

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

INSTITUTO DE BIOINGENIERÍA



“VALORACIÓN DE PROTOCOLOS DE DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS DE RATÓN HACIA ENDODERMO PANCREÁTICO MEDIANTE EL ANÁLISIS DE POBLACIONES CELULARES QUE EXPRESAN MARCADORES CARACTERÍSTICOS”

Memoria de Tesis Doctoral para optar al grado de
Doctor en Biología.

Presentada por:

Néstor Vicente Salar

Licenciado en Biología

Diplomado en Nutrición Humana

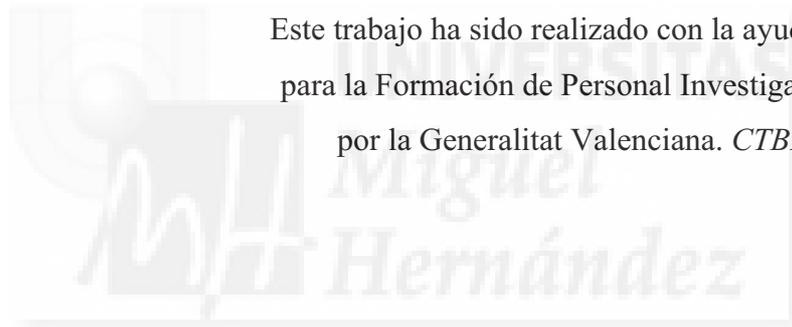
Directores de Tesis:

Juan Antonio Reig Maciá

Enrique Roche Collado

Alfredo Santana Rodríguez

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda de una beca
para la Formación de Personal Investigador concedida
por la Generalitat Valenciana. *CTBPRB/2004/309*



Durante el periodo de disfrute de la beca de formación se han publicado los siguientes trabajos:

ARTÍCULOS PUBLICADOS.

“Isolation and characterization of residual undifferentiated mouse embryonic stem cells from embryoid body cultures by fluorescence tracking”. Roberto Enseñat-Waser, Alfredo Santana, **Nestor Vicente-Salar**, Juan Cigudosa, Enrique Roche, Bernat Soria and Juan Reig. IN VITRO CELLULAR AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY – ANIMAL 42:115-123 (2006)

REVISIONES PUBLICADAS.

“Culture, maintenance and control of mouse embryonic stem cells”. **Vicente-Salar, N.** AVANCES EN DIABETOLOGÍA 24(2): 123-127 (2008)

“From stem cells to insulin-producing cells: towards a bioartificial endocrine pancreas”. Roche, E.; Santana, A.; **Vicente-Salar, N.**; Reig, J.A. PANMINERVA MED. 47:39-71 (2005)

CAPITULOS DE LIBRO.

“Cell Differentiation: Therapeutical Challenges in Diabetes”. Enrique Roche, **Néstor Vicente-Salar**, Maribel Arribas and Beatriz Paredes. Progress in Stem Cell Application, pp. 209-233. Nova Science Publishers Inc.(2008)

“Insulin-producing cells from embryonic stem cells. Experimental considerations”. Enrique Roche, Roberto Enseñat-Waser, **Néstor Vicente-Salar**, Alfredo Santana, Martin Zenke, Juan Antonio Reig. Methods in Molecular Biology, vol. 407: Stem Cells Assays (2007)

CONGRESOS.

XX Congreso de la Sociedad Española de Diabetes. Tenerife, España (2009). Póster: “Liberación artefactual de insulina en células madre embrionarias diferenciadas in vitro hacia linajes endodérmicos”. N. Vicente- Salar; E. Roche Collado; J. A. Reig Maciá.

XXII International congress of The Transplantation Society. Sidney, Australia. (2008). Póster: “Protein transduction technology for stem cell reprogramming: a novel strategy to obtain insulin-producing cells”. M. Ramírez-Dominguez, **N. Vicente-Salar**, A. Santana, J. Domínguez-Bendala, L. Inverardi, C. Ricordi, K. Hmadcha, B. Soria, E. Roche.

FEBS/EMBO-workshop, “Programming pancreatic beta-cells”. El Perelló, Tarragona, España. (2006). Póster: “Processing embryonic stem cells to obtain insulin-producing cells”. **Vicente-Salar, N.**; Santana, A.; Arribas, M.; Paredes, B.; Fuster, E.; Roche, E.; Reig, J.A.

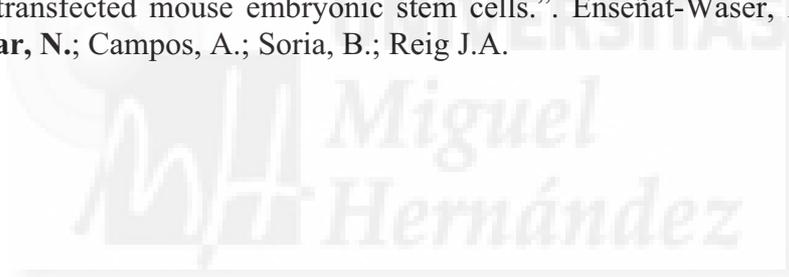
XXIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Elche, España. (2006). Póster: “Optimización de la obtención de endodermo definitivo mediante diferenciación dirigida de células madre embrionarias de ratón”. **Vicente-Salar, N.**; Santana, A.; Paredes, B.; Arribas, M.; Fuster, E.; Roche, E.; Reig, J.A.

XVIII Congreso de la SED. Madrid, España. (2006). Comunicación oral: “Obtención de células productoras de insulina a partir de células madre embrionarias de ratón comprometidas a endodermo”. Roche, E.; **Vicente-Salar, N.**; Paredes, B.; Arribas, M.; Reig, J.A.

XVII Congreso Svedyn. Orihuela, Alicante, España. (2005). Póster: “Diferenciación espontánea y dirigida in vitro de células embrionarias de ratón”. Roche, E.; Arribas, M.; **Vicente-Salar, N.**, Santana, A.; Paredes, B.; Reig, J.A.

XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Zaragoza, España. (2005). Póster: “Diferenciación espontánea y dirigida de células embrionarias de ratón en cultivos in vitro”. **Vicente-Salar, N.**; Santana, A.; Paredes, B.; Arribas, M.; Fuster, E.; Roche, E.; Reig, J.A.

International Society for Stem Cell Research. ISSCR 2004. Second Annual International Meeting. Boston, MA, USA. (2004). Póster: “Characterization of a fraction of presumed residual undifferentiated cells after embryoid body culture of Oct4-eGFP transfected mouse embryonic stem cells.”. Enseñat-Waser, R.; Fuster, E.; **Vicente-Salar, N.**; Campos, A.; Soria, B.; Reig J.A.





ÍNDICE

	Pag.
0. ABREVIATURAS	6
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 <u>CÉLULAS MADRE</u>	11
1.1.1. TIPOS DE CÉLULAS MADRE SEGÚN SU POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN.	12
1.1.2. CLASIFICACIÓN SEGÚN SU ORIGEN.	13
1.1.3. CONCEPTO DE NICHO CELULAR EN RELACIÓN CON LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS MADRE	15
1.2 <u>FACTORES MOLECULARES IMPLICADOS EN LA PLURIPOTENCIALIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS.</u>	17
1.2.1. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.	17
1.2.1.1. Oct 3/4	17
1.2.1.2. Nanog	18
1.2.1.3. Sox2	20
1.2.2. FACTORES EXTRACELULARES Y SUS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN.	21
1.2.2.1. LIF y la ruta JAK/STAT3	21
1.2.2.2. Vía canónica WNT	23
1.2.2.3. La familia TGFβ	25
1.2.2.4. El factor bFGF	26
1.3 <u>TERAPIA CELULAR.</u>	28
1.3.1. CONCEPTOS BÁSICOS	28
1.3.2. CÉLULAS MADRE Y DIABETES.	29
1.4 <u>DESARROLLO EMBRIONARIO DEL RATÓN. ENDODERMO DEFINITIVO Y PÁNCREAS.</u>	32
1.4.1. DESARROLLO DEL ENDODERMO DEFINITIVO EN RATÓN.	32
1.4.2. DESARROLLO DEL PÁNCREAS DE RATÓN.	35
1.4.3. DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA CÉLULA ALFA Y BETA PANCREÁTICAS.	38
1.4.3.1. Célula alfa	38
1.4.3.2. Célula beta	40
1.5 <u>MÉTODOS DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE HACIA ENDODERMO DEFINITIVO O CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA.</u>	43
1.5.1. PROTOCOLOS PARA LA OBTENCIÓN DE ENDODERMO DEFINITIVO A PARTIR DE LAS ESC.	44
1.5.2. PROTOCOLOS PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA A PARTIR DE LAS ESC.	47

	Pag.
1.5.2.1. Obtención de células productoras de insulina a partir de ESC de ratón.	47
1.5.2.2. Obtención de células productoras de insulina a partir de ESC humanas.	52
<u>1.6. CÉLULAS MADRE Y CANCER.</u>	55
2. OBJETIVOS	57
2.1 OBJETIVO GENERAL.	58
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	58
3. MATERIALES Y MÉTODOS	59
<u>3.1 TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR.</u>	60
3.1.1. LÍNEAS CELULARES	60
3.1.2. MEDIOS DE CULTIVOS DE LAS LÍNEAS CELULARES	60
3.1.3. TRATAMIENTO DEL MATERIAL DE CULTIVO CELULAR CON GELATINA	63
3.1.4. DESCONGELACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES	64
3.1.5. TRIPSINIZACIÓN Y CONGELACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES	64
3.1.6. CONTAJE Y VIABILIDAD CELULAR	65
3.1.7. EXPANSIÓN DE LA LÍNEA COMERCIAL DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS D3	66
3.1.8. CULTIVO DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS DE RATÓN INDIFERENCIADAS	68
3.1.9. CULTIVO PRIMARIO DE TUMORES OBTENIDOS A PARTIR DE R1_Oct4_GFP	68
3.1.10. ELECTROPORACIÓN Y SELECCIÓN	69
3.1.11. PROTOCOLOS DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS	70
3.1.12. OBTENCIÓN DE MEDIO CONDICIONADO DE RUDIMENTOS PANCREÁTICOS	72
3.1.13. MICROSCOPIA.	72
<u>3.2 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.</u>	73
3.2.1. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	73
3.2.2. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE ARN TOTAL	74
3.2.3. ELECTROFORESIS DE ARN TOTAL EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES	74
3.2.4. RETROTRANSCRIPCIÓN DE LOS ARNs MENSAJEROS	75
3.2.5. DISEÑO DE CEBADORES PARA RT-PCR	75
3.2.6. RT-PCR CONVENCIONAL	76
3.2.7. RT-PCR A TIEMPO REAL	77
3.2.8. CARIOTIPADO	78
3.2.9. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN SDS-PAGE.	79
3.2.10. WESTERN BLOT DE GLUCAGÓN, GLP1 Y STAT3.	80

	Pag.
<u>3.3 INMUNOCITOQUÍMICA</u>	82
<u>3.4 TINCIONES CELULARES</u>	84
3.4.1. DETECCIÓN DE FOSFATASA ALCALINA	84
<u>3.5 ENSAYO DE SECRECIÓN Y CONTENIDO DE INSULINA MEDIANTE RADIOINMUNOENSAYO</u>	85
4. RESULTADOS	87
4.1. Evaluación de la obtención de endodermo definitivo durante la diferenciación espontánea de ESC D3.	88
4.2. Caracterización de las células que expresan preproglucagón obtenidas por diferenciación espontánea de ESC D3 a partir de CEs.	94
4.3. Caracterización de las células que expresan preproglucagón obtenidas a partir de CEs derivados de ESC de ratón mediante la utilización de métodos coaxiales.	98
4.4. Estudio de la diferenciación de ESC D3 mediante la presencia de medios condicionados obtenidos del cultivo de rudimentos pancreáticos.	105
4.5. Estudio de la ruta LIF-STAT3 en células Oct 3/4 ⁺ residuales.	112
4.6. Potencial tumorigénico de células residuales indiferenciadas.	114
4.7. Cariotipado de la línea celular obtenida del teratoma derivado de las células residuales.	117
5. DISCUSIÓN	119
5.1 La diferenciación espontánea de ESC genera células productoras de preproglucagón.	120
5.2. La diferenciación espontánea de ESC genera células que expresan preproglucagón de origen neuroectodérmico.	123
5.3. La diferenciación de ESC mediante métodos coaxiales genera células que expresan preproglucagón y co-localizan con marcadores neuroectodérmicos.	125
5.4. La diferenciación de ESC mediante medios obtenidos del cultivo de rudimentos pancreáticos origina células que expresan insulina tipo II y glucagón.	130

	Pag.
5.5. Los protocolos de diferenciación de esc utilizados mantienen una población celular residual Oct 3/4 ⁺ .	133
5.6. Caracterización de células Oct 3/4 ⁺ residuales derivadas del cultivo <i>in vitro</i> y con potencial tumorigénico.	135
6. CONCLUSIONES	139
7. BIBLIOGRAFÍA	142
8. ANEXO	169





0. ABREVIATURAS

AAT: alfa 1 antitripsina	DKK1: <i>Dickkopf homolog 1</i>
Abcc8: Casete de unión al ATP, subfamilia c, miembro 8	Dll: Gen <i>delta-like</i>
ADN: Ácido desoxirribonucleico	DMEM: <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
aFGF: Factor de crecimiento fibroblástico ácido	DMSO: Dimetilsulfóxido
AFP: Alfa fetoproteína	dNTPs: Desoxiribonucleótido fosfato
Alb1: Albúmina tipo 1	DTT: Ditioneitol
Amn: Amnionless	ECC: Células del carcinoma embrionario
Apoa2: Apolipoproteína A2	ECD: E-caderina
ARN: Ácido ribonucleico	EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
Arx: <i>Aristaless related homeobox</i>	Eed: <i>Embryonic ectoderm development</i>
βGEO: Fusión genética de la resistencia al antibiótico neomicina y el operón Lac.	EGC: Células germinales embrionarias
βME: Beta-mercaptoetanol	EGF: Factor de crecimiento epidérmico
bFGF: Factor de crecimiento fibroblástico básico	eGFP: <i>enhanced GFP</i>
BMP: <i>Bone morphogenetic protein</i>	ERK: <i>Elk-related tyrosine kinase</i>
BrdU: Bromodeoxiuridina	ESC: Células madre embrionarias
Brn4: Factor de transcripción 9 de unión al octámero	FACS: Separación celular activada por fluorescencia
Bry: Brachyury	FBS: Suero fetal bovino
BSA: Albúmina sérica bovina	FCS: Suero fetal de cabra
BTC: betacelulina	FGF: Factor de crecimiento fibroblástico
CBF1: Proteína de unión a la señal de recombinación para la región J de la Ig kappa	Flk1: Quinasa 1 del hígado fetal
Cdx2: <i>Caudal type homeo box 2</i>	Foxa2: <i>Forkhead box A2</i>
CE: Cuerpo embrionario	FoxD3: <i>Forkhead box D3</i>
Cer1: Homólogo de la proteína cerberus 1	G418: Gentamicina 418
CK: Citoqueratina	G6P: Glucosa 6 fosfatasa
CMRL: Medio de cultivo CMRL	GATA: Proteína de unión a la secuencia GATA
Cps1: Carbamoil fosfato sintetasa 1	GDF: <i>Growth differentiation factors</i>
Cxcr4: <i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>	GFAP: Proteína ácida fibrilar de la glía
Cyp7a1: Citocromo p450, familia 7, subfamilia a, polipéptido 1	GFP: Proteína verde fluorescente
DAPT: Inhibidor de la gamma-secretasa	GLP1: <i>Glucagon like peptide 1</i>
Dazl: Gen <i>deleted in azoospermia-like</i>	Glut2: Transportador facilitado tipo 2 de la glucosa
DEPC: Dietil pirocarbonato	GMEM: <i>Glasgow minimum essential médium</i>
dHGF: Factor de crecimiento hepático delecionado	gp130: Transductor de membrana de la señal de la interleucina 6
	Grb2: Factor de crecimiento de unión a proteína 2
	GRPP: <i>Glicentin-related pancreatic peptide</i>
	Gsc: Goosecoide

■ ABREVIATURAS

GSC: Células madre derivadas de la línea germinal multipotente	MafA/B: Homólogo del oncogén del fibrosarcoma musculoaponeurótico de ave
GSK-3: Quinasa de la glucogeno sintasa 3	MAP: <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Hes: <i>Hairy and enhancer of split</i>	MCI: Masa celular interna
Hex: <i>Hematopoietically expressed homeobox</i>	Mix11: <i>Mix1 homeobox-like 1</i>
HGF: Factor de crecimiento hepático	MOPS: Ácido 3(N-morfolino)propanosulfónico
Hhex: <i>Hematopoietically expressed homeobox</i>	MTG: <i>1-Thioglycerol</i>
Hlxb9: Factor de transcripción con caja homeótica del pancreas y motoneurona	NEAAs: Aminoácidos no esenciales
Hnf: Factores nucleares hepáticos	Nef 200: Neurofilamento 200 o pesado
H.R.: Recombinación homóloga	NFκB: <i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
IAPP: Polipéptido amiloide del islote	Ngn3: Neurogenina 3
IF: Inmunofluorescencia	Nkx: Factor de transcripción NK
IH: Inmunohistoquímica	Oct 3/4: <i>Octamer binding transcription factor 3/4</i>
IFABP: Proteína que une ácidos grasos del intestino	P48: Acil CoA-tioesterasa
IGF: Factor de crecimiento insulínico	p53: proteína 53
IL: Interleucina	PAH: Fenilalanina hidroxilasa
IMDM: <i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>	Pax: <i>Paired box gene</i>
INS: Insulina	PBS: Tampón fosfato salino
IP1/2: <i>Intervening peptide</i>	PC: Proteín convertasas
Ipf1: Ver Pdx1	PeGs: Proteínas policombo
ITS: Insulina-Transferrina-Selenio	Pdx1: Factor de transcripción con caja homeótica 1 duodenal y pancreática
ITSFn: Insulina-Transferrina-Selenio-Fibronectina	PFA: Paraformaldehído
Isl1: Factor de transcripción del islote	PFHM: <i>Protein free hybridoma medium</i>
JAK: Quinasa asociada a janus	PI3K: Quinasa del inositol 3 fosfato
Kcnj11: ver Kir	PP: Ver PYY
KGF: Factor de crecimiento de los queratinocitos	Ptfla: Factor de transcripción 1A específico de páncreas
Kir: Canal de potasio interno	PYY: Polipéptido pancreático Y
KRB: <i>Krebs-ringer buffer</i>	RA: Ácido retinoico todo trans
KSR: <i>Knockout serum replacement</i>	Reg1: Péptido 1 regenerador del islote
LEF: <i>Lymphoid enhancer binding factor 1</i>	Rex-1: <i>Reduced expression 1</i>
Lefty: Factor de determinación del eje derecha izquierda	RIA: Radioinmunoensayo
Lhx1: Proteína homeobox LIM 1	RPMI: Medio RPMI
LIF: <i>Leukemia inhibitor factor</i>	
LIFRβ: Receptor del factor LIF	

■ ABREVIATURAS

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa a partir de la retrotranscripción del ARNm

SB: Inhibidor SB- 431542

SF: Factor Stell

Sftpc: Proteína C asociada a surfactante

Shh: *Sonic hedgehog*

Smad: Proteína homóloga del dominio MAD de *Drosophilla*

SoB: Butirato de sodio

SOS: *Son of sevenless homolog*

Sox: *SRY-box containing gene*

Src: *Rous sarcoma oncogene*

STAT3: *Signal transducer and activator of transcription 3*

STZ: Estreptozotocina

SU5402: Inhibidor de FGFr1

Sur1: Receptor de la sulfonilurea

SYP: Sinaptofisina

TAT: Tirosina aminotransferasa

Tcf1: Hnf1 (ver Hnf)

TGFβ: Factor de crecimiento transformante beta

TTR: Transtiretina

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

Wnt3: *Winglessrelated MMTV integration site 3*

YPA: Yema pancreática anterior

YPP: Yema pancreática posterior

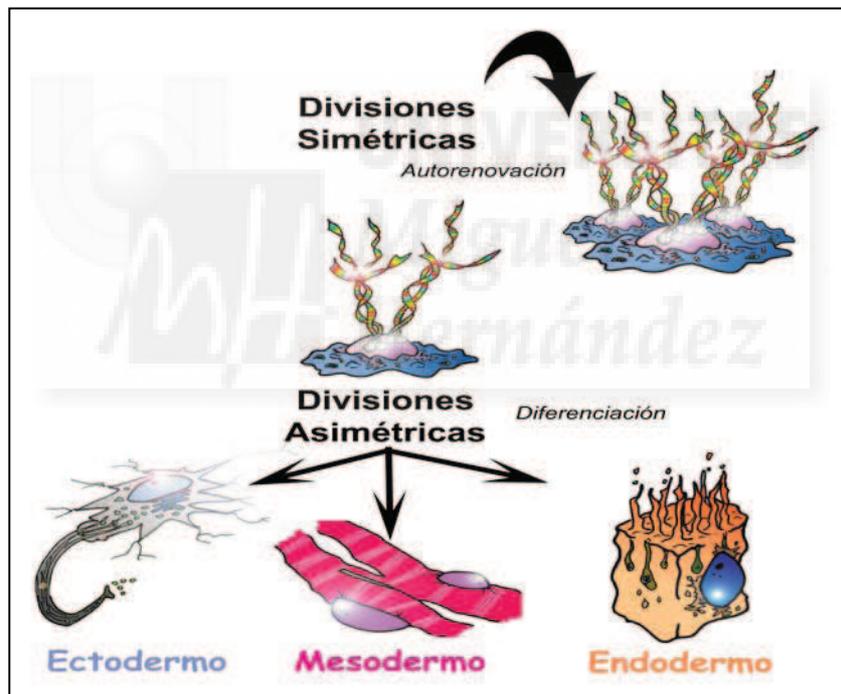




1. INTRODUCCIÓN.

1.1 CÉLULAS MADRE.

El campo de la investigación en terapia celular y tisular con el uso de células troncales (más conocidas como células madre) está adquiriendo gran importancia biomédica. Este tipo de células tiene varias propiedades que les confieren las características óptimas para su uso en medicina regenerativa, entre ellas podemos destacar: a) su alto grado de potencialidad para diferenciarse en distintos tipos celulares de diferentes capas embrionarias a través de divisiones asimétricas (Gadue P. y col., 2005), b) su alta tasa de proliferación y regeneración clonal por divisiones simétricas y c) la capacidad de mantenerse en un estado indiferenciado en cultivo.



Esquema 1.- Imagen representativa de la potencialidad y autorenovación de las células madre.

Las células madre se han clasificado hasta ahora tanto por su diferente grado de potencialidad a la hora de generar distintos tipos celulares como por su origen. En cualquier caso, estas dos características no describen totalmente la naturaleza de todos los tipos de células madre descritos, por lo que se necesita una investigación más

profunda en este campo para delimitar unas definiciones menos artificiosas y más acordes con la biología de estas células.

1.1.1 TIPOS DE CÉLULAS MADRE SEGÚN SU POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN.

Según el grado de potencial de diferenciación de estas células, se pueden clasificar en:

- a) Totipotenciales: es el grado mayor de potencialidad, donde la célula podría diferenciarse a todos los tejidos incluidos los extraembrionarios, cordón umbilical y el trofoblasto. Este tipo de células es una especie de entelequia debido a que perduran en el embrión en una fase muy corta del desarrollo (fase de 8-16 células) y rápidamente diferencian para desaparecer.
- b) Pluripotenciales: son aquellas células en el que su grado de potencialidad les permite diferenciarse en tejidos de las tres capas embrionarias y la línea germinal. Es el caso de las células madre embrionarias aisladas de la masa celular interna del blastocisto.
- c) Multipotenciales: hace referencia a aquellas células que ya están comprometidas dentro de un linaje de una capa embrionaria, con lo cual solo podrían diferenciarse a tipos celulares dentro de márgenes más estrictos. El ejemplo residiría en las células madre adultas procedentes de la estirpe hematopoyética de la médula ósea, las cuales solo diferencian hacia células sanguíneas (linaje mesodérmico).
- d) Unipotenciales: son células muy comprometidas con un grado de diferenciación nulo o muy limitado. Es el caso de las neuronas o de la propia célula beta pancreática.

En cualquier caso la delimitación entre los diferentes grados de potencial de diferenciación es un tanto artificiosa, ya que se han descrito casos de células

multipotenciales, que han podido diferenciarse hacia tipos celulares pertenecientes a otras capas embrionarias (Chamberlain J. y col., 2007; Wang X. y col., 2006), o incluso células que supuestamente estaban muy comprometidas han podido desdiferenciarse y autoreplicarse. Posteriormente se ha comprobado que éstas células son los progenitores de los tejidos donde residen, como por ejemplo en el páncreas (Brennan K. y col., 2007; Seaberg R.M. y col. 2004).

1.1.2 CLASIFICACIÓN SEGÚN SU ORIGEN.

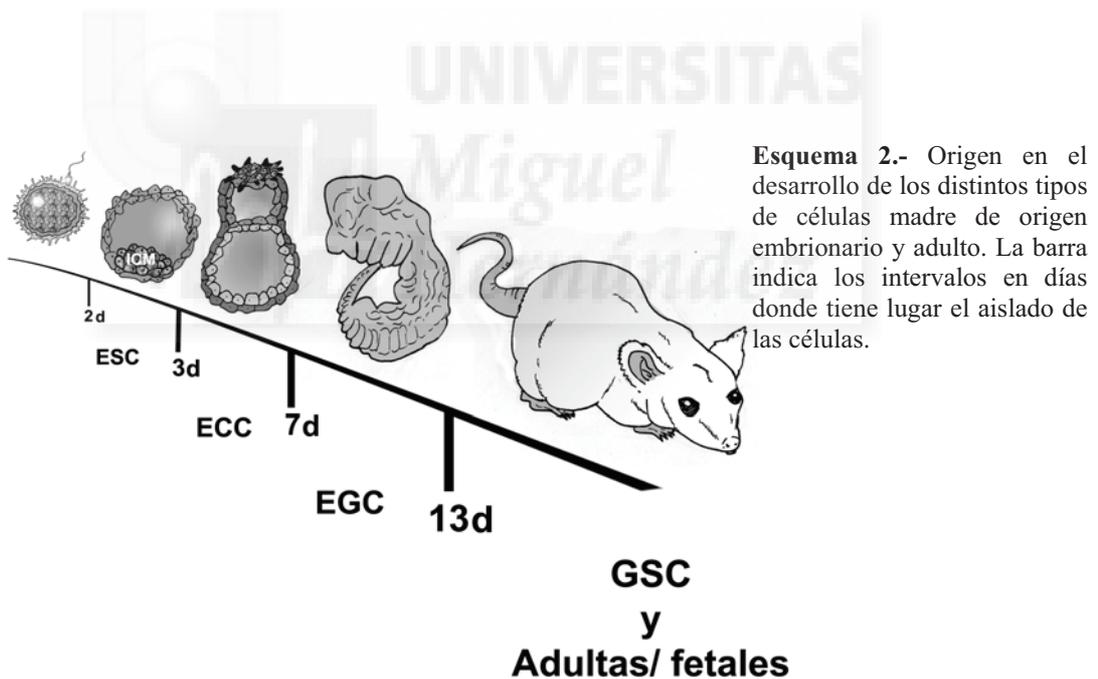
Atendiendo a su origen, estas células, se clasifican en:

- a) Células madre embrionarias (ESC): se obtuvieron del ratón como líneas celulares a principio de los años 80 (Axelrod H.R., 1984; Doetschman T.C. y col., 1985). Se aislaron a partir del grupo de células que forman la masa celular interna del blastocisto (aproximadamente día 3 del desarrollo embrionario en ratón). Su cultivo *in vitro* no altera su cariotipo ni su potencial de diferenciación a lo largo del tiempo, pudiendo originar tipos celulares de las tres capas embrionarias (pluripotenciales). Para su mantenimiento en estado de indiferenciación en cultivo se necesitan una serie de factores, como es el caso del LIF (leukemia inhibitor factor) en el caso de las procedentes de ratón o el cocultivo con fibroblastos inactivados en ratón y humanos. El trasplante de estas células puede colonizar los tejidos fetales y la línea germinal durante el desarrollo y a su vez pueden provocar teratocarcinomas en un individuo adulto (Cao, F. y col., 2007; Enseñat-Waser, R. y col., 2006).

- b) Células madre germinales (EGC): provienen de las células primordiales germinales precursoras de los gametos que no sufrieron la oleada de metilaciones en la gastrulación. Esta línea celular fue establecida a partir del ratón a principio de los años 90 (Matsui Y. y col., 1992). Las propiedades de las EGC son muy similares a las ESC en cuanto a proliferación, diferenciación y producción de teratocarcinomas, existiendo diferencias en cuanto a requerimientos para su establecimiento en cultivo, como el Factor

de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y el Factor steel (SF) así como el diferente perfil de metilación de ciertos genes (Labosky, P. y col., 1994)

- c) Células de carcinoma embrionario (ECC): estas células provienen de los teratocarcinomas provenientes de la línea germinal que se aislaron en la década de los 50 (Kahan, B. y col., 1970; Rosenthal, M. y col., 1970). Como las ESC, pueden diferenciarse hacia las tres capas germinales pero con la particularidad de que no colonizan la línea germinal, pierden su capacidad diferenciadora y acumulan aberraciones cromosómicas con el tiempo.
- d) Células madre derivadas de la línea germinal multipotente (GSC): se trata de células derivadas del cultivo de células madre espermatoogónicas tanto de neonatos como de adultos.



- e) Células madre adultas y/o fetales: participan en la regeneración de los tejidos adultos, bien por un daño tisular o bien por el propio recambio fisiológico. Se cree que estas células se localizan en un entorno tisular que controla su proliferación y capacidad de renovación denominado nicho (Moore K.A. y col. 2006).

1.1.3 CONCEPTO DE NICHOS CELULARES EN RELACIÓN CON LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS MADRE.

Este concepto se comenzó a utilizar a finales de la década de los 70 del siglo XX cuando se estudiaban las relaciones entre las células madre hematopoyéticas y las células formadoras de colonias del bazo (Schofield, R. 1978). El nicho se podría definir como el sistema físico-químico, celular y de soporte, donde las células madre se encuentran en un controlado equilibrio entre su estado indiferenciado y/o quiescente y su proliferación y/o diferenciación a través de factores de crecimiento.

Atendiendo a la clasificación anterior de las células madre según su origen, podríamos hablar de dos grandes grupos de nichos:

- a) Nicho de las células madre embrionarias: que se refiere a un nicho temporal, ya que conforme el embrión va madurando, estas células evolucionan en el sentido a que adquieren un potencial de diferenciación más restringido. Las células madre van a estar controladas por factores de pluripotencialidad internos como Oct 3/4 (Rosner, M.H. y col., 1990), Nanog (Chambers, I. y col. 2003) y Sox2 (Avilion, A.A. y col., 2003); factores externos como el LIF (Smith, A.G. y col., 1988), la familia TGF β (Ying, Q. y col., 2003), bFGF (Levenstein, M.E. y col., 2006), Wnt (Sato, N. y col., 2004), la matriz extracelular, la interacción celular (Todorova, M.G. y col., 2007) así como factores físicoquímicos (osmolaridad, pH, concentración de nutrientes, temperatura y presión parcial de oxígeno).

- b) Nicho de las células madre adultas: que hace referencia a aquellos microambientes tisulares donde las células madre son capaces de generar células de una capa embrionaria o tipo celular específico y reparar tejidos dañados. Éstas pueden permanecer quiescentes durante la vida del organismo, hasta recibir la señal que les permita ejercer su función.

El aislamiento de células madre de la masa celular interna, en el caso de las ESC o de un tejido adulto para su posterior cultivo *in vitro*, hace que éstas se adapten a un nuevo entorno muy diferente a su nicho natural. Este hecho incide en que pueden existir

notables diferencias entre las células *in vivo* frente a las cultivadas *in vitro* debido a múltiples factores como por ejemplo requerimientos en citoquinas,... (Zwaka, T. P. y col., 2006)

Debido al hecho de que el nicho adopta la función del control de la proliferación de las células madre, se ha planteado la hipótesis de que la pérdida de dicha función derivaría en células con una alta tasa proliferativa y una baja diferenciación. La ausencia de señales de inhibición de la duplicación celular, como por ejemplo factores de la superfamilia TGF- β , o por el contrario, aumento de dichas señales, como es el caso de la vía Wnt, derivaría en el desequilibrio de la tasa proliferación-diferenciación dando lugar a células tumorales (Li, L. y col., 2006).



1.2 FACTORES MOLECULARES IMPLICADOS EN LA PLURIPOTENCIALIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS.

Las ESC tienen una serie de características que las diferencian de otras células troncales como se ha indicado anteriormente y que se detallan debido a su importancia a la hora de cultivarlas o a su posible uso en terapia celular. Las ESC *in vitro* pueden mantener la pluripotencialidad, es decir, su capacidad de división en un estado indiferenciado, gracias a la activación de un sistema de comunicación intracelular activado por señales externas. En el transcurso de la investigación con ESC se han descubierto varios tipos de factores con una gran importancia en el mantenimiento de este sistema de comunicación. Clasificaremos entre factores de transcripción presentes en la célula y factores externos (fundamentalmente factores de crecimiento) que activan cascadas de señalización intracelulares, dicha separación es un tanto artificiosa debido a que investigaciones recientes demuestran un alto grado de relación entre ambos.

1.2.1. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

1.2.1.1. Oct 3/4.

Este factor está codificado por el gen *pou5f1*, que está presente y conservado en multitud de especies animales. Perteneció a la familia de proteínas con un dominio POU, el cual está alojado en el extremo N-terminal y compuesto por dos subunidades que actúan uniéndose a una región octamérica específica del ADN (ATGCAAT) así como a secuencias ricas en AT.

Es la molécula más importante en la regulación de la pluripotencialidad ya que se ha comprobado que en ratones Oct 3/4 *-/-* a pesar de llegar a la fase de blastocisto en el desarrollo embrionario, la masa celular interna pierde esta propiedad (Nichols, J. y col. 1998). Aunque en un principio se le ha dado el papel principal en dicha regulación, investigaciones posteriores han evidenciado su papel en otros procesos como es la

diferenciación neuronal (Shimozaki, K. y col., 2003), así como una relación entre sus niveles de expresión y el estado de autorenovación o diferenciación a linajes como el endodermo primitivo y el mesodermo (si la expresión es alta) o a la línea trofoectodérmica (si disminuye su expresión) (Niwa, H. y col., 2000).

Diversos estudios han encontrado varios genes diana que trabajan bajo la regulación del Oct 3/4 como son el Fgf4 (Yuan, H. y col., 1995) y Rex-1 (Ben-Shushan, E. y col., 1998) entre otros. Muchos de ellos no tienen una función clara en la autorenovación celular pero en cambio actúan como factores de crecimiento en los linajes en desarrollo.

Por otro lado, Oct 3/4 actúa junto con lo que se ha venido a llamar Proteínas policombo (PcGs) asociadas a zonas de represión de la cromatina (histonas trimetiladas en la lisina 27) coincidiendo con genes que se expresan en las ESC. Por tanto la asociación de ambos factores podría estar implicada en la inhibición de la diferenciación celular (Meshorer, E. y col., 2006). Este hecho podría explicar la dependencia de la autorenovación según el gradiente de expresión de Oct 3/4, ya que un aumento o disminución de éste podría desplazar el equilibrio del complejo con las PcGs y disminuir la actividad represora de los genes implicados en la diferenciación. Publicaciones recientes señalan la importancia de la asociación de Oct 3/4 y STAT 3 en la activación del mayor componente de las PcGs, el factor Eed, importante en el mantenimiento de la pluripotencialidad celular (Ura, H. y col., 2008) (Esquema 3).

La primera diferenciación que ocurre en el desarrollo embrionario de los mamíferos está dirigida hacia el trofoectodermo, linaje precursor de la placenta. Para ello la expresión de Oct 3/4 debe disminuir para que aumente la del gen que codifica la proteína Cdx2 (Niwa, H. y col., 2005), por lo que puede ser uno de los genes regulados en asociación a las PcGs.

1.2.1.2. Nanog

Es uno de los últimos factores implicados en la pluripotencialidad, tanto de la MCI del blastocisto como de las ESC, que se han descubierto en estos últimos años.

Pertenece a la familia de las proteínas homeobox, teniendo tres homeodominios por lo que tiene una clara función de unión y regulación del ADN.

Se ha observado que el aumento de la expresión de Nanog en ESC de ratón, hace que éstas mantengan su estado pluripotencial independientemente de la presencia o no de BMP (*Bone morphogenetic proteins*) o LIF en el cultivo (Ying, Q. y col., 2003). Este hecho constata la variedad de rutas que mantienen el estado de autorenovación celular y su complejidad, de hecho las ESC humanas no necesitan del factor LIF para mantenerse en estado indiferenciado pudiendo estar implicadas otras vías. Por otro lado, los niveles de expresión de Nanog es una característica que marca la diferencia entre éste y Oct 3/4, ya que mientras que un aumento de expresión de Nanog no implica la pérdida del estado indiferenciado, en el caso de Oct 3/4 implica un proceso de diferenciación celular (Niwa, H. y col., 2000).

La regulación del gen codificante de Nanog se ha estudiado mediante técnicas de protección de ARNasas y PCR, delimitándose zonas de unión de complejos Oct/Sox, denominados “cassetes” HMG/POU (Kuroda, T. y col., 2005), así como factores como STAT3 (Suzuki, A. y col., 2006) y FoxD3 (Pan, G. y col., 2006). Recientes estudios han demostrado la regulación de la asociación de Oct 3/4 y Sox2 en la expresión de Nanog (Rodda, D. y col., 2005).

Uno de los mecanismos en los que Nanog está implicado para mantener la autorenovación celular es mediante la inhibición de factores de la familia NFκB (Torres, J. y col., 2007) encargados de activar genes propios del proceso de diferenciación (Esquema 3). Por otro lado se ha comprobado la formación de un complejo de represión efectuada por la asociación de Nanog y Oct 3/4 con factores con actividad deacetilasa frente a genes de diferenciación (Liang, J. y col., 2008).

Además de los factores cis descubiertos que regulan la expresión de Nanog, se ha comprobado que existe al menos una región de regulación negativa de la que todavía falta por caracterizar posibles factores de unión a ella, sospechándose de p53 y del propio Nanog (Boer, B. y col., 2008).

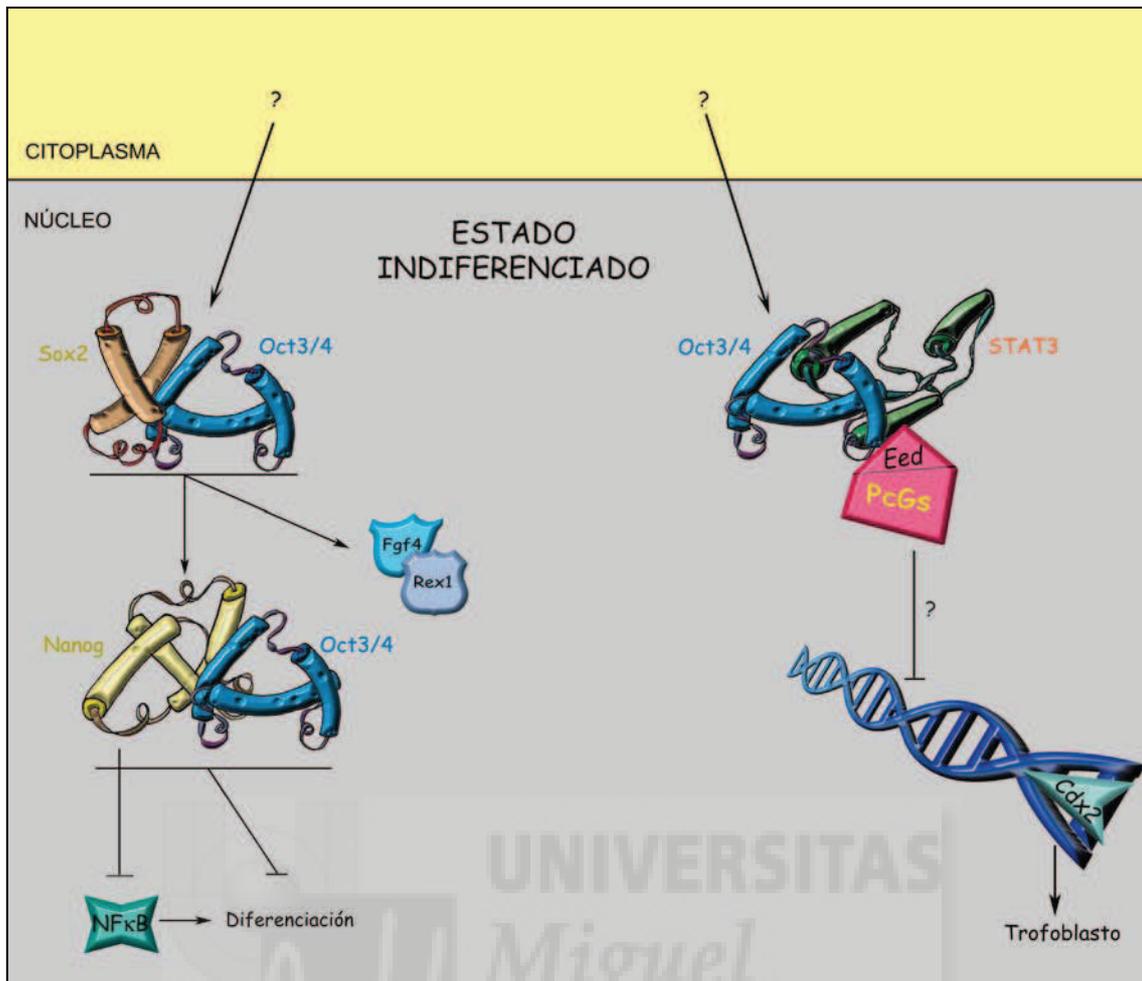
1.2.1.3. Sox2

Este factor de transcripción se caracteriza por poseer un dominio HMG (*High mobility group*) consistente en 79 aminoácidos y que participa en el reconocimiento y unión al ADN.

Su función en el mantenimiento de la pluripotencialidad celular está íntimamente ligado al factor Oct 3/4 (Chew, J. y col., 2005). La asociación de ambos factores es esencial para la activación de factores tales como el Fgf4, implicado en el desarrollo tras la implantación del blastocisto de ratón (Feldman, B. y col., 1995) (Esquema 3). En experimentos de silenciamiento del ARN de Sox2, se comprobó que las ESC se diferenciaban a todos los linajes embrionarios (Ivanova, N. y col., 2006).

Además de actuar en asociación con el factor Oct 3/4, Sox2 también regula a éste de forma indirecta, mediante la activación e inhibición de promotores o represores de su expresión (Masui, S. y col., 2007).

Existen otros factores pertenecientes a la familia Sox que se expresan en las ESC pero que no contribuyen al mantenimiento del estado indiferenciado ni tienen como diana a los factores que están bajo el control de Sox2 (Maruyama, M. y col., 2005).



Esquema 3.- Representación de la función de los diferentes factores de transcripción, así como de sus interacciones, involucrados en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células madre embrionarias. Nótese como el factor Oct 3/4 se encuentra presente en todos los mecanismos asociado a otros factores y proteínas.

1.2.2. FACTORES EXTRACELULARES Y SUS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN

1.2.2.1.LIF y la ruta JAK/ STAT 3.

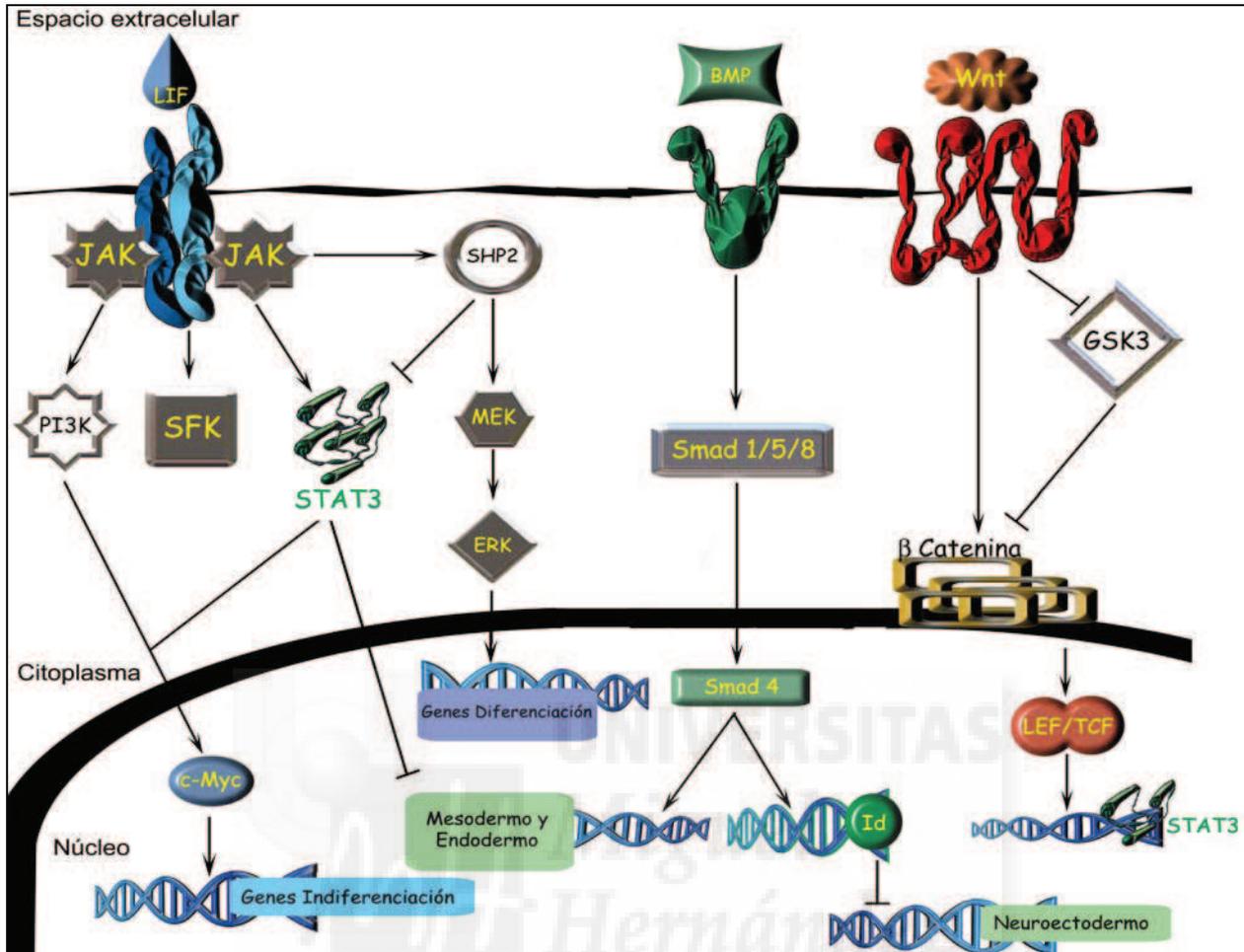
El factor LIF es una glicoproteína soluble de la familia de la interleucina 6 de un tamaño alrededor de 40-50 kDa. Esta molécula es esencial en la implantación del blastocisto murino en el útero materno tal como se comprobó en ratones mutantes *lif*^{-/-} (Stewart, C.L. y col., 1992). En el caso de los humanos, no parece que sea tan esencial en este proceso según se ha observado en casos de infertilidad en el que la prevalencia de mutaciones en el gen *lif* es apenas significativo (Steck T. y col., 2004).

La molécula de LIF interviene en la transducción de señales intracelulares a través del complejo transmembrana gp130 y el receptor de LIF tipo beta (LIFR β) formándose así un complejo trimérico (Zhang, J.G. y col., 1997) que activa la vía JAK/STAT3. Esta vía es la encargada de mantener la pluripotencialidad de las ESC murinas en cultivo mientras está activada (Burdon T. y col., 2002).

Cuando el complejo trimérico se genera, activa por fosforilación al factor JAK (Janus associated tirosin kinase) que es posteriormente el inductor de la activación por fosforilación de STAT3 (Esquema 4). Éste último forma un homodímero para introducirse en el núcleo y unirse al ADN en regiones promotoras de genes tales como c-myc, el cual tiene un papel importante en la autorenovación celular y el mantenimiento del estado indiferenciado (Cartwright, P. y col., 2005). No solo STAT3 es activado de esta forma, ya que existen al menos dos vías más bajo el control de JAK como son: la activación de la quinasa del fosfatidilinositol-3 fosfato (PI3K) implicada en la autorenovación y propagación celular (Paling, N. R. y col., 2004) y de la quinasa Src de la que se ha observado que su inhibición no interfiere en la señalización de STAT3 (Anneren, C. y col., 2004).

JAK activa a su vez la vía de las MAP quinasas la cual posee una función moduladora de la vía STAT3 y está en mayor medida implicada en rutas de diferenciación. A través del factor SHP2, JAK modula la inhibición de STAT3 y la activación de la cascada de MAP quinasas que desemboca en la activación de ERK y por consiguiente en la de genes implicados en la diferenciación celular (Burdon, T. y col., 1999). De esta manera se produce un control por retroalimentación del estado de pluripotencialidad o de diferenciación celular a través de esta vía.

En el cultivo *in vitro* de ESC de ratón es indispensable la adición del factor LIF si éstas no se sustentan en fibroblastos inactivados para mantener el estado de pluripotencialidad, particularidad que no ocurre con el cultivo de las ESC humanas, por lo que se presupone la existencia de diferentes vías y otros factores presentes en el suero que las mantiene en este estado (Thomson J.A. y col., 1998).



