentos procedentes.

Para ciertos experimentos, las mESCs se recolectaron y cultivaron durante 2 días en medios 2i (con inhibidores selectivos de GSK3β -PD0325901 1µM - y MEK1/2 -CHIR99021 3µM- que aumentan la viabilidad de las células madre embrionarias de ratón) en medios con SFB al 1,5% suplementados con LIF (Baharvand & Hassani, 2013).

Cultivos de células renales humanas

Líneas de carcinoma de células renales de células claras (ccRCC) humanas: Caki-1 (ATCC® HTB46™), Caki-2 (ATCC® HTB47™) y la línea celular de riñón de embrión humano HEK-293 (ATCC® CRL-1573™) se cultivaron en medios DMEM/F12 y RPMI 1640 suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Hyclone), penicilina (100 UI/ml) y estreptomina (100 µg/ml) en botellas de cultivo celular rectangulares de cuello inclinado de 75 cm² (Corning®) en condiciones de normoxia y de simulación de hipoxia (adición de 100-300 ug/ml de CoCl₂) a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. El cultivo de la línea celular HEK-293 se tomó como control. Todas las líneas celulares renales humanas, antes de ser utilizadas en los experimentos descritos, poseen al menos un pasaje luego de su descongelación, fueron cultivadas en monocapa hasta alcanzar aproximadamente el 80-90% de confluencia y recogidas por tripsinización (solución de tripsina-EDTA al 0,25%; GIBCO).

Formación de cuerpos embrionarios de ratón (mEBs) en diferentes condiciones de cultivo

Después de alcanzar la confluencia, se realizó el pasaje de las mESCs y se cultivaron en suspensión, en un medio con suero (SCM) y con medio restringido en suero (SFM) suplementados con N2 y B27 (inductores neuronales). Los cultivos se mantuvieron hasta lograr la diferenciación en cuerpos embrionarios de ratón (mEBs) como se describe en Ying et al., 2003. Después del pasaje celular las células restantes se recogieron como “día 0” del experimento. Los experimentos se realizaron independientemente y por triplicado para todas las condiciones (Corradi et al., 2015).

Se permitió que las mESCs se diferencien en mEBs en SCM a una densidad de 10.000 células/ml durante 6 días, cambiando el medio al menos 2 veces durante ese período. La recolección de células se realizó en los días 2, 3, 4, 5 y 6 de diferenciación. Se tomaron fotografías de los mEBs utilizando

MATERIALES Y MÉTODOS

un microscopio óptico invertido. Se registraron al menos seis vistas de campo para cada día de cultivo.

Se indujo la diferenciación de las mESCs en SFM para la formación de cuerpos embrionarios de ratón (mEBs) a una densidad de 5,000 células/ml. Se permitió que las células se diferenciaran por un total de 48 horas. Posteriormente, se mantuvieron durante otros 2 días en SFM (preparado en el momento de uso) que contenía Activina A recombinante humana (5 o 50 ng/ml), BMP4 recombinante de ratón (5 o 50 ng/ml) o el inhibidor del receptor de TGF- β tipo I SB431542 (10 μ M). Las muestras finales se recogieron el día 4.

Formación de esferoides celulares renales en diferentes condiciones de cultivo

Células de la línea embrionaria renal humana HEK-293 (ATCC® CRL-1573™), de las líneas de carcinoma de células renales claras (ccRCC) humanas Caki-1 (ATCC® HTB46™) y Caki-2 (ATCC® HTB-47™), fueron cultivadas en suspensión en placas de 96 pocillos en forma de U (CELLSTAR®) cubiertas con poli-HEMA (Sigma-Aldrich) por un periodo de 7 días. El cultivo celular se ajustó a una densidad de 10.000 células/ml en medio RPMI 1640 complementado con antibióticos (100 UI/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina), 10% de SFB y bicarbonato sódico (2,0 g/L) en las mismas condiciones de normoxia y de simulación de hipoxia mencionadas anteriormente. Se tomaron fotografías de las esferas formadas con un microscopio de luz invertido y con un aumento de 5x utilizando el software ISCapture.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Se realizó la evaluación de la morfología de las esferas celulares en cultivo 3D utilizando microscopía electrónica de barrido (MEB).

Las esferas formadas fueron fijadas con formol bufferado 10% en cubreobjetos durante 24 h (se colocó más de una esfera por cada cubreobjetos) contenidos en placas de cultivo de 35mm y seguidamente se deshidrataron en soluciones de concentración creciente de acetona: 12.5% - 30 min; 25% - 30 min; 50% - 30 min; 75% - 30 min; 100%. Posteriormente, las placas fueron selladas con parafilm para evitar la evaporación de acetona y poder continuar con el proceso. No se realizó el proceso de secado en punto crítico.

Luego, las esferas fueron trasladadas de los portaobjetos a los discos de grafito mediante el uso de un pincel. Seguidamente dicho disco fue colocado en el porta muestras del metalizador, que en este caso correspondió a un metalizado con oro.

Finalmente, se procedió con el montaje en el microscopio electrónico de barrido (modelo EVOLS15, marca CARL ZEISS, del IMCIF (Instituto de Medicina y Ciencias Forenses, Resistencia, Chaco) que consta con un detector de la señal brindada por electrones secundarios y un modo de alto vacío.

MATERIALES Y MÉTODOS

Finalmente se eligieron las mejores opciones de visualización que dependieron de la muestra a analizar (generalmente consistentes en un voltaje del haz de electrones aproximadamente de 2 o 3 Kv) utilizando el software INCA GSR, revisión 4.05.

INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Las secciones embebidas en parafina fueron desparafinadas y rehidratadas en alcoholes graduados utilizando protocolos de rutina. Cada sección (con un tamaño estándar de 4 µm) se incubó con los siguientes anticuerpos: Anti BMP-7 (Cat: 6E5D12: sc-517294 anticuerpo monoclonal de ratón criado contra una proteína recombinante correspondiente a los aminoácidos 239-431 de BMP-7 de origen humano - Santa Cruz Biotechnology), anti E-CAD (monoclonal de ratón G-10: sc-8426 - Santa Cruz Biotechnology), anti-PCNA (antisuero policlonal de conejo) y anti HIF-2α (anticuerpo policlonal de conejo NB100-122 HIF-2α /EPAS1, Novus Biological). Todos los anticuerpos primarios se ensayaron utilizando una dilución 1:100 y con una incubación de aproximadamente 16 horas a 4º C.

La inmunotinción se realizó utilizando un kit DAKO LSAB+/HRP (Dako Cytomation) seguido de la aplicación de un cromógeno DAB (kit DAKO) siguiendo las instrucciones del fabricante. En los experimentos de control, el anticuerpo primario fue sustituido por PBS.

A continuación, las muestras se tiñeron con hematoxilina y se visualizaron mediante el empleo de un microscopio óptico. Las células con partículas marrones depositadas en su estructura, se consideraron células positivas y se describió el patrón de expresión particular de cada proteína. Los controles positivos utilizados en los ensayos de inmunohistoquímica fueron: riñón hipóxico murino (ratones sometidos durante 6 h a hipoxia hipobárica - 0,4 atm) para HIF-2α y riñones humanos normales (área cortical) para BMP-7 y E-CAD.

La cuantificación de BMP-7, HIF-2α y ECAD se realizó mediante un análisis semicuantitativo. Se escogieron un total de 10 secciones de estadíos representativos de especímenes de ccRCC, y se examinaron 10 campos visuales de cada sección bajo un microscopio óptico CX-35 (Olympus, Japón) con un aumento de 125x utilizando una cámara microdigital Olympus Coolpix instalada en dicho microscopio. Se examinó el núcleo del tumor así como toda la región correspondiente al margen o periferia del mismo.

Análisis de la inmunotinción

Los portaobjetos teñidos con BMP-7, HIF-2α y E-CAD fueron analizados mediante microscopía óptica por dos investigadores independientes que desconocían la información correspondiente a cada uno de los pacientes. La intensidad de la tinción se calificó de la siguiente manera: 0 (sin

MATERIALES Y MÉTODOS

tinción), + (pequeña cantidad o tinción débil), ++ (tinción moderada) y +++ (tinción abundante o muy fuerte).

INMUNOCITOQUÍMICA (ICQ)

Las células Caki-1, Caki-2 y HEK-293 se cultivaron en cubreobjetos hasta alcanzar un 60-70% de confluencia. Posteriormente, se fijaron con paraformaldehído durante 15 minutos y se conservaron hasta su uso. A continuación, los portaobjetos se hidrataron con diferentes grados decrecientes de alcohol. Después de enjuagarlos con PBS, se trataron con Tritón X-100 al 1% en PBS durante 5 min y se volvieron a enjuagar dos veces con PBS Tween (5 min cada una). La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó sumergiendo los portaobjetos en peróxido de hidrógeno al 3% en PBS durante 5 minutos. Se volvieron a enjuagar dos veces con PBS Tween antes de la incubación con los anticuerpos primarios. Se utilizó un antisuero policlonal de conejo contra BMP-7, PCNA, HIF-2 α y E-CAD humanos a una dilución de 1:500 durante toda la noche o aproximadamente 16 horas a 4°C.

Se retiraron los anticuerpos primarios y los portaobjetos se enjuagaron con PBS. La inmunotinción se realizó utilizando un kit DAKO LSAB+/HRP (Dako Cytomation) seguido de la aplicación de un cromógeno DAB (kit DAKO) según las instrucciones brindadas por el fabricante. Todos los controles negativos se obtuvieron excluyendo el anticuerpo primario de la reacción. A continuación, las muestras se contratiñeron con hematoxilina y se visualizaron con un microscopio óptico.

A continuación, los portaobjetos se enjuagaron con agua de grifo y se deshidrataron en grados crecientes de alcohol isopropílico, se limpiaron con xileno y se montaron con una resina sintética neutra. Las imágenes se tomaron con una cámara microdigital Olympus Coolpix instalada en un microscopio CX-35 (Olympus, Japón).

Índice proliferativo

El índice proliferativo (IP) se expresó como el porcentaje de núcleos pardos positivos para Ki-67 por cada 1000 células cancerosas examinadas, respectivamente. Estos porcentajes se obtuvieron a partir de observaciones realizadas en zonas cancerosas histológicamente comprobadas sin necrosis, hemorragias o infiltraciones mononucleares. La evaluación de la proliferación en las células Caki se realizó mediante inmunocitoquímica de Ki-67.

RT-qPCR

Testeo de cebadores de genes desconocidos y cuantificación

Las mESCs se cultivaron como se describe anteriormente y se recogieron por tripsinización. El ARN total se extrajo usando el reactivo TRIzol® y luego se usó para la transcripción inversa de acuerdo con el método descrito en Kemp et al., 2005.

MATERIALES Y MÉTODOS

La qRT-PCR se realizó utilizando iTaq™ Universal SYBR R Green Supermix (Biorad) siguiendo un protocolo de ciclado de tres pasos (Tabla 1) y utilizando el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX connect™ (Biorad). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 µl, utilizando 1 µl de ADN copia (ADNc) y siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante.

Todos los cebadores se obtuvieron de las bases de datos disponibles o se diseñaron utilizando la herramienta de diseño de cebadores NCBI (Ye et al., 2012). Los cebadores se diseñaron para evitar la amplificación de ADN genómico (ADNg), se seleccionaron para tener entre 18 y 25 pares de bases (pb) y el tamaño del amplicón entre 150 y 250 pb para garantizar la máxima eficiencia de la qRT-PCR. El contenido de GC de los mismos se estandarizó entre 40-60% para proporcionar un buen anillado (annealing) y así garantizar la especificidad. La temperatura de fusión (T_m) se consideró óptima entre 55-60°C (Tabla 2). Todos los pares de cebadores se probaron inicialmente en ADNc correspondiente al día 4 de diferenciación de mEBs. Para cada prueba de cebador, se incluyeron un positivo (+RT), un negativo/no enzimático (-RT) y un control sin muestra (W) para permitir la detección de posibles contaminaciones. El amplicón generado se analizó y validó mediante una curva de fusión que contenga un único pico principal junto a la visualización de una única banda del tamaño esperado en el gel de agarosa correspondiente a la corrida electroforética. Se diseñaron nuevos pares de cebadores cuando fue necesario (Tabla 2).

Protocolo del ciclo de PCR en tiempo Real.

Pasos del ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo en minutos (') o segundos (")	Ciclo
Desnaturalización inicial	95	5'	X 1
Desnaturalización	95	15"	x 40/50
Annealing	58	30"	
Extensión	72	30"	
Melting	+0.5 hasta 100	10'	X 1

Tabla 1. Protocolo de 5 pasos con un número de entre 40 y 50 ciclos totales con un tiempo estimado de 2h 15 min.

La cuantificación de los niveles de expresión génica se realizó mediante el método de cuantificación relativa. En este método, los cambios en la cantidad en que se transcribe un gen determinado en múltiples muestras se expresa en relación a los niveles del control interno (Pfaffl, 2004). Esto es posible de obtener mediante el método de cuantificación relativa entre la proporción del gen objetivo y el gen de referencia, cuya ecuación es la siguiente:

$$R = 2^{-(\Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{control}})} = 2^{-(\Delta \Delta Ct)}$$

MATERIALES Y MÉTODOS

donde R es la relación de expresión entre el gen objetivo y el gen de referencia (β -actina), ΔC_t muestra es la diferencia entre el valor de C_t correspondiente al gen de interés y C_t del gen de referencia en una muestra tratada o bien en una muestra correspondiente a un día específico del desarrollo in vitro del cuerpo embrionario murino, y ΔC_t control hace alusión a la misma diferencia mencionada pero considerando, en este caso, una muestra no tratada (Pfaffl, 2001). β -actina se usó como gen de referencia ya que se expresa a niveles constantes durante el desarrollo embrionario de ratones (Willems et al., 2004). El umbral para obtener los valores de cada ciclo (C_t) fueron establecidos automáticamente por el software CFX Maestro™ y un valor límite idéntico se aplicó a través de todos los experimentos. Todas las experiencias fueron llevadas a cabo por triplicado utilizando tres muestras de ADN copia (ADNc) diferentes, y se promediaron los resultados. El valor obtenido (R) proporciona el nivel de expresión relativo a la etapa embrionaria de referencia (día 2 asignado como 1) y el uso de β -actina como gen de referencia brinda la oportunidad de comparar el nivel de expresión de los diferentes genes candidatos en diferentes etapas embrionarias como el objetivo principal.

Listado de cebadores diseñados.

Simbolo	Secuencia Forward del cebador (5' a 3')	Secuencia Reverse del cebador (5' a 3')
<i>Atp9a</i>	GAAAGGACGGTGGAGGGATG	GAAAGTTTCCGCAAACCGCT
<i>Caspl</i>	GAAAGGACGGTGGAGGGATG	GAAAGTTTCCGCAAACCGCT
<i>Ccp10s</i>	ACACTGGAAGACGGAGGGTT	AACTCTTTCCTGATAGCGAGAAGTC
<i>D230030E09Rik</i>	GAAAGGACGGTGGAGGGATG	GAAAGTTTCCGCAAACCGCT
<i>Dmgdh</i>	CCAGATGGGACATGGGATGTG	ATCCCTTTCCTGTGCGAGGTA
<i>Fam183b</i>	GGTGATCGTCTTCCCCAAG	CTGCCGACGAAATCTGCAAG
<i>Josd2</i>	TGATGTCAACGTGATCATGGCT	CCGGAGCTTTGAGTCCAGATTAT
<i>Kbtbd4</i>	CCCTATCTCGGTACAGCGGA	CGGCCTTCCACTGAAATGG
<i>Mgst1</i>	CACTGACGAGAAGGTGGAACG	TGGTGTGGTAGATCCGAGCA
<i>Mlf1</i>	GGTCATCACATCCATGACCGA	CAGTGTTTCCTGACCGTCCA
<i>Pcdh19</i>	GCCCATTTAATCAAAAGCAGCTC	TCTATCAGAGTGGCCAAGAATCC
<i>Prtg</i>	GGACACGACGTACACCAAGA	TCCTTGCAGGCCCTTTCAG
<i>Rbm24</i>	CGATGGTAGGAAGGCCAATGT	ATGTACGGTGTGGTGGGAAGC
<i>Scara3</i>	TGCTGGCCTCTCTGGTTTTT	CCTTCCTGATCTCTTGCCCC
<i>Slc7a3</i>	CTCCCTGGTGTCCATTTGTGTT	GAGTTGTCCACCAGGTCAGC

Tabla 2. Secuencias forward y reverse de cebadores diseñadas empleando la herramienta de diseño de cebadores NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/).

Cuantificación de marcadores en líneas celulares renales humanas

Las líneas celulares renales humanas se cultivaron como se ha descrito anteriormente y se recogieron por tripsinización. Se aisló el ARN total utilizando el reactivo TRIzol® y se transcribieron 2,5 µg de dicho ARN utilizando 50 pmol de Oligo dT (BIODYNAMICS, Buenos Aires, Argentina) y 10 µM de hexámeros aleatorios (Thermo Fisher Scientific). La transcriptasa inversa, M-MLV RT, fue utilizada siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante (Promega). La reacción se llevó a cabo con un paso inicial de calentamiento a 70°C durante 5 minutos para fundir la estructura secundaria dentro de la plantilla y seguido por un paso de extensión a 37°C durante 60 min en un volumen final de muestra de 25µl.

La RT-qPCR se realizó utilizando 1×SYBR Green PCR Master Mix (BIODYNAMICS, Buenos Aires, Argentina) siguiendo un protocolo de ciclado en tres pasos y utilizando el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX connect TM (BioRad). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 µl, utilizando 1 µl de ADNc y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Todos los cebadores se obtuvieron de las bases de datos disponibles o bien se diseñaron utilizando la herramienta de diseño de cebadores de NCBI (Ye et al., 2012). Los cebadores se diseñaron de forma que contengan un intrón para evitar la amplificación del ADN genómico (ADNg), para su posterior selección se consideró que contengan entre 18 y 25 pares de bases (pb) y que el tamaño del amplicón esté comprendido entre 150 y 250 pb, para así asegurar la máxima eficiencia de la qRT-PCR. El contenido de GC (Guanina-Citosina) de los cebadores se fijó entre el 40-60%, para proporcionar un buen recalentamiento y garantizar una alta especificidad y la temperatura de fusión (Tm) se consideró óptima cuando estaba dentro del rango de 55 a 60°C. Todas las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado. Se seleccionó el gen de la peptidilproil isomerasa A (PPIA) como control endógeno, ya que su expresión ha mostrado estabilidad en muestras de carcinoma de células renales (Jung et al, 2007).

Los cebadores diseñados y utilizados para los genes tumorales fueron los siguientes:

BMP7: 5'-AAGATAGCCATTTCTCACC-3'; -5'TGTAGTCCTTGTAGATCCG-3';

HIF-1α: 5'-GCGCGAACGACAAGAAAA-3'; 5'-GGCCTTATCAAGATGCGAAC-3';

HIF-2α: 5'AGACTCCGAGAACATGACCA-3'; 5'-CATGGAGAACACCACGTCAT-3';

PPIA: 5'-ATGCTGGACCCAACACAAAT-3' 5'-TCTTTCACTTTGCCAAACACC-3'.

El análisis de los datos se realizó mediante el método de cuantificación relativa ($R_{\text{sample}} = 2^{-(\Delta C_{\text{t sample}} - \Delta C_{\text{t control}})} = 2^{-(\Delta \Delta C_{\text{t}})}$), donde R es la relación de expresión entre el gen diana y el gen de referencia (PPIA), $\Delta C_{\text{t sample}}$ es la diferencia entre el valor Ct del gen de interés y el gen de referencia en una muestra tratada y $\Delta C_{\text{t control}}$ es la misma diferencia, pero en una muestra control (Pfaffl, 2004). El umbral para la obtención de los valores de ciclo umbral (Ct) fue

MATERIALES Y MÉTODOS

establecido automáticamente por el software CFX Maestro™ y el umbral idéntico se aplicó a través de todos los experimentos. Todos los experimentos de RT-qPCR se realizaron por triplicado utilizando tres muestras diferentes de ADNc, y los resultados se promediaron. Los resultados se expresaron como media ± error estándar de la media (EEM). Todos los experimentos se realizaron de forma independiente por triplicado.

El análisis de los datos se realizó mediante el método de cuantificación relativa:

$$R = 2^{-(\Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{control}})} = 2^{-(\Delta \Delta Ct)}$$

donde **R** es la relación de expresión entre el gen diana y el gen de referencia (PPIA), **ΔCt sample** es la diferencia entre el valor Ct del gen de interés y el gen de referencia en una muestra tratada y **ΔCt control** es la misma diferencia, pero en una muestra control (Pfaffl, 2004). El límite para la obtención de los valores de ciclo umbral (Ct) fue establecido automáticamente por el software CFX Maestro™. Todos los experimentos de RT-qPCR se realizaron por triplicado utilizando tres muestras diferentes de ADNc, y los resultados se promediaron. Los resultados se expresaron como media ± EEM. Todos los experimentos fueron desarrollados de forma independiente y por triplicado.

PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

Las imágenes de los especímenes de ccRCC se capturaron para que fueran representativas de todo el tumor, utilizando un patrón de trama que permitía que los campos capturados fueran aleatorios y evitaran su solapamiento. Se evaluaron diez campos por tumor (periferia y centro) con aumentos de baja y alta potencia (100x y 400x respectivamente).

Se tomaron imágenes representativas de las células Caki-1 y Caki-2 de diez campos de cultivos con un 70% de confluencia cada uno y utilizando una cámara digital Olympus Coolpix-micro montada en un microscopio invertido siguiendo idénticos criterios de aumento. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Prueba t de Student

Tanto el análisis estadístico como la presentación gráfica se realizaron con los paquetes GraphPad PrismR 6.0 e Instat R 5.0 (GraphPad, San Diego CA, EE.UU.). Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar (DE). Todos los experimentos se realizaron independientemente y por triplicado. Las comparaciones entre grupos se analizaron mediante la prueba t de Student emparejada de 2 colas. y todos los resultados con un nivel de p <0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Prueba U de Mann-Whitney

Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para cotejar los índices proliferativos entre el ccRCC y el tejido renal normal. Se utilizó la correlación de Pearson para determinar las correlaciones existentes entre los porcentajes de expresión de BMP7, E-CAD, HIF-2 α y Ki-67. Todos los resultados con un nivel de probabilidad $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos, mientras que un valor de p comprendido entre 0,05 y 0,10 se consideró con un límite significación.

RESULTADOS CAPITULO 1

DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE GENES NOVELES DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS Y SU ROL DURANTE LOS ESTADÍOS TEMPRANOS DEL DESARROLLO MURINO

Las complejas interacciones moleculares que gobiernan las etapas embrionarias aún necesitan más validación experimental y pruebas para aclarar las brechas e incertidumbres en cuanto a nuestro conocimiento para comprender el proceso de diferenciación embrionaria murina temprana.

El empleo de las células madre embrionarias de ratón (mESCs) como modelo *in vitro* para estudiar el desarrollo embrionario de mamíferos se ha validado ampliamente, exhibiendo características similares a las de las células involucradas *in vivo* en las etapas tempranas del desarrollo embrionario murino (Willems & Leyns, 2008).

Retomando algunos conceptos desarrollados en la sección de Introducción, se considera **etapa de desarrollo embrionario murino temprano** el período comprendido hasta el fin del proceso de gastrulación (aproximadamente 7.5 post coitum; dpc) coincidente en términos experimentales con el sexto día de cultivo de los mEBs.

En concordancia con el objetivo general de esta tesis, se estudió la expresión de marcadores moleculares involucrados en la formación del eje anteroposterior y el modelado del mesodermo en las mESCs, aplicando el conocimiento de la señalización molecular que ocurre durante el desarrollo temprano en el ratón.

La mayoría de los procesos responsables estudiados están regulados por la expresión de un grupo de actores cruciales en el desarrollo que incluyen diferentes factores transcripcionales y genes implicados en complejas vías de señalización.

En el presente estudio, se consideró una lista preliminar de genes candidatos elaborada a partir de una extensa búsqueda bibliográfica que incluyó bases de datos genéticos y que estaba centrada en los genes expresados durante los días 6,25 a 9,75 dpc y en estructuras anatómicas definidas (línea primitiva, mesodermo embrionario, mesendodermo, placa y proceso notocordal, notocordio y el brote de la cola). La expresión de los genes seleccionados en estos tejidos y etapas sugiere un posible papel en la inducción y/o el modelado del mesodermo.

Quince potenciales genes candidatos fueron inicialmente identificados y analizados en muestras de mESC en diferenciación mediante una serie de reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (RT-qPCR). Además, se evaluó el patrón de expresión génica de once de ellos después de la adición de moléculas estimulantes o inhibidoras con un papel relevante durante el desarrollo murino: Activina A, proteína morfogénica ósea 4 (BMP4) y el inhibidor conocido como SB431542. Finalmente, los patrones de expresión analizados se compararon con los marcadores de

RESULTADOS-CAPÍTULO 1

referencia del desarrollo embrionario murino, previamente establecidos (*Nanog*, *Oct4*, *Nodal*, *T*, *Snail1*, *N-cad*, *Evx1*, *E-cad*, *Sox17* y *Sox1*).

Cada nuevo gen se analizó de forma independiente utilizando mESC, como un modelo *in vitro* para estudiar el desarrollo embrionario temprano del ratón, en el que la señalización que se produce en el embrión se imitó y comparó con genes con una expresión conocida y bien caracterizada en las tres capas germinales del embrión de ratón.

La RT-qPCR fue el enfoque experimental de elección para la cuantificación de la expresión de los genes estudiados. En general, este análisis ha facilitado la identificación y caracterización de genes noveles, con un potencial rol en rutas específicas del desarrollo, así como sus vías moleculares/celulares subyacentes.

PUESTA A PUNTO DE UN MODELO DE DESARROLLO BASADO EN LA FORMACIÓN DE CUERPOS EMBRIONARIOS DE RATÓN (mEBs; MOUSE EMBRYOID BODIES)

Primeramente, se cultivaron células madre embrionarias de ratón (mESC) para evaluar sus propiedades de crecimiento en colonias características formando cuerpos embrionarios de ratón (mEB) *in vitro*.

Los mEB se analizaron diariamente durante 6 días de diferenciación para la expresión de varios genes embrionarios conocidos. El conjunto de marcadores utilizados incluyó:

- *Oct4*, *Nanog* y *Nodal* (pluripotencia) (Figura 13),
- *E-cad* y *N-cad* (transición epitelial-mesenquimal, EMT) (Figura 14),
- *Snail1*, *T*, *Evx1* y *Flk1* (mesodermo) (Figura 15),
- *Gsc* y *Lhx1* (mesendoderma) (Figura 15),
- *Sox17* (endoderma), *Sox1* (destino neural) (Figura 16).

En general, hubo una buena correlación entre la etapa de desarrollo embrionario en este ensayo *in vitro* y la expresión correspondiente de estos marcadores.

