



Vol. 72 • Núm. 2
Marzo-Abril • 2018
pp 77-83

Recibido: 22/02/2018
Aceptado: 30/04/2018

Artículo de investigación

Detección de células madre mesenquimales de origen urinario mediante espectroscopia de impedancia

Jesús Gabriel Silva-Escobedo,* Margarita Nora González-Ruiz,†
Rodolfo Mario Orihuela-Servín,§ Lucio Bahena-Carrera||

* Tte. Q. B. y Dr. en C. Centro Militar de Ciencias de la Salud. Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Secretaría de la Defensa Nacional. Lomas de Sotelo, Ciudad de México.

† Tte. Q. B. y M. en C. Centro Militar de Ciencias de la Salud. Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Secretaría de la Defensa Nacional. Lomas de Sotelo, Ciudad de México.

§ Tte. Col. M. C. Servicio de Nefrología. Hospital Central Militar. Lomas de Sotelo, Ciudad de México.

|| Myr. M. C. Servicio de Nefrología. Hospital Central Militar. Lomas de Sotelo, Ciudad de México.

RESUMEN

Introducción: La medicina regenerativa es una rama de la medicina relacionada con el empleo de células madre (CM) para aprovechar su capacidad para reemplazar o regenerar células, tejidos u órganos, para restaurar una función dañada por alguna causa, incluyendo defectos congénitos, trauma y envejecimiento. Las técnicas de obtención, aislamiento e inmunotipificación (como son la citometría de flujo, pruebas de inmunofluorescencia y microscopia de fluorescencia, así como técnicas de biología molecular) actualmente requieren infraestructura y personal especializado, además de ser costosas y de difícil acceso. **Objetivo:** Proponer y evaluar una técnica para la detección y aislamiento de células madre en muestras de orina mediante el empleo de un biosensor, con el uso de espectroscopia de impedancia asistida con nanosondas. **Material y métodos:** Las células obtenidas fueron cultivadas y luego marcadas con nanosondas específicas para marcadores de células madre indiferenciadas de origen mesenquimal. **Resultados:** Los resultados iniciales de la espectroscopia de impedancia eléctrica, donde se compararon células sin marcaje con nanosondas y células marcadas con nanosondas, no son concluyentes; sin embargo, tienen una tendencia a mostrar algunas diferencias entre ambas condiciones. Además, se realizaron análisis de microscopia de fluorescencia y multifotónica para corroborar la presencia de células madre mesenquimales.

Palabras clave: Célula madre, orina, medicina regenerativa, terapia celular.

Detection of mesenchymal stem cells of urinary origin using impedance spectroscopy

ABSTRACT

Introduction: Regenerative medicine is a branch of medicine related to the use of stem cells (SC) to take advantage of their capacity to replace or regenerate cells, tissues or organs to restore a function damaged by some cause, including congenital defects, trauma and aging. The techniques for obtaining, isolating and immunotyping (such as flow cytometry, immunofluorescence and fluorescence microscopy tests, as well as molecular biology techniques) currently require specialized infrastructure and personnel, and they are expensive and difficult to access. **Objective:** To propose and evaluate a technique for the detection and isolation of stem cells in urine samples by using a biosensor with impedance spectroscopy assisted by nanoprobe. **Material and methods:** The cells obtained were cultured and then labeled with specific nanoprobe for markers of undifferentiated stem cells of mesenchymal origin. **Results:** The initial results of electrical impedance spectroscopy, where cells without labeling were compared with cells labeled with nanoprobe, are inconclusive; however, they tend to show some differences between both conditions. Additionally, fluorescence and multiphoton microscopy analysis were carried out, as well as flow cytometry, to corroborate the presence of mesenchymal stem cells.

Key words: Stem cell, urine, regenerative medicine, cell therapy.