Esquema 4.- Representación de las vías de señalización de los diferentes factores extracelulares encargados del mantenimiento del estado indiferenciado de las ESC de ratón. Algunas de las vías pueden divergir hacia rutas de diferenciación (p. ej. LIF/JAK/STAT3 y BMP) por lo que es necesario una fina regulación de todos los factores implicados para mantener el estado de pluripotencialidad.

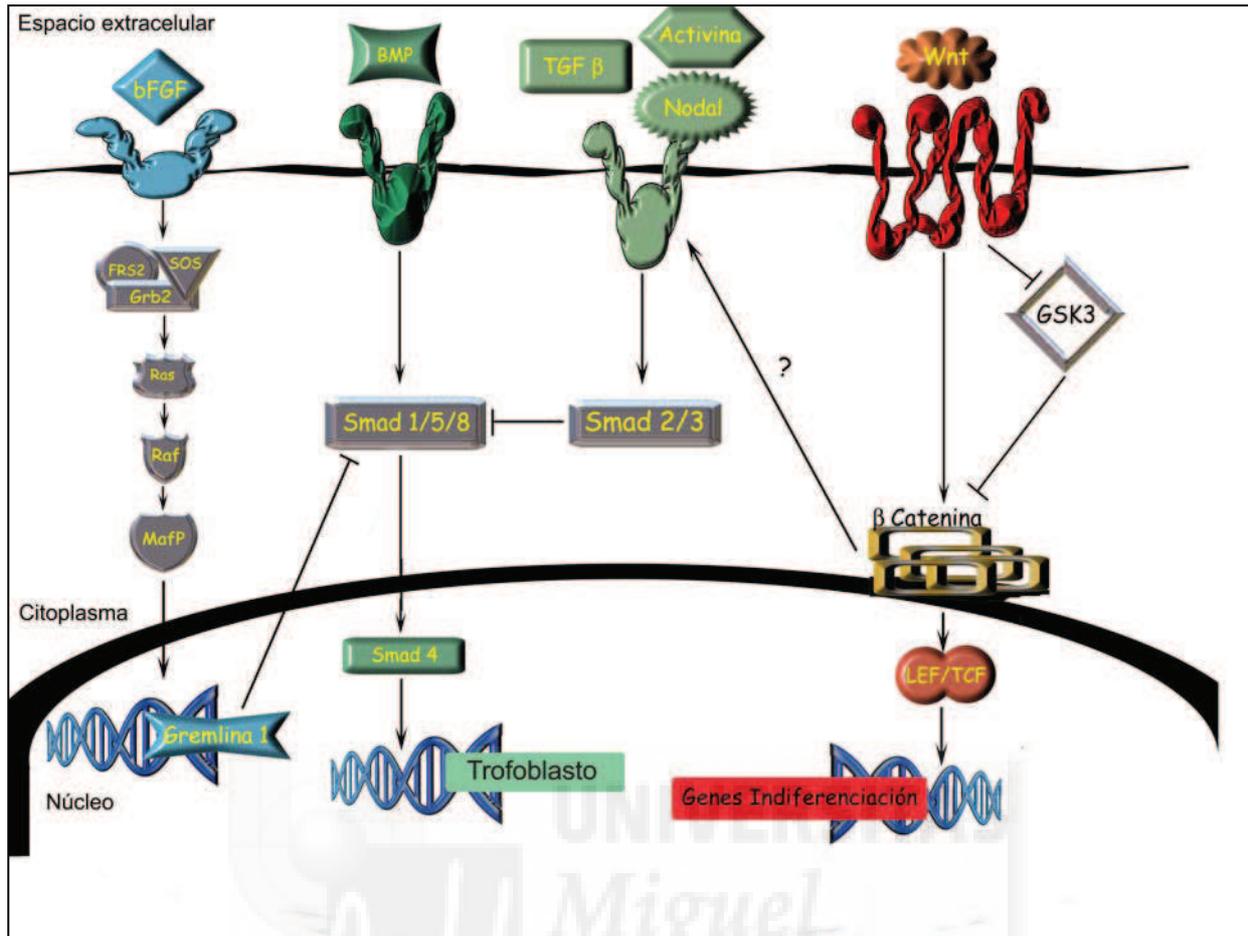
1.2.2.2 Vía canónica Wnt.

El cocultivo de ESC en presencia de fibroblastos inactivados es un método para mantener su estado indiferenciado. Con el transcurso del tiempo se han ido analizando los factores presentes en el medio de estos cocultivos para dilucidar los factores que intervienen en la autorenovación celular. El LIF, como se ha mencionado, es uno de ellos, capaz de mantener el estado de pluripotencialidad de las ESC de ratón pero sin provocar el mismo efecto en las de origen humano. Investigaciones recientes han descubierto la implicación de la vía canónica Wnt en la autorenovación de las ESC tanto de origen humano como de ratón (Sato, N. y col., 2004).

La vía de señalización Wnt en ESC comienza con la unión de la proteína Wnt con su receptor transmembrana Frizzled, el cual envía la señal al interior de la célula, inhibiendo la quinasa de la glucogeno sintasa 3 (GSK-3) y promoviendo la acumulación de β -catenina en el núcleo (Moon, R. T. y col., 2002). Todo ello induce la activación de los factores LEF/TCF que son los encargados de activar los genes implicados en la autorenovación celular como Oct3/4 y Rex-1 (Esquema 5) (Sato, N. y col., 2004). Por otro lado se ha observado que esta vía también está implicada en la diferenciación neuronal (Otero, J.J. y col., 2004). Con ello se deduce, que al contrario de cómo sucedía con la adición de LIF en el cultivo de las ESC de ratón, Wnt no debe ser una vía exclusiva para el mantenimiento de la pluripotencialidad en las células de origen humano.

La paradoja de que una misma ruta de señalización esté implicada en dos procesos antagónicos se puede explicar en base a los efectores finales. Recientes investigaciones han observado que el equilibrio entre la asociación de la β -catenina con distintos factores promueve el estado de autorenovación o de diferenciación (Miyabayashi, T. y col., 2007).

La vía canónica Wnt en ESC de origen murino no actúa totalmente independiente ya que en ciertos trabajos se ha demostrado su convergencia con la vía del LIF, estimulando la transcripción de STAT 3 pero no la activación de la vía (Esquema 4), por lo que el LIF debe estar presente para que se active la cascada de fosforilaciones de la ruta JAK/ STAT 3 (Hao, J. y col., 2005).



Esquema 5.- Representación de las vías de señalización de los diferentes factores extracelulares encargados del mantenimiento del estado indiferenciado de las ESC humanas. La vía de BMP está fuertemente inhibida para mantener el estado de pluripotencialidad, ya que promueve la diferenciación hacia trofoblasto, uno de los linajes diferenciados que aparecen en primer lugar. Esta inhibición está promovida directamente por los factores bFGF y la familia TGFβ e indirectamente por el factor Wnt.

1.2.2.3. La familia TGFβ

El estudio de esta familia es otra de las vías para comprobar su grado de participación en el mantenimiento de la pluripotencialidad en las ESC y especialmente en las de origen humano.

Esta familia de factores se puede dividir en dos grupos diferentes en base a las proteínas activadas. En un primer bloque se encontrarían las BMP y GDF (*Growth differentiation factors*) que una vez unidos a su receptor específico activan las proteínas intracelulares Smad 1,5 u 8, y en segundo lugar el bloque que contiene al propio TGFβ, activina y nodal que activan las Smad 2 y 3. Todas estas vías convergen en la ruta

canónica activando finalmente a Smad 4 que es el único factor que se une al ADN (Massagué, J. y col., 2005). Los receptores de TGF β activan una ruta alternativa donde las MAPKs están implicadas, pero en las ESC de ratón no se ha observado que inhiban la vía de diferenciación de ERK activada por JAK (Ying, Q. y col., 2003).

En trabajos con ESC murinas, se ha comprobado el papel de interacción entre las BMP y la vía LIF/STAT 3 para controlar la autorenovación celular, inhibiendo el primero la diferenciación neuroectodérmica y el segundo la meso y endodérmica. La ausencia de LIF en presencia de BMP, daría como resultado la diferenciación dirigida a meso y endodermo, ya que este factor está implicado en dicho proceso (Esquema 4) (Ying, Q. y col., 2003).

En el cultivo de ESC humanas, al no responder al estímulo del LIF, cabe la posibilidad de que el suero del medio contuviera suficiente concentración de BMP que iniciaría procesos de diferenciación, principalmente a trofoblasto (Xu, R. y col., 2002). La adición de Nodal (Vallier, L. y col., 2004), Activina (Xiao, L. y col., 2006) y TGF β (Amit, M. y col., 2004) ha resultado en la activación de la ruta Smad 2 y 3 inhibiendo la acción de BMP y por tanto manteniendo la pluripotencialidad (Esquema 5). Este hecho no se ha observado en las ESC de ratón (James, D. y col., 2005). La ruta Wnt parece que actúa de forma indirecta a nivel de la unión de los factores TGF β a sus receptores por algún mecanismo aún no descrito para mantener la activación de Smad 2/3 (Besser, D. y col., 2004).

1.2.2.4. El factor bFGF

El factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF o también denominado FGF2) pertenece a la familia FGF y es una proteína de unión a la membrana altamente conservada en la evolución. Este factor se expresa ampliamente en tejidos embrionarios y adultos, teniendo multitud de funciones.

El bFGF se une a su receptor específico de membrana junto con moléculas de proteoglicanos con heparán sulfato para dimerizarlo. La cascada de señalización implica

la formación del complejo FRS2-Grb2-SOS que se encarga de activar la vía de la Ras-Raf-MAFP.

Se ha observado que en el cultivo de ESC humanas, la sola presencia de bFGF es suficiente para mantener la pluripotencialidad en ausencia de fibroastos inactivados (Diecke, S., y col., 2008; Xu, C. y col., 2005). Existe cierta controversia si la vía de la familia TGF β , por medio de la activina A es la encargada principal del mantenimiento de la pluripotencialidad en las ESC humanas (Xiao, L. y col., 2006) o por el contrario ejerce esta función el bFGF. De todos modos se ha comprobado mediante técnicas de microarray la activación de Gremlina 1 inducida por bFGF, un inhibidor de la señal de BMP que induce diferenciación (Esquema 5) (Diecke, S., y col., 2008), proceso que también ocurre en el cultivo en presencia de activina A, inhibiendo la fosforilación de Smad 1/5, efector final de BMP. Esto podría deberse a que las dos vías convergen en la inhibición final de BMP por medio del control en diferentes puntos de la ruta, siendo así un sistema para asegurar el mantenimiento de la autorenovación.



1.3. TERAPIA CELULAR.

1.3.1. CONCEPTOS BÁSICOS

La terapia celular tiene como objetivo la sustitución de un tejido o tipo celular enfermo o dañado, por otros funcionales. La fuente de obtención de material biológico apropiado para ello ha ido evolucionando a lo largo de las últimas décadas, desde los trasplantes de órganos completos hasta la nueva terapia celular basada en las células madre. Las células madre son una buena fuente de obtención de material transplantable más específico, debido a la plasticidad que ofrecen a la hora de poder diferenciarlas a un tipo celular o tejido definido sin tener que hacer uso de órganos completos.

Al igual que ocurre con los órganos transplantados, la terapia celular también se enfrenta al rechazo inmunológico del huésped. Normalmente ocurre debido a las fuentes de obtención de las células madre, ya sean de individuos de la misma especie (trasplante alogénico) o por la contaminación con agentes xenobióticos debido al cultivo *in vitro* de estas células junto con componentes de otras especies animales. Por lo tanto, se está teniendo en cuenta en el uso de protocolos de cultivo de las células madre, la completa supresión de agentes xenobióticos tal como la sustitución o eliminación del suero fetal de mamíferos y las “feeder layers” de fibroblastos entre otros.

El uso de ESC trae consigo problemas éticos y legales a la hora de hacer uso de embriones humanos para la investigación. Debido al enorme potencial que ofrecen estas células se intentan buscar vías de actuación para que su uso no suponga una vulneración de las leyes ni de la dignidad humana. Un ejemplo es la aplicación de técnicas donde se biopsia una sola célula del embrión, sin dañarlo, y obtener a partir de ella una población clónica de ESC (Cheng, Y. y col., 2005). La aportación de la tecnología basada en la transferencia nuclear, además de evitar por un lado el rechazo inmunológico, puede sortear también estos problemas inactivando genes que podrían dotar a un embrión de la potencialidad de crear un ser vivo, como es el caso de CDX2 que promueve la formación del trofoectodermo y por tanto la implantación en el útero (Meissner, A. y col., 2005).

El uso en investigación de células madre adultas, en especial las de médula ósea, mesenquimales derivadas del tejido adiposo o progenitores específicos de cualquier órgano, no está tan restringido desde el punto de vista ético y legal como ocurre con las ESC. El problema reside en el escaso potencial diferenciador que poseen comparado con las ESC.

1.3.2. CÉLULAS MADRE Y DIABETES.

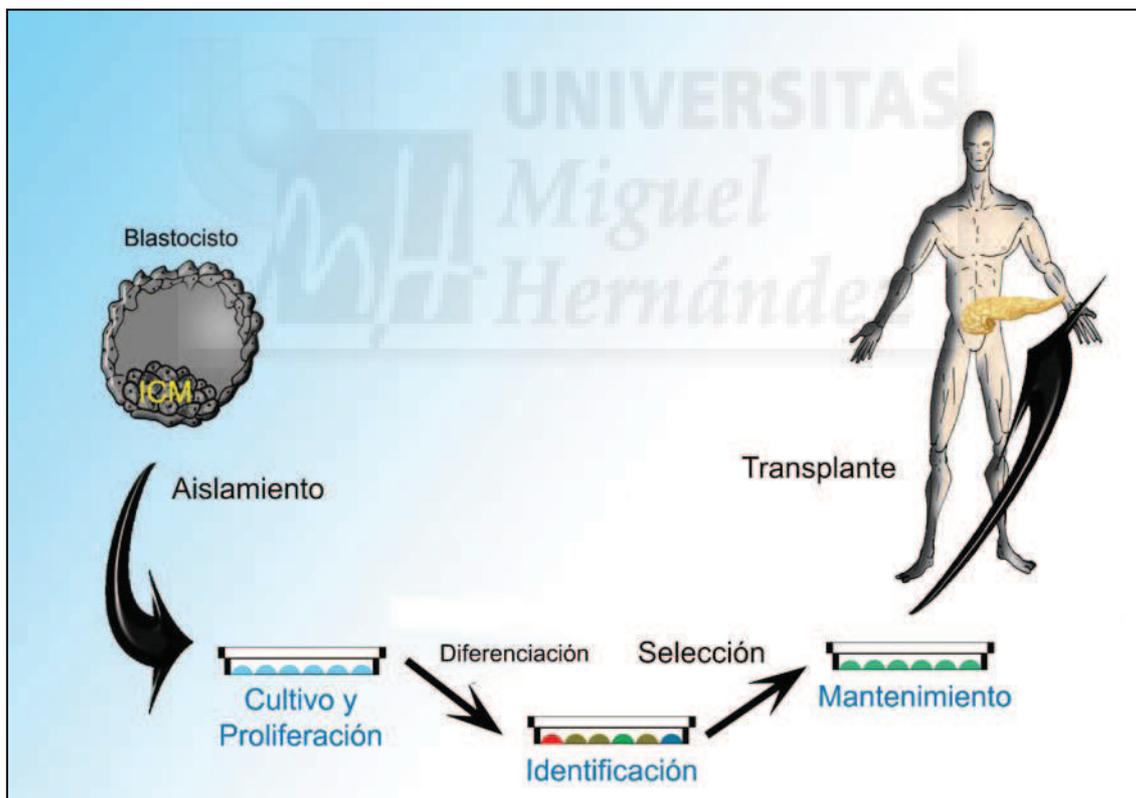
La diabetes es una de las principales enfermedades crónicas que afecta actualmente al mundo industrializado y de la que se espera que el número de enfermos llegue a los 300 millones en el año 2025 según la World Health Organization.

Clásicamente se identifican dos tipos de diabetes, la diabetes de tipo I donde existe una respuesta autoinmune que destruye a las células beta y que suele tener una prevalencia mayor en edades tempranas y la tipo II, la cual tiene sus causas en una resistencia periférica a la insulina y una disminución de la secreción de ésta, apareciendo hiperinsulinemia en primer término y posteriormente hiperglucemia, hiperlipidemia, hipercolesterolemia y a menudo correlacionándose con obesidad o sobrepeso, teniendo lugar en edades más avanzadas. Hasta ahora el modo de actuar frente a la enfermedad es la administración de insulina exógena o de antidiabéticos orales. En la mayoría de los casos este procedimiento no mimetiza el fino control que mantiene la célula beta frente a las diferentes concentraciones de glucosa en sangre, por lo que con el transcurso del tiempo suelen aparecer complicaciones típicas en estos enfermos como son la nefropatía, neuropatía o retinopatía entre otras.

Una de las soluciones que se ha barajado como alternativa al trasplante de páncreas, ha sido el trasplante de islotes procedentes de donantes cadavéricos, tal y como se ha expuesto en el protocolo de Edmonton (Shapiro, A. y col., 2000). A pesar de que estos pacientes prescindieron de la insulina exógena (10%) (Ryan E.A. y col., 2005), son muy pocos los beneficiados debido a la escasez de material transplantable y al rechazo inmunitario.

Por tanto, el uso de células madre para conseguir diferenciarlas hacia células productoras de insulina, es una vía factible debido a las características de éstas. En recientes trabajos se han utilizado células madre adultas en cultivo *in vitro* logrando conseguir células productoras de insulina. De todos modos, en estas células diferenciadas el contenido de insulina es menor del 1% respecto al que contiene la célula beta (Tang, D. y col., 2004).

La investigación con ESC de ratón ha sentado las bases a la hora de confeccionar protocolos de diferenciación dirigida a obtener células productoras de insulina. Además de sus propiedades pluripotenciales, el hecho de su alta tasa de proliferación hacen de ellas una herramienta útil para generar suficientes células con la capacidad de revertir la enfermedad al ser transplantadas (Esquema 6).



Esquema 6.- Representación del posible protocolo de trabajo con las ESC como uso en terapia celular en la enfermedad de la diabetes.

El modelo murino sirve de modelo experimental básico a la hora de implantar protocolos futuros con ESC humanas, a pesar de que se diferencien en ciertas características a la hora de cultivarlas *in vitro* (la necesidad del factor LIF en las ESC de ratón o la presencia de fibroblastos inactivados en el caso de las humanas). Para todo ello, ha sido necesaria la recopilación de conocimientos de una rama de la ciencia, la biología del desarrollo, imprescindible para diseñar una vía de diferenciación *in vitro*. Con todo ello, se están aplicando los factores y moléculas implicadas en el desarrollo del embrión para obtener *in vitro* el tejido o tipo celular deseado a partir de las ESC, como es el caso de las células endocrinas del páncreas, y entre ellas, la célula beta.



1.4 DESARROLLO EMBRIONARIO DEL RATÓN. ENDODERMO DEFINITIVO Y PÁNCREAS.

1.4.1. DESARROLLO DEL ENDODERMO DEFINITIVO EN RATÓN.

Durante el desarrollo embrionario, se forman las tres capas embrionarias en la fase de gastrulación: el ectodermo, del que derivarán tejidos como el sistema nervioso y la piel; el mesodermo, de donde surgen el tejido cardíaco y adiposo, músculos y la médula ósea y el endodermo que dará lugar a órganos tales como los pulmones, las glándulas tiroideas, el hígado, la vesícula biliar o el páncreas (Esquema 7 A).

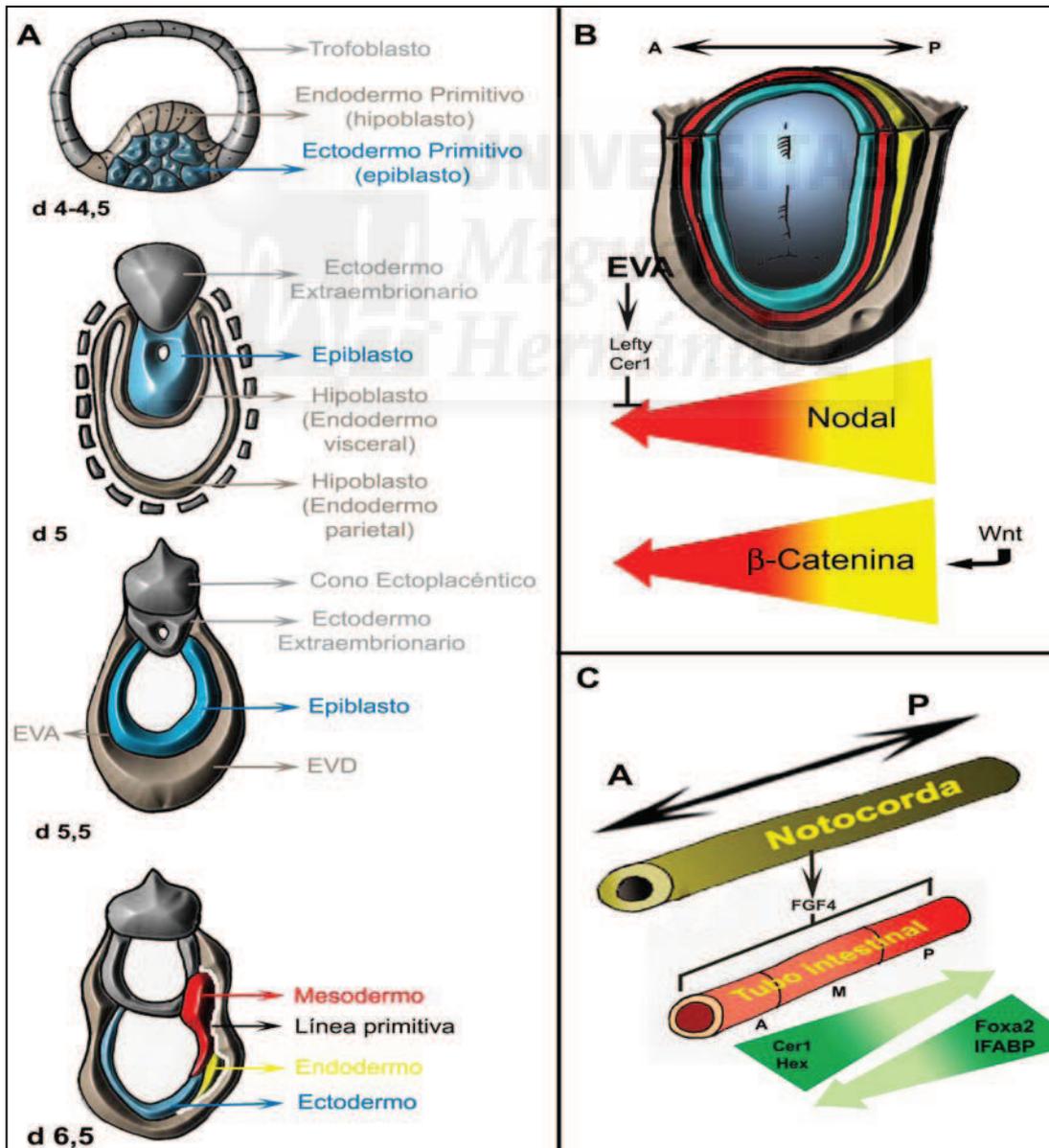
El endodermo es la más interna de las tres capas germinales que aparece en la fase de gastrulación durante el desarrollo embrionario de los mamíferos (día 6 *post coitum* en ratón). El programa molecular de formación del endodermo definitivo está muy conservado entre especies divergentes en la filogenia. A partir de la masa celular interna del blastocisto se formará el endodermo primitivo o hipoblasto (linaje que dará lugar a componentes del saco vitelino) y el ectodermo primitivo o epiblasto. Es a partir de éste último donde se generará la línea primitiva en la parte posterior del embrión tras la gastrulación. A partir de dicha línea se formarán las tres capas embrionarias.

Una de las rutas de señalización más importantes en el proceso del desarrollo del endodermo es la del factor de crecimiento Nodal (perteneciente a la familia TFG β) así como la cooperación de la ruta Wnt. Ambas rutas inciden en un progenitor común denominado mesendodermo, el cual dará lugar al mesodermo y el endodermo. Aunque estos progenitores solo se han observado en *Xenopus* y peces, se ha sugerido en ratón.

Nodal actúa como un morfógeno conduciendo la respuesta de las células en función de su concentración y del tiempo de exposición a éste, de tal manera que a concentraciones altas dirigirá la diferenciación hacia endodermo y a dosis bajas hacia mesodermo (Esquema 7 B). Los efectores finales de esta ruta implicados en la diferenciación endodérmica son diferentes factores de transcripción: Mix11, el cual actúa con complejos activados de Smad para regular la transcripción de otros efectores de

Nodal; la familia GATA, sobre todo los factores GATA 4 y 6 (Narita, N. y col., 1997; Zhao, R. y col., 2005); Sox17 y la familia de factores de transcripción Foxa.

La formación del endodermo implica una asimetría del embrión en el eje anteroposterior, donde el endodermo extraembrionario visceral anterior es el encargado de la expresión de inhibidores de Nodal (Lefty y Cer1), haciendo que solo se active la vía en la parte posterior donde se formará la línea primitiva (Yamamoto, M. y col., 2004) (Esquema 7 B). Con ello se demuestra el papel determinante del endodermo visceral en la formación del definitivo (Beddington, R. y col., 1999). Se han publicado estudios que describen la interacción entre los dos endodermos durante sus respectivos desarrollos (Tam, P. y col., 1992 y 2004).



Esquema 7.- Representación del proceso de gastrulación y sus factores implicados durante el desarrollo embrionario del ratón. **A)** Diferenciación y distribución espacial de las diferentes capas embrionarias surgidas durante la gastrulación de manera secuencial. Para facilitar la comprensión se han obviado algunos tejidos extraembrionarios. EVA: endodermo visceral anterior; EVD: endodermo visceral dorsal. **B)** La expresión zonal de ciertos genes induce la formación de una capa embrionaria determinada. Mientras que una elevada expresión de Nodal y β catenina conduce a la formación del endodermo definitivo (amarillo), Nodal se ve inhibido por el EVA (marrón) formándose así el mesodermo (rojo). Durante este proceso, el ectodermo (azul) comienza a polarizarse y a formar el boceto cerebral. **C)** Tras la formación del tubo intestinal a partir del endodermo definitivo y mediante la señal de factores inducidos por la notocorda (p. ej. FGF4), éste comienza a regionalizarse a partir de la distribución zonal de factores de transcripción, formándose así el tubo intestinal anterior (A), medio (M) y posterior (P). A: anterior; P: posterior.

Para el inicio de la gastrulación la vía Wnt es necesaria ya que se ha comprobado que la ausencia de β -catenina hace imposible este proceso en el embrión (Huelsen, J. y col., 2000). Una ausencia de β -catenina localizada en la línea primitiva conduce la diferenciación hacia el mesodermo en detrimento del endodermo (Lickert, H. y col., 2002).

En un estadio más avanzado de la gastrulación (día 8 *post coitum*) se ha estudiado la necesidad de la interacción del endodermo en formación, con otras capas germinales (p. ej. la notocorda) para lograr la determinación definitiva gracias a factores aportados por éstas como el FGF4 (Wells, J. y col., 2000) (Esquema 7 C).

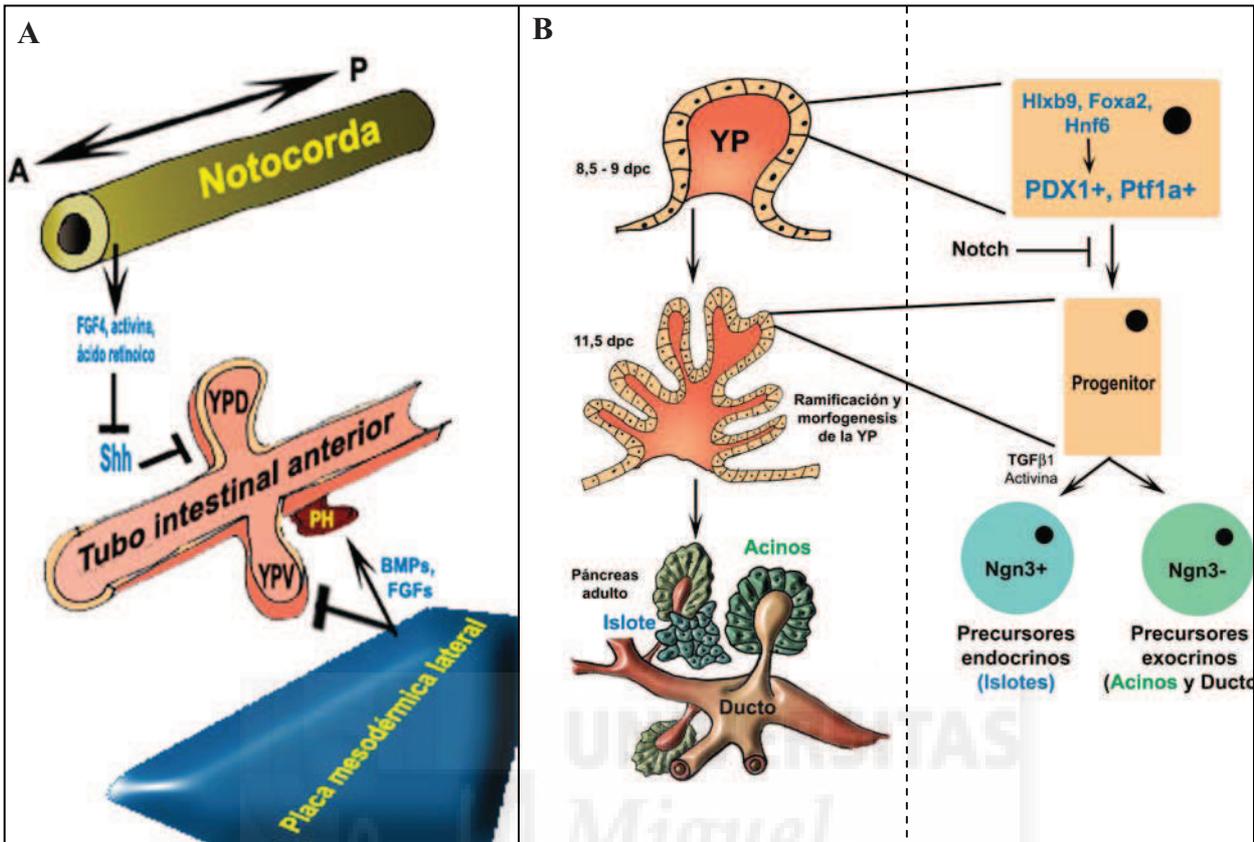
Una vez determinado el endodermo definitivo, se inicia la formación del tubo intestinal con la aparición de un “bolsillo” en la región anterior y posterior del embrión. Estos “bolsillos” se irán extendiendo hasta cerrarse para formar el tubo completo con ayuda del cambio en la posición del feto. Embriones mutantes para GATA 4, Sox17 o Furin/SPC1 ven imposibilitada la rotación corporal con lo que el tubo intestinal queda abierto (Kuo, C. y col., 1997; Kanai-Azuma, M. y col., 2002; Roebroek, A. y col., 1998). El tubo intestinal se subdivide en tres regiones principalmente, la anterior, media y posterior, dependiendo del gradiente de expresión de genes y los órganos que derivarán de él (Esquema 7 C). Se ha comprobado que mientras que en la parte anterior se concentra la expresión de Cer1 y Hex, en la parte posterior lo hacen Foxa 2 e IFABP (Dessimoz, J. y col., 2005).

1.4.2. DESARROLLO DEL PÁNCREAS DE RATÓN.

El páncreas deriva de la parte anterior del tubo intestinal endodérmico a partir de dos engrosamientos de éste. Por lo tanto en el desarrollo se diferenciará la yema pancreática dorsal (YPD) que aparecerá en primer lugar y la ventral (YPV) (Slack, J., 1995). La YPD estará en contacto con la notocorda hasta el día 8,5 *post coitum* para luego hacerlo con la aorta dorsal y la placa mesodérmica lateral mientras que la YPV establece contacto con el hígado en desarrollo y la placa mesodérmica lateral. Debido a una rotación del tubo intestinal, ambas yemas terminarán por fusionarse para dar lugar al órgano maduro.

Para el inicio de la formación de la YPD debe existir una señal inhibidora del factor BMP y de Shh, los cuales se encargan de dirigir la diferenciación hacia el hígado o el epitelio intestinal respectivamente (Esquema 8 A) (Hebrok, M. y col., 1998; Rossi, J. y col., 2001). Para ello se necesita la acción de factores tales como FGF4, activina y ácido retinoico (Martin, M. y col., 2005). Tanto los factores precursores como los inhibidores de la formación de la YPD son secretados por la notocorda, ya que ésta tiene un papel regulador a lo largo de todo el tubo intestinal y en parte del neuroectodermo en formación (Briscoe, J. y col., 2000).

En cuanto a la formación de la YPV, existen argumentos para pensar que procede de un progenitor común junto con el hígado (Deutsch, G. y col., 2001). La placa mesodérmica lateral se encarga de mandar señales de inducción hepática a través de BMPs y FGFs (Esquema 8 A) (Jung, J. y col., 199; Rossi, J. y col., 2001) por lo que se especula que deben existir mecanismos que inhiban estos factores para el normal desarrollo de la YPV como son los factores Hex (Bort, R. y col., 2004).



Esquema 8.- A) Representación de la génesis de los primordios pancreáticos a partir de los factores generados por los tejidos circundantes. Nótese que la yema pancreática dorsal (YPD) está en un principio bajo la influencia de la notocorda, para posteriormente pasar a estarlo por la aorta dorsal. B) Maduración de las yemas pancreáticas (izq.) y generación de los tipos celulares que las componen (dcha.), durante el desarrollo embrionario del ratón. El proceso culmina con la fusión de la YPD y la yema pancreática ventral (YPV) tras la rotación intestinal. A: anterior; P: posterior; PH: primordio hepático; YP: yema pancreática;

Una vez dirigida la diferenciación hacia el tejido pancreático cabe señalar los reguladores intrínsecos que participan en la diferenciación de sus células. Se ha observado que uno de los marcadores más tempranos en aparecer en las células epiteliales del páncreas en formación es Pdx1 (Jonson, J. y col., 1994) sobre día 8,5 en la YPV y día 9 *post coitum* en la YPD (Jacquemin, P. y col., 2003). En procesos del desarrollo más tardíos también se ha comprobado su expresión en el duodeno y estómago para luego restringirse solo a la célula beta en adulto. El mero hecho de la expresión de Pdx1 no es suficiente para promover la diferenciación pancreática necesitando la participación de otros factores como Ptf1a (Afelik, S. y col., 2006). Las células positivas a ambos marcadores darán lugar a los tres linajes maduros que conforman el páncreas: los acinos, las células del ducto y las de los islotes (Esquema 8 B).

Se ha especulado con la regulación de Pdx1 por parte del factor Hlxb9 (Li, H. y col., 1999) ya que en ratones Hlxb9 $-/-$ fracasa la formación de la YPD y la expresión de Pdx1. Aunque se sospecha que existen más factores que controlen a Pdx1, como por ejemplo Foxa2 (Wu, K. y col., 1997) o Hnf6 (Jacquemin, P. y col., 2003).

El páncreas puede dividirse en una parte exocrina encargada de la síntesis y secreción de enzimas que desempeñan su función en la digestión de los alimentos y una endocrina que regula el metabolismo de los nutrientes. Dentro del compartimento exocrino se encuentran las células del ducto y los acinos, mientras que los islotes de Langerhans formados por las células alfa, beta, delta, PP y epsilon que sintetizan glucagón, insulina, somatostatina, polipéptido P y ghrelina respectivamente; forman la parte endocrina. Se piensa que ambos linajes proceden de un progenitor común alrededor del día 11,5 *post coitum* (Fishman, M. y col., 2002). La señal de Notch secretada por el mesénquima retrasa la diferenciación de los progenitores, ya que un adelanto en su especificación conduce a un bajo número de células maduras como se ha observado en ratones Dll1 $-/-$, CBF1 $-/-$ y Hes1 $-/-$, todos ellos factores implicados en la señalización de Notch (Apelqvist, A. y col., 1999). Por otro lado, una señal mantenida de Notch inhibe la diferenciación de acinos y de islotes (Esni, F. y col., 2004). Factores pertenecientes a la familia TGF β , como TGF β 1 y activina, promueven la diferenciación de progenitores hacia la línea endocrina (Miralles, F. y col., 1998; Sanvito, F. y col., 1994).

El marcador de la especificación del linaje endocrino es la Neurogenina 3 (Ngn3), el cual aparece alrededor del día 15,5 *post coitum* y es el único necesario para el total desarrollo del linaje endocrino (Esquema 8 B) (Gradwohl, G. y col., 2000). En varios estudios se hace referencia al papel regulatorio del eje Notch-Ngn3 en el desarrollo de los islotes, por una parte una ausencia de Dll1 promueve un aumento del número de células Ngn3 $^+$ y de Glucagón $^+$ (Apelqvist, A. y col., 1999), por otro lado se ha demostrado que Hes1 es un represor directo de Ngn3 (Lee, J. y col., 2001). Esto sugiere que la especificación de los progenitores será endocrina en base a la expresión de Ngn3 y exocrina debido a su inhibición.

Algunas publicaciones indican la posibilidad de que las células del ducto y las del linaje endocrino tengan un progenitor común, debido a que se ha comprobado que tanto en la YPD como en la YPV se encuentran células $Hnf1\beta^+$, marcador del linaje del ducto, así como poblaciones celulares $Hnf1\beta^+$ /Neurogenina 3⁺, sugiriendo la idea de que éstas últimas sean precursores del linaje endocrino pancreático. El control de la expresión de Neurogenina 3 en estas células se llevaría a cabo por la inhibición de la señal de Notch vía Hes1 (Maestro, M. y col., 2003). En otros trabajos descartan esta posibilidad, afirmando la existencia de progenitores diferentes para los dos tipos celulares (Gu, G. y col., 2002), por lo que se necesitan más estudios para averiguar el origen real de los progenitores endocrinos.

1.4.3. DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA CÉLULA ALFA Y BETA PANCREÁTICAS.

A partir de precursores Neurogenina 3⁺, que conducen a la diferenciación de las células del páncreas en formación al linaje endocrino, tendrá lugar una cascada de expresión de factores que delimitarán el camino hacia células más especializadas en la secreción hormonal. Todo ello comienza con la activación de NeuroD1 por parte de Neurogenina 3 (Esquema 8), lo cual no implica una especificación concreta hacia un tipo celular, sino quizás un mecanismo de proliferación al inicio del proceso de diferenciación hacia todas las células endocrinas (Huang, H. y col., 2000).

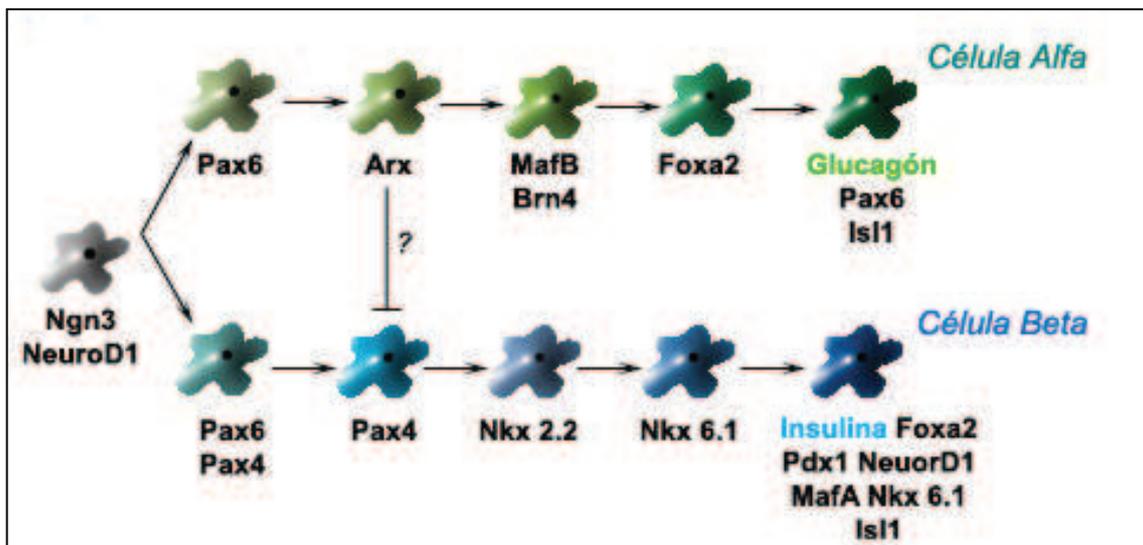
1.4.3.1. Célula Alfa.

Una vez formada la YPD, rápidamente comienza la activación de los factores específicos para conducir las células progenitoras hacia el linaje endocrino, apareciendo incluso células que ya expresan glucagón y polipéptido P a día 10,5 *post coitum* (Herrera, P. y col., 1991; Teitelman, G. y col., 1993). Esto se apoya en estudios de expresión ectópica de Neurogenina 3, donde algunas de las primeras células en diferenciarse son glucagón⁺ (Apelqvist, A. y col., 1999). La YPV sufrirá el mismo proceso de diferenciación con un cierto retraso respecto a la YPD.

Pax6, además de expresarse en el desarrollo del sistema nervioso central, es el primer factor determinante en el desarrollo de la célula alfa (Esquema 9) ya que estudios con ratones Pax6 *-/-* demuestran la carencia o muy poca cantidad de células alfa (St-Onge, L. y col., 1997). La determinación completa de los precursores de célula alfa también debe implicar la ausencia de expresión de Pax4, factor importante en el desarrollo de la célula beta y delta (Wang, J. y col., 2004).

El siguiente factor implicado en la especificación de la célula alfa es Arx, gracias a trabajos en los que se ha estudiado que una alta expresión inducida de su gen promueve la conversión de células productoras de insulina en células alfa y PP (Collombat, P. y col., 2007) y por el contrario, ratones mutantes para Arx, presentan un mayor número de células beta y delta (Collombat, P. y col., 2003). Por tanto Arx es un importante inhibidor de la ruta de especificación de célula beta quizás a través de la inhibición de Pax4.

Hay evidencias de otros factores que son necesarios en la especificación de la célula alfa, tales como Brn4, que ya comienza a expresarse a día 10 *post coitum* (Hussain, M. y col., 1997 y 2002) y tiene un papel regulador junto con Cdx2 del gen del glucagón (Wang, P. y col., 2006); MafB, activador del gen del glucagón (Artner I y col., 2006) y Foxa 2, implicado en la maduración final de la célula alfa (Lee, C. y col., 2005).



Esquema 9.- Modelo simplificado de la especificación de las células alfa y beta pertenecientes al páncreas endocrino durante el desarrollo embrionario de ratón. Hay que destacar que los factores de transcripción mostrados pueden aparecer en varios pasos del desarrollo y que por simplificar solo se muestran en uno de los pasos.

1.4.3.2. Célula Beta.

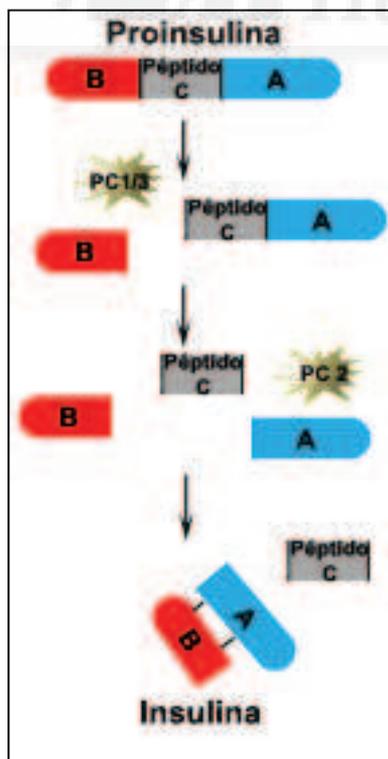
La célula beta es la encargada de la síntesis y secreción controlada de insulina, actuando como un sensor de la glucosa circulante en sangre. En un principio se afirmaba que se originaba, durante el desarrollo, a partir de células que co-expresaban glucagón e insulina (Guz, Y. y col., 1995; Teitelman, G. y col., 1993). Posteriormente y a raíz de trabajos utilizando herramientas de ingeniería genética como las estrategias con CRE/lox, que permiten inactivar un gen determinado, se ha comprobado que las células alfa no son progenitores de las beta (Herrera, P. y col., 1994 y 2000, Jensen, J. y col., 2000). Por tanto se presupone que las células glucagón⁺/insulina⁺ son una fracción minoritaria de células alfa que transitoriamente expresan estas dos hormonas.

La célula beta comienza su especificación con una doble expresión de Pax4 y 6, al igual que la célula delta, estando Pax4 regulado por Neurogenina 3 (Esquema 9) (Gradwohl, G. y col., 2000). Posteriormente entran en juego factores de transcripción de la familia NK homeobox tales como Nkx2.2 y Nkx6.1 que son cruciales para la determinación de esta célula. El primero en actuar, Nkx2.2, también se expresa en las células PP ya que se ha visto que en ratones mutantes para dicho gen presentan un reducido número de estas células así como la nula producción de insulina (Doyle, M. y col., 2007; Sussel, L. y col., 1998). Nkx6.1 se expresa ampliamente en el páncreas en formación, siendo activado por Nkx2.2 en los precursores de célula beta y manteniéndose exclusivamente en ella en el adulto. Mutaciones dirigidas de este gen dan lugar a individuos con ausencia de células beta, sin afectar al resto que conforman el islote (Sander, M. y col., 2000). En recientes publicaciones se ha indicado el papel importante del factor con dominio de cremallera de leucinas, MafB, para el normal desarrollo y maduración final de la célula beta (Artner, I. y col., 2007; Nishimura, W. y col., 2008)

Una vez determinado el perfil de esta célula, Pdx1 vuelve a actuar como regulador en fases más maduras e incluso ya en el adulto sobre el gen de la insulina (Serup, P. y col., 1996). Su expresión viene regulada principalmente en este estadio por Foxa2 (Lee, C. y col., 2002) y por el factor MafA (Samaras, S. y col., 2003) que incluso con MafB cooperan ambos uniéndose al área II de la zona promotora de Pdx1 (Vanhoose, A. y col., 2008). Además de la función que estos factores tienen en el

desarrollo y maduración de la célula beta, también tienen una implicación esencial en la regulación del gen de la insulina como se ha comprobado con Pdx1, MafA y NeuroD1 entre otros (Aramata, S. y col., 2005).

Mientras que en humanos solo se sintetiza una clase de insulina, en ratón aparecen dos tipos cuya distribución es específica según el tipo celular. Por un lado, el gen de la insulina tipo I se localiza en el cromosoma 19 (Davies, P. O. y col., 1994) y se expresa y sintetiza exclusivamente en la célula beta, por lo que los factores de regulación descritos anteriormente están referidos a su actuación sobre el gen de este tipo de insulina. Por otro lado, la insulina tipo II mapea en el cromosoma 7 (Jones, J. M. y col., 1992) y su distribución es mayor que la anterior, encontrándose en célula beta, saco vitelino (Deltour, L. y col., 1995) y en ciertas células provenientes del neuroectodermo. Los transcritos de ambos genes conservan cierta homología, pero mientras el de la insulina I tiene un tamaño de 1 Kb, la de tipo II tan solo es de 450 pb. Las proteínas generadas tras la traducción de los ARNm, denominadas proinsulinas I y II, tienen un tamaño similar, compuesto por 108 y 110 aminoácidos respectivamente. Ambas se componen de dos cadenas (A y B) unidas por el péptido C, el cual se deberá escindir en la maduración de la hormona (Esquema 10).



Esquema 10.- Procesamiento general de la proinsulina hasta su forma madura. En el ratón, ambos tipos de insulina sufren el mismo proceso, generando la unión de sus dos cadenas por puentes de disulfuro, además de la generación de un puente adicional intracatenario en A, y el péptido C.

● INTRODUCCIÓN

El procesamiento de ambas proinsulinas es similar y es realizado por las PC 1/3 y 2. Mientras que la PC 1/3 es la primera en actuar liberando la cadena B del péptido C en la región 29-35 (Baillyes, E. M. y col., 1992), PC2 lo hace posteriormente en la región 62-68 liberando la cadena A del péptido C (Bennett, D. L. y col., 1992). Finalmente ambas cadenas se unirán con dos puentes de disulfuro. El péptido C generado tanto por la insulina tipo I o tipo II, así como dichos tipos de insulina, difieren en unos pocos aminoácidos, pero los anticuerpos utilizados contra ellos en los protocolos de diferenciación de ESC reconocen las secuencias homólogas, por lo que no distinguen entre los dos tipos de insulina generados.



1.5 MÉTODOS DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE HACIA ENDODERMO DEFINITIVO O CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA.

Como se ha descrito, las ESC de ratón pueden diferenciarse espontáneamente a cualquier linaje embrionario (Gadue P. y col., 2005) en las condiciones apropiadas como son la ausencia de fibroblastos que actúan como matriz de sustentación o bien al retirar el factor LIF. Los procesos de diferenciación pueden llevarse a cabo en superficies de cultivo no adherentes para la formación de agregados tridimensionales denominados Cuerpos Embrionarios (CEs) (Desbaillets, I. y col., 2000), en una superficie adherente en forma de monocapa o con algún soporte biológico o sintético (matrigeles, matrices proteicas extracelulares,...).