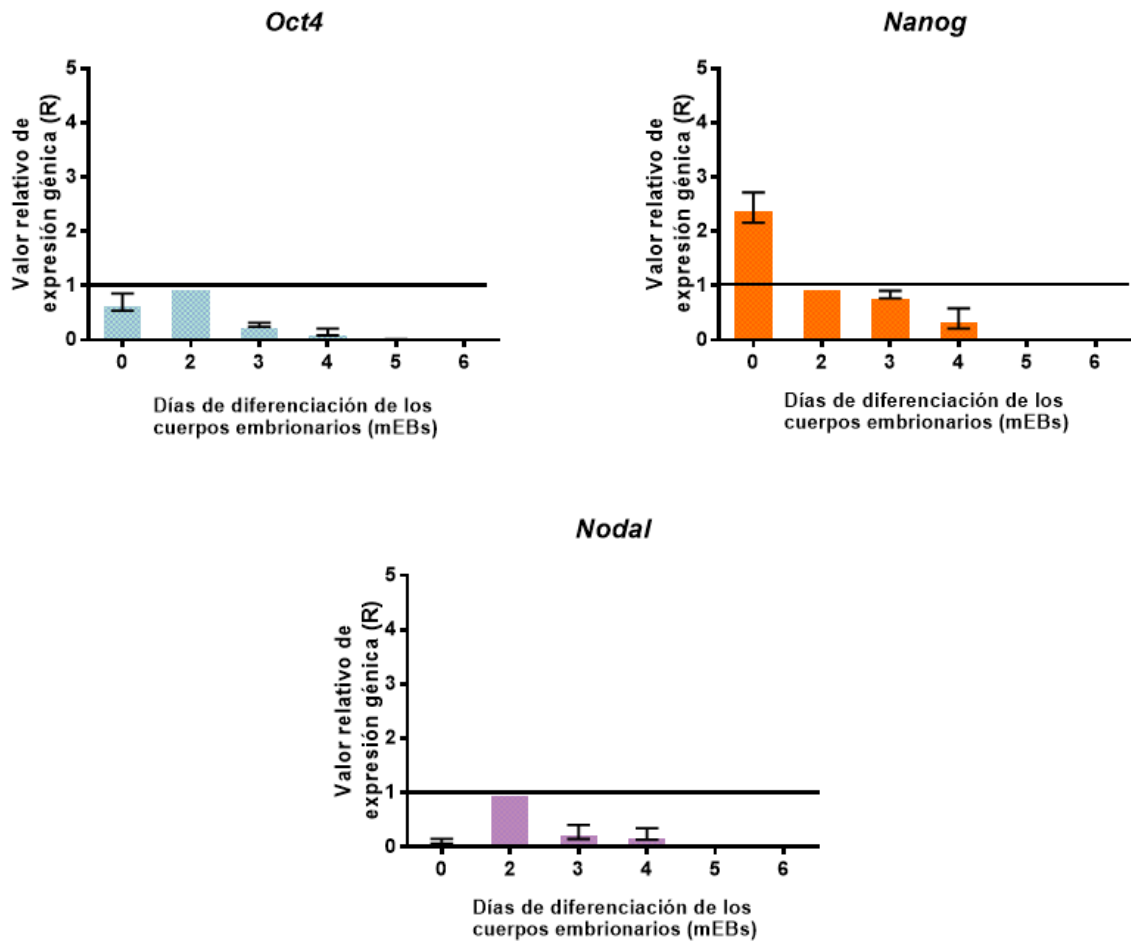


Figura 13. Expresión genética relativa de genes de referencia de marcadores de pluripotencia: Nodal, Nanog y Oct4 La expresión génica relativa (R) se calculó para los días 0, 2, 3, 4, 5 y 6 de diferenciación con el día 2 como día de referencia (línea punteada = 1). Los valores para cada día representan el promedio de los valores de las tres réplicas. Los valores son medias \pm EEM. El nivel de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo (*).

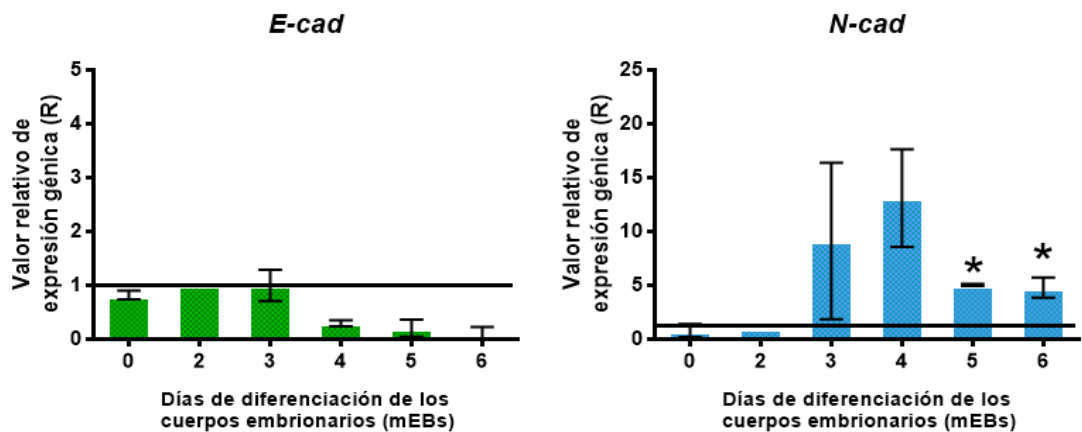
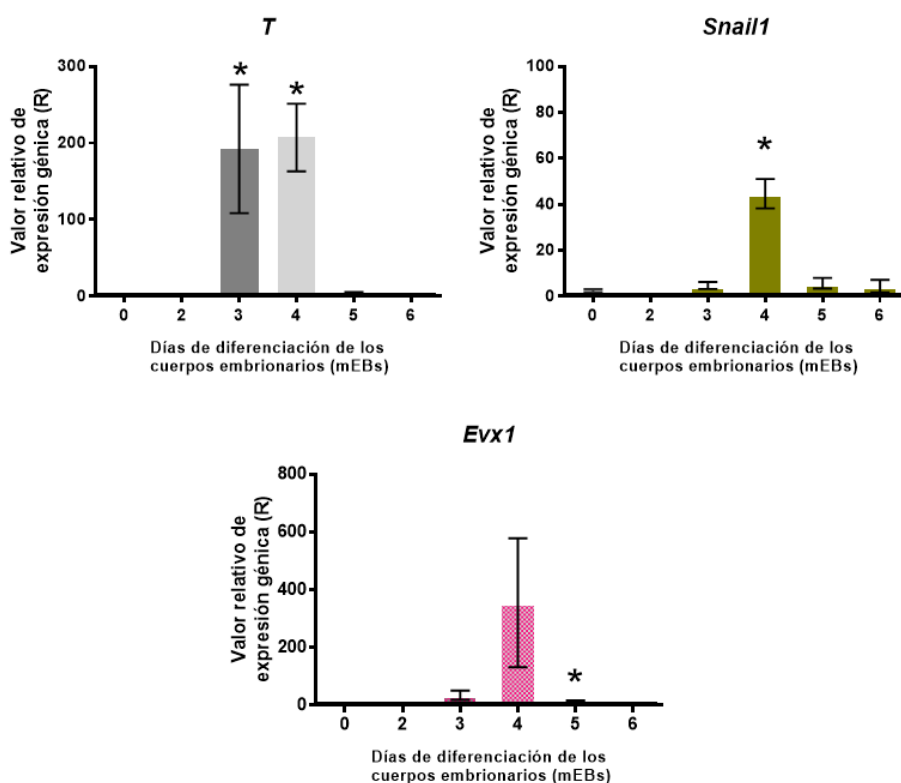


Figura 14. Expresión genética relativa de genes de referencia marcadores de transición epitelial-mesenquimal (TEM). E-cad y N-cad. La expresión génica relativa (R) se calculó para los días 0, 2, 3, 4, 5 y 6 de diferenciación con el día 2 como día de referencia (línea negra horizontal = 1). Los valores para cada día representan el promedio de los valores de las tres réplicas. Los valores son medias \pm EEM. El nivel de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo (*).

A



B

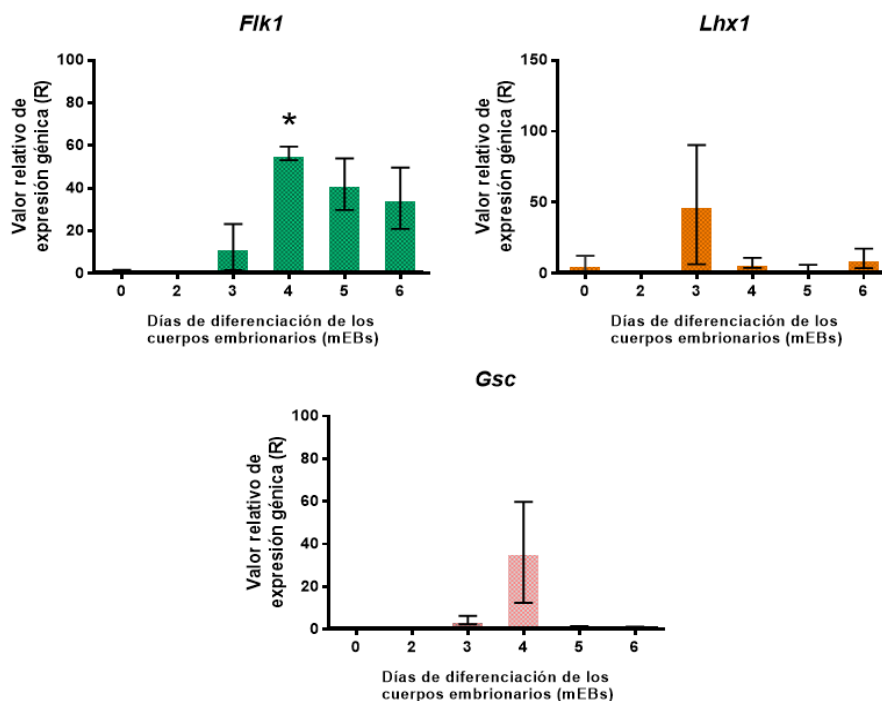


Figura 15. Expresión genética relativa de genes de referencia marcadores de mesodermo murino. *T*, *Snail1*, *Evx1* (A), *Flk1*, *Gsc* y *Lhx1* (B). La expresión génica relativa (R) se calculó para los días 0, 2, 3, 4, 5 y 6 de diferenciación con el día 2 como día de referencia (línea negra horizontal = 1). Los valores para cada día representan el promedio de los valores de las tres réplicas. Los valores son medias \pm EEM. El nivel de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo (*).

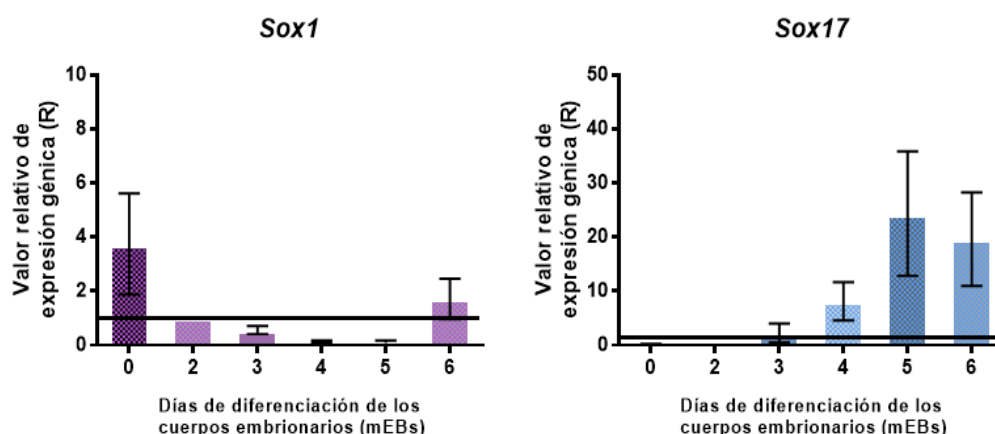


Figura 16. Expresión génica relativa de genes de referencia marcadores neural y de endodermo murino. *Sox1* y *Sox17*, respectivamente. La expresión génica relativa (R) se calculó para los días 0, 2, 3, 4, 5 y 6 de diferenciación con el día 2 como día de referencia (línea negra horizontal = 1). Los valores para cada día representan el promedio de los valores de las tres réplicas. Los valores son medias \pm EEM. El nivel de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo (*).

PATRÓN DE EXPRESIÓN DE GENES CANDIDATOS PARA EL DESARROLLO EN mEBs QUE SE DIFERENCIAN ESPONTÁNEAMENTE EN MEDIO SUPLEMENTADO CON SUERO (SCM)

Se compiló una lista de 26 genes candidatos de acuerdo con una búsqueda en la base de datos y la literatura disponibles en los sitios: Genética Informática del Ratón-MGI (www.informatics.jax.org) y en el Centro Nacional de Biotecnología-NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) (Tabla 3).

Los genes de interés se eligieron de acuerdo con varios parámetros: (i) expresión en la formación de endo-meso- y ectodermo; (ii) sin mutaciones previas; y (iii) no se consideran genes de referencia.

Listado de genes candidatos analizados

Símbolo del gen	Nombre del gen
1700007G11Rik	Gen del ADN complementario RIKEN 1700007G11
Aggf1	Factor angiogénico con parche G y dominios FHA 1
Apcdd1	Adenomatosis poliposis coli 1 regulada negativamente
Atp9a	ATPasa transportadora de fosfolípidos 9A
Capsl	Proteína similar a calcifosina
Ccpg1os	Factor de progresión del ciclo celular 1
D230030E09Rik	Gen del ADN complementario Riken D230030E09
Daam2	Activador desarreglado 2 asociado a la morfogénesis
Dixdc1	Dominio DIX que contiene a 1
Dmgdh	Dimetil glicin deshidrogenasa
Fam183b	Miembro B de la familia con similitud de secuencia 183
Foxd4	Caja de horquillas D4
Josd2	Dominio que contiene al Josefina 2
Kbtbd4	Repetición de Kelch y dominio que contiene al BTB (POZ) 4
Mgst1	Glutación S-transferasa microsomal 1
Mlf1	Factor 1 de leucemia mieloide
Moxd1	Monooxigenasa, tipo DBH 1
Nkx1-2	Factor de transcripción NK1 relacionado con el locus 2 de Drosophila
Pcdh19	Protocaderina 19
Plet1	Transcripto 1 expresado de la placenta
Prtg	Protogenina
Ptma	Protimosina alfa
Rbm24	Proteína 24 de unión al ARN
Scara3	Miembro 3 del Receptor recolector de clase A
Slc7a3	Miembro 3 de la familia de transportadores de solutos 7 (transportador de aminoácidos catiónicos, sistema y+)
Tle4	Potenciador de la división 4 similar a la transducina, homólogo del E(spl) de Drosophila

Tabla 3. Lista correspondiente a los 26 genes candidatos preseleccionados de acuerdo con la búsqueda en la base de datos y la literatura disponibles en los sitios: Genética Informática del Ratón-MGI (www.informatics.jax.org) y en el Centro Nacional de Biotecnología-NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) y de acuerdo a los parámetros mencionados.

Los cebadores correspondientes a los genes de interés se diseñaron y probaron mediante RT-qPCR usando muestras de ADN complementario (ADNc) derivados del día 4 de diferenciación de mEB cultivados en SCM. Ese día en particular corresponde aproximadamente a la etapa de gastrulación de embriones de ratón (6.5-7.5 dpc) y que muestra una mayor expresión génica de marcadores mesodérmicos. Solo se utilizaron cebadores que exhibían un pico principal único en el análisis de la curva de fusión del producto de amplificación. A partir de esos análisis y de varios ciclos de diseño de cebadores, 11 genes no cumplieron los requisitos establecidos anteriormente y, por lo tanto, fueron descartados del estudio.

RESULTADOS-CAPÍTULO 1

Finalmente, se determinó la expresión de 15 genes mediante RT-qPCR durante un período de diferenciación de cuerpos embrionarios de ratón que comprendieron los días 0, 2, 3, 4, 5 y 6 de cultivos en suspensión y en condiciones de formación de mesodermo.

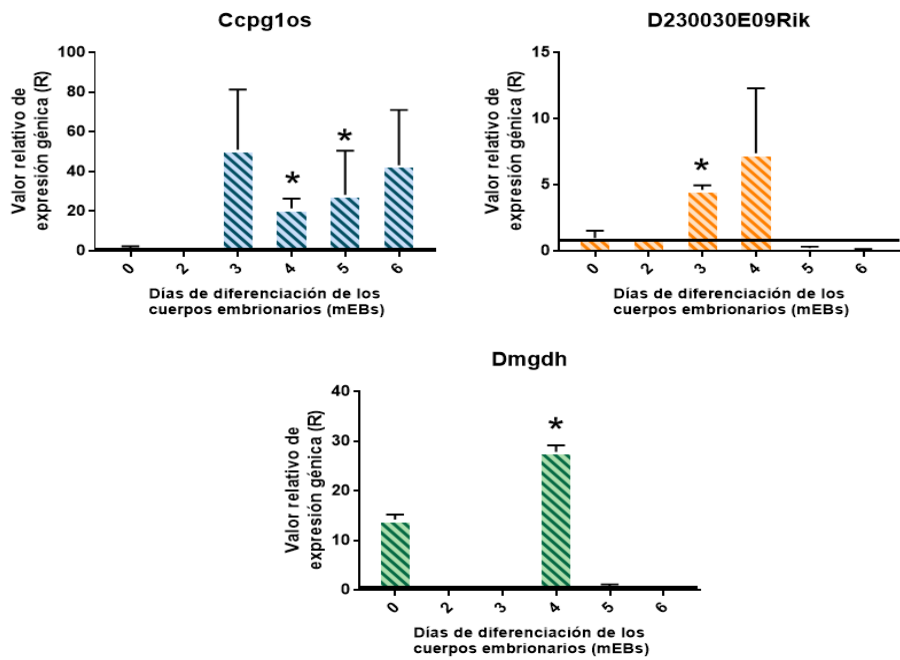
Se utilizó el método de cuantificación relativa para calcular la relación de expresión (R) para cada día, utilizando el día 2 como punto de referencia (valor R día 2 = 1) y *Actina β* (*Actina b*) como gen de referencia. Se calcularon en cada caso, la media de los valores R de tres experimentos independientes y el error estándar de la media.

Estos análisis revelaron dos grupos: uno de ellos incluyendo 10 genes (*Ccp1os*, *D230030E09Rik*, *Dmgdh*, *Josd2*, *Kbtbd4*, *Mlf1*, *Pcdh19*, *Prtg*, *Rbm24* y *Slc7a3*) con más del doble de la tasa transcripcional de referencia en los días 3 y/o 4 de diferenciación de mEBs y otro grupo con menos del doble de la expresión de referencia (*Atp9a*, *Capsl*, *Fam183b*, *Mgst1* y *Scara3*) durante los mismos días (Figura 17). Esos grupos representan un perfil mesodérmico potencial y un perfil no mesodérmico, respectivamente.

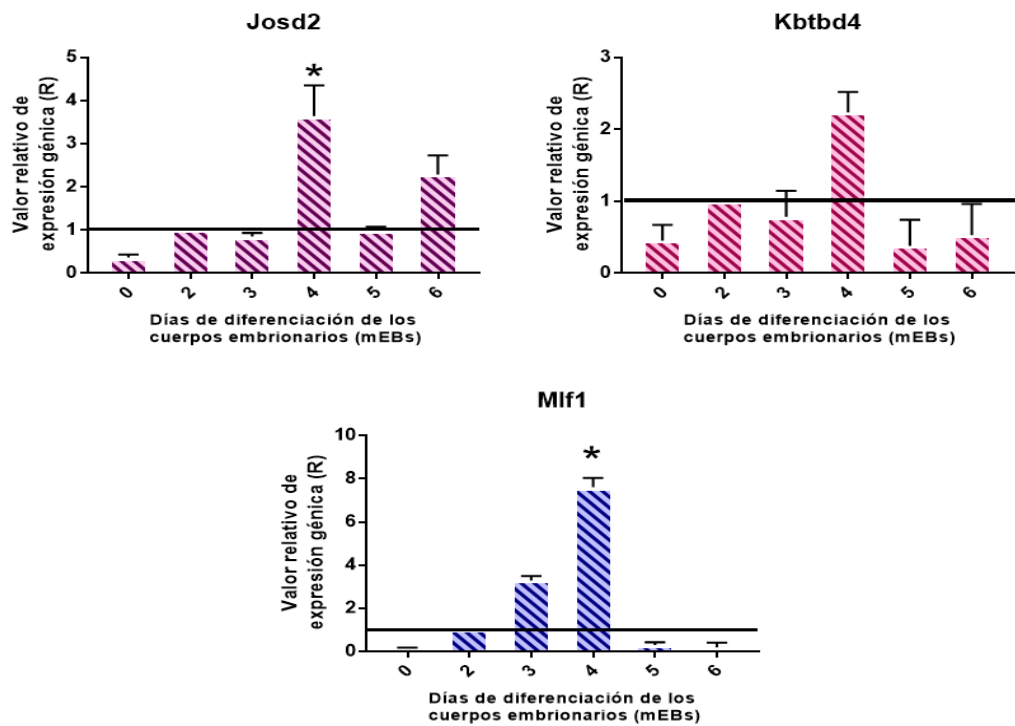
En el primer grupo, *Ccp1os* y *Slc7a3* alcanzaron su punto máximo en el día 3, lo que se correlaciona con una **etapa mesodérmica temprana** que se puede comparar con la expresión del marcador *Lhx1* (Figura 15). El resto de los miembros de este primer grupo mostraron una mayor expresión en el día 4, más bien indicando un posible **perfil mesodérmico posterior**. Por ejemplo, *Rbm24*, *D230030E09Rik* y *Prtg* (Figura 17) muestran perfiles similares a *T*, *Evx1*, *Snail*, *Gsc*, *Snail1* y *Flk1*, respectivamente (Figura 15).

Por otro lado, los genes que pertenecen al **perfil no mesodérmico** mostraron un patrón de expresión indefinido o un pico de expresión génica en el día 2, que generalmente coincide con una pérdida en los marcadores de pluripotencia a medida que transcurre la diferenciación de mEB. En particular, los perfiles de expresión de *Mgst1* y *Scara3* (Figura 17) se pueden comparar con *Nodal* (Figura 13), mientras que el de *Capsl* es similar a *E-cad* (Figura 14).

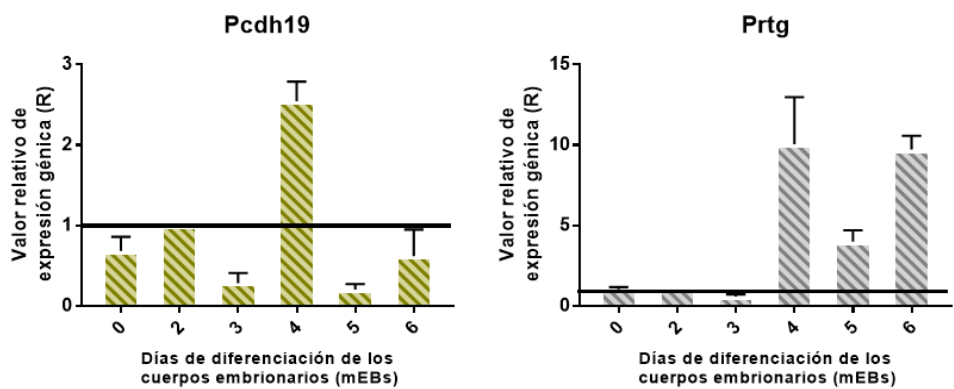
A



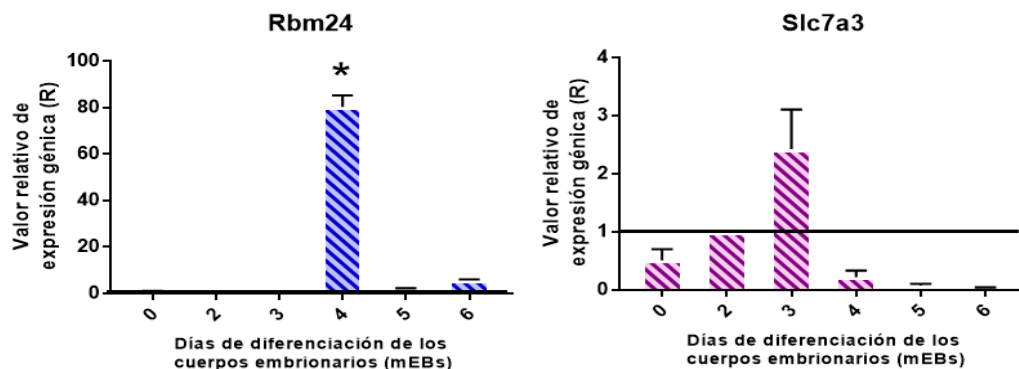
B



C



D



E

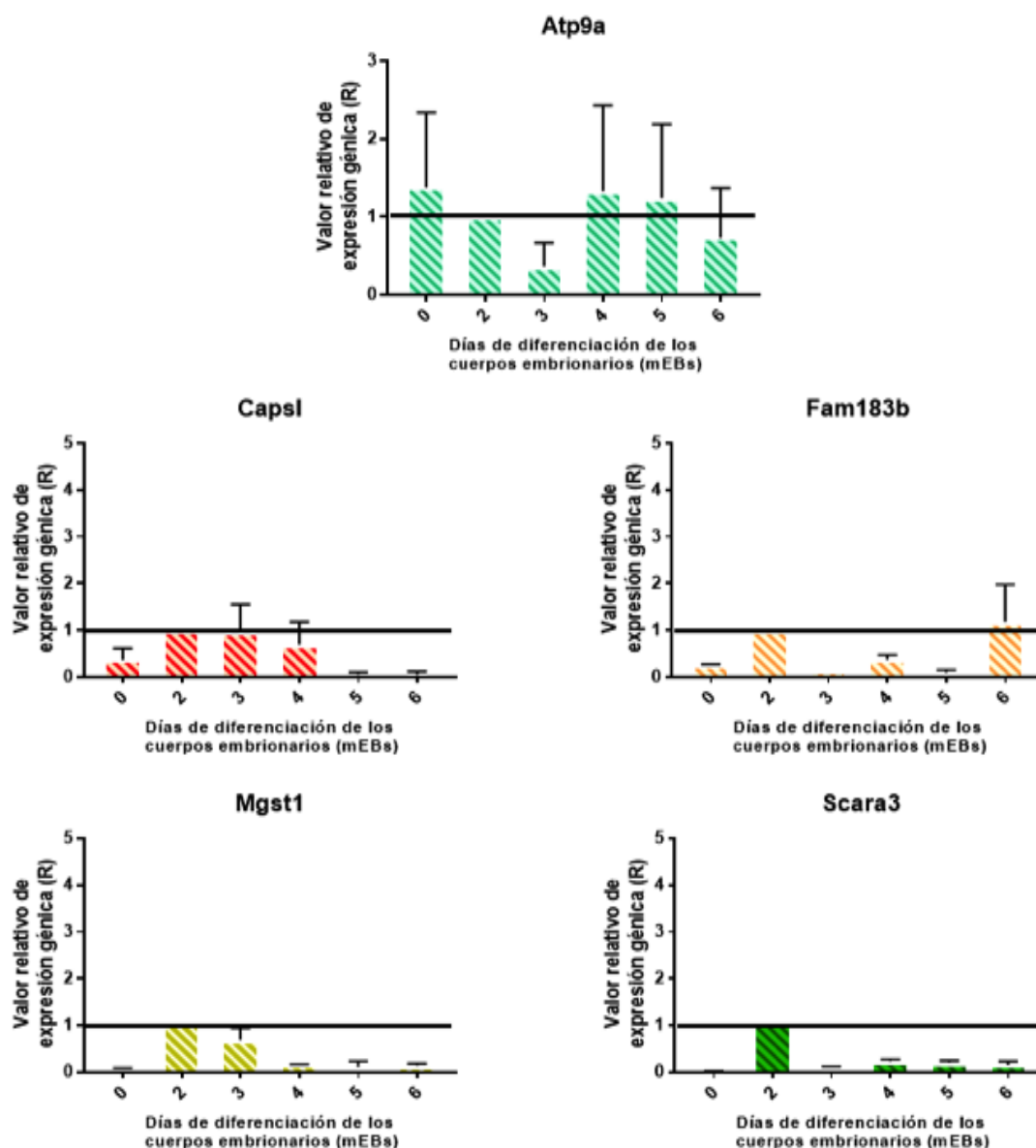


Figura 17. Expresión génica relativa de genes noveles candidatos involucrados en el desarrollo embrionario de ratón: *Ccp10s*, *D230030E09Rik*, *Dmgdh* (A), *Josd2*, *Kbtbd4*, *Mlf1* (B), *Pcdh19*, *Prtg* (C), *Rbm24*, *Slc7a3* (D), *Atp9a*, *Capsl*, *Fam183b*, *Mgst1* y *Scara3* (E). Expresión génica relativa (R) de genes candidatos calculada para los días 0, 2, 3, 4, 5 y 6 de diferenciación con el día 2 como día de referencia (valor R día 2 = 1). Los valores para cada día representan el promedio de los valores de tres réplicas. La línea negra horizontal = 1 (valor del día 2). (A) Genes con más de 2 puntos de regulación positiva. (B) Genes con menos de 2 puntos la regulación positiva. Los valores son medias \pm EEM. El nivel de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo (*).

