



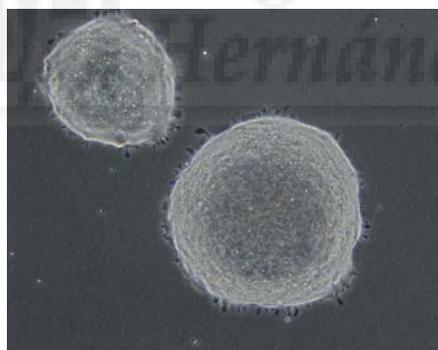
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

Departamento de Biología Aplicada

Instituto de Bioingeniería

TESIS DOCTORAL

**REPROGRAMACIÓN CELULAR DE CÉLULAS MADRE
EMBRIONARIAS DE RATÓN PARA LA OBTENCIÓN DE
CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA**

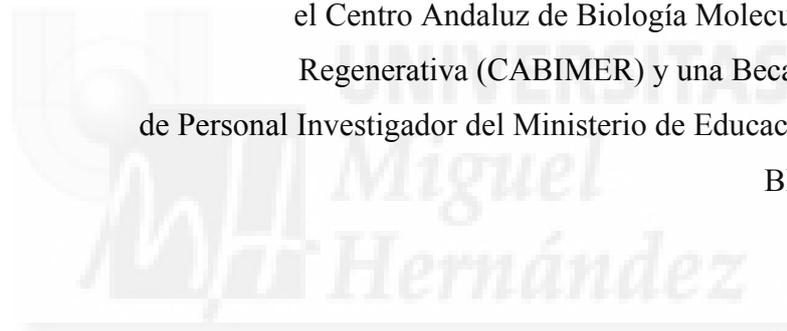


**Trabajo presentado por
Miriam Ramírez Domínguez**

**Director de la tesis:
Dr. Bernat Soria Escoms**

Elche, 2007

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda
del Instituto de Bioingeniería de la UMH,
el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina
Regenerativa (CABIMER) y una Beca de Formación
de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia,
BES-2002-1486.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi director de tesis, Bernat, el haberme dado esta oportunidad y de esta manera el haberme permitido dedicarme a mi vocación durante estos años.

Quiero darle las gracias a Enrique por su paciencia al resolver mis dudas y por ver siempre el lado positivo de las cosas. Gracias por haberme permitido crecer profesionalmente.

También quería agradecer a Juan Antonio y Jesús su pronta disposición al ofrecerme material bibliográfico para esta tesis. Gracias Jesús por tu sencillez, por tener siempre unas palabras amistosas para mí y por animarme con la tesis. Gracias a Jose Villanueva también por su amabilidad y por estar siempre ahí.

Gracias de todo corazón a Isabel, por sus sabios consejos, su amistad y por acogerme con los brazos abiertos. ¡Qué pena que hayamos compartido tan poco tiempo en el laboratorio! Contigo los experimentos hubieran sido más llevaderos.

Quiero darle un millón de gracias a Christian, por tener siempre palabras de aliento para mí, por ayudarme siempre, por no tener dobleces y por saber escuchar.

Muchas gracias también a Alfredo, sin cuya ayuda esta tesis no hubiera sido posible.

Gracias a Roberto, Néstor, Ana, Maribel, Beatriz y Encarna, por haberme ayudado siempre que lo he necesitado con diligencia y amabilidad.

Gracias también a Lucrecia, la “última adquisición” del laboratorio, por las confidencias y los cafés que hemos compartido, te deseo mucha suerte con tu tesis.

Muchas gracias también a Mónica, Nuria, Paloma R., Pilar, Andrea, Patricia, Marta, Jose, Jon, Everardo, Fina, Raquel, Iván, Paloma A., Begoña, Pablo y Paqui, vuestras risas y ganas de vivir han hecho más ameno mi paso por este Instituto.

Elena, muchas gracias a ti también por tu alegría y por preocuparte por la marcha de la tesis, por la experiencia que me has aportado.

Muchas gracias a Mariana por haberme acogido en su casa cuando llegué a Alicante, no lo olvidaré.

Muchas gracias a Mari Cruz y Mari Mar, por vuestra paciencia y buen humor ante los pequeños problemas administrativos del día a día.

Mil gracias a los servicios técnicos de la Universidad, en especial a Paco, Darío, Alberto y José Antonio, y a las chicas de la limpieza, la señora Lola, Tere y Pilarín, vuestro humor hacía las tareas rutinarias más llevaderas.

Muchas gracias también a la gente de Micro, Conchi, Arantxa, Alex, Mila, Sergio, Elena, Pushker, Boris y Paco. Hicisteis las comidas más agradables con vuestros interesantes debates.

Y como no, muchísimas gracias a todos los amigos que dejo en Alicante y parte del extranjero. Gracias a mis amigos de Neurociencias, siempre recordaré los buenos ratos que hemos pasado juntos, sobre todo dentro del Instituto pero también fuera de él. Muchas gracias también a Javi, de Jumilla, y Celes, por lo bien que nos lo hemos pasado juntos, os echaré de menos.

Muchas gracias con mucho cariño a las que ya no están aquí, a Esperanza, Giovanna, Laura, Eva Alonso y Erika, gracias por vuestra amistad, y por los buenos momentos que compartimos a vuestro paso por Alicante. Os deseo mucha suerte en el futuro.

También tengo que darle las gracias a mi familia por su comprensión y apoyo incondicional, por enseñarme a crecerme ante las dificultades y por estar siempre al otro lado del teléfono, cuando lo he necesitado y cuando no.

Por último, muchas gracias a Eloy, de la Universidad de Huelva, por tener el don de saber escuchar y por sus sabios consejos, a mis amigos de Huelva y a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron a que llegara hasta aquí, enseñándome a disfrutar los buenos momentos al máximo, a mostrarme como soy y dar lo mejor de mi misma.



“Convierte tu muro en un peldaño”

Rainer M. Rilke

“¿Y cuando piensas realizar tu sueño?”,

le preguntó el Maestro a su discípulo.

“Cuando tenga la oportunidad de hacerlo”,

respondió éste. El Maestro le contestó:

“La oportunidad nunca llega.

La oportunidad ya está aquí”.

Anthony de Mello.



A mis padres y a mis hermanos,
por permanecer cerca de mí
a pesar de la distancia
y por su apoyo incondicional.



ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	5
1. Desarrollo y función de la célula beta pancreática.	6
1.1. Formación del endodermo.	6
1.2. Organogénesis del páncreas.	7
1.3. Función de la célula β .	16
2. Diabetes mellitus.	20
2.1. Diabetes mellitus tipo 1.	20
2.2. Diabetes mellitus tipo 2.	22
2.3. Tratamiento de la diabetes.	23
2.4. Futuras estrategias para el tratamiento de la diabetes tipo 1.	25
2.4.1. Terapia génica.	25
2.4.2. Trasplante de islotes y páncreas entero.	27
2.4.3. Xenotrasplantes.	28
2.4.4. Trasplante de células productoras de insulina.	29
2.4.4.1. Células beta procedentes de células transdiferenciadas.	29
2.4.4.2. Células beta procedentes de células madre.	30
2.4.4.3. Expansión ex vivo de células beta.	32
2.4.5. Células beta procedentes de la neogénesis.	32
3. Células madre.	34
3.1. Concepto.	34
3.2. Clasificación de las células madre.	35
4. Las células madre embrionarias.	37

4.1.Origen y aislamiento.	37
4.2.Características.	38
5. Métodos para diferenciar células madre embrionarias hacia células productoras de insulina.	38
5.1. Diferenciación espontánea.	41
5.2. Diferenciación dirigida.	43
5.2.1. Reprogramación celular.	47
6. Reprogramación celular mediante extractos reprogramadores.	51
OBJETIVOS	55
MATERIALES Y MÉTODOS.	57
1. Técnicas de cultivo celular.	58
1.1. Líneas celulares utilizadas.	58
1.2. Medios de cultivo utilizados.	58
1.3. Tripsinización de células.	59
1.4. Protocolos de diferenciación espontánea. Formación de cuerpos embrionarios.	60
1.4.1. Método masivo.	60
1.4.2. Método por gota colgante.	61
1.5. Disgregación de cuerpos embrionarios.	61
1.5.1. Disgregación con tripsina.	62
1.5.2. Disgregación combinada con colagenasa y tripsina.	62
1.6. Microscopía.	63

2. Técnicas de Bioquímica.	63
2.1. Medida de la actividad enzimática de la GAPDH.	63
3. Técnicas de Biología Molecular.	65
3.1. Extracción de ARN total.	65
3.2. Extracción de ARN de menos de 5×10^5 células.	68
3.3. Extracción de ARN de islotes y yemas pancreáticas.	69
3.4. Extracción de ADN.	71
3.5. Retrotranscripción de los ARN mensajeros.	72
3.6. Reacción en cadena de la polimerasa.	72
3.7. Resolución de los productos de PCR.	76
3.8. Tratamiento con DNAsa y RNAsa de los extractos celulares totales nativos.	76
3.9. Tratamiento con proteinasa K de los extractos celulares totales nativos.	77
3.10. Electroforesis de ARN.	77
3.11. Electroforesis de proteínas.	77
3.12. Transfección de las células D3 con el plásmido phins-bgeo-PGKHygro.	80
3.12.1. Generación del vector y descripción de la construcción.	80
3.12.2. Hacer las bacterias competentes.	81
3.12.3. Transformación por CaCl_2 de células competentes.	82
3.12.4. Aislamiento del plásmido.	85
3.12.5. Linealización y precipitación del plásmido.	86
3.12.6. Transfección del plásmido a las células D3 indiferenciadas por electroporación.	87
3.13. Selección y amplificación de clones transfectados.	88
3.14. Reprogramación celular y selección de células productoras de insulina.	88

4. Técnicas de Biología Celular.	89
4.1. Tinción de núcleos con Hoechst.	89
4.2. Aislamiento de islotes.	89
4.3. Aislamiento de yemas pancreáticas.	91
4.4. Extractos celulares totales en condiciones nativas.	91
4.5. Extractos de proteínas nucleares.	93
4.6. Extractos proteicos citosólicos.	94
4.7. Permeabilización de células madre embrionarias indiferenciadas con estreptolisina-O.	95
4.8. Incubación con el extracto proteico tras la permeabilización.	96
4.9. Introducción de proteínas en células madre embrionarias indiferenciadas o cuerpos embrionarios mediante Chariot.	96
4.10. Tinción con X-Gal.	98
4.11. Revelado de la peroxidasa.	99
4.12. Técnicas inmunocitoquímicas.	100
RESULTADOS.	102
1. Permeabilización de las células madre embrionarias de ratón D3 con estreptolisina-O.	103
2. Elección de un método alternativo para introducir proteínas en el interior celular.	106
3. Puesta a punto del método Chariot para reprogramar células madre embrionarias de ratón D3.	109
3.1. Cinética temporal.	109
3.2. Cinética temporal dependiente del peso molecular.	114
3.3. Tipo celular.	116
3.4. Concentración de proteína.	117
3.5. Afinidad.	119
3.6. Resumen de las modificaciones de las condiciones comerciales del Chariot.	120

4. Efecto de los ácidos nucleicos y las proteínas sobre la reprogramación.	121
4.1. Efecto de los ácidos nucleicos sobre la reprogramación.	121
4.2. Efecto de las proteínas sobre la reprogramación.	125
5. Reprogramación de células madre embrionarias de ratón D3 a células productoras de insulina.	129
5.1. Caracterización molecular.	129
5.1.1 Caracterización molecular de las células D3.	130
5.1.2. Caracterización molecular de las células INS-1.	131
5.1.3. Caracterización molecular de yemas pancreáticas.	133
5.2. Reprogramación con extractos proteicos de INS-1.	134
5.2.1. Tipo de extracto.	134
5.2.2. Reproducibilidad del protocolo de reprogramación en células D3 indiferenciadas con extractos de INS-1.	135
5.2.3. Reproducibilidad del protocolo de reprogramación en células D3 formando EB con extractos de INS-1.	138
5.2.4. Reproducibilidad del protocolo de reprogramación en células D3 indiferenciadas con extractos de INS-1 tratados.	140
5.3. Reprogramación con extractos proteicos de yemas.	141
6. Selección de las células que expresan insulina.	146
DISCUSIÓN.	151
1. Estado actual del campo de la reprogramación celular con extractos proteicos.	152
2. Elección de un método alternativo para introducir proteínas en el interior celular.	156

3. Puesta a punto del método Chariot para reprogramar células madre embrionarias de ratón D3.	157
4. Efecto de los ácidos nucleicos y las proteínas sobre la reprogramación.	158
5. Reprogramación con extractos proteicos de INS-1 y yemas pancreáticas.	159
6. Caracterización molecular de las células donante, las células diana y las células reprogramadas.	161
7. Selección de células que expresan insulina.	163
8. Planes de futuro.	165
CONCLUSIONES.	167
ANEXO.	169
BIBLIOGRAFÍA.	171