A la hora de obtener un linaje embrionario o tipo celular específico, la diferenciación espontánea no es la mejor alternativa debido a la aleatoriedad de los fenómenos que la conducen, por lo que se suelen emplear protocolos de diferenciación dirigida que se basan en modificaciones o adiciones de factores al medio de cultivo, lo que se denomina cultivo coaxial. Dada la diversidad de elementos que componen los medios de cultivos utilizados en los protocolos de diferenciación, existe un alto grado de complejidad a la hora de reproducirlos en diferentes laboratorios. Uno de los componentes más controvertidos es el suero fetal donde la composición y la concentración de factores son desconocidos. Cada vez es más necesario el uso de medios definidos que permitan establecer qué elementos están actuando en la especificación de las ESC, por ello, ha sido importante la sustitución del suero por un análogo sintético en algunos protocolos publicados.

Las diferentes estrategias empleadas para la obtención de células productoras de insulina se han centrado en aspectos diversos tales como: la diferenciación espontánea mediante CEs, la utilización de medios coaxiales, la obtención de poblaciones precursoras de células productoras de insulina a través de selecciones genéticas o los cultivos definidos con factores implicados en el desarrollo embrionario durante las diferentes etapas que conllevan a la especificación del endodermo definitivo o de la propia célula beta.

A continuación se expondrán los diferentes protocolos publicados utilizando tanto ESC murinas como humanas para diferenciarlas hacia el endodermo definitivo, como capa embrionaria precursora del páncreas endocrino; o directamente hacia progenitores o células productoras de insulina.

1.5.1. PROTOCOLOS PARA LA OBTENCIÓN DE ENDODERMO DEFINITIVO A PARTIR DE LAS ESC.

La diferenciación dirigida hacia endodermo definitivo sería el primer paso lógico para obtener el mayor número de células comprometidas hacia progenitores de los distintos órganos que derivan de esta capa. De este modo, se debería lograr un mayor rendimiento en la obtención de células provenientes de este linaje, ya que evitamos que otras capas embrionarias tengan una presencia mayor en el cultivo, como ocurriría con un protocolo de diferenciación espontánea en el que el neuroectodermo es el linaje predominante (Roche, E. y col., 2005). Uno de los problemas más evidentes a la hora de obtener una población endodérmica definitiva es su caracterización, ya que muchos de los marcadores utilizados en las publicaciones son compartidos con otros linajes, especialmente el endodermo visceral o extraembrionario.

La aparición del endodermo definitivo puede obtenerse de manera espontánea a partir de la formación de CE (Choi, D. y col., 2005), ya que estas estructuras parecen mimetizar la fisiología del huevo cilindro en el desarrollo embrionario. De todos modos el rendimiento suele ser muy bajo y no todas las líneas celulares de ESC están predisuestas a diferenciarse a este linaje.

La familia TGF β tiene un papel importante en la inducción de la formación del endodermo definitivo, así como del mesodermo a partir de un progenitor común durante el desarrollo embrionario, por lo que la mayoría de protocolos han centrado los primeros pasos en activar su vía de señalización. Con la adición al medio de cultivo de factores pertenecientes a esta familia (p. ej. activina A) se ha podido constatar las concentraciones y el tiempo de exposición que se necesitan para la especificación del endodermo.

En el trabajo de Kubo, A., y col., 2004 (Anexo, tabla 1) demuestran que una concentración de 30 ng/ml de activina A es la óptima para dirigir supuestamente la diferenciación hacia endodermo definitivo, basándose en la expresión del gen Brachyury a través de una construcción genética de su promotor unido al gen de la proteína verde fluorescente. Entre día 5 y 6 observan el mayor pico de expresión tanto de brachyury como de otros marcadores durante la diferenciación en CE y en ausencia de suero. De todos modos, estos marcadores utilizados así como Brachyury se expresan en el endodermo visceral (Inman, K.E. y col., 2006). En el mismo trabajo observan incluso que en condiciones de sustitución del suero fetal por un análogo sintético sin la adición de ningún factor, logran la inducción del endodermo definitivo mediante el análisis de la expresión de Brachyury, Sox17 y Foxa2, marcadores presentes también en otras capas embrionarias (Sherwood, R. y col., 2007; Filosa, S. y col, 1997). Por otro lado, logran obtener fenotipos hepáticos cuando prosiguen con la diferenciación añadiendo otros factores como la dexametasona, ya que por RT-PCR evidencian la expresión de marcadores muy específicos de hígado tales como TAT y AAT. De todos modos se necesitan estudios funcionales para determinar el grado de diferenciación conseguido o si tan solo se trata de progenitores inmaduros.

Posteriormente se han publicado dos trabajos más del mismo grupo (Gadue, P. y col., 2006; Gouon-Evans, V. y col., 2006) que han venido utilizando la misma estrategia a través de la recombinación homóloga del promotor de Brachyury (Anexo, tabla 1). Ambos trabajos no despejan las dudas de si las poblaciones obtenidas mediante separación por “cell-sorting” son una población pura de endodermo definitivo o una mezcla con el visceral. El marcador específico de endodermo visceral, Amn (Kalantry, S. y col., 2001) podría proporcionar esa información. De todos modos, fue el primer grupo que comenzó a establecer protocolos de diferenciación de una manera secuencial tal y como ocurre en el desarrollo embrionario.

Existen trabajos que han utilizado otros genes distintos a brachyury como marcadores de la población mesendodérmica para poder seleccionarla mediante construcciones genéticas en ESC de ratón y utilizando cultivos coaxiales mediante la adición de la activina A (10 ng/ml), BMP4 y/o bFGF en ausencia total de suero. Es el caso del gen Goosecoide (Tada, S. y col., 2005) o acompañado de la doble selección con otro gen endodérmico denominado Sox17 (Yasunaga, M. y col., 2005) (Anexo,

tabla 1). En el primer trabajo seleccionan por “cell-sorting” una población Goosecoide⁺-E Cadherina⁺ la cual caracterizan por RT-PCR con unos marcadores compartidos con el endodermo visceral. Tan solo la presencia de la expresión del gen homeótico Prox1 asegura la presencia de progenitores del endodermo definitivo, ya que éste se expresa específicamente en la línea primitiva, pero cabe la posibilidad de que exista una mezcla con el extraembrionario. En el segundo trabajo, las caracterizaciones de las poblaciones obtenidas por “cell-sorting” con la doble selección permiten de una manera más discriminatoria establecer los orígenes de los dos endodermos obtenidos. La utilización de Amn y Cxcr4, marcadores específicos de endodermo extraembrionario y definitivo respectivamente, proporciona las claves para determinar que la población Goosecoide⁺-E Cadherina⁺-Sox17⁺ tiene características similares al endodermo definitivo y Goosecoide⁻-E Cadherina⁺-Sox17⁺ al endodermo visceral o extraembrionario.

Utilizando construcciones genéticas con el promotor de Pdx1, un marcador más tardío del endodermo definitivo que especifica a los progenitores pancreáticos (Jonson, J. y col., 1994), se ha podido mejorar el rendimiento de los protocolos establecidos por Kubo (Shiraki, N. y col., 2008). Con la adición de una concentración mayor de activina A (100 ng/ml), bFGF y ácido retinoico en presencia de suero fetal y de una manera secuencial, logran obtener un porcentaje mayor de población Pdx1⁺. A pesar de que Pdx1 aparece también en el saco vitelino, tejido derivado del endodermo visceral y neuroectodermo, acompañan todos sus resultados con Cxcr4 marcador específico del endodermo definitivo. Por tanto un conocimiento exhaustivo de los factores y rutas implicados en el desarrollo embrionario, es esencial para la obtención del endodermo definitivo mediante protocolos en los que la adición de los factores se realice de una forma secuencial a como ocurriría durante el desarrollo embrionario.

La activina A también se ha utilizado en el cultivo de las ESC humanas tal como se muestra en el trabajo de D'Amour, K. y col., 2005 (Anexo, tabla 1), utilizando concentraciones mayores (100 ng/ml), un bajo porcentaje de suero y sin formar CEs. Al igual que ocurría con la publicación de Kubo, la caracterización de las poblaciones celulares obtenidas no asegura la pureza o la especificidad de la población al utilizar marcadores compartidos con otros linajes, como el endodermo visceral y el neuroectodermo. Empleando el marcador de superficie Cxcr4, les permite aislar una población que presenta el mismo perfil de marcadores que la obtenida con el protocolo

con el que trabajan, asegurando que Cxcr4 es muy específico de endodermo definitivo (McGrath, K. y col., 1999). Gracias a este receptor, se puede aislar poblaciones por “cell-sorting” sin necesidad de utilizar construcciones genéticas de cara a su utilización en terapia celular.

1.5.2. PROTOCOLOS PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA A PARTIR DE LAS ESC.

La diferenciación de ESC hacia células productoras de insulina como posible fuente de material transplantable en enfermos de diabetes, es uno de los objetivos en terapia celular. La obtención de células que mimeticen la función de la célula beta pancreática es compleja debido a la alta especialización funcional de ésta. Por otro lado, existen otros tipos celulares que expresan también insulina como son células que derivan del neuroectodermo y del endodermo visceral.

Al igual que se ha comentado en el apartado anterior, los protocolos que se han publicado de diferenciación hacia este tipo celular concreto abordan el problema desde varias perspectivas que se describen a continuación y que se basan fundamentalmente en:

- obtención de células nestina⁺ mediante el uso de ITS según el protocolo publicado por Lumelsky, N. y col., 2001.
- utilización del factor activina A y/o otros factores de crecimiento.
- selección de poblaciones por construcciones genéticas.

1.5.2.1. Obtención de células productoras de insulina a partir de ESC de ratón.

La utilización de marcadores específicos pancreáticos facilitan la discriminación del tipo celular que se obtiene tras un protocolo de diferenciación. En el ratón es particularmente interesante ya que se sintetizan dos tipos de insulina, siendo la insulina

tipo I la específica de célula beta y la de tipo II más ubicua, apareciendo en páncreas, sistema nervioso y saco vitelino. El glucagón también puede emplearse como marcador a la hora de comprobar la presencia de páncreas endocrino. Ensayos de secreción de insulina y el trasplante de las células diferenciadas en ratones diabéticos, son algunas de las pruebas que tratan de demostrar la funcionalidad de las poblaciones obtenidas.

Los primeros trabajos publicados centrados en la obtención de células productoras de insulina se basaban en complejos protocolos basados en la adición de factores, sin seguir un patrón similar al desarrollo embrionario, hasta obtener una población nestina⁺ (Lumelsky, M. y col., 2001). La observación de que progenitores nestina⁺ daban lugar a células que expresaban hormonas pancreáticas (Zulewski, H. y col., 2001) fue la base para que durante años muchos protocolos se basaran en esta estrategia. Publicaciones posteriores han demostrado el origen neuroectodérmico de estas células (Sipione, S. y col., 2004 y Takayama, I. y col., 2007) incluso demostrando la co-localización de péptido C con la β III tubulina, un marcador muy específico neuronal, así como la posible captación de la insulina debido a su presencia en el medio de cultivo y al inicio de procesos apoptóticos de las células diferenciadas que facilitan este hecho (Rajagopal, J. y col., 2003). Por otro lado también se comenzaron a emplear protocolos mediante la utilización de ESC modificadas genéticamente para aislar poblaciones productoras de insulina (Soria, B. y col., 2000) utilizando la diferenciación espontánea. De todos modos a pesar de las respuestas que se obtuvieron ante la presencia de diferentes concentraciones de glucosa en el medio de cultivo, no se analizaron los perfiles de marcadores específicos de célula beta así como el tipo de insulina sintetizada por las células tras la diferenciación.

Por diferenciación espontánea, mediante formación de CE y posterior adhesión, durante un periodo de tiempo prolongado también se ha logrado obtener células productoras de insulina (Shiroi, A. y col., 2002) (Anexo, tabla 2), pero faltan estudios funcionales que confirmen si responden a distintas concentraciones de glucosa y descartar la posibilidad de que se trate de progenitores inmaduros. Del mismo modo, pero con el cultivo exclusivo de las ESC en monocapa, se obtiene una población con un perfil de endodermo visceral inmaduro (Milne, H. y col., 2005). Los autores basan su hipótesis en la aparición de ciertos marcadores, los cuales también se comparten con el neuroectodermo, y la nula expresión por RT-PCR de AFP. El análisis por RT-PCR de

Amn y Neurofilamento M despejaría las dudas del origen de la población celular que obtienen en el trabajo.

Protocolos similares al empleado por Lumelsky basados en la selección de células nestina⁺, utilizando insulina, transferrina y selenio, se han seguido de distintas formas obteniendo células productoras de insulina. En algunos casos se ha obtenido por RT-PCR, expresión de los genes de las hormonas del páncreas endocrino y exocrino, exceptuando la insulina tipo I, así como respuesta secretora de insulina de las células obtenidas a diferentes concentraciones de glucosa (Moritoh, Y. y col., 2003). Es paradójico que estas células respondan a altas concentraciones de glucosa secretando insulina al medio sin que se observe la expresión del gen de la hormona responsable. La captación de insulina adicionada al medio por parte de la célula y su posterior secreción con el transcurso del tiempo sin aparente regulación sería una posible respuesta a este hecho. En otros trabajos se demuestra la presencia de insulina I, incluso en las ESC indiferenciadas, y de otras hormonas del páncreas endocrino por RT-PCR (Schroeder, I. y col., 2006) (Anexo, tabla 2). Los cebadores utilizados no amplifican exclusivamente el ADN complementario de este marcador, sino también el ADN genómico (tamaño que corresponde con la preproinsulina I), por lo que no se descarta que la señal sea un artefacto.

Es interesante indicar los resultados en la publicación de Ku y col. (Ku, H. Y. y col., 2004) donde obtienen una población que expresa insulina tipo I sin la adición de factores de crecimiento, tan solo con la presencia de MTG, ácido ascórbico y un análogo del suero (Anexo, tabla 2). Por otro lado cabe destacar, un alto grado de expresión de glucagón y nestina observado por RT-PCR. La obtención de expresión por RT-PCR de insulina I con unos cebadores específicos, es una prueba clave de que la estrategia utilizada para la obtención de células productoras de insulina está en la dirección correcta. De todos modos, existen algunas incongruencias en este trabajo, donde la falta de controles no logra determinar que factor o condición de cultivo es la responsable de la obtención de insulina I.

El cultivo de las ESC en presencia de un medio con factores solubles provenientes de yemas pancreáticas murinas en desarrollo o de la nicotinamida, conduce a la obtención de células que producen insulina y normalizan la glucosa en sangre de

ratones diabéticos (Vaca, P. y col., 2005 y 2008). Estas células se pudieron seleccionar gracias a la construcción genética que contiene el promotor de la insulina humana junto al gen que proporciona resistencia a la neomicina. La caracterización no es exhaustiva ya que utilizan marcadores muy generales y no comprueban si la insulina detectada es de tipo I; en un protocolo semejante con la adición de nicotinamida (Chen, C. y col., 2008), intentan diferenciar los dos tipos de insulina pero los cebadores empleados en RT-PCR no hacen posible esa distinción. Aunque, en el trabajo de Vaca, la incorporación de BrdU de la población seleccionada es menor que unas ESC indiferenciadas, mantienen un alto porcentaje de división, por lo que se deberían realizar estudios de marcadores de pluripotencialidad para descartar la posibilidad de que existiera una población residual indiferenciada. En el trabajo de Chen observan una cierta expresión de Oct 3/4 tanto en los CEs como en su posterior adhesión. No se evidencia aparición de tumores en los aproximadamente 50 días de transplante en animales, tiempo relativamente corto comparado con el que se ha utilizado en otros trabajos (Enseñat-Waser, R. y col., 2006).

Con los conocimientos obtenidos en estudios del desarrollo embrionario, se ha podido conseguir mimetizar éste utilizando sofisticados protocolos de diferenciación *in vitro*, que logran obtener células productoras de insulina funcionales. Uno de los grandes puntos de inflexión en este hecho ha sido la utilización de activina A para activar la cascada de señales de la vía TGF β , una de las primeras señales de inducción del endodermo, al igual que lo hace Nodal *in vivo*. La utilización de este factor ha demostrado cierta efectividad a la hora de conseguir un compromiso de las ESC hacia endodermo definitivo (D'Amour, K. y col., 2005; Shiraki, N. y col., 2008; Tada, S. y col., 2005; Yasunaga, M. y col., 2005) (Anexo, tabla 1).

Se ha comprobado que la adición en el medio de cultivo de activina A, ácido retinoico y bFGF de una manera secuencial, permitiendo la formación de CEs y luego su posterior adhesión, promueve la obtención de células que expresan insulina tipo I (Shi, Y. y col., 2005). Gracias a la utilización de una construcción genética compuesta por el promotor de la insulina junto con la eGFP, se seleccionaron estas células y se lograron transplantar en ratones diabéticos. La glucosa en sangre alcanzó valores normales a partir de las dos semanas y se mantuvo así durante 40 días. No se comunicó la aparición de tumores. El uso de otras líneas de ESC y con protocolos similares no ha

permitido la determinación de qué linaje proceden las células productoras de insulina obtenidas, bien debido a que los marcadores utilizados por RT-PCR no eran suficientemente específicos, o bien a la utilización de cebadores de insulina I que amplifican ADN genómico llevando a posibles errores de interpretación (McKiernan, E. y col., 2007).

La sustitución del suero por un análogo sintético, permite controlar de una manera más precisa la composición del medio de cultivo, por lo que es un factor más que se ha tenido en cuenta en los protocolos de diferenciación dirigida. De esta forma se puede comprobar que distintas concentraciones de activina A pueden derivar hacia un determinado linaje pancreático (Nakanishi, M. y col., 2007) (Anexo, tabla 2). Mientras que el páncreas endocrino parece prevalecer en cultivo a altas concentraciones de activina A, ocurre lo contrario con el exocrino como lo demuestra el aumento de expresión de amilasa y del factor de transcripción Ptf1a. Lo interesante de este trabajo es la aparición de la expresión de insulina tipo I y glucagón en días muy tempranos de cultivo en presencia tanto de la combinación de activina A y ácido retinoico, como sólo en presencia de ácido retinoico. Se necesitarían mecanismos de selección de las distintas poblaciones celulares obtenidas y ensayos de secreción de insulina y/o glucagón para determinar el grado de funcionalidad. Jiang, W. y col., 2008 (Anexo, tabla 2) utiliza técnicas de transferencia nuclear mediante fibroblastos embrionarios, obteniendo ESC funcionales. Los protocolos que utilizan para diferenciarlas hacia células productoras de insulina se basan en la adición de activina A y la combinación de Insulina, Transferrina y Selenio utilizada por Lumelsky, además de otros factores de crecimiento de manera secuencial y en monocapa. Observan por RT-PCR la expresión de insulina tipo I, Glucagón y Nkx2.2 y no comprueban por inmunocitoquímica si el Péptido C no co-localiza con la β III tubulina como realizaron Sipione, S. y col., 2004. Además, comprueban que las células obtenidas responden a la glucosa en ensayos de secreción de insulina y que pueden normalizar la glucemia en ratones diabéticos transplantados al menos durante 9 semanas sin comunicar la presencia de tumores.

1.5.2.2. Obtención de células productoras de insulina a partir de ESC humanas.

Las investigaciones llevadas a cabo con el modelo de ratón, están permitiendo adaptar las condiciones óptimas de cultivo para la consecución de estas células a partir de ESC humanas. Los humanos a diferencia del ratón sólo sintetizan un tipo de insulina, por lo que se necesitan más marcadores y pruebas adicionales para poder determinar el linaje del que provienen las células productoras de insulina obtenidas. Una estrategia racional es utilizar el desarrollo embrionario como modelo para la diferenciación por fases en cultivo, con lo que la selección de células Cxcr4⁺, marcador específico del endodermo definitivo, permite asegurar que las células productoras de insulina que se derivan pertenecen al linaje del páncreas endocrino.

La adición secuencial de Activina A y Wnt3a para activar la diferenciación endodérmica, como ocurre en el desarrollo embrionario, es el primer paso para comprometer las células hacia la dirección deseada (D'Amour, K. y col., 2006) (Anexo, tabla 3). Los autores plantean un protocolo en que en cada fase mimetiza un estadio en el desarrollo a través de la adición de factores con una función específica siempre en un cultivo en monocapa. Un ejemplo es la presencia de ciclopamina que disminuye la actividad del factor de transcripción Sonic hedgehog, un inhibidor de la formación del páncreas (Hebrok, M. y col., 1998). Logran probar la procedencia endodérmica definitiva de las células obtenidas a partir del marcador Cxcr4, así como la co-localización de Pdx1 con Nkx 6.1 por medio de técnicas inmunocitoquímicas, demostrando así que la dirección tomada en la diferenciación, es la correcta. Se necesitarían experimentos adicionales para determinar la causa de la obtención de grandes poblaciones glucagón⁺ en detrimento de otras que componen el páncreas endocrino y la poca respuesta a la glucosa de las células productoras de insulina en los ensayos de secreción. El mismo grupo optimizó posteriormente el protocolo con unos pequeños cambios en los factores adicionados al medio pero con la salvedad de detener la diferenciación en un estadio temprano de la determinación pancreática (Kroon, E. y col., 2008). Estas células positivas a Nkx6.1, Foxa2 y Pdx1 fueron transplantadas en ratones inmunodeprimidos, se observó como maduraban *in vivo* y mantenían estables los niveles de glucosa en sangre durante más de tres meses. Un estudio de los marcadores del páncreas exocrino y endocrino dio como resultado la obtención de una

mayor proporción de este último, quizás debido a la falta de interacciones in vivo del epitelio mesodérmico o las señales del ácido retinoico como proponen los autores. En el análisis de los injertos no se observó ninguna población glucagón⁺/insulina⁺ ni la formación de tumores.

Jiang, J. y col., 2007 (Anexo, tabla 3) utiliza la misma estrategia que D'Amour y Kroon pero utilizando otros factores en la especificación del páncreas endocrino a través de las ESC; además de combinar el cultivo en monocapa y en suspensión. Un ejemplo radica en utilizar butirato de sodio en lugar de de Wnt3 en el paso de ESC indiferenciadas hacia endodermo definitivo; o nicotinamida e IGF II en lugar de exendina 4, IGF I y HGF para a partir de los precursores del páncreas endocrino, obtener islotes. Este hecho apunta a que existen diferentes factores que pueden activar las mismas o vías alternativas para comprometer la célula hacia un linaje determinado y que debería ser tenido en cuenta en los estudios del desarrollo embrionario. Al contrario que la publicación de D'Amour, Jiang, J. observa poblaciones celulares que co-expresan péptido C y somatostatina con el glucagón. A pesar de todo logran obtener respuesta a diferentes concentraciones de glucosa en ensayos de secreción de Péptido C, ya que no todas las células presentan doble marcaje y puede que se obtenga una población mezcla de células inmaduras y funcionales. En un intento por trasladar a las ESC humanas los protocolos que han venido utilizando Insulina-Transferrina-Selenio en el modelo murino, Jiang, W. y col., 2007 logran obtener células que expresan insulina, glucagón y somatostatina combinando el cultivo en monocapa y suspensión. Ensayos de secreción de insulina demuestran que las células en suspensión responden mejor que adheridas a distintas concentraciones de glucosa. Solo el 30 % de los ratones diabéticos transplantados consiguen normalizar la glucosa en sangre así como responder a un test de glucosa. No advierten presencia de tumores aunque extraen el injerto tras 42 días de experimento, tiempo insuficiente para probar la seguridad del procedimiento.

Otros trabajos dirigen la diferenciación a través de la formación de CEs añadiendo en los primeros días activina A (Phillips, B. y col., 2007 y Shim, J. H. y col., 2006) (Anexo, tabla 3). Los autores proponen la formación del CE por la necesidad de que existan interacciones celulares y una conformación tridimensional para la derivación del endodermo definitivo. Shim utiliza en su protocolo el ácido retinoico de manera similar a la publicación de Shi, Y. y col., 2005 en ESC de ratón, no observando

la presencia de hormonas pancreáticas hasta que las células diferenciadas a endodermo definitivo son transplantadas y posteriormente extraídas de los ratones utilizados en el trabajo, para su análisis. Por otro lado, obtienen poblaciones glucagón⁺/insulina⁺ con lo que cabe la posibilidad de que estén obteniendo un alto rendimiento de células inmaduras. De todos modos logran revertir la hiperglucemia en ratones diabéticos, aunque el tiempo de estudio es demasiado corto como para asegurar que no se formarán tumores utilizando su metodología. Phillips en cambio elabora un protocolo más complejo para la obtención de células productoras de insulina. En su trabajo logra observar expresión por RT-PCR de las hormonas del páncreas endocrino pero una variabilidad alta al comprobar la liberación de péptido C a distintas concentraciones de glucosa por medio de un ensayo de secreción, pudiendo ser debido a la presencia de una población mezcla de precursores y células maduras. Por último, la población Pdx1⁺ obtenida en su mayoría co-localiza con la citoqueratina 19, marcador extraembrionario, en experimentos no publicados. Hay que añadir que en estas dos publicaciones no utilizan los marcadores Cxcr4 o Amn para discriminar las poblaciones obtenidas.



1.6. CÉLULAS MADRE Y CÁNCER.

La teoría de la génesis del cáncer está siendo revisada en estos últimos años. Hasta ahora se pensaba que una progresiva acumulación de mutaciones genéticas en las células somáticas produciría tumorigénesis, pero existen pruebas de que este hecho no es del todo cierto, ya que la tasa de generación de mutaciones espontáneas en una célula somática es demasiado baja como para generar células cancerígenas. Por otro lado las células madre presentes en los organismos superiores, son candidatos probables como fuente de origen de la carcinogénesis debido a su alta tasa de autorenovación e ilimitada replicación con lo que pueden acumular un mayor número de mutaciones que las células somáticas (Erenpreisa, J. y col., 2007).

Una teoría alternativa del origen de la carcinogénesis se basa en la adquisición o pérdida de cromosomas extras (aneuploidía) por medio de la “neosis”, término que hace referencia a una nueva manera de replicación que puede dar origen a células tumorales basándose en errores de la mitosis que dan lugar a poliploidías aberrantes (Rajaraman, R. y col., 2006). Durante la adquisición del perfil poliploide de la célula (y más específicamente tetraploide) es más fácil en la siguiente generación obtener células aneuploides con características de indiferenciación temporales y por tanto con un elevado riesgo de carcinogénesis (Margolis, R. y col., 2003). La prueba reside en que un porcentaje muy elevado de cánceres humanos contienen células con un cariotipo anómalo (Lengauer, C. y col., 1998).

Las aneuploidías se pueden generar por errores en la maquinaria de control del ciclo celular (“checkpoint” en inglés). Este control asegura que la célula no progresa más allá de la fase G1 si el cómputo cromosómico va a resultar incorrecto. Se han descrito numerosas mutaciones de genes que codifican proteínas esenciales en varias fases de la mitosis como la formación incorrecta del huso mitótico, una duplicación errónea de los centrosomas, citoquinesis abortiva, etc., que provocan una segregación cromosómica aberrante (Cimini, D. y col., 2001 y 2004). Una ganancia cromosómica puede aumentar la dosis de ciertos genes y afectar a las funciones celulares, hecho que diferencia una célula madre normal de una tumoral. Las células madre tumorales, con algún tipo de

aneuploidía, pueden poseer defectos irreversibles en los inhibidores de ciclinas unido a errores en el control del ciclo celular, por lo que los procesos de diferenciación y apoptosis estarán pobremente regulados.

En cultivo *in vitro* de células madre humanas embrionarias o adultas se han observado, con el transcurso del tiempo, la aparición de anomalías cromosómicas (Draper, J. y col., 2004; Rubio, D. y col., 2005). Este hecho da pie a diseñar unos protocolos en los procesos de diferenciación dirigida, como aplicación en el campo de la terapia celular, que reúnan una serie de requisitos en materia de bioseguridad para minimizar, o lo que es mejor, suprimir, el riesgo de formación de tumores en seres humanos en los que se utilice esta herramienta para la medicina regenerativa. Por otra parte estos estudios con células madre *in vitro* podrían ayudar igualmente a comprobar los posibles mecanismos de aparición del cáncer, identificando los factores de inestabilidad que podrían afectar a las células madre adultas tanto *in vivo* como *in vitro*.





2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL.

El presente estudio tiene dos objetivos principales:

1- Optimizar los protocolos publicados de diferenciación de ESC hacia células productoras de insulina, a través de precursores de endodermo definitivo, para su posible uso futuro en terapia celular de la diabetes.

2- Caracterizar las células residuales pluripotenciales que persisten tras los protocolos de diferenciación de ESC, previamente identificadas en nuestro laboratorio por su alta expresión de Oct 3/4, para un mayor control de la bioseguridad en terapia celular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1- Estudiar la eficiencia de obtención de células endocrinas productoras de insulina tipo I, así como de otros marcadores del endodermo pancreático, como glucagón, en protocolos de diferenciación espontánea a partir de ESC de ratón.

2- Analizar de la misma forma, dos protocolos diseñados inicialmente para favorecer la diferenciación dirigida de ESC hacia el linaje endodérmico, tanto mediante sustitución del suero, como en segundo lugar, tras su cultivo con medios condicionados de rudimentos pancreáticos fetales.

3- Caracterizar las células obtenidas, tanto mediante los protocolos de diferenciación espontánea como dirigida que expresan marcadores endodérmicos, como la insulina o el glucagón.

4- Valorar las características pluripotenciales de las células residuales identificadas tras los protocolos de diferenciación (Oct4⁺). Este estudio se realizará en base a la posible formación de teratomas, la expresión de genes específicos y la actividad de rutas de señalización implicadas en la pluripotencialidad y la estabilidad cromosómica.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR.

3.1.1. LÍNEAS CELULARES.

Se utilizaron en cultivo las siguientes líneas celulares:

- Células madre embrionarias de ratón comerciales D3 (CRL-1934), derivadas de la masa celular interna del blastocisto y generadas por el grupo de T. Doetschman (Friedrich-Miescher- Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft Institute Alemania) (Doetschman, T. y col, 1985), depositadas en la *American Type Culture Collection* (ATCC).

- Células madre embrionarias de ratón comerciales R1 generadas por el grupo de A. Nagy (Mount Sinai Hospital, Toronto, Canadá) (Nagy, A. y col., 1993).

- Células alfa TC-1 clon 9 (CRL-2350), derivadas de glucagonoma de páncreas de ratón y depositadas en la ATCC por el grupo de E.H. Leiter (Jackson laboratory, Bar Harbor, ME).

- Células INS 1, derivadas de insulinoma de rata y generadas por el grupo de C.B. Wollheim (Universidad de Ginebra, Suiza) (Asfari, M. y col, 1992).

- Células tumorales obtenidas de teratoma formado por inoculación en ratón de células madre embrionarias R1 residuales, tras su selección previa con el constructo Oct4-GFP (Enseñat-Waser, R. y col., 2006).

3.1.2. MEDIOS DE CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES.

3.1.2.1. Medios de cultivo de las células D3.

En la tabla 1 se resume los diferentes tipos de medio de cultivo utilizados en el trabajo. Todos los reactivos fueron adquiridos de la casa Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), exceptuando el suero fetal bovino (Biochrom, Berlín, Alemania), el LIF

(Chemicon, Temecula, CA, USA), el 1-Thioglycerol (MTG) (Sigma, St. Louis, USA) y el Ácido ascórbico (Merck, Darmstadt, Alemania). Todos los reactivos exceptuando el LIF se esterilizaron por filtración (Millipore, Massachussets, USA)

Hay que destacar que el suero utilizado en las cuatro líneas celulares, una vez completamente descongelado, debe ser previamente descomplementado en un baño a 56°C durante 25 min, agitando cada 10 min.

Tabla 1.- Medios de cultivo de las ESC D3 y R1 utilizados en el trabajo

Reactivos	Solución origen	Medio de Indiferenciación	Medio de Diferenciación	Medio de Serodeprivación^a
DMEM (25mM Glucosa)	1x	1x	1x	1x
Suero fetal bovino	100%	15%	15%	-
Serum Replacement	100%	-	-	15%
Aminoácidos no esenciales	100x	1x	1x	-
β-Mercaptoetanol	50mM	0,1mM	0,1mM	-
Penicilina	10000 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml
Estreptomicina	10000 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
MTG	11M	-	-	0,45mM
Glutamina	200mM	-	-	2mM
Ácido ascórbico	250mM	-	-	0,5mM
LIF	10 ⁶ U/ml	10 ³ U/ml	-	-

a) Tomado de Ku, H. T. y col., 2004.

3.1.2.2. Medios de cultivo de las células alfa TC-1, INS 1 y STO.

En la tabla 2 se indica los componentes de los medios utilizados en el cultivo de estas tres líneas celulares. Todos los reactivos fueron adquiridos de la casa Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), exceptuando la glucosa (Merck, Darmstadt, Alemania), el bicarbonato sódico (Panreac, Barcelona, España), el piruvato de sodio y el β mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Tabla 2.- Medios de cultivo de las líneas celulares utilizadas en el trabajo

Reactivos	Solución origen	Medio de alfa TC-1	Medio de células INS 1	Medio de células STO
DMEM (5,5 mM Glucosa/l)	1x	1x	-	-
RPMI (11 mM Glucosa) + Glutamax	1x	-	1x	-
DMEM (25mM Glucosa)	1x	-	-	1x
Suero fetal bovino	100%	10%	10%	10%
Glucosa	1M	16,7 mM	-	-
Aminoácidos no esenciales	100x	1x	-	-
Hepes	100x	1x	1x	-
Penicilina/Estreptomicina	100x	1x	1x	1x
Glutamina	200mM	2mM	-	-
Bicarbonato sódico	-	1,5g/l	-	-
Piruvato de Sodio (100 mM)+ β Mercaptoetanol (5 mM)	100x	-	1x	-

3.1.2.2. Medio de cultivo de las células derivadas de teratoma a partir de R1 seleccionadas con Oct4_eGFP.

En la tabla 3 se indica los componentes del medio de cultivo utilizado en el cultivo primario y cultivo de las líneas celulares derivadas de los teratomas. Los reactivos son de la casa Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) excepto el suero fetal bovino (Biochrom, Berlín, Alemania).

Tabla 3.- Medios de cultivo para el cultivo primario de las células tumorales derivadas de la población residual R1 Oct3/4_eGFP.

Reactivos	Solución origen	Medio células tumorales
DMEM: NUT MIX F12 (1:1)	1x	1x
Penicilina	10000 U/ml	100 U/ml
Estreptomicina	10000 µg/ml	100 µg/ml
Suero fetal bovino	100%	20%

3.1.3. TRATAMIENTO DEL MATERIAL DE CULTIVO CELULAR CON GELATINA.

En los procesos de expansión celular y mantenimiento en estados de indiferenciación de las células madre embrionarias D3, se cultivaron en placas (Corning, NY, USA) y frascos de cultivo (TPP, Trasadingen, Suiza) tratados para el cultivo celular adherente. A dicho material se le realizó un proceso adicional añadiendo 8 ml de una solución de gelatina (Sigma, St. Louis, MO, USA) al 0,1% en 1X PBS (Biochrom, Berlín, Alemania) previamente atemperada a 37° C procurando que toda la superficie del material quedara en contacto con dicha solución, para favorecer así la adherencia celular. Se dejó 10 min incubando a temperatura ambiente y posteriormente se pasó a retirar la gelatina que no había solidificado. Rápidamente se añadió el volumen de medio de cultivo con el que se iba a trabajar para evitar que la gelatina se secase y disminuyera sus propiedades de adherencia celular.

Todos los pasos del tratamiento con gelatina se realizaron dentro de la campana de flujo para evitar contaminaciones. Es posible realizar este tratamiento sin eliminar la gelatina y guardar las placas a 37° C en un incubador estéril para su uso posterior.

3.1.4. DESCONGELACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES.

Tras preparar previamente el material de cultivo y los medios correspondientes, se descongelaron las células preservadas en crioviales en nitrógeno líquido. Para ello, y una vez extraídos del tanque, se descongelaron suavemente en un baño a 37°C y en agitación sin que llegaran a calentarse. A continuación se lavó bien el cierre del criovial con etanol al 70% para evitar posibles contaminaciones y se trabajó bajo la campana de flujo laminar.

Se preparó un tubo con 8 ml con medio de cultivo correspondiente a la línea que se iba a descongelar y se le añadió el volumen del criovial suavemente, para así diluir el DMSO que estaba presente en el medio de congelación celular. El tubo con dicha mezcla se centrifugó durante 3 min a 70xg y a continuación se eliminó el sobrenadante dejando el pellet celular. Las células se resuspendieron en 1-5 ml, dependiendo del experimento o utilización posterior, con los medios de cultivo correspondientes. A continuación se sembraron las células en los materiales de cultivo previamente preparados. Las placas de 100 mm suelen contener 10-12 ml de medio de cultivo mientras que los frascos de 75 cm² 12-15 ml. Las células se cultivaron en incubadores a 37°C y atmósfera de 5% de CO₂.

3.1.5. TRIPSINIZACIÓN Y CONGELACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES.

Debido a los procesos de proliferación celular, cada cierto periodo de tiempo las células deben sembrarse en otras superficies cuando las originales llegan a confluencia, es decir, cubren casi la totalidad de la superficie de la placa (80-90%). Para ello se despegan las células de la superficie de cultivo por tripsinización. También en el caso de congelar y conservar material de experimentación para futuros trabajos se debe realizar este proceso. Para ello se eliminó el medio de cultivo de las células en monocapa y a continuación se realizaron lavados con 1X PBS (tabla 4) para eliminar los restos de suero del medio que pudieran inhibir la acción de la tripsina. Tras eliminar el PBS se adicionó la solución de 0,05% Tripsina con 0,002% Na₄EDTA (Gibco, Invitrogen, Inglaterra).

Las células se incubaron con esta solución durante un periodo de tiempo variable, dependiendo de la línea celular (tabla 3) a 37°C preferiblemente dentro de un incubador de cultivos. Posteriormente se detuvo la reacción añadiendo el doble de medio de cultivo con suero. En algunos casos es aconsejable parar la reacción con un volumen de medio mayor, si el procedimiento se está aplicando a cultivos que rinden una alta densidad en suspensión, con la idea de facilitar su contaje posterior.

Tabla 4.- Condiciones de tripsinización.

Línea celular	Nº lavados con PBS	Volumen tripsina (ml)		Tiempo tripsinización (min)
		P100	Frasco75	
D3	2	1	1,5	3
INS 1	2	1	1,5	3
α TC1	2	1,5	2	5

La congelación de las líneas celulares se realizó añadiendo al medio de cultivo correspondiente de cada línea celular un 10% DMSO y 10% de suero. Tras tripsinizar y contar las células, se centrifugaron durante 3 min a 70xg, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron con el medio de congelación en un volumen conocido para obtener una concentración determinada de células por unidad de volumen (normalmente 3×10^6 células/ml). Posteriormente se repartió el volumen en los crioviales (TPP, Trasandingen, Suiza) y se mantuvieron aproximadamente 12 h en un ultracongelador a -80° C, en el soporte “Mr. Frosty” (Nalgene, Rochester, NY, USA), el cual, gracias a su contenido en isopropanol, permite la bajada de la temperatura de forma gradual hasta la congelación. Finalmente los crioviales se guardaron en un bidón con nitrógeno líquido (Locator Jr, Nalgene, Rochester, NY, USA) y se conservaron hasta su utilización.

3.1.6. CONTAJE Y VIABILIDAD CELULAR.

A la hora de resembrar las células tras tripsinizarlas - para formar CEs en el caso de las D3, congelarlas o realizar un determinado experimento - es necesario trabajar con

un número preciso de ellas. Para ello, y al obtener una suspensión homogénea de células, se mezclaron 20 µl de suspensión celular con 20 µl de una solución de colorante vital azul tripan 0,4% en 1X PBS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Tras mezclarlos bien, se cargaron 20 µl de mezcla en un hemo-citómetro de Neubauer y se procedió a contar las células bajo el microscopio, eliminando del conteo las células teñidas de azul o con una morfología irregular. Se contaron dos cuadrantes contrapuestos. El número de células por ml de cultivo se obtiene aplicando la fórmula siguiente:

$$\text{Concentración (número de células /ml)} = M \cdot 2 \cdot 10.000$$

Donde M es la media de las células contadas en los dos cuadrantes y el factor de dilución es 2, debido a que la mezcla entre el cultivo celular y el azul tripán es 1:1. Se multiplica por 10.000 para convertir los mm³ en ml.

3.1.7. EXPANSIÓN DE LA LÍNEA COMERCIAL DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS D3.

El uso de líneas comerciales de células madre embrionarias es preferible frente a las obtenidas directamente de la MCI a la hora de contrastar los resultados obtenidos por distintos laboratorios, debido a las diferencias observadas a la hora de aplicar diferentes protocolos.

Tras la recepción del criovial, el cual contiene las células congeladas mediante algún producto con propiedades anticongelantes que impide la destrucción de las células por la formación de cristales de hielo (normalmente se trata de DMSO), se almacenó éste en nitrógeno líquido para evitar procesos de descongelación hasta el momento de su uso.

Previamente a la descongelación de las células, se prepararon monocapas de fibroblastos inactivados para facilitar la posterior adhesión de las células y dar sustento nutritivo a éstas. Se utilizaron fibroblastos de la líneas STO inactivándolos con 10 µg/ml mitomicina C en el medio de cultivo (tabla 2) durante 4 h en un incubador a 37°C y

5% CO₂. Tras la descongelación de éstas, se eliminó el medio y se realizaron 5 lavados con 1X PBS para eliminar por completo la mitomicina C, ya que este compuesto resulta tóxico para las células. Mediante la adición de tripsina, se despegaron los fibroblastos de su soporte para ser contados y resembrados en un nuevo soporte a una densidad celular conocida (normalmente 80.000 células/ cm²). Las células se dejaron 12-24 h en el incubador para permitir su adhesión.

La descongelación de la línea de células madre embrionarias fue suave por inmersión del criovial en baño a 37° C evitando su calentamiento. La apertura de éste se realizó en campana de flujo laminar habiendo previamente lavado la apertura con etanol al 70% evitando así posibles focos de contaminación. Se sembró todo el contenido del criovial en una sola placa sobre la monocapa de fibroblastos inactivados y medio de indiferenciación (tabla 1). Las células se mantuvieron en un incubador vigilando que las condiciones de presión parcial de CO₂ estuvieran ajustadas al 5% y la temperatura a 37° C.

El cultivo se dejó progresar varios días hasta que se observaron al microscopio colonias de células madre embrionarias. El tiempo de aparición de dichas colonias depende de la cantidad de células suministradas por la casa comercial, así como del porcentaje de éstas que sobrevivan a los procesos de congelación y descongelación. Una vez se observaron las colonias características de bordes birrefringentes y ausencia de células individualizadas (Ver resultados, Fig. 3 A) se tripsinizaron para congelar aproximadamente 5×10^6 células por criovial con medio de congelación (tabla 1). Parte de las células se sembraron (5×10^5) en placas de 100 mm de diámetro tratadas con 0,1 % gelatina. Se les cambió el medio cada 2 días y se mantuvieron en cultivo durante 4-5 días, de esta forma se permitió que las células proliferaran con la idea de establecer una reserva de pases tempranos.

Se observó la presencia de fibroblastos en el cultivo a pesar de los sucesivos pases por lo que tras cada tripsinización se utilizó el medio de cultivo de indiferenciación sustituyendo el suero comercial completo por 15% de suero Knockout. Esto permitió la eliminación completa de los fibroblastos y el mantenimiento de una población pura de células madre.

Una vez que se obtuvo una población homogénea de células madre y libre de fibroblastos, se aislaron y expandieron colonias para obtener poblaciones lo más homogéneas posible. Estas colonias se expandieron con sucesivos pases en soportes, tratados con gelatina, cada vez con mayor superficie y congelando pases tempranos.

3.1.8. CULTIVO DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS DE RATÓN INDIFERENCIADAS.

Las células se cultivaron en placas de cultivo adherente previamente tratadas con gelatina en medio de indiferenciación (tabla 1) con una densidad aproximada de 13300 células/cm². Una vez sembradas y 24 h después, se cambió el medio de cultivo para eliminar aquellas células que no se hubieran adherido a la superficie de la placa y mantener el medio fresco. El medio de cultivo se puede cambiar cada día según el grado de consumo del mismo y el grado de densidad celular que se quiera alcanzar.

Es conveniente realizar cada dos días una tripsinización y resiembra en placa de cultivo si se quiere mantener éste durante un tiempo prolongado en estado desdiferenciado con el fin de evitar llegar a una confluencia alta que pueda repercutir en la diferenciación posterior.

3.1.9. CULTIVO PRIMARIO DE TUMORES OBTENIDOS A PARTIR DE R1 Oct4_eGFP.

El tumor proviene de la inoculación, en ratones inmunodeficientes, de ESC R1 transfectadas con el constructo Oct 3/4_eGFP y previamente seleccionadas por “cell sorting” (CR) a partir de cuerpos embrionarios disgregados (como se detalla en Enseñat-Waser, R. y col., 2006). Los ratones fueron inoculados con 10⁶ células por inyección intravenosa en cola tanto con ESC control como con células transfectadas Oct 3/4⁺ en ausencia de LIF.

El tumor se procesó para varios análisis: un fragmento para extracción del ARN total, un segundo para su fijación en formol pH 7 (J.T. Baker, Deventer, Holland) y posterior análisis de la anatomía patológica y por último un tercer fragmento para su cultivo primario con el medio especificado en tabla 4.

A los fragmentos obtenidos para cultivo primario se les aplicó dos procedimientos de disgregación diferentes. Por un lado una disgregación mecánica por maceración con el propio medio de cultivo y con ayuda de un filtro de 100 μm , se contaron las células y se sembraron 10^6 células/ P100 (TPP, Trasadingen, Suiza). Por otro lado se aplicó una disgregación enzimática, obteniendo con el bisturí fragmentos más pequeños e incubando con 0,05% Tripsina con 0,002% Na_4EDTA (Gibco, Invitrogen, Inglaterra) durante 5 min. a 37° C. Posteriormente se contó el número de células viables y se sembraron 6×10^6 células/ P60 (TPP, Trasadingen, Suiza).

La línea tumoral (CRT) se mantuvo en cultivo hasta que se obtuvo una densidad celular apropiada para su congelación con las condiciones descritas en el apartado 3.1.5.

3.1.10. ELECTROPORACIÓN Y SELECCIÓN.

Se cultivaron las células madre embrionarias D3 en placas de 100 mm tratadas con gelatina a una densidad de 9×10^3 células/ cm^2 durante 3 días en presencia de medio de indiferenciación.

Durante ese periodo de tiempo de cultivo se procedió a linearizar 25 μg del vector GB2 (Vaca, P. y col., 2006) con *KpnI* (Fermentas, MD, USA). El vector incorpora la resistencia a neomicina bajo el control del promotor de la insulina humana. Tras la linearización se precipitó la digestión con 70% etanol (J. T. Baker, Deventer, Holland) y 0,3 M acetato sódico pH 5,2 (Sigma, St. Louis, USA) durante 24 h. Posteriormente se centrifugó la digestión a 16.000xg durante 15 min y se realizó un lavado con 1ml de 75% etanol. Finalmente se centrifugó el ADN a 16000 g durante 10 min y se resuspendió el pellet en 100 μl de 1X PBS en condiciones estériles.

Las células se tripsinizaron y se procedió a contar 13 millones para resuspenderlas en 900 μl de 1X PBS estéril. Posteriormente se mezclaron las células con todo el volumen del vector linearizado en una cubeta de electroporación de 0,4 cm previamente enfriada. La mezcla se dejó en hielo 5 min y se procedió a realizar el protocolo de electroporación mediante el Electro Square Porator (ECM 830, CA, USA)

con un pulso de 250 V durante 1 ms. Finalmente se dejaron reposar las células en hielo durante 10 min y posteriormente se sembraron en 4 placas de 100 mm tratadas, con medio de indiferenciación (tabla 1).

Tras 24 h de cultivo, se cambió el medio a las placas y se les añadió 200 µg/ ml de hygromicina (Sigma, St. Louis, USA) para iniciar el proceso de selección de células transfectadas. Se mantuvo la presión selectiva durante 4 días y al quinto se clonaron y se disgregaron con tripsina las colonias resistentes, sembrándolas en placas de menor diámetro para permitir la proliferación. Una vez obtenidos clones con un número satisfactorio de células, se procedió a su congelación.

3.1.11. PROTOCOLOS DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS.

En el presente trabajo se siguieron tres protocolos de diferenciación distintos tal y como se indica en el esquema 11.