PATRÓN DE EXPRESIÓN DE GENES CANDIDATOS DE DESARROLLO EN mEBs TRATADOS CON FACTORES DE SEÑALIZACIÓN DE LA VÍA TGF- β Y PRIVADOS DE SUERO (SFM)

El patrón de expresión de 11 genes se analizó (Figura 18) usando muestras de ADNc de mEB tratados con Activina A o SB431542 (un inhibidor de señalización de Activina A) y también alguna de ellas con BMP4.

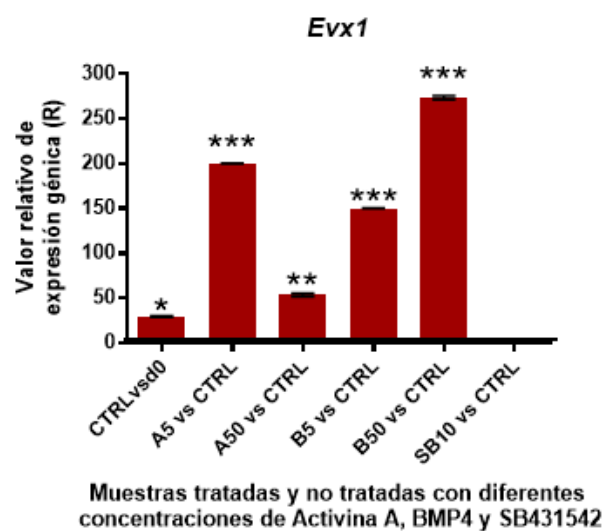
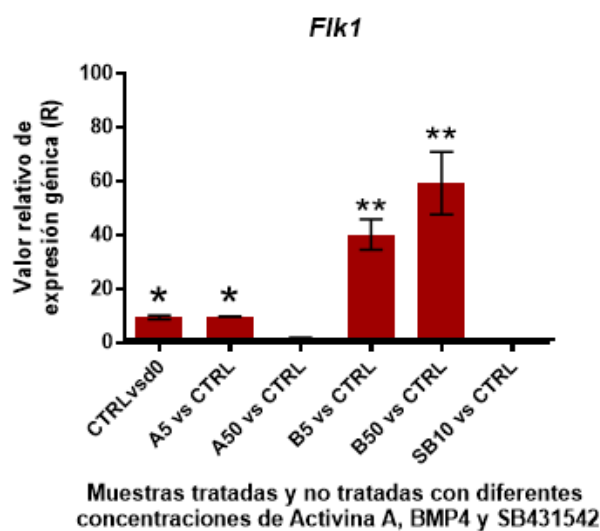
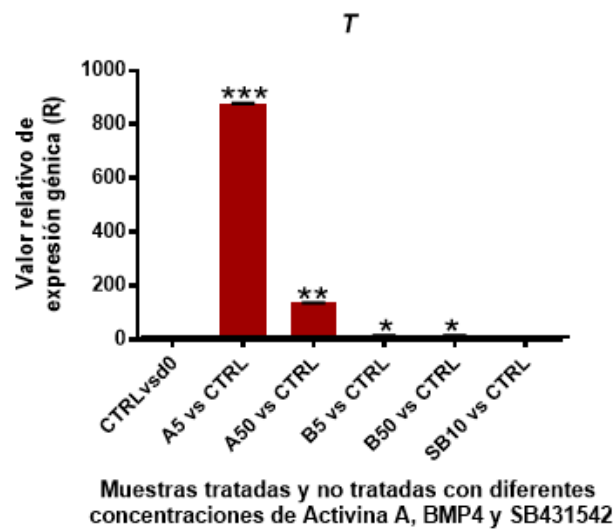
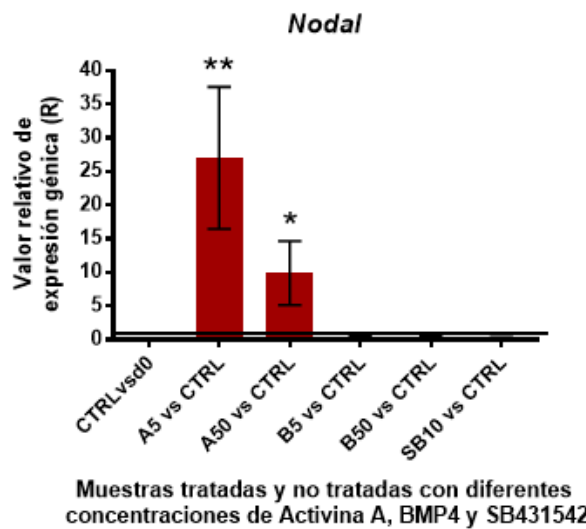
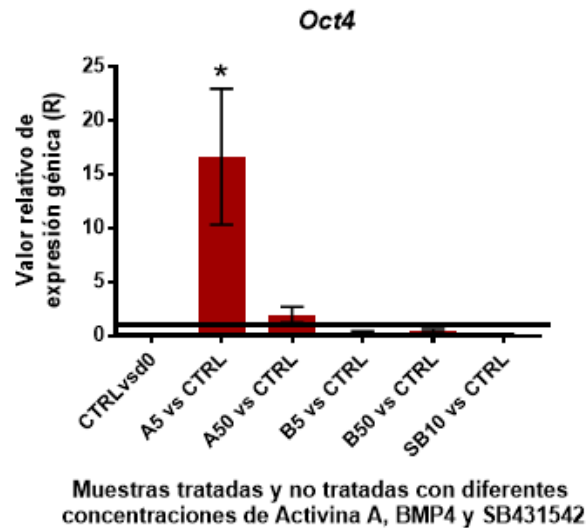
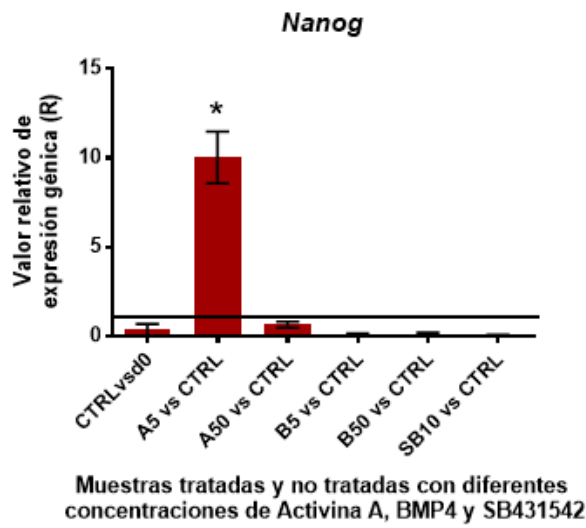
Todos se compararon con el perfil de expresión de marcadores mesodérmicos típicos en las mismas condiciones. Los mESC y los mEB se cultivaron en medios sin suero (SFM) y se añadió Activina A (5 o 50 ng/ml), BMP4 (5 o 50 ng/ml) o el inhibidor SB431542 (10 μ M) en el día 2 de diferenciación, recolectando las células al cuarto día del ensayo. Las muestras no tratadas de los días 0 y 4 se usaron como puntos de referencia (CTRL) para muestras no diferenciadas y diferenciadas, respectivamente. La cuantificación génica relativa se calculó considerando el promedio de los valores R de tres experimentos independientes y sus respectivos SEM.

El análisis de datos mostró que 6 genes (*Ccpg1os*, *D230030E09Rik*, *Dmgdh*, *Mlf1*, *Pcdh19* y *Slc7a3*) estaban regulados positivamente en las muestras inducidas por Activina A, especialmente a bajas concentraciones. Un gen (*Dmgdh*) también fue regulado al alza en las muestras inducidas por BMP4 en baja y alta concentración, lo que sugiere que este último forma parte y es compartido por las vías de señalización de Activina A y BMP4. Por otro lado, otros 5 genes (*Atp9a*, *Josd2*, *Kbtbd4*, *Prtg* y *Rbm24*) se regularon negativamente en las muestras inducidas por Activina A y BMP4, pero ninguno de ellos se sobreexpresó en presencia de SB431542 (Figura 18C).

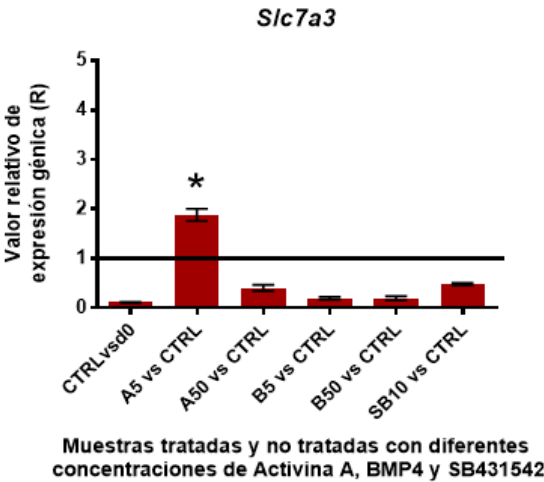
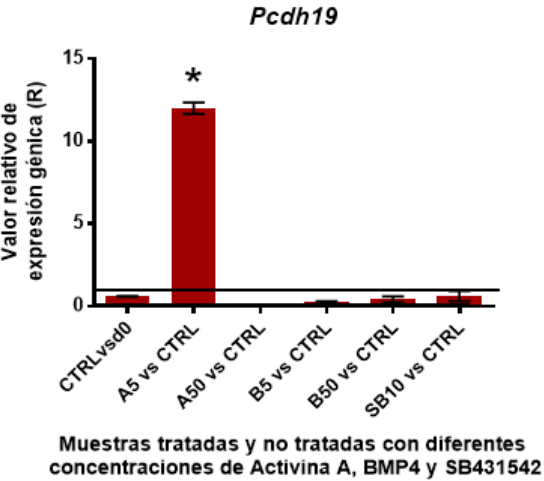
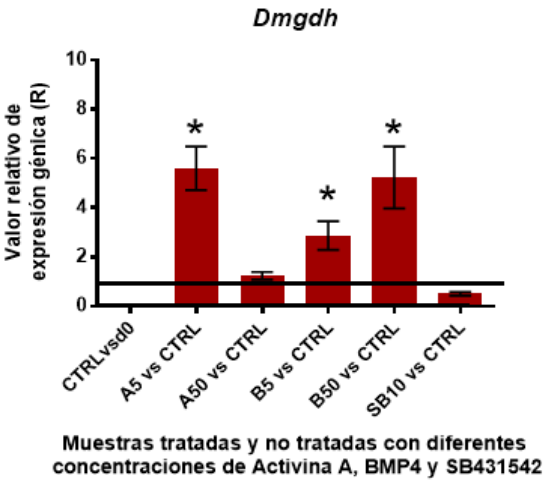
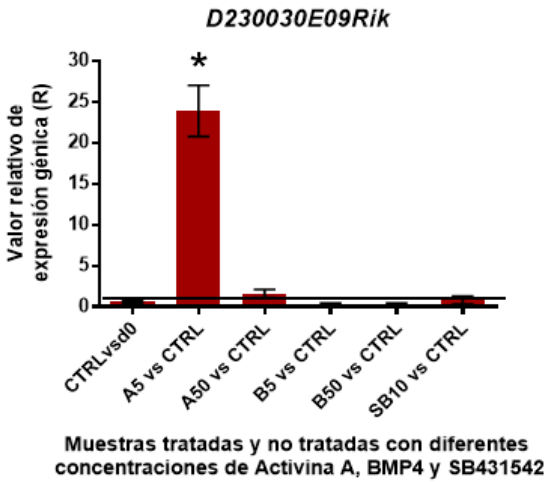
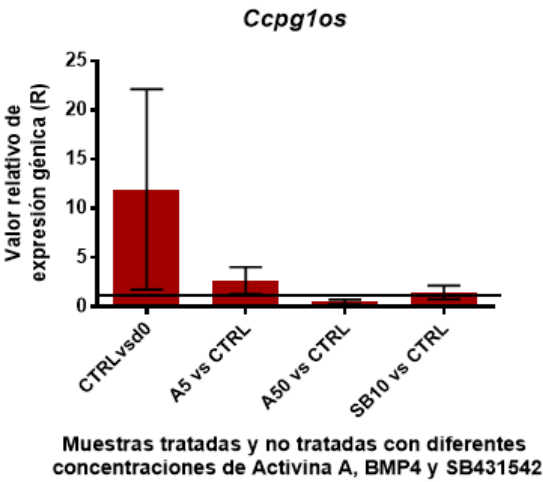
Los 6 genes que estaban regulados positivamente por Activina A y/o BMP4 mostraron perfiles de expresión distintivos dependiendo de las concentraciones utilizadas para los diferentes factores de señalización. *Dmgdh* se sobreexpresó principalmente con Activina A utilizada a 5 ng/ml y BMP4 a 50 ng/ml (Figura 18B), mostrando un perfil muy similar al marcador mesodérmico *Evx1* (Figura 18A). *D230030E09Rik*, *Mlf1* y *Pcdh19* fueron altamente inducidos con Activina A utilizada a 5 ng/ml (Figura 18B), lo que está de acuerdo con el pico de inducción visto en los días 3 y 4 durante el curso inicial de la diferenciación de mEBs (Figura 17).

Los perfiles de expresión de *Mlf1* (Figura 18B) podrían compararse con marcadores como *T* y *Oct4* (Figura 18A), mientras que los perfiles de expresión *D230030E09Rik* y *Pcdh19* (Figura 18B) podrían compararse con los patrones de *Nanog* y *Nodal* (Figura 18A). *Ccpg1os* y *Slc7a3* se indujeron ligeramente con el tratamiento con Activina A a 5 ng/ml (Figura 18 B), aunque ambos mostraron un pico de expresión en el día 3 (Figura 17A).

A



B



C

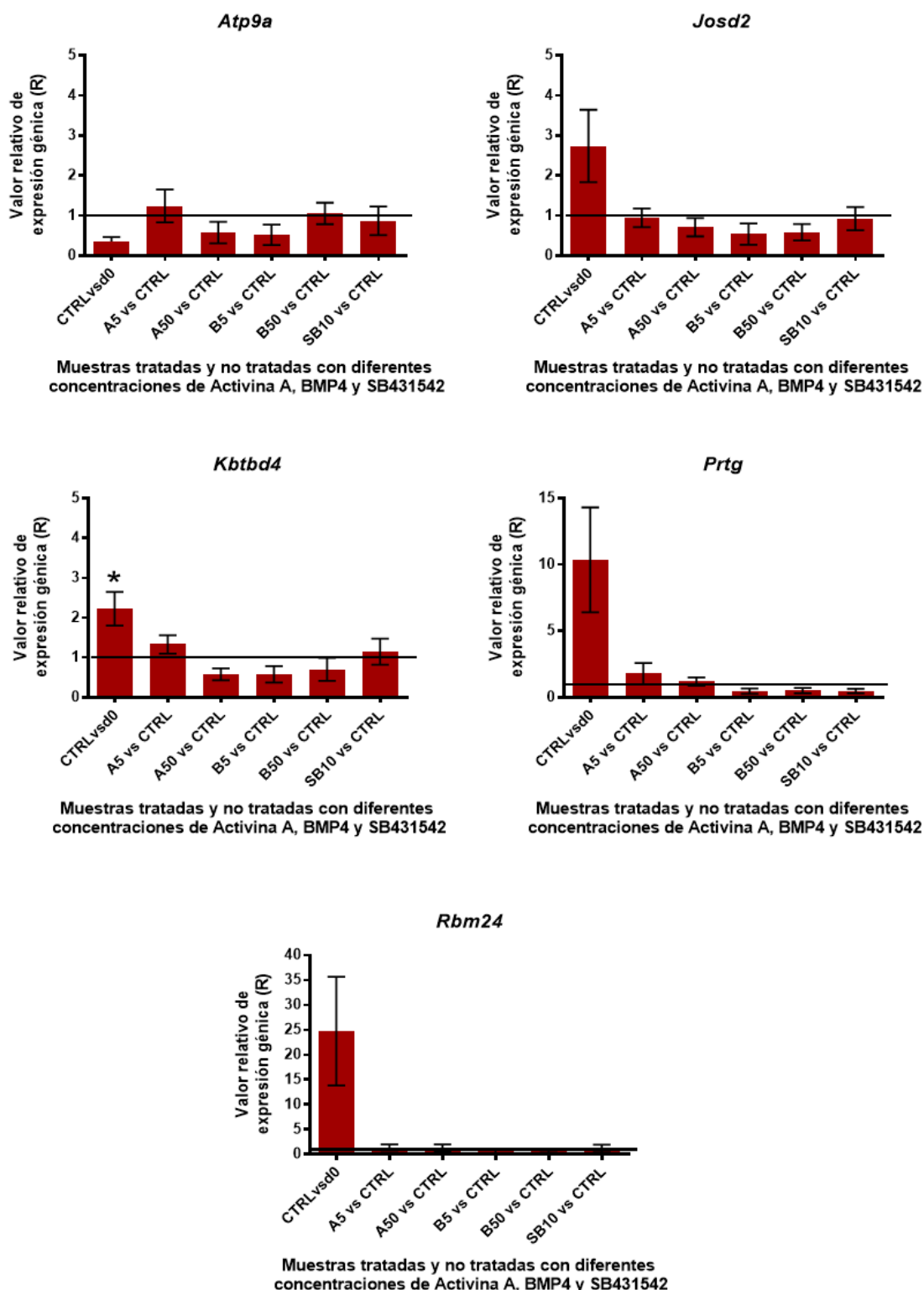


Figura 18: Expresión genética relativa de genes de referencia del desarrollo embrionario temprano y genes candidatos en mEB tratados con Activina A/Nodal, BMP4 y con el inhibidor de Activina A, SB431542. Conjunto seleccionado de marcadores de desarrollo conocidos: *Evx1*, *T*, *Oct4*, *Nanog*, *Nodal*, *Flk1* (A), Nuevos genes candidatos involucrados en el desarrollo embrionario del ratón: *Atp9a*, *Ccp91os*, *D230030E09Rik*, *Josd2*, *Dmgdh* (B). *Mlf1*, *Pcdh19*, *Kbtbd4*, *Prtg*, *Rbm24*, *Slc7a3* (C). Expresión genética relativa (R) de los genes indicados calculados para las muestras tratadas el día 4 con medios sin suero y Activina A a 5 (A5) o 50 ng/ml (A50), BMP4 a 5 (B5) o 50 ng/ml (B50) o SB431542 a 10 μ M (SB10). Los valores para cada día representan el promedio de los valores de tres réplicas. El valor de CTRL=muestras no tratadas del día 4 se usaron como referencia y las muestras del día 0 como control para el estado indiferenciado. Línea negra=1 (valor CTRL). Los valores son medias \pm EEM. El nivel de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo (*).

CONCLUSIÓN PARCIAL

En este capítulo se presentaron los resultados de un sistema que combina el uso de cultivos 3D (mEB) con el análisis de las RT-qPCR para la identificación y caracterización de la expresión de genes novedales potencialmente involucrados en el desarrollo mesodérmico temprano murino.

El análisis de los datos permite describir la expresión de cinco genes poco frecuentemente asociados a la embriogénesis (*Ccp10s*, *D230030E09Rik*, *Dmgdh*, *Mlf1* y *Pcdh19*), dentro de la lista seleccionada de genes candidatos que están potencialmente involucrados en la inducción/diseño del mesodermo murino.

Por otra parte, en este estudio funcional se logró reconocer a los mismos como sensibles a la acción de los factores de crecimiento: Activina, Nodal y BMP4, pertenecientes a la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF- β).

Como se menciona en la introducción de esta tesis, existe una gran similitud entre la embriogénesis y la tumorigénesis, particularmente a nivel de las vías moleculares implicadas en ambos, entre ellas la del TGF- β . Dentro de esta, la subfamilia más importante comprende a las BMPs, que a su vez, poseen una alta conservación entre sus distintos miembros, exhibiendo funciones esenciales y únicas durante el desarrollo de vertebrados.

Al igual que otras isoformas, el subtipo BMP7 está asociado con interacciones inductivas en varios tejidos, con un importante rol en el desarrollo del riñón y su función postnatal. También posee una gran relevancia en muchos carcinomas e incluso tiene una mayor expresión en los carcinomas de células renales (CCR) en comparación con el tejido normal.

Es así que, siguiendo con el desarrollo de la presente tesis, se decidió emplear el enfoque plasmado en esta primera parte (estudios conjuntos multiparamétricos con cultivos de mEBs junto al análisis de las RT-qPCR) para revelar, en un segundo capítulo, el rol de la isoforma 7 de la proteína morfogenética ósea en el carcinoma de células renales de células claras (ccRCC) en el microambiente tumoral hipóxico.

RESULTADOS CAPITULO 2

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE BMP7 EN CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS (ccRCC)

BMP7 tiene particular relevancia en la carcinogénesis de diferentes orígenes, pero en lo que respecta a carcinomas renales, su expresión e importancia clínica aún es limitada.

Por otra parte, como se ha mencionado previamente, los tumores y los embriones comparten elementos comunes y paralelos asociados a la hipoxia reforzando el fenómeno por el cual la oncogénesis recapitula la embriogénesis (Brown & McGuire, 2012).

En adición con lo mencionado previamente, los niveles regionales bajos de oxígeno son frecuentes en el microambiente tumoral donde, los factores inducibles por la hipoxia (HIFs) se han relacionado con un peor pronóstico. Además, tanto la localización central y/o periférica de BMP7 de los especímenes de CCR, como, la relación entre BMP7 y la expresión de HIF-2 α siguen siendo desconocidos.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

En el presente estudio, se analizaron los resultados de tres grupos experimentales según el estadio patológico y el grado nuclear, tal y como se ha descrito previamente en Materiales y Métodos. Las características de los pacientes y los datos clínico-patológicos se resumen en la Tabla 4.

Características y datos clínico-patológicos de los pacientes con ccRCC**Características**

Edad media (rango) años	59 (27-84) años
Género (masculino/femenino)	34 hombres/10 mujeres
Nefrectomía (derecho/izquierdo)	23 derechos/21 izquierdos

Tamaño del tumor (cm)

≤ 4	5
4-7	26
≥ 7	13

Tipo of nefrectomía

Radical	40
Parcial por laparoscopia	4

Grado nuclear

1	16
2	24
3	3
4	1

Clasificación patológica TNM

Clasificación	n	Estadíos (n)	%
T1a N0M0	17	I: 30	68.18
T1b N0M0	13		
T2 N0M0	6	II: 6	13.6
T3 N0M0	4	II: 5	11.4
T3 N1M0	1		
T2N0M1	2	IV: 3	6.8
T4N0M1	1		

Tabla 4.. Esta tabla contiene los resultados de tres grupos experimentales de pacientes según el estadio patológico y el grado nuclear del tumor.

BMP7 SE SOBREENPRESA EN EL ccRCC

Se estudió la expresión de BMP7 por IHQ en secciones de core y periferia de ccRCC de un mismo paciente en cada grupo experimental. Los datos se compararon con la expresión fisiológica en secciones no tumorales de muestras renales distales.

BMP7 presentó una fuerte expresión en el citoplasma de las células tubulares proximales normales de las muestras control, como se ha descrito en estudios anteriores (Markić et al, 2010; Kwak et al, 2007). También se sobreexpresó en todas las muestras de ccRCC y la evaluación de su localización

RESULTADOS-CAPÍTULO 2

en diferentes áreas del tumor reveló una inmunomarcación aberrante más intensa en la periferia que en el núcleo (Figura 19), presentando patrones difusos tanto a nivel de membrana como citoplasmáticos, en todos los estadios estudiados para ambas localizaciones tumorales.