Introducción

La medicina regenerativa es un área de la medicina moderna que se encarga de desarrollar estrategias

para permitir la recuperación de la función perdida de tejidos u órganos dañados, sustituir o regenerar células, proporcionando elementos necesarios para la reparación *in vivo* y/o estimulando la regeneración

del organismo. Para este fin, se emplean moléculas solubles, ingeniería genética y, en particular, células madre, células troncales o *stem cells*.¹

Las células madre (CM) tienen la capacidad de autorrenovación y diferenciación. Se clasifican de acuerdo con su potencial de diferenciación en totipotentes, pluripotentes y multipotentes. Las totipotentes son capaces de originar cualquier tipo celular proveniente de las tres capas germinativas (endodermo, mesodermo y ectodermo); en un sentido estricto, sólo los estadios iniciales del cigoto constituirían CM totipotentes. Las CM pluripotentes son capaces de originar cualquier tipo de tejido, a excepción de la placenta y las membranas ovulares; las CM propias de cada órgano son multipotentes, porque —aunque presentan diferentes grados de plasticidad— ya están comprometidas con la diferenciación celular.²

Por otra parte, los padecimientos cronicodegenerativos (como la enfermedad renal crónica —ERC—), el envejecimiento y el efecto del ambiente aceleran la reserva de células madre de los seres vivos, limitando la capacidad de regeneración celular intrínseca de los organismos.³

La enfermedad renal crónica es una de las principales causas de atención hospitalaria y representa 70% de todas las muertes. En México, la principal causa de ERC es la diabetes mellitus tipo 2, que afecta a 6.4 millones de adultos, seguida de la hipertensión arterial, que impacta a 22.4 millones, según la ENSANUT 2012.⁴

Las opciones de tratamiento de la ERC dependen de la etapa de la misma; sin embargo, en la actualidad, una de las alternativas de tratamiento es el empleo de medicina regenerativa con células madre derivadas de orina (USC), que tienen la capacidad de autorrenovación y diferenciación multipotencial. Una característica importante es que estas células no forman tumores *in vivo*. Estas células pueden aislarse mediante la orina obtenida de un individuo: una forma no invasiva, sencilla y de bajo costo. Se estima que, en teoría, es posible conseguir de cinco a ocho células por cada 100 mL de orina y se pueden generar millones de células en cultivo para utilizarse potencialmente como terapia para la reparación de tejidos.⁵⁻¹⁰ Por otro lado, existen evidencias del uso de la espectroscopia de impedancia eléctrica (EIE) como un método para la identificación de células en cultivo celular obtenidas de diferentes fuentes.

González y sus colaboradores (2004) realizaron un estudio donde propusieron el desarrollo de una nueva tecnología de invasión mínima dirigida al diagnóstico

temprano del daño isquémico de la mucosa gastrointestinal mediante espectroscopia. Los resultados indicaron que la estimación del daño isquémico con esta tecnología es viable y establecieron su potencial como una herramienta en el monitoreo del paciente críticamente enfermo y la implementación de esta tecnología en el Instituto Armado.¹¹

En otro estudio, Yang y su grupo (2007) mostraron la posibilidad de utilizar la EIE para determinar las diferencias en la caracterización de las propiedades eléctricas de diferentes líneas de células tumorales.¹²

En 2014, Silva y sus colegas evaluaron una técnica simple y no costosa que empleaba espectroscopia de impedancia asistida con nanosondas para evaluar mediciones realizadas con células de cáncer de mama en suspensión.¹³

En la actualidad, no se han encontrado reportes donde se use la espectroscopia de impedancia para la detección de células madre mesenquimales de origen urinario utilizando nanosondas, por lo que el objetivo del estudio fue proponer y evaluar una técnica para la detección y aislamiento de células madre en muestras de orina con un biosensor, empleando espectroscopia de impedancia asistida con nanosondas.