3.1.11.1. PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN ESPONTÁNEA.

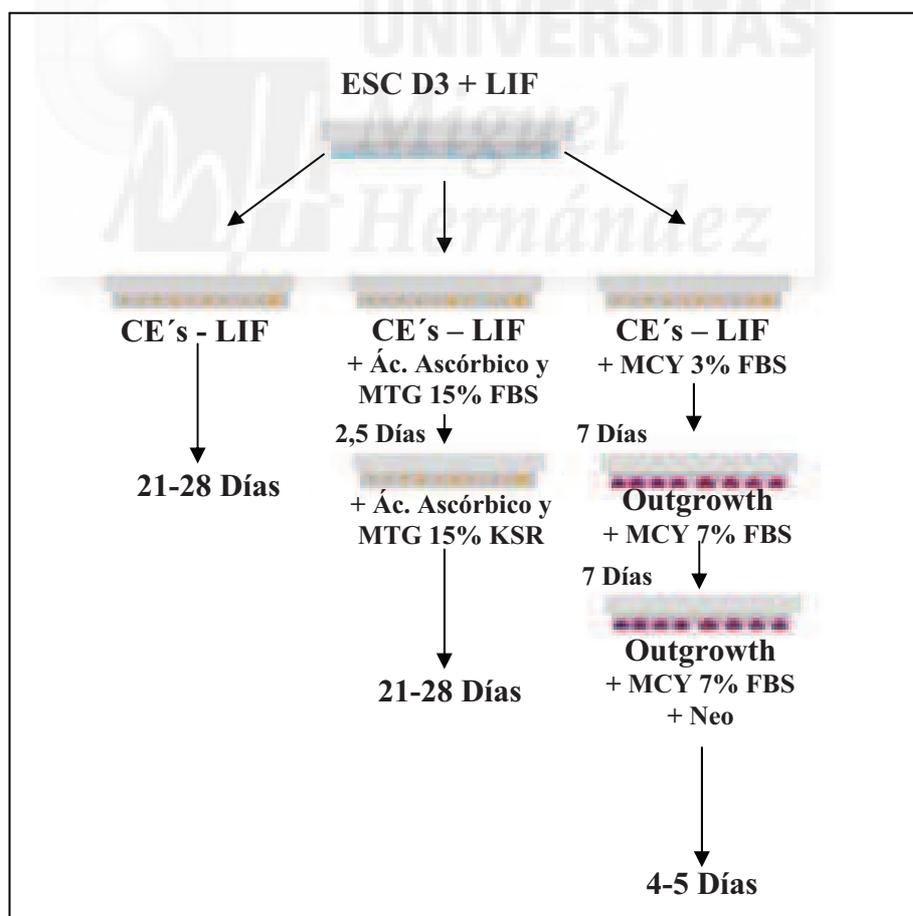
Una vez obtenida una población de células madre embrionarias indiferenciadas de óptima calidad, se tripsinizaron y se sembraron en placas no tratadas (Deltalab, Barcelona, España) 5×10^4 células/ ml con medio de diferenciación (tabla 1). Se permitió la formación de CEs y se mantuvieron en cultivo durante 21-28 días.

3.1.11.2. PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN POR SUSTITUCIÓN DEL SUERO POR UN ANÁLOGO SINTÉTICO.

El protocolo utilizado es el publicado por Ku, H. T. y col. 2004 donde se obtenía células que expresaban insulina tipo I por RT-PCR en los pasos iniciales de la diferenciación. Para ello se sembraron 5×10^4 células/ml con medio de serodeprivación (tabla 1) añadiendo 15% FBS en los primeros 2,5 días y así permitir la formación de los CEs, para luego sustituirlo por el 15% KSR. Los CEs se mantuvieron en cultivo durante 21-28 días.

3.1.11.3. PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN MEDIANTE MEDIO
CONDICIONADO DE RUDIMENTOS PANCREÁTICOS DE
16,5 DÍAS.

El protocolo está basado en el trabajo de Vaca, P. y col., 2005 donde las células D3 previamente transfectadas con la construcción genética GB2, se cultivaron en presencia del medio obtenido del cultivo de rudimentos pancreáticos de ratón de 16,5 días (Apartado 3.1.12), tanto en la fase de CE (5×10^4 ó $1,5 \times 10^6$ células/ml) con el 3% de FBS durante 7 días, como posteriormente en la de “outgrowth” durante otros 7 días y 7% de FBS. Se combinaron condiciones de cultivo en presencia de un cocktail de inhibidores de proteasas: 1 μ M leupeptina, 20 μ g/ ml aprotinina y 1 μ M pepstatina, todas de la casa Sigma. Tras los 14 días de cultivo se procedió a seleccionar con 200 μ g/ml ó 2,3 mg/ml neomicina (Sigma, St. Louis, USA) las células diferenciadas durante 4-5 días.



Esquema 11.- Figura representativa de los protocolos de diferenciación utilizados en el trabajo. CE's: Cuerpos Embrionarios; MCY: Medio condicionado de rudimentos pancreáticos.

3.1.12. OBTENCIÓN DE MEDIO CONDICIONADO DE RUDIMENTOS PANCREÁTICOS.

Se aislaron los rudimentos pancreáticos de fetos de día 16.5 p.c. pertenecientes al linaje OF1. Los rudimentos se cultivaron en placas de 24 multipocillos en un número de 7-8 y con 1 ml de medio DMEM (1000 mg/l glucosa), 3% FBS, 1X Penicilina/Estreptomicina, 0,1 mM β -Mercaptoetanol y 1X Aminoácidos no esenciales por pocillo.

Se recogieron 0,5 ml de medio y se repusieron 0,5 ml en cada pocillo todos los días durante 10 d. El medio se congeló a -80° C hasta su utilización. Posteriormente se diluyó el medio condicionado con medio de cultivo de los rudimentos en una proporción 1:1 y se esterilizó pasando por una unidad de filtración de 0,22 μ m (Millipore, Massachussets, U.S.A.). Se realizaron alícuotas de 1ml y de nuevo se congelaron a -80° C.

3.1.13. MICROSCOPIA.

La observación de las células se realizó bajo un microscopio invertido de contraste de fases de la casa Nikon (Badhoevedorp, Netherland), modelo Eclipse TE200, conectado a una cámara digital Kappa DX30 (Kappa, Gleichen, Alemania). La cámara se controla por ordenador gracias al programa Kappa Image Base, versión 2.5.2.

3.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

3.2.1. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.

Se utilizó el reactivo Tripure (Roche, Basel, Suiza), siguiendo un protocolo que difiere en algunos aspectos de las recomendaciones del fabricante. Una vez obtenido el pellet de células o CEs en un eppendorf libre de RNAsas se pasó a:

- 1.- Adicionar 1 ml de Tripure (si se obtiene un pellet formado por menos de 1 millón de células se adicionarán 0,8ml)
- 2.- Lisar el pellet repipeteando en caso de ser células individualizadas u homegeneizando en el caso de CEs.
- 3.- Incubar 5 min a temperatura ambiente.
- 4.- Adicionar 200 μ l de cloroformo por cada ml de Tripure y agitar durante 15 s.
- 5.- Incubar 10 min a temperatura ambiente.
- 6.- Centrifugar durante 15 min a 4° C a 12.000xg
- 7.- Obtener la fase superior que contiene el ARN total (alrededor de 400 μ l) y transferirlo a un eppendorf libre de RNAsas.
- 8.- Precipitar con 500 μ l de isopropanol a -20° C e invertir varias veces.
- 9.- Incubar 8 min a temperatura ambiente.
- 10.- Centrifugar durante 10 min, a 4 ° C y a 12.000xg.
- 11.- Descartar el sobrenadante, adicionar 1ml de 75% etanol (con agua tratada con DEPC que se le añade al agua al autoclavar para eliminar RNAsas) a -20° C y agitar.
- 12.- Centrifugar durante 5 min, a 4° C y a 7.500xg.
- 13.- Secar el pellet al aire durante 5 min (eliminar restos de etanol pipeteando).
- 14.- Resuspender el pellet con 25 μ l de agua DEPC.
- 15.- Incubar la solución a 58° C durante 12 min y guardar a -80° C.

3.2.2. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE ARN TOTAL.

Se diluyó el ARN con el tampón 1X TNE (10 mM Tris pH 7,4; 0,2 M NaCl y 1 mM EDTA) a una concentración de 1:200 para realizar la cuantificación de su densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm usando un espectrofotómetro SmartSpec 3000 (BioRad, CA, USA). El ratio entre las absorbancias a las longitudes de onda de 260 y 280 nm (260/280) debe encontrarse en torno a 2.

3.2.3. ELECTROFORESIS DE ARN TOTAL EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.

Para comprobar si existe una posible degradación en el ARN total obtenido, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes. El gel donde se corren las muestras está compuesto de:

- 1% Agarosa (Seakem LE, Cambrex, Rockland, USA)
- 1X tampón MOPS
- 2,2 M Formaldehído (J.T. Baker, Deventer, Holland)
- Agua bidestilada
- 0,5 µg/ml Bromuro de etidio (Amresco, Solon, Ohio, USA)

El tampón MOPS se preparó al 10X con 0,04 M MOPS, 0,01 M acetato sódico y 1 mM EDTA, todos los reactivos de la casa Sigma (Steinheim, Germany). Se cargaron 2 µg de ARN total a los que se les adicionaron un tampón de carga compuesto por 0,5 M acetato amónico (Merck, Darmstadt, Germany), 1,1 M formaldehído, 35% glicerol (J.T. Baker, Deventer, Holland) y azul de bromofenol (Biorad, Richmond, California, USA).

El gel se sumergió en un tampón de MOPS 1X y se le aplicó una corriente de 80 V dejando que las muestras migraran durante 45 min. Para la visualización del gel se utilizó una lámpara de ultravioleta GelDoc 2000 (Biorad, Hercules, CA, USA) conectada al programa GelQuant (BioRad, Hercules, CA, USA) de análisis de imagen. Se comprobó la aparición de las dos bandas correspondientes a los ARN ribosómicos que se encuentran en mayor proporción en el ARN total (18S y 28S), así como la proporción 2:1 en intensidad de ambas bandas indicando la calidad del ARN de partida.

3.2.4. RETROTRANSCRIPCIÓN DE LOS ARNs MENSAJEROS.

Para la obtención del ADN complementario de los ARNs mensajeros, tras la extracción, se siguió el protocolo del kit de la Expand Reverse Transcriptase (Roche, Indianápolis, USA). Para ello se utilizó un 1µg de ARN total siguiendo el protocolo:

- 1.- Añadir a un eppendorf el volumen que contenga 1µg de ARN total.
- 2.- Añadir la mezcla de polidTs (Roche, Basel, Suiza) a una concentración final de 1,9 µM.
- 3.- Añadir agua DEPC hasta un volumen total de 10,5 µl
- 4.- Incubar en un termociclador a 65° C durante 10 min para la hibridación de los polidTs con las colas de poliA de los ARNs mensajeros.
- 5.- Añadir a cada muestra una concentración final de: 1X Tampón de reacción, 10 mM DTT, 1mM dNTPs (Takara, Shiga, Japón), 1U/ µl RNaseOUT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 2,5U/ µl del enzima retrotranscriptasa.
- 6.- Incubar en el termociclador a 37° C durante 1 h y posteriormente a 93° C durante 5 min para desactivar el enzima
- 7.- Guardar las muestras, previamente rotuladas, a -20° C.

3.2.5. DISEÑO DE CEBADORES PARA RT-PCR.

Los cebadores utilizados en el trabajo se diseñaron con el programa Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, CA, USA.) y se solicitaron a la empresa Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Para el diseño de los cebadores se siguieron los siguientes puntos:

- El tamaño de cada cebador fue aproximadamente de 20 pares de bases.
- La composición de G + C de cada cebador no supone más del 60% de las bases totales.

- La temperatura de hibridación (T_a) de cada cebador fue calculada en base a la diferencia de entre 5 – 7 °C menos a las de sus propias temperaturas de fusión (T_m). Para ello, se diseñaron cebadores con temperaturas de fusión aproximadas a 63 – 70° C.
- Para aumentar la eficiencia de la reacción se procuró terminar el extremo 3' en G o C.
- Se comprobaron posibles hibridaciones entre los cebadores (dímeros de cebadores) o intracebador (horquillas) ya que disminuyen la eficiencia de la reacción y generan artefactos de amplificación.
- Se comprobaron posibles hibridaciones con otros ADNc por medio del programa en red, BLAST proporcionado por la NIH.
- El tamaño del producto amplificado para una PCR convencional se diseñó en torno a 100 – 600 pares de bases.

Los cebadores fueron enviados liofilizados por la empresa fabricante. Tras su recepción se resuspendieron en campana y en condiciones de esterilidad con tampón TE (10 mM Tris y 2mM EDTA pH 7,5). La resuspensión se llevó a cabo a una concentración final de 100 μ M (100pmoles/ μ l) para cada cebador (sentido y antisentido). Se realizaron diluciones de trabajo de cada cebador a 25 μ M con tampón TE y se mantuvieron a -20° C.

Tabla 5.- Cebadores y condiciones utilizados en las RT-PCRs de la presente tesis.

Gen	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')	Ta (°C)	Ciclos	Amplificación (pb)	Número de acceso
Amnionless	ACTGCCTCCAACCTGGAACCAGAAC	CGCAGAGGTCACAGCATTGTCCTT	62	35	667	BC087954,1
b-Actina	GTGGGCCCGCCCTAGGCACCA	CTCTTTGATGTCACGCACGATTC	62	25	539	NM_007393.1
Brachyury	GCTCATCGGAACAGCTCTCCAACC	GGAGAACCAGAAGACGAGGACGTG	61	30	319	NM_009309
Dazl	GCCAGCACTCAGTCTTCATC	GTTGGAGGCTGCATGTAAGT	57	30	419	NM_010021.2
Flk1	CAGCCAGACAGACAG TGGGATGGTC	CCGAGGCCACAGACT CCCTGCTT	63	35	124	NM_010612
GATA6	CTCCATGGGGTGCCTCGACCA	GGAAGTAGGAGTCATAGGGACAGAGCCAC	63	35	135	NM_010258
Glucagón	GAGAGGCATGCTGAAGGGACC	CATCCCAAGTGACTGGCACGAG	62	35	313	NM_008100
Glucagón Cuantitativa	GGTCCTTCTCTGACGAGATGAGCAC	CTGGCACGAGATGTTGTGAAGATGG	61	40	141	NM_008100
Insulina I	TAGTGACCAGCTATAATCAGAG	ACGCCAAGGTCTGAAGGTCC	58	38	288	NM_008386
Insulina II	CCCTGCTGGCCCTGCTCTT	AGGTCTGAAGGTCACCTGCT	60	38	212	NM_008387
Nanog	AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG	CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG	63	30	363	NM_028016
Neurofilamento M	CTTTCCTGCGGCGTAATCACGAA	GGAGTTTCTGTACGCGGCG	63	35	518	NM_008691
Neurofilamento M Cuantitativa	CAGCAGCTACCAGGACACCATC	CCAGGGCCATCTTGACGTTA	61	40	115	NM_008691
Oct 3/4	TTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA	GACAACAATGAGAACCCTCAGGAGA	60	25	217	GI_53500
PC1	CTTCTCAACCAGAGCACATGAAGCAG	GGGTACCAGGAGATTGCCATTCAG	60	30	146	NM_013628.2
PC2	GACGGTGGCAGCTACGATGACTGC	CGGAGCAGCTGCAGATGTCCA	62	30	237	NM_008792
Vasa	GGCAAAGAAAAGATTGGCCT	GGGTTTGGCGTTGTTCTT	62	30	141	NM_010029

3.2.6. RT-PCR CONVENCIONAL.

Se utilizaron los ADN complementarios como molde de la reacción de polimeración. Para la PCR se utilizó el kit de la Expand High Fidelity (Roche, Basel, Suiza). El volumen del molde para cada reacción fue de 1 µl añadiendo los siguientes reactivos:

- 1X Tampón con MgCl₂
- 0,2 mM dNTPs (Takara, Shiga, Japón)
- 0,5 µM Cebadores (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- 0,052U/ µl Taq polimerasa

Para la amplificación de los ADN complementarios se utilizó el termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA, USA). Se utilizó el siguiente

protocolo estándar de amplificación, donde solo varía la temperatura de hibridación (Ta) de los cebadores, ya que es específica de éstos, y el número de ciclos:

Tabla 6.- Condiciones de los distintos segmentos de la RT-PCR convencional

	1 Ciclo	n Ciclos	1 Ciclo
Segmentos	95° C/ 5 min.	94° C/ 0,5 min.	72° C/ 10 min.
		Ta° C/ 0,5 min.	
		72°C/ 1,5 min.	

Los productos de PCR se mezclaron con idéntico volumen de tampón de carga 1X (MO BIO, Carlsbad, CA, USA.) y se cargaron en un gel de 2% de agarosa (Seakem LE, Cambrex, Rockland, USA) en tampón 0,5X TBE (Eppendorf, Hamburg, Germany) con 0,5 µg/ ml bromuro de etidio. Se aplicó a la electroforesis un voltaje de 80 V y se dejó migrar durante 60 min. La visualización de los productos de PCR se realizó bajo el programa GelQuant (BioRad, Hercules, CA, USA) antes descrito.

3.2.7. RT-PCR A TIEMPO REAL.

Del mismo modo que en la RT-PCR convencional, se utilizaron los ADN complementarios como molde de la reacción utilizando el kit de LightCycler FastStart DNA. Master Plus, Syber Green (Roche, Basel, Suiza).

El volumen del molde para cada reacción fue de 1 µl añadiendo los siguientes reactivos:

- 20% Mix (contiene Syber green, polimerasa, dNTPs y el tampón)
- 0,5 µM Cebadores (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

La amplificación de los ADN complementarios se llevó a cabo mediante el termociclador Light Cycler (Roche, Basel, Suiza). Se utilizó el siguiente protocolo estándar de amplificación, donde solo varía la temperatura de hibridación (Ta) de los cebadores, ya que es específica de éstos, y el número de ciclos:

Tabla 7.- Condiciones de los distintos segmentos de la RT-PCR a tiempo real.

	1 Ciclo	n Ciclos	1 Ciclo
Segmentos	95° C/ 10 min.	95° C/ 10 seg.	95° C/ 0 seg.
		Ta° C/ 7 seg.	63° C/ 15 seg.
		72°C/ 12 seg.	95° C/ 0 seg.

Los resultados se analizaron en el software Light Cycler 4.0 (Roche, Basel, Suiza), comprobando que los productos de amplificación obtenidos eran específicos mediante la curva de fusión. Todo amplicón tiene un punto característico de fusión debido a su tamaño y al contenido de bases que lo componen, el cual aparece como un pico de fluorescencia específico a una determinada temperatura donde la mitad de las hebras de ADN están hibridadas.

La cuantificación de la expresión relativa de los genes se basó en el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ publicado por Livak, K. y col., 2001.

3.2.8. CARIOTIPADO.

El número de cromosomas de las células fue obtenido a partir del bandeo por tinción con Giemsa de 60 células en metafase de cada condición de análisis. En primer lugar, las células fueron expuestas a 0,5 µg/ml de colchicina durante 4 h. a 37° C, posteriormente se prepararon las metafases con un protocolo de citogenética convencional fijando las células en una solución 3:1 de metanol y ácido acético en cubres de vidrio. Los cubres fueron tratados con un kit para cariotipado (Applied Spectral Imaging, Migdal Ha'Emek, Israel). Finalmente las imágenes fueron obtenidas mediante un microscopio (Zeiss Axioplan) conectado a un programa de adquisición de imágenes (SD 3000 Spectra Cube, Applied Spectral Imaging).

3.2.9 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN SDS-PAGE.

Tras recoger las muestras celulares obteniendo un pellet por centrifugación, éstas se trataron con un tampón de lisis compuesto por: 1% detergente NP40 (Sigma,

Steinheim, Germany), 1% inhibidores de proteasas (Roche, Basel, Suiza) y agua MQ. La muestra se introdujo en hielo y se le aplicó una fuente de ultrasonidos (Hielscher ultrasonics GMBH, Teltow, Germany) durante 3 ciclos de 10 seg. (0,6 ciclos y 40% de amplitud). Se incubó en hielo durante 15 min y posteriormente se centrifugó a 16.000xg para obtener el sobrenadante. La concentración de proteína se midió por el método de Bradford.

Se cargaron 40 µg de proteína por calle en un gel de poliacrilamida (Biorad, CA, USA) compuesto de dos partes: una separadora al 8% de poliacrilamida y una concentradora al 5% de poliacrilamida encastrado en los soportes de minigeles de BioRad (CA, USA). Se aplicó una corriente de 70 V durante 30 min para que la muestra penetre en el gel y posteriormente 90 min a 120 V en un tampón de electroforesis (25 mM Trizma base, 192 mM Glicina y 0,1 % SDS, todos los componentes de Sigma y disueltos en agua destilada).

El revelado del gel se realizó mediante tinción de plata. Para ello, en primer lugar, se fijó el gel con 12% ácido tricloroacético (Scharlau Chemie, Sentmenat, Barcelona) durante 16 h. en agitación. Posteriormente se realizaron 2 lavados de 20 min. en agitación con 50% etanol y otros dos lavados con 10% etanol. A continuación se procedió al paso de sensibilización con la incubación de 1 min. en 0,02% tiosulfato sódico (Panreac, Barcelona, España) y dos lavados de 20 seg. con agua destilada. La tinción con 0,2% nitrato plata (Panreac, Barcelona, España) y 0,1% formaldehído (Panreac, Barcelona, España) se llevó a cabo en oscuridad durante 30 min. Finalmente el revelado del gel se realizó con 3% Na₂CO₃ (Panreac, Barcelona, España), 0,01% formaldehído y 0,0004% tiosulfato sódico.

3.2.10. WESTERN BLOT DE GLUCAGÓN, GLP1 Y STAT3.

Tras la electroforesis en PAGE-SDS de los extractos proteicos de las muestras a analizar (Ver apartado 3.2.9), se procedió a transferir las proteínas del gel a membranas de PVDF (Amersham, Buckinghamshire, England) con el tampón de transferencia (25 mM Trizma base, 192 mM Glicina de Sigma y 20 % Metanol de J.T. Baker, disuelto en agua destilada) en agitación y a una intensidad de corriente de 12 mA durante 16 h. Las

membranas se bloquearon con una solución de leche semidesnatada 1,5% grasa, 10X PBS y agua destilada, en agitación durante 2 h.

Posteriormente se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios contra STAT3 y STAT3 fosforilado, ambos de la casa Cell signaling technology (Danvers, USA) a una concentración de 1:1000 y 1:300 respectivamente, contra glucagón (Sigma, Steinheim, Germany) a una concentración 1:700 o contra GLP1 (Alpha diagnostic, San Antonio, TX, USA) a una dilución de 1:50, siempre en la misma solución de bloqueo y en agitación a 4° C durante 16 h. Las membranas se lavaron y se incubaron con un anticuerpo secundario frente a conejo y marcado con peroxidasa (Sigma, Steinheim, Germany) a una concentración de 1:2000 durante 1 h en agitación. Finalmente se lavaron las membranas y se procedió a revelar según indica la casa comercial del kit ECL plus (Amersham, Buckinghamshire, England).



3.3 INMUNOCITOQUÍMICA.

Para la realización de técnicas inmunocitoquímicas con el fin de co-localizar marcadores celulares se facilitó la adhesión y proliferación de los CEs de días 21 o 28 en cubres de vidrio tratados con 0,1 mg/ml poli-L-Lisina, 0,01% Fibronectina y 0,2% gelatina todo de la casa Sigma, Steinheim, Germany; en 1X PBS, dejándolos en cultivo entre 7 a 17 días.

Posteriormente se eliminó totalmente el medio y se realizaron 2 lavados de 5 min con 1X PBS en agitación para eliminar las impurezas del medio. Las células se fijaron con 4% PFA (Panreac, Barcelona, España) a 4° C durante 16 h. Se eliminó el PFA con dos lavados con 1X PBS durante 5 min en agitación y se continuó con el proceso de permeabilización mediante 0,05% Tritón (Sigma, Steinheim, Germany) en 1X PBS durante 6 h a 4° C. Tras 2 lavados con 1X PBS en agitación durante 5 min, las células se bloquearon con una solución al 10% de suero de cabra y 3% BSA ambos de Sigma, Steinheim, Germany en 1X PBS durante 1 h a 4° C. Los cubres se volvieron a lavar 2 veces con 1X PBS durante 5 min en agitación.

Los anticuerpos primarios se diluyeron según la tabla 6 en 1X PBS y se añadieron 100 µl por cubre intentando que toda la superficie quedara expuesta al anticuerpo. Se dejó incubando 16h a 4° C. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 min con 1X PBS en agitación para eliminar el anticuerpo primario y se continuó con la incubación de los anticuerpos secundarios según las diluciones de la tabla 7 en 1X PBS, durante 30 min y en oscuridad. Se eliminó el anticuerpo secundario con 3 lavados de 15 min en agitación y oscuridad.

Finalmente se incubaron las células con 1 mg/ml Hoescht 33258 (Sigma, Steinheim, Germany) para teñir los núcleos durante 3 min en oscuridad. Se lavaron los cubres 3 veces durante 5 min cada una en 1X PBS en agitación y oscuridad. Se montaron sobre portaobjetos con el kit Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA) para preservar la fluorescencia y se guardaron a -80° C hasta su visualización. Las muestras se observaron bajo microscopio de fluorescencia (Olympus AX70, PA, USA) adquiriendo las imágenes con el software DP-SOFT 3.2 (Olympus, PA, USA).

Tabla 8.- Anticuerpos primarios utilizados en las técnicas de inmunocitoquímica

Anticuerpo primario	Animal inmunizado	Dilución de trabajo	Casa comercial
GFAP	Ratón	1:200	Becton-Dickinson
GLP-1	Conejo	1:50	Alpha Diagnostic
Glucagón	Ratón	1:200	Sigma
Nef 200	Conejo	1:200	Sigma

Tabla 9.- Anticuerpos secundarios utilizados en las técnicas de inmunocitoquímica

Anticuerpo secundario	Fluoróforo	Dilución de trabajo	Casa comercial
Anti Ig G conejo	Cy3	1:500	Becton-Dickinson
Anti Ih G conejo	FITC	1:500	Jackson
Anti Ig G ratón	Alexa F 488	1:100	Molecular probes
Anti Ig G ratón	Cy3	1:500	Jackson

3.4 TINCIONES CELULARES.

3.4.1 DETECCIÓN DE FOSFATASA ALCALINA.

La detección de la actividad de la fosfatasa alcalina del citosol celular se realizó mediante un kit comercial de la casa Vector (Alkaline phosphatase substrate kit I, Vector laboratories, Burlingame , CA, USA). Los cubres de vidrio se trataron con 0,2% gelatina en 1X PBS en placa de 6 multipocillos (Corning, NY, USA) durante 10 min. Posteriormente se retiró la gelatina no solidificada y se adicionó el medio de cultivo. Las células se sembraron en un número de 1×10^5 células/pocillo y se dejaron crecer durante 48-72 h.

Se retiró el medio y se realizó un lavado con 1X PBS para a continuación proceder a la fijación con 4% PFA durante 15 min. Posteriormente se realizó un lavado con 100mM Tris-HCl a pH 8,3 (Sigma, Madrid, España) y se añadió la solución del sustrato de la fosfatasa alcalina incubando las células en oscuridad y a temperatura ambiente durante 25 min. Finalmente se lavaron de nuevo los pocillos con la solución 100mM Tris-HCl y se pasó al montaje de los cubres con un medio especial para fluorescencia (Vectashield, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA).

Las células se observaron bajo microscopio de fluorescencia (Olympus AX70, PA, USA).

3.5 ENSAYO DE SECRECIÓN Y CONTENIDO DE INSULINA MEDIANTE RADIOINMUNOENSAYO.

Las células en las que se realizó el ensayo se cultivaron en placas 24 multipocillos (TPP, Trasadingen, Suiza) en una densidad de 2×10^5 células/ pocillo y con un medio bajo en glucosa (5 mM) durante 24 h.

Posteriormente se lavaron los pocillos con el tampón 1X KRB (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 25 mM Hepes de la casa Sigma; 1,2 mM KH_2PO_4 y 1mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ de Merck y 5mM $NaHCO_3$ de Panreac) durante 5 min. A continuación se realizó el ensayo de secreción de insulina cultivando las células con distintas concentraciones de glucosa y 0,1 % BSA (Sigma, St. Louis, USA) en 500 μ l de tampón KRB durante 30 min a 37° C y 5 % CO_2 . Los medios se recogieron y se centrifugaron a 800xg durante 5 min, para congelar aproximadamente el 80 % del volumen total a -80° C y así descartar posibles células flotantes. A las células de los pocillos se les añadió 500 μ l de etanol ácido (72 % etanol y 0,2 N HCl disuelto en agua destilada) y se incubaron 16 h a 4° C. Finalmente las células se rasparon y se congelaron con el etanol ácido a -80° C para así determinar el contenido de insulina total. Paralelamente se obtuvieron pellets celulares de los pocillos en las condiciones estudiadas, de donde se obtuvieron extractos proteicos totales (ver apartado 3.2.9) para reflejar los datos frente a proteína en el caso de que el contenido de insulina total fuera escaso.

La determinación de la insulina, contenida en las células como presente en el medio, se realizó mediante radioinmunoensayo (RIA) utilizando para ello el kit comercial Coat-A-Count (Siemens, CA, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo se basa en la competición por el anticuerpo específico de la insulina que se encuentra pegado en los tubos del kit, entre la insulina a determinar frente a la que se suministra en el kit y marcada con I^{125} . Por tanto a mayor concentración de insulina presente en los medios o intracelularmente, menos insulina radiactiva competirá por el anticuerpo.

El medio que contiene la insulina secretada no se diluyó mientras que la insulina contenida en las células se diluyó a 1:75 con tampón KRB. Todas las muestras se mezclaron con la insulina marcada con I^{125} . La medida de las cuentas radiactivas por minuto se obtuvieron mediante un contador de partículas gamma (Pakcard Cobra II B5005, MI, USA). Posteriormente se intrapolaron los datos a la curva patrón que se obtiene con concentraciones conocidas de la insulina no marcada del kit comercial, para obtener la concentración final en las muestras analizadas.





4. RESULTADOS

4.1 EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE ENDODERMO DEFINITIVO DURANTE LA DIFERENCIACIÓN ESPONTÁNEA DE ESC D3.

La calidad de las ESC murinas con las que se trabajó fue un factor a tener en cuenta ya que es clave evitar un compromiso inicial a ciertos linajes embrionarios. Este hecho ocurre cuando se utilizan ESC de pases prolongados, donde las propiedades pluripotentes se pierden y las células suelen comprometerse espontáneamente a linajes neuroectodérmicos (Roche, E. y col., 2005)). Los marcadores de pluripotencialidad Oct 3/4 y Nanog se expresaron en las ESC D3 cultivadas en monocapa y en presencia del factor LIF (Fig. 1 A) detectando al mismo tiempo un alto nivel de fosfatasa alcalina (Fig 1 B), indicando el estado indiferenciado de la población. Por otro lado, marcadores específicos del endodermo extraembrionario (Amnionless) (Kalantry, S. y col., 2001), de la línea germinal (Vasa) (Tanaka, S. y col., 2000), endodermo definitivo (preproglucagón), neuroectodermo (Neurofilamento M) y mesodermo (Flk1) no se expresaron en estas condiciones, comprobando de esta forma que la población inicial está indiferenciada (Fig. 1 A). Igualmente tampoco se observó expresión de insulina tipo I y II.

La formación de agregados celulares denominados cuerpos embrionarios (CEs) favorece la diferenciación espontánea a distintos linajes, por ejemplo: células que expresan glucagón. En cambio, mediante la diferenciación en monocapa en ausencia de LIF no se observó expresión de este marcador (Fig. 2). La diferenciación espontánea en monocapa tiende a dirigir las células mayoritariamente hacia neuroectodermo tal como se observó por la morfologías presentadas en cultivo (Fig. 3 B) y por la expresión de Neurofilamento M (Fig. 2). Igualmente se observó diferenciación hacia mesodermo y a endodermo primitivo, confirmado respectivamente por la alta expresión de Flk1 ya a días tempranos y a la expresión de Amn, donde con el transcurso de los días de cultivo se hizo más evidente (Fig. 2).

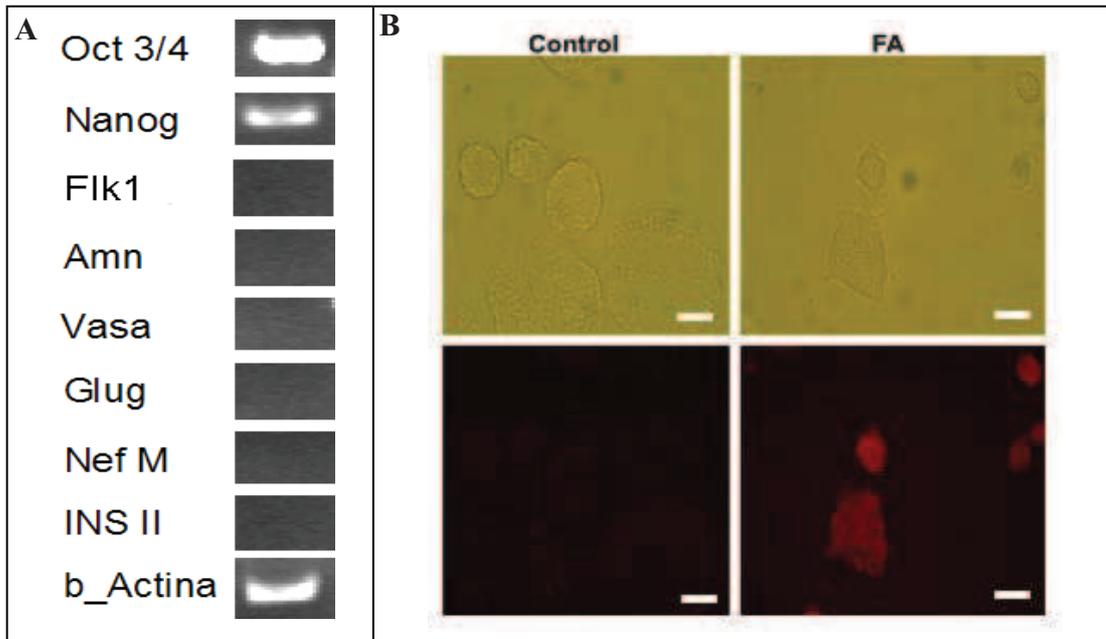


Fig. 1- Caracterización fenotípica y genotípica de las ESC D3 utilizadas en la memoria. A) Análisis de la expresión por RT-PCR de marcadores específicos de linajes derivados de las distintas capas embrionarias en ESC D3 cultivadas en monocapa y en presencia de LIF. B) Ensayo para la detección de la actividad de la fosfatasa alcalina (FA) sobre ESC D3 cultivadas en presencia de LIF durante 4 días. Imágenes de contraste de fases en el panel superior y fluorescencia en el panel inferior. El control se realizó sin el sustrato. Amn: Amnionless; Glug: preproglucagón; INS: insulina; Nef M: Neurofilamento intermedio. La barra indica 100 μ m.

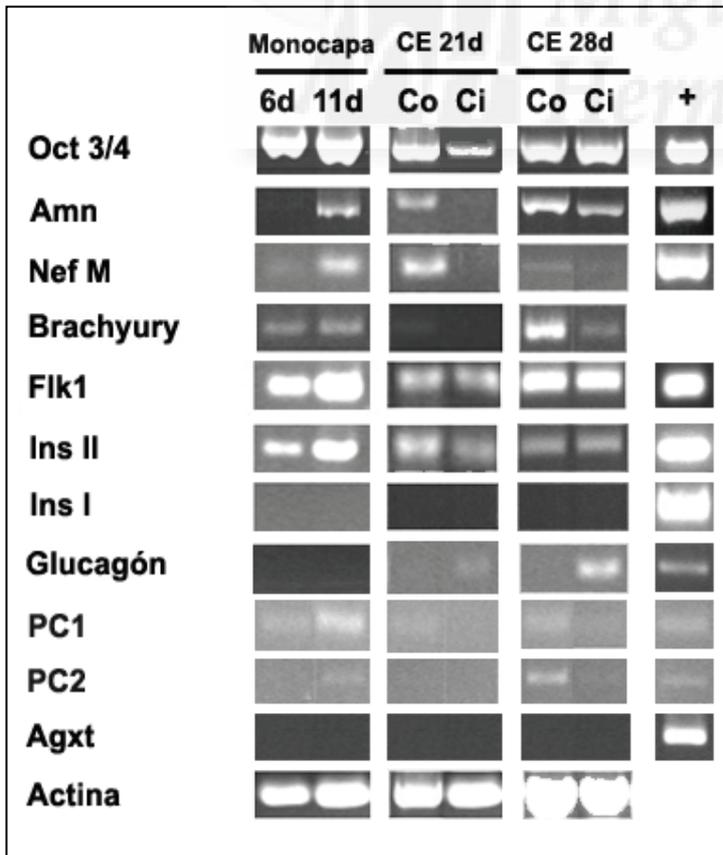


Fig. 2- Perfil de expresión de diferentes marcadores por RT-PCR en distintas condiciones de diferenciación espontánea. El cultivo en monocapa se mantuvo 6 – 11 días en ausencia de LIF sin tripsinización. Los cuerpos embrionarios (CE) se mantuvieron de 21 – 28 días en suspensión en ausencia de LIF, posteriormente se separaron manualmente los CE compactos (Co) de los císticos (Ci). Los controles positivos utilizados fueron: cerebro para Ins II y Nef M; páncreas para preproglucagón e Ins I; ESC D3 para Oct 3/4; saco vitelino para Amn; INS1 para PC1; alfaTC1 para PC2; hígado para Agxt y corazón para Flk1. Agxt: alanina-glioxilato aminotransferasa; Amn: Amnionless; Ins: Insulina; PC: Proteínconvertasas; Nef M: Neurofilamento M. n = 3.

La diferenciación espontánea mediante formación de CEs presentó una heterogeneidad de morfologías, siendo característica la presencia de CEs compactos sin apenas excrecencias celulares en la periferia y CEs císticos, con grandes cavidades y en algunos casos presentando zonas con latidos (Fig. 3 C y D). Al separar manualmente los dos tipos de CEs y analizar la expresión de marcadores por RT-PCR se observaron ciertas diferencias. En primer lugar, la expresión de Amn indica que la presencia del endodermo visceral se concentraba mayoritariamente en los CEs compactos y conforme aumentaba el tiempo de cultivo, los CEs císticos comenzaron a expresarlo más tardíamente (Fig. 2). Del mismo modo ocurrió con el neuroectodermo, donde la expresión de Nef M se hizo más evidente en los CEs compactos.

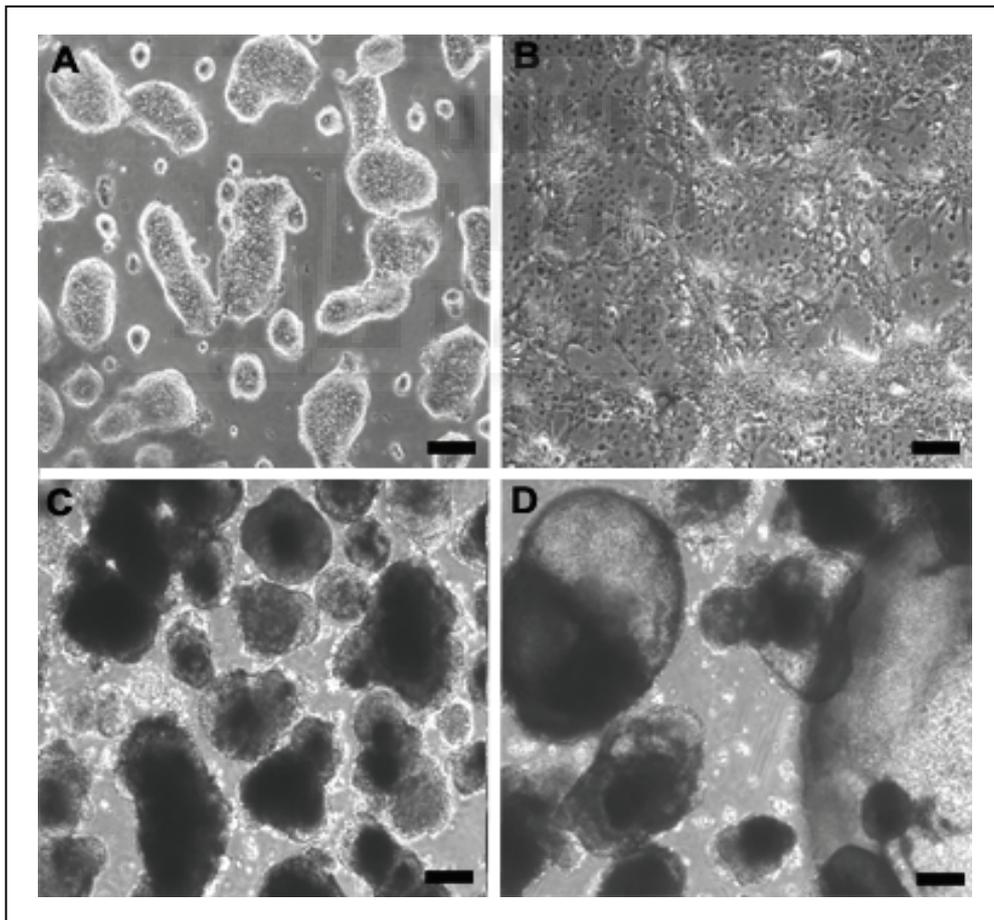
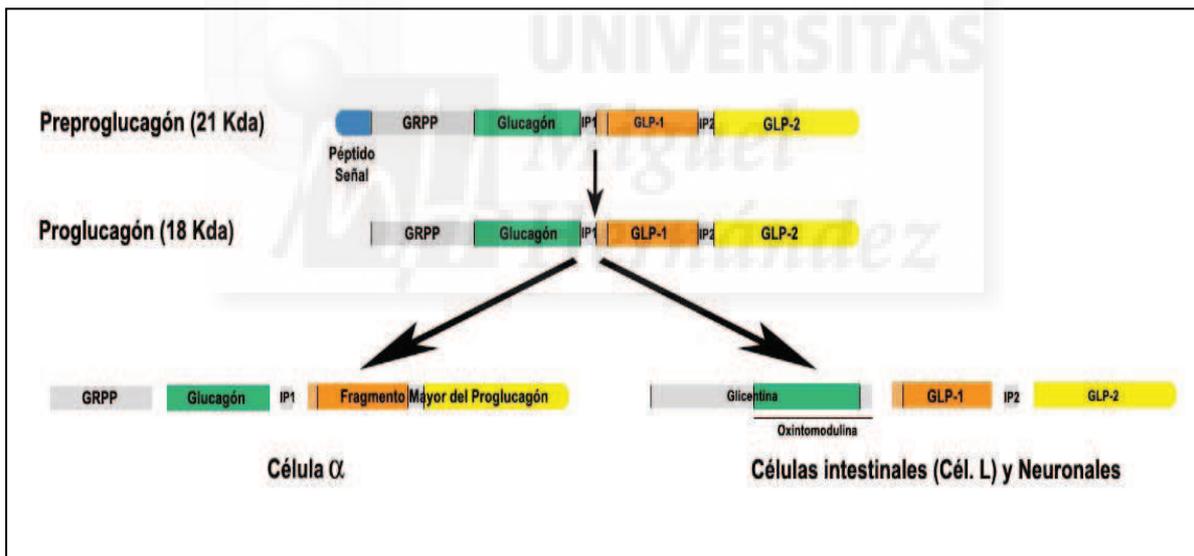


Fig. 3- Imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases sobre cultivo de ESC D3. A) ESC en monocapa y en presencia de LIF donde se aprecia las colonias características que forman en estas condiciones. B) ESC en monocapa y en ausencia de LIF durante 10 días. C) y D) CEs compactos y císticos respectivamente de día 21 obtenidos por diferenciación espontánea. La barra indica 500 µm.

En el caso del preproglucagón ocurre lo contrario, apareciendo mayoritariamente en los CEs císticos a día 28 de cultivo. Por lo que la obtención de un cultivo en el que prevalezcan los CEs císticos favorecerá, en principio, la obtención de células productoras de glucagón y/o hormonas relacionadas. El procesamiento del preproglucagón ocurre a nivel postraduccional mediante proteólisis específica de la preproteína generada (Esquema 12). Mientras que en la célula alfa, el preproglucagón es procesado a glucagón, GRPP y el fragmento mayor del proglucagón mediante las PC tipo 2, en las células L intestinales y en neuronas del hipotálamo y tálamo de ratón, es procesado a GLP1, GLP2 y glicentina por la PC 1/3. Como se observó por expresión de RT-PCR, la PC1/3 prevaleció frente a la PC2 en el cultivo en monocapa en ausencia de LIF (Fig. 2). En el caso de los CEs ambas PCs están presentes, concentrando su expresión sobre todo en los CEs compactos, donde no se observó señal de preproglucagón.



Esquema 12.- Representación gráfica del procesamiento del preproglucagón. La escisión del péptido señal es el primer paso en la maduración de la prohormona. Posteriormente, a través de las PCs específicas de cada tipo celular, el proglucagón dará lugar a diferentes péptidos activos. Nótese que en las células L y de origen neuroectodérmico, la glicentina puede procesarse a su vez al péptido oxintomodulina, encargado de la regulación del eje apetito/saciedad.

De todos modos, en ninguno de los dos tipos de CEs, a distintos días de cultivo, aparecieron células productoras de insulina tipo I, específica de páncreas endocrino. En cambio, se observó expresión de insulina tipo II en todas las condiciones, hecho que se ve acompañado por el marcaje de algunas células con péptido C (Fig. 4 B). Este péptido

se detecta al generarse *de novo* tanto la insulina tipo I como la II (Blume N. y col., 1992), aunque el anticuerpo no discrimina las formas de la insulina sin procesar o madura.

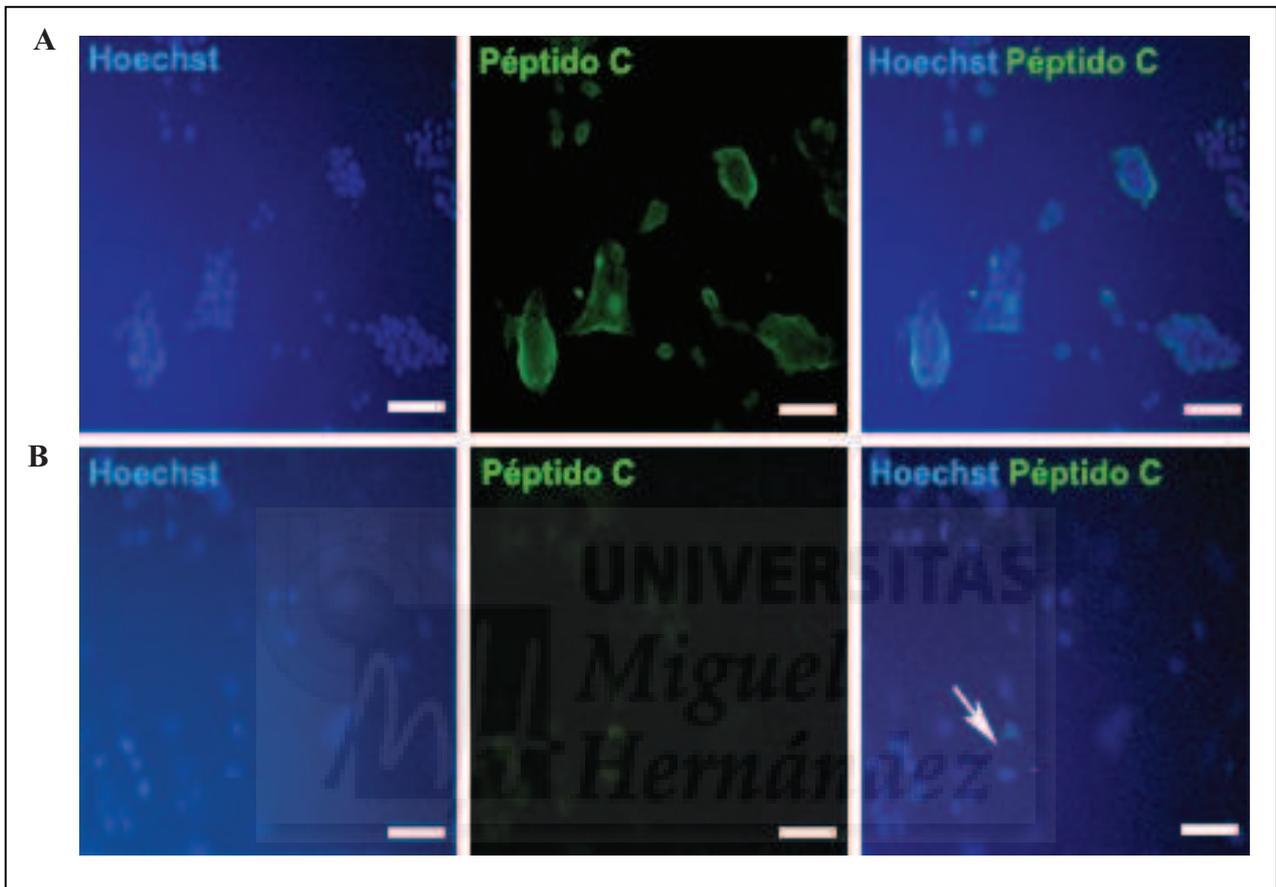


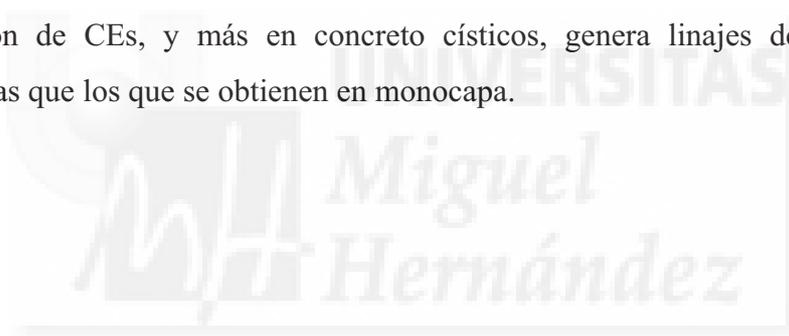
Fig. 4- Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de inmunocitoquímicas de Péptido C sobre **A)** células INS 1 y **B)** “outgrowths” de CEs de día 28 generados por diferenciación espontánea. La flecha indica el marcaje de las células con el péptido C. La barra indica 100 μm .