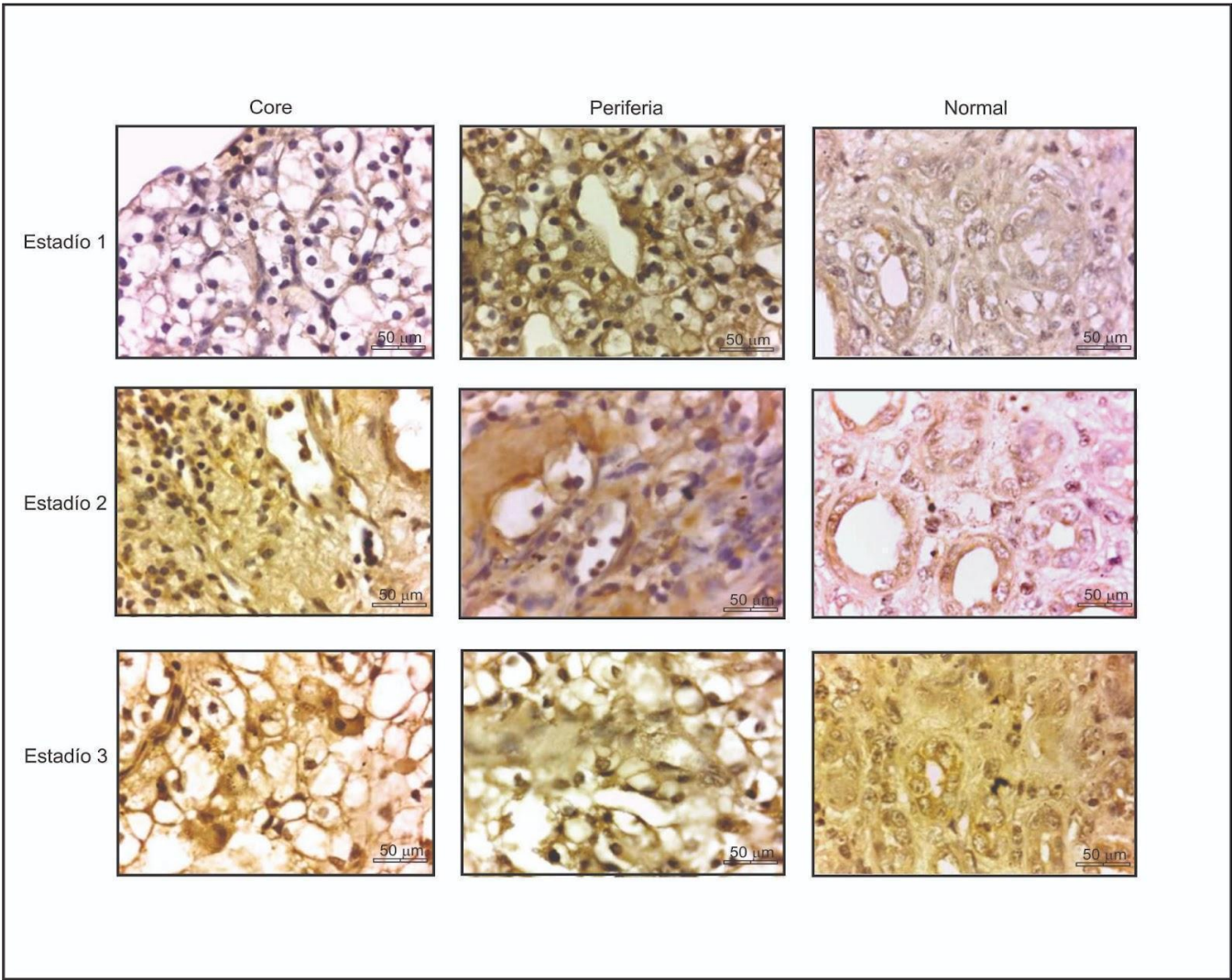


Figura 19. Inmunohistoquímica de BMP7 en ccRCC. Muestras del núcleo y la periferia de las muestras de ccRCC exhibieron mayor inmunorreactividad de BMP7 en todos los estadios en comparación con las muestras controles (no ccRCC). BMP7 mostró principalmente patrones difusos a nivel de membrana y citoplasmáticos en ambas localizaciones. Aumento original 400x.

Expresión semicuantitativa de BMP7 en ccRCC							
Localización espacial	core de ccRCC			periferia de ccRCC			Total
n(%)	0	+	++	0	+	++	
Estadio I	1 (33.33)	25 (75.76)	4 (13.33)	4 (13.33)	11 (36.66)	15 (50.00)	30
Estadio II	0 (0.00)	3 (50.00)	3 (50.00)	0 (0.00)	1 (16.66)	5 (83.33)	6
Estadio III	0 (0.00)	2 (40.00)	3 (60.00)	0 (0.00)	1 (20.00)	4 (80.00)	5
Total	41			41			41

Tabla 5. La evaluación semicuantitativa considera los siguientes parámetros: (0): ninguna, (+) débil, y (++) fuerte expresión inmunohistoquímica en muestras de core y periferia de ccRCC (n= 41).

La evaluación semicuantitativa confirmó que la tinción por IHQ de BMP7 en la periferia del tejido tumoral del ccRCC fue de 51,21% (24/41), siendo significativamente mayor que la del core 12,50%

(10/41), considerando la expresión más intensa (++). Además, analizamos la expresión de BMP7 en función del estadio TNM y los grados histológicos, donde se evidenció que fue significativamente mayor en los pacientes con un diámetro tumoral mayor a 7 cm (Tabla 5, $P < 0,05$). Por otra parte, la expresión de BMP7 no resultó estar relacionada con el sexo y la edad de los pacientes (Tabla 5, $P > 0,05$).

El microambiente tumoral del CCR es muy complejo debido a los múltiples mediadores moleculares que afectan a su progresión y desarrollo a través de interacciones celulares solubles y de contacto (Joyce & Pollard, 2009).

Para evitar interferencias por interrelaciones entre las diferentes poblaciones celulares, el microambiente y las respuestas del huésped, validamos todos los ensayos realizados en muestras de pacientes con los resultados obtenidos de líneas celulares derivadas de ccRCC, ya que estas últimas están exentas de ello (Brodaczewska et al., 2016). Además, las líneas celulares representan un modelo “*in vitro*” fundamental para estudiar la biología del cáncer, ya que ofrecen un gran número de células disponibles para las pruebas prolongadas, mientras que los cultivos primarios suelen tener una vida útil limitada (Zieba et al., 2015 ; Arul et al., 2014). En esta investigación, se seleccionó una línea celular primaria (Caki-2) y una línea celular metastásica de ccRCC (Caki-1), tomando como control a la línea celular HEK-293 embrionaria renal humana.

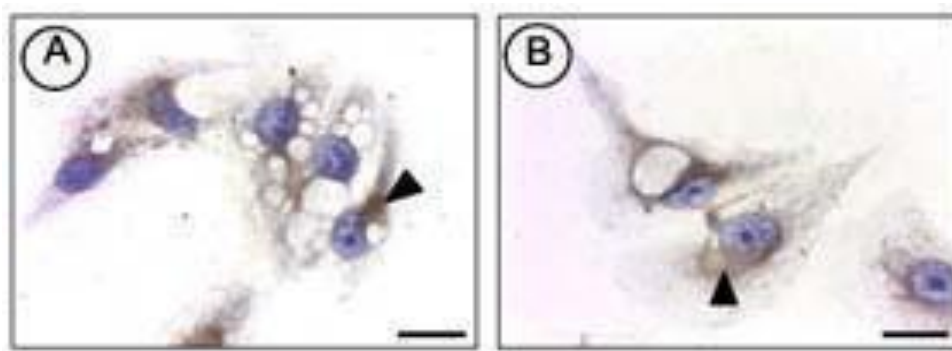


Figura 20. Inmunocitoquímica de BMP-7 en líneas celulares Caki: Microfotografías representativas de la expresión de BMP7 en las células Caki-1 (A) y Caki-2 (B). En ambos casos se evidencia una expresión citoplasmática de la proteína. Aumento total 400x.

Para confirmar la sobreexpresión de BMP7 a nivel transcripcional en los tumores frente a los tejidos no tumorales, medimos a continuación la expresión de su ARNm mediante RT-qPCRs utilizando cebadores específicos como se ha descrito en materiales y métodos.

Los datos revelaron que el gen *BMP7* se sobreexpresa en todos los estadios del ccRCC, en comparación con las muestras renales consideradas normales (Figura 21A). Como se muestra en la Figura 21B, la expresión de *BMP7* en las diferentes monocapas celulares (HEK-293, Caki-1 y Caki-2) no mostró diferencias significativas. Esto se debe probablemente al hecho de que las células que

RESULTADOS-CAPÍTULO 2

crecen en cultivos 2D están permanentemente expuestas a condiciones idénticas del medio de cultivo, en contraste con lo que se observa “*in vivo*”.

Así es que, a continuación, se pusieron a punto las condiciones experimentales para obtener esferas tridimensionales (tumorisferas) de las líneas celulares mencionadas y posteriormente se evaluó la expresión de *BMP7*.

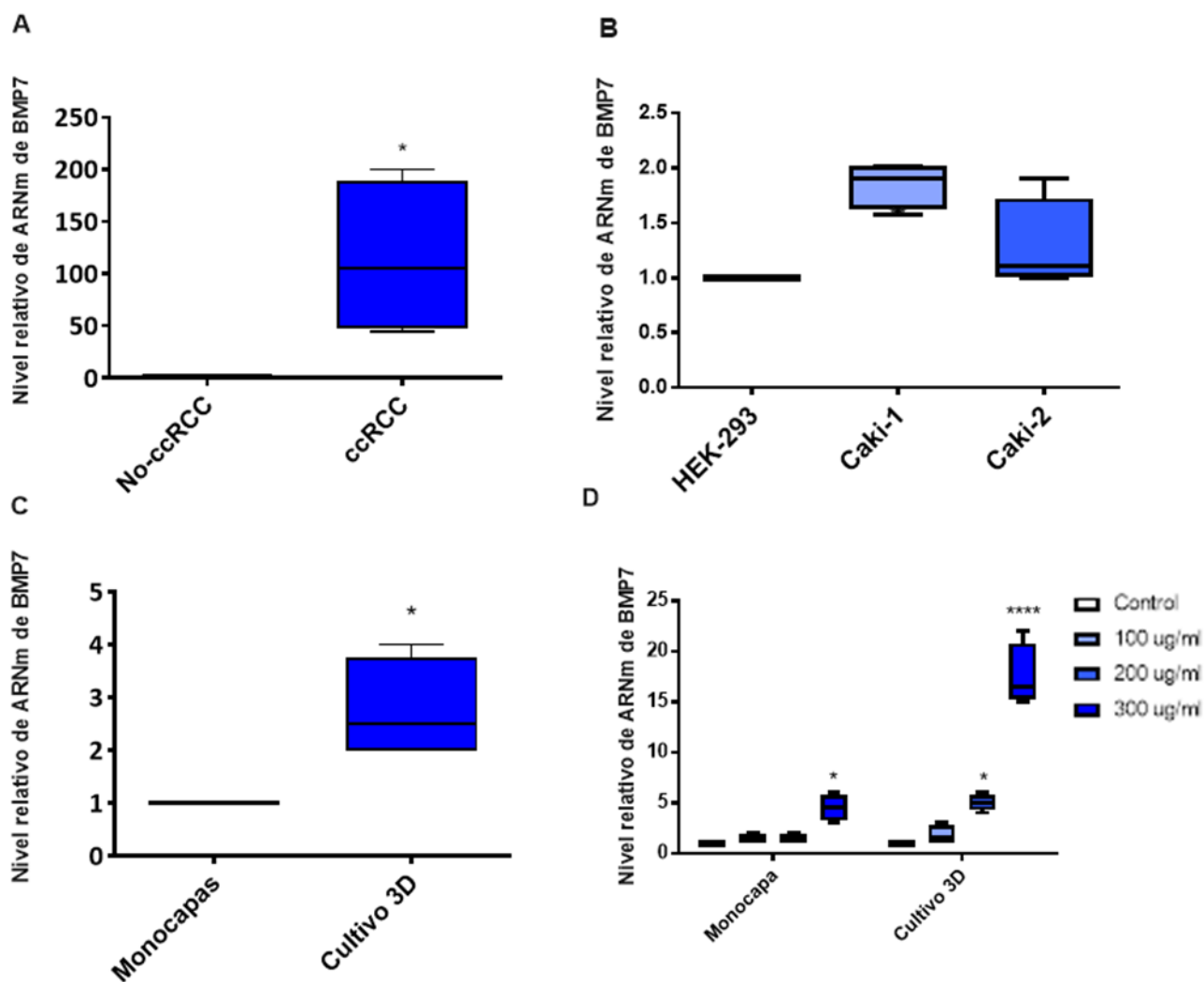


Figura 21. Expresión génica de *BMP7* mediante RT-qPCRs. Expresión relativa de ARNm de *BMP7* en: (A) muestras de ccRCC comparadas contra controles (n: 41; todos los grupos experimentales), (B) en las líneas celulares renales Caki 1 y Caki 2 en comparación con las células HEK-293, (C) según distintas condiciones de cultivo (monocapas y tumorisferas) y (D) en 100-300 ug/ml de CoCl_2 (condicionante de hipoxia química) según distintas condiciones de cultivo (monocapas y tumorisferas). Los valores son medias \pm SD. Significativamente diferente del control * ($P < 0,05$); **** ($P < 0,001$). Prueba t de Student (A y C) y ANOVA (B y D).

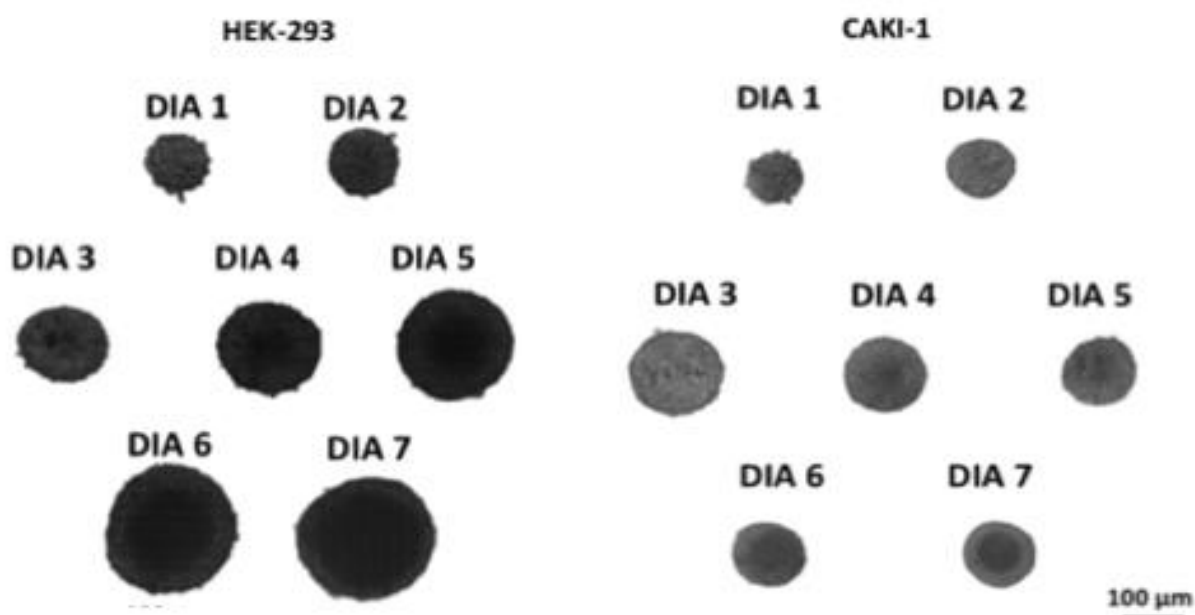


Figura 22. Cultivos 3D en líneas celulares renales (Caki-1 y HEK293). Imagen representativa de los cultivos 3D durante el periodo de 7 días de las líneas celulares renales embrionaria y cancerígena metastásica HEK-293 y Caki-1, respectivamente. Se puede ver la formación de una esfera compacta en ambas líneas celulares. En el caso de HEK293 el crecimiento continúa hasta el último día, a diferencia de Caki-1 que crece exponencialmente hasta el día 3 y luego va decreciendo. Todas las fotografías se tomaron con un aumento total de 50x.

Los resultados obtenidos en múltiples experimentos mostraron que las células Caki-1 son más competentes para la formación de tumorisferas que las Caki-2. Espontáneamente, durante la formación de monocapas se observa que al tercer día de cultivo, las células Caki-1 tienden a agruparse forma *clusters* sobreelevados, en tanto las Caki-2 tienden a cubrir la monocapa mucho más rápidamente. Visto esto, se ensayó la formación de tumorisferas en placas de 96 pocillos de fondo curvo, y aún así, pese al aumento del número inicial de células sembradas (5 veces más) no se logró la formación de los cultivos 3D con las Caki-2 (imágenes no incluidas). Las líneas celulares HEK 293 y Caki-1 se mantuvieron hasta el día 7 de cultivo (Figura 22).

Se pudo evidenciar que sólo las colonias 3D de HEK-293 aumentaron significativamente de tamaño durante todo el tiempo de ensayo ya que para Caki-1 no se mantuvieron a largo plazo, revelando una posible pluripotencialidad limitada y así inferir el posible carácter de célula madre tumoral considerando que la ausencia de diferenciación, o anaplasia, es una característica clave de la transformación maligna (Chen et al., 2012).

En el último día de cultivo se colectaron las tumorisferas y se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Se observaron cambios en la morfología de las tumorisferas, mostrando una superficie uniforme y una leve distinción entre células individuales (Figura 23). Adicionalmente, algunas estructuras 3D presentaron forma característica redondeada y otras distribución espacial irregular.

RESULTADOS-CAPÍTULO 2

La Figura 21C indica que la expresión de *BMP7* alcanzó un aumento de casi 3 veces en los cultivos de células 3D en comparación con los cultivos en monocapas ($p < 0,05$) de la línea celular Caki-1.

Tras el condicionamiento de los cultivos con hipoxia química, se observó que tanto los cultivos en 3D como los de monocapa, desencadenaron una sobreexpresión de *BMP7* (Figura 21D), aunque esta última fue mucho más significativa ($P < 0.001$) con alta concentración de CoCl_2 . En conjunto, estos datos confirman que la técnica de cultivo celular en 3D es una herramienta útil para imitar el crecimiento tumoral en condiciones de hipoxia, y que este estímulo estresante celular condiciona la sobreexpresión de *BMP7*.

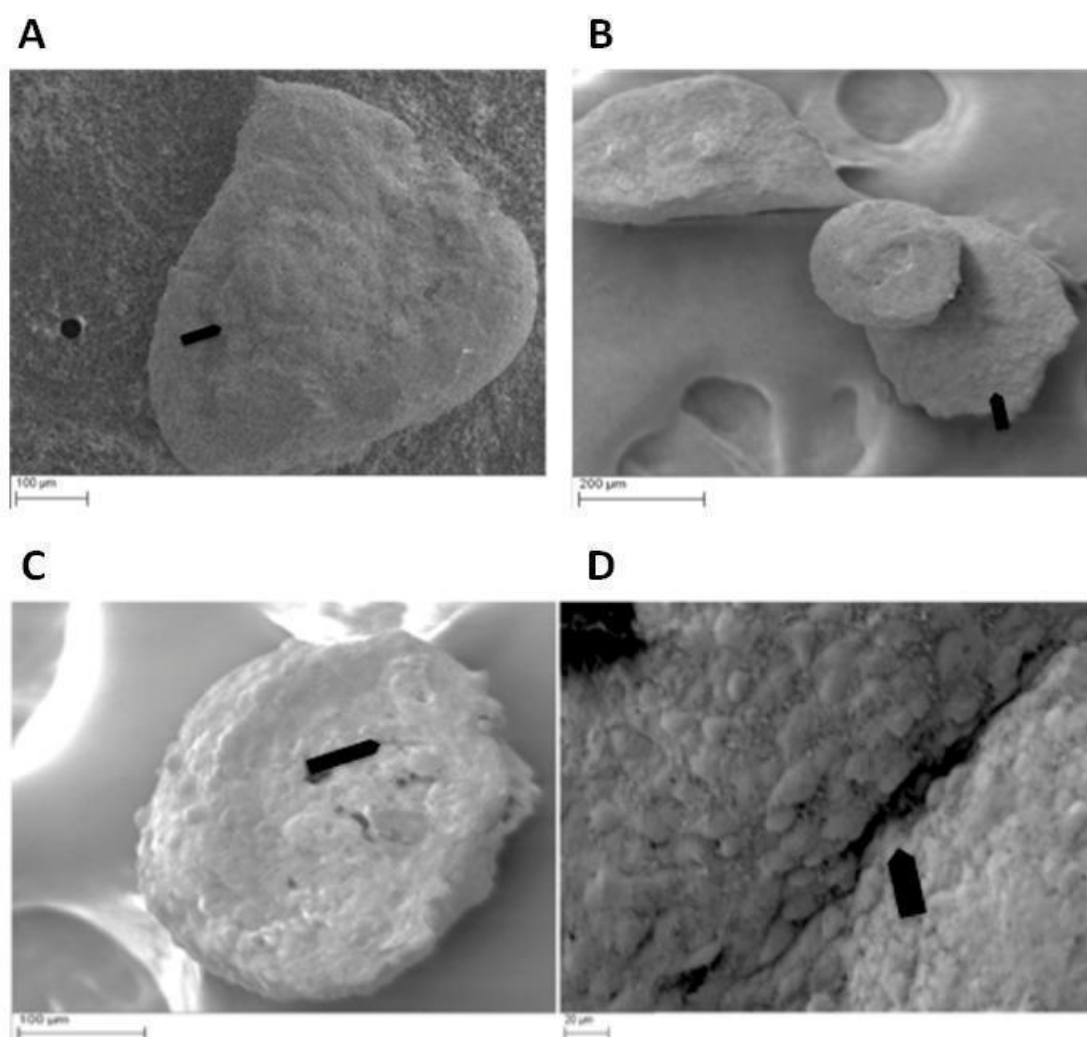


Figura 23. Morfología de los cultivos celulares 3D mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Imágenes obtenidas con un MEB EVOLS15 (CARL ZEISS) donde se puede observar la textura externa de los cultivos 3D correspondientes al séptimo día de cultivo de las líneas celulares renales metastásica Caki-1 (A y B) y embrionaria HEK-293 (C y D), con un aumento total de 343x, 256x, 480x y 1.21 Kx respectivamente.

LOS MARCADORES DE HIPOXIA HIF MUESTRAN PATRONES DE EXPRESIÓN DIFERENCIALES ENTRE CORE Y PERIFERIA EN EL ccRCC

Se han atribuido papeles distintos a la función de las isoformas de HIF cómo se ha mencionado en la introducción. Las expresiones de los genes *HIF-1 α* y *HIF-2 α* se cuantificaron mediante RT-qPCR utilizando cebadores específicos.

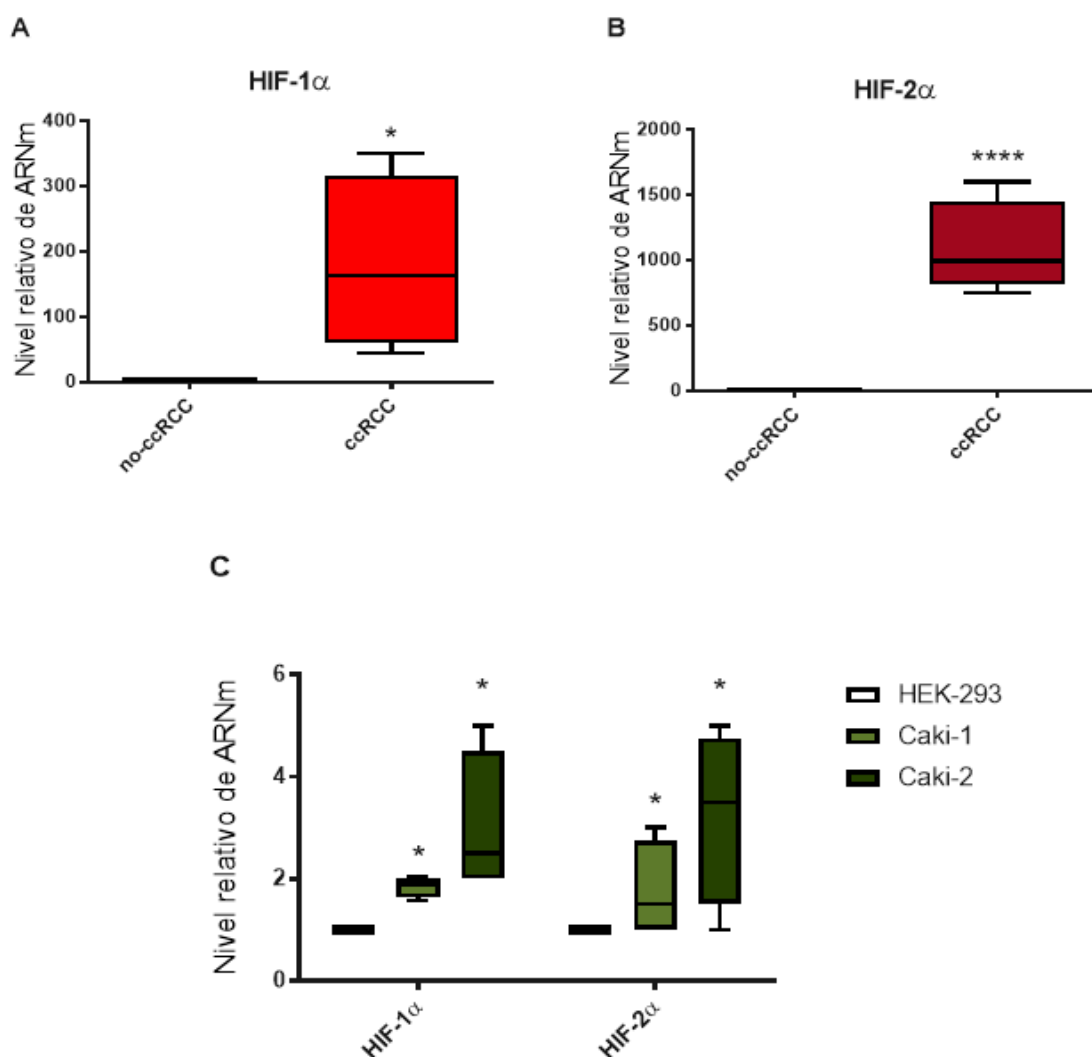


Figura 24. Expresión de las isoformas HIFs en las células ccRCC y Cakis. RT-qPCR de *HIF-1α* (A) y *HIF-2α* (B) en muestras tumorales (41 tumores) comparadas con tejidos control. En (C) se ilustra la expresión de los HIFs en las líneas Caki-1 y Caki-2 comparadas contra las RT-qPCR en la línea control HEK-293. Los resultados se expresan como la media \pm SD. * $P < 0,05$ y **** $P < 0,0001$ indican diferencias significativas.

Los datos revelaron que ambas isoformas estaban sobreexpresadas en las muestras de ccRCC en comparación con las muestras renales control (Figura 24 A-B). Por lo demás, la expresión génica de *HIF-2α* fue casi 5 veces mayor que la de *HIF-1α*. Esta diferencia de isoformas no se manifestó cuando se comprobó la expresión de ambos genes en las líneas celulares renales Cakis y embrionaria HEK-293 (Figura 24C).