ABREVIATURAS

Abreviaturas

AChE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADP	Adenosín difosfato
ADP	Adenosín monofosfato
AFP	α -Fetoproteína
APS	Persulfato amónico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosín trifosfato
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
biP	Bifosfato
bHLH	<i>Basic Helix-Loop-Helix</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
CK20	Citokeratina-20
Cols	Colaboradores
CTP	Citosina trifosfato
D	Día
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos
Dpc	<i>Days post coito</i>
DTT	Ditiotreitol
EB	Cuerpos embrionarios
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ESC	Células madre embrionarias
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	Conjugado de isotiocianato de fluoresceína
Foxa1, Foxa2, Foxa3,	<i>Forkhead box A</i>
GAP	Gliceraldehido 3-fosfato
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
GLP-1	<i>Glucagon-Like Peptide-1</i>
GS	Glutation sintetasa
GTP	Guanosina trifosfato
Glut-1, Glut-2	Transportador de glucosa
H	Hora/s
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	4-(2-hidroxietil)1-piperazina-etanosulfónico
Hes1	<i>Hairy and Enhancer of Split1</i>

hESC	Células madre embrionarias humanas
HIV-1	Virus de la inmunodeficiencia humana
HNF1 α , HNF4 α , HNF6	<i>Hepatocyte Nuclear Factor</i>
HSV	Virus del herpes simple
IAPP	<i>Islet Amyloid Polypeptide</i>
IGRP	<i>Islet-specific glucose-g-phosphatase catalytic subunit-related protein</i>
IL-1 β	Interleukina 1 β
INGAP	<i>Islet-associated neogenesis protein</i>
IFN γ	Interferón γ
Isl-1	<i>Isl-1</i>
ITSFn	Medio con Insulina-Transferrina-Selenio-Fibronectina
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos
KRB	Tampón Krebs-Ringer-Bicarbonato
LB	Luria-Bertani
LIF	Factor inhibidor de leucemia
LIM	Genes Lin-11 Isl-1 y Mec-3
MafA, MafB	Proteína A de la familia oncogen músculoaponeurotico fibrosarcoma
MBP	<i>Myelin-binding protein</i>
MCI	Masa Celular Interna
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
Min	Minutos
MOPS	Ácido-3-(N-morfolino) propanosulfónico
N-200	Neurofilamento 200
NADH, NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida
Nest	Nestina
NeuroD1	<i>Neurogenic Differentiation factor 1</i>
Ngn3	Neurogenina 3
NP-40	Nonidet P-40
Oct-4	Factor de transcripción de unión a octámero
Pax4, Pax6	<i>Paired box gene</i>
PBS	Tampón fosfato salino
Pbx1	<i>Pre-β-cell leukemia transcription factor 1</i>
PC2, PC3	Proteína Convertasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pdx-1	<i>Pancreatic and duodenal homeobox factor 1</i>
PFA	Paraformaldehído
PGK	3-Fosfoglicerato kinasa
Pi	Fosfato inorgánico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PP	Polipéptido Pancreático
PTD	Domnios de Transducción de Proteínas
Ptf1a	<i>Pancreas specific Transcription Factor 1a</i>
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RT	Temperatura ambiente
RT-PCR	Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa
SCNT	<i>Somatic Cell Nuclear Transfer</i>

SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
Seg	Segundos
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>
SLO	Estreptolisina-O
SPC	Proteína C surfactante
SSEA	Antígenos embrionarios específicos de estadio
TAE	Tris-Acético-EDTA
TBE	Trizma base-ácido bórico-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina
TFB I, TFB II	Tampón transformante de bacterias
TH	Tirosina hidroxilasa
TNE	Tris Base-NaCl-EDTA
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TRITC	Isotiocianato de tetrametil-rodamina
TrkA	<i>Tyrosine kinase A</i>
UTP	Uridina trifosfato
VEGF-A	Factor de crecimiento del endotelio vascular A
X-Gal	5-bromo-4-cloro-indolyl- β -galactopiranosido





INTRODUCCIÓN

1. Desarrollo y función de la célula β pancreática.

1.1. Formación del endodermo.

El endodermo se define clásicamente como la capa más interna de las tres capas embrionarias de los metazoos y de esta manera es la que da lugar al revestimiento interno del intestino y sus órganos asociados (Stainier, 2002). Hay cuatro tipos de endodermo durante el desarrollo embrionario: el embrionario, el definitivo, el primitivo y el extraembrionario, que han sido muy estudiados en el modelo de ratón cuya gestación dura 18-20 días.

Durante el desarrollo embrionario, en el día 3.5 en ratón y 7 en humanos, el embrión se halla en la fase de blastocisto (Soria, B et al, 2003). En ella hay unas 200 células, divididas en dos tipos: las células de la masa celular interna (MCI), las cuales están englobadas en el interior de otra estructura celular denominada trofoblasto. Durante el desarrollo, las células de la MCI darán lugar a una estructura embrionaria formada por dos capas, el mesendodermo y el ectodermo, estando los progenitores del endodermo en la parte posterior del epiblasto (Tam et al., 2003). El mesendodermo pasará a diferenciarse durante la gastrulación (días 6-7.5) en mesodermo y endodermo. A partir de este endodermo embrionario se originará, mediante la acción de determinadas señales reguladoras intercelulares que modularán determinados programas de transcripción, el endodermo definitivo. El endodermo embrionario es una capa gruesa de unas 500 células que aparece a día 7.5 en la parte externa del embrión y que al invaginarse da lugar a un tubo a día 8.5, que será el endodermo definitivo. De esta forma, el endodermo se convierte en la capa germinal más interna que se origina durante la gastrulación y que dará lugar al estómago, intestino, hígado, pulmones y páncreas.

Por otra parte, las células del trofoblasto darán lugar al trofoectodermo, a partir del cual se obtienen el endodermo primitivo que se desarrollará posteriormente en endodermo extraembrionario (saco vitelino). Por ello y a modo de resumen, las células de la MCI darán lugar a todos los tejidos del futuro organismo

(incluida la línea germinal), mientras que del trofoblasto derivarán la placenta y los tejidos de sustentación en el útero.

1.2. Organogénesis del páncreas.

Hay cuatro fases fundamentales en la formación de órganos a partir del endodermo (Wells and Melton, 1999):

- Aparición del endodermo durante la gastrulación (día 7.5)
- Formación del tubo primitivo (día 8.5)
- Aparición de yemas específicas de cada órgano (días 9.5-10.5)
- Diferenciación de tipos celulares específicos de cada órgano en dichas yemas (día 14.5)

La especificación de la región del páncreas en el ratón comienza el día 7.5 del desarrollo embrionario, cuando las señales de mesodermo y ectodermo establecen el patrón antero-posterior del endodermo definitivo, que se ha invaginado formando un tubo, tal y como se ha comentado anteriormente (Wells and Melton, 2000). En este sentido, el páncreas aparece en 2 regiones de dicho tubo: la dorsal (de donde deriva el páncreas endocrino) y la ventral con un doble destino (páncreas exocrino e hígado). Por ello, los tejidos y estructuras que rodean el endodermo van a interactuar con éste para promover la diferenciación pancreática.

De esta forma, la notocorda que deriva del propio mesodermo permanece en contacto con el endodermo desde el día 7.5 hasta el día 9.5. A lo largo de este periodo de tiempo, la notocorda se va desplazando y separando del endodermo por la fusión de la aorta dorsal. Durante este tiempo de contacto de la notocorda, las señales secretadas por ésta como son la activina βB y el FGF2 (fibroblast growth factor), son cruciales para la obtención de células endodérmicas que están destinadas a formar las yemas pancreáticas (Kim and Hebrok, 2001). Estas señales promueven la expresión del factor de transcripción Pdx-1 en el epitelio pancreático, gracias a la inhibición de la proteína Sonic Hedgehog (Shh). Shh induce la diferenciación de todos los órganos que derivan del endodermo

(estómago, hígado, bazo, etc), a excepción del páncreas. El desplazamiento de la notocorda por acción de la aorta dorsal coincide con la aparición de yemas específicas de cada órgano.

Las señales liberadas por el mesénquima (de origen mesodérmico) que rodea las yemas pancreáticas también son importantes durante el desarrollo pancreático, ya que participan en la determinación hacia páncreas endocrino y exocrino. En este contexto, entraría la ruta de señalización de TGF- β (transforming growth factor) con sus respectivos ligandos como activinas y TGF- β 1, sus antagonistas como la folistatina, noggin y gremlin, los receptores correspondientes y los factores intracelulares de la familia Smad. Los ligandos de esta ruta (activinas y TGF- β 1) favorecerían la formación de páncreas endocrino, en concreto célula β y PP, mientras que los antagonistas (folistatina) favorecerían la diferenciación hacia exocrino (Chakrabarti and Mirmira, 2003).

En este proceso de diferenciación hacia páncreas exocrino y endocrino también juega un papel importante la ruta de señalización de Notch, que interesantemente también juega un papel prominente durante la diferenciación neuronal. Esta ruta controla la proliferación y la diferenciación endocrina-exocrina en el páncreas en desarrollo. Notch es un receptor de membrana que tras su unión a ligandos del tipo Delta, es internalizado en la célula, procesado proteolíticamente y traslocado al núcleo donde activa, junto con otros factores, la transcripción de hes-1. Hes-1 es un represor transcripcional que inhibe la expresión del factor de transcripción neurogenina-3 (necesario para la expresión de Delta y de Neuro-D). Por el contrario, el bloqueo del receptor Notch en progenitores pancreáticos tempranos da lugar a una expresión alta de Ngn3, la cual promueve la diferenciación endocrina temprana a expensas de la proliferación pancreática. De esta manera, la modulación de la ruta Notch es esencial para prevenir la diferenciación prematura de los progenitores pancreáticos, permitiendo además el mantenimiento de una población de precursores pancreáticos (Edlund, 2002).

Por otro lado, la aorta dorsal que entra en contacto con el páncreas, tras desplazar a la notocorda, el día 9-10 también libera señales importantes en este proceso. Así, se ha observado que sólo la porción de endodermo en contacto con

la aorta evoluciona a rudimento pancreático, expresando el factor de transcripción Pdx-1. Los factores liberados por las células endoteliales son por el momento desconocidos, pero son claves para inducir determinados genes pancreáticos. Al mismo tiempo, las células de los rudimentos pancreáticos liberan factores angiogénicos, como VEGF-A, que favorecen la vascularización del páncreas al mismo tiempo que éste se va formando.

A partir del día 12, las zonas dorsal y ventral del páncreas se fusionan. Como ya se ha señalado, el páncreas dorsal dará lugar al páncreas endocrino, mientras que el páncreas ventral originará el páncreas exocrino. Por su posición, es obvio deducir que el páncreas ventral escapa de las señales reguladoras producidas por la notocorda y la aorta dorsal. La inhibición de Shh se consigue en este caso particular por las señales liberadas por el mesodermo cardiaco, como por ejemplo FGF2. En este caso, los factores de origen endotelial vienen proporcionados por las venas vitelinas que son las que establecen el contacto con el páncreas ventral (Habener et al., 2005; Schwitzgebel, 2001; Servitja and Ferrer, 2004).

Finalmente, el desarrollo culmina con la aparición de las distintas unidades funcionales para los 2 tipos de páncreas. La unidad funcional del páncreas endocrino son los islotes de Langerhans, y la del páncreas exocrino los acinos que liberan enzimas digestivas (proteasas, lipasas y nucleasas). También hay que señalar la presencia del epitelio ductal (también derivado de la región ventral), altamente ramificado y encargado de transportar estas enzimas digestivas y los iones bicarbonato al intestino (Edlund, 2002).

El páncreas endocrino está formado por cuatro tipos celulares: α , β , δ y PP que producen respectivamente las hormonas glucagón, insulina, somatostatina y polipéptido pancreático, que son liberadas al torrente sanguíneo. Estos 4 tipos celulares forman agregados (los islotes de Langerhans) que están diseminados en el tejido exocrino (figura 1). Un páncreas humano adulto tiene un 99% de tejido exocrino y tan sólo un 1% de tejido endocrino formado por alrededor de un millón de islotes. Entre el 60-80% de las células que forman el islote son células

β , el 15-20% son células α , entre el 5-10% son células δ y menos del 2% son células productoras de polipéptido pancreático.

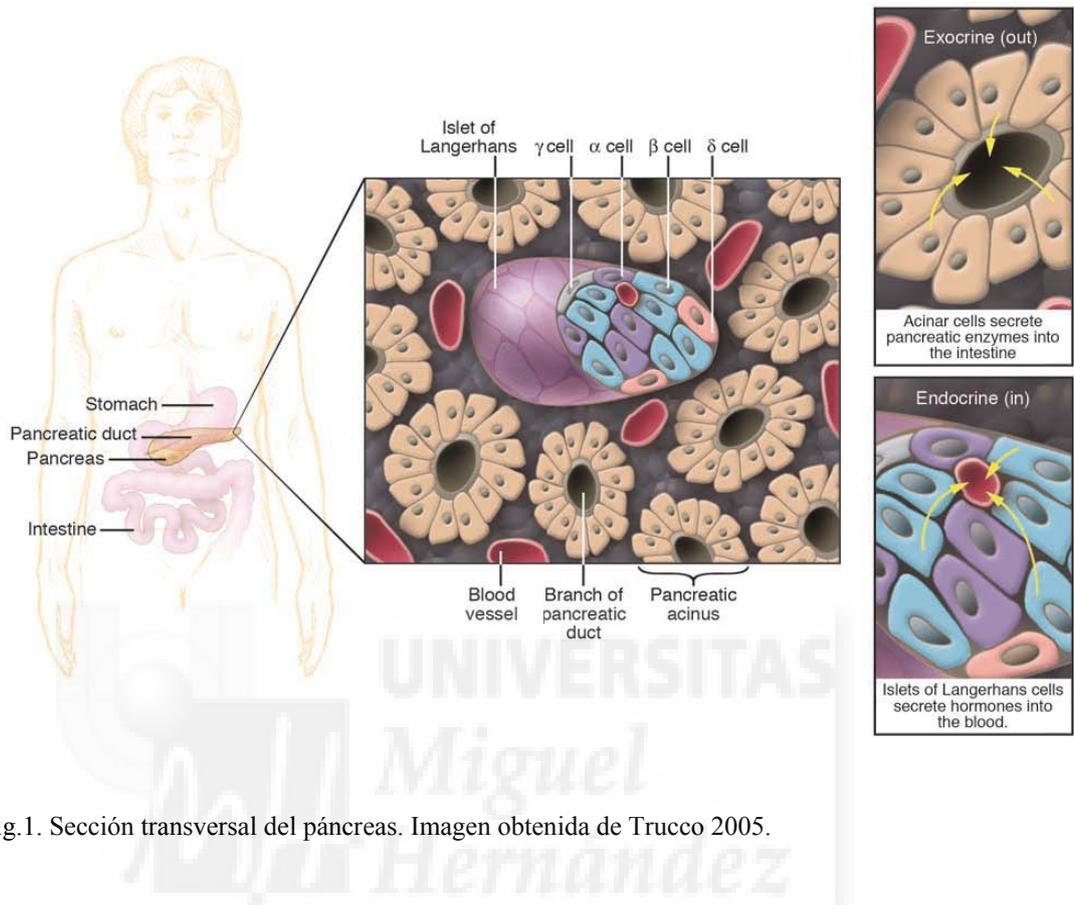


Fig.1. Sección transversal del páncreas. Imagen obtenida de Trucco 2005.