Los resultados obtenidos parecen sugerir la ausencia de endodermo definitivo. Para verificar este punto se estudió la expresión de Brachyury. Este factor de transcripción, empleado en varios protocolos publicados de diferenciación como marcador específico de mesendodermo, comenzó a expresarse en fases muy tardías, incluso posteriormente a Flk1, marcador de mesodermo (Fig. 2), y apareciendo predominantemente en los CEs compactos. Como ocurría con Amn, Brachyury comenzó a expresarse a día 28 en los CEs císticos. Por el contrario, la expresión de Brachyury apareció a días tempranos de diferenciación, siguiendo un patrón muy similar a Flk1, cuando se trata de un cultivo en monocapa. Recientemente se ha

evidenciado que este marcador se expresa también en el endodermo extraembrionario (Inman, K, E. y col., 2006).

A pesar del prolongado tiempo de cultivo, se continuó observando la expresión del marcador de pluripotencialidad y de precursores neuronales Oct 3/4, tanto en monocapa como en los dos tipos de CEs (Fig. 2). Por ello la diferenciación espontánea mantiene posiblemente una población residual con marcadores pluripotenciales tal como se ha demostrado previamente en nuestro laboratorio (Enseñat-Waser, R. y col. 2006).

En conclusión, la diferenciación espontánea en monocapa parece dirigir las ESC hacia linajes del neuroectodermo, endodermo primitivo, mesendodermo y mesodermo al igual que ocurre con los CEs compactos. En cambio, la expresión de preproglucagón, solo se observó en los CEs císticos generados por diferenciación espontánea. Por tanto la generación de CEs, y más en concreto císticos, genera linajes de células más especializadas que los que se obtienen en monocapa.



4.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS QUE EXPRESAN PREPROGLUCAGÓN OBTENIDAS POR DIFERENCIACIÓN ESPONTÁNEA DE ESC D3 A PARTIR DE CEs.

Tras evidenciar la expresión de glucagón en los CEs císticos generados espontáneamente en cultivo paralelamente con la expresión de insulina tipo II pero no de la insulina tipo I, se planteó estudiar el origen de dichas células mediante co-localización de marcadores de distintos linajes celulares.

Las técnicas inmunocitoquímicas sobre criocortes de CEs presentaban mucho ruido de fondo en el canal del rojo, debido a la alta autofluorescencia de los propios CEs, dificultando así la evidencia de marcaje específico (Fig. 5). Por tanto, para estudiar las células positivas a preproglucagón se optó por obtener células individualizadas sobre las que utilizar inmunocitoquímica a través de la adhesión en placa y posterior proliferación en monocapa de los CEs, siempre manteniendo las mismas condiciones de cultivo (Fig. 6 A). Adicionalmente se comprobó en estas condiciones la presencia de expresión de preproglucagón por RT-PCR (Fig. 6 B).

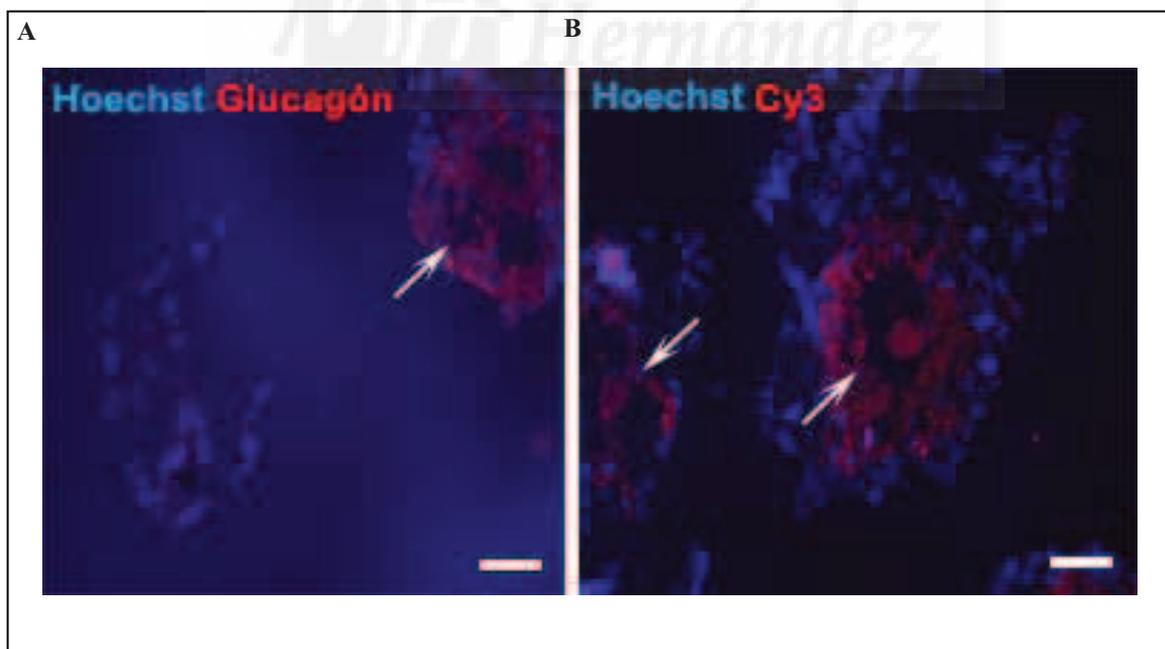


Fig. 5- Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de criocortes sobre diferentes CEs de 28 días generados por diferenciación espontánea. **A)** Marcaje con el anticuerpo primario antiglucagón y el secundario con el fluoróforo Cy3 que emite en rojo. **B)** Marcaje sólo con el anticuerpo secundario con el fluoróforo Cy3. Se comprueba la alta autofluorescencia emitida por los propios CEs y localizada en el centro de éstos. Las flechas indican las áreas de fluorescencia en el canal del rojo. La barra indica 100 μ m.

El marcaje con el anticuerpo de glucagón sobre las células provenientes del crecimiento periférico en monocapa (“outgrowth”) de los CEs de día 28 fue escaso y co-localizando en todos los casos con el marcador de neuroectodermo, Neurofilamento 200 (Fig. 7), que además marca la mayoría de las células del “outgrowth”, lo que sugiere que el neuroectodermo es el linaje predominante por este marcador de diferenciación. Además, el anticuerpo de glucagón reconoce no sólo la forma procesada, sino también el preproglucagón (21 Kda) y el proglucagón (18 Kda) tal y como se comprobó por western blot en células alfa TC1 (Fig. 6 C).

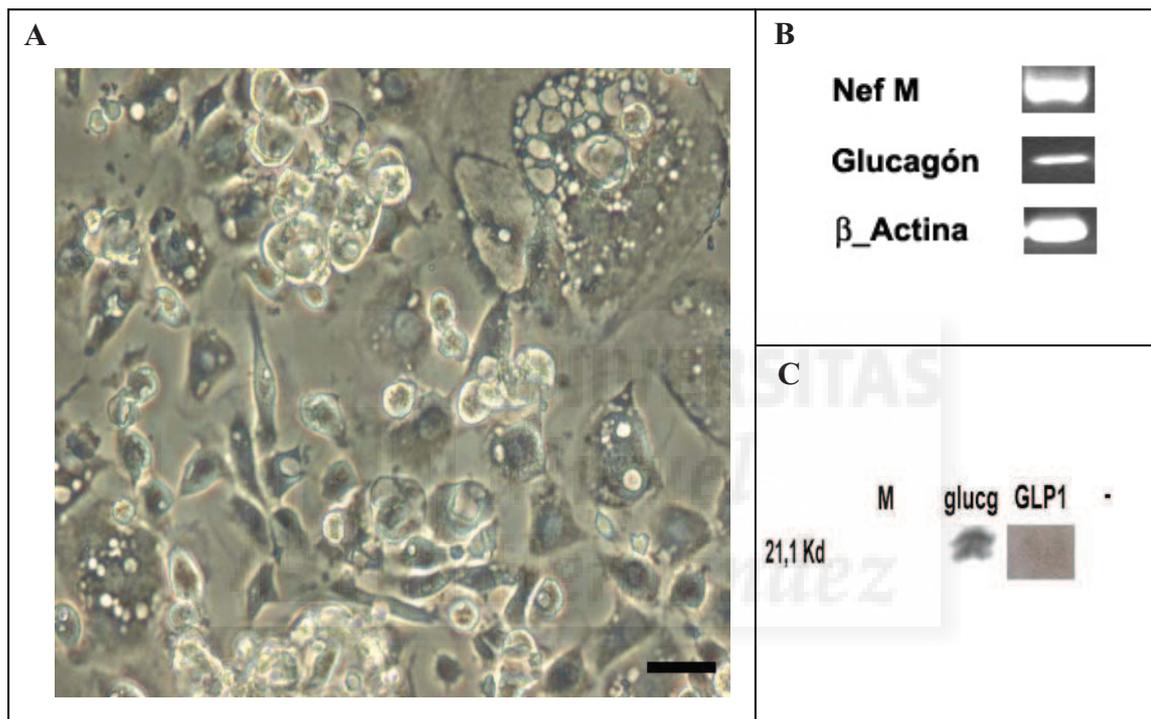


Fig. 6- El “Outgrowth” de los CEs no afecta a la expresión del ARN mensajero de Glucagón. **A)** Imagen obtenida por microscopía de contraste de fases sobre la proliferación celular a partir de los CEs de día 28 adheridos a la placa de cultivo. La barra indica 100 µm. **B)** RT-PCR del ARN mensajero de glucagón en “Outgrowth” de CEs de día 28. **C)** Detección por western blot del preproglucagón (21 KDa) y el proglucagón (18 Kda) en células alfa TC1 mediante el anticuerpo contra glucagón y GLP1 utilizado en las técnicas inmunocitoquímicas. Como control negativo (-) se utilizó músculo. glucg: glucagón; Nef M: Neurofilamento intermedio; M: marcador de peso molecular.

Del mismo modo ocurre con la co-localización de GLP1, péptido que se genera principalmente en células intestinales especializadas y neuroectodérmicas. Su marcaje fue minoritario y siempre co-localizando con la proteína específica de neuroectodermo, GFAP (Fig. 8). El anticuerpo contra GLP1 reconoce mínimamente las formas no procesadas (Fig. 6 C) por lo que podemos concluir que es bastante específico del péptido GLP1.

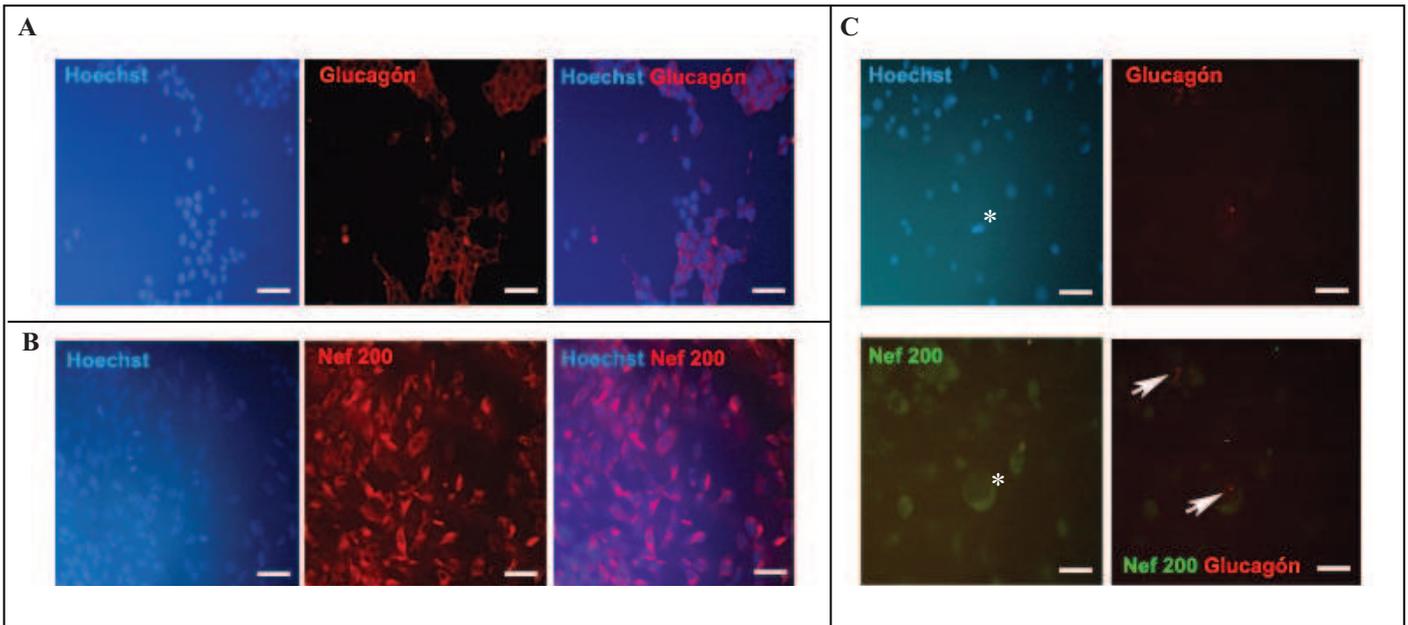


Fig. 7- Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de inmunocitoquímicas de **A)** glucagón sobre células alfa TC1, **B)** Neurofilamento 200 (Nef 200) sobre neuroblastoma y **C)** co-localización de glucagón y neurofilamento 200 en “outgrowths” de CEs de día 28 generados por diferenciación espontánea. Las flechas indican la co-localización de ambos marcadores. Los asteriscos comparan la tasa núcleo/ citoplasma de las células positivas a glucagón. Las barras indican 100 μ m.

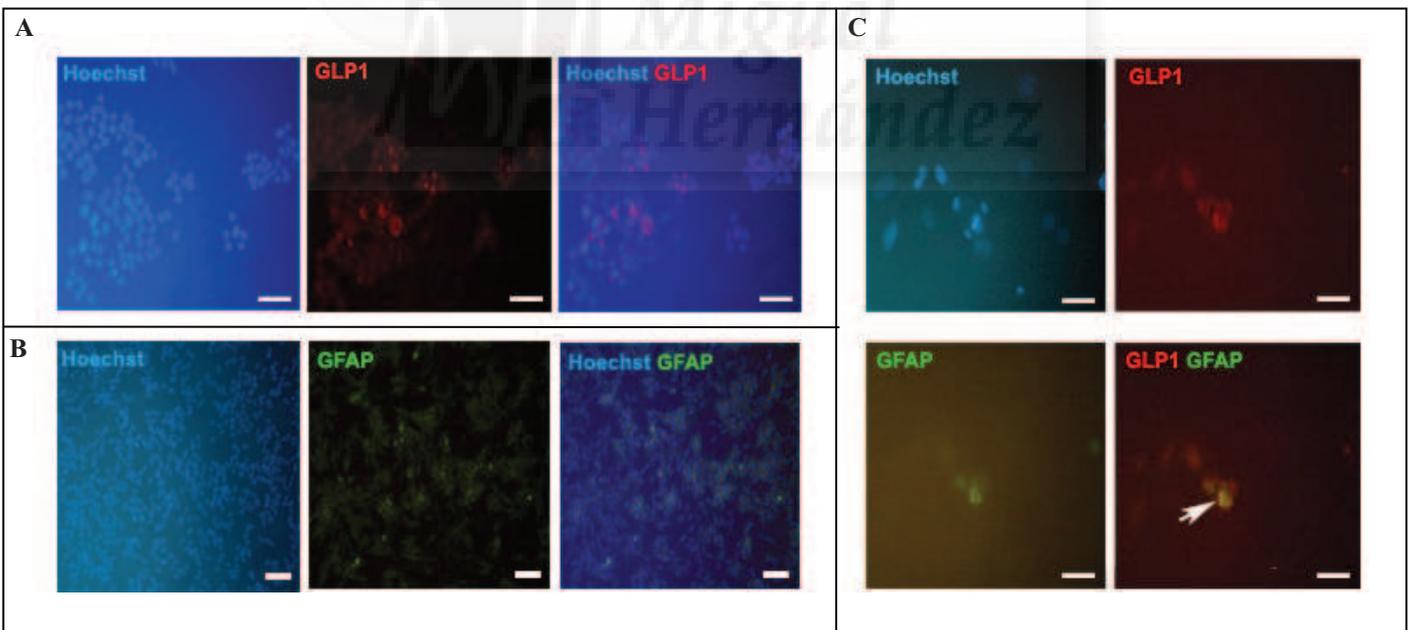


Fig. 8- Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de inmunocitoquímicas de **A)** GLP1 sobre células alfa TC1, **B)** GFAP (Proteína fibrilar ácida de la glía) sobre células de Neuroblastoma y **C)** co-localización de GFAP y GLP1 en “outgrowths” de CEs de día 28 generados por diferenciación espontánea. Las flechas indican la co-localización de ambos marcadores. Las barras indican 100 μ m.

Al igual que con el marcaje del filamento Nef 200, la mayoría de las células que proliferaron a partir del CE adherido fueron marcadas con GFAP. Las células que expresaban glucagón poseían una relación núcleo/ citoplasma muy bajo, observándose incluso vacuolas rodeadas por el neurofilamento 200 (Fig. 7 C). Mientras el glucagón se marcaba en el citoplasma de manera muy puntual, el marcaje con GLP1 lo hacía de manera más extensa (Fig. 7 C y 8 C).

Por tanto las células glucagón⁺ obtenidas por diferenciación espontánea de las ESC D3, tenían un origen neuroectodérmico. Además, se comprobó que la expresión de preproglucagón de los CEs císticos no se relaciona con las concentraciones de glucosa del medio, obteniendo niveles similares de expresión tanto a alta como a baja glucosa (Fig. 14), al contrario de lo observado en la línea alfa TC1.



4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS QUE EXPRESAN PREPROGLUCAGÓN OBTENIDAS A PARTIR DE CEs DERIVADOS DE ESC DE RATÓN MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE MÉTODOS COAXIALES.

Dada la ausencia de endodermo definitivo observada en la diferenciación espontánea de ESC D3, se procedió a tratar de dirigir la diferenciación celular mediante el protocolo publicado por Ku, H. T. y col. 2004 donde observan expresión de insulina tipo I por RT-PCR anidada en presencia de monotioglicerol (MTG) y ácido ascórbico, tanto en presencia de suero como sustituido por un análogo sintético durante el cultivo de CEs derivados de ESC R1. En nuestro trabajo se utilizó la línea de ESC D3 para verificar si se obtenían los mismos resultados, aunque ensayos claves se repitieron con ESC R1.

Con el cultivo de ESC D3 mediante este protocolo se obtienen CEs muy homogéneos en cuanto a morfología, mucho más compactos que por diferenciación espontánea y sin formarse CEs císticos (Fig. 9 B), en los que sabemos que el preproglucagón es de origen ectodérmico.

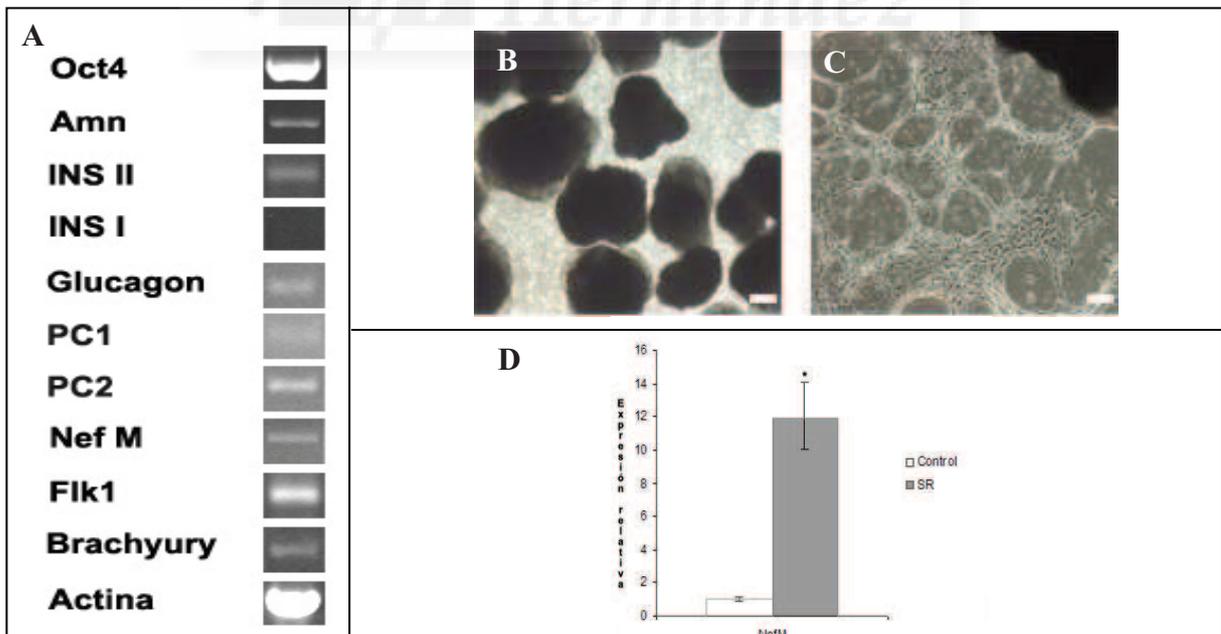


Fig. 9- Estudio de la diferenciación dirigida en ESC D3 en presencia de ácido ascórbico, MTG y bajo serodeprivación. **A)** Perfil de expresión por RT-PCR de marcadores de distintas capas embrionarias en CEs de día 28, n = 3. **B)** y **C)** Imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases sobre cultivo de ESC D3 formando CEs de día 28. Las barras indican 500 μ m (**B**) y CEs adheridos durante 17 días facilitando la proliferación celular (**C**). **D)** Comparación de la expresión relativa de Nef M por RT-PCR cuantitativa entre CEs de día 28 generados por diferenciación espontánea (control) y serodeprivación con la adición de MTG y ácido ascórbico (SR). La significación estadística fue realizada mediante el test de t de Student: *p < 0,05. Amn: Amnionless; INS: insulina; Nef M: Neurofilamento intermedio; PC: Proteínconvertasas

El perfil de expresión de marcadores de diferenciación es muy similar al que se obtiene en CEs, tanto císticos como compactos, obtenidos por diferenciación espontánea (Fig. 9 A y 2), con la particularidad de que no existen características morfológicas evidentes que supongan que unos CEs se diferencien a una capa embrionaria en particular. Mientras que Ku obtiene expresión de insulina tipo I mediante este protocolo a partir de día 11 utilizando ESC R1, con D3 no se observa en ningún momento ni siquiera a día 28 (Fig. 9 A). Se observa expresión de glucagón por RT-PCR del mismo modo que se constató en los CEs císticos de día 28 generados espontáneamente (Fig. 2). A pesar de encontrar expresión del marcador específico de mesodermo cardíaco Flk1, en ningún momento se observó CEs latiendo en cultivo, sin embargo, no existe una relación causal unívoca entre la expresión de Flk1 y la presencia de latidos tal y como se demostró en los CEs compactos obtenidos por diferenciación espontánea (Fig. 2).

Aún siendo un protocolo de diferenciación dirigida, mediante el uso del cultivo coaxial, el marcador Oct 3/4 mantiene un nivel alto de expresión, dando a entender la posible presencia de poblaciones pluripotenciales residuales o precursores neuronales.

Del mismo modo que ocurría con los CEs embrionarios generados de manera espontánea, los obtenidos mediante este protocolo pudieron adherirse en placa de cultivo para facilitar la proliferación de las células y el estudio de marcadores mediante técnicas de inmunocitoquímica. La adhesión en placa de estos CEs fue mucho menos eficiente que la de los CEs generados de forma espontánea. El tratamiento de las superficies de cultivo con 0,2% gelatina y 0,05 % fibronectina permitió corregir este problema. La morfología de las células que se obtuvieron a partir de estos CEs es totalmente distinta a la generada por diferenciación espontánea, apareciendo células con una baja tasa de relación núcleo/ citoplasma y formando un entramado fibrilar entre ellas (comparar Fig. 6 A y 9 C).

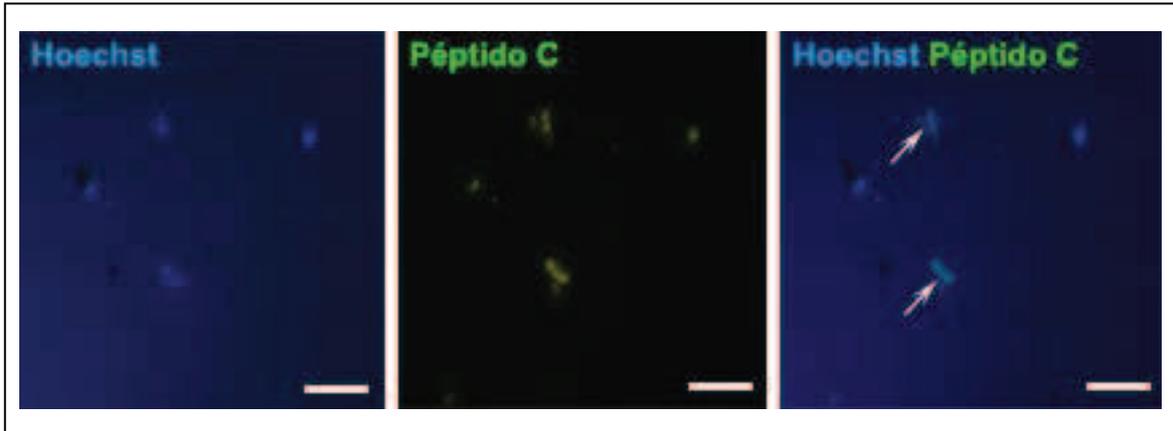


Fig. 10- Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de inmunocitoquímicas de Péptido C sobre “outgrowths” de CEs de día 28 generados por sustitución del suero por un análogo sintético y la adición de ácido ascórbico y MTG. Las flechas indican la localización del marcaje. Las barras indican 100 μm .

Al igual que ocurría por diferenciación espontánea (Fig. 4 B), y a pesar de no observarse expresión de insulina tipo I, se observa la presencia de péptido C en algunas células obtenidas tras la adhesión de los CEs (Fig. 10). Esto confirma la expresión única de insulina tipo II por RT-PCR (Fig. 9 A).

Miguel
Hernández

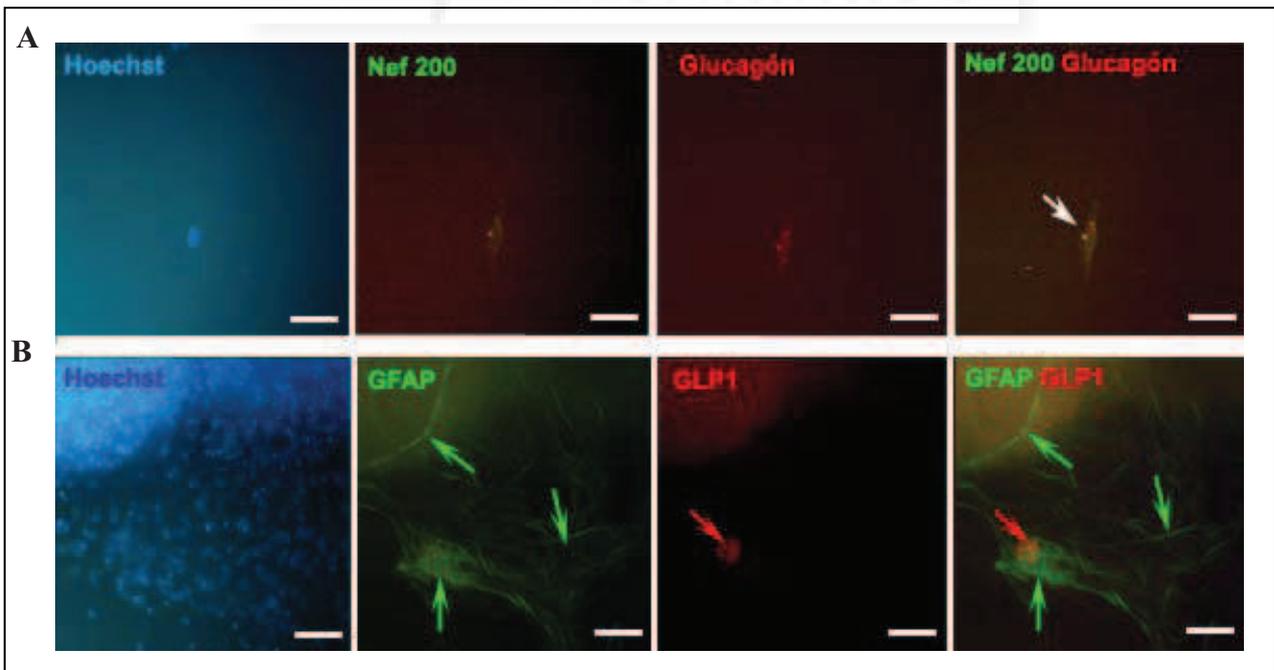


Fig. 11- Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de inmunocitoquímicas de **A)** Glucagón y Neurofilamento 200 (Nef 200) y **B)** Proteína glial fibrilar ácida (GFAP) y GLP1 sobre “outgrowths” de CEs de ESC D3 adheridos a los 21 días de cultivo y generados con la sustitución del suero por un análogo sintético y la adición de MTG y ácido ascórbico. La flecha blanca indica la co-localización de ambos marcadores. Las flechas de colores indican la localización de sus respectivos marcadores. Las barras indican 100 μm .

Las células marcadas con el anticuerpo de glucagón representaron un porcentaje muy bajo dentro de la población total obtenida. Estas células co-localizaron con la proteína estructural Nef 200 (Fig. 11 A), marcador de neuroectodermo, por lo que se establece la relación en cuanto a la capa embrionaria que origina estas células que expresan el mensajero de la hormona peptídica. En este caso, la morfología observada no se corresponde a las células obtenidas por diferenciación espontánea (Fig. 7 C), ya que no ofrecen grandes vacuolas citoplasmáticas. Por otro lado, la co-localización celular de GFAP y GLP1 que se observó en diferenciación espontánea (Fig. 8), no ocurre en estas condiciones (Fig. 11 B); se comprobó que las células que expresan GLP1 se encuentran próximas a las que expresan GFAP.

La cuantificación de expresión del marcador neuroectodérmico, Nef M, que resultó de utilizar este protocolo en la diferenciación de ESC, mostró unos niveles de expresión 7 veces mayor frente al protocolo de diferenciación espontánea (Fig. 9 D).

Tal y como ocurría con los CEs obtenidos por diferenciación espontánea, estas células tampoco modularon la expresión de preproglucagón en respuesta a distintas concentraciones de glucosa en el medio.

Con las observaciones obtenidas, se procedió a utilizar la línea de ESC R1, para comprobar si los resultados obtenidos con D3 son reproducibles con ésta y comprobar si la expresión de insulina tipo I es dependiente de la línea celular empleada.

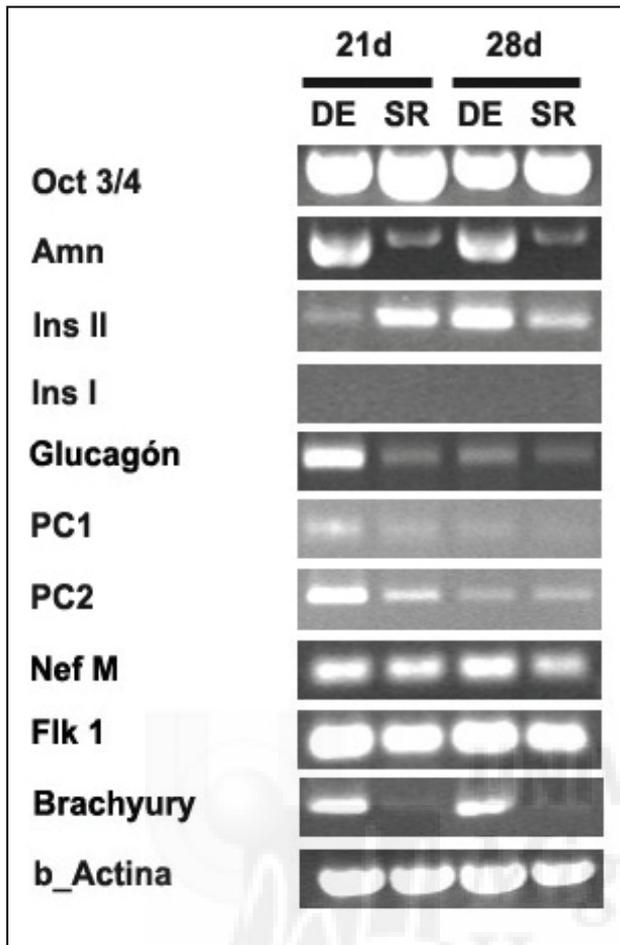


Fig. 12- Perfil de expresión por RT-PCR de marcadores en CEs de días 21 y 28 generados por diferenciación espontánea (DE) o por serodeprivación y adición de ácido ascórbico y MTG (SR) a partir de ESC R1. Amn: Amnionless; Ins: insulina; Nef M: neurofilamento M. n = 3.

Como se evidencia con la línea R1, la expresión de preproglucagón aparece antes en los CEs que con las ESC D3, siendo positiva su presencia ya a día 21 (Fig. 2 y 12). Al igual que esta hormona, tanto Flk1, neurofilamento M, insulina tipo II, amnionless, Oct 3/4 y PC 1 y 2 se expresaron tanto en las condiciones del protocolo de Ku, T. y col. como por diferenciación espontánea, del mismo modo que ocurría con las ESC D3. Brachyury presentó una mayor expresión en las condiciones de especificación espontánea que en sustitución del suero (Fig. 2, 9A y 12) reproduciéndose lo observado con las ESC D3. Por otro lado, el marcador cardíaco Flk1 se expresó en todas las condiciones, independientemente de que lo haga Brachyury a pesar de ser éste último un marcador específico de precursores mesodermicos tal y como se indica en la bibliografía.

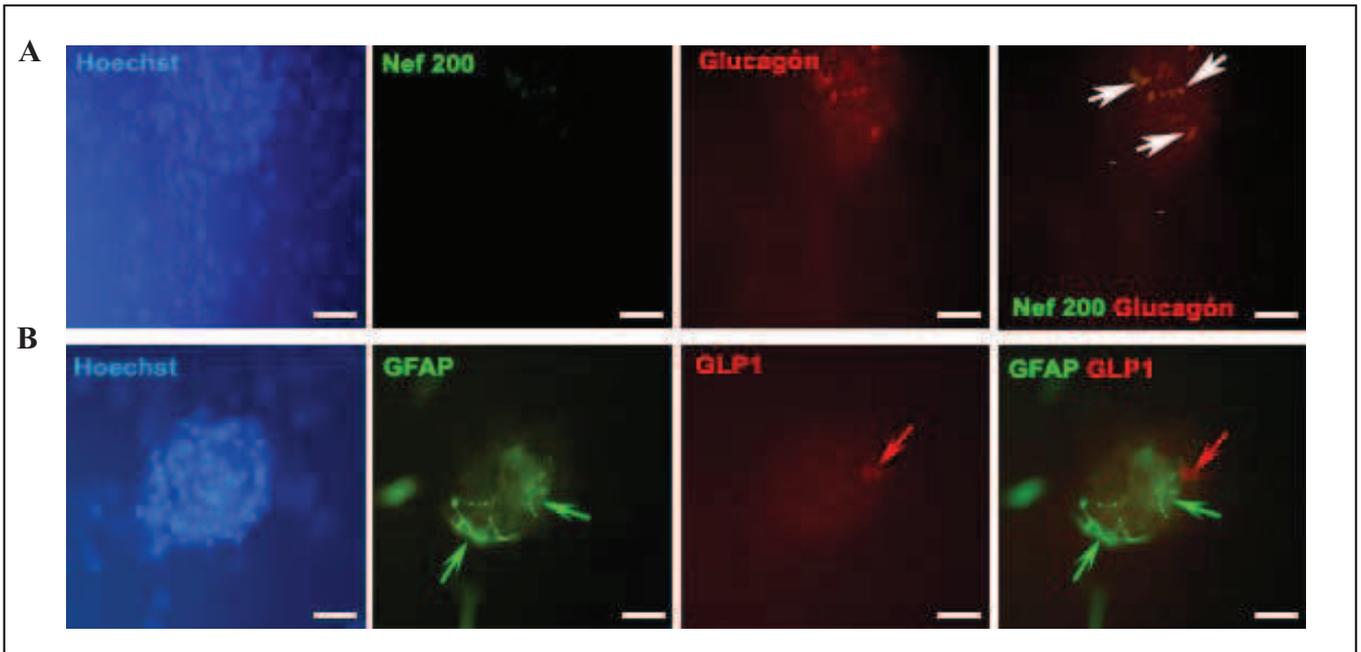


Fig. 13- Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de inmunocitoquímicas de **A)** Glucagón y Neurofilamento 200 (Nef 200) y **B)** Proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) y GLP1 sobre “outgrowths” de CEs de ESC R1 adheridos a los 21 días de cultivo y generados con la sustitución del suero por un análogo sintético y la adición de MTG y ácido ascórbico. Las flechas blancas indican la co-localización de ambos marcadores. Las flechas de colores indican la localización de sus respectivos marcadores. La barra indica 100 μ m.

En las condiciones de diferenciación espontánea de la línea R1, el endodermo visceral prevalece frente a las condiciones de diferenciación por serodeprivación ya que la expresión de Amn fue mucho mayor. Así, durante el transcurso en cultivo de los CEs la señal de amnionless no aumentó, mientras que en las ESC D3 ocurría lo contrario, apareciendo incluso en los CEs císticos (Fig. 2 y 12). Este hecho sugiere que el rendimiento de obtención de un linaje específico es dependiente de la línea de ESC utilizada. De todos modos se comprueba que con ESC R1 no se logró obtener una población celular con expresión de insulina tipo I (Fig. 12) a pesar de ser la misma línea celular utilizada en el trabajo de Ku, T. y col.

Como sucedía con las ESC D3, en la localización de marcadores por inmunocitoquímica, el anticuerpo para el glucagón co-localizó con el marcador neurofilamento 200 (Fig. 9 A y 13 A). De nuevo se correlaciona este hecho con el origen neuroectodérmico de la población de células que expresan esta hormona. Del mismo modo las morfologías de las células obtenidas no se asemejan a las que se observaron por diferenciación espontánea (Fig. 7 C). Por otro lado, la localización de

GFAP y GLP1 no se producía en una única célula, sino que ambos marcadores aparecían en pequeñas agrupaciones separadas (Fig. 13 B), coincidiendo con lo que se observó en la línea de ESC D3 (Fig. 11 B). Además, al igual que ocurría con las ESC D3, las R1 diferenciadas que expresaron tanto glucagón como GLP1 son minoritarias en el cultivo diferenciado donde predominaba el neuroectodermo (Fig. 9 D).

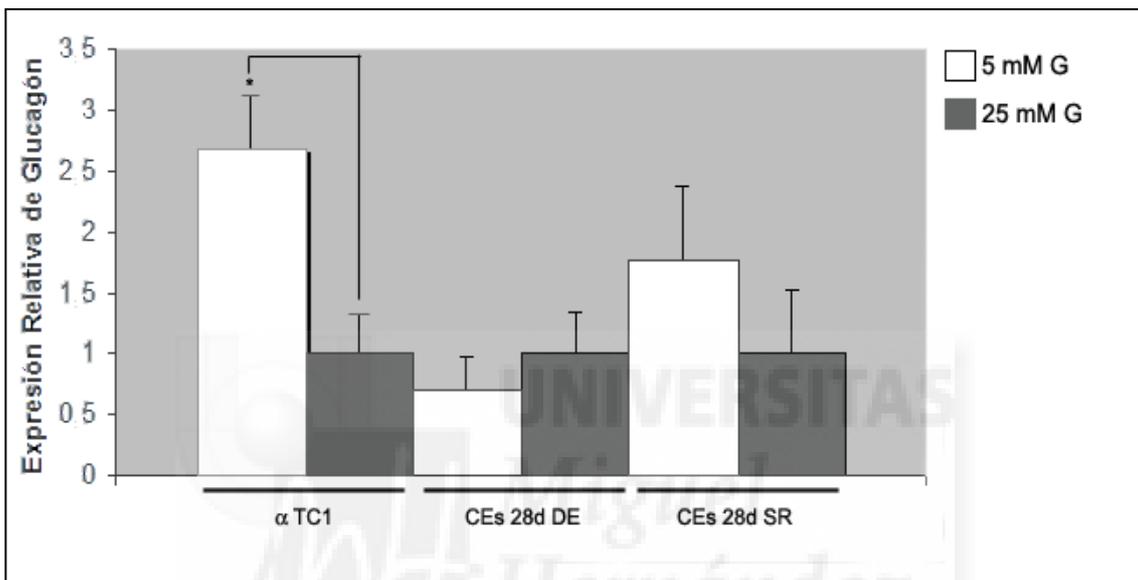


Figura 14- Análisis de la expresión relativa del gen del Glucagón por medio de PCR a tiempo real. Tanto las células alfa TC1 como los CEs se dejaron 7 días en cultivo con las concentraciones de glucosa indicadas. El calibrador de cada condición fue el propio cultivo a 25 mM glucosa debido a que los niveles de Glucagón frente a esa concentración del estímulo son mínimos. DE: diferenciación espontánea; SR: sustitución del suero por un análogo sintético y adición de MTG y ácido ascórbico. La significación estadística fue realizada mediante el test de t de Student: * $p < 0,05$

4.4. ESTUDIO DE LA DIFERENCIACIÓN DE ESC D3 MEDIANTE LA PRESENCIA DE MEDIOS CONDICIONADOS OBTENIDOS DEL CULTIVO DE RUDIMENTOS PANCREÁTICOS.

Tras comprobar que con los métodos de diferenciación por medio de cultivo coaxial de Ku, no se obtuvieron células productoras de insulina tipo I ni que expresaran glucagón de origen endodérmico, se optó por utilizar otro protocolo publicado de diferenciación hacia células productoras de insulina.

En base a los antecedentes publicados por Vaca, P. y col., 2006, se procedió a estudiar si el cultivo coaxial de ESC con factores procedente de precultivos de rudimentos pancreáticos fetales, implicaba la diferenciación hacia células productoras de insulina de origen endodérmico definitivo. En primer lugar se comprobaron las diferencias, en cuanto a presencia de factores, entre este medio condicionado a día 0 y tras varios días de cultivo. Las SDS-PAGE revelaron una banda en torno a los 16 Kda, sólo en los medios condicionados de rudimentos pancreáticos (Fig. 15), procediéndose a identificar las proteínas que la conformaban utilizando para ello en primer lugar una digestión de tripsina de la banda y posteriormente un análisis de los fragmentos obtenidos por espectrometría de masas. El análisis dio como resultado la presencia de varias proteínas: quimiotripsinógeno B1, la proteína zimógeno granular de membrana 16 y Reg1.

La presencia de las primeras implica un desarrollo del páncreas exocrino y quizás un cierto grado de funcionalidad proteolítica para la primera, si se procesa a su forma activa, la quimiotripsina. Por otro lado, una de las proteínas de interés que pudiera estar implicada en los procesos de diferenciación es el factor de crecimiento Reg1, implicado en la regeneración pancreática (Terazono, K. y col., 1990).

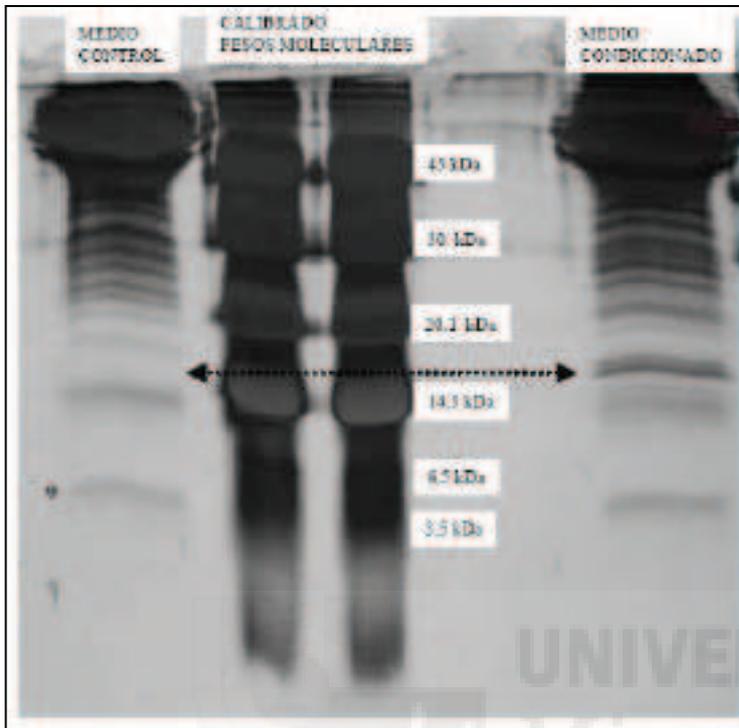


Fig. 15- Detección por SDS-PAGE de factores presentes en los medios obtenidos tras el cultivo con rudimentos pancreáticos fetales. Se observa una banda en torno a los 16 KDa que no se encuentra presente en el medio control. Esta banda está compuesta por tres proteínas según se evidenció tras su digestión con tripsina y posterior análisis por espectrofotometría de masas.

Una vez comprobada la presencia, en estos medios, de factores implicados específicamente en la regeneración y desarrollo pancreático (como por ejemplo Reg1) así como de proteasas de la porción exocrina del páncreas, se pasó a observar su efecto sobre la línea de célula beta INS1. El objetivo que se persiguió con ello, fue evidenciar cuál era el efecto de dicho medio sobre la secreción de insulina. Complementariamente se procedió a la adición de inhibidores de proteasas de amplio espectro en los medios condicionados, por si éstas pudieran ejercer algún efecto deletéreo sobre las células y por tanto pudiera provocar un fenómeno análogo al proceso secretor de insulina.

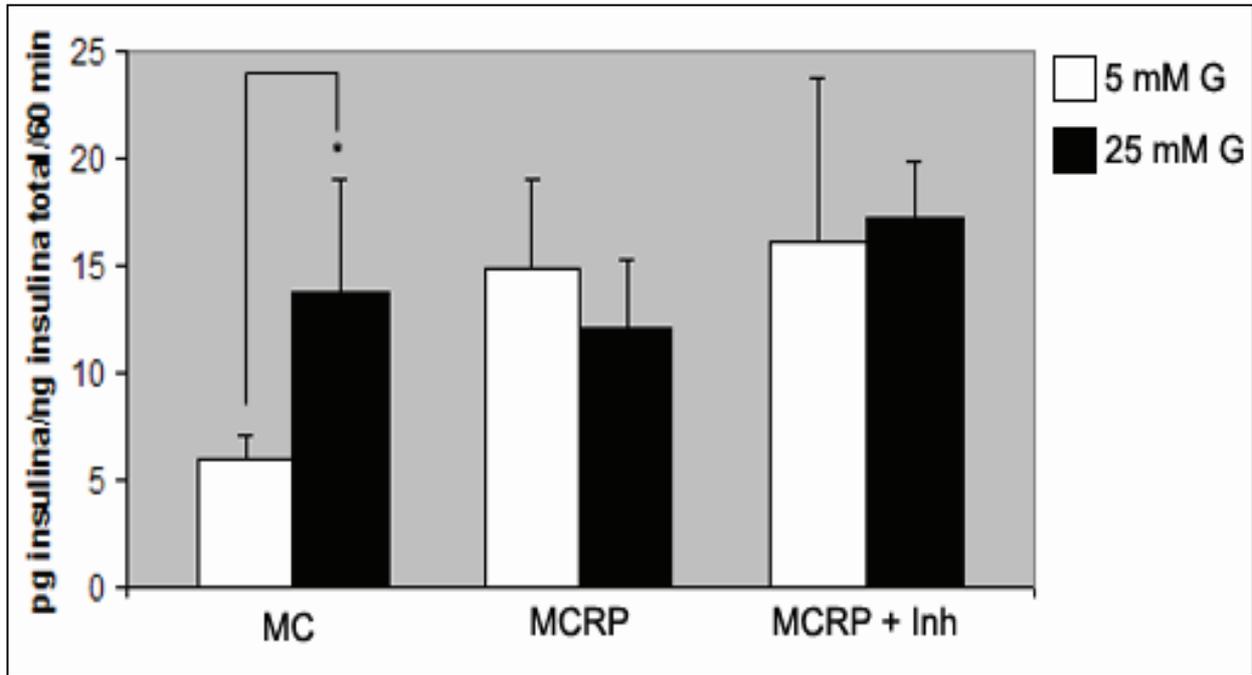


Fig. 16- Secreción de insulina de la línea celular INS1 cultivada durante 24 h. en presencia de medio basal al 3% de suero (MC), medio condicionado de rudimentos pancreáticos (MCRP) y en presencia de inhibidores de proteasas (MCRP + Inh); en respuesta a 5 mM y 25 mM de glucosa (G). La significación estadística fue realizada mediante el test de t de Student: * $p < 0,05$. $n = 3$

Como se puede observar en los ensayos de secreción de insulina de las INS1 (Fig. 16), las células que fueron cultivadas durante tan solo 24 horas con los medios condicionados de rudimentos pancreáticos, pierden el control de la liberación de insulina. No se observan diferencias significativas ante la presencia de distintas concentraciones de glucosa en el medio, obteniéndose valores máximos de secreción de insulina. Por otro lado, la adición de inhibidores de proteasas al medio, no logra revertir este proceso.