La validación de la expresión de *HIF-2α* se realizó mediante ICQ en las líneas celulares Caki-1 y Caki-2. Una vez más, el patrón de expresión de *HIF-2α* fue nuclear y/o citoplasmático en las condiciones de cultivo (Figura 25).

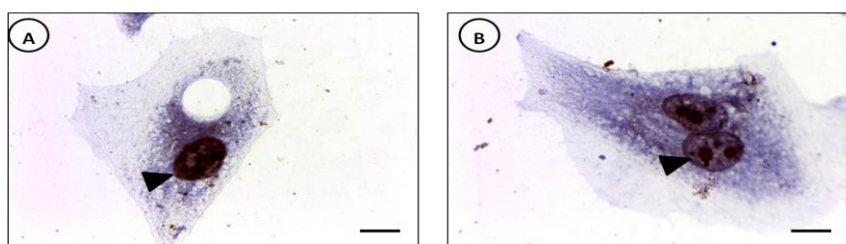


Figura 25. Inmunocitoquímica de HIF-2α en células Caki. La expresión de HIF-2α se muestra en microfotografías representativas de cultivos de Caki-1 y Caki-2. Tanto las células Caki-1 (A) como las Caki-2 (B) exhibieron patrones de inmunotinción nuclear (puntas de flecha). Las barras representan 50 μm.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se determinó la localización de HIF-2α mediante IHQ en todas las muestras y estadíos tumorales. Las muestras controles exhibieron una expresión basal de HIF-2α principalmente en las células tubulares y endoteliales, ya que los riñones poseen un gradiente hipóxico de tipo fisiológico (Cannito et al., 2010).

Por otro lado, en todos los grupos experimentales, las muestras de ccRCC, revelaron una sobreexpresión de HIF-2α significativamente mayor en el núcleo en relación con la periferia con un patrón de inmunorreactividad de carácter difuso (Figura 26). Los análisis semicuantitativos demostraron que la expresión de este factor de transcripción está asociada a un mayor estadio patológico y a un mayor tamaño del tumor (Tabla 6).

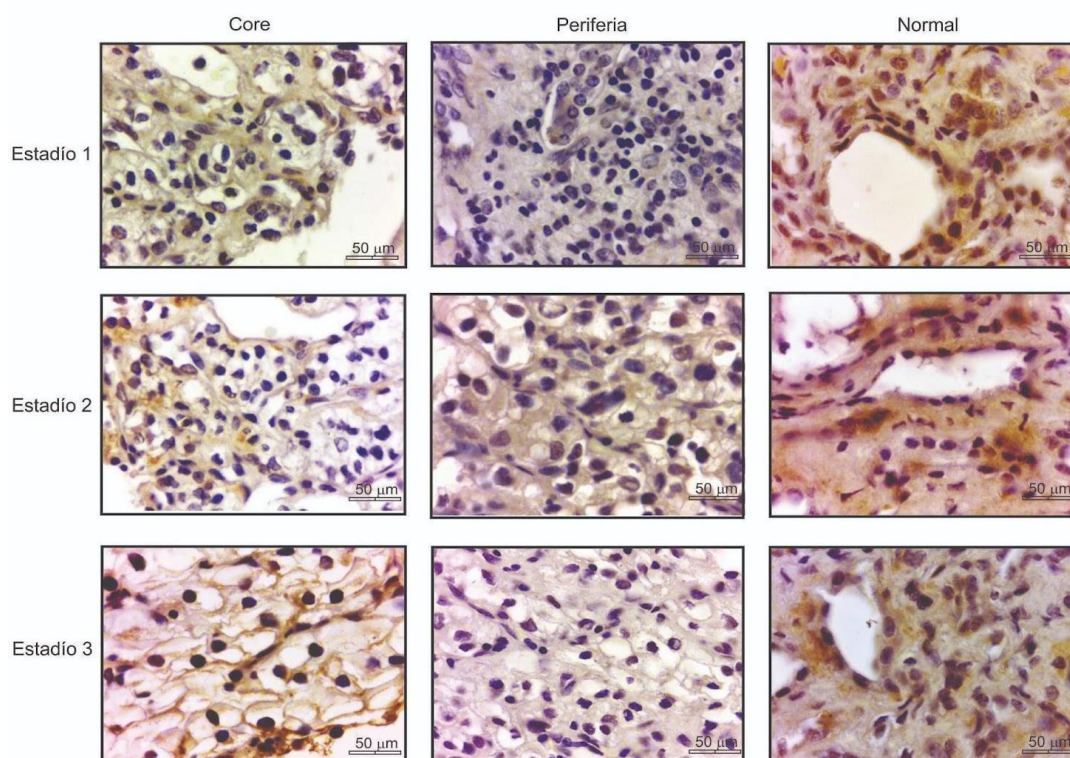


Figura 26. Inmunohistoquímica de HIF-2α. Microfotografías representativas de la inmunohistoquímica de HIF-2α en muestras de diferentes estadíos de ccRCC (core y periferia) y de secciones distales de ccRCC de cada grupo experimental. HIF-2α exhibió principalmente patrones nucleares y citoplasmáticos difusos. Aumento original 400x. Las barras representan 50 μm

Expresión semicuantitativa de HIF-2 α en ccRCC

Localización espacial	core de ccRCC			periferia de ccRCC			Total
	0	+	++	0	+	++	
Estadío I	0 (0.00)	9 (30.00)	21 (70.00)	0 (0.00)	17 (56.66)	13 (43.33)	30
Estadío II	0 (0.00)	1 (16.66)	5 (83.33)	0 (0.00)	4 (66.66)	2 (33.33)	6
Estadío III	0 (0.00)	0 (0.00)	5 (100.00)	0 (0.00)	4 (80.00)	1 (20.00)	5
Total		41			41		41

Tabla 6. La evaluación semicuantitativa considera los siguientes parámetros: (0): ninguna, (+) débil, y (++) fuerte expresión IHQ en muestras de core y periferia de ccRCC (n= 41).

La evaluación semicuantitativa confirmó que la tinción por IHQ de HIF-2 α en el centro del tejido tumoral del ccRCC fue de 75,61% (31/41), siendo significativamente mayor que la de la periferia 39.02% (16/41).

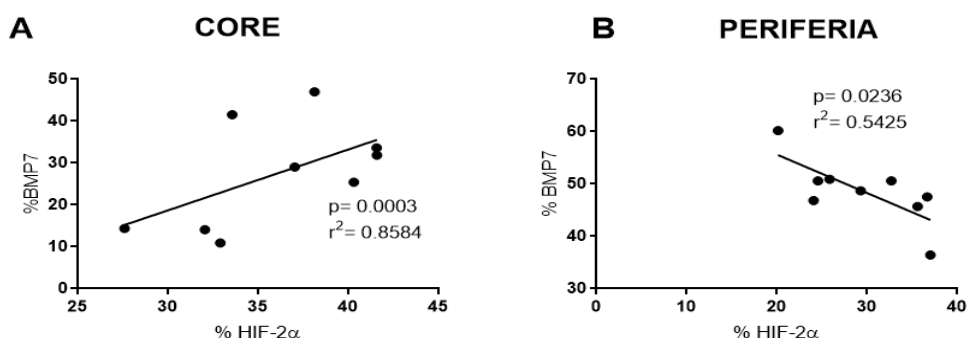


Figura 27. Análisis de correlación entre la expresión de BMP7 y la hipoxia en muestras de ccRCC. **A.** Correlación positiva entre el porcentaje de incremento de BMP7 y el porcentaje de incremento de HIF-2 α en muestras de core de ccRCC. **B.** Correlación negativa entre el porcentaje de incremento de BMP7 y el porcentaje de disminución de HIF-2 α en muestras de periferia de ccRCC. Los valores representan el promedio de los valores de tres análisis realizados para cada estadío tumoral (I, II y III). El nivel de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

La asociación lineal entre variables de naturaleza continua se evaluó con la correlación de Pearson, obteniendo una correlación positiva entre los porcentajes de expresión de BMP7 y HIF-2 α en core ($r^2 = 0,8584$; $p = 0,0003$) y una correlación negativa entre los respectivos de BMP7 y HIF-2 α en periferia ($r^2 = 0,5425$; $p = 0,0236$) en muestras correspondientes a los estadíos I,II y III de ccRCC (Figura 27 A-B).

EXPRESIÓN DE E-CADERINA EN EL ccRCC

Se ha determinado que el TGF- β induce la transición epitelial-mesenquimal (TEM) en el epitelio tubular renal (Godin et al., 1998), un cambio observado durante el desarrollo embrionario, la fibrosis renal y a nivel tumoral (Introducción, Figura 12). Esta TEM puede ser revertida por BMP7, lo cual se evidencia por la expresión de la molécula de adhesión celular epitelial **E-caderina** (E-CAD) (Li et al., 2015). Esta proteína no sólo desempeña un papel importante en el mantenimiento del fenotipo epitelial, sino también en la supresión de tumores, y su pérdida en las células epiteliales se ha relacionado con malignidad en varios tipos de cáncer. La pérdida de este marcador de diferenciación epitelial es crucial durante el proceso de TEM, ya que sin las uniones adherentes

RESULTADOS-CAPÍTULO 2

estrechas que unen los tejidos, las células individuales son libres de migrar, lo cual, a su vez es un requisito esencial para la metástasis tumoral (Tang et al., 2018; Singla et al., 2018).

La expresión de E-CAD se evaluó en muestras de ccRCC en comparación con muestras controles emparejadas mediante IHQ. En las muestras de control, la E-CAD se localizó en los túbulos distales y en los conductos colectores. En las muestras periféricas de ccRCC, E-CAD mostró una fuerte inmunorreacción, mientras que se observó una ligera inmunotinción en el core del tumor en todos los grupos experimentales (Figura 28). Los resultados de la Tabla 7 ilustran los mayores porcentajes de expresión de E-CAD en las muestras de baja estadificación tumoral, principalmente en cortes de la periferia.

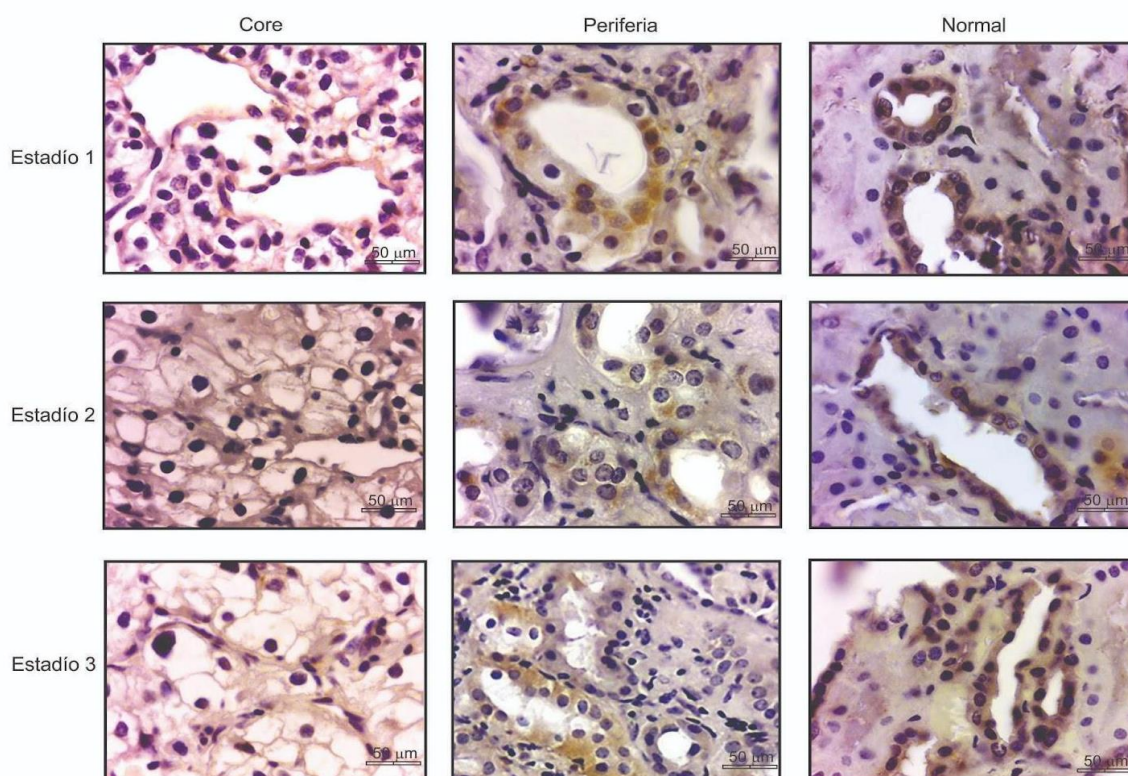


Figura 28. Inmunohistoquímica de E-caderina. Microfotografías representativas de la IHQ de E-CAD en muestras de diferentes estadios de ccRCC (núcleo y periferia) y secciones distales de muestra sin ccRCC de cada grupo experimental. Las barras representan 50 µm. E-CAD mostró un patrón de tinción citoplasmática difusa. Aumento original 400x.

Expresión semicuantitativa de E-Caderina en ccRCC

Localización espacial n(%)	core de ccRCC			periferia de ccRCC			Total
	0	+	++	0	+	++	
Estadio I	0 (0.00)	20 (66.66)	10 (33.33)	0 (0.00)	2 (66.66)	28 (93.33)	30
Estadio II	0 (0.00)	4 (66.66)	2 (33.33)	0 (0.00)	4 (16.66)	2 (33.33)	6
Estadio III	2 (40.00)	3 (60.00)	0 (0.00)	1 (20.00)	3 (60.00)	1 (20.00)	5
Total		41			41		41

Tabla 7. La evaluación semicuantitativa considera los siguientes parámetros: (0): ninguna, (+) débil y (++) fuerte expresión IHQ en muestras de ccRCC del centro y periféricas (n= 41).

Además, se estudió la expresión de E-CAD mediante ICQ en las células Caki-1 y Caki-2. El patrón de inmunotinción fue principalmente perinuclear y ligeramente difuso en ambas líneas celulares (Figura 29).

RESULTADOS-CAPÍTULO 2

Estos datos confirman una expresión básica de E-CAD en las líneas celulares renales (Caki-1 y Caki-2), a diferencia del análisis de IHQ que reveló diferencias notables entre el centro y la periferia en las muestras de ccRCC, así como según los estadios del tumor.

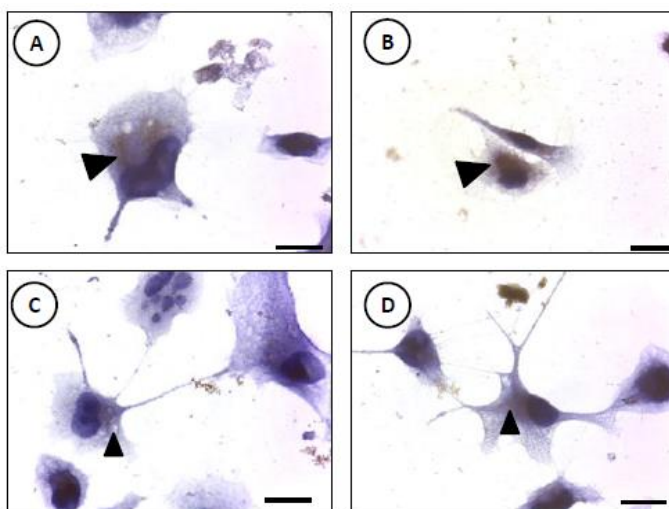


Figura 29. Inmunocitoquímica de E-caderina en células Caki. La expresión de E-CAD se muestra en microfotografías representativas de cultivos de Caki-1 y Caki-2. Tanto las células Caki-2 (A y B) como las Caki-1 (C y D) mostraron patrones de inmunotinción citoplasmática. Las barras representan 50 µm.

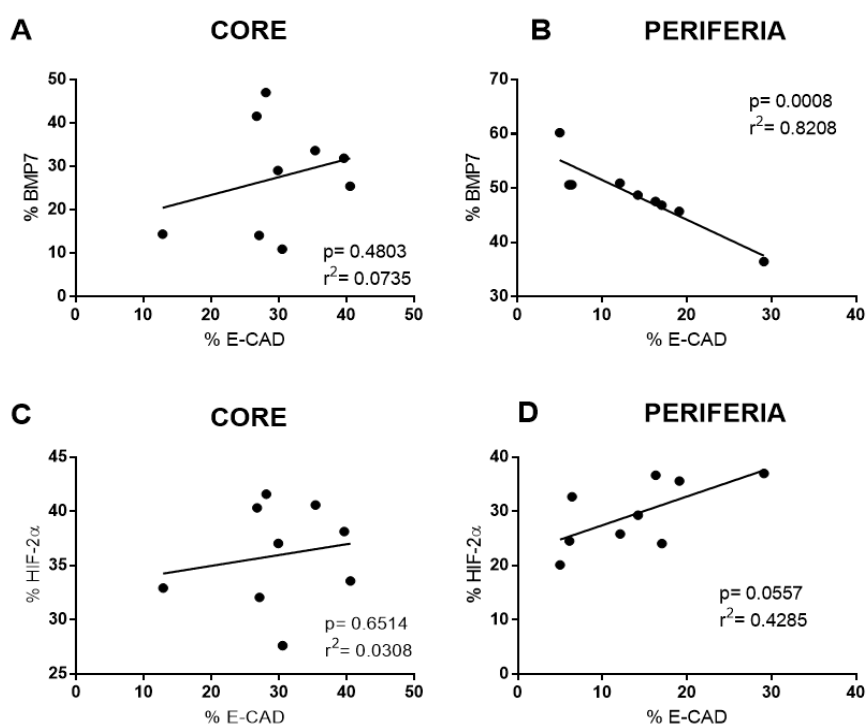


Figura 30. Análisis de correlación entre la expresión de BMP7, E-CAD y la hipoxia en muestras de ccRCC. A. Correlación entre el porcentaje de incremento de BMP7 y el porcentaje de incremento de E-CAD en muestras de core de ccRCC. B. Correlación entre el porcentaje de incremento de BMP7 y el porcentaje de disminución de E-CAD en muestras de periferia de ccRCC. C. Correlación entre el porcentaje de incremento de E-CAD y el porcentaje de incremento de HIF-2α en muestras de core de ccRCC. D. Correlación entre el porcentaje de incremento de E-CAD y el porcentaje de incremento de HIF-2α en muestras de periferia de ccRCC. Los valores representan el promedio de los valores de tres análisis realizados para cada estadio tumoral (I, II y III). El nivel de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS-CAPÍTULO 2

El análisis de correlación permitió evaluar el porcentaje de los niveles de expresión de la proteína BMP7 en función del respectivo porcentaje de expresión de la proteína E-CAD y los niveles de expresión de la proteína HIF-2 α en función del respectivo porcentaje de expresión de la proteína E-CAD. En ambos casos fue observado en muestras de core y periferia, correspondientes a los estadios I, II y III de ccRCC. La asociación lineal entre variables de naturaleza continua se evaluó con la correlación de Pearson. No se obtuvo una correlación significativa entre BMP7 y E-CAD en core ($r^2 = 0,0735$; $p = 0,4803$), pero si se evidenció una significativa correlación negativa entre BMP7 y E-CAD en periferia ($r^2 = 0,8208$; $p = 0,0008$) como se muestra en la Figura 30 A-B, respectivamente. Por su parte, la correlación entre HIF-2 α y E-CAD en core ($r^2 = 0,8107$; $p = 0,0009$) y en periferia ($r^2 = 0,4285$; $p = 0,0557$) exhiben un p mayor a 0,05; por lo tanto carecen de significación estadística (Figuras 30C y 30D respectivamente).

LAS CÉLULAS TUMORALES CENTRALES PRESENTAN MAYORES TASAS DE PROLIFERACIÓN QUE LAS DE LA PERIFERIA EN EL ccRCC

El antígeno nuclear de células proliferantes (Ki-67) se detectó mediante IHQ tanto en los tumores como en los controles. Como era de esperar, estaba restringido a los núcleos de las células tubulares, mostrando una granularidad intensa de color marrón y homogénea en las muestras de control de todos los grupos experimentales (Figura 31).

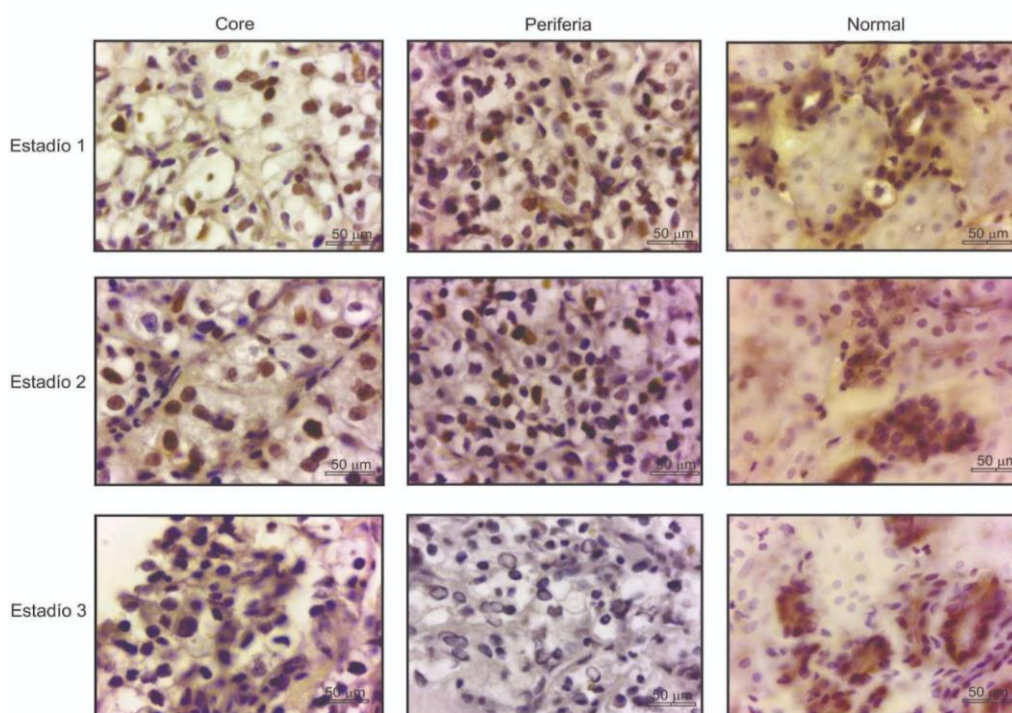


Figura 31. Inmunohistoquímica de Ki-67. Microfotografías representativas de la inmunohistoquímica de Ki-67 en muestras de diferentes estadios de ccRCC (núcleo y periferia) y en secciones distales no relacionadas con ccRCC de cada grupo experimental. Aumento total 400x. Las barras representan 50 μ m.

Sin embargo, los índices de proliferación (IP) de Ki-67 fueron estadísticamente más altos en el núcleo en comparación con la periferia, en todos los estadios del ccRCC (Figura 32). Además, el IP aumentó en forma gradual en el núcleo con los estadios histológicos del tumor. Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre los estadios patológicos I y III (#; $p < 0,0001$; Figura 29).

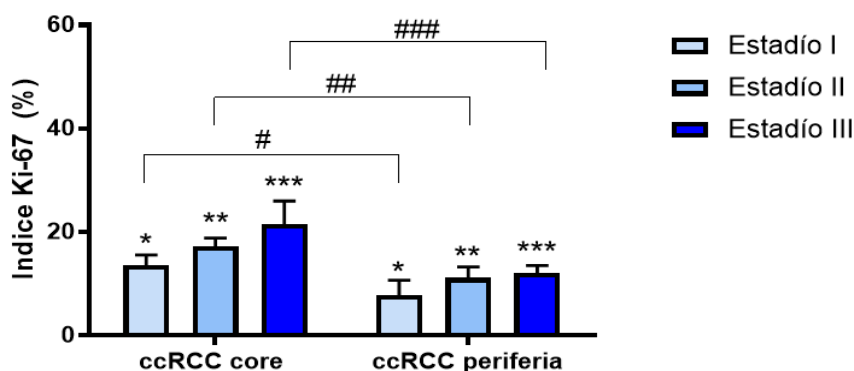


Figura 32. Diferencias espaciales de los índices proliferativos en las muestras de ccRCC. Las barras representan el IP en las muestras del núcleo y de la periferia según los estadios patológicos del tumor I, II y III. Los valores se expresan como la media \pm SD. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ indican diferencias significativas entre el IP de la periferia y del núcleo respectivamente en función de los estadios. # y ### indican diferencias entre iguales estadios en el núcleo y la periferia, respectivamente.

Los ensayos de proliferación revelaron que las células Caki-1 y Caki-2 presentan un 80-90% de inmunodetección positiva para Ki-67 por ICQ. Esto es predecible ya que las células crecen en fase exponencial en los cultivos en monocapa (Figura 33).

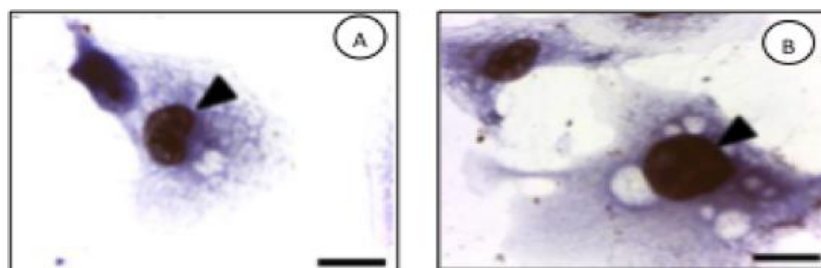


Figura 33. Inmunocitoquímica de Ki-67 en células Cakis. Microfotografías representativas de la expresión de Ki-67 en cultivos de células Caki-1 (A) y Caki-2 (B). Aumento total 400x.