En todo este contexto, la función de los factores de transcripción pancreáticos es esencial, ya que éstos controlan tanto la habilidad de las células precursoras pancreáticas para mantener su estado indiferenciado, como también el proceso de desarrollo que lleva a la formación de las células β . Todo ello es llevado a cabo gracias a la activación específica de determinados paquetes de genes que permiten la diferenciación total a células productoras de insulina y permiten la activación génica correcta para que las células β adultas funcionen apropiadamente (Servitja and Ferrer, 2004). La identificación de estos factores ha sido un área muy activa dentro de la investigación, siendo su conocimiento necesario para poder diseñar protocolos e identificar marcadores que permitan seguir y controlar el proceso durante los protocolos de diferenciación in vitro (Edlund, 2002). Estos factores se especifican a continuación (figura 2) (Chakrabarti and Mirmira, 2003; Servitja and Ferrer, 2004):

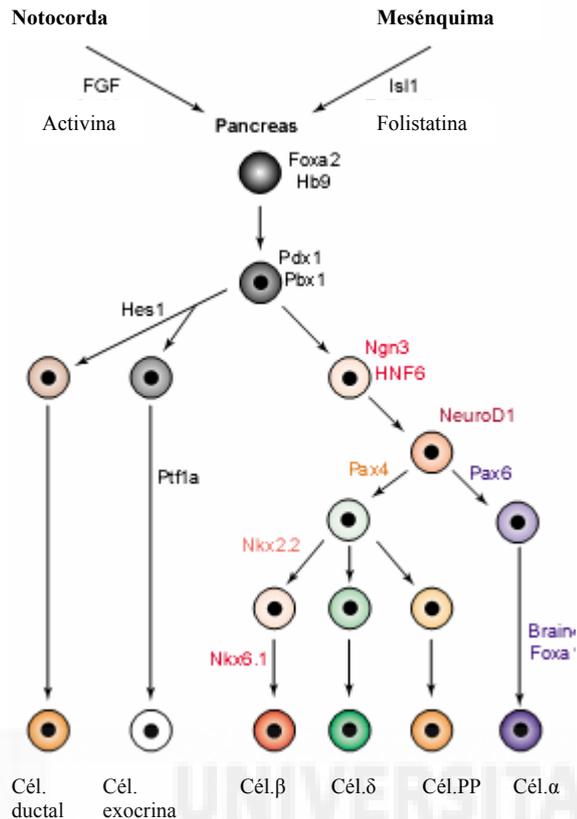


Fig.2. Rol de los factores de transcripción durante la diferenciación celular en el páncreas en desarrollo. Imagen obtenida de Chakrabarti et al (2003).

- **Formación de endodermo: factores Forkhead box.**

Los factores Foxa1 y Foxa2 (también conocidos como *hepatocyte nuclear factor 3α* (HNF3α) y HNF3β, respectivamente) se encuentran en la capa de endodermo temprano de la cual se originará el páncreas. La delección de Foxa2 en ratones transgénicos dio lugar a una disrupción severa de la formación del endodermo, indicando la importancia de este factor en estos estadios primigenios del desarrollo pancreático (Chakrabarti and Mirmira, 2003). Una disfunción controlada de Foxa2 en células madre embrionarias o células β resultó además en la ausencia de expresión o la expresión reducida de otros factores claves de este tipo celular, tales como Foxa1, Hnf1α, Hnf4α y Pdx1 (Chakrabarti and Mirmira, 2003).

- **Los factores LIM homeodomain.**

La proteína LIM homeodomain Isl1 se expresa en el páncreas en desarrollo y en el sistema nervioso central. En animales adultos Isl1 se expresa en todas las células del islote pancreático. Isl1 se requiere para el desarrollo del mesénquima de páncreas dorsal y para diferenciar el epitelio pancreático dorsal hacia células endocrinas (Habener et al., 2005).

- **Morfogénesis pancreática: los factores homeobox.**

El factor de transcripción homeobox Pdx1 (*pancreatic and duodenal homeobox factor 1*), también conocido como Ipfl, Stf1 o Idx1, se sintetiza en el rudimento temprano que comprende las yemas pancreáticas, además del epitelio del intestino que hay alrededor. Es el primer factor de transcripción que aparece en el páncreas, lo hace a día 8.5 en una banda estrecha del tubo primitivo de endodermo (Habener et al., 2005). Pdx1 juega un papel clave en el desarrollo temprano del páncreas pues su delección en ratones transgénicos resulta en embriones que carecen de páncreas. Aunque se forman las yemas pancreáticas no se da la morfogénesis definitiva ni la diferenciación (Chakrabarti and Mirmira, 2003).

También se ha observado que es un factor regulador específico de las células β y δ para la expresión transcripcional de los genes de la insulina y la somatostatina. De hecho, la expresión de Pdx-1 en la célula β adulta es esencial en el control de la expresión génica de insulina, en respuesta a la glucosa (Schwitzgebel, 2001). Además, este factor transcripcional también regula la expresión de otros genes específicos del islote, incluyendo Glut-2, IAPP (islet amyloid polypeptide) y glucoquinasa (Habener et al., 2005).

Pbx1 (*pre- β -cell leukemia transcription factor 1*) participa en el crecimiento de las yemas pancreáticas en virtud de su interacción con Pdx1.

El factor homeobox Hb9 se sintetiza en el endodermo de las yemas ventrales y dorsales justo antes de la expresión de Pdx1. Aunque la disfunción del gen que

codifica Hb9 (Hlxb9) no afecta significativamente la expresión de Pdx1 en la yema ventral, no hay expresión de Pdx1 en la yema dorsal afectando severamente la morfogénesis de dicha yema (Chakrabarti and Mirmira, 2003; Schwitzgebel, 2001). La presencia de Hb9 se requiere para la formación del páncreas dorsal y para terminar la diferenciación y maduración de la célula β .

- **Diferenciación de células endocrinas versus células exocrinas: los factores basic helix-loop-helix.**

El que una célula se comprometa en el linaje endocrino o exocrino depende de la síntesis de diferentes factores de transcripción, como son Ngn3 (neurogenina 3), Hes1 (hairy and enhancer of split 1) y NeuroD1 (neurogenic differentiation 1).

La expresión de Ngn3 es evidente justo antes de la proliferación de células endocrinas el día 13.5 y el gen se coexpresa con otros marcadores de células endocrinas (Pax6, Nkx2.2, y Nkx6.1). La expresión de Ngn3 empieza en los días 9-9.5, con un pico de expresión en el día 15.5, coincidiendo con la génesis de células endocrinas, antes de disiparse totalmente (Schwitzgebel, 2001; Servitja and Ferrer, 2004).

Los ratones transgénicos a los que les falta Ngn3 no tienen células endocrinas pancreáticas, indicando que Ngn3 no es sólo un marcador de progenitores sino también un efector esencial (Servitja and Ferrer, 2004). Además, los ratones Ngn3^{-/-} no expresaron mRNA de Pax4, sugiriendo que Pax4 es también una diana directa de Ngn3. Durante la embriogénesis Pax4 se expresa sólo transitoriamente en progenitores. Su función es subespecificar el tipo celular β entre el conjunto de progenitores endocrinos. Todas las células endocrinas expresan transitoriamente Ngn3, aunque se considera que la diferenciación a células α es el programa de diferenciación por defecto en ausencia de otros factores más específicos. Por todo ello, se considera que Ngn3 es un potente marcador de la población de células precursoras del islote, siendo un modulador esencial en la diferenciación a células endocrinas (Habener et al., 2005; Schwitzgebel, 2001; Servitja and Ferrer, 2004).

En cambio, la expresión de Hes1 durante este período se da en células no endocrinas. Estudios en ratón sugieren que las células que expresan Ngn3 se comprometen al programa de diferenciación endocrina, mientras que aquellas que expresan Hes1 (un potente represor de la expresión de Ngn3) derivan hacia células no endocrinas.

NeuroD1/Beta2 es otro factor de transcripción bHLH que regula la supervivencia y la diferenciación terminal de las células β . La expresión se da a día 9.5, colocalizando con la expresión de glucagón. El día 14.5 la expresión aparece en el epitelio ductal y sus alrededores, y hacia el día 17.5 la expresión se restringe a los islotes (Habener et al., 2005).

HNF6 juega un papel de control de la expresión temprana de Ngn3. Se expresa a día 9.5 en las células epiteliales del páncreas que se destinan a formar el islote, pero después su expresión se restringe a las células exocrinas y ductales, para desaparecer al final de la gestación (Schwitzgebel, 2001). Los ratones que carecen de HNF6 desarrollan muy pocos islotes al nacer y la expresión de Ngn3 y la presencia de células endocrinas durante el desarrollo está reducida significativamente (Chakrabarti and Mirmira, 2003; Servitja and Ferrer, 2004)

Ptf1a/P48 es un factor de transcripción del tipo bHLH, se detecta en el páncreas en desarrollo en el día 12 y se expresa en progenitores ductales, endocrinos y exocrinos. Los ratones que carecen del P48 mueren al poco de nacer y no tienen tejido exocrino detectable (Habener et al., 2005).

- **Diferenciación entre células α y β : factores paired homeobox.**

Una vez que las células se han dirigido hacia el linaje endocrino, se necesitan señales adicionales para diferenciar las células a los distintos tipos celulares que formarán el islote, entrando en juego los factores Pax4 y Pax6.

La expresión de Pax4 se restringe al sistema nervioso central y el páncreas en desarrollo. El día 9.5 Pax4 se expresa en ambas yemas, dorsal y ventral, y en el momento del nacimiento su expresión se restringe a la célula β , aunque es

indetectable en el ratón adulto (Schwitzgebel, 2001; Servitja and Ferrer, 2004). Pax4 promueve la diferenciación de las células β y δ (Habener et al., 2005), pues los animales deficientes para Pax4 carecen totalmente de estos linajes, mientras el número de células α se incrementa de forma significativa.

En cambio, Pax6 es importante para el desarrollo de los islotes. Pax6 se expresa en el ojo, el sistema nervioso central, la nariz y el páncreas endocrino. También se expresa en el epitelio temprano del páncreas a día 9.0 en las yemas dorsal y ventral y en las células α , β , δ y PP diferenciadas (Habener et al., 2005). Pax6 está específicamente relacionado con el desarrollo de las células α , los ratones knock out de Pax6 no llegan a formar este tipo celular. Por último, Pax6 se requiere para la regulación del número de islotes y su morfología (Schwitzgebel, 2001).

Por tanto y en conclusión, los ratones deficientes para Pax4 no desarrollan células β y δ (Sosa-Pineda et al., 1997), mientras los deficientes en Pax6 no llegan a desarrollar células α .

- **Diferenciación final de las células β : los factores NK homeobox.**

Los factores Nkx2.2 y Nkx6.1 son cruciales para dirigir la diferenciación hacia células β . Nkx6.1 se expresa ampliamente en el páncreas hasta el día 10.5, pero al final de la gestación se expresa exclusivamente en células β . Parece ser que Nkx6.1 se requiere para la expansión y la diferenciación final de los progenitores de célula β (Schwitzgebel, 2001). Una disfunción controlada de Nkx6.1 en ratones conduce a prácticamente la ausencia de células β .

En cambio, Nkx2.2 se expresa a día 9.5 en toda la yema pancreática y en el islote maduro en las células α y PP, además de las células β . Los ratones deficientes de Nkx2.2 desarrollan un número reducido de células α y PP, pero no células productoras de insulina. Este factor de transcripción se requiere para terminar la diferenciación de células β , además de controlar el mantenimiento de la expresión de Nkx6.1 (Schwitzgebel, 2001).

Aunque Nkx2.2 está presente en el epitelio pancreático previamente a la activación de Ngn3, su primera función esencial no es hasta la fase inmediatamente posterior a Ngn3. La inactivación de Nkx2.2 da lugar a células similares a las endocrinas a las que les falta insulina o Glut2 pero expresan otros marcadores endocrinos como la amilina e Isl1, lo cual sugiere que el proceso de diferenciación endocrina se bloquea, se desvía o no se completa en su totalidad. En cambio la inactivación del otro factor de transcripción homeodomain Nkx6.1 resulta en la reducción del número de células productoras de insulina (Servitja and Ferrer, 2004).

- **Factores de transcripción que regulan la función de la célula β .**

Además del papel de los factores de transcripción en el páncreas en desarrollo, muchos de los factores anteriormente mencionados tienen una función adicional en la célula β totalmente diferenciada.

Como ya se ha comentado, además de su función clave en la organogénesis temprana, Pdx1 es también un regulador clave de las células β diferenciadas. Poco después de la fase Ngn3+, Pdx1 presenta un pico en las células productoras de insulina y permanece altamente expresado durante la vida adulta. La disfunción del gen Pdx1 en células β maduras conduce a un fenotipo diabético debido a la expresión defectuosa de genes diana de este factor, tales como son la propia insulina, IAPP, Nkx6.1 y Glut2 (Servitja and Ferrer, 2004).

MafA y MafB son factores de transcripción reconocidos como importantes en el desarrollo de la lente del ojo. Durante el desarrollo pancreático MafA se expresa en células β a día 14 y en las células α a día 15 (Habener et al., 2005). Aunque por ahora su función es desconocida, juega un papel clave en la expresión del gen de la insulina conjuntamente con Pdx1.

1.3. Función de la célula β .

La función principal de las células β es la síntesis y la liberación controlada de insulina, siendo la única hormona con efecto hipoglucemiante que produce el

organismo. La insulina es una hormona de naturaleza proteica con un peso molecular aproximado de 6 KDa. Está formada por 2 cadenas polipeptídicas, la cadena A formada por 21 aminoácidos, y la cadena B constituida por 30. Estas cadenas están conectadas por 2 enlaces disulfuro intermoleculares entre los aminoácidos 7 de cada una de las cadenas y el 20 de la A con el 19 de la cadena B, además de un enlace intramolecular en la cadena A entre los aminoácidos 6 y 11.