Material y métodos

a. Diseño experimental

Se colectaron 100 muestras de orina (previo consentimiento bajo información) de pacientes con nefropatía que acudieron a la consulta de nefrología y subgabinete de diálisis peritoneal del Hospital Central Militar en el periodo comprendido de abril de 2016 a diciembre de 2017. Se obtuvieron en promedio 100 mL de orina de cada paciente, la cual se depositó en tubos cónicos estériles de 50 mL.

b. Cultivo celular

Las muestras de orina fueron centrifugadas a 1,800 rpm durante 10 minutos; los sobrenadantes fueron eliminados y el sedimento fue resuspendido en *buffer* salino de fosfatos (PBS) y centrifugado una vez más; se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en un mililitro de medio de cultivo fresco. Se realizó el conteo celular, empleando el contador automático de células; la viabilidad se determinó por exclusión con azul tripano. Las células restantes se colocaron en placas de cultivo de seis pozos —aproximadamente, 100 células por pozo— con un medio combinado, que incluye: medio de queratinocitos libres de suero, con

medio de células progenitoras, en una proporción de 1:1. El medio de queratinocitos sin suero, se complementó con 5 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico, 50 ng/mL de extracto de hipófisis bovina, 30 ng/mL de toxina del cólera, 100 U/mL de penicilina y 1 mg/mL de estreptomycin; el medio de células progenitoras contenidas $\frac{3}{4}$, medio de Eagle modificado de Dulbecco, $\frac{1}{4}$ Hamm's F12, suero bovino fetal al 10%, hidrocortisona 0.4 g/mL, toxina colérica 10^{10} M, insulina 5 ng/mL, adenina 1.8×10^4 M, transferrina 5 g/mL más 2×10^9 M 3,3',5'-triyodo-L-tironina, factor de crecimiento epidérmico 10 ng/mL y 1% de penicilina-estreptomycin.¹⁴ Se realizó el seguimiento de los cultivos a los ocho, 15 y 30 días.

c. Elaboración de nanosondas y marcaje de células obtenidas de orina

Para la elaboración de las nanosondas se emplearon nanopartículas ferromagnéticas *nanoscreen* MAG/G-Ara (Chemicell, Alemania) de 100 nm recubiertas con fluorocromo color verde y sílice. Se funcionalizaron con anticuerpos monoclonales SSEA-4, CD90, CD44, CD105, CD73, CD146 (receptores de superficie de células mesenquimales indiferenciadas y multipotentes) y podocalixina (marcador de células renales). Para el efecto, se usó la técnica de acoplamiento utilizando el método de carbodiimida (protocolo A-10. Chemicell, Alemania). Las células obtenidas en los cultivos fueron analizadas por microscopia óptica para determinar sus características morfológicas, tripsinizadas y marcadas con las diferentes nanosondas para ser analizadas mediante espectroscopia de impedancia.

d. Evaluación de espectroscopia de impedancia eléctrica

Las mediciones de impedancia se realizaron emplean-

do el espectroscopio de impedancia de alta precisión (Agilent; Modelo 4294A), que aporta una señal/cos (ωt) en un rango de 100 MHz. Por su parte, el prototipo del biosensor consiste en dos electrodos de oro insertos en una superficie de cuarzo, colocados de manera que se cierre el circuito eléctrico a través de la muestra de células en las siguientes condiciones: 200,000 células marcadas con las nanosondas, 200,000 células solas y PBS. Las evaluaciones se llevaron a cabo en un rango de frecuencia de 100 Hz a 100 MHz a 181 pasos/espaciados logarítmicamente. El principio del sistema consiste en que las mediciones representan cambios de conductividad y permitividad eléctrica; lo que significa que la bioimpedancia compleja Z varía en relación con las condiciones de las células ya mencionadas (Figura 1).

e. Análisis de microscopia de fluorescencia

Para la inmunotipificación de las células obtenidas en los cultivos se marcaron 100,000 células con los diferentes anticuerpos y nanosondas SSEA-4, CD90, CD44, CD105, CD73, CD146 y podocalixina, y fueron analizadas mediante microscopia de fluorescencia (microscopio Nikon Eclipse ME600) a un aumento de 40x. Simultáneamente, se realizaron observaciones empleando el microscopio multifotón FVMPE-RS de dos canales (Olympus).