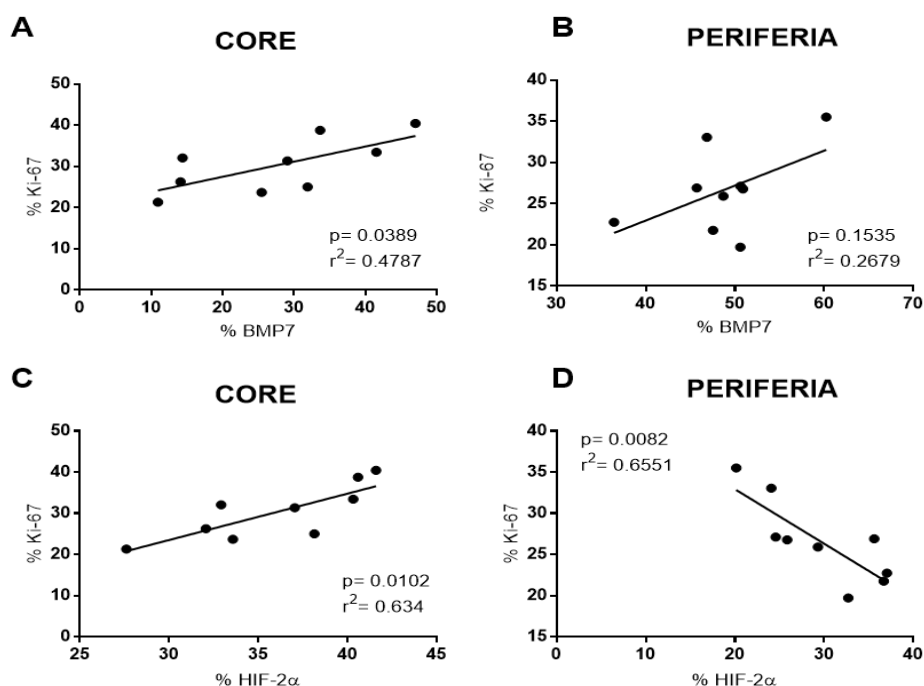


Figura 34. Análisis de correlación entre la expresión de BMP7, la hipoxia y la proliferación en muestras de ccRCC. A. Correlación entre el porcentaje de incremento de Ki-67 y el porcentaje de incremento de BMP7 en muestras de core de ccRCC. B. Correlación entre el porcentaje de incremento de Ki-67 y el porcentaje de incremento de BMP7 en muestras de periferia de ccRCC. C. Correlación entre el porcentaje de incremento de Ki-67 y el porcentaje de incremento de HIF-2α en muestras de core de ccRCC. D. Correlación entre el porcentaje de incremento de Ki-67 y el porcentaje de disminución de HIF-2α en muestras de periferia de ccRCC. Los valores representan el promedio de los valores de tres análisis realizados para cada estadio tumoral (I, II y III). El nivel de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

La asociación lineal entre variables de naturaleza continua se evaluó con la correlación de Pearson. El análisis de correlación entre el porcentaje de los niveles de expresión de la proteína Ki-67 en función del respectivo porcentaje de expresión de las proteínas BMP7, HIF-2α y E-CAD se realizó en todos los casos a partir de muestras de core y periferia correspondientes a los estadios I, II y III de ccRCC. Se obtuvo una correlación positiva entre Ki-67 y BMP7 en core ($r^2 = 0,634$; $p = 0,0389$) (Figura 34A) pero no en periferia, ya que los valores no fueron significativos ($p > 0,05$) (Figura 34B). Por su parte, la correlación entre Ki-67 y HIF-2α en core es positiva ($r^2 = 0,634$; $p = 0,0102$) y negativa en periferia ($r^2 = 0,6551$; $p = 0,0082$) con alta significancia, como se puede observar en la Figura 34 C-D, respectivamente.

CONCLUSIÓN PARCIAL

En este capítulo, se describe por primera vez, en forma global, la localización de BMP7, la de HIF-2α (biomarcador clave de hipoxia), la de E-CAD (indicativa de TEM) y Ki-67 (marcador de proliferación) en muestras de core y periferia de ccRCC según los estadios patológicos del tumor (Clasificación TNM: I, II y III).

RESULTADOS-CAPÍTULO 2

Se determinó mediante IHQ y RT-qPCRs que todos los especímenes de ccRCC manifiestan una sobreexpresión de BMP7 en comparación con las secciones renales distales no tumorales emparejadas de cada grupo experimental. Sin embargo, al comparar por IHQ los niveles de expresión del core con la periferia de los especímenes de ccRCC en cada uno de los estadios, estos resultaron ser muy diferentes entre sí. En el core la expresión de BMP7 aumenta gradualmente con el estadio mientras que en periferia no ocurre lo mismo. Esto nos permite señalar un posible importante papel de BMP7 en la progresión de ccRCC.

En relación con la hipoxia existente, se registró a través de RT-qPCR una sobreexpresión de ambas isoformas HIFs (HIF-1 α y HIF-2 α) en muestras de ccRCC con respecto a las normales.

A su vez, la expresión del gen HIF-2 α fue claramente superior, casi 5 veces mayor a la expresión de HIF-1 α , lo que determinó que los posteriores estudios se realicen detectando sólo la primera isoforma mencionada. Asimismo, mediante IHQ se verificó una sobreexpresión de HIF-2 α en muestras de ccRCC, siendo significativamente mayor en el núcleo que en la periferia en todos los grupos experimentales. El patrón de inmunoreactividad nuclear se correspondió con el obtenido mediante ICQ en las líneas Caki-1 y Caki-2. Por lo tanto, la sobreexpresión de HIF-2 α coincide con lo descrito por otros autores en diversos tipos de tumores sólidos, por lo que se le atribuye un importante rol en la progresión de ccRCC.

Por otra parte, las pruebas experimentales han demostrado que los índices de proliferación (IP) de Ki-67 fueron estadísticamente más altos en el núcleo en comparación con la periferia, en todos los estadios del ccRCC. Además, los ensayos de proliferación revelaron que las células Caki-1 y Caki-2 presentan un 80-90% de inmunodetección positiva para Ki-67 con idéntico patrón de expresión que en las muestras tumorales humanas. Esto permite concluir que los ccRCC poseen un elevado grado de proliferación celular en el core tumoral.

Finalmente, al realizar los análisis de correlación se pudo ver que la alta expresión de BMP7 se asoció con una elevada hipoxia (determinada por HIF-2 α) y una proliferación celular en la región del core del tumor (establecida por Ki-67) y de forma gradual con el aumento de los estadios. Por otra parte, se observó una correlación negativa en la expresión de BMP7 con la molécula clave de adhesión celular epitelial E-CAD, en la periferia del tumor, esto es compatible con la idea antes mencionada de un efecto inhibitorio, que la proteína posee en el proceso TEM. Es así que se pudo comprobar que BMP7 se opone al desarrollo y progresión de los ccRCC.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Existen múltiples evidencias que han permitido comprender los mecanismos regulatorios de la embriogénesis que se reiteran anárquica y atemporalmente durante la oncogénesis. Por consiguiente, se pueden plantear paralelismos entre la expresión de ciertos genes embrionarios con respecto a los tumorales (Brown & McGuire, 2012).

En la primera parte de esta tesis, se proporciona un análisis sistemático genético temporal respecto de la expresión de genes novedales potencialmente involucrados en el desarrollo del mesodermo durante la embriogénesis murina.

Es ampliamente sabido que, en el caso del desarrollo embrionario temprano del ratón, a los 6 días post-coito comienza el proceso de gastrulación, con la formación de la línea primitiva. Este evento define el desarrollo de las tres capas germinales: meso, ecto y endodermo, las cuales darán lugar a la futura organogénesis (Marikawa et al, 2012).

De acuerdo con estos conocimientos previos y cómo se mencionó en la sección de resultados, en esta tesis inicialmente, se recopilaron 26 genes candidatos de acuerdo con una exhaustiva búsqueda en la literatura y bases de datos. Pero, luego de una primera serie de análisis realizados, esta lista de candidatos se refinó aún más seleccionando sólo aquellos genes con funciones desconocidas o no canónicas durante el desarrollo embrionario temprano, particularmente durante el proceso de gastrulación murina.

Cada gen elegido se analizó de forma independiente utilizando las células madre embrionarias de ratón (mESC) como un modelo *in vitro* y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) para su cuantificación. Este enfoque experimental es importante debido a que las múltiples semejanzas existentes entre el desarrollo embrionario *in vivo* y la diferenciación *in vitro* de mESC cultivadas. Esto se debe a que estas células poseen una capacidad de autorrenovación ilimitada y pueden diferenciarse hacia todos los tipos celulares de tejidos de adultos (Smith, 2001).

La señalización que produjeron los genes candidatos se comparó con genes con una expresión conocida y bien caracterizada en las tres capas germinales del embrión murino y que, junto con factores transcripcionales y con proteínas involucradas en las vías de señalización, son actores cruciales en la mayoría de los procesos responsables del desarrollo embrionario de los mamíferos. Dentro de las principales vías de señalización, los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), desempeñan diversas funciones a través de varios conjuntos de procesos celulares, que incluyen proliferación, diferenciación y especificación del destino que tomará la embriogénesis, así como en los tejidos ya maduros (Shi & Massagué, 2003).

A su vez, dentro de esta superfamilia, Activina, Nodal y la proteína morfogenética ósea, particularmente, su isoforma 4 (BMP4), se destacan por tener un papel importante en el proceso de

DISCUSIÓN

elección del linaje celular en el desarrollo del mesodermo durante y después de la gastrulación (Winnier et al., 1995).

En concordancia con lo anteriormente mencionado, Willems & Leyns (2008) han señalado que la expresión de genes mesodérmicos se detecta desde el tercer al quinto día de diferenciación de los mEB, para disminuir posteriormente. Además, la expresión de estos genes también aumenta de forma gradual dependiendo de sus concentraciones en mESCs tratadas con Activina A, BMP4 o ambos. Sin embargo, su expresión génica disminuye en aquellas muestras tratadas con el factor inhibidor SB-431542.

Como resultado del estudio realizado en esta tesis, se detectaron cinco genes (*Ccpg1os*, *D230030E09Rik*, *Mlf1*, *Pcdh19* y *Slc7a3*) con aumento de expresión en muestras tratadas con Activina A y disminución con BMP4. Los mismos se corresponden con un pico de expresión al tercer y cuarto día de diferenciación de los mEB y perfiles similares a las de los marcadores mesodérmicos bien caracterizados (*Snail1*, *T*, *Evx1* y *Flk1*). Estas observaciones indican un potencial rol para estos cinco genes en el desarrollo del mesodermo axial y del mesendodermo.

Por su parte, el gen *Dmgdh* mostró inducción por Activina A y BMP4 con una mayor expresión al cuarto día de diferenciación. Esto revela una probable participación en la línea primitiva hacia la inducción/desarrollo del mesodermo lateral, lo cual se corresponde con el aumento de la expresión génica del marcador *Lhx1*.

Algunos estudios de expresión génica no revelaron diferencias significativas. Dentro de estos casos se encuentran *Josd2*, *Prtg* y *Rbm24* que no fueron inducidos con Activina A ni BMP4, y tampoco fueron sensibles a la acción de SB4315425, a pesar de tener un pico de expresión al cuarto día de diferenciación. Esto indica que no están regulados por Activina A o BMP4 pero no descarta su posible rol en el proceso de gastrulación. Asimismo, *Atp9a* y *Kbtbd4* no mostraron una expresión diferencial clara dentro del período de diferenciación de las mESCs y mEBs.

Al igual que estos últimos, los genes restantes (*Capsl*, *Fam183b*, *Mgst1* y *Scara3*) tampoco presentaron una expresión significativa en las muestras de mESCs y mEBs lo que sugirió que no están involucrados en la gastrulación y por lo tanto no se analizaron en muestras tratadas con los diferentes factores.

Estudios previos sólo han permitido detectar por diferentes métodos la expresión de estos genes en el desarrollo temprano murino (Ito et al., 1997; Douglas & Camper, 2000; Sousa-Nunes et al., 2003; Hou et al., 2007; Svensson et al., 2007; Tamplin et al., 2008; Hassan et al., 2010; Tamplin et al., 2011; Fossat et al 2015; Dash et al., 2020; Gui et al., 2021; Imbard et al., 2021). De hecho, gran parte de los hallazgos anteriores se corresponden con lo obtenido en el análisis presentado en esta tesis.

DISCUSIÓN

Sin embargo, ninguno de estos estudios analizó la expresión de estos genes desde el punto de vista funcional con el efecto de activadores del desarrollo.

A nuestro entender, es la primera vez que se realiza un estudio integral que involucra a los genes candidatos mencionados teniendo en cuenta su expresión génica en muestras de mESC y mEBS que reproducen el desarrollo temprano murino y en aquellas tratadas con factores de señalización de la vía TGF- β (Activina A y BMP4) inductores del desarrollo.

En relación con los resultados obtenidos y analizados previamente se sabe que existe una gran similitud entre los controles moleculares y celulares operantes durante la embriogénesis y la tumorigénesis, particularmente a nivel de las vías de señalización implicadas en ambos procesos, entre ellas la del TGF- β . Dentro de esta última, a su vez, la subfamilia de la proteína morfogénica ósea (BMPs) tiene funciones esenciales y únicas durante el desarrollo de vertebrados ya que su desregulación conduce casi invariablemente a defectos y/o enfermedades del desarrollo, incluido el cáncer (Xu et al., 2013).

El correcto funcionamiento de la vía TGF- β /BMP depende de su comunicación constitutiva y extensa con otras vías de señalización, lo cual es abrumadoramente complejo y está condicionado en gran medida por el contexto, particularmente en el caso de los tumores, por su microambiente. Los diferentes modos de interacción entre TGF- β /BMP y las vías de señalización incluyen una gran lista: la proteína cinasa activada por mitógeno, fosfatidilinositol-3 cinasa/Akt, Wnt, Hedgehog, Notch y las señales de interleucina/interferón-gamma/factor de necrosis tumoral (Guo & Wang, 2009; Zhang, 2017). Sumado a esto, se ha sugerido recientemente a la hipoxia dentro de los moduladores de la actividad de TGF- β , así como del metabolismo energético (captación/consumo de glucosa, señalización de AMPK y mTOR) y de la señalización de NO (óxido nítrico) (Mingyuan et al., 2018).

Estos antecedentes determinan un vínculo existente entre la vía del TGF- β y el estado de hipoxia. A su vez, se sabe que este último, tiene un papel importante en la supervivencia celular, tanto en estados fisiológicos como fisiopatológicos. Por lo que, se quiere evaluar su rol como denominador común entre la embriogénesis y la oncogénesis

Particularmente, en esta tesis el proceso fisiopatológico estudiado es, a su vez, oncológico y se trata del carcinoma renal de células claras (ccRCC). Es así que, una de las isoformas de las BMPs que cobra particular relevancia es BMP7. Esta última, al igual que las otras proteínas miembros de la familia, está asociada a interacciones inductivas en varios tejidos con un papel importante en el desarrollo del riñón así como también en la fisiología y fisiopatología del mismo (Markić et al., 2010). Si bien, se expresa en un amplio grupo de carcinomas, su conocimiento es limitado o incluso

DISCUSIÓN

contradictorio en lo que se refiere al ccRCC (Kwak et al., 2007, Blish, et al., 2008, Markić et al., 2011).

Es por el escaso conocimiento mencionado que en esta tesis se evaluó la expresión de BMP7 en muestras tumorales. Este estudio se realizó mediante inmunohistoquímica (IHQ) y reveló una sobreexpresión de BMP7 en todas las muestras cancerígenas, en comparación con las secciones renales distales no tumorales emparejadas para cada grupo experimental. Estos datos difieren de los comunicados por Markić et al. (2010), quienes demostraron una disminución de la expresión de BMP7 en los CCR en comparación con el riñón normal.

Por otra parte, y coincidentemente con los resultados del presente estudio, un trabajo posterior del mismo grupo (Markić et al., 2011), reveló que el ARNm de BMP7 es la isoforma predominante expresada en el ccRCC. Adicionalmente, las RT-qPCR no revelaron aumento significativo en su expresión en relación con el aumento de estadificación tumoral, en contraposición a lo encontrado en la presente tesis por IHQ. Las aparentes discrepancias en la detección de BMP7 en ccRCC podrían deberse a la heterogeneidad tumoral y a su expresión diferencial según la zona estudiada del tumor.

En relación a lo mencionado anteriormente, la embriogénesis y la oncogénesis se asemejan en varios aspectos: por una parte, en ambos fenómenos está involucrada la vía de señalización TGF- β /BMP y por otra, la hipoxia es un importante determinante de ambos procesos.

Particularmente, en lo que refiere este último factor, la presencia de zonas hipóxicas y el modo en que las células cancerígenas se adaptan a ellas puede comprenderse mediante la actividad de los factores inducibles por hipoxia (HIF- α y β). Es la actividad de la subunidad α la que conduce a regular en alza a los genes implicados en muchos aspectos de la progresión del cáncer (Shinojima, 2007). Esta subunidad presenta 3 isoformas (HIF-1 α , 2 α y 3 α), pero sólo 2 de ellas (HIF-1 α y HIF-2 α) se expresan ampliamente en los cánceres humanos (Calle et al, 2019).

Las áreas con baja tensión de oxígeno son frecuentes en los CCR, donde, los marcadores establecidos de hipoxia tumoral se han relacionado con un peor pronóstico (Gilkes et al., 2014; Masson & Ratcliffe, 2014).

En el presente estudio, los datos revelaron que el ARNm de ambas isoformas (HIF-1 α y HIF-2 α) se sobreexpresan en las muestras de ccRCC en comparación con las muestras renales no ccRCC, siendo la expresión del gen HIF-2 α claramente superior, casi cinco veces mayor a la expresión del gen HIF-1 α , lo que se corresponde con lo reportado por las investigaciones de Wierzbicki et al. (2019).

Sin embargo, cuando se reprodujo el mismo análisis en las líneas celulares Caki-1 y Caki-2 contra el control (línea celular renal embrionaria HEK-293) no se manifestó una diferencia significativa entre las expresiones de las dos isoformas. Esto contrasta con lo establecido por Wohlrab et al. (2019)

DISCUSIÓN

quienes detectaron diferencias en la expresión génica entre ambas isoformas en la línea celular Caki-1.

Considerando esto, se procedió con el análisis de la expresión proteica de HIF-2 α mediante IHQ en todas las muestras y estadios tumorales para validar los datos anteriores. Las muestras no tumorales mostraron una expresión proteica basal de HIF-2 α , principalmente en las células tubulares y endoteliales, ya que los riñones normales presentan un gradiente hipóxico fisiológico (Cannito et al., 2010).

Por otra parte, Jiang et al. (2011) reportaron a las zonas centrales de los tumores como las más hipóxicas respecto al tejido periférico. Específicamente en ccRCC, nuestro estudio revela una inmunoreactividad de HIF-2 α predominantemente nuclear en concordancia con lo hallado por Talks et al. (2000). La inmunocitoquímica (ICQ) realizada en las líneas Caki-1 y Caki-2 validó el patrón de expresión de HIF-2 α nuclear, en acuerdo con lo descrito por Wierzbicki et al. (2019).

Por otra parte, los mecanismos de señalización y transcripción relacionados con la hipoxia, están emergiendo como una de las condiciones más relevantes capaces de inducir la transición epitelial-mesenquimal (TEM) en la embriogénesis, la fibrosis de órganos y los tumores (Cannito et al., 2010; Brown & McGuire, 2012).

En lo que respecta a las relaciones entre hipoxia, TEM y cáncer, Higgins et al. (2007) afirmaron que la hipoxia es un desencadenante de la TEM en las células cancerosas de origen epitelial, considerando que el microambiente de casi cualquier tumor maligno sólido posee bajas presiones de oxígeno.

A su vez, la TEM está relacionada con la progresión tumoral, y su principal inductor es el TGF- β 1, mientras que BMP7 es quien revierte esta situación, como se demuestra por la expresión de E-caderina (E-CAD) (Godin et al., 1998, Li et al., 2015, Tretbar et al., 2019). Esta última es una molécula clave de adhesión celular epitelial y se la puede considerar como un marcador de diferenciación epitelial. Por lo tanto, su pérdida es crucial durante el proceso de TEM así como una característica clave para la metástasis, ya que sin las uniones adherentes estrechas que existen en los tejidos, las células individuales son libres de migrar, lo cual es un requisito esencial para la invasividad tumoral (Singla et al., 2018; Tang et al., 2018).

Por su parte, Prozialeck et al. (2004) determinaron la sobreexpresión de E-CAD en los túbulos distal y colector, así como en la mayoría de los segmentos medulares. Sin embargo, en los túbulos proximales está presente en baja proporción. Adicionalmente, se halló una correlación negativa estadísticamente significativa entre la pérdida de la expresión de E-CAD y el aumento de los estadios tumorales, encontrándose con poca frecuencia o ausente en los tumores renales de bajo grado (Katagiri et al., 1995). Asimismo, la E-CAD se evidenció mediante inmunofluorescencia *in*

DISCUSIÓN

vitro con un patrón de tinción típico de panal de abeja en 20 líneas de ccRCC (Shimazui et al., 1996).

En relación con lo expuesto previamente, se ha reportado que la diseminación metastásica de los tumores sólidos suele iniciarse con la reactivación de un programa de desarrollo embrionario y la TEM. Por lo tanto, la disminución de la expresión de E-CAD se correlaciona con la agresividad del tumor en la mayoría de los carcinomas (Zeisberg et al., 2003) y su aparición disminuye con el grado y el estadio del tumor (Umbas et al., 1994; Jäger et al., 2010). Sin embargo, estas correlaciones no están bien establecidas en el ccRCC.

En esta investigación, los resultados obtenidos refuerzan el hecho de que la expresión de E-CAD es débil, o incluso ausente, en las muestras de ccRCC en comparación con las secciones de control, que mostraron una fuerte inmunotinción epitelial. Esto último está en concordancia con el hecho de que la expresión de la E-CAD se encuentra con poca frecuencia o bien no se expresa en los tumores renales de bajo grado, comunicado previamente por Katagiri et al. (1995). Además, estos estudios añaden información sobre su localización espacial, ya que la E-CAD se inmunodetectó significativamente con mayor intensidad en la periferia en comparación con el centro de las muestras de ccRCC. Estos resultados sugieren que los pacientes con una expresión disminuida de E-CAD pueden estar asociados con la metástasis, lo que resulta en un mal pronóstico.

Con relación a la heterogeneidad tumoral mencionada previamente, investigaciones anteriores señalaron que la mayoría de los tumores sólidos, incluidos el cáncer colorrectal y los gliomas de alto grado, presentan una región central diferenciada y altamente proliferativa rodeada por una zona peritumoral de células invasivas (Vignjevic et al., 2007; Clark & Vignjevic, 2015; Mehta et al., 2018).

La mayoría de los carcinomas de células renales claras (ccRCC) están asociados a una importante proliferación celular. Teniendo en cuenta esto, estudiamos el proceso de proliferación de las células tumorales de ccRCC detectando el antígeno nuclear de células proliferantes (Ki-67) por IHQ y también en las células Caki-1 y Caki-2 por ICQ.

De acuerdo con las pruebas experimentales realizadas, se ha demostrado que los índices proliferativos (IP) del Ki-67 fueron estadísticamente más altos en el core tumoral en comparación con la periferia, en todos los estadios del ccRCC. Además, los ensayos de proliferación revelaron que las células Caki-1 y Caki-2 presentan un 80-90% de inmunodetección nuclear positiva para Ki-67 por ICQ, corroborando el patrón nuclear de marcación. Los estudios abarcaron, tal como se describió en el segundo capítulo de resultados, ensayos *in vitro* (RT-qPCR) e ICQ, con líneas celulares renales tumorales contra cultivos de células embrionarias tomadas como control para ponderar estas variables sin interferencias microambientales del tumor sólido.

DISCUSIÓN

Finalmente, con los resultados de la expresión de BMP7, HIF-2 α , Ki-67 y E-CAD según su localización, el grado de inmunomarcación y su estadio tumoral se realizaron varios análisis de correlación de estas variables.

Así se pudo encontrar una correlación positiva entre BMP7 y HIF-2 α en core ($r^2=0,8584$; $p=0,0003$) y negativa en periferia ($r^2=0,5425$; $p=0,0236$), ambas significativas (Figura 27 A-B). Por otro lado, BMP7 sólo mostró significancia en su correlación positiva con Ki-67 en core ($r^2 = 0,634$; $p = 0,0389$) (Figura 34A) y negativa con E-CAD en periferia ($r^2 = 0,8208$; $p = 0,0008$) (Figura 30B).

A su vez, HIF-2 α mostró una correlación positiva con Ki-67 en core ($r^2 = 0,634$; $p = 0,0102$) y negativa en periferia ($r^2 = 0,6551$; $p = 0,0082$), también ambas significativas (Figura 34 C-D).

Mediante el análisis realizado se puede determinar la correspondencia entre un alto grado de hipoxia y de proliferación en el core tumoral. Esto está en concordancia con Gordan et al. (2007) que señalaron a HIF-2 α como el único factor en promover la proliferación y la transformación tumoral. Adicionalmente, la elevada hipoxia es coincidente con un alto nivel de expresión de BMP7 en la misma región del tumor. Asimismo, se pudo corroborar una limitación del avance del proceso TEM mediante la correlación negativa existente entre la expresión de BMP7 con la expresión de E-CAD en la periferia del tumor.