La insulina se sintetiza como una preprohormona que es procesada tras su traducción para dar una molécula biológicamente activa. El producto inmediato de la traducción del ARNm de la proinsulina es un péptido de 11.5 KDa, llamado preproinsulina. La síntesis proteica se inicia en el citosol. La preproinsulina consta de un péptido señal de 24 aminoácidos, seguido de la cadena B, un péptido conector (péptido C) que contiene cerca de 30 aminoácidos y la cadena A (figura 3). La preproinsulina recién sintetizada y empaquetada, es procesada durante su viaje a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. El péptido señal dirige el transporte de la proteína desde los ribosomas hacia el interior del retículo endoplásmico. Este proceso se lleva a cabo a través de la interacción con una partícula de reconocimiento citosólica (SRP), la cual causa una asociación del complejo proteína-ribosoma, con el receptor SRP presente en el retículo endoplásmico. Durante esa transferencia una peptidasa elimina el péptido señal, convirtiendo la preproinsulina en proinsulina. La proinsulina es transportada desde el retículo endoplásmico hasta las cisternas del cis-Golgi. De allí viaja por todo el aparato de Golgi hasta llegar a las cisternas del trans-Golgi, donde se forman los gránulos de secreción. La proinsulina es el precursor de la insulina, siendo en este estadio una cadena polipeptídica de 9 KDa aproximadamente. La conversión definitiva de proinsulina a insulina y péptido C tiene lugar en el complejo de Golgi, en concreto dentro de los gránulos secretorios inmaduros, de pH ligeramente ácido, por efecto de dos endopeptidasas (PC3 y PC2) y la carboxipeptidasa H. El corte produce 2 péptidos, insulina madura y péptido C, y ambos son secretados a la vez durante el proceso exocitótico.

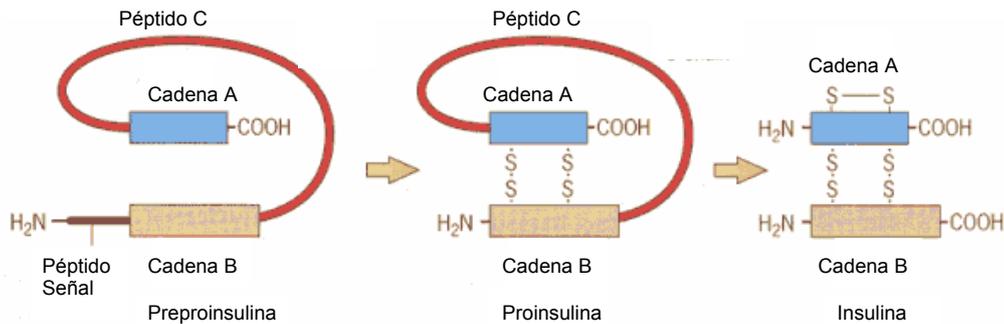


Fig.3 Estructura esquemática de la preinsulina y su procesamiento hasta convertirse en insulina madura.

La célula β libera insulina en respuesta a un aumento de los niveles de azúcar en sangre tras la ingesta de alimentos. La hormona regula a su vez de forma directa o indirecta la incorporación del azúcar a los tejidos diana (hígado, músculo y tejido adiposo). En cambio, la secreción de glucagón se estimula a bajos niveles de azúcar, favoreciendo de esta forma la glucogenolisis y la gluconeogénesis en tejidos muscular y hepático (Edlund, 2002). La insulina ejerce efectos antagónicos, de esta forma la hormona previene la glucogenolisis y la gluconeogénesis en hepatocitos. Además, en células musculares la insulina incrementa el consumo de glucosa y estimula su conversión en glucógeno. Finalmente, en las células adiposas, la insulina promueve la conversión de glucosa en glicerol y ácidos grasos para formar triglicéridos, además de prevenir la lipólisis.

El mayor inductor de la secreción de insulina es la glucosa, que provoca la liberación de la hormona a elevadas concentraciones (sobre 7-10 mM). Además, otros nutrientes de la dieta son capaces de potenciar esta secreción en presencia de glucosa, como son ciertos aminoácidos (leucina y glutamina) y ácidos grasos. La secreción de insulina está también modulada por diferentes hormonas liberadas por el estómago, el intestino y células adyacentes del islote, así como diversos neurotransmisores (Lang, 1999).

La inducción del proceso secretor por parte de la glucosa requiere la entrada del azúcar en la célula β pancreática y su metabolismo hasta piruvato a través de la ruta glucolítica citosólica. En este proceso juegan un papel esencial el

transportador de glucosa GLUT-1 (humanos) o GLUT-2 (roedores) y la enzima glucoquinasa, que permiten un equilibrio rápido entre la glucosa extra e intracelular y su metabolismo rápido en la glucólisis. El piruvato resultante entra en la mitocondria y altera la relación ATP/ADP que conduce al cierre de los canales de K^+ sensibles al ATP. Esto da lugar a la despolarización de la membrana y la abertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. El subsiguiente aumento en el Ca^{2+} libre citosólico induce la secreción de insulina interaccionando con diversas dianas, entre las que hay que destacar proteínas localizadas en la superficie de los gránulos de secreción o determinadas isoformas de la proteína kinasa C.

Además tal y como se ha señalado, la secreción de insulina está regulada también por numerosas hormonas y neurotransmisores, mediante la activación de rutas de señalización alternativas. Por ejemplo la acetilcolina (neurotransmisor) y colecistokina (hormona intestinal) promueven la ruta de los fosfoinositoles-fosfato, induciendo la movilización de Ca^{2+} de sus almacenes intracelulares y resultando en la activación de la proteína kinasa C. Otras hormonas, entre las que se incluye el glucagón-like peptide-1 (GLP-1) o péptido análogo al glucagón (secretado por células endocrinas intestinales), actúa elevando los niveles de cAMP y activando la proteína kinasa A.

La secreción de insulina también puede ser regulada por diferentes compuestos químicos y agentes farmacológicos. Así por ejemplo, las sulfonilureas inactivan los canales de K^+ sensibles al ATP, induciendo así la secreción de insulina incluso a baja concentración de glucosa. Estos fármacos, se están utilizando con éxito en el tratamiento de la diabetes tipo 2, en pacientes detectados a tiempo. Otro ejemplo de agente químico modulador de la secreción de insulina sería la nifedipina, un bloqueador de los canales de Ca^{2+} , resultando en una inhibición de la liberación de insulina a concentraciones inductoras de glucosa (Henquin, 2000).

2. Diabetes mellitus.

La diabetes mellitus es “un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por un nivel alto de glucosa en sangre debido a defectos en la secreción de insulina, o a la acción de la insulina sobre los tejidos diana o ambos” (Eiselein et al., 2004).

La diabetes es una de las enfermedades crónicas más comunes en los países industrializados. En 1995 la Organización Mundial de la Salud (OMS) calculaba que había 135 millones de adultos en el mundo con diabetes, y que en el año 2025 se alcanzarán los 300 millones, correspondiendo la mayoría a países en desarrollo (Fujimoto, 2000; King et al., 1998).

Hay dos tipos principales de diabetes: la diabetes tipo 1, caracterizada por la destrucción selectiva autoinmune de células β productoras de insulina, y la diabetes tipo 2, caracterizada por la resistencia a la insulina y una disfunción de la célula β , llegando a la muerte de la misma por mecanismos apoptóticos.

Además durante el curso de la enfermedad surgen las conocidas complicaciones diabéticas, como consecuencia de la elevada glucemia. De esta forma, se ha demostrado que una hiperglucemia crónica favorece la glucosilación de proteínas en diversos tejidos provocando ceguera, nefropatía, neuropatía, además de problemas cardiovasculares.

2.1. Diabetes tipo 1.

La diabetes tipo 1 es una enfermedad conocida desde hace mucho, que ya fue documentada en textos egipcios y griegos. La diabetes tipo 1 afecta aproximadamente al 10% de todos los casos de diabetes mellitus (Eiselein et al., 2004; Zimmet et al., 2001) dándose en individuos jóvenes, con un pico de incidencia alrededor de los 14 años. Es una enfermedad autoinmune, mediada por los linfocitos T y caracterizada por la destrucción específica de las células β de los islotes de Langerhans. El origen de la enfermedad no se conoce

exactamente, aunque se cree que es una combinación de factores ambientales en individuos genéticamente predispuestos. El gen que podría ser el responsable estaría localizado en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) HLA-II (en humanos). Los factores ambientales que se han propuesto como relacionados con el desencadenamiento de la diabetes tipo 1 son de origen viral, factores tóxicos y nutricionales. Existen varios tipos de virus como el Coxsackie B4 o el citomegalovirus que pueden promover reacciones autoinmunes y en los que determinados determinantes antigénicos coinciden con antígenos de superficie presentes en las células β . Sin embargo, no se ha logrado demostrar con rotundidad una relación directa entre la infección por estos virus y el desarrollo de la diabetes. Por otro lado, la exposición a toxinas como los nitratos y nitritos a través de la dieta, así como a especies de *Streptomyces* que producen estreptozotocina, un agente diabetogénico, o la administración a ciertos fármacos como la pentamidina, la L-asparaginasa o la bafilomicina A1 también serían ejemplos de factores tóxicos relacionados con la diabetes. Como en el caso de los virus, no se ha encontrado la relación directa entre estos agentes y el desarrollo de la enfermedad. Por último y dentro de los factores nutricionales, se ha postulado que la introducción temprana de la leche de vaca en las dietas de los lactantes, generaría respuestas inmunológicas a determinadas proteínas presentes en este alimento, que podrían a posteriori iniciar una respuesta autoinmune hacia ciertas proteínas del propio islote, como por ejemplo la insulina. Al igual que se ha comentado anteriormente, todavía faltan evidencias directas que relacionen ambos hechos.

La diabetes tipo 1 presenta 2 fases en su desarrollo: la insulinitis, caracterizada por la invasión de los islotes por los linfocitos T, y en segundo lugar el ataque y destrucción de las células β , con la consiguiente carencia de insulina (Roche, 2005). El diagnóstico se realiza tras la aparición de varios síntomas típicos por la carencia de la hormona, ya que la glucosa no entra en las células y se queda en concentraciones elevadas en circulación, generando hiperglucemia. La cantidad de azúcar circulante es tan elevada que el riñón no puede retenerla y se pierde por la orina junto con agua (poliuria). Las pérdidas excesivas de agua se compensan con una ingesta aumentada (polidipsia), apareciendo más pronto la sed como resultado del estado hiperosmolar. También se tiene una sensación

aumentada de hambre que se compensa con una ingesta excesiva (polifagia). Sin embargo, las pérdidas de peso son evidentes a causa del catabolismo de las grasas y proteínas (cetoacidosis) al no poder utilizar los azúcares como fuente primaria de energía metabólica. La cetoacidosis se produce al usar los ácidos grasos para producir ATP, debido a que las células no pueden disponer de la glucosa, y la acumulación de excedentes de acetil-CoA que derivan a cuerpos cetónicos. Éstos pasan a circulación, provocando una disminución del pH sanguíneo. Esta situación puede repercutir negativamente en tejidos que dependen enteramente de la glucosa para su funcionamiento, como es el caso del cerebro, pudiendo evolucionar a un cuadro de pérdida del conocimiento y de la función cerebral (coma diabético), que precede a la muerte del enfermo sino se le suministra la insulina con urgencia (Eiselein et al., 2004; Halvorsen and Levine, 2001).

2.2. Diabetes tipo 2.

La diabetes tipo 2 es el tipo más frecuente, dándose en el 90% de los casos aproximadamente. En este tipo de diabetes el origen de la hiperglucemia está en el desajuste entre secreción de insulina (disfunción de la célula β) y acción de la misma sobre los tejidos diana (resistencia a la insulina) (Fujimoto, 2000; Halvorsen and Levine, 2001; Kahn, 2003).

La insulina favorece la entrada de la glucosa en determinados tejidos y facilita su acumulación en el hígado y el músculo, en forma de glucógeno. Sin embargo en situaciones de resistencia a la insulina, la hormona no es capaz de reducir los niveles de glucosa en sangre, ya que no es reconocida por los tejidos diana (músculo esquelético y tejido adiposo) que van a ser incapaces de incorporar y metabolizar el exceso de azúcar circulante. Además, en esta situación el hígado activa la ruta gluconeogénica, incrementando la glucemia, proceso que también escapa al control de la insulina en los enfermos con diabetes tipo 2. Durante un cuadro de resistencia a la insulina, el exceso de glucosa debería transformarse en ácidos grasos durante la lipogénesis en el adipocito: Sin embargo, la “ceguera” a la insulina inhibe la lipogénesis y activa en contrapartida la lipólisis. La degradación de triglicéridos conlleva la liberación de ácidos grasos y glicerol

desde el tejido adiposo hacia el torrente circulatorio. El exceso de grasa se acumula en músculo, hígado, corazón e incluso en la propia célula β pancreática. Este fenómeno, conocido como lipotoxicidad, ha sido descrito por diversos laboratorios y hace referencia a la acumulación de grasa fuera del tejido adiposo. Según los estudios de Randle en 1963 (Randle et al., 1963), los ácidos grasos compiten con la glucosa a la hora de constituir el sustrato de energía requerida por el músculo esquelético y el tejido adiposo. De esta manera, un exceso de lípidos circulantes inhibe el transporte de glucosa hasta el tejido diana y reduce la síntesis de glucógeno y metabolismo de la glucosa (glucolisis). Por ello, es muy frecuente que la diabetes tipo 2 venga acompañada de cuadros en los que existe un exceso de grasa circulante en las personas afectadas de tal forma que la enfermedad aparezca conjuntamente con obesidad, dislipemias y síndrome metabólico, todo ello asociado a una alta incidencia de enfermedades coronarias, cerebrales y arteriales periféricas (Moller, 2001).