Resultados

Del total de muestras, 94 no presentaron desarrollo celular y mostraron presencia de contaminación por bacterias o levaduras. Sólo seis muestras exhibieron crecimiento celular, el cual fue registrado a los ocho, 15 y 30 días. La cantidad obtenida en promedio fue 1.4 millones de células por placa; la viabilidad promedio fue del 60% (Figura 2). Se analizaron las células consigui-

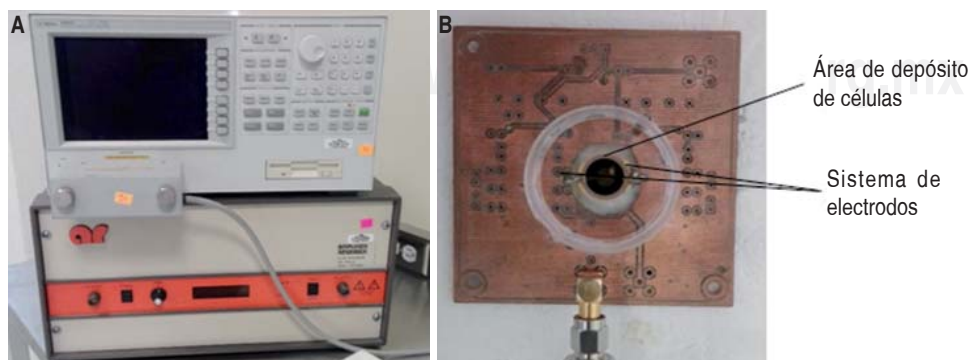


Figura 1.

Sistema de análisis de espectroscopia de impedancia eléctrica: A. espectrómetro de impedancia de alta precisión (Agilent; Modelo 4294A), B. biosensor constituido por un sistema de electrodos, una base de cuarzo y un área de depósito de células.

das mediante microscopía óptica y se pudo determinar que su morfología es similar a un grano de arroz y algunas otras con morfología de fibroblastos, como lo menciona la literatura (Figura 3). En cuanto al análisis de espectroscopia de impedancia eléctrica, se realizó el ensayo bajo tres condiciones: PBS solo como control, células sin marcar y células marcadas con nanosondas. En lo que respecta al resultado observado en el ensayo de la fase de la espectroscopia, fue posible establecer que existen diferencias estadísticamente significativas (*t* de Student, $p < 0.05$) entre las frecuencias 1.00×10^2 y 2.00×10^3 Hz cuando se comparan las células solas (sin marcar) y las células marcadas con el coctel de las diferentes nanosondas (SSEA-4, CD90, CD73, CD44 y PDXL) (Figura 4). Para confirmar la expresión de los marcadores específicos de células madre, se llevó a cabo el análisis mediante microscopía de fluorescencia y multifotónica, y de manera simultánea, el marcaje del núcleo celular empleando el colorante DAPI. Se observó que existe una baja expresión de los marcadores de superficie SSEA-4, CD44, CD73, CD146 podocalixina (PDXL) y CD90; sin embargo, sí fue posible identificar las células con estos marcadores específicos de células madre.

Por otra parte, se realizó el análisis de espectroscopia de impedancia eléctrica, el cual mostró que en la magnitud y fase fue posible establecer diferencias estadísticamente significativas (*t* de Student, $p < 0.05$) en las frecuencias de 1.0×10^6 - 1.0×10^7 Hz y 1.0×10^2 - 2.0×10^3 Hz cuando se comparan las células solas (sin marcar) y las células marcadas con el coctel de las diferentes nanosondas (SSEA-4, CD90, CD73, CD44, CD146 y PDXL, respectivamente) (Figuras 5 y 6).

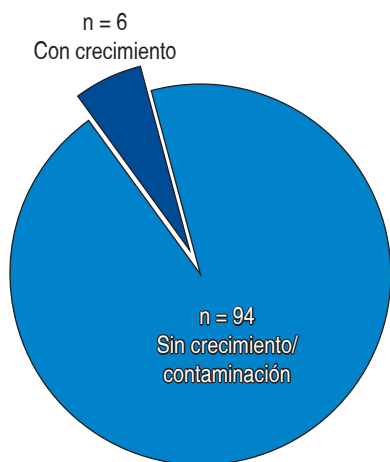


Figura 2. Resultados del desarrollo de cultivos celulares en 100 muestras de orina de individuos nefróticos.