Por lo mencionado previamente, en la segunda parte de esta tesis se describe por primera vez, a nuestro entender, las diferencias en la localización de BMP7 junto con la expresión de biomarcadores clave de hipoxia (HIFs), TEM (E-CAD) y proliferación (Ki-67) en relación con el núcleo y la periferia de especímenes del Carcinoma renal de células claras (ccRCC) según los estadios patológicos del mismo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La expresión de cinco genes: Ccp10s, D230030E09Rik, Dmgdh, Mlf1 y Pcdh19, es descrita por primera vez como potencialmente involucrados en la inducción/diseño del mesodermo murino a través de cultivos de mEBs y ensayos de RT-qPCR.
- Existe correlación directa de la expresión de BMP7 con la estadificación tumoral en el ccRCC.
- La expresión de BMP7 es mayor en todos los tumores estudiados con respecto al control y presenta un patrón de expresión citoplasmático difuso.
- La expresión de BMP7 depende directamente del grado de hipoxia del tejido en directa correlación con la expresión de HIF-2 α .
- La tasa proliferativa es mayor en core que en periferia y aumenta con el estadio tumoral en ccRCC.
- HIF-2 α es el factor de transcripción principal involucrado en la progresión/desarrollo tumoral y está en correlación directa con el índice proliferativo en el core de ccRCC.
- E-caderina se expresa diferencialmente en las distintas zonas del tumor, presentando mayor inmunodetección en la periferia respecto del core en ccRCC.
- BMP7 y E-caderina presentan una expresión antagónica y podrían utilizarse como predictores de agresividad del ccRCC.
- Evaluaciones diferenciales histoquímicas de Ki-67 conjuntamente con potenciales marcadores de invasividad (BMP7 y E-CAD) podrían resultar útiles en optimizaciones de diagnóstico y/o pronóstico para los ccRCC.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Alarmo EL, Pärssinen J, Ketolainen JM, Savinainen K, Karhu R & Kallioniemi A. (2009). BMP7 influences proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells. *Cancer Lett.*,275(1), 35-43.
- Anlaş, K., Gritti, N., Oriola, D., Arató, K., Nakaki, F., Le Lim, J., Sharpe, J. & Trivedi, V. (2021). Dynamics of anteroposterior axis establishment in a mammalian embryo-like system. *bioRxiv*.
- Aoki, M., Ishigami, S., Uenosono, Y., Arigami, T., Uchikado, Y., Kita, Y., Kurahara, H., Matsumoto, M., Ueno, S. & Natsugoe, S. (2011). Expression of BMP-7 in human gastric cancer and its clinical significance. *British Journal of Cancer*, 104(4), 714-718.
- Arul, M., Roslani, A. C., Ng, C. L., & Cheah, S. H. (2014). Culture of low passage colorectal cancer cells and demonstration of variation in selected tumour marker expression. *Cytotechnology*, 66(3), 481–491.
- Atlasi Y, Looijenga L & Fodde R. (2014). Cancer stem cells, pluripotency, and cellular heterogeneity: a WNTer perspective. *Curr Top Dev Biol*. 107, 373-404.
- Bachs, J. G., Moreno, M. D., Sánchez, A. S., Romero, J. L., Martín, M. S., Millán, I. H., Navarro, H. P., Martínez Córcoles, B., Cañamares Pabolaza, L. & Rodríguez, J. V. (2006). Incidencia creciente en el carcinoma de células renales. *Actas Urológicas Españolas*, 30(3), 295-300.
- Badalian, G., Derecskei, K., Szendroi, A., Szendroi, M., & Timar, J. (2007). EGFR and VEGFR2 protein expressions in bone metastases of clear cell renal cancer. *Anticancer research*, 27(2), 889-894.
- Baharvand H & Hassani SN. (2013). A new chemical approach to the efficient generation of mouse embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*. 997:13-22.
- Baillie-Benson, P., Moris, N., & Arias, A. M. (2020). Pluripotent stem cell models of early mammalian development. *Current Opinion in Cell Biology*, 66, 89-96.
- Baker, Christopher L & Pera, Martin F. (2018). Capturing Totipotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 22(1):25-34.
- Baldewijns, M. M., Thijssen, V. L., Van den Eynden, G. G., Van Laere, S. J., Bluekens, A. M., Roskams, T., van Poppel, H., De Bruïne, A. P., Griffioen, A. W., & Vermeulen, P. B. (2007). High-grade clear cell renal cell carcinoma has a higher angiogenic activity than low-grade renal cell carcinoma based on histomorphological quantification and qRT-PCR mRNA expression profile. *British journal of cancer*, 96(12), 1888–1895.
- Balkwill, F. R., Capasso, M., & Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *Journal of cell science*, 125(23), 5591-5596.
- Bašić-Jukić, N., Hudolin, T., Radić-Antolić, M., Ćorić, M., Zadro, R., Kaštelan, Ž., Pasini J., Bandić-Pavlović D. & Kes, P. (2011). Bone morphogenetic protein-7 expression is down-regulated in human clear cell renal carcinoma. *Journal of nephrology*, 24(1), 91-97.
- Beck, S., Le Good, J. A., Guzman, M., Ben Haim, N., Roy, K., Beermann, F. & Constam, D. B. (2002). Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. *Nat Cell Biol* 4, 981-5.
- Belanger, L.F. & Leblond, C.P. (1946). A method for locating radioactive elements in tissues by covering histological sections with a photographic emulsion, *Endocrinology*, Volume 39, Issue 1, Pages 8–13.

BIBLIOGRAFÍA

- Bell, C. C., Amaral, P. P., Kalsbeek, A., Magor, G. W., Gillinder, K. R., Tangermann, P., di Lisio, L., Cheetham, S., Gruhl, F., Frith, J., Tallack, M., Ru, K., Crawford, J., Mattick, J., Dinger, M. & Perkins, A. C. (2016). The *Evx1/Evx1as* gene locus regulates anterior-posterior patterning during gastrulation. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.
- Ben-Haim, N., Lu, C., Guzman-Ayala, M., Pescatore, L., Mesnard, D., Bischofberger, M., Naef, F., Robertson, E. J. & Constam, D. B. (2006). The nodal precursor acting via activin receptors induces mesoderm by maintaining a source of its convertases and BMP4. *Dev Cell* 11, 313-23.
- Beppu, H., Kawabata, M., Hamamoto, T., Chytil, A., Minowa, O., Noda, T. & Miyazono, K. (2000). BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev Biol* 221, 249-58.
- Biechele, S., Cox, B. J. & Rossant, J. (2011). Porcupine homolog is required for canonical Wnt signaling and gastrulation in mouse embryos. *Developmental biology*, 355(2), 275-285.
- Blish, K. R., Wang, W., Willingham, M. C., Du, W., Birse, C. E., Krishnan, S. R., Brown, J. C., Hawkins, G. A., Garvin, A. J., D'Agostino, R. B., Jr, Torti, F. M. & Torti, S. V. (2008). A human bone morphogenetic protein antagonist is down-regulated in renal cancer. *Molecular biology of the cell*, 19(2), 457-464.
- Borovecki, F., Simic, P., Grgurevic, L. & Vukicevic, S. (2004). The role of bone morphogenetic proteins in developing and adult kidney. In *Bone morphogenetic proteins: regeneration of bone and beyond*, 213-243. Birkhäuser, Basel.
- Bouhon, I. A., Kato, H., Chandran, S. & Allen, N. D. (2005). Neural differentiation of mouse embryonic stem cells in chemically defined medium. *Brain Res Bull*, 68, 62-75.
- Boward, B. R. (2019). LHX1 is a master regulator of intermediate mesoderm formation from human embryonic stem cells (Doctoral dissertation, University of Georgia).
- Brodaczewska, K. K., Szczylik, C., Fiedorowicz, M., Porta, C. & Czarnecka, A. M. (2016). Choosing the right cell line for renal cell cancer research. *Molecular cancer*, 15(1), 1-15.
- Brown, R. E. & McGuire, M. F. (2012). Oncogenesis recapitulates embryogenesis via the hypoxia pathway: morphoproteomics and biomedical analytics provide proof of concept and therapeutic options. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 42(3), 243-257.
- Buijs, J.T., Henriquez, N.V., van Overveld, P.G., van der Horst, G., Que, I., Schwaninger, R., Rentsch, C., Ten Dijke, P., Cleton-Jansen, A.M., Driouch, K., Lidereau, R., Bachelier, R., Vukicevic, S., Clézardin, P., Papapoulos, S.E., Cecchini, M.G., Löwik, C.W. & van der Pluijm, G. (2007). Bone morphogenetic protein 7 in the development and treatment of bone metastases from breast cancer. *Cancer Res.*, 67(18), 8742-51.
- Bürgesser, M., Riba, V., Ojeda, S. M., Morales, D. M., Calafat, P. & Diller, A. (2014). Expression of vegf-a, hif-1 α , cd34 and ki67 in clear cell renal cell carcinomas and their relationship with conventional prognostic markers. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba*, 71.
- Cairns, R., Papandreou, I. & Denko, N. (2006). Overcoming physiologic barriers to cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment. *Molecular Cancer Research*, 4(2), 61-70.
- Calle, X., Jiménez-Gallegos, D., Muñoz-Córdova, F., Sánchez, P. & Lavandero, S. (2019). Mecanismo sensor y de adaptación a los niveles de oxígeno y su implicancia en las enfermedades

BIBLIOGRAFÍA

cardiovasculares: a propósito del Premio Nobel de Fisiología-Medicina 2019. *Revista chilena de cardiología*, 38(3), 225-235.

Cannito, S., Novo, E., di Bonzo, L. V., Busletta, C., Colombatto, S. & Parola, M. (2010). Epithelial-mesenchymal transition: from molecular mechanisms, redox regulation to implications in human health and disease. *Antioxidants & redox signaling*, 12(12), 1383-1430.

Casser, E., Israel, S., Witten, A., Schulte, K., Schlatt, S., Nordhoff, V. & Boiani, M. (2017). Totipotency segregates between the sister blastomeres of two-cell stage mouse embryos. *Scientific reports*, 7(1), 1-15.

Catchpole, G., Platzer, A., Weikert, C., Kempkensteffen, C., Johannsen, M., Krause, H., Jung, K., Miller, K., Willmitzer, L., Selbig, J. & Weikert, S. (2011). Metabolic profiling reveals key metabolic features of renal cell carcinoma. *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(1), 109-118.

Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA & Wozney JM. (1990). Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(24):9843-9847.

Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. & Smith, A.(2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643-55.

Chang, H., Huylebroeck, D., Verschuere, K., Guo, Q., Matzuk, M. M. & Zwijsen, A. (1999). Smad5 knockout mice die at mid-gestation due to multiple embryonic and extraembryonic defects. *Development* 126, 1631-42.

Chen J, Ye L, Xie F, Yang Y, Zhang L & Jiang WG. (2010). Expression of bone morphogenetic protein 7 in lung cancer and its biological impact on lung cancer cells. *Anticancer Res.*, 30(4), 1113-20

Chen, J., McKay, Renée M., Parada & Luis F. (2012). Malignant Glioma: Lessons from Genomics, Mouse Models, and Stem Cells. *Cell*. 149:1, 36-47.

Chen, L. Q. & Pagel, M. D. (2015). Evaluating pH in the extracellular tumor microenvironment using CEST MRI and other imaging methods. *Advances in radiology*, 2015.

Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Marh, J., Lu, S. J., Johnson, J., Meisner, L. & Lanza, R. (2006). Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* 439, 216-9.

Clark, A. G., & Vignjevic, D. M. (2015). Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current opinion in cell biology*, 36, 13-22.

Combe, P., de Guillebon, E., Thibault, C., Granier, C., Tartour, E. & Oudard, S. (2015). Trial Watch: Therapeutic vaccines in metastatic renal cell carcinoma. *Oncoimmunology*, 4(5), e1001236.

Condic, Maureen L. (2014). Totipotency: What It Is and What It Is Not. *Stem Cells Dev.* 23(8): 796-812.

Conlon, F. L., Lyons, K. M., Takaesu, N., Barth, K. S., Kispert, A., Herrmann, B. & Robertson, E. J. (1994). A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* 120, 1919-28.

BIBLIOGRAFÍA

- Constam, D. B. & Robertson, E. J. (1999). Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol* 144, 139-49.
- Corradi S, Dakou E, Yadav A, Thomassen LC, Kirsch-Volders M & Leyns L. (2015). Morphological observation of embryoid bodies completes the in vitro evaluation of nanomaterial embryotoxicity in the embryonic stem cell test (EST) *Toxicol in Vitro*. 29(7):1587–1596
- Coucouvanis, E. & Martin, G. R. (1999). BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo. *Development* 126, 535-46.
- Crossley, P. H. & Martin, G. R. (1995). The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development*, 121(2), 439-451.
- Dai, Y., Yao, Q., Wu, G., Wu, D., Wu, L., Zhu, L., Xue, R. & Xu, J. (2016). Characterization of clear cell renal cell carcinoma with diffusion kurtosis imaging: correlation between diffusion kurtosis parameters and tumor cellularity. *NMR in Biomedicine*, 29(7), 873-881.
- Dash, S., Brastrom, L. K., Patel, S. D., Scott, C. A., Slusarski, D. C. & Lachke, S. A. (2020). The master transcription factor SOX2, mutated in anophthalmia/microphthalmia, is post-transcriptionally regulated by the conserved RNA-binding protein RBM24 in vertebrate eye development. *Human molecular genetics*, 29(4), 591-604.
- Deniz, F., Dilek, K., Hande, M., Umit, U. M. & Handan, K. (2015). Ki-67 and caspase expression in breast carcinoma: does variance in locational sampling exist?. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(9), 11305–11313.
- Douglas, K. R. & Camper, S. A. (2000). Partial transcriptome of the developing pituitary gland. *Genomics*, 70(3), 335-346.
- Driessens, G., Beck, B., Caauwe, A., Simons, B. D. & Blanpain, C. (2012). Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature* 488, 527–530.
- Dudley A.T. & Lyons KM, Robertson E.J. (1995). A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev*. 9(22):2795-2807.
- Dudley AT, Robertson EJ. (1997). Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in BMP7 deficient embryos. *Dev Dyn*. 208(3):349-362.
- Eisenhardt, L. & Cushing, H. (1930). Diagnosis of Intracranial Tumors by Supravital Technique. *The American journal of pathology*, 6(5), 541–552.7.
- Evans, M. J. & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-6.
- Fernandes, C., Soares, D. & Yegerli, M. C. (2018). Tumor microenvironment targeted nanotherapy. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1230.
- Forristal, C. E., Wright, K. L., Hanley, N. A., Oreffo, R. O. & Houghton, F. D. (2010). Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction*, 139: 85-97.

BIBLIOGRAFÍA

- Fossat, N., Ip, C. K., Jones, V. J., Studdert, J. B., Khoo, P. L., Lewis, S. L., Power, M., Tourle, K., Loebel, D., Kwan, K., Behringer, R. & Tam, P. P. (2015). Context-specific function of the LIM homeobox 1 transcription factor in head formation of the mouse embryo. *Development*, 142(11), 2069-2079.
- Fujiwara, T., Dehart, D. B., Sulik, K. K. & Hogan, B. L. (2002). Distinct requirements for extra-embryonic and embryonic bone morphogenetic protein 4 in the formation of the node and primitive streak and coordination of left-right asymmetry in the mouse. *Development* 129, 4685-96.
- Fuhrman S.A., Lasky L.C. & Limas C. (1982). Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 6(7):655-63.
- Furic-Cunko, V., Kes, P., Coric, M., Hudolin, T., Kastelan, Z. & Basic-Jukic, N. (2015). Expression of bone morphogenetic proteins 4, 6 and 7 is downregulated in kidney allografts with interstitial fibrosis and tubular atrophy. *International urology and nephrology*, 47(7), 1219-1229.
- Furth, J., Kahn, M. C., & Breedis, C. (1937). The transmission of leukemia of mice with a single cell. *The American Journal of Cancer*, 31(2), 276-282.
- Gadue, P., Huber, T. L., Paddison, P. J. & Keller, G. M. (2006). Wnt and TGF- β signaling are required for the induction of an in vitro model of primitive streak formation using embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Gaitan, Y. & Bouchard, M. (2006). Expression of the δ -protocadherin gene *Pcdh19* in the developing mouse embryo. *Gene Expression Patterns*, 6(8), 893-899.
- Garry, D. J., Caplan, A. L. & Garry, M. G. (2020). Chimeric Humanized Vasculature and Blood: The Intersection of Science and Ethics. *Stem cell reports*, 14(4), 538-540.
- Gasinska, A., Jaszczynski, J., Adamczyk, A., Janecka-Widła, A., Wilk, W., Cichocka, A. & Stelmach, A. (2018). Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in localized, surgically treated clear-cell renal cell carcinoma. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 56(4), 195-206.
- Gilkes, D. M., Semenza, G. L. & Wirtz, D. (2014). Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nature reviews. Cancer*, 14(6), 430-439.
- Godin R.E., Takaesu N.T., Robertson E.J. & Dudley AT. (1998). Regulation of BMP7 expression during kidney development. *Development*, 125(17):3473-82.
- Gordan, J. D., Bertout, J. A., Hu, C. J., Diehl, J. A. & Simon, M. C. (2007). HIF-2 α promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer cell*, 11(4), 335-347.
- Gui, M., Farley, H., Anujan, P., Anderson, J. R., Maxwell, D. W., Whitchurch, J. B., Botsch, J., Qiu, T., Meleppattu, S., Singh, S., Zhang, Q., Thompson, J., Lucas, J., Bingle, C. & Brown, A. (2021). De novo identification of mammalian ciliary motility proteins using cryo-EM. *Cell*, 184(23), 5791-5806.
- Guo, X. & Wang, X. F. (2009). Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways. *Cell research*, 19(1), 71-88.
- Guo, G., Stirparo, G. G., Strawbridge, S. S E., Spindlow, D., Yang, J., Clarke, J., Dattani, A., Yanagida, A., Amy Li, M., Myers, S., Özel, B., Nichols, J. & Smith, A. (2021). Human naive epiblast cells possess unrestricted lineage potential. *Cell stem cell*, 28(6), 1040-1056.

BIBLIOGRAFÍA

- Hadjantonakis, A. K., Gertsenstein, M., Ikawa, M., Okabe, M. & Nagy, A. (1998). Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech Dev* 76, 79-90.
- Halder, S. K., Beauchamp, R. D. & Datta, P. K. (2005). A specific inhibitor of TGF- β receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers. *Neoplasia*, 7(5), 509-521.
- Hassan, A. S., Hou, J., Wei, W. & Hoodless, P. A. (2010). Expression of two novel transcripts in the mouse definitive endoderm. *Gene Expression Patterns*, 10(2-3), 127-134.
- Heidegger, I., Pircher, A. & Pichler, R. (2019). Targeting the tumor microenvironment in renal cell cancer biology and therapy. *Frontiers in oncology*, 9, 490.
- Heldin, C. H., Miyazono, K. & Ten Dijke, P. (1997). TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390 (6659): 465– 471.
- Higgins, D. F., Kimura, K., Bernhardt, W. M., Shrimanker, N., Akai, Y., Hohenstein, B., Yoshihiko Saito, Y., Johnson, R., Kretzler, M., Cohen, C. D., Eckardt, K., Iwano, M. & Haase, V. H. (2007). Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 117(12), 3810-3820.
- Hoarau-Véchet, J., Rafii, A., Touboul, C. & Pasquier, J. (2018). Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions?. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 181.
- Hogan, B., Costantini, F. & Lacy, E. (1995). *Manipulating the Mouse Embryo*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Hou, J., Charters, A. M., Lee, S. C., Zhao, Y., Wu, M. K., Jones, S. J., Marra, M. & Hoodless, P. A. (2007). A systematic screen for genes expressed in definitive endoderm by Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). *BMC developmental biology*, 7(1), 1-13.
- Imbard, A., Schwendimann, L., Lebon, S., Gressens, P., Blom, H. J. & Benoist, J. F. (2021). Liver and brain differential expression of one-carbon metabolism genes during ontogenesis. *Scientific reports*, 11(1), 1-9.
- Inman, G. J., Nicolas, F. J., Callahan, J. F., Harling, J. D., Gaster, L. M., Reith, A. D., Laping, N. J. & Hill, C. S. (2002). SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* 62, 65-74.
- Ito, K. & Groudine, M. (1997). A new member of the cationic amino acid transporter family is preferentially expressed in adult mouse brain. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42), 26780-2678.
- Itoi, T., Yamana, K., Bilim, V., Takahashi, K. & Tomita, F. (2004). Impact of frequent Bcl-2 expression on better prognosis in renal cell carcinoma patients. *British journal of cancer*, 90(1), 200-205.
- Jackson, E. B. & Brues, A. M. (1941). Studies on Transplantable Embryoma of the Mouse. *Cancer Res.*, 1:494-98.

BIBLIOGRAFÍA

- Jäger, T., Becker, M., Eisenhardt, A., Tilki, D., Tötsch, M., Schmid, K. W., Romics I., Rübber H., Ergün S. & Szarvas, T. (2010). The prognostic value of cadherin switch in bladder cancer. *Oncology reports*, 23(4), 1125-1132.
- James, D., Levine, A. J., Besser, D. & Hemmati-Brivanlou, A. (2005). TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* 132, 1273-82.
- Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A. & Verfaillie, C. M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-9.
- Jiang, J., Tang, Y. L. & Liang, X. H. (2011). EMT: a new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer biology & therapy*, 11(8), 714-723.
- Johansson, B. M. & Wiles, M. V. (1995). Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. *Molecular and cellular biology*, 15(1), 141-151.
- Johnson, Z. M., Yuan, Y., Li, X., Jashashvili, T., Jamieson, M., Urata, M., Chen, Y. & Chai, Y. (2021). Mesenchymal stem cells and three-dimensional-osteoconductive scaffold regenerate calvarial bone in critical size defects in swine. *Stem cells translational medicine*, 10(8), 1170-1183.
- Joyce, J. A. & Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews cancer*, 9(4), 239-252.
- Jung, M., Ramankulov, A., Roigas, J., Johannsen, M., Ringsdorf, M., Kristiansen, G. & Jung, K. (2007). In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol Biol.*, 8:47.
- Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Gad, J. M., Tajima, Y., Taya, C., Kurohmaru, M., Sanai, Y., Yonekawa, H., Yazaki, K., Tam, P. & Hayashi, Y. (2002). Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice.
- Kasai, T., Chen, L., Mizutani, A. Z., Kudoh, T., Murakami, H., Fu, L., & Seno, M. (2014). Cancer stem cells converted from pluripotent stem cells and the cancerous niche. *Journal of stem cells & regenerative medicine*, 10(1), 2.
- Katagiri, A., Watanabe, R. & Tomita, Y. (1995). E-cadherin expression in renal cell cancer and its significance in metastasis and survival. *British journal of cancer*, 71(2), 376-379.
- Kayaselçuk, F., Zorludemir, S., Gümürdülü, D., Zeren, H. & Erman, T. (2002). PCNA and Ki-67 in central nervous system tumors: correlation with the histological type and grade. *Journal of neuro-oncology*, 57(2), 115-121.
- Kemp, C., Willems, E., Abdo, S., Lambiv, L. & Leyns, L. (2005). Expression of all Wnt genes and their secreted antagonists during mouse blastocyst and postimplantation development. *Dev Dyn* 233, 1064-75.
- Khan, M. I., Czarnecka, A. M., Lewicki, S., Helbrecht, I., Brodaczewska, K., Koch, I., Zdanowski, R., Król M. & Szczylik, C. (2016). Comparative gene expression profiling of primary and metastatic renal cell carcinoma stem cell-like cancer cells. *PLoS One*, 11(11), e0165718.

BIBLIOGRAFÍA

Kitisin K., Saha T., Blake T., Golestaneh N., Deng M., Kim C., Tang Y., Shetty K., Mishra B. & Mishra L. (2007). Tgf-b signaling in development. *Science Signaling. Sci STKE*. 2007(399):cm1.

Kleinsmith, Lewis J. & Pierce, G. Barry Jr. (1964). Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res.* (24) (9) 1544-1551.

Koster, M., Plessow, S., Clement, J. H., Lorenz, A., Tiedemann, H. & Knochel, W. (1991). Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4), a member of the TGF-beta family, in early embryos of *Xenopus laevis*: analysis of mesoderm inducing activity. *Mech Dev* 33, 191-9.

Ku, H. T., Zhang, N., Kubo, A., O'Connor, R., Mao, M., Keller, G. & Bromberg, J. S. (2004). Committing embryonic stem cells to early endocrine pancreas in vitro. *Stem Cells* 22, 1205-17.

Kubo, A., Shinozaki, K., Shannon, J. M., Kouskoff, V., Kennedy, M., Woo, S., Fehling, H. J. & Keller, G. (2004). Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development* 131, 1651-62.

Kuzaka, B., Janiak, M., Włodarski, K. H., Radziszewski, P. & Włodarski, P. K. (2015). Expression of bone morphogenetic protein-2 and -7 in urinary bladder cancer predicts time to tumor recurrence. *Archives of medical science : AMS*, 11(2), 378–384.

Kwak, C., Park, Y. H., Kim, I. Y., Moon, K. C. & Ku, J. H. (2007). Expression of Bone Morphogenetic Proteins, the Subfamily of the Transforming Growth Factor- β Superfamily, in Renal Cell Carcinoma. *The Journal of Urology*, 178 (3):1062-1067

Kwisda, K., White, L. & Hübner, D. (2020). Ethical arguments concerning human-animal chimera research: a systematic review. *BMC medical ethics*, 21(1), 24.

Landolt, L., Eikrem, Ø., Strauss, P., Scherer, A., Lovett, D. H., Beisland, C., Finne, K., Osman, T., Ibrahim, M., Gausdal, G., Ahmed, L., Lorens, J., Thiery, J., Tan, T., Sekulic, M. & Marti, H. P. (2017). Clear cell renal cell carcinoma is linked to epithelial-to-mesenchymal transition and to fibrosis. *Physiological Reports*, 5(11), e13305.

Le Good, J. A., Joubin, K., Giraldez, A. J., Ben-Haim, N., Beck, S., Chen, Y., Schier, A. F. & Constam, D. B. (2005). Nodal stability determines signaling range. *Curr Biol* 15, 31-6.

Levenstein, M. E., Ludwig, T. E., Xu, R. H., Llanas, R. A., Vandenheuvel-Kramer, K., Manning, D. & Thomson, J. A. (2005). Basic FGF Support of Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cells*.

Li, W., Cai, H. X., Ge, X. M., Li, K., Xu, W. D. & Shi, W. H. (2013). Prognostic significance of BMP7 as an oncogene in hepatocellular carcinoma. *Tumor Biology*, 34(2), 669-674.

Li, B., Shao, Q., Ji, D., Li, F. & Chen, G. (2015). Mesenchymal Stem Cells Mitigate Cirrhosis through BMP7. *Cell Physiol Biochem*, 35:433-440.

Lindblad, P. (2004). Epidemiology of renal cell carcinoma. *Scandinavian journal of surgery*, 93(2), 88-96.

Loboda, A., Jozkowicz, A. & Dulak, J. (2012). HIF-1 versus HIF-2—is one more important than the other?. *Vascular pharmacology*, 56(5-6), 245-251.

BIBLIOGRAFÍA

- López, J. I., Ugalde, A. & Zhou, M. (2008). Carcinomas renales con células claras. *Revista Española de Patología*, 41(3), 169-182.
- Losino, N., Luzzani, C., Solari, C., Boffi, J., Tisserand, M. L., Sevillever, G., Barañao, L. & Guberman, A. (2011). Maintenance of murine embryonic stem cells' self-renewal and pluripotency with increase in proliferation rate by a bovine granulosa cell line-conditioned medium. *Stem Cells and Development*, 20(8), 1439-1449.
- Luo G., Hofmann C., Bronckers A.L., Sohocki M., Bradley A. & Karsenty G. (1995). BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev.* 9(22):2808-2820.
- Lynch A. T., Mazzotta, S. & Hoppler, S. (2018). Cardiomyocyte differentiation from mouse embryonic stem cells. In *Experimental Models of Cardiovascular Diseases* (pp. 55-66). Humana Press, New York, NY.
- Lyons, K. M., Pelton, R. W. & Hogan, B. L. M. (1990). Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). *Development* 109, 833-844.
- Lyons, K. M., Hogan, B. L. M. & Robertson, E. J. (1995). Colocalization of BMP 7 and BMP 2 RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development. *Mech. Dev.* 50, 71-83.
- Lyons, K. M., Pelton, R. W. & Hogan, B. L. M. (1989). Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2a RNA suggest that transforming growth factor- β -like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. *Gen. Develop.* 3, 1657-1668.
- McBlane, J. W., Phul, P. & Sharpe, M. (2018). Preclinical development of cell-based products: a European regulatory science perspective. *Pharmaceutical research*, 35(8), 1-9.
- Maemura, M., Taketsuru, H., Nakajima, Y., Shao, R., Kakiyama, A., Nogami, J., Ohkawa, Y. & Tsukada, Y. I. (2021). Totipotency of mouse zygotes extends to single blastomeres of embryos at the four-cell stage. *Scientific reports*, 11(1), 1-20.
- Marikawa Y. & Alarcon VB. (2012). Creation of trophectoderm, the first epithelium, in mouse preimplantation development. *Results Probl Cell Differ.* 55:165–184.
- Markić D., J., Grsković A., Bobinac D. & Fuckar Z. (2010). Expression of bone morphogenetic protein-7, its receptors and Smad1/5/8 in normal human kidney and renal cell cancer. *Coll Antropol.*, 34 Suppl 2, 149-53.
- Markić D., Čelić T., Gršković A., Španjol J., Fučkar Ž., Grahovac B., Dorđević G. & Bobinac D. (2011). mRNA expression of bone morphogenetic proteins and their receptors in human renal cell carcinoma. *Urol Int.* 87(3):353-8
- Martin G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12), 7634–7638.
- Martin G.R., & Evans M.J. (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 72(4):1441-1445.