La hiperglucemia ocasiona una hiperinsulinemia en un intento de la célula β por normalizar los niveles circulantes del azúcar. Sin embargo, se sabe que con el tiempo la célula β comienza a fallar y a secretar menos cantidad de la hormona. En este proceso, se cree que juegan un papel esencial las elevadas concentraciones de nutrientes circulantes (hipótesis de la glucolipotoxicidad). Si esto se da durante un corto período de tiempo, la célula β puede recuperarse y permitir la normalización de los niveles de glucosa en sangre, denominándose desensibilización a la glucosa. Sin embargo, la exposición prolongada y crónica de la célula β a altas concentraciones de glucosa, acaba teniendo efectos irreversibles y tóxicos, activando programas de “suicidio celular” o apoptosis que terminan, como en el caso de la diabetes tipo 1, destruyendo a las células β y afectando consecuentemente a la secreción de insulina (Kahn, 2003; Poitout and Robertson, 1996).

2.3. Tratamiento de la diabetes.

La diabetes tipo 1, sino es tratada correctamente, es una enfermedad aguda y mortal, que con el descubrimiento de la insulina por Banting y Best en 1921 (Rosenfeld, 2002) se convirtió en una enfermedad crónica. Hasta la actualidad,

la terapia con insulina exógena es el único remedio paliativo que funciona a la hora de controlar la glucemia en sangre. Sin embargo, la inyección de insulina no puede imitar la función que la propia célula β ejerce, ya que ésta es capaz de secretar la cantidad adecuada de hormona en el momento justo. Es por ello que con el tiempo los diabéticos desarrollan una serie de complicaciones asociadas, como son la nefropatía, la neuropatía, la retinopatía y alteraciones cardiovasculares.

Otra alternativa es el trasplante de páncreas total, conjuntamente con el de riñón. Sin embargo, esta técnica origina numerosas complicaciones a la hora de aplicar la inmunosupresión, y por activación incontrolada de las enzimas digestivas del páncreas exocrino. Además se requiere cirugía mayor y una hospitalización prolongada del paciente que conlleva un elevado coste sanitario. El trasplante de las estructuras que sólo producen insulina (los islotes de Langerhans) es una alternativa que se ha empezado a aplicar muy recientemente, ya que no requeriría una cirugía mayor y disminuiría el coste sanitario asociado. La mejora más reciente de esta técnica fue realizada en el año 2000 por el grupo del Dr Shapiro, en lo que se conoce como el protocolo de Edmonton (Shapiro et al., 2000). Este protocolo consiste en la optimización de protocolos anteriores, mejorando la técnica de aislamiento de islotes conjuntamente con el establecimiento de un régimen inmunosupresor libre de esteroides (sustancias con elevada actividad diabetogénica). Con este protocolo más del 80% de los pacientes lograron la independencia de la insulina durante 2 años y un 10 % llegó a más de 5 años (Roche et al., 2005a). La causa de esta bajada en la eficiencia parece ser debida a que la combinación de inmunosupresores utilizados todavía no era la adecuada y este es un punto en el que todavía hay que seguir trabajando. Por otro lado, cada trasplante de islotes necesita de 2-3 donantes por paciente, lo que limita bastante la utilización técnica, simplemente por el hecho de que no hay suficientes donantes cadavéricos para trasplantar a todos los enfermos de diabetes. Todo esto ha llevado a la búsqueda de fuentes alternativas de células β .

Aunque los enfermos de diabetes tipo 1 serían los máximos beneficiarios de estas investigaciones, no hay que olvidar que los casos más avanzados de

diabetes tipo 2 (aquellos en los que la masa de célula β se ha reducido ostensiblemente por la apoptosis), serían también serios candidatos. Sin embargo, hay que advertir que la diabetes tipo 2 está asociada al estilo de vida y a la obesidad, con lo cual, si la enfermedad se coge a tiempo, es perfectamente prevenible o mejorable con una medicación adecuada. La dieta, el ejercicio y el uso de hipoglucemiantes orales, como inhibidores de α -glucosidasa, sulfonilureas, reguladores prandiales de glucosa, glitazonas y biguanidas, pueden ayudar a reducir bastante el avance de la enfermedad.

2.4. Futuras estrategias terapéuticas para el tratamiento de la diabetes tipo 1.

2.4.1. Terapia génica.

Gracias a la terapia génica la ausencia de una función o una función anormal en una célula causada por la herencia de un gen mutado puede ser corregida mediante la introducción de una copia normal del gen correcto (Efrat, 1998). Como se ha comentado anteriormente la diabetes tipo 1 se caracteriza por la destrucción autoinmune de células β , por lo cual la modificación génica de las células β o de células del propio sistema inmune podría prevenir la aparición o el avance de la enfermedad, e incluso permitir la regeneración del páncreas. Es por ello que se proponen varias aproximaciones en las que las técnicas de terapia génica permitirían el tratamiento de la diabetes tipo 1. Por un lado, estarían las manipulaciones génicas con carácter preventivo o protector, sólo cuando el paciente tuviera la mayoría de las células β intactas. Esto implicaría genotipar prematuramente con la máxima precisión aquellos individuos susceptibles de padecer la enfermedad. Hay que señalar que actualmente no existen marcadores fiables que permitan identificar la enfermedad antes de que aparezcan sus síntomas. En segundo lugar, con terapia génica se puede promover la regeneración de células β , la producción ectópica de insulina y la ingeniería de líneas tumorales de células productoras de insulina.

En principio, la mejor estrategia, tal y como se ha comentado, pasaría por identificar a las personas con riesgo de desarrollar la enfermedad y tratarlas. Si

se identificaran las dianas antigénicas que tienen un papel importante en el inicio de la respuesta autoinmune, podría desarrollarse una inmunoterapia por la inducción de la tolerancia específica a esos antígenos mediante manipulaciones génicas a nivel de los linfocitos T. También podrían manipularse los genes que incrementan la resistencia de las células β a los ataques autoinmunes. En este sentido se conoce que el mecanismo responsable de la destrucción autoinmune de las células β está relacionado con la inducción de la apoptosis por citoquinas como la interleukina 1β (IL- 1β), interferón γ (IFN γ) o el factor de necrosis tumoral o “*tumor necrosis factor α* ” (TNF α). De esta forma, la sobreexpresión de genes antiapoptosis a la acción de estas citoquinas podría aumentar la supervivencia de la célula β , que está sufriendo el ataque autoinmune. Sin embargo, la transferencia del material génico al interior celular es de una extrema complejidad técnica, no existiendo por el momento vehículos virales o no virales que puedan ejercer dicha función in vivo y de forma específica en la propia célula β .

Otra posible estrategia sería la regenerar los islotes que todavía estuvieran intactos, bien estimulando su división, o bien estimulando la división y diferenciación de células precursoras pancreáticas (Bouwens and Kloppel, 1996; Dudek et al., 1991; Grapin-Botton, 2005; Madsen et al., 1996; Paris et al., 2004; Slack, 1995). En modelos experimentales de roedores en los que se induce daño pancreático por ligación de los ductos, pancreatectomía, envolviendo el páncreas en celofán, o administrando estreptozotocina, se observa un aumento en la actividad mitótica de los ductos y una regeneración limitada del páncreas (Bonner-Weir and Sharma, 2002). Esta actividad podría potenciarse transfiriendo genes que codificaran factores implicados en la diferenciación de los ductos a islotes. Así mismo, también podrían expandirse los ductos en cultivo (ex vivo) y diferenciarlos a islotes para su posterior trasplante.

Otra alternativa sería la producción y secreción de insulina en células distintas a la propia célula β . Ello implicaría la transfección con el gen de la insulina, que como ya se ha comentado codifica la preprohormona. De ser así, sería necesario que el tejido receptor del transgen tuviera una síntesis correcta de preproinsulina, procesamiento de la proinsulina, almacenamiento de la insulina madura y secreción

regulada de la misma. La expresión del gen puede conseguirse en diversos tejidos, ahora bien su procesamiento correcto a la forma fisiológicamente activa de la hormona, es el paso limitante.

Por último estaría la ingeniería de líneas tumorales de células β (insulinomas). Esta estrategia parece en principio más fácil de acometer que la aproximación anterior, ya que facilitaría la manipulación génica *in vitro*. Sin embargo, el implante de estas células plantearía nuevos problemas, siendo el principal la capacidad de generar tumores debido a su capacidad proliferadora. El rechazo inmunitario y el lugar de implante son también cuestiones claves a considerar en este respecto.

En resumen, la terapia génica no parece ser una estrategia que pueda satisfacer las necesidades del posible paciente tratado. La diabetes es principalmente una enfermedad poligénica y multifactorial, posiblemente muy heterogénea de unos pacientes a otros. Encontrar el “cocktail” perfecto de genes para tratar esta enfermedad resulta muy difícil dado el estado actual de los conocimientos. Las estrategias de terapia celular que se van a presentar a continuación parecen estrategias más realistas a medio y largo plazo.

2.4.2. Trasplante de islotes y páncreas entero.

Ya se ha comentado antes que esta es una de las alternativas utilizadas actualmente para paliar los efectos de la diabetes. Sin embargo, el protocolo óptimo que pueda restaurar la función perdida en el paciente no existe. En un principio, en la década de los 70 se llevaron a cabo los trasplantes de páncreas entero con un éxito muy reducido. Fue más tarde, con el aislamiento y trasplante de islotes, cuando se consiguió una ligera mejora (Bonner-Weir and Weir, 2005). Paul Lacy fue el que originalmente propuso la sustitución física de la masa de célula beta como base para el trasplante de islotes (Lacy, 1982), aunque esta técnica no se impuso hasta los años 90. A pesar de que en los últimos años se ha conseguido un mayor éxito al optimizar esta técnica (Shapiro et al., 2000) todavía hay algunos aspectos por mejorar. Por ejemplo, encontrar el régimen inmunosupresor más adecuado que minimice la respuesta inmune del receptor y

mejorar el proceso de aislamiento de los islotes, ya que sólo obtiene rendimientos del 50% en el mejor de los casos, obligando a partir de 2-3 donantes por paciente para cubrir la mínima masa celular requerida (Roche et al., 2005a; Trucco, 2005).

De todas maneras, esta técnica presenta muchas ventajas frente al trasplante del órgano completo, como se hacía tradicionalmente. El trasplante de islotes se puede llevar a cabo en 1 hora, con anestesia local y cirugía de mínima invasión. La operación se puede repetir si procede hasta 2 veces más. Como hecho significativo, se ha observado que los pacientes trasplantados en su mayoría han desarrollado menos complicaciones diabéticas que aquéllos que se inyectan insulina. En resumen, aunque queda mucho por estudiar, esta técnica supone un nexo de unión entre el trasplante del páncreas entero y el futuro trasplante de células manipuladas por bioingeniería, que sin necesidad de ser islotes podrían suplir su función perfectamente.

2.4.3. Xenotrasplantes.

Los xenotrasplantes surgen como respuesta a un problema inherente a los trasplantes de donantes humanos. Se trata de la escasez de donantes cadavéricos, que muy de lejos llegan a cubrir las necesidades de la población diabética actual. Los xenotrasplantes se realizan con islotes pancreáticos de cerdo debido a razones éticas y por su fisiología y tamaño compatibles con los del ser humano. De hecho, la insulina porcina se usó ampliamente en humanos para tratar la enfermedad antes de la irrupción en el mercado de las insulinas recombinantes. La insulina porcina sólo difiere de la humana en la posición de un aminoácido (Bretzel et al., 2004). Además, se podrían manipular genéticamente los cerdos para obtener insulina humana e incluso para disminuir el rechazo inmunitario en implantes en humanos. De hecho, se está trabajando con cerdos transgénicos que no expresen la α -1,3-galactosil-transferasa, responsable del rechazo hiperagudo en trasplantes. Sin embargo, los inconvenientes de esta técnica son que se pueden transmitir patógenos retrovirales porcinos a los receptores, como así se ha demostrado en modelos de primates trasplantados (Roche and Soria, 2004). Otra opción sería la de encapsular los islotes para evitar el ataque inmunológico,

estableciendo una barrera física de alginato que permitiera el intercambio de nutrientes y oxígeno entre el exterior y el material encapsulado (Roche et al., 2003).

Otra fuente de islotes xenogénicos serían los provenientes de páncreas porcino fetal, que tienen más proporción de tejido endocrino. Además, el tejido exocrino se atrofia durante el cultivo. El tejido fetal tiene un gran potencial de crecimiento y podría ser menos inmunogénico. Por otra parte los agregados celulares fetales similares a islotes no provocan un rechazo hiperagudo cuando son trasplantados a roedores. Parece ser que los tejidos que los rodean contienen células endoteliales que los revascularizan fácilmente, lo que los hace ideales para los ensayos clínicos de xenotrasplantes.

2.4.4. Trasplante de células productoras de insulina.

2.4.4.1. Células β procedentes de células transdiferenciadas.

La transdiferenciación podría definirse como el cambio de una célula comprometida hacia un linaje a otro linaje sin desdiferenciación previa y usando como herramienta la reprogramación. Se puede aplicar en células diferenciadas, comprometidas a un linaje o en células madre de tejidos accesibles, como por ejemplo la médula ósea. Estas células han sido extensivamente estudiadas, son pluripotentes (Ianus et al., 2003; Jiang et al., 2002) y constituyen un material óptimo para la generación de células autólogas para reparar tejidos dañados (Hess et al., 2003; Ianus et al., 2003).

Otra aproximación para la generación de células β es la transdiferenciación de células ya diferenciadas de origen endodérmico, como las células del hígado o las células endocrinas intestinales (Ber et al., 2003; Ferber et al., 2000; Fujita et al., 2004; Kojima et al., 2003). En el caso del hígado, la expresión ectópica de genes pancreáticos clave como Pdx1 o NeuroD indujo programas de expresión de genes típicos de célula β , incluyendo la expresión del gen de la insulina, en hepatocitos diferenciados o precursores de hepatocitos (Ferber et al., 2000; Kojima et al., 2003; Sapir et al., 2005; Zalzman et al., 2003). Sin embargo, la

transdiferenciación puede aplicarse también a células desdiferenciadas del tejido hepático, como es el caso de las células óvalas (Yang et al., 2002). Cuando estas células son cultivadas en un medio de alta glucosa (23 mM) así como con bajo contenido de suero (10%), se obtienen células que expresan transcritos y proteínas pancreáticas, y que sintetizan y secretan insulina en respuesta a concentraciones incrementadas de glucosa extracelular. El protocolo se ve netamente mejorado cuando las células ovas hepáticas se sometían a un tratamiento de 7 días con 10 mM nicotinamida.