Discusión

Se considera que la fuente de la contaminación de las muestras pudo ser el procedimiento de toma de muestra, aun cuando éste se les indicó a los pacientes; otra razón posible es que los pacientes pudieron tener algún proceso de infección asociado con la nefropatía. Respecto al cultivo celular, fue posible realizarlo empleando, en un inicio, un medio que no fue el específico; posteriormente, se usó el medio enriquecido, lo que permitió que las pocas células obtenidas de muestras de orina crecieran en el cultivo; sin embargo, se sabe que las células pueden sufrir daño al momento de su extracción y resultan ser muy

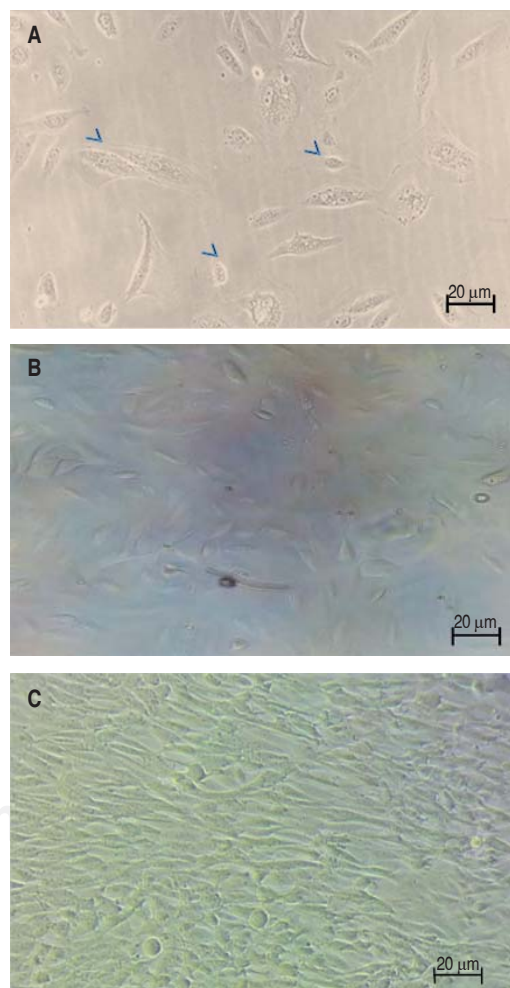


Figura 3. Microfotografías de los cultivos celulares a partir de muestras de orina: A. ocho días, B. 15 días, C. 30 días. Aumento: 40x. Campo claro (microscopio invertido Nikon Eclipse TS100).