BIBLIOGRAFÍA

- Martin, S. K., Diamond, P., Gronthos, S., Peet, D. J. & Zannettino, A. C. W. (2011). The emerging role of hypoxia, HIF-1 and HIF-2 in multiple myeloma. *Leukemia*, 25(10), 1533-1542.
- Masson N., & Ratcliffe P.J. (2014). Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer Metab.*, 2(1), 3
- Matak, D., Brodaczewska, K. K., Lipiec, M., Szymanski, Ł., Szczylik, C. & Czarnecka, A. M. (2017). Colony, hanging drop, and methylcellulose three dimensional hypoxic growth optimization of renal cell carcinoma cell lines. *Cytotechnology*, 69(4), 565-578.
- Matak, D., Brodaczewska, K. K., Szczylik, C., Koch, I., Myszczyzyn, A., Lipiec, M., Lewicki, S., Szymanski, L., Zdanowski, R. & Czarnecka, A. M. (2017). Functional significance of CD105-positive cells in papillary renal cell carcinoma. *BMC cancer*, 17(1), 1-17.
- Megumi, K., Ishigami, S., Uchikado, Y., Kita, Y., Okumura, H., Matsumoto, M., Uenosono, Y., Arigami, T., Kijima, Y., Kitazono, M., Shinchu, H., Ueno, S. & Natsugoe, S. (2012). Clinicopathological significance of BMP7 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Annals of surgical oncology*, 19(6), 2066-2071.
- Mehta, S. J., Khan, T., Guerra, C., Reitz, C., McAuliffe, T., Volpp, K. G., Asch, D.A. & Doubeni, C. A. (2018). A Randomized Controlled Trial of Opt-in Versus Opt-Out Colorectal Cancer Screening Outreach. *The American Journal of Gastroenterology*, 113(12), 1848.
- Melana, J.P, Mignolli. F., Stoyanoff, T., Aguirre, M.V., Balboa, M.A., Balsinde, J. & Rodríguez, J.P. (2021). The Hypoxic Microenvironment Induces Stearoyl-CoA Desaturase-1 Overexpression and Lipidomic Profile Changes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancers*, 13, 2962.
- Mier, J. W. (2019). The tumor microenvironment in renal cell cancer. *Current opinion in oncology*, 31(3), 194.
- Mingyuan, X., Qianqian, P., Shengquan, X., Chenyi, Y., Rui, L., Yichen, S. & Jinghong, X. (2018). Hypoxia-inducible factor-1 α activates transforming growth factor- β 1/Smad signaling and increases collagen deposition in dermal fibroblasts. *Oncotarget*, 9(3), 3188.
- Mishina, Y., Suzuki, A., Ueno, N. & Behringer, R. R. (1995). Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes Dev* 9, 3027-37.
- Mishina, Y., Hanks, M. C., Miura, S., Tallquist, M. D. & Behringer, R. R. (2002). Generation of Bmpr/Alk3 conditional knockout mice. *Genesis* 32, 69-72.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. & Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631-42.
- Miura, S., Davis, S., Klingensmith, J. & Mishina, Y. (2006). BMP signaling in the epiblast is required for proper recruitment of the prospective paraxial mesoderm and development of the somites. *Development* 133, 3767-75.
- Miyazono, K., Maeda, S. & Imamura, T. (2005). BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 251-63.

BIBLIOGRAFÍA

- Motoyama K., Tanaka F., Kosaka Y., Mimori K., Uetake H., Inoue H., Sugihara K., & Mori M. (2008). Clinical significance of BMP7 in human colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.*, 15(5), 1530-7.
- Mulas, C., Kalkan, T., von Meyenn, F., Leitch, H. G., Nichols, J. & Smith, A. (2019). Defined conditions for propagation and manipulation of mouse embryonic stem cells. *Development*, 146(6), dev173146.
- Müller, J. (1843). *Elements of physiology* (Vol. 2). Lea and Blanchard.
- Naber, H. P., Wiercinska, E., Pardali, E., van Laar, T., Nirmala, E., Sundqvist, A., van Dam, H., van der Horst, G., van der Pluijm, G., Heckmann, B., Danen, E. & Ten Dijke, P. (2012). BMP-7 inhibits TGF- β -induced invasion of breast cancer cells through inhibition of integrin $\beta 3$ expression. *Cellular oncology*, 35(1), 19-28.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. & Roder, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8424-8.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H. & Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379-91.
- Nickel, J., Ten Dijke, P. & Mueller, T. D. (2018). TGF- β family co-receptor function and signaling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50(1), 12-36.
- Niwa, H., Miyazaki, J. & Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372-6.
- Nowotschin, S., Hadjantonakis, A. K. & Campbell, K. (2019). The endoderm: a divergent cell lineage with many commonalities. *Development*, 146(11), dev150920.
- Olson, S. E., & Seidel Jr, G. E. (2000). Reduced oxygen tension and EDTA improve bovine zygote development in a chemically defined medium. *Journal of Animal Science*, 78(1), 152-157.
- Ogawa, K., Saito, A., Matsui, H., Suzuki, H., Ohtsuka, S., Shimosato, D., Morishita, Y., Watabe, T., Niwa, H. & Miyazono, K. (2007). Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci* 120, 55-65.
- Ozkaynak, E., Rueger, D. C., Drier, E. A., Corbett, C., Ridge, R. J., Sampath, T. K. & Oppermann, H. (1990). OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family. *The EMBO journal*, 9(7), 2085-2093.
- Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet*, 133(3421), 571-573.
- Paul, R., Dorsey, J. F. & Fan, Y. (2021). Cell plasticity, senescence, and quiescence in cancer stem cells: Biological and therapeutic implications. *Pharmacology & therapeutics*, 107985.
- Pearce, J. J., Penny, G. & Rossant, J. (1999). A mouse cerberus/Dan-related gene family. *Developmental biology*, 209(1), 98-110.

BIBLIOGRAFÍA

- Perroud, B., Lee, J., Valkova, N., Dhirapong, A., Lin, P. Y., Fiehn, O., Kültz, D. & Weiss, R. H. (2006). Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling. *Molecular cancer*, 5(1), 1-17.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26, 509-15.
- Pfendler, K. C., Catuar, C. S., Meneses, J. J. & Pedersen, R. A. (2005). Overexpression of Nodal promotes differentiation of mouse embryonic stem cells into mesoderm and endoderm at the expense of neuroectoderm formation. *Stem Cells Dev* 14, 162-72.
- Pierce, G. B., Dixon Jr. F. J. & Verney, E. (1959). Testicular teratomas. I. Demonstration of teratogenesis by metamorphosis of multipotential Cells. *Cancer*. Volume 12, Issue 3.
- Pierce, G. B. & Speers, W. C. (1988). Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation. *Cancer research*, 48(8), 1996-2004.
- Piva, F., Giulietti, M., Santoni, M., Occhipinti, G., Scarpelli, M., Lopez-Beltran, A., Cheng, L., Principato, G. & Montironi, R. (2016). Epithelial to mesenchymal transition in renal cell carcinoma: implications for cancer therapy. *Molecular diagnosis & therapy*, 20(2), 111-117.
- Posfai, E., Lanner, F., Mulas, C. & Leitch, H. G. (2021). All models are wrong, but some are useful: Establishing standards for stem cell-based embryo models. *Stem Cell Reports*, 16(5), 1117-1141.
- Prozialeck, W. C., Lamar, P. C., & Appelt, D. M. (2004). Differential expression of E-cadherin, N-cadherin and beta-catenin in proximal and distal segments of the rat nephron. *BMC physiology*, 4(1), 1-14.
- Pulido, E. G., Centeno, A. M., Rey, P. M. & Narbón, E. S. (2007). Biología molecular del carcinoma de células claras renales: Principios para un tratamiento selectivo. *Actas Urológicas Españolas*, 31(3), 233-243.
- Qi, X., Li, T. G., Hao, J., Hu, J., Wang, J., Simmons, H., Miura, S., Mishina, Y. & Zhao, G. Q. (2004). BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6027-32.
- Rasti, A., Madjd, Z., Abolhasani, M., Mehrazma, M., Janani, L., Saeednejad Zanjani, L. & Asgari, M. (2018). Cytoplasmic expression of Twist1, an EMT-related transcription factor, is associated with higher grades renal cell carcinomas and worse progression-free survival in clear cell renal cell carcinoma. *Clinical and Experimental Medicine*, 18(2), 177-190.
- Richardson, L., Torres-Padilla, M. E. & Zernicka-Goetz, M. (2006). Regionalised signalling within the extraembryonic ectoderm regulates anterior visceral endoderm positioning in the mouse embryo. *Mech Dev*.
- Ricketts, C. J. & Linehan, W. M. (2014). Intratumoral heterogeneity in kidney cancer. *Nature genetics*, 46(3), 214-215.

BIBLIOGRAFÍA

- Ricketts, C. J., De Cubas, A. A., Fan, H., Smith, C. C., Lang, M., Reznik, E., Bowlby, R., Gibb, E., Akbani, R., Beroukhi, R., Bottaro, D., Choueiri, T., Gibbs, R., Godwin, A., Haake, S., Hakimi, A., Henske, E., Hsieh, J., Ho, T., Kanchi, R., Krishnan, B., Kwiatkowski, D., Lui, W., Merino, M., Mills, G., Myers, J., Nickerson, M., Reuter, V., Schmidt, L., Shelley, C., Shen, H., Shuch, B., Signoretti, S., Srinivasan, R., Tamboli, P., Thomas, G., Vincent, B., Vocke, C., Wheeler, D., Yang, L., Kim, W., Robertson, A. Cancer Genome Atlas Research Network; Paul T Spellman 21, W Kimryn Rathmell & Mayo, M. (2018). The cancer genome atlas comprehensive molecular characterization of renal cell carcinoma. *Cell reports*, 23(1), 313-326.
- Rivera-Pérez, J. A. & Magnuson, T. (2005). Primitive streak formation in mice is preceded by localized activation of Brachyury and Wnt3. *Developmental biology*, 288(2), 363-371.
- Rodriguez, A. M., Jin, D. X., Wolfe, A. D., Makedis, M. M., Wierenga, L., Hashmi, M. P., Viebahn, C. & Downs, K. M. (2017). Brachyury drives formation of a distinct vascular branchpoint critical for fetal-placental arterial union in the mouse gastrula. *Developmental biology*, 425(2), 208-222.
- Rothhammer, T., Wild, P. J., Meyer, S., Bataille, F., Pauer, A., Klinkhammer-Schalke, M., Hein, R., Hofstaedter, F. & Bosserhoff, A. K (2007). Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) expression is a potential novel prognostic marker for recurrence in patients with primary melanoma. *Cancer Biomarkers*, 3(2), 111-117.
- Rous, P. (1910). An experimental comparison of transplanted tumor and a transplanted normal tissue capable of growth. *The Journal of experimental medicine*, 12(3), 344-366.
- Rous, P. (1911). The relations of embryonic tissue and tumor in mixed grafts. *The Journal of experimental medicine*, 13(2), 239-247.
- Sagy, N., Slovin, S., Allalouf, M., Pour, M., Savyon, G., Boxman, J. & Nachman, I. (2019). Prediction and control of symmetry breaking in embryoid bodies by environment and signal integration. *Development*, 146(20), dev181917.
- Saxén, L. (1987). *Organogenesis of the Kidney* (Vol. 19). Cambridge University Press.
- Schepers, A. G., Snippert, H. J., Stange, D. E., van den Born, M., van Es, J. H., van de Wetering, M. & Clevers, H. (2012). Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science*, 337(6095), 730-735.
- Schier, A. F. (2003). Nodal signaling in vertebrate development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 589-621.
- Schier, A. F. & Shen, M. M. (2000). Nodal signalling in vertebrate development. *Nature*. 403, 385-9.
- Schökrup, S., Hu, J., Moughon, D. L., Liu, P., Lin, L. C., Hermann, K., Mangul, S., Guan, W., Pellegrini, M., Xu, H. & Wu, L. (2016). CRISPR-mediated VHL knockout generates an improved model for metastatic renal cell carcinoma. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.
- Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. A. & Benvenisty, N. (2000). Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 11307-12.
- Shi Y. & Massagué J. (2003). Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113:685-700.

BIBLIOGRAFÍA

- Shi, Q., Zhong, Y. S., Ren, Z., Li, Q. L., Zhou, P. H., Xu, M. D. & Yao, L. Q. (2011). Analysis of the role of the BMP7-Smad4-Id2 signaling pathway in SW480 colorectal carcinoma cells. *Molecular Medicine Reports*, 4(4), 627-631.
- Shimazui, T., Girolodi, L. A., Bringuier, P. P., Oosterwijk, E., & Schalken, J. A. (1996). Complex cadherin expression in renal cell carcinoma. *Cancer research*, 56(14), 3234-3237.
- Shinojima, T., Oya, M., Takayanagi, A., Mizuno, R., Shimizu, N. & Murai, M. (2007). Renal cancer cells lacking hypoxia inducible factor (HIF)-1 α expression maintain vascular endothelial growth factor expression through HIF-2 α . *Carcinogenesis*, 28(3), 529-536.
- Shparberg, R. A., Glover, H. J. & Morris, M. B. (2019). Modeling mammalian commitment to the neural lineage using embryos and embryonic stem cells. *Frontiers in physiology*, 10, 705.
- Singla, M., Kumar, A., Bal, A., Sarkar, S. & Bhattacharyya, S. (2018). Epithelial to mesenchymal transition induces stem cell like phenotype in renal cell carcinoma cells. *Cancer cell international*, 18(1), 57.
- Sjölund, J., Boström, A. K., Lindgren, D., Manna, S., Moustakas, A., Ljungberg, B., Johansson, M., Fredlund, E. & Axelson, H. (2011). The notch and TGF- β signaling pathways contribute to the aggressiveness of clear cell renal cell carcinoma. *PloS one*, 6(8), e23057.
- Sladitschek, H. L. & Neveu, P. A. (2017). Integrated experimental and theoretical studies of stem cells. *Current stem cell reports*, 3(3), 248-252.
- Smith A. G. (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annual review of cell and developmental biology*. 17:435-462
- Soares M.L., Haraguchi S., Torres-Padilla M.E., Kalmar T., Carpenter L., Bell G., Morrison A., Ring C.J., Clarke N.J., Glover D.M., & Zernicka-Goetz, M. (2005). Functional studies of signaling pathways in peri-implantation development of the mouse embryo by RNAi. *BMC Dev Biol* 5, 28.
- Sobin L.H. & Wittekind C. (eds) (2002). *TNM classification of malignant tumours*. Wiley-Liss, New York.
- Soto, D. A., Navarro, M., Zheng, C., Halstead, M. M., Zhou, C., Gultinan, C., Wu, J. & Ross, P. J. (2021). Simplification of culture conditions and feeder-free expansion of bovine embryonic stem cells. *Scientific reports*, 11(1), 1-15.
- Sousa-Nunes, R., Rana, A. A., Kettleborough, R., Brickman, J. M., Clements, M., Forrest, A., Grimmond, S., Avner, P., Smith, J., Dunwoodie, S. & Beddington, R. S. (2003). Characterizing embryonic gene expression patterns in the mouse using nonredundant sequence-based selection. *Genome research*, 13(12), 2609-2620.
- Subramanian, K., Geraerts, M., Pauwelyn, K. A., Park, Y., Owens, D. J., Muijtjens, M., Ulloa-Montoya, F., Jiang, Y., Verfaillie Catherine M. & Hu, W. S. (2010). Isolation procedure and characterization of multipotent adult progenitor cells from rat bone marrow. In *Cellular Programming and Reprogramming* (pp. 55-78). Humana Press
- Svensson, P., Williams, C., Lundeberg, J., Rydén, P., Bergqvist, I. & Edlund, H. (2007). Gene array identification of *Ip1/Pdx1*-regulated genes in pancreatic progenitor cells. *BMC developmental biology*, 7(1), 1-12.

BIBLIOGRAFÍA

- Tada, S., Era, T., Furusawa, C., Sakurai, H., Nishikawa, S., Kinoshita, M., Nakao, K. & Chiba, T. (2005). Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture. *Development* 132, 4363-74.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. & Harris, A. L. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *The American journal of pathology*, 157(2), 411-421.
- Tam, P. PL. & Loebel, D. AF. (2007). Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nature Reviews Genetics*.8:368–381.
- Tamplin, O. J., Kinzel, D., Cox, B. J., Bell, C. E., Rossant, J. & Lickert, H. (2008). Microarray analysis of *Foxa2* mutant mouse embryos reveals novel gene expression and inductive roles for the gastrula organizer and its derivatives. *BMC genomics*, 9(1), 1-19.
- Tamplin, O. J., Cox, B. J. & Rossant, J. (2011). Integrated microarray and ChIP analysis identifies multiple *Foxa2* dependent target genes in the notochord. *Developmental biology*, 360(2), 415-425.
- Tang, X. R., Li, Y. Q., Liang, S. B., Jiang, W., Liu, F., Ge, W. X., Tang, L., Mao, Y., He, Q., Yang, X., Zhang, Y., Wen, X., Zhang, J., Wang, Y., Zhang, P., Sun, Y., Yun, J., Zeng, J., Li, L., Liu, L., Liu, N. & Ma, J. (2018). Development and validation of a gene expression-based signature to predict distant metastasis in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: a retrospective, multicentre, cohort study. *The Lancet Oncology*, 19(3), 382-393.
- Thoenes, W., Störkel, S., Rumpelt, H. J. & Jacobi, G. H. (1986). Renal cell carcinoma--a classification based on cytomorphological criteria. *Zentralblatt für Allgemeine Pathologie u. Pathologische Anatomie*, 132(5-6), 503-513.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-7.
- Tretbar, S., Krausbeck, P., Müller, A., Friedrich, M., Vaxevanis, C., Bukur, J., Jasinski-Bergner, S. & Seliger, B. (2019). TGF- β inducible epithelial-to-mesenchymal transition in renal cell carcinoma. *Oncotarget*, 10(15), 1507–1524.
- Tsujimura, T., Idei, M., Yoshikawa, M., Takase, O. & Hishikawa, K. (2016). Roles and regulation of bone morphogenetic protein-7 in kidney development and diseases. *World journal of stem cells*, 8(9), 288–296.
- Tun, H. W., Marlow, L. A., Von Roemeling, C. A., Cooper, S. J., Kreinest, P., Wu, K., Luxon, B., Sinha, M., Anastasiadis, P. & Copland, J. A. (2010). Pathway signature and cellular differentiation in clear cell renal cell carcinoma. *PloS one*, 5(5), e10696.
- Ulmer, B., Tingler, M., Kurz, S., Maerker, M., Andre, P., Mönch, D., Campione, M., Deißler, K., Lewandoski, M., Thumberger, T., Schweickert, A., Fainsod, A., Steinbeißer, H. & Blum, M. (2017). A novel role of the organizer gene *Goosecoid* as an inhibitor of Wnt/PCP-mediated convergent extension in *Xenopus* and mouse. *Scientific reports*, 7(1), 1-17.

BIBLIOGRAFÍA

- Um, S., Ha, J., Choi, S. J., Oh, W. & Jin, H. J. (2020). Prospects for the therapeutic development of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 12(12), 1511.
- Umbas, R., Isaacs, W. B., Bringuier, P. P., Schaafsma, H. E., Karthaus, H. F., Oosterhof, G. O., Frans M. J. Debruyne & Schalken, J. A. (1994). Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer research*, 54(14), 3929-3933.
- Valent, P., Bonnet, D., De Maria, R., Lapidot, T., Copland, M., Melo, J. V., Chomienne, C., Ishikawa, F., Schuringa, J.J., Stassi, G., Huntly, B., Herrmann, H., Soulier, J., Roesch, A., Schuurhuis, G., J., Wöhrer, S., Arock, M., Zuber, J., Cerny-Reiterer, S., Johnsen, H. E., Andreeff, M. & Eaves, C. (2012). Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature Reviews Cancer*, 12(11), 767-775.
- Valente, M. J., Henrique, R., Costa, V. L., Jerónimo, C., Carvalho, F., Bastos, M. L., Bastos, M.L., Guedes de Pinho, P. & Carvalho, M. (2011). A rapid and simple procedure for the establishment of human normal and cancer renal primary cell cultures from surgical specimens. *PloS one*, 6(5), e19337.
- Vallier, L., Alexander, M. & Pedersen, R. A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 118, 4495-509.
- Vesque, C., Anselme, I., Couvé, E., Charnay, P. & Schneider-Maunoury, S. (2006). Cloning of vertebrate Protogenin (Prtg) and comparative expression analysis during axis elongation. *Developmental dynamics*, 235(10), 2836-2844.
- Vignjevic, D., Schoumacher, M., Gavert, N., Janssen, K. P., Jih, G., Laé, M., Louvard, D., Ben-Ze'ev, A. & Robine, S. (2007). Fascin, a novel target of β -catenin-TCF signaling, is expressed at the invasive front of human colon cancer. *Cancer research*, 67(14), 6844-6853.
- Virchow, R. (1858). *Cellular Pathology as based upon physiological and pathological histology*. London: John Churchill; 1860.
- Wan Kamarul Zaman, W. S., Nurul, A. A. & Nordin, F. (2021). Stem Cells and Cancer Stem Cells: The Jekyll and Hyde Scenario and Their Implications in Stem Cell Therapy. *Biomedicines*, 9(9), 1245.
- Wang, Q., Hu, B., Hu, X., Kim, H., Squatrito, M., Scarpace, L., de Carvalho, A., Lyu, S., Li, P., Li, Y., Barthel, F., Cho, H., Lin, Y., Satani, N., Martinez-Ledesma, E., Zheng, S., Chang, E., Sauve, C. & Verhaak, R. G. (2017). Tumor evolution of glioma-intrinsic gene expression subtypes associates with immunological changes in the microenvironment. *Cancer cell*, 32(1), 42-56.
- Whitman, M. (2001). Nodal signaling in early vertebrate embryos: themes and variations. *Dev Cell* 1, 605-17.
- Wierzbicki, P. M., Klacz, J., Kotulak-Chrzaszcz, A., Wronska, A., Stanislawowski, M., Rybarczyk, A., Ludziejewska, A., Kmiec, Z. & Matuszewski, M. (2019). Prognostic significance of VHL, HIF1A, HIF2A, VEGFA and p53 expression in patients with clear-cell renal cell carcinoma treated with sunitinib as first-line treatment. *International journal of oncology*, 55(2), 371-390.
- Willems, E., Mateizel, I., Kemp, C., Cauffman, G., Sermon, K. & Leyns, L. (2004). Selection of reference genes in mouse embryos and in differentiating human and mouse ES cells. *International Journal of Developmental Biology*, 50(7), 627-635.

BIBLIOGRAFÍA

- Willems, E. & Leyns, L. (2008). Patterning of mouse embryonic stem cell-derived pan-mesoderm by Activin A/Nodal and Bmp4 signaling requires Fibroblast Growth Factor activity. *Differentiation*, 76:745–759
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A. & Hogan, B. L. (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes & development*, 9(17), 2105-2116.
- Winslow, T. (2001). *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*
- Wohlrab, C., Kuiper, C., Vissers, M. C., Phillips, E., Robinson, B. A. & Dachs, G. U. (2019). Ascorbate modulates the hypoxic pathway by increasing intracellular activity of the HIF hydroxylases in renal cell carcinoma cells. *Hypoxia*, 7, 17.
- Wood, H. B. & Episkopou, V. (1999). Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. *Mechanisms of development*, 86(1-2), 197-201.
- Xu, X. Q., Soo, S. Y., Sun, W. & Zweigerdt, R. (2009). Global expression profile of highly enriched cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Stem cells*, 27(9), 2163-2174.
- Xu, G., Tang, S., Yang, J., Chen, K., Kang, J., Zhao, G., Feng F, Yang X, Zhao L, Lu Q, Sun L, Hong L, Gong T & Zhang, H. (2013). BMP7 expression in esophageal squamous cell carcinoma and its potential role in modulating metastasis. *Digestive diseases and sciences*, 58(7), 1871-1879.
- Yanagita, M. (2005). BMP antagonists: their roles in development and involvement in pathophysiology. *Cytokine & growth factor reviews*, 16(3), 309-317.
- Yang, Y., Liu, B., Xu, J., Wang, J., Wu, J., Shi, C., Xu, Y., Dong, J., Wang, C., Wifeng, L., Zhu, J., Xiong, L., Zhu, D., Li, X., Yang, W., Yamauchi, T., Sugawara, A., Li, Z., Sun, F., Li, X., Li, C., He, A., Du, Y., Wang, T., Zhao, C., Li, H., Chi, X., Zhang, H., Liu, Y., Li, C., Duo, S., Yin, M., Shen, H., Izpisua B., J.C. & Deng, H. (2017). Derivation of pluripotent stem cells with in vivo embryonic and extraembryonic potency. *Cell*, 169(2), 243-257.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13(1), 1-11.
- Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I. and Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281-92.
- Zeisberg, M., Hanai, J. I., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F. & Kalluri, R. (2003). BMP-7-7 counteracts TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nature medicine*, 9(7), 964.
- Zhang, Y. E. (2017). Non-Smad signaling pathways of the TGF- β family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(2), a022129.
- Zhao, H. & Choi, K. (2019). Single cell transcriptome dynamics from pluripotency to FLK1+ mesoderm. *Development*, 146(23), dev182097.

BIBLIOGRAFÍA

Zhou, H., Hammonds Jr, R. G., Findlay, D. M., Martin, T. J. & Ng, K. W. (1993). Differential effects of transforming growth factor- β 1 and bone morphogenetic protein 4 on gene expression and differentiated function of preosteoblasts. *Journal of cellular physiology*, 155(1), 112-119.

Zhu, G., Pei, L., Yin, H., Lin, F., Li, X., Zhu, X., He, W. & Gou, X. (2019). Rothhammer et al., 2007; *Oncology letters*, 18(5), 5235-5242.

Zieba, J., Ksiazkiewicz, M., Janik, K., Banaszczyk, M., Peciak, J., Piaskowski, S., Lipinski M, Olczak M., Stoczynska-Fidelus E. & Rieske, P. (2015). Sensitivity of neoplastic cells to senescence unveiled under standard cell culture conditions. *Anticancer Research*, 35(5), 2759-2768.