Las células K o endocrinas del intestino delgado se presentan también como interesantes candidatos. En primer lugar pueden ser obtenidas mediante biopsias intestinales y poseen la maquinaria secretora en respuesta a los nutrientes que circulan extracelularmente. Sin embargo, no poseen la maquinaria para procesar la hormona adecuadamente, debiendo utilizarse análogos peptídicos de la insulina (Cheung et al., 2000).

Recientemente, se ha propuesto la transdiferenciación de monocitos sanguíneos en presencia de citoquinas (interleukina 3 y el factor estimulador de colonias de macrófagos), así como de factores de crecimiento (el epidérmico y el hepático) y nicotinamida para obtener células productoras de insulina (Ruhnke et al., 2005). Sin embargo, la cantidad de insulina producida (estimada en relación a la cantidad de péptido C liberado) dista mucho de la que produce una célula β adulta. Interesa de todas formas identificar con más detalle los precursores circulantes para poder aislarlos y manipularlos en sistemas de cultivo controlados.

2.4.4.2. Células β procedentes de células madre.

Las células madre, tanto las adultas como las embrionarias, se perfilan como una alternativa con un gran potencial para la terapia celular, tanto por su capacidad de diferenciación en diferentes tipos celulares como por su capacidad de autorenovación.

En el caso de las células madre embrionarias de ratón, la primera diferenciación al linaje pancreático realizada con éxito se llevó a cabo mediante la transfección de una construcción con un gen de resistencia a neomicina bajo el control de regiones reguladoras del gen de la insulina humana, seguido de una selección del tipo celular y una maduración dirigida (Soria et al., 2000). Sin embargo, la eficiencia de este protocolo es extremadamente baja, generando numerosos clones con un bajo contenido en insulina. A partir de entonces se han desarrollado protocolos alternativos para obtener poblaciones enriquecidas de células productoras de insulina mediante estrategias de trampas celulares (Leon-Quinto et al., 2004), manipulando las condiciones de cultivo (métodos coaxiales) (Hori et al., 2002; Kahan et al., 2003; Lumelsky et al., 2001), o mediante la expresión constitutiva de factores de transcripción clave para el funcionamiento de la célula β , como Pax4 y Pdx-1 (métodos direccionales) (Blyszczuk et al., 2004; Blyszczuk et al., 2003; Miyazaki et al., 2004).

Una alternativa a las células madre embrionarias son las células madre adultas, obtenidas de otros tejidos y derivándose en el tipo celular de interés mediante técnicas de reprogramación (ya comentado anteriormente), o bien obtenidas del propio tejido pancreático. Estas células tienen la ventaja de poseer un menor potencial tumorigénico, pues presentan una menor tasa de proliferación, y son además una fuente muy interesante de células autólogas en protocolos de trasplantes. El principal problema de estos protocolos es identificar la verdadera fuente de células progenitoras pancreáticas. Diversos grupos poseen evidencias de que ciertas células del ducto pancreático, todavía por identificar, constituirían la población de precursores de los islotes pancreáticos (Bonner-Weir et al., 2000) (Ramiya et al., 2000). Sin embargo, otros grupos no parecen apoyar estos resultados. En cualquier caso el páncreas humano debe de tener algún mecanismo de regeneración muy discreto. No es lógico pensar que nacemos con una dotación única de células β para el resto de nuestra vida. Esta es otra área de activa investigación en la actualidad.

2.4.4.3. Expansión ex vivo de células β .

Los recientes experimentos del grupo de Melton sugieren que las células β del páncreas derivan de divisiones de las células β preexistentes (Dor et al., 2004). Sin embargo, los experimentos no descartan la participación de otros progenitores pancreáticos, como los descritos en el tejido ductal y que podrían adquirir el fenotipo de célula β a través de una transición epitelio-mesenquimal (Bonner-Weir and Weir, 2005) (Grunert et al., 2003). El cultivo de estas últimas in vitro mostró por una parte expresión de marcadores mesenquimales como nestina y vimentina, y por otra de proteínas típicamente endodérmicas como amilasa, anhidrasa carbónica II y albúmina. Sin embargo, la expresión de hormonas del islote fue muy escasa, estimándose unos niveles de ARNm de insulina equivalentes al 0.01% del que expresan las células β humanas adultas. De todas formas, la utilización de células β provenientes de donantes cadavéricos y su expansión in vitro para su posterior trasplante, se enfrenta al problema de poder incrementar la tasa replicativa de estas células, que hoy por hoy es muy limitada, al menos en humanos. También habría que tener en cuenta la posible pérdida de función al maximizar la expansión y al intentar mantener la estructura tridimensional del cultivo organotípico de islotes.

2.4.5. Células β procedentes de la neogénesis.

La vida media de una célula β en condiciones normales en un adulto es de 50 días (Bonner-Weir and Sharma, 2002). Hasta ahora se conocen tres mecanismos de regeneración de las células β : replicación de células beta maduras preexistentes (quizás sea el mecanismo más habitual en adultos) (Dor et al., 2004), neogénesis de células precursoras en el islote (todavía por identificar, aunque se piensa que sean positivas a nestina) y neogénesis de células ductales (Grapin-Botton, 2005). Estas células se requerirían en las situaciones en las que aumenta ostensiblemente la demanda de insulina (obesidad y embarazo).

De todos estos mecanismos el más documentado es el proceso de diferenciación de las células precursoras ductales hacia célula β , no solo durante la etapa fetal y neonatal sino también en la adulta (Bonner-Weir et al., 2000; Paris et al., 2004).

Esta posibilidad podría explotarse para poder obtener células productoras de insulina a partir de la diferenciación dirigida in vitro de tejido ductal proveniente de donantes cadavéricos. El principal problema es conocer la identidad molecular precisa de dichos precursores, ya que hay autores que piensan que estas células serían células mesenquimales próximas a los ductos, mientras que otros argumentan que serían células localizadas en el propio epitelio ductal (Bonner-Weir and Weir, 2005; Paris et al., 2004) (Trucco, 2005) (Paris et al., 2004).

Sin embargo, el origen de las células ductales parece estar más documentado. En este sentido, se sabe que todas las células del páncreas derivan de un progenitor común que expresa Pdx1. Así los precursores ductales expresarían Pdx1 entre los días 9.5 y 11.5 del desarrollo embrionario, no coincidiendo con la expresión de este gen en los linajes endocrinos y acinares. Esto provoca que el linaje ductal siga su propia vía de diferenciación a partir del día 12.5, momento en el que se expresan las citoqueratinas como marcadores diferenciales de estas células (Grapin-Botton, 2005). Además, otros marcadores del ducto fetal serían Glut-2, TrkA y vimentina conjuntamente con citokeratina-20 (CK20) (Paris et al., 2004).

Otra alternativa que se ha barajado sería la neogénesis de células precursoras localizadas en el propio islote (Fernandes et al., 1997; Guz et al., 2001; Pang et al., 1994; Tsanadis et al., 1995). Está descrito que dentro de los islotes humanos fetales hay un tipo celular morfológicamente distinto de los ya descritos exocrinos, ductales y endocrinos, considerándolos una nueva población de precursores celulares (Tsanadis et al., 1995). También se ha observado que dicha población se diferencian cuando hay una lesión en el páncreas. De hecho, Guz y colaboradores describieron 2 poblaciones de precursores dentro de los islotes usando un modelo de regeneración pancreática, una que expresaba GLUT-2 y otra que coexpresaba somatostatina e insulina. En este contexto, muchos autores apuntan que dicha célula precursora presente en los islotes tendría un origen mesenquimal y se caracterizaría por la expresión de nestina (Hunziker and Stein, 2000; Zulewski et al., 2001). La nestina es una proteína de los filamentos intermedios identificada como marcador de células madre multipotentes precursoras neuronales. La presencia de estas células positivas a nestina en

islotos de ratón adulto, ratas y humanos y su participación en la neovascularización del islote, hace suponer que la nestina no es un marcador exclusivo de neuroectodermo, pudiendo expresarse también en ciertas células precursoras de origen mesenquimal (Paris et al., 2004) (Treutelaar et al., 2003).

La identificación de estos tipos celulares precursores en el tejido pancreático podrá abrir las puertas en un futuro al desarrollo de fármacos que puedan potenciar la regeneración de los islotes in vivo. Actualmente se conocen algunos de estos agentes que están empezando incluso a ensayarse en estudios clínicos preliminares. Por citar algunos ejemplos que estimulan la neogénesis en roedores: el “*islet-associated neogenesis protein*” (INGAP), el “*glucagon-like peptide-1*” (GLP-1) y el agonista del receptor de GLP-1 exendina 4, la combinación de betacelulina y activina A y la combinación de EGF y gastrina (Bonner-Weir and Weir, 2005). El INGAP es un fragmento peptídico de la proteína REG, cuya función se ha asociado con la regeneración de islotes y célula β en roedores. GLP-1/exendina, además de estimular la replicación de la célula β , mejoran la secreción de insulina y ejercen efectos protectores en situaciones de prediabetes por sus efectos antiapoptóticos. La betacelulina, un miembro de la familia EGF, estimula la proliferación de la célula β . Tanto la activina A, miembro de la familia TGF β , y la gastrina se piensa que promueven la diferenciación de la célula β a partir de precursores in vitro.

3. Células madre.

3.1. Concepto.

Las células madre se definen como células clonogénicas capaces de autorenovarse y diferenciarse en distintos tipos celulares. La primera característica supone la capacidad de dividirse continua e ilimitadamente dando lugar a células hijas iguales a la madre. En cambio, la segunda surge en virtud de su pluripotencialidad y hace referencia a la capacidad de diferenciación a cualquier tipo celular de los 200 que se encuentran en el organismo adulto (Figura 4). De estas dos propiedades se desprende el gran potencial de

aplicación clínica que tienen estas células, consistiendo en una fuente ilimitada de células transplantables para terapia celular en enfermedades degenerativas, como es el caso de la diabetes.

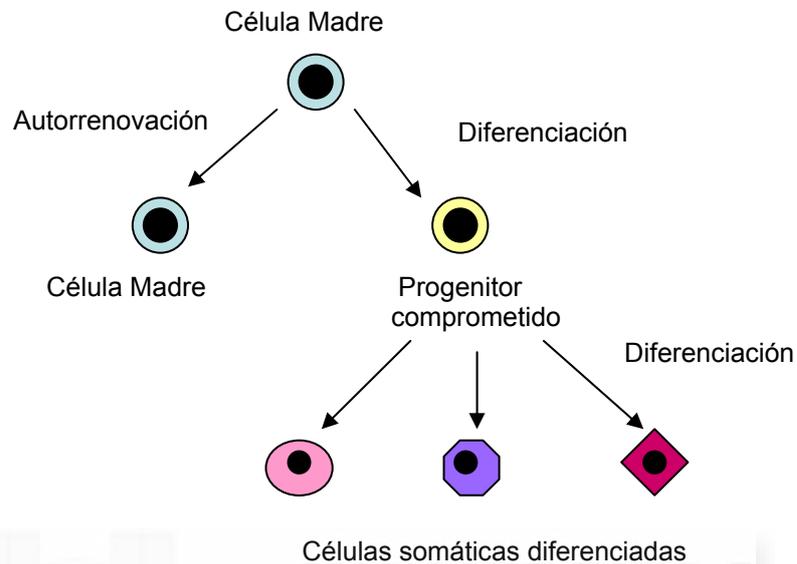


Fig.4. Esquema del concepto de célula madre.

3.2. Clasificación de las células madre.

Las células madre se pueden clasificar según su origen y según su potencial de diferenciación.

Según su origen se dividen en:

- Embrionarias: Proceden de embriones antes de su implantación, cuando están en el estadio de blastocisto (entre los días 5-7 en humanos y 3.5 en ratones).
- Fetales: Se aíslan de tejidos presentes en el feto, por ejemplo las células madre germinales y las procedentes de teratocarcinomas.

- Adultas: Se aíslan de tejidos adultos, su función es regenerar un tejido durante la vida del individuo. Un ejemplo serían las células de la médula ósea, las ovas hepáticas o las ductales pancreáticas ya mencionadas anteriormente.

Según la capacidad que tengan para diferenciarse, las células madre se clasifican en:

- Totipotentes: Son las células capaces de formar un organismo completo, tanto los tipos celulares que forman parte del embrión como los que soportan su desarrollo en el útero (las células del trofoblasto, que originarán la placenta, los tejidos extraembrionarios y el cordón umbilical). Las únicas células totipotentes son las del cigoto hasta mórula, antes de que llegue al estadio de blastocisto.
- Pluripotentes: Son las células que se pueden diferenciar en cualquiera de los tipos celulares derivados de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) y la línea germinal. En este apartado se encuentran las células madre embrionarias y algunas fetales (por ejemplo las de cordón umbilical).
- Multipotentes: Son las que pueden originar más de un tipo celular. Son células más comprometidas que pueden derivar a los distintos tipos celulares del tejido u órgano en el que se encuentran. Suelen encontrarse en tejidos adultos. Por ejemplo, las células madre del epitelio intestinal, que originarán los cuatro tipos de células que forman parte del mismo.
- Unipotentes: Son las que únicamente se pueden diferenciar en un tipo celular concreto. Un ejemplo serían las células madre adultas de la piel.

4. Las células madre embrionarias.

4.1. Origen y aislamiento.

Las células madre embrionarias proceden de la masa celular interna del blastocisto. El blastocisto es la estructura del embrión humano a día 5-7 tras la fecundación. Se compone de una agrupación de células, la masa celular interna, y una cavidad con un líquido, el blastocele. En este momento ya se han generado los dos primeros linajes celulares: el trofoblasto, que originará la placenta y los tejidos extraembrionarios de sustentación para el embrión, y el embrioblasto o masa celular interna, constituido por las células madre embrionarias, como se mencionó anteriormente.