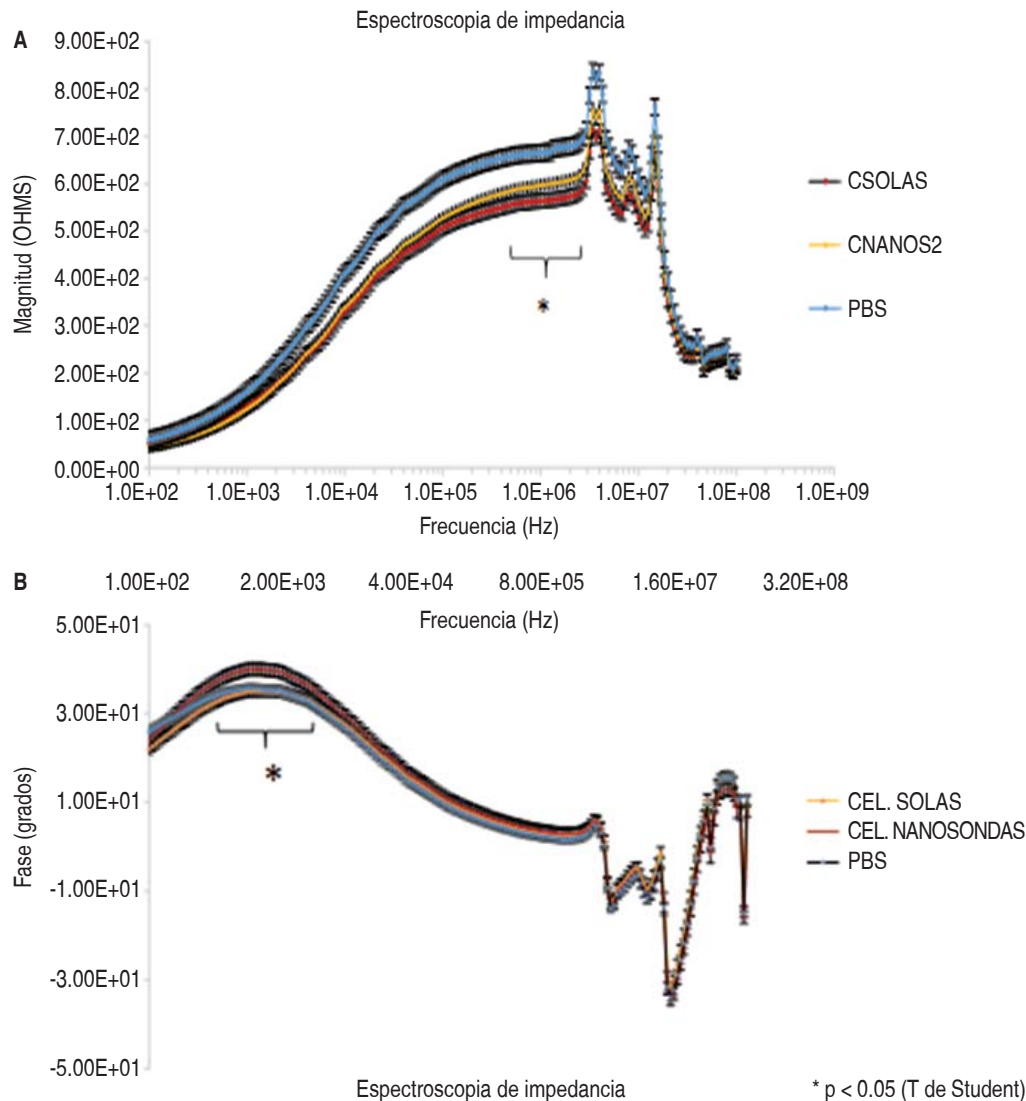


Figura 4.

Resultados de la evaluación de espectroscopia de impedancia eléctrica. Se muestran los registros multifrecuencia de magnitud y fase.

sensibles a la manipulación.

Se realizó el análisis morfológico de las células obtenidas, pero éstas fueron escasas; además, se presentó otro tipo de células en el cultivo, las cuales podrían ser células madre, pero ya en un estado de diferenciación, por lo que la expresión de los marcadores se pudo haber visto modificada. Sin embargo, se pudo demostrar que sí hay existencia de células madre. Los resultados generados por microscopia permitieron evidenciar que las células obtenidas en los cultivos muestran positividad leve en la expresión de los marcadores de células madre mesenquimales indiferenciadas. A pesar de ello, hace falta mejorar la técnica de marcaje con los anticuerpos y las nanosondas, así como la utilización de células como

controles positivo y negativo, además de realizar más ensayos para tener la certeza de la positividad exhibida por las células obtenidas.

Se pudo evidenciar de manera inicial la factibilidad de emplear la espectroscopia de impedancia para detectar y aislar células de origen renal marcadas con nanosondas, ya que hubo ciertos rangos de frecuencia donde se detectaron diferencias en la fase y la magnitud del ensayo. Sin embargo, al ser un estudio inicial, falta realizar más repeticiones y ver la reproducibilidad de la técnica.