Tras evidenciar estos efectos del medio condicionado se siguió el mismo procedimiento descrito por Vaca, P. Se utilizaron ESC D3 transfectadas con el constructo GB2, el cual contiene el gen que proporciona la resistencia al antibiótico neomicina bajo el control de la región proximal (aprox. 0,5 Kb) del promotor de la insulina humana. Por lo que tras el proceso de diferenciación, se seleccionaron las células que expresaban esta hormona por la adición de neomicina.

Además de seguir el proceso descrito y en las mismas condiciones, se procedió a comprobar el papel de las proteasas presentes en el medio condicionado de rudimentos pancreáticos, procedentes de la porción exocrina sobre la secreción de insulina y en la viabilidad de las células obtenidas tras la diferenciación. Para ello, se cultivaron las ESC en presencia de inhibidores de un amplio rango de proteasas, en todos los pasos del protocolo de diferenciación.

En las condiciones que se detallan en el trabajo de Vaca, P. para la obtención de CEs, sembrando $1,5 \times 10^6$ células/ml, se obtenían agregados celulares y CEs fusionados debido a la alta densidad celular por unidad de volumen (Fig. 17 A). Tras la adhesión de estos agregados y tras los 7 días de crecimiento se procedió a seleccionar las células productoras de insulina mediante la adición de 2,3 mg/ml neomicina. Con dicha concentración de antibiótico no se logró seleccionar ningún tipo celular.

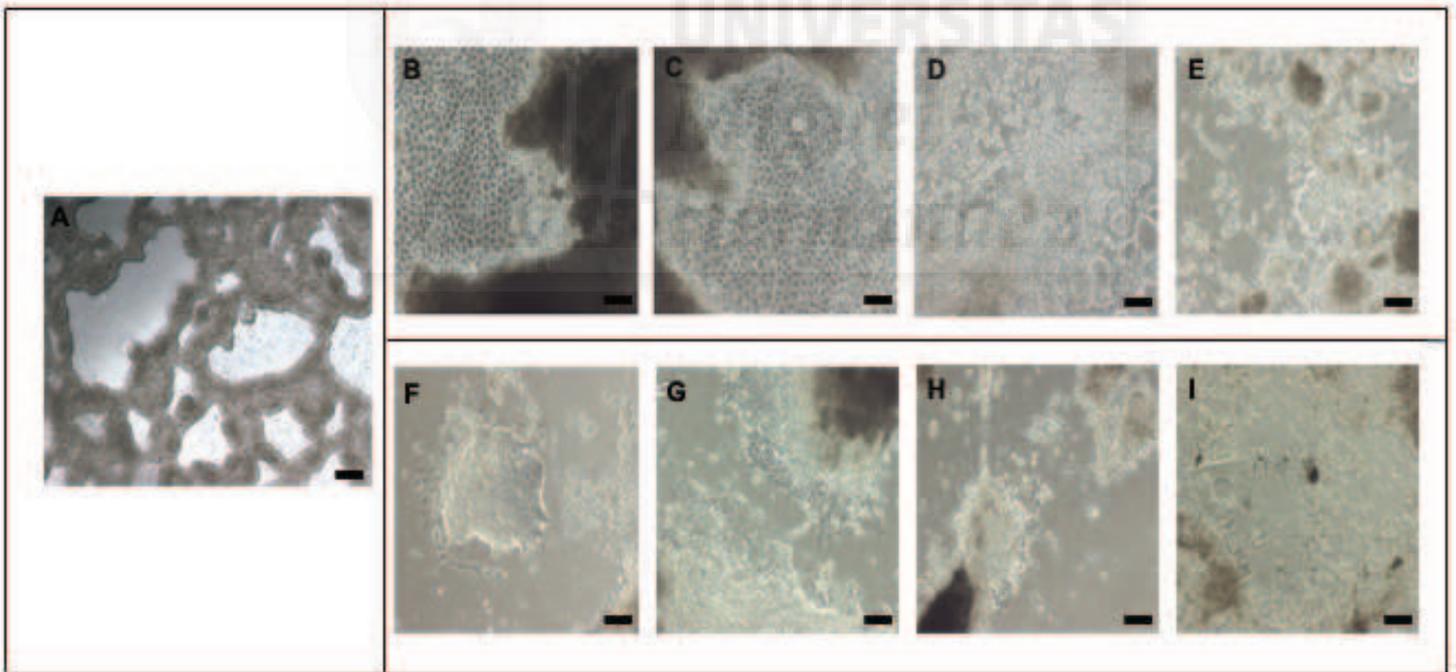


Fig. 17- Imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases sobre CEs y outgrowths mantenidos en cultivo en presencia de medio condicionado de rudimentos pancreáticos. **A)** CEs formados a partir de $1,5 \times 10^6$ células/ml donde se observa como se agregan hasta formar una masa celular compacta. **B-I)** Diferentes condiciones de cultivo de los outgrowths provenientes de los CEs de 7 días. En el panel superior se muestra los outgrowths a día 7 previos a la selección con neomicina, en el panel inferior, los outgrowths tras la selección con el antibiótico. **B y F)** Medio control; **C y G)** Medio control en presencia de inhibidores de proteasas; **D y H)** Medio condicionado de rudimentos pancreáticos y **E e I)** Medio condicionado de rudimentos pancreáticos en presencia de inhibidores de proteasas. La barra indica 200 μm

Se decidió modificar el protocolo utilizando una densidad de siembra de células menor (2×10^5 células/ ml) y una selección con 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ neomicina, tal como se realizó en el trabajo del mismo grupo de Soria, B. y col., 2000 (Fig. 17 B-I) y en otros muchos protocolos publicados.

Se procedió a estudiar la expresión de marcadores específicos de cada capa embrionaria por RT-PCR en las células obtenidas por este protocolo (Fig. 18). Como observa Vaca, P. y col. se obtuvo expresión de insulina en las células seleccionadas, siendo baja en las obtenidas a partir del cultivo procedente de rudimentos pancreáticos en presencia de inhibidores de proteasas. Aunque, la insulina expresada en las células diferenciadas se corresponde al tipo II y en ningún caso se expresa la de tipo I (Fig. 18). En el caso del control, tanto en ausencia o presencia de inhibidores, se seleccionaron células que también expresaban insulina tipo II.

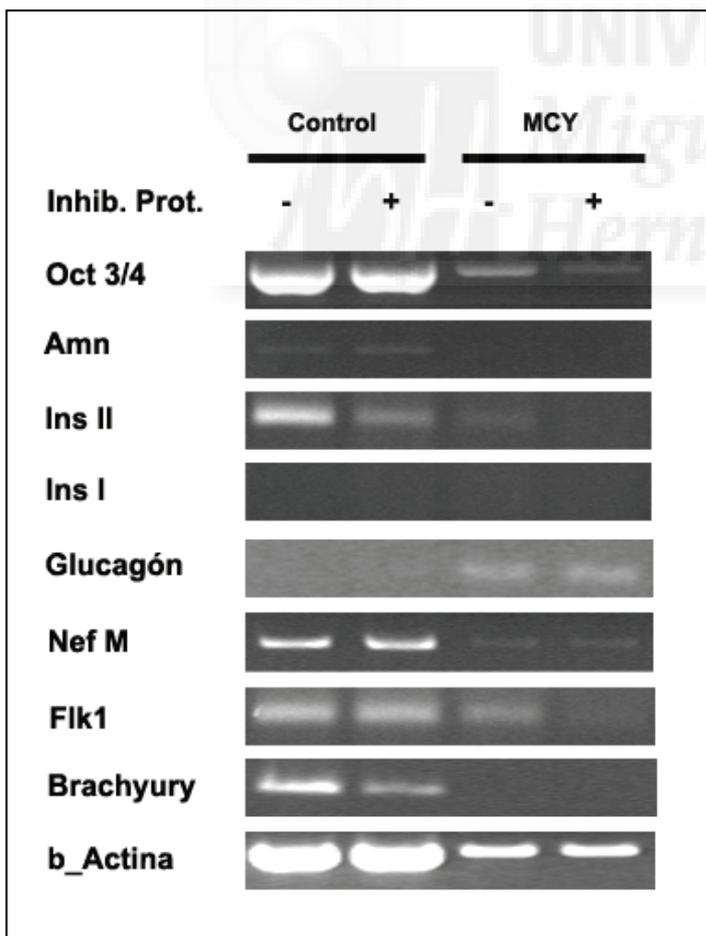


Fig. 18- Perfil de expresión por RT-PCR de marcadores específicos de capas embrionarias en ESC D3-GB2 diferenciadas hacia células productoras de insulina por medio del cultivo en medio condicionado de rudimentos pancreáticos (MCY) y en presencia o ausencia de inhibidores de proteasas.

En las condiciones de cultivo de las ESC con los medios condicionados, se obtuvo una mayor expresión de células que expresaban preproglucagón, observándose también marcaje de neurofilamento M en todas las condiciones.

Por otro lado, en ambas condiciones, se obtuvo un rendimiento de endodermo visceral menor que en las condiciones de cultivo por diferenciación espontánea o por sustitución del suero ya que los niveles de expresión de Amn fueron más bajos (Fig. 2, 9 A y 18). A pesar de la selección con antibióticos de las ESC diferenciadas que expresan insulina, la expresión de Oct 3/4 en todas las condiciones indica que una población residual pluripotente ha escapado de la presión selectiva o se trata de precursores neuroectodérmicos.

De todos modos, la presencia en el medio de cultivo de los inhibidores de proteasas, no pareció afectar en gran medida a la expresión de genes ni a las morfologías celulares observadas tras la selección con antibiótico.

Tras el análisis morfológico y de expresión génica, se procedió a estudiar la funcionalidad de estas células seleccionadas en función de su capacidad de regulación de la secreción de insulina ante distintas concentraciones de glucosa en el medio.

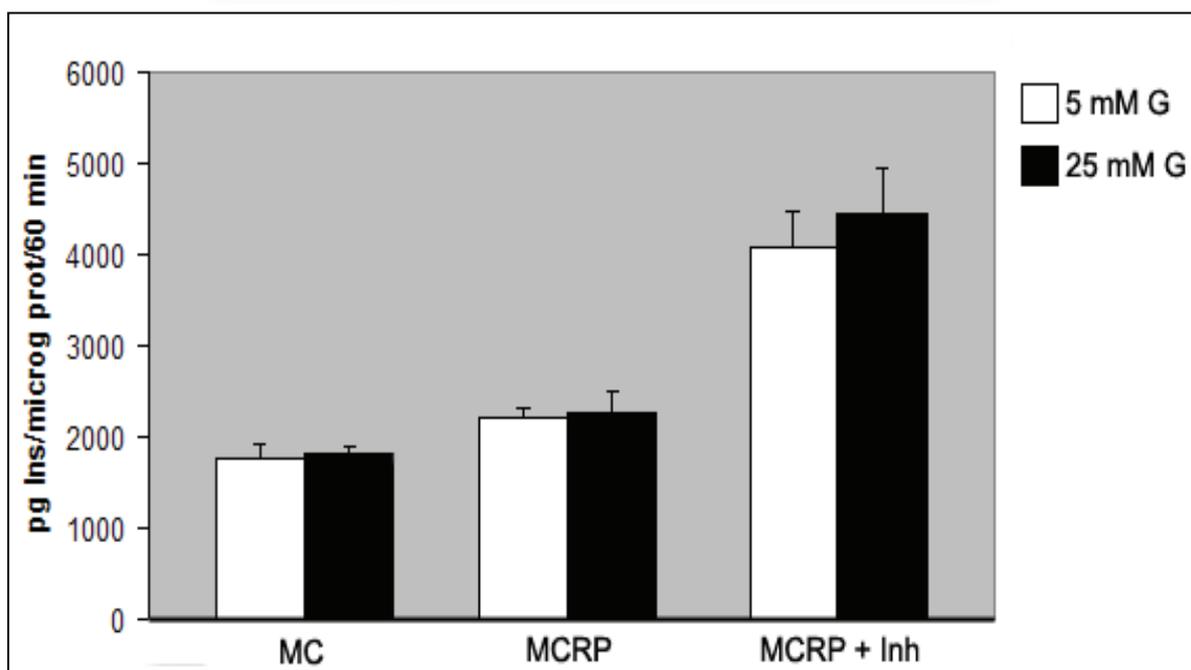


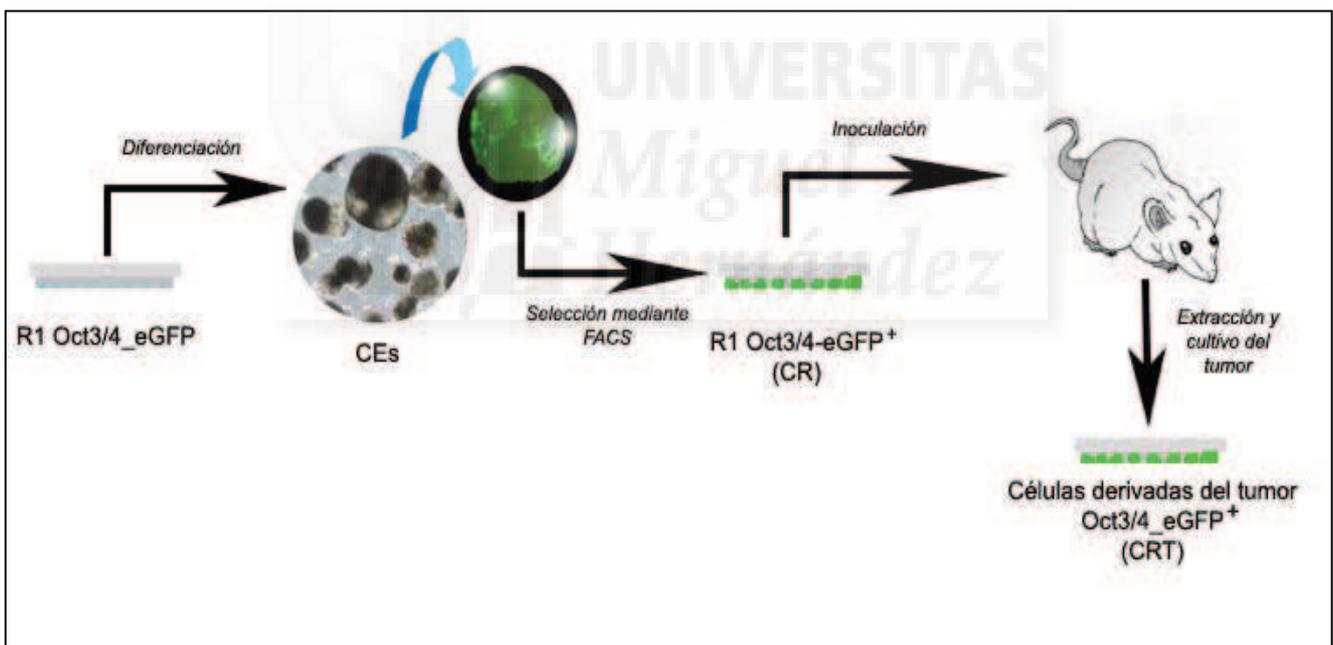
Fig. 19- Secreción de insulina de las células seleccionadas con neomicina tras los protocolos de cultivo en presencia de medio basal (MC), medio condicionado de rudimentos pancreáticos (MCRP) y en presencia de inhibidores de proteasas (MCRP + Inh); en respuesta a 5 mM y 25 mM de glucosa (G). n = 3

Las células seleccionadas no parecieron responder a los estímulos de la glucosa en ninguna condición (Fig. 19), siendo evidente debido a la ausencia de expresión de insulina tipo I (Fig. 18). De todos modos, las células seleccionadas tras el cultivo con los medios condicionados muestran una secreción mayor de insulina respecto a las obtenidas mediante el medio control, al igual que ocurría con las INS1 (Fig. 16). Por otro lado, se hace patente que la adición de inhibidores de proteasas a los medios condicionados, aumenta la secreción no controlada de insulina hasta casi el doble respecto al medio en ausencia de estos inhibidores.



4.5. ESTUDIO DE LA RUTA LIF-STAT3 EN CÉLULAS OCT 3/4⁺ RESIDUALES.

Tras observar la presencia de expresión de Oct 3/4 en todos los protocolos de diferenciación utilizados en la presente memoria, se pasó a estudiar las células que presentaban expresión de dicho factor de transcripción. Para la caracterización de las células residuales Oct 3/4⁺ que escapan de los procesos de diferenciación, se procedió a la transfección de ESC R1 con una construcción genética donde la proteína verde fluorescente (GFP) permanece bajo el control del promotor del Oct 3/4. Con ello se facilitó la selección de las ESC R1 Oct 3/4_eGFP⁺ (CR) mediante FACS (Esquema 13), tras la formación de CEs mediante diferenciación espontánea, para obtener un cultivo homogéneo que permitiera su caracterización y estudio del posible potencial tumorigénico.



Esquema 13- Obtención de las ESC resistentes a los procesos de diferenciación (CR) mediante selección con la construcción genética Oct3/4_eGFP y el posterior estudio de la capacidad tumorigénica en ratones inmunodeprimidos. Finalmente, se obtuvieron en cultivo *in vitro* la línea celular de los tumores (CRT) para su caracterización.

La ruta LIF-STAT3 es una de las principales vías de transducción de señales intracelulares en ratón relacionada con el estado de indiferenciación celular (Burdon T. y col., 2002). Las CR obtenidas por selección con el constructo Oct 3/4_eGFP ofrecen una resistencia a la diferenciación en ausencia del LIF, por lo que se procedió a evaluar

el estado de esta ruta por medio de western blot de STAT3 en su forma activa, esto es, fosforilada.

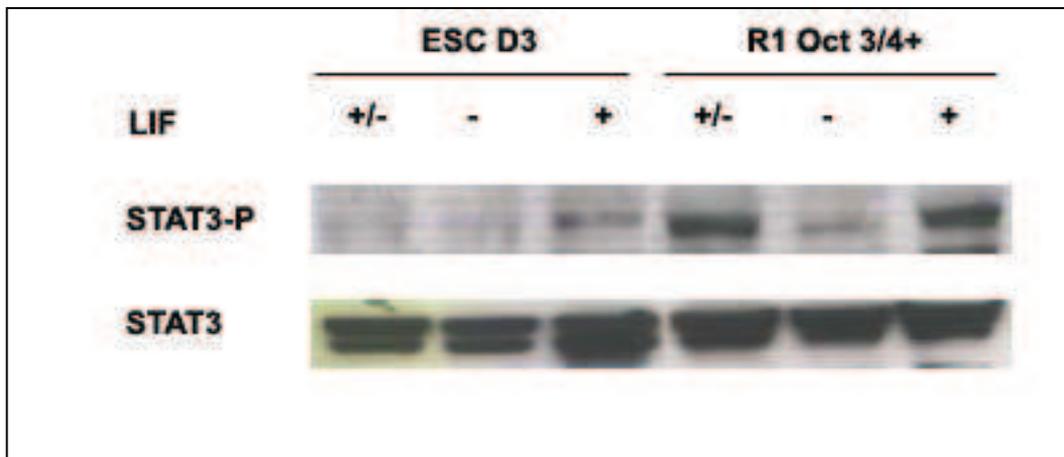


Fig. 20- Western blot de STAT3 fosforilado (STAT3-P) y STAT3 total de ESC D3 y células residuales Oct 3/4⁺ (R1 Oct 3/4⁺) en presencia (+), ausencia (-) o tras inicialmente en presencia de LIF y posteriormente 24 h. en ausencia de LIF (+/-). n = 3.

Se evidencia una activación constitutiva de STAT3, manteniendo el estado fosforilado de las CR tanto en presencia como en ausencia de LIF (Fig. 20), por lo que esta vía parece estar desregulada a nivel de la fosforilación de STAT3. En condiciones normales, la retirada del LIF induce la defosforilación de STAT3 y el inicio en las células de los procesos espontáneos de diferenciación. Se descartan posibles factores del medio de cultivo que puedan activar de manera inespecífica esta ruta, debido a que es el mismo que se utilizó en el cultivo de las ESC D3 que actuaron como control y que como se comprueba en ausencia de LIF, la señal de STAT3 fosforilado es inapreciable. Se evidenció que 24 h. después de eliminar el LIF del medio, la señal de STAT3 fosforilado en las ESC D3 que actuaron como control (Fig. 20 ESC D3 (+/-)), disminuye hasta llegar a los niveles de las D3 que estuvieron en ausencia de LIF durante todo el periodo de cultivo (Fig. 20 ESC D3 (-)), comprobándose la dependencia del LIF en la activación de STAT3. Este hecho no ocurre en las CR donde los niveles de STAT3 fosforilado permanecieron inalterados (Fig. 20 R1 Oct 3/4⁺ (+/-) y (+)). De todos modos, el cultivo de las CR en ausencia de LIF durante todo el periodo de cultivo, resulta en una disminución de la señal de STAT3 fosforilado, similar a los niveles de las ESC D3 en presencia de esta citoquina, dando pie a pensar en una tasa mas lenta de recambio del STAT3 fosforilado en CR.

4.6. POTENCIAL TUMORIGÉNICO DE CÉLULAS RESIDUALES INDIFERENCIADAS.

Una vez estudiado el estado de la ruta de transducción de señales STAT3 en las CR, se procedió a comprobar el potencial tumorigénico de éstas, ya que una característica de las células pluripotenciales es la formación de teratomas de manera espontánea. Se inocularon las CR en ratones inmunodeprimidos y tras aproximadamente 90 días, se apreció la aparición de un tumor sólido y bien definido en el lugar de inoculación de los ratones con las CR. La aparición del tumor fue más tardía que el control con ESC R1 sin transfectar. Tras el sacrificio del animal, se pudo comprobar que no había signos aparentes de metástasis.

El análisis anatomopatológico reveló que se trataba de un teratoma en el que se podía diferenciar tipos celulares procedentes de las tres capas embrionarias (Fig. 21). Se observaron áreas de neuroectodermo, epitelio ciliar, condrocitos y adipocitos tanto en los tumores con ESC R1 control como con las células residuales indiferenciadas.

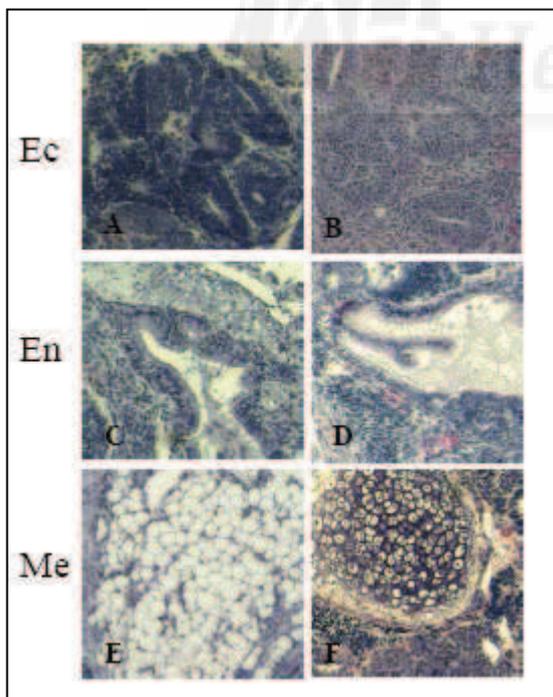


Fig. 21- Análisis comparativo histológico hematoxilina-eosina de los tumores obtenidos de las ESC R1 (A, C, E) y las células residuales Oct 3/4⁺ expandidas en ausencia de LIF (B, D, F). Las secciones muestran la variedad de tejidos derivados de las tres capas embrionarias: ectodermo (Ec) neuroepitelio (A y B); endodermo (En) epitelio ciliar (C y D); mesodermo (Me) adipocitos (E) o condrocitos (F). X100 (A, C-F); X200 (B).

El análisis de la expresión de Oct 3/4 de los tumores se analizó mediante RT-PCR semicuantitativa (Fig. 22). Se observó que la expresión de Oct 3/4 entre los

tumores procedentes de las R1 control frente a los de las CR es prácticamente la misma (Fig. 22 A y B), dando unos valores por semicuantificación de $0,5 \pm 0,05$ y $0,45 \pm 0,07$ respectivamente. Estos valores son menores respecto a las células del propio tumor (Fig. 22 C-D) pudiendo ser debido a que los tumores se han diferenciado a linajes más maduros dentro del animal. De todos modos se confirmó siempre la existencia de una fracción celular residual indiferenciada y con fluorescencia verde.

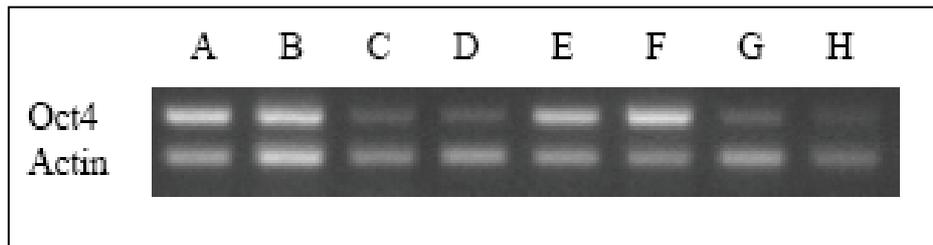


Fig. 22- Expresión de Oct 3/4 en ESC y células derivadas de tumores. La expresión fue analizada por RT-PCR semicuantitativa normalizando por densitometría los valores de Oct 3/4 a partir de la bActina en diferentes tipos celulares: ESC R1 cultivadas en monocapa en presencia de LIF (A); células residuales Oct 3/4⁺ (CR) cultivadas en ausencia de LIF (B); tejido tumoral derivado de ESC R1 (C) o derivado de células residuales fluorescentes (CR) (D); células residuales Oct 3/4⁺ derivadas de tumor (CRT) y cultivadas en monocapa en ausencia de LIF y gelatina durante 1 día (E) y 7 días (F) o en presencia de gelatina durante 7 días (G) o como CE durante 7 días (H).

A partir de los tumores procedentes de las CR, se procedió a obtener una línea celular para su caracterización (CRT). Estas CRT ofrecían en cultivo 2 poblaciones: una población verde fluorescente y otra con ausencia de fluorescencia (Fig. 23 A y B). La expresión de Oct 3/4 se mantuvo en el transcurso del tiempo en las CRT (Fig. 22 E y F) en ausencia de LIF y gelatina, por lo que confirma el carácter indiferenciado de estas células.

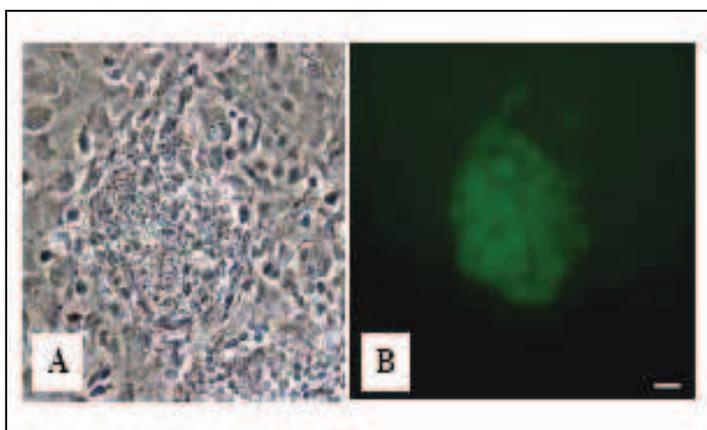


Fig. 23- Imágenes por microscopía de contraste de fases (A) y fluorescencia (B) de células obtenidas a partir de digestión enzimática parcial de teratoma formado por células residuales Oct 3/4⁺ (CRT) y expandidas en monocapa en ausencia de LIF. La barra indica 100 μ m

En presencia de gelatina o induciendo procesos de diferenciación mediante la formación de cuerpos embrionarios de las CRT, se comprobó que la expresión de Oct 3/4 disminuyó tal como se observó por RT-PCR (Fig. 22 G y H) y por microscopía de fluorescencia (Fig. 23). Para comprobar si esto afectó a la tasa de proliferación se realizó una curva de crecimiento de las CRT, con las CR y con la línea ESC D3 (Figura 24). Se comprobó que la población CRT en presencia de gelatina mantuvo una tasa de proliferación menor que sin la presencia de ésta, durante las primeras 48 h. El periodo de duplicación de la población verde derivada del tumor en ausencia de gelatina fue mayor que el cultivo de las ESC D3 a las 48 h por lo que existe una diferencia de partida con respecto a esta propiedad, siendo indicativo también el hecho de que es mayor que las CR. Todo ello podría indicar que el paso de estas células por el animal implique un desequilibrio en la tasa de crecimiento tras su aislamiento y cultivo *in vitro*. El crecimiento en cultivo de las CRT en presencia de gelatina, parece mimetizar los procesos de diferenciación que ocurren en el animal en el proceso de formación del tumor.

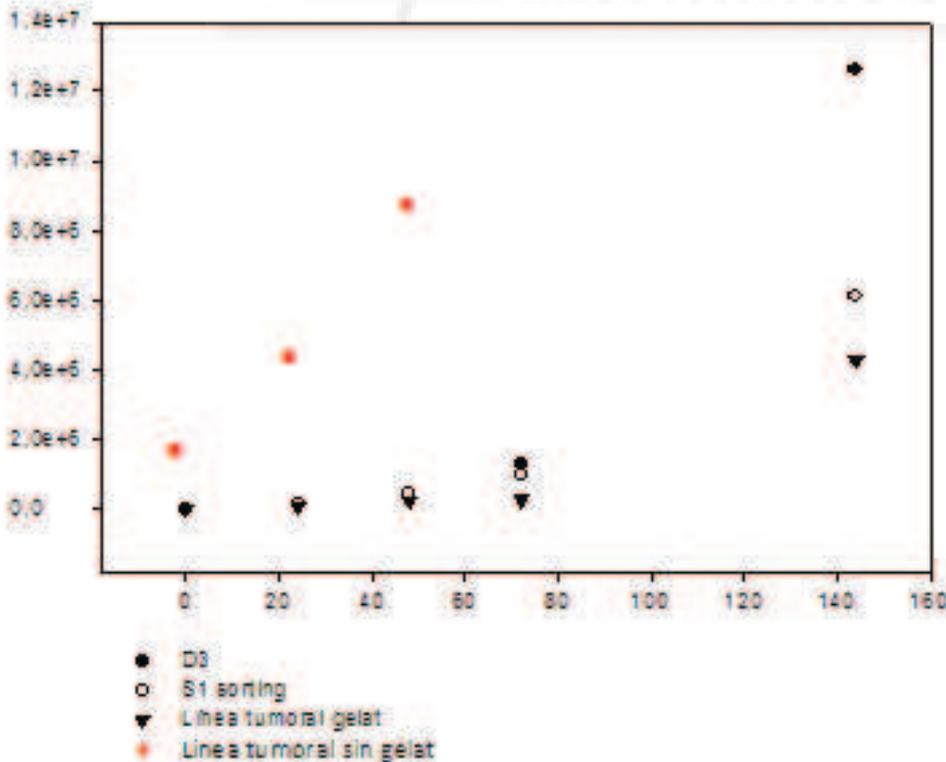


Fig. 24- Curvas de crecimiento de diferentes tipos celulares en cultivo: ESC D3 (D3); células residuales fluorescentes preinoculación en ratón, CR (S1 sorting) o tras aislarse del teratoma en presencia o ausencia de gelatina, CRT (Línea tumoral). El conteo de las células se realizó cada 24 h. durante 6 días.

4.7. CARIOTIPADO DE LA LÍNEA CELULAR OBTENIDA DEL TERATOMA DERIVADO DE LAS CÉLULAS RESIDUALES.

Comparando las CR resistentes a la ausencia de LIF con ESC R1 sin transfectar, se observa en las primeras una ganancia de dos cromosomas en más del 50% de las células analizadas en metafase (Fig. 25). Por el contrario las R1 presentan un cariotipo normal con una frecuencia de más del 75%. Las células derivadas y aisladas del teratoma de ratón (CRT) presentan el mismo patrón que las CR, ofreciendo también una ganancia de dos cromosomas extras.

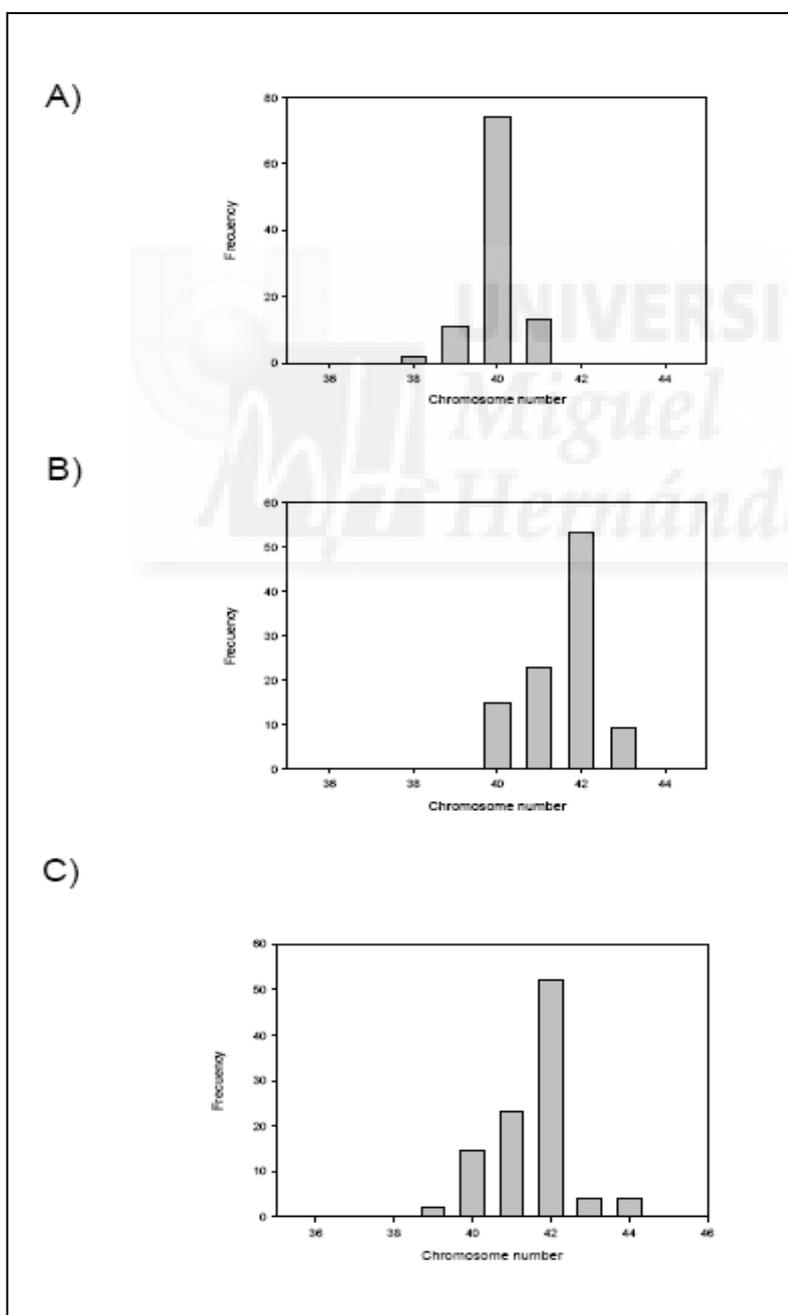


Fig. 25- Número de cromosomas de diferentes células usadas en el trabajo: ESC R1 después del pase 20 (A); células fluorescentes residuales transfectadas con el vector Oct 3/4_eGFP y aisladas de CE de 20 días, CR (B); células fluorescentes obtenidas de teratomas formados a partir de células residuales Oct 3/4⁺, CRT (C)

Un análisis en profundidad de los cromosomas reveló que tanto en las CR como las CRT presentaban una duplicación de los cromosomas 8 y 9 (Tabla 10). Esta anomalía cromosómica podría explicar por qué *in vitro* se favorece la selección de esta población que ofrece una expresión constitutiva de Oct 3/4⁺. De todos modos se documentó que el gen Oct 3/4 no mapea en dichos cromosomas, sino en el 17. Por otro lado, las CRT que mantienen el mismo patrón cromosómico podrían diferenciarse *in vitro*.

Tipo celular	# células (%)	Cariotipo
ESC R1	8 (80%)	40,XY
	1 (10%)	40,XY; t(4;10)
	1 (10%)	1 (10%)
Células residuales transfectadas y fluorescentes Oct 3/4-eGFP (CR)	6 (60%)	42,XY;+8;+9
	1 (10%)	43,XY;+8;+9;+10
	1 (10%)	43,XY;+2;+8;+11
	1 (10%)	43,XY; +8;+8;+9
	1 (10%)	41,XY;+1;-5;-6;+8;+9
Células fluorescentes provenientes del teratoma (CRT)	8 (100%)	42,XY;+8;+9

Tabla 10 – Análisis del cariotipo por SKY de diferentes células con expresión de Oct 3/4

Con todo ello se comprueba que las alteraciones cromosómicas de la fracción celular residual indiferenciada no deriva directamente de las ESC parentales. Probablemente estas alteraciones se produzcan durante el cultivo celular y contribuyan de alguna manera a seleccionar una población que ofrezca resistencia a diferenciarse *in vitro*.



5. DISCUSIÓN.

5.1 LA DIFERENCIACIÓN ESPONTÁNEA DE ESC GENERA CÉLULAS PRODUCTORAS DE PREPROGLUCAGÓN.

Las ESC de ratón de la línea D3 en cultivo *in vitro* mantienen sus características de indiferenciación mediante las condiciones adecuadas, como es la presencia de la citoquina LIF en el medio, lo que viene corroborado por la expresión de marcadores de pluripotencialidad como Oct 3/4 (Nichols, J. y col. 1998) y Nanog (Ying, Q. y col., 2003) (Fig. 1 A) así como la actividad de la fosfatasa alcalina (Fig. 1 B). La ausencia de expresión de otros genes utilizados en este trabajo, como marcadores específicos de distintas capas embrionarias, aseguran que las ESC no están comprometidas desde el primer momento hacia ningún linaje en particular (Fig. 1 A).

Las ESC tienden a diferenciarse de manera espontánea a todos los linajes de las tres capas embrionarias en condiciones de cultivo definidas (Gadue P. y col., 2005). El endodermo definitivo, es por su disposición en el embrión, una capa embrionaria compleja de obtener *in vitro* por la necesidad de multitud de contactos con otras capas o estructuras embrionarias a lo largo del desarrollo *in vivo* (Beddington, R. y col., 1999; Wells, J. y col., 2000; Yamamoto, M. y col., 2004). De todos modos, en trabajos publicados se han obtenido células maduras provenientes de esta capa, como son los hepatocitos, por medio de la diferenciación espontánea (Choi, D. y col., 2005; Jones, E. y col., 2002). En nuestro laboratorio, a partir de la formación espontánea de agregados tridimensionales denominados CEs durante 21-28 días, nunca se ha obtenido señal del marcador específico de hepatocito, alanina-glioxilato aminotransferasa (Agxt) (Fig. 2), enzima que participa en la transaminación de aminoácidos. Por tanto, las ESC D3 no parecen dirigirse fácilmente hacia el endodermo hepático o linajes más maduros de manera espontánea. Esto puede ser debido a que no todas las líneas de ESC tienen el mismo potencial de diferenciación y ofrecen por tanto, un rendimiento diferente a la hora de obtener un determinado linaje o tipo celular.

En algunos trabajos se ha observado que los linajes que se obtienen por diferenciación espontánea en monocapa son mayoritariamente de origen

neuroectodérmico (Roche, E. y col., 2005) o provienen del endodermo visceral inmaduro (Milne, H. y col., 2005). La alta expresión de PC1 que se observa en paralelo a la de Nef M, indica que prevalece el neuroectodermo. No se descarta la presencia de linajes provenientes de otras capas embrionarias como es el caso del mesodermo debido a la presencia de expresión de Flk1, ya en días tempranos de cultivo, así como de brachyury que presenta la misma cinética de expresión temporal que el anterior. El endodermo visceral maduro, aparece a días más tardíos (alrededor del día 11) verificado por la presencia de Amn, observación que se contrapone con la hipótesis de Milne, H., que sugieren la presencia de un endodermo extraembrionario inmaduro hasta el día 12 debido a la ausencia de expresión de AFP. Por otro lado, en dicha publicación observan expresión de preproglucagón por RT-PCR tras la diferenciación en monocapa, pero no comprueban si la preproteína generada sufre un procesamiento posterior. De todos modos, en nuestro caso no observamos expresión por RT-PCR de esta hormona, por lo que se descarta incluso la presencia de preproglucagón, pudiendo ser debido a que la línea de ESC utilizada (CCE) es distinta a la del trabajo de Milne, H. y tiene una pluripotencialidad diferente.

La formación espontánea de CEs a partir de las ESC, parece mimetizar el desarrollo del huevo cilindro *in vitro* (Desbaillets, I. y col., 2000). A partir del día 10 de cultivo comienzan a aparecer CEs más desarrollados y con cavitaciones llenas de aire o líquido en su interior (Fig. 3 C y D), que conforme progresan en el tiempo, aumentan de tamaño e incluso presentan zonas con latidos. Este hecho constata que no todos los CEs toman la misma dirección a la hora de diferenciarse espontáneamente y que por tanto existe una heterogeneidad en el cultivo que puede afectar a la eficiencia a la hora de obtener un linaje derivado de una capa embrionaria en particular. Este aspecto se ha evidenciado en cuanto a la relación del tamaño del CE y la capacidad de generación de condrocitos (Messana, J. y col., 2008).

En el análisis por RT-PCR de la expresión de marcadores de las ESC D3, se evidencia que mediante diferenciación espontánea, los CEs generan el endodermo visceral, endodermo pancreático, neuroectodermo, mesendodermo y mesodermo como sugieren las señales obtenidas de Amn, preproglucagón, neurofilamento M, brachyury y Flk1 respectivamente (Fig. 2). El mismo perfil de expresión general presentan las ESC R1 (Fig. 10), diferenciándose con respecto a las D3 únicamente en la presencia de

brachyury a días más tempranos (día 21) y una disminución, respecto al tiempo, de la expresión de preproglucagón y ambas PCs.

Por otro lado, a pesar de la expresión del ARNm de preproglucagón, no se observa señal por RT-PCR de la insulina tipo I en ambas líneas de ESC. En cambio la insulina tipo II se expresa en todas las condiciones de cultivo, tanto en monocapa como en los CEs císticos y compactos en ESC D3 (Fig. 2). Además de por la célula beta, esta insulina se genera en células provenientes del neuroectodermo (Deltour, L. y col., 1993) y del endodermo visceral (McGrath, K. E. y col., 1997). Por tanto, al verse acompañada su expresión por marcadores como Nef M y Amn, el origen de este tipo de insulina puede deberse a la presencia de linajes de dichas capas embrionarias.

En publicaciones sobre diferenciación de ESC de ratón hacia células productoras de insulina, se utiliza el péptido C como prueba de la síntesis de insulina *de novo* sin concluir nada acerca de un procesamiento (Ku, H. T. y col., 2004; Shi, Y. y col., 2005; Vaca, P. y col., 2005 y 2008). De todos modos, este péptido también se encuentra cuando se genera la insulina de tipo II (Blume N. y col., 1992) e incluso se ha observado que se localiza también en células de origen neuroectodérmico (Sipione, S. y col., 2004). Aunque se puede discernir a qué tipo de insulina pertenece el péptido C mediante anticuerpos específicos (Blume, N. y col., 1990), dichos trabajos utilizan anticuerpos contra péptido C que no discriminan entre ambas insulinas. El marcaje observado de péptido C en nuestras células (Fig. 4 B) podría tener su origen en el linaje ectodérmico ya que no se acompaña de la expresión de insulina tipo I por RT-PCR (Fig. 2).

A pesar de la ausencia de insulina tipo I, los CEs císticos dan lugar a una población de células que expresan preproglucagón (Fig. 2) hecho que no se observó en monocapa por diferenciación espontánea. Esta observación sugeriría en principio, que se debería procurar aumentar la obtención CEs císticos en cultivo para lograr un mayor número de células preproglucagón⁺. De todos modos, en el protocolo de diferenciación por serodeprivación y adición de ácido ascórbico y MTG basado en el trabajo de Ku. T. y col., no se logra obtener CEs císticos, aún observando expresión de preproglucagón (Fig. 9 A). Por tanto, se hace necesario evaluar si las poblaciones preproglucagón⁺ obtenidas en ambos protocolos, presentan las mismas características.

El tejido vascular proviene específicamente de la capa embrionaria mesodérmica, siendo el receptor de membrana Flk1 un marcador específico de éste. Tanto en la diferenciación espontánea en monocapa o por medio de la formación de CEs, la expresión de Flk1 se hace patente (Fig. 2). Debido a la proliferación y diferenciación de las ESC a estructuras más complejas, se necesitan células especializadas que vayan formando el árbol vascular para permitir el transporte de nutrientes y gases a áreas más inaccesibles. Este hecho ya se observa a días muy tempranos de la diferenciación en monocapa en ausencia de LIF (día 6) (Fig. 2) y también en otros trabajos a día 7 en CEs con una expresión por RT-PCR del marcador bastante robusta en ESC 129/SvJ (Choi, D. y col., 2005) (Ver anexo, tabla 1). De cualquier forma el marcador específico del mesendodermo, el factor de transcripción brachyury no se expresa de manera correlativa en el tiempo con Flk1 en CEs (Fig. 2). En la bibliografía son numerosos los grupos que le atribuyen a brachyury el papel de marcador del precursor del mesodermo y endodermo (D'Amour, K. y col., 2005, Ku, H. T. y col., 2004; Kubo, A. y col., 2003), al igual que también lo hacen con goosecoide (Tada, S. y col., 2005; Yasunaga, M. y col., 2005), utilizándolos en diferentes protocolos de diferenciación de ESC hacia endodermo definitivo y así verificar la correcta dirección del proceso. Pero existen trabajos en que se ha observado que ambos genes también se expresan en tejidos extraembrionarios (Faust, C. y col., 1995; Inman, K, E. y col., 2006). Por tanto es probable que la expresión de brachyury sea debida a la presencia de células del endodermo visceral.

5.2 LA DIFERENCIACIÓN ESPONTÁNEA DE ESC GENERA CÉLULAS QUE EXPRESAN PREPROGLUCAGÓN DE ORIGEN NEUROECTODÉRMICO.

Los estudios por inmunofluorescencia de los CEs adheridos a la placa de cultivo, muestran la presencia de marcaje con el anticuerpo contra glucagón correlacionándose con la expresión de esta hormona observada por RT-PCR (Fig. 6 B y 7 C). Por medio de técnicas de western blot en células alfa TC1, se evidenció que este anticuerpo también es capaz de reconocer a los precursores de la hormona (18 y 21 Kda) (Fig. 6 C). Por

cuestiones de resolución de la técnica, no se pudo observar una banda correspondiente al glucagón procesado (3,5 – 4,5 Kda). Por tanto el glucagón observado por inmunofluorescencia no permite discernir si es tan solo la prohormona o una mezcla entre ésta y el glucagón maduro o tan solo del segundo.

El precursor proteico del glucagón puede procesarse de dos formas distintas según el tipo celular en el que se sintetice (Esquema 12). En la célula alfa del páncreas endocrino, el preproglucagón se escinde en varios fragmentos debido a la acción de la PC2, dando lugar al glucagón, GRPP y el fragmento mayor del proglucagón (Rouillé, Y. y col., 1994; Rouillé, Y. y col., 1995). En cambio en las células L especializadas del intestino distal y en células derivadas del neuroectodermo, esta prohormona da lugar a los péptidos GLP 1 y 2, glicentina y oxintomodulina por acción de la PC1/3 (Dhanvantari, S. y col., 1998; Dhanvantari, S. y col., 2001; Rouillé, Y. y col., 1995). En los estudios por inmunofluorescencia de los CEs adheridos en placa, se observó tanto marcaje con glucagón como con el anticuerpo anti-GLP1 (Fig. 7 C y 8 C), además de co-localizar ambos con Nef 200 y GFAP respectivamente, marcadores específicos de neuroectodermo. Por otro lado se hace evidente la expresión por RT-PCR de ambas PCs en los CEs compactos mantenidos durante 28 días de cultivo (Fig. 2), lo que no ocurre en los CEs císticos donde se expresa el preproglucagón por diferenciación espontánea. Todo ello podría indicar que los CEs císticos no procesarían el preproglucagón para dar lugar a la hormona madura debido a la ausencia de señal de PC2 y que una vez que proliferan tras su adhesión, se demuestra que siempre existe una co-localización entre marcadores neuroectodérmicos y los posibles productos de la prohormona.

De todos modos las PCs no están solo implicadas en el procesamiento del glucagón sino también en otros muchos precursores proteicos como los neuropéptidos que aparecen en el sistema nervioso (Rehfeld, J. y col., 2002; Villeneuve, P. y col., 2002; Zhu, X. y col., 2002) o incluso la propia insulina (Baillyes, E. M. y col., 1992; Bennett, D. L. y col., 1992).

Tras evidenciar la naturaleza de las células positivas a preproglucagón, se demostró la nula capacidad que tienen, formando parte del CE, de modular la expresión génica del glucagón en presencia de distintas concentraciones de glucosa (Fig. 14). Mientras que la línea alfa TC1, responde ante una baja concentración de glucosa con un

aumento de expresión de esta hormona, los CEs que contienen dichas células, mantienen el mismo nivel de expresión del gen independientemente de la concentración de glucosa.