Las técnicas de obtención y cultivo de las ES son relativamente recientes. Los científicos MJ Evans y MH Kaufman establecieron en 1981 (Evans and Kaufman, 1981) los primeros cultivos de ES de ratón, y no fue hasta 1998 cuando JA Thomson y colaboradores (Thomson et al., 1998) hicieron lo propio con las humanas. Sin embargo, el dilema ético que supone la destrucción de un embrión para la obtención de células madre ha provocado que se busquen otras alternativas para el aislamiento de células madre. Recientemente se han propuesto dos. En primer lugar estaría la obtención de células madre a partir de blastómeros (Chung et al., 2006), adaptando un método usado comúnmente en las clínicas de reproducción asistida para el diagnóstico genético preimplantacional. Consistiría en retirar una célula del estado de desarrollo de 8 células durante la segmentación, de forma que el desarrollo del embrión no se viera comprometido, obteniéndose una célula madre totipotente (el blastómero). La segunda opción sería una alteración de la transferencia nuclear (Meissner and Jaenisch, 2006) en la que se suprimiría el gen *cdx2* del núcleo de la célula donante durante el proceso de la transferencia nuclear. La función de este gen consiste en establecer el trofoectodermo y posteriormente, el tracto intestinal, por lo que sin él el embrión no puede implantarse.

4.2. Características.

Todas las células madre embrionarias presentan una serie de características comunes que son (Wobus, 2001):

- Son células derivadas de la masa celular interna de un blastocisto.
- Pueden dividirse ilimitadamente sin diferenciarse en presencia de una citoquina (LIF) o sobre una capa de fibroblastos mitóticamente inactivados.
- Son clonogénicas.
- Tienen actividad telomerasa y una alta actividad fosfatasa alcalina.
- Mantienen de forma estable un cariotipo, al menos durante un número relativamente elevado de divisiones.
- Expresan marcadores de indiferenciación Oct-4, fosfatasa alcalina y SSEA-1 (antígenos embrionarios de estado específico)
- Pueden diferenciarse generando células de las tres capas embrionarias, tanto in vivo como in vitro.
- Pueden generar animales quiméricos al inyectarse en un embrión, colonizando la línea germinal de éste y dando lugar a oocitos y espermatozoides.
- No tienen inactivado permanentemente el cromosoma X ni su genoma completo
- Generan teratomas al ser inyectadas en ratones inmunodeprimidos.
- Tienen una relación núcleo-citoplasma elevada.

5. Métodos para diferenciar células madre embrionarias hacia células productoras de insulina.

Todavía no se ha descrito ningún protocolo con el que se obtenga una población pura y funcional de células productoras de insulina a partir de células madre embrionarias indiferenciadas. Básicamente se emplean distintas estrategias que intentan imitar las condiciones in vivo en las que tiene lugar el desarrollo embrionario del páncreas endocrino. Sin embargo, estos procesos embrionarios

no encierran las únicas pistas para poder obtener un fenotipo funcional que pueda emplearse con éxito en protocolos de terapia celular contra la diabetes.

Las estrategias utilizadas se dividirían en dos tipos, principalmente: diferenciación espontánea (*in vitro*) y diferenciación dirigida (figura 5). La primera hace referencia a la diferenciación libre de las células en la que se expresan poblaciones heterogéneas correspondientes a las 3 capas del desarrollo embrionario, a saber ectodermo, mesodermo y endodermo. Para ello, las células que crecen en monocapa y en presencia de LIF, se cultivan en suspensión y sin LIF, formándose unos agregados celulares denominados cuerpos embrionarios (*embryoid bodies*). De esta manera van apareciendo, progresivamente, derivados de las tres capas embrionarias que van generando precursores o tipos celulares de diferentes linajes. La diferenciación dirigida se da cuando se fuerza la diferenciación hacia un linaje o tipo celular concreto utilizando diferentes agentes, como por ejemplo la inducción de genes concretos o la adición de factores de crecimiento al medio de cultivo. Tanto las estrategias de diferenciación espontánea, como dirigida quedan englobadas en 3 tipos diferentes de metodología, que no obstante pueden combinarse para producir células positivas a insulina, a saber, trampas celulares, métodos coaxiales y métodos direccionales.

Las trampas celulares o “*gating technology*” son sistemas de selección basados en la tecnología del ADN recombinante. En estos sistemas, se transfectan las células con una construcción con un gen de resistencia a un antibiótico o un gen reportero como el de la proteína verde fluorescente (GFP), bajo el control de un promotor que sea específicamente y exclusivamente activo en el tipo o linaje celular deseado. Al añadir el antibiótico al cultivo las células que no expresan ese gen específico mueren, o las que lo expresan se ven de color verde fluorescente. Sin embargo, el principal inconveniente de esta estrategia es encontrar genes exclusivos del linaje deseado. Así por ejemplo en el caso de la selección de células productoras de insulina no se puede distinguir entre células derivadas de ectodermo o de endodermo, que aunque expresan la hormona difieren mucho en otros aspectos, como son la regulación del gen, el procesamiento y la cantidad de insulina producidas.

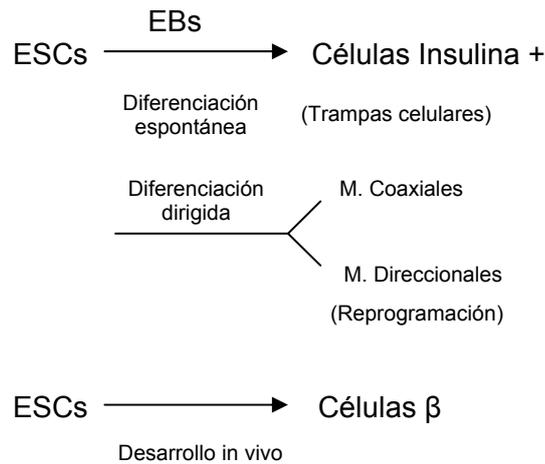


Fig.5. Métodos de diferenciación de ESC y estrategias de selección.

Los métodos coaxiales consistirían en el uso de medios de cultivo que intentan reproducir las condiciones de diferenciación más favorables para las células β in vitro, basándose sobre todo en estudios de desarrollo embrionario en modelos animales. Por ejemplo medios de cultivo en cuya composición hay determinados factores de crecimiento u hormonas en las que se ha descrito un papel durante la proliferación, diferenciación y supervivencia de la célula β . Hay muchos factores candidatos y el desafío es encontrar la combinación más adecuada que contenga en un momento preciso del proceso la mezcla idónea con las concentraciones más favorables (Soria et al., 2001).

Y por último, los métodos direccionales, los cuales se pueden asimilar a la reprogramación celular, consistirían en la conversión de una célula, bien diferenciada, comprometida o desdiferenciada, a un linaje o tipo celular concreto. Los métodos direccionales utilizan 2 estrategias concretas basadas en la tecnología del ADN recombinante o en mezclas más o menos diseñadas de proteínas.

Por tanto, la tecnología de las trampas celulares podría aplicarse a la diferenciación espontánea. Una diferenciación dirigida utilizaría metodología coaxial y/o direccional. De todas formas, y como se ha señalado, los protocolos diseñados y que se van a comentar a continuación para obtener células

productoras de insulina, suelen combinar todas estas metodologías para conseguir el objetivo final.

5.1. Diferenciación espontánea.

Un ejemplo de diferenciación espontánea sería el empleado por Assady y colaboradores (Assady et al., 2001) para obtener células productoras de insulina a partir de células embrionarias humanas. En este trabajo se describe como simplemente a partir de la formación de cuerpos embrionarios se obtenían células que expresaban insulina, GLUT-2, glucoquinasa y neurogenina 3. Aunque en principio estos genes son típicos de la célula β , el estudio no hace ningún ensayo funcional para validar el fenotipo del tipo celular obtenido. Además no queda claro si las células obtenidas derivan de un linaje ectodérmico, endodérmico o una mezcla de ambos.

Así mismo, Shiroi y colaboradores (Shiroi et al., 2002) demostraron que se podían detectar células productoras de insulina con ditizona tras diferenciarlas espontáneamente. Para ello las cultivaron en suspensión, formando EB, durante 5 días, y luego las sembraron en monocapa durante 23 días más. Las células teñidas con ditizona no fueron visibles hasta el día 16 desde el inicio del cultivo en monocapa. La ditizona es un colorante quelante de zinc que permite la detección de este ión en las células. El zinc es necesario para el correcto empaquetamiento de del hémico de insulina en los gránulos de secreción de la célula β y su detección sugiere la presencia de insulina empaquetada en la ruta de secreción. Con este sencillo protocolo se obtuvieron células positivas a Pdx-1, proinsulina 1, proinsulina 2, glucagón, PP, GLUT-1 y IGRP por PCR. Sin embargo, el rendimiento fue muy bajo, ya que menos del 0.1 % de las células cultivadas expresaban insulina. De todas formas, este estudio necesita una caracterización más precisa de las células obtenidas y eliminar el resto de células contaminantes que crecen conjuntamente con las células positivas a insulina durante la fase de monocapa. Finalmente, las pruebas funcionales de secreción no son concluyentes, ya que las células no responden a altas concentraciones de glucosa, sugiriendo un posible origen neuroectodérmico o una captación de

glucosa del medio de cultivo, para lo cual hubiera sido necesario confirmar la secreción de péptido C (Rajagopal et al., 2003).

Por otra parte, como se comentó anteriormente, la primera diferenciación de las ESC a células productoras de insulina realizada con éxito se llevó a cabo por Soria y colaboradores (Soria et al., 2000) mediante un protocolo de doble selección basado en la resistencia a dos antibióticos. En primer lugar se hacía una selección con higromicina, ya que el constructo de ADN transfectado tenía el gen de resistencia a la higromicina bajo el control del promotor constitutivo del gen de la fosfogliceratokinasa. Esto permitía seleccionar clones que habían sido transfectados con éxito. Después se hacía una selección con neomicina, basada en la expresión del gen de la resistencia a neomicina bajo el control de regiones reguladoras del gen de la insulina (Roche et al., 2003). Tras la primera selección de las células con la higromicina se iniciaba el proceso de la diferenciación, mediante la formación de EBs durante 8-10 días. Luego se sembraban los EB resultantes en monocapa durante 5-8 días, iniciándose posteriormente la segunda selección con neomicina. Por último había una etapa de maduración en la que las células se volvían a crecer en suspensión, para que formaran agregados celulares similares a los islotes y se añadía 10 mM nicotinamida durante 14 días, manteniéndose en el medio una alta concentración de glucosa (30 mM). La nicotinamida aumenta la masa celular de los islotes a la vez que preserva la estructura tridimensional y la función de la célula β . Este compuesto se usó como factor diferenciador por primera vez por Otonkoski y Sjöholm (Otonkoski et al., 1993; Sjöholm et al., 1994), aunque también parece tener influencia sobre procesos proliferadores (Vaca et al., 2003). Dado que la elevadas concentraciones de glucosa en esta fase del cultivo podían producir cambios fenotípicos y funcionales en la célula obtenida, se ensayaron en las últimas fases del proceso de maduración diversas concentraciones de glucosa más cercanas a la normogluemia (5 mM). Con ello se pretendía normalizar los parámetros de expresión de genes regulados por la glucosa, así como los perfiles de secreción, evitando que una exposición prolongada en esta fase final de la diferenciación pudiera causar glucotoxicidad (Soria et al., 2001).

Como resultado se obtuvo un clon que contenía 16.5 ng de insulina/ μ g de proteína, lo cual supone un 65% del contenido de un islote normal de ratón y cuyas células secretaban insulina en respuesta a distintas concentraciones de glucosa y a diferentes secretagogos. Una vez que fueron trasplantadas al bazo de ratones diabéticos por inyección con estreptozotocina, corregían la hiperglucemia en tan sólo una semana, llegando a mantener la normoglucemia durante 42 semanas. Además, los ratones recuperaban su peso normal en cuatro semanas. Sin embargo, el 40% de los ratones trasplantados desarrollaron otra vez hiperglucemia en 12 semanas, indicando posiblemente procesos de muerte o de dediferenciación tras el implante. En conclusión, este trabajo demostró por primera vez que es posible obtener células productoras de insulina de células madre embrionarias. Sin embargo, es importante darse cuenta todavía del trabajo que queda por realizar, sobre todo a la hora de diseñar protocolos que permitan obtener un mejor porcentaje de clones productores de insulina.

5.2. Diferenciación dirigida.

Los protocolos desarrollados en este sentido (Hori et al., 2002; Lumelsky et al., 2001; Moritoh et al., 2003) se basaban en la selección de células positivas a nestina que serían precursoras de células pancreáticas, tal y como afirman algunos autores (Hunziker and Stein, 2000; Zulewski et al., 2001).

Lumelsky desarrolló un protocolo basado en cinco pasos: a) cultivo de células madre embrionarias en monocapa en presencia de LIF (2-3 días); b) cultivo de cuerpos embrionarios (4 días); c) selección de células positivas a nestina, cultivando nuevamente en monocapa con medio libre de suero y en presencia de ITSFn (6-7 días); d) expansión de los progenitores pancreáticos endocrinos, cultivando las células con medio N2 suplementado con B27 y bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*) (6 días); e) inducción de la diferenciación y morfogénesis de los agregados celulares secretores de insulina, retirando el bFGF del medio N2 suplementado con B27 y 10 mM nicotinamida. El medio ITSFn sería medio DMEM/F12 con insulina, transferrina, selenio y fibronectina, mientras que el medio N2 contendría DMEM/F12 insulina, transferrina, selenio, progesterona y putrescina.

Siguiendo este protocolo obtuvo células precursoras positivas a nestina que se diferenciaban tanto en células productoras de insulina como en neuronas. Este fue quizás el punto más criticado de este trabajo, ya que no quedaba claro que la nestina marcara células precursoras pancreáticas, como han demostrado trabajos posteriores (Treutelaar et al., 2003). Las células obtenidas con este protocolo tenían un contenido de insulina equivalente al 2% del contenido de un islote normal, y el trasplante a animales diabéticos no consiguió normalizar la glucemia. Otro punto oscuro del trabajo es el referente al origen de la insulina detectada por radioinmunoensayo. El grupo de Melton demostró que las células en estas condiciones eran capaces de captar insulina del medio y liberarla posteriormente con una cinética que podría asemejarse a un proceso secretor (Rajagopal et al., 2003). La determinación de péptido C hubiera podido demostrar una síntesis endógena de la hormona, pero esta medición no se realizó en este trabajo. Finalmente, quedaría por determinar el verdadero papel del bFGF, ya que en este trabajo es utilizado para inducir la diferenciación a linajes endodérmicos, mientras que en otros trabajos parece favorecer la diferenciación hacia mesodermo y ectodermo (Schuldiner et al., 2000).