Conclusiones

La técnica de obtención de células madre de mues-

tras de orina resultó ser complicada debido al alto porcentaje de contaminación y de nulo crecimiento de células en la mayoría de las muestras conseguidas. La morfología celular sugiere la presencia de células de tipo mesenquimal, pero en baja proporción, y expresan

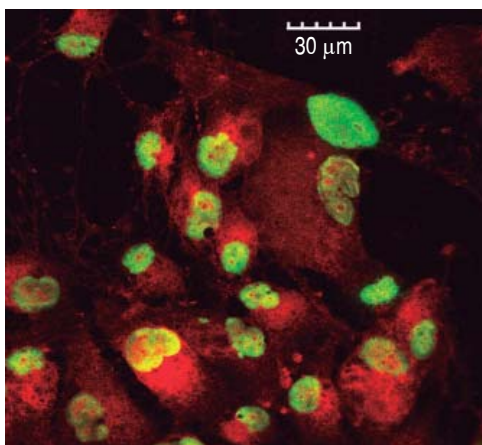


Figura 5. Microfotografía de células obtenidas de muestras de orina marcadas con el anticuerpo monoclonal anti-SSEA-4 FITC. Marcaje de núcleos con DAPI. Aumento: 25x (microscopio multifotónico).

en bajo porcentaje los marcadores específicos para células mesenquimales indiferenciadas y multipotentes. El resto de las células podrían ser diferenciadas y con una mortalidad importante. Las mediciones de EIE evidenciaron en ciertas longitudes de onda diferencia entre las condiciones de células solas y células marcadas con las nanosondas, lo que permite asumir de manera inicial la presencia de células que fueron reconocidas por los anticuerpos específicos de este tipo de células. Se recomienda optimizar la técnica de obtención de muestras y realizar más estudios de espectroscopia de impedancia para corroborar los resultados preliminares de este trabajo, con el objeto adicional de validar la técnica.

Agradecimientos

Agradecemos al alto mando y al Centro de Investigación y Desarrollo del Ejército y Fuerza Aérea (CIDEFAM) por apoyar el proyecto a través de los recursos asignados por el programa A022-2015. «Investigación y desarrollo militar en coordinación con universidades públicas, instituciones públicas de educación superior y/o demás centros públicos de investigación».