Todo esto da pie a determinar que las células que expresan glucagón obtenidas por diferenciación espontánea a partir de CEs císticos no tienen su origen en el endodermo definitivo y por tanto no se acercan al perfil de la célula alfa pancreática, sino que derivan hacia la línea neuroectodérmica. Además, la nula expresión de las PCs en los CEs císticos indicaría que el glucagón presente tampoco sería la hormona madura. Por tanto, utilizar esta hormona como marcador específico del endodermo pancreático no sería discriminante, debido a que las técnicas empleadas en las publicaciones no demuestran el origen de las células positivas a glucagón.

Como ejemplo cabe destacar los trabajos de Shiroi, A. y col., 2002 y Milne, H. y col., 2005, donde en CE o en monocapa respectivamente, detectan la expresión de glucagón. En el caso de Shiroi, A. observan expresión de esta hormona por RT-PCR, a falta de estudios funcionales más determinantes que comprueben el grado de madurez de las células que lo expresan. Similar es el caso de Milne, H. donde también utilizan RT-PCR pero sin distinguir los distintos grados de procesamiento de la preprohormona.

5.3 LA DIFERENCIACIÓN DE ESC MEDIANTE MÉTODOS COAXIALES GENERA CÉLULAS QUE EXPRESAN PREPROGLUCAGÓN Y CO-LOCALIZAN CON MARCADORES NEUROECTODERMICOS.

Tras evidenciar por protocolos de diferenciación espontánea la ausencia de obtención de endodermo definitivo y la naturaleza neuroectodérmica de las células que expresaban preproglucagón, se procedió a utilizar protocolos publicados de diferenciación dirigida. Basándonos en los trabajos de Kubo, A. y col., 2004 y Ku, T. y col., 2004, se reprodujo el protocolo de diferenciación publicado para conseguir mejorar el rendimiento de obtención de células productoras de insulina, en teoría derivadas del endodermo definitivo.

Existen trabajos donde el ácido ascórbico se ha utilizado en protocolos de diferenciación dirigida hacia tejido óseo tanto en ESC (Handschel, J. y col., 2008) como en células madre adultas provenientes de la médula ósea (Choi, K. y col., 2008). Esta vitamina, además de su función antioxidante, también facilita la formación del entramado de colágeno extracelular de las células óseas. Por otro lado, se ha comprobado también su implicación en la diferenciación de ESC hacia mesodermo, debido al aumento de zonas con latidos en el cultivo cuando se acompaña de una serodeprivación (Passier, R. y col., 2005). Kubo, A. es el primer autor que refiere el uso de ácido ascórbico como componente de un cultivo coaxial para diferenciar ESC hacia endodermo definitivo.

El MTG, al igual que el β ME, es un compuesto químico perteneciente a la familia de los tioles. El uso de estas sustancias en los medios de cultivo permite el control del estrés oxidativo producido por la presencia de radicales libres formados a partir de las reacciones metabólicas de las células. El uso específico de este compuesto, en las publicaciones de Kubo, A. y Ku, T., es debido a las concentraciones fluctuantes del glutatión, proteína involucrada en el control del estrés oxidativo celular, que se han observado durante el desarrollo embrionario (Gardiner, C. y col., 1994), por lo que la utilización del MTG puede modular *in vitro* la función antioxidante por mecanismos aún no conocidos. El MTG también ha sido utilizado por otros grupos en protocolos para la obtención de células productoras de insulina (Schroeder, I. y col, 2006), aunque debido a problemas técnicos no logran confirmar la presencia de insulina tipo I (Ver Anexo, tabla 2).

El uso del suero como componente de los medios de cultivo está bastante extendido en los protocolos de diferenciación celular. En el caso del cultivo *in vitro* de ESC de ratón es imprescindible tanto a la hora de permitir la adhesión de las células a las superficies de cultivo, como en los primeros estadios de formación del CE así como establecer la presencia de factores de crecimiento que permitan la proliferación celular. Su uso puede acarrear problemas si en un futuro se pretenden usar ESC humanas en protocolos de terapia celular, debido al riesgo de infección por patógenos animales. Por otro lado, la presencia del suero implica trabajar con medios de cultivo no definidos, por lo que el control de ciertos factores presentes en él es escaso y al aplicar los protocolos

de diferenciación de ESC puede alterar los resultados cuando se cambia de lote. La serodeprivación de los medios de cultivos es una alternativa para evitar estos problemas, bien reduciendo al mínimo o en su totalidad el porcentaje de suero o bien sustituyéndolo por un análogo sintético.

Kubo, A. utiliza una línea ESC modificada genéticamente (ver Anexo, tabla 1) mediante la inserción por recombinación homóloga del gen que codifica la GFP bajo el promotor de brachyury. Con estas ESC y utilizando un método coaxial de cultivo, compuesto por un análogo sintético del suero, ácido ascórbico y MTG, comprueba que se obtiene un perfil de expresión por RT-PCR a día 6 de CE semejante al endodermo definitivo, basándose en la expresión de genes tales como Pax6, Foxa2, y Sox17. Estos marcadores, además de aparecer en el endodermo definitivo, también lo hacen en otras capas embrionarias como el neuroectodermo (Pax6 (Grindley, J. y col., 1995) y Foxa2 (Monaghan, A. y col., 1993)) y el endodermo visceral o extraembrionario (Foxa2 (Perea-Gomez, A. y col., 1999) y Sox17 (Sherwood, R. y col., 2007)). Al no aislar una población celular mediante estos tres marcadores o inmuno-localizarlos en una misma célula, no se puede determinar la presencia de endodermo definitivo ya que no se descarta una mezcla de poblaciones pertenecientes al neuroectodermo y endodermo visceral en el cultivo.

De todos modos observan que siguiendo este protocolo y sembrando los CEs a día 4 de cultivo en matrigel y en presencia de dexametasona obtienen por RT-PCR expresión de marcadores específicos de hepatocitos, como por ejemplo los genes de la TTR, AAT y TAT, hecho que no ocurre con CEs obtenidos por diferenciación espontánea. Lo que se comprueba con estos experimentos es la predisposición de las ESC a tomar la vía de especificación hacia endodermo definitivo sólo bajo condiciones coaxiales particulares. No obstante, el protocolo de diferenciación necesita de otros pasos o estadios en los que la adición de factores o sustancias (como la dexametasona en el caso de la especificación hacia hepatocitos) promuevan una diferenciación más avanzada. A pesar de dejar en cultivo los CEs durante 28 días en las condiciones descritas, no observamos expresión de insulina tipo I en los dos tipos de líneas de ESC empleadas (Fig. 9 A y 12) y por consiguiente ausencia de células con fenotipo similar a la célula beta.

En los estudios realizados por Kubo utilizando activina A y seleccionando las poblaciones brachyury⁺ en condiciones de serodeprivación, tampoco distingue entre los dos endodermos ya que de nuevo utiliza marcadores compartidos por ambos. Sólo al emplear posteriormente un protocolo de diferenciación hepática a día 10 de CE durante 4 días es cuando verifica la obtención de expresión de marcadores del endodermo definitivo como Tcf1 y Sftpc, por lo que corrobora la necesidad de completar el protocolo para dirigir a las ESC en el proceso de diferenciación.

La expresión por RT-PCR de preproglucagón a día 28, podría sugerir la presencia de progenitores o poblaciones de célula alfa pancreática en los CEs o en los outgrowths derivados de estos, en ESC R1 y D3, (Fig. 9 A y 10) ya que se ha observado que es la primera población endocrina en aparecer durante el desarrollo embrionario (Herrera, P. y col., 1991; Teitelman, G. y col., 1993). Esto explicaría el hecho de observar la expresión de esta hormona y no la de la insulina tipo I. Pero al igual que las células obtenidas por diferenciación espontánea, éstas co-localizan el glucagón con el marcador de neuroectodermo, Nef 200 (Fig. 11 A y 13 A), por tanto se descarta el origen pancreático de la población. A diferencia del protocolo de especificación espontánea, en ambos tipos de ESC no se consigue co-localizar células GFAP⁺ y GLP1⁺ (11 B y 13 B), apareciendo éstas muy próximas entre sí. Por tanto cabe la posibilidad de que se esté obteniendo células semejantes a las de tipo L intestinales, y por consiguiente, tendría sentido la presencia de células GFAP⁺ muy próximas, debido a la alta inervación del intestino distal por los circuitos neuronales enterales (Furukawa, K. y col., 1986). Por otro lado la presencia de péptido C (Fig. 10) no asegura la presencia de insulina I tal como se observa en la expresión por RT-PCR (Fig. 9 A y 12), por lo que no se puede concluir que su localización implique síntesis de insulina tipo I *de novo* y por consiguiente, diferenciación hacia células productoras de insulina de origen endodérmico definitivo.

Al igual que sucedía en CEs obtenidos por diferenciación espontánea, mediante este método coaxial, las células preproglucagón⁺ en el CE son incapaces de modular la expresión del gen del glucagón ante distintas concentraciones de glucosa en el medio (Fig. 14). Este dato parece apoyar la hipótesis de que las células glucagón positivas o bien no procesan la preprohormona, o no se descarta que sea procesada a GLP1. (a

pesar de observar una mínima banda de preproglucagón al utilizar el anticuerpo contra GLP1 (Fig. 6 C))

A pesar de que Kubo demuestra que su protocolo no dirige la diferenciación de las ESC hacia el endodermo definitivo si no que las compromete en un primer paso, en el trabajo de Ku se observa la expresión de insulina tipo I a día 11 de CE en estas condiciones. En ningún momento obtenemos expresión por RT-PCR de insulina tipo 1 en las ESC D3 (Fig. 9 A) ni en las R1 (Fig. 12), esta última línea, utilizada en dicho trabajo. De todos modos, en este trabajo afirman que las células insulina⁺ glucagón⁺ o péptido C⁺ glucagón⁺ obtenidas deben tener un origen pancreático, sin barajar la posibilidad de que se tratase de células de origen neuroectodérmico al expresar también éste los tres marcadores mencionados. Por otro lado, Ku achaca la presencia de insulina tipo I a elementos desconocidos presentes en el suero sintético, ya que demuestra que el factor FGF2 no es el inductor de su expresión. Según Ku el suero sintético debe contener factores todavía por identificar que promueven la expresión de la insulina tipo I, pero en nuestro caso, utilizando la misma casa comercial para este análogo del suero, no advertimos la presencia de esta hormona.

De cualquier modo este protocolo se señala como óptimo para la obtención de endodermo definitivo y por tanto para la consecución posterior de tejidos derivados de éste, pero se comprueba que la capa embrionaria que más prevalece es la neuroectodérmica frente a condiciones de diferenciación espontánea (Fig. 9 D). La utilización de activina A y Wnt en los primeros estadios de diferenciación (D'Amour, K. y col. 2006) podrían aumentar la especificación del endodermo definitivo en detrimento del ectodermo, pero siendo siempre dependiente de la línea celular utilizada.

5.4 LA DIFERENCIACIÓN DE ESC MEDIANTE MEDIOS OBTENIDOS DEL CULTIVO DE RUDIMENTOS PANCREÁTICOS ORIGINA CÉLULAS QUE EXPRESAN INSULINA TIPO II Y GLUCAGÓN.

La búsqueda de nuevos factores que permitan la diferenciación de ESC hacia linajes del endodermo definitivo, como es el páncreas endocrino, es uno de los objetivos que se consideraron para completar protocolos ya establecidos. Algunos de estos protocolos logran obtener células del endodermo pancreático, pero en un estadio inmaduro (D'Amour, K. a. y col., 2006). Para ello se contempló la estrategia de cultivar las ESC con medios ricos en posibles factores implicados en la formación y desarrollo del páncreas. Estos medios pueden obtenerse, por ejemplo, a partir del cultivo de rudimentos pancreáticos de ratón en desarrollo de día 16,5, para posteriormente identificar los factores secretados. Reg1 es uno de los factores identificados, tras la secuenciación de una banda observada por SDS-PAGE de los medios obtenidos tras 10 días de cultivo de dichos rudimentos (Fig. 15). Este factor de transcripción da nombre a una familia, subdividida a su vez en tres clases, debido a la similitud en sus estructuras primarias (Narushima, Y. y col., 1997). Dicha familia pertenece a las lectinas de tipo C con un dominio calcio-dependiente que reconoce carbohidratos.

Reg1 es un factor de crecimiento involucrado en la regeneración y proliferación de la célula beta pancreática como se ha demostrado en rata (Terazono, K. y col., 1988 y 1990) y en ratones “knock out” (Unno, M. y col., 2002). Junto con el factor INGAP (Reg3 δ) son los componentes de la familia Reg que más se han estudiado en relación a este proceso en adultos (Rafaeloff, R. y col., 1997; Rosenberg, L. y col., 2004). Por otro lado se ha comprobado que también están involucrados en la expansión celular del islote durante el desarrollo embrionario (Baeza, N. y col., 1996; Hamblet, N. y col., 2008). Otros componentes de esta familia, como es el caso de Reg3 β , tienen un papel importante a nivel extrapancreático como es la regeneración hepática (Simon, M. T. y col., 2003) o su papel neurotrófico (Nishimune, H. y col., 2000).

La expresión de Reg1 en el páncreas en desarrollo ya se demostró por RT PCR a partir de los días 8 y 12 del desarrollo del ratón (Perfetti, R. y col., 1996). Por lo que la

presencia de Reg1 en los medios obtenidos a partir de los rudimentos pancreáticos de 16,5 días corrobora estos resultados.

Vaca, P. y col., 2006 logra obtener células que expresan insulina al cultivar ESC de ratón en estos medios y revertir la diabetes en ratones tratados con STZ. Debido a la selección de las células que expresan insulina tras la diferenciación, mediante una modificación genética de las ESC donde el gen para la resistencia a neomicina esta bajo el control del promotor de insulina humano, consiguen obtener una población homogénea. De todos modos, obtienen valores de incorporación de BrdU en torno al 60%, un valor bastante alto para tratarse de células diferenciadas y teóricamente con una tasa de proliferación limitada.

Utilizando dicho protocolo con las mismas condiciones de siembra inicial de células para formar CEs ($1,5 \times 10^6$ células/ml) y de concentración de antibiótico (2,3 mg/ml) para posteriormente seleccionar las células, obtuvimos por un lado numerosos agregados de CEs debido a la alta densidad de siembra por unidad de volumen (Fig. 17 A) y por otro, ausencia de células tras la selección. La alta dosis de neomicina utilizada permitiría seleccionar un clon de células sólo si previamente hubiese sido transfectado con un alto número de copias de la construcción genética, ya que de este modo, se sintetizaría suficiente enzima para inhibir la acción del antibiótico a través de cambios en su estructura. Por tanto, si se utiliza unas ESC transfectadas con un número bajo de copias del gen de la resistencia, estas dosis de antibiótico serían igual de letales que para unas células no modificadas debido quizás a la saturación por el sustrato, en este caso neomicina, del enzima codificado por el gen de la resistencia.

Debido a esto, se procedió a disminuir tanto el número de células por unidad de volumen en la siembra inicial para formar los CEs como la dosis de neomicina para la posterior selección de células insulina⁺ tal y como se hace en otras publicaciones (Soria, B. y col., 2000; León-Quinto, T. y col., 2004). Por otro lado, la presencia de enzimas proteolíticos en los medios condicionados de rudimentos pancreáticos, tal y como se evidenció en el análisis de las bandas presentes en estos medios (Fig. 15), llevó a pensar en la posible degradación de los factores de interés en los procesos de diferenciación presentes en el medio, así como en la viabilidad de las ESC. Todo ello podría producir en estas células una liberación inespecífica de insulina semejante a un proceso secretor

regulado. Por tanto se decidió comprobar el posible efecto de la adición de inhibidores de proteasas al medio de cultivo.

Tras la selección con el antibiótico, las morfologías de las células obtenidas en el medio control diferían respecto a las cultivadas en presencia del medio condicionado de rudimentos pancreáticos (Fig. 17 B-E). Mientras que las células crecidas en medio basal presentaban un ratio núcleo/ citoplasma alto (Fig. 17 B y C), lo contrario ocurría con las cultivadas con el medio condicionado, apareciendo también células muy redondeadas y birrefringentes (Fig. 17 D y E). Tras 4 días de presión selectiva con neomicina, se observaron que las morfologías de las células resistentes eran bastante semejantes en ambas condiciones, así como con la presencia o ausencia de inhibidores de proteasas (Fig. 17 F-I). Las células tendían a organizarse en colonias compactas de tal forma que no se podían distinguir células individualizadas, algo muy semejante a lo que ocurría con las ESC indiferenciadas. A partir de dichas colonias, proliferan células de aspecto fibroblástico con bordes muy irregulares.

El estudio de expresión de marcadores de estas células seleccionadas cultivadas en medio basal en presencia o ausencia de inhibidores de proteasas (Fig. 17 F y G), mostraron un nivel alto del marcador Oct 3/4 (Fig. 18). Por otro lado, la selección solo permitió obtener células que expresaban insulina tipo II, así como el marcador de mesodermo, Flk1. Brachyury y Amn, disminuyeron su expresión en presencia de medios condicionados. De ello se deduce que brachyury aparece cuando hay presencia de endodermo visceral y que podría ser su linaje en D3. Además, el medio condicionado parece inhibir la vía de diferenciación de células del linaje de endodermo primitivo.

En el caso de las células seleccionadas tras el cultivo con medios condicionados, no hay diferencias respecto a las cultivadas en medio basal en cuanto al tipo de insulina que se expresa, así como a la presencia del marcador de pluripotencialidad Oct 3/4 y al de mesodermo, Flk1. Las diferencias estriban en el aumento de la expresión del preproglucagón y la disminución de endodermo visceral como se había comentado anteriormente. La expresión de neurofilamento M en todas las condiciones tras la selección, indica la presencia de neuroectodermo, por lo que ello puede explicar la presencia de insulina tipo II y preproglucagón en las células obtenidas a partir del medio de rudimentos pancreáticos. Como ya se había observado en otros protocolos de

diferenciación, la obtención de expresión de preproglucagón por RT-PCR no indica la obtención de células alfa cuyo origen es el endodermo definitivo. Por tanto, se necesitaría un estudio inmunocitoquímico de co-localización de marcadores específicos para descartar un posible origen neuroectodérmico de estas células glucagón⁺.

El estudio funcional de las células obtenidas tras el protocolo de diferenciación por medio de la secreción de insulina revela falta de respuesta al estímulo de la glucosa (Fig. 19). Por otro lado, el cultivo de la línea INS1, células que responden a distintas concentraciones de glucosa, en presencia de los medios condicionados durante 24 h., hace que pierdan la respuesta a glucosa (Fig. 16). Este fenómeno podría ser debido al papel que pueden desempeñar las hidrolasas presentes en el medio condicionado sobre la integridad de la membrana celular, y por tanto a la liberación inespecífica de la hormona. La insulina liberada a 5 y 25 mM de glucosa es la misma en las células seleccionadas así como en las INS1. De todas formas no se puede descartar que la presencia de estos inhibidores puedan producir efectos citotóxicos y liberación inespecífica de insulina tal como se ha demostrado recientemente con inhibidores de proteasas utilizadas en terapia frente al VIH (Zhang, S. y col., 2008). Estos inhibidores se utilizan acompañando a la terapia retroviral y se ha observado que su uso se asocia a la aparición de resistencia a la insulina, hiperlipidemia y diabetes mellitus de tipo II. El estudio de Zhang demuestra la inducción de apoptosis así como la disminución de la secreción de insulina tanto en células del islote pancreático como en la línea INS1.

Con estos datos se puede afirmar que el protocolo no se dirige específicamente hacia la capa embrionaria de endodermo definitivo tal como afirman los autores (Soria, B. y col. 2008), si no que prevalecen otros linajes como el mesodermo o el neuroectodermo.

5.5 LOS PROTOCOLOS DE DIFERENCIACIÓN DE ESC UTILIZADOS MANTIENEN UNA POBLACIÓN CELULAR RESIDUAL Oct 3/4⁺.

A pesar del tiempo prolongado en cultivo de los CEs en condiciones de diferenciación espontánea, la expresión de Oct 3/4 sigue presente como se observa por

RT-PCR (Fig. 2 y 12) reproduciéndose así lo observado por Enseñat-Waser, R. en la línea R1. Incluso se ha demostrado que esta expresión se mantiene durante 6 semanas en cultivo (Choi, D. y col., 2005). Por otro lado existen trabajos que utilizan la diferenciación espontánea de las ESC, mediante formación de CEs, donde observan que la expresión de este gen disminuye con el tiempo pero nunca llega a desaparecer (Jones, E. y col., 2002). Se ha comprobado en estudios prolongados de expresión de marcadores en CEs, que a pesar de mantenerse durante todo el rango, la expresión puede disminuir o aumentar dentro de él (Enseñat-Waser, R. y col., 2006). En el trabajo de Jones, E. el estudio de la cinética de expresión de Oct 3/4 lo realizan solo hasta el día 12, precisamente en el punto del rango donde Enseñat-Waser, R. observa que aparece la mínima expresión de este gen, para posteriormente aumentar tal y como evidencia a día 30. De todos modos, como se ha discutido previamente, la expresión de genes y sus cinéticas temporales son ligeramente dependientes de la línea de ESC con la que se trabaja.

En el caso de la diferenciación por sustitución del suero y adición de MTG y ácido ascórbico, en ambas líneas de ESC utilizadas, la expresión por RT-PCR del marcador de pluripotencialidad Oct 3/4 permanece (Fig. 9 A y 12). En los trabajos de Kubo, A. y Ku, T. no comprueban este hecho, por lo que a pesar de que se trata de un protocolo de diferenciación dirigido a partir de un cultivo coaxial, el riesgo de que se mantengan en el cultivo células Oct 3/4⁺ es alto. La selección de poblaciones puede evitar la obtención de estas células residuales, tal y como realizó este grupo posteriormente (Gadue, P. y col., 2006; Gouon-Evans, V. y col., 2006), a pesar de que no comprobaron la existencia de células con características pluripotenciales en las poblaciones purificadas.

Como en el caso anterior, a pesar de la utilización de un protocolo coaxial mediante la adición de un medio de cultivo con factores provenientes de rudimentos pancreáticos y aún mediante la realización de una selección de las células que expresan insulina por medio de antibióticos, se observa por RT-PCR expresión de Oct 3/4 (Fig. 14). En el trabajo de Vaca, P. y col., 2005 no procedieron a la comprobación de este hecho a pesar de que obtienen niveles altos de incorporación de BrdU. Por otro lado transplantan las células en ratones diabéticos durante un periodo de tiempo insuficiente (13 días) como para evidenciar la presencia de tumores, ya que se ha comprobado que

su aparición suele darse tras dos meses tras la inoculación de las ESC (Enseñat-Waser, R. y col., 2006). Por tanto se hace necesario otros procedimientos de selección que eliminen de manera eficaz las células Oct 3/4⁺.

5.6 CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS Oct 3/4⁺ RESIDUALES DERIVADAS DEL CULTIVO *IN VITRO* Y CON POTENCIAL TUMORIGÉNICO.

Tras una caracterización previa de las células Oct 3/4⁺ residuales obtenidas a partir de la disgregación de CEs y aisladas por “cell sorting”, se comprobó por RT-PCR a tiempo real que no derivaban de la línea germinal al expresar un bajo nivel de los genes VASA y DAZL (Enseñat-Waser, R. y col., 2006), ya que se ha demostrado que este tipo celular expresa Oct 3/4 (Geijsen, N. y col., 2004; Toyooka, Y. y col., 2003). De todos modos no se descarta la posibilidad de que existan una población minoritaria de células precursoras de la línea germinal (o incluso de precursores neuroectodérmicos (Shimozaki, K. y col., 2003)) al observarse cierta expresión de los dos genes analizados, pero a falta de marcadores específicos que distingan entre esta población y ESC es difícil llegar a una conclusión en este aspecto.

Como se ha comprobado por medio del análisis del estado de la ruta LIF-STAT3 (Fig. 20), ésta permanece activa constitutivamente en las CR (Esquema 13). Esto puede ser la causa de la resistencia a la diferenciación que mantienen en ausencia de LIF, por lo que los factores implicados en la pluripotencialidad siguen activados. Por otro lado se observó que en ausencia de LIF los niveles de STAT3 fosforilado en las CR son menores que en las condiciones en presencia de LIF, pero a pesar de ello son muy similares a los niveles que se observan en las ESC D3 cultivadas en presencia de esta citoquina. Este hecho podría deberse a una tasa de recambio de la fosforilación de STAT3 más baja en las CR con respecto a las ESC D3 utilizadas como control, o quizás, a un aumento del nivel basal de fosforilación en las CR cuando se encuentran en presencia de LIF, tal como se evidencia por western blot (Fig. 20).

Con los experimentos de inoculación de las CR en ratones inmunodeprimidos se observó la aparición de teratomas al cabo de 90 días, tiempo muy superior al que transcurre en protocolos publicados de terapia celular a partir de ESC en animales de experimentación. Por lo tanto se debe prestar especial atención a las poblaciones celulares residuales con características pluripotenciales que puedan permanecer en los cultivos, tras los procesos de diferenciación y que pueden pasar inadvertidas (Ramírez, M. y col., 2007).

En el análisis histológico de los tumores formados con las ESC residuales Oct 3/4⁺ se observa la aparición de tejidos o tipos celulares de las tres capas embrionarias (Fig. 21), tal y como ocurre *in vitro* en la diferenciación de ESC (Gadue P. y col., 2005). Previamente a su inoculación en ratones, estas células residuales una vez seleccionadas, no sufrieron procesos de diferenciación *in vitro* cuando se cultivaron formando CEs manteniendo en todo momento la expresión de Oct 3/4⁺ (Enseñat-Waser, R. y col., 2006). Por tanto cabe señalar que deben existir señales en el propio ratón, que permitan que éstas comiencen a establecer mecanismos de diferenciación espontánea. Por otro lado, tampoco se mantuvieron los CEs de las células residuales en cultivo durante los 90 días, periodo a partir del cual se observó la aparición del tumor, debido a la inviabilidad del proceso. Por tanto el factor tiempo es una variable a considerar ya que estas células podrían necesitar tiempos más prolongados que las ESC para diferenciarse.

La expresión de Oct 3/4 experimenta una disminución en la formación del tumor (Fig. 22 C y D) tanto con las CR como con las ESC R1, dato que se evidencia en el análisis por RT-PCR. Esta disminución se ha observado también en procesos de diferenciación espontánea *in vitro* así como durante el desarrollo embrionario (Enseñat-Waser, R. y col., 2006; Niwa, H. y col., 2005). Tras el aislamiento del tumor y la obtención de la línea celular, se observó una recuperación de la pluripotencialidad, hecho que se evidencia con un aumento de la expresión de Oct 3/4 (Fig. 22 E y F). Al contrario de lo que ocurría con las CR, las CRT parece que inician procesos de diferenciación, tal como se observó cuando se forman CEs (Fig. 22 H). Este hecho también se evidenció por un lado, en la expansión celular de la digestión parcial de los teratomas cultivados en monocapa en ausencia de LIF (Fig. 23), donde se observó la ausencia de fluorescencia y por otro lado, en el estudio del tiempo de duplicación de las

CRT cultivadas en presencia de gelatina, donde la tasa de crecimiento fue bastante menor que en su ausencia (Fig. 24).

Con estos datos se puede avanzar dos hipótesis: 1) que las CRT, en un principio diferenciadas, poseen una “memoria” pluripotencial que les permite, una vez en cultivo y con las señales apropiadas, volver a al estatus inicial para de nuevo comenzar procesos de diferenciación o bien 2) que se tratase de una población heterogénea donde residiera una población Oct 3/4 minoritaria con capacidad de proliferar en las condiciones apropiadas. Este hecho también ha sido observado con ESC de ratón transfectadas con el promotor de la transcriptasa reversa de la telomerasa unido al gen de la GFP, donde obtienen poblaciones celulares que se diferencian en CE para luego, tras su adhesión y en monocapa, algunas células recuperan su estado indiferenciado (Ramírez, M. y col., 2007). Los cambios epigenéticos de genes que controlan el balance pluripotencialidad/diferenciación pueden estar involucrados en este aspecto, ya que existen pruebas de que factores moleculares implicados en la pluripotencialidad trabajan en el control de algunos genes mediante metilaciones (Meshorer, E. y col., 2006; Ura, H. y col., 2008).

En estos últimos años han ido apareciendo publicaciones que advierten de la selección en cultivo de poblaciones celulares en ESC tanto humanas como en ratón que resisten a los procesos de diferenciación manteniendo una cierta pluripotencialidad y/o presentando un cariotipo anormal (Imreh, M. y col., 2006; Park, Y. y col., 2008; Ramírez, M. y col., 2007). Esta selección puede ser debida a la acumulación de mutaciones a lo largo de un cultivo *in vitro* prolongado, para así poder adaptarse a unas condiciones nuevas fuera de su nicho natural. Dicho efecto se ha comprobado en el hecho de la adhesión de las células a un nuevo soporte de cultivo, ya que con el transcurso del tiempo se hacen menos dependientes de un sustrato (tipo fibroblastos inactivados, matrices extracelulares,...) circunstancia que ocurre paralelamente a un cambio cromosómico como refirió Imreh, M. y col., 2006 al observar una delección en el cromosoma 7 y una ganancia del cromosoma 12 en ESC humanas tras 11 pases. La aparición de ciertas aneuploidías parece ser que no responde a cuestiones del azar ya que la misma aneuploidía obtuvo Draper, J, y col., 2004 en el cultivo de ESC humanas.

En el análisis realizado tanto de las ESC residuales Oct 3/4⁺ como en las CRT, se comprobó la presencia de aneuploidías que afectaban de una manera constante a los cromosomas 8 y 9 (Figura 25 y Tabla 10). Esta ganancia de cromosomas no se observa en las ESC R1 parentales, por lo que se advierte que este cambio cariotípico se ha dado en el transcurso del cultivo *in vitro*. Se comprobó que el gen de Oct 3/4 mapea en el cromosoma 17 de ratón y no en los cromosomas que conforman la aneuploidía observada. De todos modos puede que en alguno de estos cromosomas exista un regulador directo o indirecto de la expresión de Oct 3/4, como puede ser el caso de la β catenina que mapea en el cromosoma 8 y es un efector intermedio de la vía canónica Wnt donde se ha demostrado su relación con la regulación de Oct 3/4 en ESC humanas (Sato, N. y col., 2004) o el factor Tcf12 localizado en el cromosoma 9 e involucrado en la proliferación de las células troncales neuronales, entre otros factores (Enseñat-Waser, R. y col., 2006). En cualquier caso es un aspecto que necesita una investigación más profunda.

La desregulación de la vía LIF-STAT3 de estas células fluorescentes residuales hace que sean resistentes a la diferenciación a pesar de la ausencia del LIF en cultivo (Fig. 20). Puede ser que la ganancia de estos cromosomas aumente la dosis de expresión de reguladores positivos de la ruta, aunque se ha comprobado que la kinasa de STAT3, JAK, no mapea en ninguno de los dos cromosomas que conforman la aneuploidía. Hay que destacar que al mantenerse activa la ruta, facilita la asociación de Oct 3/4 y STAT3 lo que permite mantener el estado de pluripotencialidad celular (Ura, H. y col., 2008) e inhibir así la expresión de genes que activan la diferenciación como Cdx2 (Niwa, H. y col., 2005).



6. CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES

1. La diferenciación espontánea mediante la formación de CEs o mediante condiciones coaxiales a partir de ESC D3 y R1 generan células que expresan preproglucagón pero no insulina de tipo I.
2. Las células preproglucagón⁺ identificadas por RT-PCR y generadas por diferenciación espontánea co-localizan con marcadores propios del neuroectodermo como son el Nef 200 y GFAP.
3. Mediante la diferenciación por condiciones de cultivo coaxiales se obtiene una población que co-localiza glucagón y Nef 200 y otra que expresa GLP1 próxima a células GFAP⁺.
4. El marcador de glucagón no es válido para la discriminación entre el endodermo definitivo y el neuroectodermo generados a partir de la diferenciación de ESC de ratón.
5. En los medios condicionados de rudimentos pancreáticos de día 16,5 están presentes factores involucrados en la regeneración pancreática como Reg1, así como hidrolasas propias del páncreas exocrino, entre otras.
6. La línea celular INS1 cultivada con el medio condicionado de rudimentos pancreáticos, pierde la regulación de la secreción de insulina ante diferentes concentraciones de glucosa.
7. Las células obtenidas mediante diferenciación con medios condicionados de rudimentos pancreáticos a partir de ESC D3, expresan insulina de tipo II, preproglucagón y Nef M pero no insulina de tipo I y por tanto la secreción de insulina no está regulada y son incapaces de responder a distintas concentraciones de glucosa.
8. Tras la diferenciación de ESC mediante los protocolos utilizados en el presente trabajo, se obtiene siempre una población residual Oct 3/4⁺.

CONCLUSIONES

9. Las células seleccionadas tras los procesos de diferenciación, con un transgénico Oct 3/4_eGFP, son capaces de generar teratomas formados por células pertenecientes a las tres capas embrionarias, al implantarlas en ratones inmunodeprimidos.

10. La línea celular generada *in vitro* a partir de los teratomas, preserva características pluripotenciales a partir de poblaciones Oct 3/4⁺ además de mecanismos de diferenciación y aneuploidías en el cariotipo, debido a la duplicación de los cromosomas 8 y 9.





7. BIBLIOGRAFÍA

- Afelik, S., Y. Chen, and T. Pieler. "Combined ectopic expression of Pdx1 and Ptf1a/p48 results in the stable conversion of posterior endoderm into endocrine and exocrine pancreatic tissue." Genes Dev. 20.11 (2006): 1441-46.
- Amit, M. et al. "Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells." Biol.Reprod. 70.3 (2004): 837-45.
- Anneren, C., C. A. Cowan, and D. A. Melton. "The Src family of tyrosine kinases is important for embryonic stem cell self-renewal." J.Biol.Chem. 279.30 (2004): 31590-98.
- Apelqvist, A. et al. "Notch signalling controls pancreatic cell differentiation." Nature 400.6747 (1999): 877-81.
- Aramata, S. et al. "Synergistic activation of the insulin gene promoter by the beta-cell enriched transcription factors MafA, Beta2, and Pdx1." Biochim.Biophys.Acta 1730.1 (2005): 41-46.
- Artner, I. et al. "MafB: an activator of the glucagon gene expressed in developing islet alpha- and beta-cells." Diabetes 55.2 (2006): 297-304.
- Artner, I. et al. "MafB is required for islet beta cell maturation." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 104.10 (2007): 3853-58.
- Avilion, A. A. et al. "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function." Genes Dev. 17.1 (2003): 126-40.
- Axelrod, H. R. "Embryonic stem cell lines derived from blastocysts by a simplified technique." Dev.Biol. 101.1 (1984): 225-28.

- Baeza, N. et al. "Reg protein: a potential beta-cell-specific growth factor?" Diabetes Metab 22.4 (1996): 229-34.
- Baillyes, E. M. et al. "A member of the eukaryotic subtilisin family (PC3) has the enzymic properties of the type 1 proinsulin-converting endopeptidase." Biochem.J. 285 (Pt 2) (1992): 391-94.
- Beddington, R. S. and E. J. Robertson. "Axis development and early asymmetry in mammals." Cell 96.2 (1999): 195-209.
- Ben Shushan, E. et al. "Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site." Mol.Cell Biol. 18.4 (1998): 1866-78.
- Bennett, D. L. et al. "Identification of the type 2 proinsulin processing endopeptidase as PC2, a member of the eukaryote subtilisin family." J.Biol.Chem. 267.21 (1992): 15229-36.
- Besser, D. "Expression of nodal, lefty-a, and lefty-B in undifferentiated human embryonic stem cells requires activation of Smad2/3." J.Biol.Chem. 279.43 (2004): 45076-84.
- Blume, N. et al. "Production of peptide antisera specific for mouse and rat proinsulin C-peptide 2." Biomed.Biochim.Acta 49.12 (1990): 1247-51.
- Blume, N. et al. "Immature transformed rat islet beta-cells differentially express C-peptides derived from the genes coding for insulin I and II as well as a transfected human insulin gene." Mol.Endocrinol. 6.2 (1992): 299-307.

- Boer, B. et al. "Regulation of the Nanog gene by both positive and negative cis-regulatory elements in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells." Mol.Reprod.Dev. (2008).
- Bort, R. et al. "Hex homeobox gene-dependent tissue positioning is required for organogenesis of the ventral pancreas." Development 131.4 (2004): 797-806.
- Brennan, K., D. Huangfu, and D. Melton. "All beta Cells Contribute Equally to Islet Growth and Maintenance." PLoS.Biol. 5.7 (2007): e163.
- Briscoe, J. et al. "A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube." Cell 101.4 (2000): 435-45.
- Burdon, T. et al. "Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells." Dev.Biol. 210.1 (1999): 30-43.
- Burdon, T., A. Smith, and P. Savatier. "Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells." Trends Cell Biol. 12.9 (2002): 432-38.
- Cao, F. et al. "Spatial and temporal kinetics of teratoma formation from murine embryonic stem cell transplantation." Stem Cells Dev. 16.6 (2007): 883-91.
- Cartwright, P. et al. "LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism." Development 132.5 (2005): 885-96.
- Chamberlain, J. et al. "Efficient generation of human hepatocytes by the intrahepatic delivery of clonal human mesenchymal stem cells in fetal sheep." Hepatology 46.6 (2007): 1935-45.

Chambers, I. et al. "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." Cell 113.5 (2003): 643-55.

Chen, C. et al. "Differentiation of embryonic stem cells towards pancreatic progenitor cells and their transplantation into streptozotocin-induced diabetic mice." Cell Biol.Int. 32.4 (2008): 456-61.

Chew, J. L. et al. "Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells." Mol.Cell Biol. 25.14 (2005): 6031-46.

Choi, D. et al. "In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells: enrichment of endodermal cells in the embryoid body." Stem Cells 23.6 (2005): 817-27.

Choi, K. M. et al. "Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation." J.Biosci.Bioeng. 105.6 (2008): 586-94.

Chung, Y. et al. "Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres." Nature 439.7073 (2006): 216-19.

Cimini, D. et al. "Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells." J.Cell Biol. 153.3 (2001): 517-27.

Cimini, D., L. A. Cameron, and E. D. Salmon. "Anaphase spindle mechanics prevent mis-segregation of merotelically oriented chromosomes." Curr.Biol. 14.23 (2004): 2149-55.

Collombat, P. et al. "Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development." Genes Dev. 17.20 (2003): 2591-603.

- Collombat, P. et al. "Embryonic endocrine pancreas and mature beta cells acquire alpha and PP cell phenotypes upon Arx misexpression." J.Clin.Invest 117.4 (2007): 961-70.
- D'Amour, K. A. et al. "Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm." Nat.Biotechnol. 23.12 (2005): 1534-41.
- D'Amour, K. A. et al. "Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells." Nat.Biotechnol. 24.11 (2006): 1392-401.
- Davies, P. O. et al. "Genetic reassignment of the insulin-1 (Ins1) gene to distal mouse chromosome 19." Genomics 21.3 (1994): 665-67.
- Deltour, L. et al. "Differential expression of the two nonallelic proinsulin genes in the developing mouse embryo." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 90.2 (1993): 527-31.
- Deltour, L. et al. "Tissue- and developmental stage-specific imprinting of the mouse proinsulin gene, Ins2." Dev.Biol. 168.2 (1995): 686-88.
- Desbaillets, I. et al. "Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis." Exp.Physiol 85.6 (2000): 645-51.
- Dessimoz, J. et al. "FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis in vivo." Mech.Dev. 123.1 (2006): 42-55.
- Deutsch, G. et al. "A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm." Development 128.6 (2001): 871-81.

Dhanvantari, S. and P. L. Brubaker. "Proglucagon processing in an islet cell line: effects of PC1 overexpression and PC2 depletion." Endocrinology 139.4 (1998): 1630-37.

Dhanvantari, S. et al. "Coregulation of glucagon-like peptide-1 synthesis with proglucagon and prohormone convertase 1 gene expression in enteroendocrine GLUTag cells." Endocrinology 142.1 (2001): 37-42.

Diecke, S. et al. "FGF2 signaling in mouse embryonic fibroblasts is crucial for self-renewal of embryonic stem cells." Cells Tissues.Organs 188.1-2 (2008): 52-61.

Doetschman, T. C. et al. "The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium." J.Embryol.Exp.Morphol. 87 (1985): 27-45.

Doyle, M. J. and L. Sussel. "Nkx2.2 regulates beta-cell function in the mature islet." Diabetes 56.8 (2007): 1999-2007.

Draper, J. S. et al. "Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells." Nat.Biotechnol. 22.1 (2004): 53-54.

Enseñat-Waser, R. et al. "Isolation and characterization of residual undifferentiated mouse embryonic stem cells from embryoid body cultures by fluorescence tracking." In Vitro Cell Dev.Biol.Anim 42.5-6 (2006): 115-23.

Enseñat-Waser, R. Et al "Embryonic stem cell processing in obtaining insulin-producing cells: a technical review." Cell Preservation Technology 4.4 (2006): 278-279.

- Erenpreisa, J. and M. S. Cragg. "Cancer: a matter of life cycle?" Cell Biol.Int. 31.12 (2007): 1507-10.
- Esni, F. et al. "Notch inhibits Ptf1 function and acinar cell differentiation in developing mouse and zebrafish pancreas." Development 131.17 (2004): 4213-24.
- Faust, C. et al. "The eed mutation disrupts anterior mesoderm production in mice." Development 121.2 (1995): 273-85.
- Feldman, B. et al. "Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development." Science 267.5195 (1995): 246-49.
- Filosa, S. et al. "Goosecoid and HNF-3beta genetically interact to regulate neural tube patterning during mouse embryogenesis." Development 124.14 (1997): 2843-54.
- Fishman, M. P. and D. A. Melton. "Pancreatic lineage analysis using a retroviral vector in embryonic mice demonstrates a common progenitor for endocrine and exocrine cells." Int.J.Dev.Biol. 46.2 (2002): 201-07.
- Furukawa, K., G. S. Taylor, and R. A. Bywater. "An intracellular study of myenteric neurons in the mouse colon." J.Neurophysiol. 55.6 (1986): 1395-406.
- Gadue, P. et al. "Germ layer induction from embryonic stem cells." Exp.Hematol. 33.9 (2005): 955-64.
- Gadue, P. et al. "Wnt and TGF-beta 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 103.45 (2006): 16806-11.

Gardiner, C. S. and D. J. Reed. "Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo." Biol.Reprod. 51.6 (1994): 1307-14.

Geijsen, N. et al. "Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells." Nature 427.6970 (2004): 148-54.

Gouon-Evans, V. et al. "BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm." Nat.Biotechnol. 24.11 (2006): 1402-11.

Gradwohl, G. et al. "neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 97.4 (2000): 1607-11.

Grindley, J. C., D. R. Davidson, and R. E. Hill. "The role of Pax-6 in eye and nasal development." Development 121.5 (1995): 1433-42.

Gu, G., J. Dubauskaite, and D. A. Melton. "Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors." Development 129.10 (2002): 2447-57.

Guz, Y. et al. "Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny." Development 121.1 (1995): 11-18.

Hamblet, N. S. et al. "The Reg family member INGAP is a marker of endocrine patterning in the embryonic pancreas." Pancreas 36.1 (2008): 1-9.

Handschel, J. et al. "Induction of osteogenic markers in differentially treated cultures of embryonic stem cells." Head Face.Med. 4 (2008): 10.

- Hao, J. et al. "WNT/beta-catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells." Dev.Biol. 290.1 (2006): 81-91.
- Hebrok, M., S. K. Kim, and D. A. Melton. "Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development." Genes Dev. 12.11 (1998): 1705-13.
- Herrera, P. L. et al. "Embryogenesis of the murine endocrine pancreas; early expression of pancreatic polypeptide gene." Development 113.4 (1991): 1257-65.
- Herrera, P. L. et al. "Ablation of islet endocrine cells by targeted expression of hormone-promoter-driven toxigenes." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 91.26 (1994): 12999-3003.
- Herrera, P. L. "Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages." Development 127.11 (2000): 2317-22.
- Huang, H. P. et al. "Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3." Mol.Cell Biol. 20.9 (2000): 3292-307.
- Hussain, M. A. et al. "POU domain transcription factor brain 4 confers pancreatic alpha-cell-specific expression of the proglucagon gene through interaction with a novel proximal promoter G1 element." Mol.Cell Biol. 17.12 (1997): 7186-94.
- Hussain, M. A., C. P. Miller, and J. F. Habener. "Brn-4 transcription factor expression targeted to the early developing mouse pancreas induces ectopic glucagon gene expression in insulin-producing beta cells." J.Biol.Chem. 277.18 (2002): 16028-32.

- Imreh, M. P. et al. "In vitro culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells." J.Cell Biochem. 99.2 (2006): 508-16.
- Inman, K. E. and K. M. Downs. "Localization of Brachyury (T) in embryonic and extraembryonic tissues during mouse gastrulation." Gene Expr.Patterns. 6.8 (2006): 783-93.
- Ivanova, N. et al. "Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference." Nature 442.7102 (2006): 533-38.
- Jacquemin, P., F. P. Lemaigre, and G. G. Rousseau. "The Onecut transcription factor HNF-6 (OC-1) is required for timely specification of the pancreas and acts upstream of Pdx-1 in the specification cascade." Dev.Biol. 258.1 (2003): 105-16.
- James, D. et al. "TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells." Development 132.6 (2005): 1273-82.
- Jensen, J. et al. "Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation." Diabetes 49.2 (2000): 163-76.
- Jiang, J. et al. "Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells." Stem Cells 25.8 (2007): 1940-53.
- Jiang, W. et al. "In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells." Cell Res. 17.4 (2007): 333-44.
- Jiang, W. et al. "Differentiation of mouse nuclear transfer embryonic stem cells into functional pancreatic beta cells." Diabetologia 51.9 (2008): 1671-79.

- Jones, E. A. et al. "Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells." Exp.Cell Res. 272.1 (2002): 15-22.
- Jones, J. M. et al. "Localization of insulin-2 (Ins-2) and the obesity mutant tubby (tub) to distinct regions of mouse chromosome 7." Genomics 14.1 (1992): 197-99.
- Jonsson, J. et al. "Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice." Nature 371.6498 (1994): 606-09.
- Jung, J. et al. "Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors." Science 284.5422 (1999): 1998-2003.
- Kahan, B. W. and B. Ephrussi. "Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma." J.Natl.Cancer Inst. 44.5 (1970): 1015-36.
- Kalantry, S. et al. "The amnionless gene, essential for mouse gastrulation, encodes a visceral-endoderm-specific protein with an extracellular cysteine-rich domain." Nat.Genet. 27.4 (2001): 412-16.
- Kanai-Azuma, M. et al. "Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice." Development 129.10 (2002): 2367-79.
- Kroon, E. et al. "Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo." Nat.Biotechnol. 26.4 (2008): 443-52.
- Ku, H. T. et al. "Committing embryonic stem cells to early endocrine pancreas in vitro." Stem Cells 22.7 (2004): 1205-17.

- Kubo, A. et al. "Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture." Development 131.7 (2004): 1651-62.
- Kuo, C. T. et al. "GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation." Genes Dev. 11.8 (1997): 1048-60.
- Kuroda, T. et al. "Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression." Mol.Cell Biol. 25.6 (2005): 2475-85.
- Labosky, P. A., D. P. Barlow, and B. L. Hogan. "Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines." Development 120.11 (1994): 3197-204.
- Lee, C. S. et al. "Foxa2 controls Pdx1 gene expression in pancreatic beta-cells in vivo." Diabetes 51.8 (2002): 2546-51.
- Lee, C. S. et al. "Foxa2 is required for the differentiation of pancreatic alpha-cells." Dev.Biol. 278.2 (2005): 484-95.
- Lee, J. C. et al. "Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3." Diabetes 50.5 (2001): 928-36.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. "Genetic instabilities in human cancers." Nature 396.6712 (1998): 643-49.
- Lensch, M. W., L. Daheron, and T. M. Schlaeger. "Pluripotent stem cells and their niches." Stem Cell Rev. 2.3 (2006): 185-201.

- Leon-Quinto, T. et al. "In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells." Diabetologia 47.8 (2004): 1442-51.
- Levenstein, M. E. et al. "Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal." Stem Cells 24.3 (2006): 568-74.
- Li, L. and W. B. Neaves. "Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters." Cancer Res. 66.9 (2006): 4553-57.
- Liang, J. et al. "Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells." Nat.Cell Biol. 10.6 (2008): 731-39.
- Lickert, H. et al. "Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm." Dev.Cell 3.2 (2002): 171-81.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods 25.4 (2001): 402-08.
- Lumelsky, N. et al. "Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets." Science 292.5520 (2001): 1389-94.
- Maestro, M. A. et al. "Hnf6 and Tcf2 (MODY5) are linked in a gene network operating in a precursor cell domain of the embryonic pancreas." Hum.Mol.Genet. 12.24 (2003): 3307-14.
- Margolis, R. L., O. D. Lohez, and P. R. Andreassen. "G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis." J.Cell Biochem. 88.4 (2003): 673-83.

- Martin, M. et al. "Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient Raldh2 mutant mice." Dev.Biol. 284.2 (2005): 399-411.
- Maruyama, M. et al. "Differential roles for Sox15 and Sox2 in transcriptional control in mouse embryonic stem cells." J.Biol.Chem. 280.26 (2005): 24371-79.
- Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton. "Smad transcription factors." Genes Dev. 19.23 (2005): 2783-810.
- Masui, S. et al. "Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells." Nat.Cell Biol. 9.6 (2007): 625-35.
- Matsui, Y., K. Zsebo, and B. L. Hogan. "Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture." Cell 70.5 (1992): 841-47.
- McGrath, K. E. and J. Palis. "Expression of homeobox genes, including an insulin promoting factor, in the murine yolk sac at the time of hematopoietic initiation." Mol.Reprod.Dev. 48.2 (1997): 145-53.
- McGrath, K. E. et al. "Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4." Dev.Biol. 213.2 (1999): 442-56.
- McKiernan, E. et al. "Directed differentiation of mouse embryonic stem cells into pancreatic-like or neuronal- and glial-like phenotypes." Tissue Eng 13.10 (2007): 2419-30.
- Meissner, A. and R. Jaenisch. "Generation of nuclear transfer-derived pluripotent ES cells from cloned Cdx2-deficient blastocysts." Nature 439.7073 (2006): 212-15.