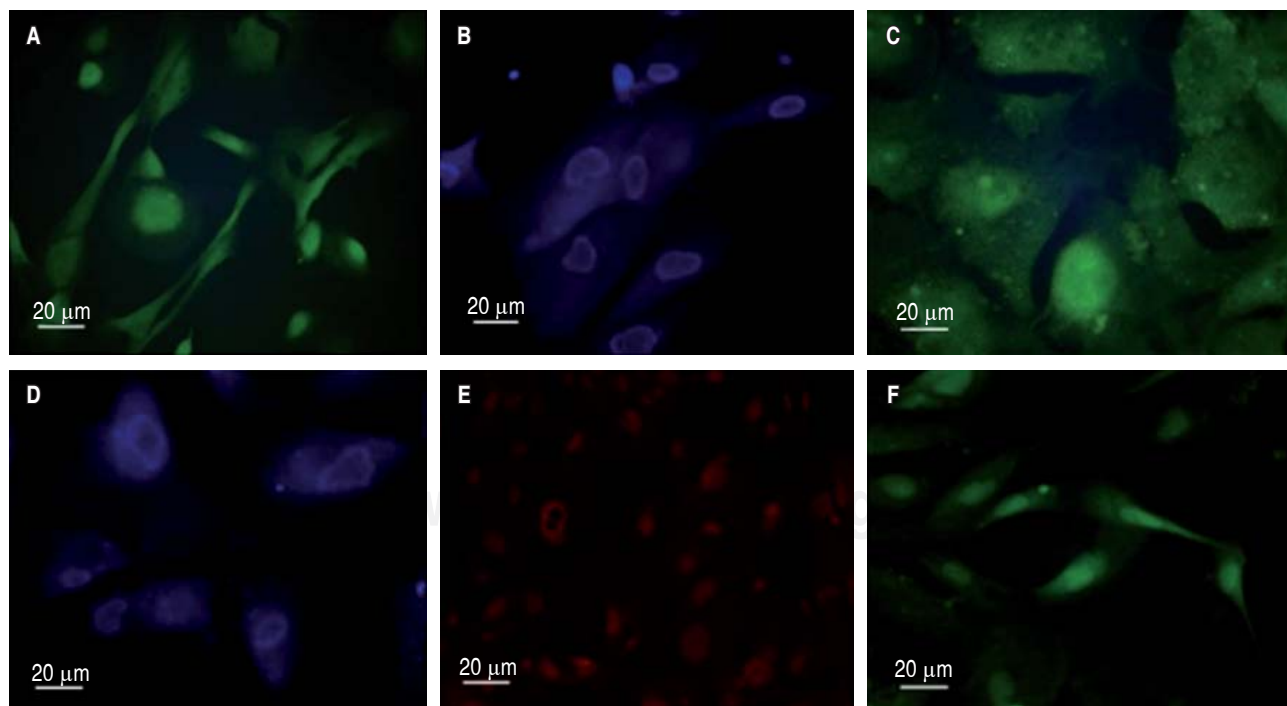


Figura 6. Microfotografías obtenidas en microscopio de epifluorescencia, donde se muestran los resultados de la fluorescencia de los marcadores de superficie relacionados con el fenotipo de células madre multipotenciales obtenidas de orina. A. CD44, B. podocalixina, C. CD73, D. CD90, E. SSEA-4 y F. CD146.

REFERENCIAS

- Greenwood HL, Singer PA, Downey GP, Martin DK, Thorsteinsdóttir H, Daar AS. Regenerative medicine and the developing world. *PLoS Med*. 2006; 3 (9): e381.
- Grenier G, Rudnicki MA. *Stem cells*. Springer (NY): Wobus A and Boheler K editors; 2006.
- Células madre vs. insuficiencia renal crónica. [Consultada el 31 de diciembre de 2017] Disponible en: http://www.celulasmadre.org.mx/page_id11/
- Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. [Consultada el 20 de julio de 2016] Disponible en: http://ensanut.insp.mx/doctos/FactSheet_ResultadosNacionales14Nov.pdf
- Espinosa-Cuevas MA. Enfermedad renal. *Gac Med Mex*. 2016; 152 Suppl 1: 90-96.
- Bodin A, Bharadwaj S, Wu S, Gatenholm P, Atala A, Zhang Y. Tissue-engineered conduit using urine-derived stem cells seeded bacterial cellulose polymer in urinary reconstruction and diversion. *Biomaterials*. 2010; 31 (34): 8889-8901.
- Wu S, Liu Y, Bharadwaj S, Atala A, Zhang Y. Human urine-derived stem cells seeded in a modified 3D porous small intestinal submucosa scaffold for urethral tissue engineering. *Biomaterials*. 2011; 32 (5): 1317-1326.
- Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, Markert C, Andersson KE, Atala A et al. Characterization of urine-derived stem cells obtained from upper urinary tract for use in cell-based urological tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2011; 17 (15-16): 2123-2132.
- Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, Wu R, Yang B, He T et al. Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology. *Stem Cells*. 2013; 31 (9): 1840-1856.
- Zhang YY, Ludwikowski B, Hurst R, Frey P. Expansion and long-term culture of differentiated normal rat urothelial cells *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2001; 37 (7): 419-429.
- González-Díaz CA, Cleva Villanueva-López G, Takao Kaneko-Wada FJ, Sacristán-Rock E. Análisis biomédico de la espectroscopia de impedancia: Una nueva herramienta en cuidado crítico. *Rev Sanid Milit Mex*. 2004; 58 (5): 404-410.
- Han A, Yang L, Frazier AB. Quantification of the heterogeneity in breast cancer cell lines using whole-cell impedance spectroscopy. *Clin Cancer Res*. 2007; 13 (1): 139-143.
- Silva JG, Cárdenas RA, Quiróz AR, Sánchez V, Lozano LM, Pérez NM et al. Impedance spectroscopy assisted by magnetic nanoparticles as a potential biosensor principle for breast cancer cells in suspension. *Physiol Meas*. 2014; 35 (6): 931-941.
- Zhang YY, Frey P. Growth of cultured human urothelial cells into stratified urothelial sheet suitable for autografts. *Adv Exp Med Biol*. 2003; 539 (Pt B): 907-920.

Dirección para correspondencia:

Tte. Q. B. y Dr. en C. Jesús Gabriel Silva-Escobedo

E-mail: gabrielsilva173@gmail.com