- Meshorer, E. and T. Misteli. "Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation." Nat.Rev.Mol.Cell Biol. 7.7 (2006): 540-46.
- Messana, J. M. et al. "Size of the embryoid body influences chondrogenesis of mouse embryonic stem cells." J.Tissue Eng Regen.Med. (2008).
- Milne, H. M. et al. "Generation of insulin-expressing cells from mouse embryonic stem cells." Biochem.Biophys.Res.Comm. 328.2 (2005): 399-403.
- Miralles, F., P. Czernichow, and R. Scharfmann. "Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development." Development 125.6 (1998): 1017-24.
- Monaghan, A. P. et al. "Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm." Development 119.3 (1993): 567-78.
- Moon, R. T. et al. "The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin." Science 296.5573 (2002): 1644-46.
- Moore, K. A. and I. R. Lemischka. "Stem cells and their niches." Science 311.5769 (2006): 1880-85.
- Moritoh, Y. et al. "Analysis of insulin-producing cells during in vitro differentiation from feeder-free embryonic stem cells." Diabetes 52.5 (2003): 1163-68.
- Nagy, A. et al. "Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 90.18 (1993): 8424-28.

- Nakanishi, M. et al. "Pancreatic tissue formation from murine embryonic stem cells in vitro." Differentiation 75.1 (2007): 1-11.
- Narita, N., M. Bielinska, and D. B. Wilson. "Wild-type endoderm abrogates the ventral developmental defects associated with GATA-4 deficiency in the mouse." Dev.Biol. 189.2 (1997): 270-74.
- Narushima, Y. et al. "Structure, chromosomal localization and expression of mouse genes encoding type III Reg, RegIII alpha, RegIII beta, RegIII gamma." Gene 185.2 (1997): 159-68.
- Nichols, J. et al. "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." Cell 95.3 (1998): 379-91.
- Nishimune, H. et al. "Reg-2 is a motoneuron neurotrophic factor and a signalling intermediate in the CNTF survival pathway." Nat.Cell Biol. 2.12 (2000): 906-14.
- Nishimura, W. et al. "Preferential reduction of beta cells derived from Pax6-MafB pathway in MafB deficient mice." Dev.Biol. 314.2 (2008): 443-56.
- Niwa, H., J. Miyazaki, and A. G. Smith. "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells." Nat.Genet. 24.4 (2000): 372-76.
- Niwa, H. et al. "Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation." Cell 123.5 (2005): 917-29.
- Otero, J. J. et al. "Beta-catenin signaling is required for neural differentiation of embryonic stem cells." Development 131.15 (2004): 3545-57.

- Paling, N. R. et al. "Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling." J.Biol.Chem. 279.46 (2004): 48063-70.
- Pan, G. et al. "A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal." FASEB J. 20.10 (2006): 1730-32.
- Park, Y. B. et al. "Alterations of proliferative and differentiation potentials of human embryonic stem cells during long-term culture." Exp.Mol.Med. 40.1 (2008): 98-108.
- Passier, R. et al. "Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures." Stem Cells 23.6 (2005): 772-80.
- Perea-Gomez, A. et al. "HNF3beta and Lim1 interact in the visceral endoderm to regulate primitive streak formation and anterior-posterior polarity in the mouse embryo." Development 126.20 (1999): 4499-511.
- Phillips, B. W. et al. "Directed differentiation of human embryonic stem cells into the pancreatic endocrine lineage." Stem Cells Dev. 16.4 (2007): 561-78.
- Rafaeloff, R. et al. "Cloning and sequencing of the pancreatic islet neogenesis associated protein (INGAP) gene and its expression in islet neogenesis in hamsters." J.Clin.Invest 99.9 (1997): 2100-09.
- Rajagopal, J. et al. "Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake." Science 299.5605 (2003): 363.
- Rajaraman, R. et al. "Stem cells, senescence, neosis and self-renewal in cancer." Cancer Cell Int. 6 (2006): 25.

- Ramirez, M. A. et al. "Inadvertent presence of pluripotent cells in monolayers derived from differentiated embryoid bodies." Int.J.Dev.Biol. 51.5 (2007): 397-407.
- Rehfeld, J. F., I. Lindberg, and L. Friis-Hansen. "Increased synthesis but decreased processing of neuronal proCCK in prohormone convertase 2 and 7B2 knockout animals." J.Neurochem. 83.6 (2002): 1329-37.
- Roche, E. et al. "Ectodermal commitment of insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells." FASEB J. 19.10 (2005): 1341-43.
- Rodda, D. J. et al. "Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2." J.Biol.Chem. 280.26 (2005): 24731-37.
- Roebroek, A. J. et al. "Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin." Development 125.24 (1998): 4863-76.
- Rosenberg, L. et al. "A pentadecapeptide fragment of islet neogenesis-associated protein increases beta-cell mass and reverses diabetes in C57BL/6J mice." Ann.Surg. 240.5 (2004): 875-84.
- Rosenthal, M. D., R. M. Wishnow, and G. H. Sato. "In vitro growth and differentiation of clonal populations of multipotential mouse cells derived from a transplantable testicular teratocarcinoma." J.Natl.Cancer Inst. 44.5 (1970): 1001-14.
- Rosner, M. H. et al. "A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo." Nature 345.6277 (1990): 686-92.
- Rossi, J. M. et al. "Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm." Genes Dev. 15.15 (2001): 1998-2009.

- Rouille, Y. et al. "Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in alpha TC1-6 cells." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 91.8 (1994): 3242-46.
- Rouille, Y., S. Martin, and D. F. Steiner. "Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide." J.Biol.Chem. 270.44 (1995): 26488-96.
- Rubio, D. et al. "Spontaneous human adult stem cell transformation." Cancer Res. 65.8 (2005): 3035-39.
- Ryan, E. A. et al. "Five-year follow-up after clinical islet transplantation." Diabetes 54.7 (2005): 2060-69.
- Samaras, S. E. et al. "The islet beta cell-enriched RIPE3b1/Maf transcription factor regulates pdx-1 expression." J.Biol.Chem. 278.14 (2003): 12263-70.
- Sander, M. et al. "Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas." Development 127.24 (2000): 5533-40.
- Sanvito, F. et al. "TGF-beta 1 influences the relative development of the exocrine and endocrine pancreas in vitro." Development 120.12 (1994): 3451-62.
- Sato, N. et al. "Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor." Nat.Med. 10.1 (2004): 55-63.
- Schroeder, I. S. et al. "Differentiation of mouse embryonic stem cells to insulin-producing cells." Nat.Protoc. 1.2 (2006): 495-507.

- Seaberg, R. M. et al. "Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages." Nat.Biotechnol. 22.9 (2004): 1115-24.
- Serup, P. et al. "Induction of insulin and islet amyloid polypeptide production in pancreatic islet glucagonoma cells by insulin promoter factor 1." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 93.17 (1996): 9015-20.
- Shapiro, A. M. et al. "Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen." N.Engl.J.Med. 343.4 (2000): 230-38.
- Sherwood, R. I. et al. "Prospective isolation and global gene expression analysis of definitive and visceral endoderm." Dev.Biol. 304.2 (2007): 541-55.
- Shi, Y. et al. "Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid." Stem Cells 23.5 (2005): 656-62.
- Shim, J. H. et al. "Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate." Diabetologia 50.6 (2007): 1228-38.
- Shimozaki, K. et al. "Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures." Development 130.11 (2003): 2505-12.
- Shiraki, N. et al. "Guided differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing regional-specific definitive endoderm." Stem Cells 26.4 (2008): 874-85.

- Shiroy, A. et al. "Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone." Stem Cells 20.4 (2002): 284-92.
- Simon, M. T. et al. "HIP/PAP stimulates liver regeneration after partial hepatectomy and combines mitogenic and anti-apoptotic functions through the PKA signaling pathway." FASEB J. 17.11 (2003): 1441-50.
- Sipione, S. et al. "Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells." Diabetologia 47.3 (2004): 499-508.
- Slack, J. M. "Developmental biology of the pancreas." Development 121.6 (1995): 1569-80.
- Smith, A. G. et al. "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides." Nature 336.6200 (1988): 688-90.
- Soria, B. et al. "Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice." Diabetes 49.2 (2000): 157-62.
- Soria, B. et al. "Cell therapy for diabetes mellitus: an opportunity for stem cells?" Cells Tissues.Organs 188.1-2 (2008): 70-77.
- St Onge, L. et al. "Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas." Nature 387.6631 (1997): 406-09.
- Steck, T. et al. "Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women with unexplained infertility and recurrent failure of implantation after IVF and embryo transfer." Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol. 112.1 (2004): 69-73.

- Sussel, L. et al. "Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells." Development 125.12 (1998): 2213-21.
- Suzuki, A. et al. "Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 103.27 (2006): 10294-99.
- Tada, S. et al. "Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture." Development 132.19 (2005): 4363-74.
- Takayama, I. et al. "Pdx-1-independent differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-expressing cells." Diabetes Res.Clin.Pract. 79.2 (2008): e8-10.
- Tam, P. P. and R. S. Beddington. "Establishment and organization of germ layers in the gastrulating mouse embryo." Ciba Found.Symp. 165 (1992): 27-41.
- Tam, P. P. et al. "Regionalization of cell fates and cell movement in the endoderm of the mouse gastrula and the impact of loss of Lhx1(Lim1) function." Dev.Biol. 274.1 (2004): 171-87.
- Tanaka, S. S. et al. "The mouse homolog of Drosophila Vasa is required for the development of male germ cells." Genes Dev. 14.7 (2000): 841-53.
- Tang, D. Q. et al. "In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow." Diabetes 53.7 (2004): 1721-32.

- Teitelman, G. et al. "Precursor cells of mouse endocrine pancreas coexpress insulin, glucagon and the neuronal proteins tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y, but not pancreatic polypeptide." Development 118.4 (1993): 1031-39.
- Terazono, K. et al. "A novel gene activated in regenerating islets." J.Biol.Chem. 263.5 (1988): 2111-14.
- Terazono, K. et al. "Expression of reg protein in rat regenerating islets and its co-localization with insulin in the beta cell secretory granules." Diabetologia 33.4 (1990): 250-52.
- Thomson, J. A. et al. "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science 282.5391 (1998): 1145-47.
- Todorova, M. G., B. Soria, and I. Quesada. "Gap junctional intercellular communication is required to maintain embryonic stem cells in a non-differentiated and proliferative state." J.Cell Physiol 214.2 (2008): 354-62.
- Toyooka, Y. et al. "Embryonic stem cells can form germ cells in vitro." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 100.20 (2003): 11457-62.
- Unno, M. et al. "Production and characterization of Reg knockout mice: reduced proliferation of pancreatic beta-cells in Reg knockout mice." Diabetes 51 Suppl 3 (2002): S478-S483.
- Ura, H. et al. "STAT3 and Oct-3/4 control histone modification through induction of Eed in embryonic stem cells." J.Biol.Chem. 283.15 (2008): 9713-23.
- Vaca, P. et al. "Induction of differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells by fetal soluble factors." Stem Cells 24.2 (2006): 258-65.

- Vaca, P. et al. "Nicotinamide induces differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells." Exp.Cell Res. 314.5 (2008): 969-74.
- Vallier, L., D. Reynolds, and R. A. Pedersen. "Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway." Dev.Biol. 275.2 (2004): 403-21.
- Vanhoose, A. M. et al. "MafA and MafB Regulate Pdx1 Transcription through the Area II Control Region in Pancreatic β Cells." J.Biol.Chem. 283.33 (2008): 22612-19.
- Villeneuve, P. et al. "Altered processing of the neurotensin/neuromedin N precursor in PC2 knock down mice: a biochemical and immunohistochemical study." J.Neurochem. 82.4 (2002): 783-93.
- Wang, J. et al. "The concerted activities of Pax4 and Nkx2.2 are essential to initiate pancreatic beta-cell differentiation." Dev.Biol. 266.1 (2004): 178-89.
- Wang, P. et al. "Redundant and synergistic effect of Cdx-2 and Brn-4 on regulating proglucagon gene expression." Endocrinology 147.4 (2006): 1950-58.
- Wang, X. et al. "Formation of pancreatic duct epithelium from bone marrow during neonatal development." Stem Cells 24.2 (2006): 307-14.
- Wells, J. M. and D. A. Melton. "Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers." Development 127.8 (2000): 1563-72.
- Wu, K. L. et al. "Hepatocyte nuclear factor 3beta is involved in pancreatic beta-cell-specific transcription of the pdx-1 gene." Mol.Cell Biol. 17.10 (1997): 6002-13.

- Xiao, L., X. Yuan, and S. J. Sharkis. "Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells." Stem Cells 24.6 (2006): 1476-86.
- Xu, C. et al. "Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium." Stem Cells 23.3 (2005): 315-23.
- Yamamoto, M. et al. "Nodal antagonists regulate formation of the anteroposterior axis of the mouse embryo." Nature 428.6981 (2004): 387-92.
- Yasunaga, M. et al. "Induction and monitoring of definitive and visceral endoderm differentiation of mouse ES cells." Nat.Biotechnol. 23.12 (2005): 1542-50.
- Ying, Q. L. et al. "BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3." Cell 115.3 (2003): 281-92.
- Yuan, H. et al. "Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3." Genes Dev. 9.21 (1995): 2635-45.
- Zhang, J. G. et al. "Evidence for the formation of a heterotrimeric complex of leukaemia inhibitory factor with its receptor subunits in solution." Biochem.J. 325 (Pt 3) (1997): 693-700.
- Zhang, S. et al. "Protease Inhibitors used in the Treatment of HIV+ Induce {beta}-cell Apoptosis via the Mitochondrial Pathway and Compromise Insulin Secretion." Am.J.Physiol Endocrinol.Metab (2009).

Zhao, R. et al. "GATA6 is essential for embryonic development of the liver but dispensable for early heart formation." Mol.Cell Biol. 25.7 (2005): 2622-31.

Zhu, X. et al. "Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99.16 (2002): 10293-98.

Zulewski, H. et al. "Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes." Diabetes 50.3 (2001): 521-33.

Zwaka, T. P. and J. A. Thomson. "A germ cell origin of embryonic stem cells?" Development 132.2 (2005): 227-33.





8. ANEXO.

TABLA 1. PROTOCOLOS PARA LA OBTENCIÓN DE ENDODERMO DEFINITIVO A PARTIR DE LAS ESC.

Referencia	Línea celular	Condiciones de cultivo	Genes endodérmicos ^D
Kubo, A. (2003)	Ratón (E14.1; H.R ^A con Bry-GFP)	<p>Indiferenciado: Feeder layer. DMEM, 1% LIF, $1,5 \times 10^{-4}$ M MTG y 15% FCS</p> <p>Diferenciación:</p> <p>A)^B 1^C- CE (10^3- 8×10^4 cells/ml). IMDM, 2mM Glutamina, 0.5 mM ácido ascórbico, $4,5 \times 10^{-4}$ M MTG, 5% PFHM-II, 200 µg/ml Transferrina y 15% FCS (2,5 días)</p> <p>2- CE. IMDM , 2mM Glutamina, 0,5 mM ácido ascórbico, $4,5 \times 10^{-4}$ M MTG y 15% KSR (4 días)</p> <p>B) 1- CE (10^3- 8×10^4 cells/ml). IMDM, 2mM Glutamina, 0,5 mM ácido ascórbico, $4,5 \times 10^{-4}$ M MTG, 5% PFHM-II, 200 µg/ml Transferrina y 15% FCS (2,5 días)</p> <p>2- CE. Stem Pro 34 Medium, 2mM Glutamina, 0,5 mM ácido ascórbico, $4,5 \times 10^{-4}$ M MTG, 1% Kit ligand y 15% KSR(2 días)</p> <p>3- CE. IMDM, 2mM Glutamina, 0,5 mM ácido ascórbico, $4,5 \times 10^{-4}$ M MTG, 100ng/ml Activina A y 15% KSR</p>	<ul style="list-style-type: none"> - AAT (RT-PCR) - AFP (RT-PCR) - Alb1 (RT-PCR, IF) - Cps1 (RT-PCR) - Foxa2 (RT-PCR, IF) - Hhex (RT-PCR) - Hnf4 (RT-PCR) - Mixl1 (RT-PCR) - PDX1 (RT-PCR) - Sftpc (RT-PCR) - Sox17 (RT-PCR) - TAT (RT-PCR) - Tcf1 (RT-PCR) - TTR (RT-PCR)
Choi, D. (2005)	Ratón (129/SvJ)	<p>Indiferenciado: DMEM, 0.1 mM βME, 1.000 U/ml LIF, 1X NEAAs y 15% FBS</p> <p>Diferenciación:</p> <p>A- CE. DMEM, 0,1 mM βME, 1X NEAAs y 15% FBS (54 días)</p> <p>B- 1- CE. DMEM, 0,1 mM βME, 1X NEAAs y 15% FBS(14 días)</p> <p>2- CEs disgregados y cultivados en gelatina. 100 ng/ml aFGF y 15% FBS(2 días)</p> <p>3- 20 ng/ml HGF y 15% FBS (3 días)</p> <p>4- Resembrados en matrigel. 20 ng/ml HGF, 10 ng/ml Oncostatina M, 10^{-7} M dexametasona, ITS (5 mg/ml insulina,</p>	<ul style="list-style-type: none"> - AFP (RT-PCR, IH) - Albumina (RT-PCR) - Aldolasa B (RT-PCR) - Apoa2 (RT-PCR) - G6P (RT-PCR) - GATA4 (RT-PCR, IH) - PAH (RT-PCR) - TAT (RT-PCR) - TTR (RT-PCR)

		5mg/ml transferrina y 5 µg/ml selenio ácido). 15% FBS (3 días)	
D'Amour, KA. (2005)	Humano (H7 and H9)	<p>Indiferenciado: Feeder layer. DMEM/F12, 1mM NEAAs, 0,55 mM βME, 4 ng/ml FGF2 y 20% KSR.(En algunos casos se añadieron 10 ng/ml activina A para mantener el estado indiferenciado).</p> <p>Diferenciación:</p> <p>A- Monocapa. RPMI. 100 ng/ml activina A y diferentes concentraciones de FBS (0,5-10%) (5 días)</p> <p>B- Monocapa. RPMI. 100 ng/ml Activina A o 100 ng/ml BMP4, 5µM SU5402 y FBS (0% 1 día; 0,2% 1 día y 2% 2 días)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Brachyury (RT-PCR, IF) - Fgf8 (RT-PCR) - Foxa2 (RT-PCR, IF) - Goosecoid (RT-PCR) - Lhx1 (RT-PCR) - Nodal (RT-PCR) - Sox17 (RT-PCR, IF) - Wnt3 (RT-PCR)
Tada, S. (2005)	Ratón (EB5 con H.R. Oct4-Blasticidina S y Goosecoid-GFP)	<p>Indiferenciado: Gelatina. G-MEM, 0,1mM NEAAs, 1mM piruvato sódico, 0,1 mM βME, 1.000 U/ml LIF, 20 µg/ml Blasticidina S, 1% FCS y 10% KSR</p> <p>Diferenciación:</p> <p>A- Monocapa. Placas de 10 cm tratadas con colágeno Tipo IV (1x10⁵ células/placa). Medio O3, 0,1% BSA, 50 µM βME y/o 10 ng/ml activina A, 10 ng/ml BMP4 y 1000 ng/ml Nodal. Sin suero (4 días)</p> <p>B- CE (3x10⁴ células/placas 6 cm). Medio O3, 0.1% BSA, 50 µM βME y/o 10 ng/ml Activina A, 10 ng/ml BMP4 y 1.000 ng/ml Nodal. Sin suero (4 días)</p> <p>C- Monocapa. "Sorting" Gsc⁺ECD⁺ y Gsc⁺ECD^{low}. Placas de 10 cm tratadas con colágeno Tipo IV (1x10⁵ células/placa). Medio O3, 0,1% BSA, 50 µM βME y 10 ng/ml activina A. Sin suero (4-6 días)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Brachyury (RT-PCR, IH) - CK18 (RT-PCR, IF) - CK19 (RT-PCR) - CK8 (RT-PCR) - Claudin 6 (RT-PCR) - E-Cadherina (RT-PCR, IF) - Foxa2 (RT-PCR, IF) - GATA4 (RT-PCR) - Goosecoid (HR:GFP, RT-PCR) - Hex (RT-PCR) - Mix11 (RT-PCR) - Sox17 (RT-PCR)
Yasunaga, M. (2005)	Ratón (EB5 con H.R. Goosecoid-GFP; Sox17-hCD25 Oct4-Blasticidina S)	<p>Indiferenciado: Gelatina. G-MEM, 0,1mM NEAAs, 1mM piruvato sódico, 0,1 mM βME, 1,000 U/ml LIF, 20 µg/ml Blasticidina S, 1% FCS y 10% KSR</p> <p>Diferenciación:</p> <p>A- Endodermo Definitivo. Monocapa. Placas de 10 cm tratadas con colágeno Tipo IV. Medio O3 y 10 ng/ml activin A Sin suero (6 días)</p> <p>B- Endodermo visceral. Monocapa (10⁵ cells/ml). Placas tratadas con gelatina o fibronectina humana. Medio O3. Sin suero (6 días)</p> <p>C- Monocapa. "Sorting" Gsc⁺ECD⁺Sox17⁺</p>	<ul style="list-style-type: none"> - AFP (RT-PCR) - Alb (RT-PCR) - Brachyury (RT-PCR) - Cxcr4 (RT-PCR, IF) - Cyp7a1 (RT-PCR) - E-cadherina (RT-PCR, IF) - Foxa2 (RT-PCR) - Goosecoid (HR:GFP, RT-PCR) - Mix11 (RT-PCR) - Sox17 (HR:hCD25, RT-PCR, IF) - TAT (RT-PCR)

		and Gsc ⁻ ECD ⁺ Sox17 ⁺ . Placas de 10 cm tratadas con colágeno Tipo IV. Medio O3, 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml BMP4, 20 ng/ml aFGF y 5 ng/ml bFGF. Sin suero (4-6 días)	
Gadue, P. (2006)	Ratón (E14.1; HR. con Bry-GFP y Foxa2-hCD4)	<p>Indiferenciado: 50% medio neurobasal, 50% DMEM/F12, 0,5x N2, 0,5x B27, 0,05% BSA, ? LIF, 10 ng/ml BMP4 y 1.5x10⁻⁴ M MTG. Sin suero (sin feeder) o con ? suero (con feeder layer).</p> <p>Diferenciación:</p> <p>1- CE (1,5x10⁵ células/ml). 75% IMDM, 25% medio Ham's F12, 0,5x N2, 0,5x B27, 0,05% BSA, 2mM Glutamina, 0,5 mM ácido ascórbico y 4,5x10⁻⁴ M MTG. Sin suero o con ? suero (2 días)</p> <p>2- CEs disgregados y reagregados. 1 o 25 ng/ml activina A, 100 ng/ml Wnt3, 150 ng/ml DKK1 o 10 μM SB. Sin suero. (3-4 días)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - AAT (RT-PCR) - Alb1 (RT-PCR) - Brachyury (HR:GFP) - Cer1 (RT-PCR) - Foxa1 (RT-PCR) - Foxa2 (HR:hCD4, RT-PCR) - Goosecoid (RT-PCR) - Hnf4 (RT-PCR) - Pdx1 (RT-PCR)
Gouon-Evans, V. (2006)	Ratón (E14.1; H.R con Bry-GFP y Foxa2-hCD4)	<p>Indiferenciado: 50% medio neurobasal, 50% DMEM/F12, 0,5x N2, 0,5x B27, 0,05% BSA, ? LIF, 10 ng/ml BMP4 y 1,5x10⁻⁴ M MTG. Sin suero.</p> <p>Diferenciación:</p> <p>1- CE (9.000 células/ml para el paso 2.A o 20.000 células/ml para el paso 2.B). 75% IMDM, 25% medio Ham's F12, 0,5x N2, 0,5x B27, 0,05% BSA, 2mM Glutamina, 0,5 mM ácido ascórbico y 4,5x10⁻⁴ M MTG. Sin suero. (2 días)</p> <p>2.A- CE. 50 ng/ml activina A. (2 días)</p> <p>2.B- CE disgregados y reagregados. 50 ng/ml activina A (2 días)</p> <p>2.B.1 – CE disgregados, poblaciones aisladas por “sorting” y reagregadas (250.000 células/ml). Combinaciones de: 50 ng/ml BMP4, 10 ng/ml bFGF, 50 ng/ml activina A, 10 ng/ml VEGF. (2 días)</p> <p>2.B.2 – “Outgrowth”. Aparecen colonias adherentes y agregados en suspensión. Combinaciones de: 50 ng/ml BMP4, 10 ng/ml bFGF, 50 ng/ml Activina A, 10 ng/ml VEGF. (6 días)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - AFP (RT-PCR, IF) - Alb1 (RT-PCR, IF) - Brachyury (HR:GFP) - c-Kit (FACS) - Cxcr4 (FACS) - Cyp3a11 (RT-PCR) - Cyp7a1 (RT-PCR) - Foxa2 (HR:hCD4) - Hhex (RT-PCR) - Ipf1 (RT-PCR) - Sox17 (RT-PCR) - Spc (RT-PCR) - TAT (RT-PCR)
Shiraki, N. (2008)	Ratón (SK7; H.R. con Pdx1-GFP)	<p>Indiferenciado: Feeder layer. GMEM, 1.000 U/ml LIF, 100 μM NEAAs, 2 mM L-Glutamina, 1 mM piruvato sódico, 100 μM βME, 15% KSR y 1% FBS.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - AFP (RT-PCR) - Alb (IF) - Cdx2 (IF) - Cxcr4 (FACS)

		<p>Diferenciación:</p> <p>1 A- Monocapa. Cocultivo (5×10^4 células/pocillo (Placas de 24 pocillos)) SK7 con la línea celular mesonefrónica M14. DMEM, ? NEAAs, ? L-Glutamina, ? βME y 10% FBS (8 o 12 días).</p> <p>1.B.1- Monocapa. DMEM, ? NEAAs, ? L-Glutamina, ? βME, 100 ng/ml activina A, 5 ng/ml bFGF y 10% FBS (4 días)</p> <p>1.B.2- Monocapa. DMEM, ? NEAAs, ? L-Glutamina, ? βME, 100 ng/ml activina A, 5 ng/ml bFGF, 3μM RA y 10% FBS (4 o 14 días)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - E-Cadherin (FACS) - Foxa2 (RT-PCR) - GATA4 (RT-PCR) - Glucagón (RT-PCR) - Hnf4 (RT-PCR) - INS 2 (RT-PCR) - Isl1 (RT-PCR) - Mixl1 (RT-PCR) - Neurogenina 3 (RT-PCR) - Nkx 6.1 (RT-PCR) - Nkx2.1 (IF) - Pax4 (RT-PCR) - Pax6 (RT-PCR) - Pdx1 (RT-PCR, HR:GFP) - PYY (RT-PCR) - Somatostatina (RT-PCR) - TTR (RT-PCR)
--	--	--	--

^A – Las abreviaturas se detallan en la página 6.

^B – Las letras indican protocolos diferentes o alternativos dentro de un mismo trabajo.

^C – Los números indican pasos secuenciales dentro de un mismo protocolo.

^D – Los marcadores expuestos son aquellos que han sido positivos con las técnicas realizadas, entre paréntesis, en el trabajo.

? – La concentración del compuesto no se especifica en el trabajo publicado.



TABLA 2. PROTOCOLOS PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA A PARTIR DE LAS ESC DE RATÓN.

Referencia	Línea celular	Condiciones de cultivo	Genes endodérmicos
Moritoh, Y. (2003)	EB3; H.R.con Oct 3/4-Blasticidina S y tranfectadas con INS2-βGEO	<p>Indiferenciado: GMEM, ? LIF y 10% FCS</p> <p>Diferenciación:</p> <p>1- CE (2-2,5x10⁴ células/cm²). DMEM y 10% FCS (4-5 días).</p> <p>2- “Outgrowth” con gelatina. DMEM y 10% FCS (2 días).</p> <p>3- “Outgrowth”. Medio ITSFn (4-7 días)</p> <p>4- Disgregación y “Outgrowth” (0,5-2x10⁵ células/cm²). DMEM/F12 1:1, 25 μg/ml insulina, 100 μg/ml transferrina, 20 nmol/l progesterona, 60 μmol/l putrescina, 30 nmol/l selenito sódico, 10 ng/ml KGF, 20 ng/ml EGF, 25 ng/ml bFGF, ? B27 y 10 ng/ml nicotinamida (6-8 días)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Amilasa (RT-PCR) - Beta2 (RT-PCR) - Carboxypeptidasa A (RT-PCR) - Glucagón (RT-PCR, IF) - Glut2 (RT-PCR) - INS 2 (RT-PCR) - Insulina (IF, X-gal) - Isl1 (RT-PCR) - Kir6.2 (RT-PCR) - Neurogenina 3 (RT-PCR) - Nkx2.2 (RT-PCR) - Nkx6.1 (RT-PCR) - p48 (RT-PCR) - Pax4 (RT-PCR) - Pax6 (RT-PCR) - Pdx1 (RT-PCR, IF) - PP (RT-PCR) - Somatostatina (RT-PCR)
Ku, H. T. (2004)	R1, E14.1 y CCE	<p>Indiferenciado: Feeder layer. DMEM, ? LIF, 3x10⁻⁴ M MTG⁸ y 15% FCS</p> <p>Diferenciación:</p> <p>1- CE (5-2x10³ células/ml). IMDM, 50 μg/ml ácido ascórbico, 6x10⁻³ M MTG y 15% FCS (2 días)</p> <p>2- CE. IMDM, 50 μg/ml ácido ascórbico, 6x10⁻⁴ M MTG y 15% FCS or KSR (4 días)</p> <p>3. A- CE o “Outgrowth” en gelatina. DMEM/F12 (1:1) con o sin 10 ng/ml FGF2 y 15% KSR (5-11 días)</p> <p>3. B- CE obtenidos en el paso 2 con 15% FCS. DMEM/F12 (1:1), 10 mM Nicotinamida, 0.1 nM Exendina-4, 10 ng/ml activina βB y 15% KSR (13 días)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Amilasa 2 (RT-PCR) - Foxa2 (RT-PCR) - Glucagón (RT-PCR, IF) - Ins I y II (RT-PCR) - Insulina (IF) - PDX1 (RT-PCR) - Péptido C (IF) - Sox17 (RT-PCR)
Shi, Y. (2005)	R1 Tranfectadas con Insulina-eGFP	<p>Indiferenciado: DMEM, 1.000 U/LIF y 20% FBS</p> <p>Diferenciación:</p> <p>1- CE. DMEM sin LIF y 10% FBS (1-2 días).</p> <p>2- “Outgrowth” con matrigel. DMEM y 10% FBS (2 h) adición de 100 ng/ml activina A (1 día).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Foxa2 (RT-PCR) - Glut2 (RT-PCR) - INS 1 (RT-PCR) - Insulina (IF, GFP) - Isl1 (RT-PCR) - Pdx1 (RT-PCR) - Péptido C (IF)

		<p>3- "Outgrowth". DMEM y 10% FBS (6-8 h) adición de 10^{-6} M RA (1 día).</p> <p>4- "Outgrowth". DMEM, 10 ng/ml bFGF y 10% FBS</p> <p>5- "Outgrowth". DMEM/F12 ??:, ? N2, ? B27, 1 μg/ml laminina, 10 ng/ml bFGF y 10 mM nicotinamida (3-5 días)</p> <p>Transplante en Ratones diabéticos por STZ. Normalizan la glucemia.</p>	
Vaca, P. (2005)	D3 tranfectadas con INS-Neo	<p>Indiferenciado: DMEM, 1% NEAAs, 0.1 mM βME, 4mM L-Glutamina, 1 mM piruvato sódico, 1.000 U/ml LIF y 15% FBS.</p> <p>Diferenciación:</p> <p>1- CE ($1,5 \times 10^6$ células/ml). Medio condicionado del cultivo de yemas pancreáticas de día 16,5 (1:1) y 3% FBS. (7 días)</p> <p>2- "Outgrowth". Medio condicionado del cultivo de yemas pancreáticas de día 16,5 (1:1) y 10% FBS (7 días)</p> <p>3- "Outgrowth". Selección con 2,3 ng/ml G418. Medio condicionado del cultivo de yemas pancreáticas de día 16,5 (1:1) y 10% FBS (? días)</p> <p>Transplante en Ratones diabéticos por STZ. Normalizan la glucemia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - GLUT2 (IF) - Insulina (RT-PCR, IF, X-gal) - Pdx1 (RT-PCR) - Péptido C (IF)
Schroeder, I. S. (2006)	R1	<p>Indiferenciado: Feeder layer. DMEM (4.5 g/l glucosa), 2 mM L-glutamina, ? NEAAs, 100 μM βME, 1000 U/ml LIF y 15% FCS.</p> <p>Diferenciación:</p> <p>1- Gota colgante (600 células/ 20 μl). IMDM, 2 mM L-glutamina, ? NEAAs, 450 μM MTG y 20% FCS (2 días).</p> <p>2- CE en suspensión. IMDM, 2 mM L-glutamina, ? NEAAs, 450 μM MTG y 20% FCS (3 días).</p> <p>3- "Outgrowth" con gelatina. IMDM, 2 mM L-glutamina, ? NEAAs, 450 μM MTG y 20% FCS (9 días).</p> <p>4- "Outgrowth" con poli-L-ornitina-laminina. DMEM/F12 (4,5 g/l glucosa), 20 nM progesterona, 100 μM putrescina, 1 μg/ml Laminina, 10 mM nicotinamida, 25 μg/ml insulina, 50 μg/ml transferrina y ? B27. Sin suero. (6 o 18 días)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - CK19 (IF) - Glucagón (RT-PCR) - INS 1 (RT-PCR) - INS 2 (RT-PCR) - Insulina (IF) - Isl1 (RT-PCR) - Pdx1 (RT-PCR) - Péptido C (IF) - Somatostatina (RT-PCR)

<p>Nakanishi, M. (2007)</p>	<p>E14 y CMTI-1</p>	<p>Indiferenciado: Feeder layer. DMEM (4,5 mg/l D-glucosa), ? NEAAs, 0,001% βME, 1.500 U/ml LIF y 15% FBS</p> <p>Diferenciación: 1- CE sin LIF y 15% KSR (4 días)</p> <p>2- CE con 15% KSR (2 días), 10-50 ng/ml activina A y 0,001-1 μM trans RA. (Exocrino \rightarrow 10 ng/ml activina A y 0,1 μM RA; INS II \rightarrow 25 ng/ml activina A y 0,1 μM RA)</p> <p>3- "Outgrowth" con gelatina y 10% KSR (6-12 días)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - AFP (RT-PCR) - Alb (RT-PCR) - Amilasa 2 (RT-PCR, IF) - G6P (RT-PCR) - Glucagón (RT-PCR, IF) - Ins I y II (RT-PCR) - Pdx1 (RT-PCR, IF) - Péptido C (IF) - PP (RT-PCR) - Ptf1a (RT-PCR) - Somatostatina (RT-PCR) - Sox17 (RT-PCR) - TAT (RT-PCR)
<p>Jiang, W. (2008)</p>	<p>Transferencia nuclear-ESC</p>	<p>Indiferenciado: Feeder layer. DMEM, 1.000 U/ml LIF y 20% KSR</p> <p>Diferenciación: 1- Monocapa. Matrigel. X-vivo 10, 1 g/l BSA y 50 ng/ml activina A (3 días) Sin suero.</p> <p>2- Monocapa. F12/IMDM 1:1, 5 g/l BSA, 1% Insulina-transferrina-selenio y 2 μmol/l RA (2 días)</p> <p>3- Monocapa. DMEM (1 g/l Glucosa), 5 g/l BSA, 1% Insulina-transferrina-selenio, 10 ng/ml bFGF y 20 ng/ml EGF (3 días)</p> <p>4- Monocapa. DF12, ? Insulina-transferrina-selenio, 10 ng/ml bFGF y 10 mmol/l Nicotinamida (3 o 5 días)</p> <p>Transplante en Ratones diabéticos por STZ. Normalizan la glucemia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Abcc8 (RT-PCR) - Brachyury (IF) - Foxa2 (IF) - Glucagón (RT-PCR, IF) - IAPP (RT-PCR) - Insulina I y II (RT-PCR) - Isl1 (RT-PCR, IF) - KCNJ11 (IF) - Neurogenina 3 (IF) - Nkx2.2 (RT-PCR) - Nkx6.1 (IF) - Pax6 (IF) - Pdx1 (RT-PCR, IF) - Péptido C (IF) - Somatostatina (RT-PCR) - Sox17 (IF) - Sox9 (IF)
<p>Vaca, P. (2008)</p>	<p>D3 transfectadas con GB2</p>	<p>Indiferenciado: DMEM, 1% NEAAs, 0.1 mM βME, 4mM L-Glutamina, 1 mM piruvato sódico, 1,000 U/ml LIF y 15% FBS.</p> <p>Diferenciación: 1- CE (1,5x10⁶ células/ml). Sin LIF, 10 mM nicotinamida y 3% FBS. (7 días)</p> <p>2- "Outgrowth". 10 mM nicotinamida y 10% FBS (7 días)</p> <p>3- "Outgrowth". Selección con 2,3 ng/ml G418. 10 mM nicotinamida y 10% FBS (? días)</p> <p>Transplante en Ratones diabéticos por STZ. Normalizan la glucemia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - GLUT2 (IF) - Insulina (IF, X-gal) - Péptido C (IF)

TABLA 3. PROTOCOLOS PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA A PARTIR DE LAS ESC HUMANAS.

Referencia	Línea celular	Condiciones de cultivo	Genes endodérmicos
D'Amour KA. (2006)	CyT203	<p>Indiferenciado: Feeder layer. DMEM/F12, 1mM NEAAs, 0,55 mM βME, 4 ng/ml FGF2 y 20% KSR.(en algunos casos se añade 10 ng/ml activina A para mantener el estado indiferenciado).</p> <p>Diferenciación: 1- Monocapa. RPMI, 100 ng/ml activina A, 25 ng/ml Wnt3a (Primeros 2 días) y FBS (0% 2 días; 0,2% 2 días) 2- Monocapa. RPMI, 50 ng/ml hFGF10, 0,25 μM KAAD-ciclopamina y 2% FBS (4 días) 3- Monocapa. DMEM, 50 ng/ml hFGF10, 0,25 μM KAAD-ciclopamina, 2 μM RA y 1% B27. (4 días) 4- Monocapa. DMEM, 1 μM DAPT, 50 ng/ml Exendina 4 y 1% B27. (3 días) 5- Monocapa. CMRL, 50 ng/ml Exendina 4, 50 ng/ml IGF1, 50 ng/ml HGF y 1% B27 (>3 días)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - CER (RT-PCR) - Cxcr4 (RT-PCR) - Foxa2 (WB) - Ghrelina (IF) - Glucagón (IF) - Hnf1β (WB, IF) - Hnf4a (RT-PCR) - Hnf6 (IF) - INS (IF) - ISL1 (IF) - Neurogenina 3 (IF) - Nkx 2.2 (WB, IF) - Nkx 6.1 (WB, IF) - PDX1 (WB, IF) - Péptido C (WB) - Polipéptido Y (IF) - Somatostatina (IF) - SOX17 (WB, IF)
Shim, J.H. (2006)	Miz-hES4 y 6	<p>Indiferenciado: Feeder layer. DMEM/F12, 0,1 mM βME, 1% NEAAs, 1mM Glutamina, 4ng/ml bFGF y 20% KSR</p> <p>Diferenciación: 1- CE. DMEM/F12, 0,1 mM βME, 1% NEAAs, 1mM Glutamina y 20% FBS (4 días). 2- CE. DMEM/F12, 0,1 mM βME, 1% NEAAs, 1mM Glutamina, 30 ng/ml activina A. Sin suero (4 días) 3- CE. DMEM/F12, 0,1 mM βME, 1% NEAAs, 1mM Glutamina, 10 μmol/l RA. Sin suero (2 días) 4- "Outgrowth". Medio ITS (Insulina-Transferrina-Selenio) y 5 μg/ml Fibronectina. Sin suero. (10-13 días) Transplante en Ratones inmunodeprimidos y diabéticos por STZ. Normalizan la glucemia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Brachyury (RT-PCR, IF) - CDX2 (RT-PCR) - Foxa2 (RT-PCR, IF) - GATA4 (IF) - Glucagón (IF) - Hlxb9 (RT-PCR) - Insulina (IF) - Isl1 (RT-PCR) - Mixl1 (RT-PCR) - NeuroD 1 (RT-PCR) - Neurogenina 3 (RT-PCR) - Nkx 2.2 (RT-PCR) - Nkx 6.1 (RT-PCR) - PDX1 (RT-PCR, IF) - Sox17 (RT-PCR, IF)

<p>Phillips, B. (2007)</p>	<p>HES1-4 y HUES 7 and 9</p>	<p>Indiferenciado: Feeder layer. (5×10^4 células/cm²). DMEM, 100µM NEAAs, 2mM L-glutamina, 1% ITS (Insulina-Transferrina-Selenio), 0,1 mM βME y 20% FBS.</p> <p>Diferenciación: 1- CE. Matrigel (1:6). RPMI-1640, 50 ng/ml activina A, 50 ng/ml BMP4 y 20% KSR. (10 días)</p> <p>2.A- CE. Sin Matrigel. RPMI-1640, 200 ng/ml HGF, 40 ng/ml Exendina-4, 200ng/ml β-cellulina y 20% KSR. (10 días)</p> <p>2.B.1- CE. Sin Matrigel. DMEM/F12, 2mM Glutamax, 8 mM Hepes, 2% B27, 20 ng/ml FGF18, 2µg/ml heparina y ? suero. (7 días)</p> <p>2.B.2- CE. DMEM/F12, 2mM Glutamax, 8 mM Hepes, 2% B27, 20 ng/ml FGF18, 2µg/ml heparina, 10 ng/ml EGF, 4 ng/ml TGF, 30 ng/ml IGF1, 30 ng/ml IGF2, 10 ng/ml VEGF y ? suero. (7 días)</p> <p>2.B.3- “Outgrowth” con Fibronectina. RPMI-1640, 11 mM glucosa, 2 mM glutamax, 8 mM Hepes, 40 ng/ml HGF, 200 ng/ml PYY, 10 µM Forskolina y 5% FBS. (10 días).</p> <p>Transplante en Ratones inmunodeprimidos y diabéticos por STZ. No normalizan la glucemia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Amilasa (RT-PCR) - Foxa2 (RT-PCR) - Glucagón (RT-PCR) - Glut2 (RT-PCR) - Insulina (RT-PCR, WMH) - Isl1 (RT-PCR) - Kir6.2 (RT-PCR) - Neurogenina 3 (RT-PCR) - Nkx2.2 (RT-PCR) - Nkx6.1 (RT-PCR) - Pax4 (RT-PCR) - Pdx1 (RT-PCR) - Ptf1a (RT-PCR) - Somatostatina (RT-PCR) - Sox17 (RT-PCR, WMH) - Sur1 (RT-PCR) - SYP (RT-PCR)
<p>Jiang, J. (2007)</p>	<p>H1, H7 y H9</p>	<p>Indiferenciado: Medio condicionado de células MEF: 80% KO-DMEM, 1mM Glutamina, 0,1 mM βME, 1% NEAAs, 4 ng/ml hbFGF y 20% KSR.</p> <p>Diferenciación: 1- Monocapa. RPMI 1640, 11.1 mM Glucosa, 1x B27, 4 nM activina A, 1 mM SoB (1 día) y posteriormente 0,5 mM SoB (6 días).</p> <p>2- Suspensión. RPMI 1640, 11,1 mM Glucosa, 1x B27, 20 ng/ml EGF, 2 ng/ml bFGF y 100 ng/ml noggin (14 días).</p> <p>3- Suspensión. RPMI 1640, 11,1 mM Glucosa, 1x B27, 20 ng/ml EGF y 100 ng/ml noggina (7 días).</p> <p>4- Suspensión. RPMI 1640, 11,1 mM Glucosa, 1x B27, 0,5% BSA, 10 mM Nicotinamida y 50 ng/ml IGF-II (5 días) y posteriormente sin IGF-II (2 días).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Amilasa (RT-PCR) - CK19 (IF) - Cxcr4 (IF) - Foxa2 (RT-PCR, IF) - Glucagón (RT-PCR, IF) - Glut2 (RT-PCR) - Hnf4a (RT-PCR) - Insulina (RT-PCR) - Isl1 (RT-PCR) - Neurogenina 3 (RT-PCR) - Pdx1 (RT-PCR, IF) - Péptido C (IF) - Ptf1a (RT-PCR) - Somatostatina (IF) - Sox17 (RT-PCR, IF)

<p>Jiang, W. (2007)</p>	<p>H1 y H9</p>	<p>Indiferenciado: Feeder layer. DMEM (4,5 mg/l D-glucosa), 1 mM Glutamina, 0,1 mM βME, 1% NEAAs y 20% FBS</p> <p>Diferenciación: 1- Monocapa. CDM (1:1 IMDM:F12 NUT-MIX), Insulina-Transferrina-Selenio-A (1:100), 450 μM MTG, 5 mg/ml Albúmina fracción V o X-Vivo10 con 55 μM βME y 0,1% Albúmina fracción V (2 días) Sin suero.</p> <p>2- Monocapa. CDM y 50 ng/ml activina A (4 días)</p> <p>3- Monocapa. CDM y 10^{-6} M RA (4 días)</p> <p>4- Monocapa. DMEM/F12 1:1, Insulina-Transferrina-Selenio-A (1:100), 2mg/ml Albúmina fracción V y 10 ng/ml bFGF (3 días)</p> <p>5- Monocapa. DMEM/F12 1:1, Insulina-Transferrina-Selenio-A (1:100), 2mg/ml Albúmina fracción V, 10 ng/ml bFGF y 10 mM Nicotinamida (5 días)</p> <p>6- Suspensión. DMEM/F12 1:1, Insulina-Transferrina-Selenio-A (1:100), 2mg/ml Albúmina fracción V, 10 ng/ml bFGF y 10 mM Nicotinamida (2 días)</p> <p>Transplante en Ratones inmunodeprimidos y diabéticos por STZ. Normalizan la glucemia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Amilasa (RT-PCR, IF) - Glucagón (RT-PCR, IF) - Glucoquinasa (RT-PCR) - Glut2 (RT-PCR) - Hnf4α (RT-PCR) - IAPP (RT-PCR) - Insulina (RT-PCR, ELISA) - Pdx1 (RT-PCR, IF) - Péptido C (IF) - Somatostatina (RT-PCR, IF) - Sox17 (RT-PCR, IF)
<p>Kroon, E. (2008)</p>	<p>CyT203</p>	<p>Indiferenciado: Feeder layer. DMEM/F12, 1mM NEAAs, 0,55 mM βME, 4 ng/ml FGF2 y 20%KSR.(en algunos casos se añade 10 ng/ml activina A para mantener el estado indiferenciado)</p> <p>Diferenciación: 1- Monocapa. RPMI, 100 ng/ml activina A, 25 ng/ml Wnt3a (primer día) y FBS (0% 2 días; 0.2% 2 días)</p> <p>2- Monocapa. RPMI, 25-50 ng/ml KGF y 2% FBS (3 días)</p> <p>3- Monocapa. DMEM, 50 ng/ml noggin, 0,25 μM KAAD-ciclopamina, 2 μM RA y 1% B27. (3 días)</p> <p>4- Monocapa. DMEM y 1% B27. (3 días)</p> <p>Transplante en Ratones inmunodeprimidos y diabéticos por STZ. Normalizan la glucemia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Arx (IF) - CDX2 (IF) - Foxa2 (IF) - Ghrelina (IF) - Glucagón (IF) - IAPP (IF) - Insulina (IF) - MAFA (IF) - Nkx6.1 (IF) - Pdx1 (IF) - Somatostatina (IF)



SOCIEDAD ESPAÑOLA DE DIABETES



FUNDACIÓN SED
de la Sociedad Española de Diabetes

FUNDACIÓN SED DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE DIABETES
D. Ramón de la Cruz, 88, oficina 1, 28006 Madrid CIF: G-84740745

Madrid a 26 de febrero de 2009

Dr. Enrique Roche Collado
Instituto de Bioingeniería
Universidad Miguel Hernández
ALICANTE

Estimado amigo:

Es un placer comunicarte, en nombre del Jurado, que te ha sido otorgado el premio "Alberto Sols de Investigación Básica Senior 2009", dotado por importe de 9.000 euros, (patrocinado por Novonordisk) por la gran trayectoria científica demostrada en el campo de la investigación básica en diabetes.

El premio te será entregado durante el XX Congreso Nacional de la SED a celebrar en Tenerife, el viernes día 3 entre las 8.30-9.00h y dispondrás de los últimos 15 minutos para dar tu conferencia.

Rogamos nos comuniqués, a la mayor brevedad posible, el título de la conferencia a impartir, y el texto que se publicará en la Revista Avances en Diabetología.

Recibe un afectuoso saludo,

Fdo. José Luis Herrera Pombo
Presidente Fundación SED