Por su parte, Hori (Hori et al., 2002) mantuvo el protocolo de diferenciación de Lumelsky pero introduciendo una variación en el paso 5 del protocolo: adición del compuesto LY294002. Este agente químico es un inhibidor de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), una enzima que controla la proliferación en diversos tipos celulares, incluidas células productoras de insulina (Ptasznik et al., 1997). Hori obtuvo expresión de insulina tanto a nivel del mensajero como de la proteína correspondiente. Los ensayos funcionales indicaron respuestas en la secreción de insulina a cambios en la concentración de glucosa, llegando al 13% del nivel detectado en islotes aislados. Sin embargo, los experimentos de trasplante en animales diabéticos no lograron restablecer la normoglucemia, dado que la producción de insulina de 300 de sus agregados celulares o IPCC (*Insulin Producing Cell Clusters*) equivalía a la de 40 islotes. Los cálculos indicaban que debía incrementarse el número de agregados al menos en 10 veces para revertir la hiperglucemia. Esto era inviable a nivel de la cápsula renal, por lo que la eficiencia de estos agregados en implantes queda pendiente de ser demostrada.

Finalmente, Moritoh (Moritoh et al., 2003) también introdujo cambios en el protocolo de selección de células positivas a nestina. En su protocolo utilizó KGF (*Keratinocyte Growth Factor*), EGF (*Epidermal Growth Factor*) y nicotinamida en el paso 4. Las células obtenidas con este protocolo respondían a concentraciones crecientes de glucosa secretando insulina. Sin embargo su origen real es cuestionado, ya que sólo expresaban el gen de insulina 2, típico de neuroectodermo y endodermo primitivo, y no el de insulina 1, que es el gen expresado en roedores en tejido pancreático.

Dado que los protocolos basados en la selección de células positivas a nestina parecían producir células de neuroectodermo con una producción muy escasa de insulina, se plantearon estrategias alternativas. En este sentido, se publicó en 2004 un trabajo del grupo del Dr. Soria que utilizaba factores extracelulares más relacionados con los procesos de diferenciación del páncreas endocrino (Leon-Quinto et al., 2004). En este caso, se combinó una estrategia de selección utilizando una construcción conteniendo el gen de resistencia a la neomicina bajo el control del gen de Nkx6.1, un factor de transcripción que dirige la diferenciación a célula β . Se utilizaron diversos factores añadidos al medio de cultivo que jugaban un papel esencial durante la diferenciación pancreática. Estos factores comprendían nicotinamida, el anticuerpo anti-Sonic hedgehog para favorecer la expresión de Pdx-1 y finalmente el co-cultivo con yemas pancreáticas de 17.5 días. Estas últimas fueron las que produjeron mejores resultados en términos de expresión del gen de la insulina. La idea era utilizar una mezcla de factores que intentaran reproducir las condiciones que se daban en el nicho pancreático en ese estadio del desarrollo. Alrededor del 100% de las células obtenidas eran positivas para genes y proteínas específicos de la célula β (Pdx-1, Insulina, Nkx6.1, NeuroD) y presentaban una secreción de insulina dependiente de glucosa. Implantes en la cápsula renal de animales diabéticos mostraron un mantenimiento de la euglucemia in vivo durante tres semanas, que revirtió en hiperglucemia al retirar el trasplante, excluyendo la recuperación del propio páncreas del animal diabético.

Por otra parte, en el 2005 este grupo volvió a presentar otro trabajo (Vaca et al., 2005) usando una combinación de trampas celulares y método coaxial para la

obtención de células productoras de insulina. En él se usaban como únicos factores de diferenciación los factores solubles obtenidos de un medio condicionado de yemas pancreáticas de 16.5 días, intentando reproducir así los nichos celulares en los que se desarrollan las células β in vivo y recogiendo la idea de Melton y colaboradores (Wells and Melton, 2000). En este caso la selección era también en base a la resistencia a neomicina bajo el control del promotor de la insulina humana. El protocolo de diferenciación se llevaba a cabo en 2 etapas, una primera de 14 días con el medio condicionado de yemas y baja concentración de suero, y una segunda etapa de selección con neomicina. En este trabajo se demuestra que los factores solubles liberados por las yemas son de naturaleza proteica y que, aunque la insulina está presente en el medio de cultivo, no es ésta la que se detecta al final del protocolo. Se hace una caracterización muy completa de estas células productoras de insulina (mediante PCR, inmunocitoquímica, ensayos de secreción, contenido de insulina y péptido C y estudios de patch-clamp). Se obtienen células que expresan algunos transcritos y proteínas típicos de las células β , tienen una secreción regulada de insulina de novo (determinado por la presencia de péptido C) por glucosa y tolbutamida. El trasplante en animales diabéticos mantuvo la normoglucemia durante 6 semanas, no desarrollando tumores y no habiendo regeneración pancreática.

Aunque estos trabajos no han permitido establecer todavía el protocolo definitivo, sí que han asentado una serie de criterios para poder definir las bases para futuros protocolos. Estos criterios se resumen así: las células generadas deben expresar insulina, detectable tanto por su ARNm como a nivel de la proteína y que se complete con la presencia de péptido C. Las células obtenidas deben tener sistemas sensores de glucosa y una maquinaria secretora conectada con un sistema de síntesis, almacenamiento y procesamiento de proinsulina. Por otro lado, habría que generar biomasa suficiente para corregir la hiperglucemia en cualquier trasplante, idealmente en ausencia de rechazo inmunitario y de tumores debido a la actividad proliferativa. Finalmente conseguir una producción mejorada de la hormona lo más cercana posible a la que produce una célula β adulta.

5.2.1. Reprogramación celular.

La reprogramación celular es la conversión de una célula en un determinado estado de diferenciación hacia otro distinto al que está comprometida. Se presenta como una alternativa más precisa o complementaria a los métodos coaxiales ya que en teoría permiten dirigir con más precisión el proceso.

La reprogramación celular se puede llevar a cabo a través de varias aproximaciones: a través de la técnica de transferencia nuclear (SCNT), a través de procesos de fusión celular entre una célula somática y una célula madre, mediante extractos reprogramadores y mediante la inducción de un gen único y específico del tipo celular a obtener.

De esta manera, cabría distinguir las aproximaciones que se han centrado sobretudo en la reprogramación de células somáticas adultas hacia un tipo celular totipotente o pluripotente (transferencia nuclear, fusión celular, extractos celulares) y las que apuntan hacia un concepto más amplio de reprogramación, partiendo incluso de células madre indiferenciadas para obtener células diferenciadas con potencial terapéutico (extractos celulares y la inducción de un gen específico).

Mediante la técnica de la transferencia nuclear se pueden producir células madre “a la carta”, inmunológicamente compatibles con el receptor. Para ello, se obtiene por microinyección el núcleo de una célula somática del hipotético paciente y se microinyecta en un oocito previamente enucleado. La experiencia ha demostrado que los factores reprogramadores del oocito, cuya naturaleza se desconoce por el momento, serían capaces de reprogramar el núcleo de la célula somática, convirtiéndola de nuevo en totipotente, con la capacidad incluso de generar un individuo completo. Esta fue la hipótesis de partida que generó la oveja Dolly y con la que se han generado otros muchos animales clónicos. Esta técnica sería la que se conoce con el nombre de clonación reproductiva y que ha despertado muchas incertidumbres en la comunidad científica por la posibilidad que se abre para generar individuos clónicos. Sin embargo, una alternativa nos la brindaría la clonación terapéutica ya que el óvulo transplantado con su nuevo

núcleo podría dividirse in vitro hasta la etapa de blastocisto, permitiendo el aislamiento de las células madre de la masa celular interna para proceder posteriormente a su diferenciación dirigida hasta los linajes deseados. Este fue el protocolo que publicó el Dr Hwang y aunque la hipótesis de trabajo parece correcta, los resultados publicados por este científico son totalmente falsos (Hwang et al., 2005; Hwang et al., 2004). Si esto llega a ser realidad algún día, se podrían obtener tejidos inmunocompatibles, ya que el material genético del donante y del receptor sería idéntico, pero por el momento ningún grupo ha publicado resultados consistentes al respecto (Lanza et al., 2002) (Rideout et al., 2002).

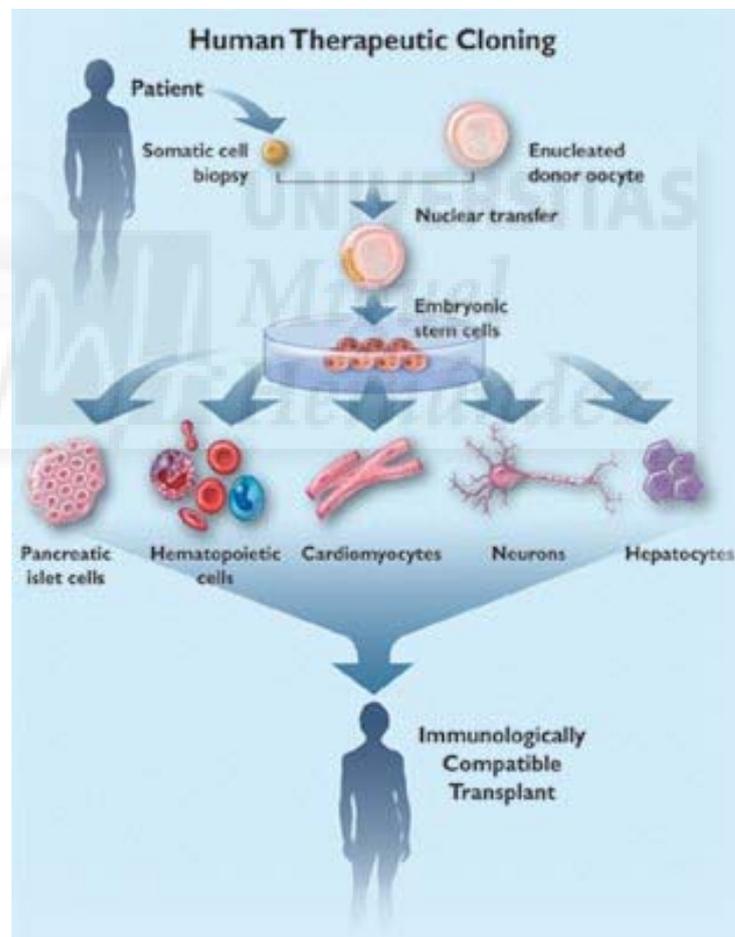


Fig 6. Transferencia nuclear aplicada a la clonación terapéutica. Obtenido de www.lef.org.

Por lo tanto, aunque el uso de la transferencia nuclear implica una fuente de células autólogas también supone la necesidad de un alto número de oocitos, pues la eficiencia del proceso es bastante baja. A esto hay que añadir la dificultad a la hora de manejar correctamente los oocitos, se desconocen además los factores reprogramadores clave y todo en su conjunto conlleva unos costes elevados y un dilema ético. Debido a ello hay una gran expectación respecto los posibles métodos alternativos que conduzcan a una reprogramación celular.

Respecto a la fusión de una célula somática y una ESC hay varios trabajos con células murinas (Do and Scholer, 2004; Tada et al., 2001) y posteriormente con humanas (Cowan et al., 2005; Strelchenko et al., 2006; Yu et al., 2005). En uno de los estudios con ratones (Tada et al., 2001) se observó como la fusión de timocitos de ratón hembra adulto transfectados con un transgen GFP silenciado bajo el control del promotor de Oct4 con ESCs de ratón macho generaba híbridos que expresaban GFP. Interesantemente, la microinyección de estos híbridos en blastocistos diploides normales mostraba el potencial de éstos para diferenciarse en las tres capas germinales. Con las células embrionarias humanas se llegaron a resultados similares en experimentos de fusión con fibroblastos (Cowan et al., 2005).

De todo ello se deduce que la fusión entre una célula somática del paciente y una célula madre embrionaria podría ser una alternativa a la transferencia nuclear. Sin embargo, la célula resultante sería tetraploide, lo que cuestionaría su posible potencial terapéutico. Sin embargo, estos sistemas híbridos permitirían poder identificar los factores reprogramadores intracelulares y permitir así su utilización en protocolos de expresión dirigida. Alternativamente se podría enuclear la célula madre embrionaria justo antes de la fusión o poco después de la misma, con lo que la célula resultante sería diploide. Sin embargo, se ha descrito que es el núcleo de la ESC el que tiene un mayor poder reprogramador (Do and Scholer, 2004).

Un ejemplo de diferenciación dirigida con un método direccional combinado con un método coaxial sería el llevado a cabo por Blyszczuk y cols (Blyszczuk et al., 2003). En este protocolo se fuerza la diferenciación mediante la expresión

constitutiva de Pax4, junto con un método de selección de células positivas a nestina similar al de Lumelsky (Rolletschek et al., 2001). Las células resultantes expresaban genes típicos de la célula β , al igual que del linaje neuroectodérmico. Las células finales también expresaban insulina de novo y corregían la hiperglucemia en ratones diabéticos trasplantados, al igual que las células salvajes usadas como control, formándose tumores en ambos casos.

Los extractos reprogramadores fueron utilizados por primera vez por el Dr. Collas y cols en la Universidad de Oslo. El método consiste en introducir extractos celulares de la “célula donante” en células ya diferenciadas (transdiferenciación) o en células madre embrionarias para obtener otro tipo celular (Collas, 2003; Hakelien et al., 2004). Se cree que el extracto proporciona componentes reguladores requeridos para iniciar un programa transcripcional específico para el tipo celular “donante” (Hakelien et al., 2004), aunque dicha reprogramación no suele ser completa. Para tal fin, los extractos son introducidos en las células mediante permeabilización de la membrana plasmática con la toxina estreptolisina-O.

Las ventajas de la reprogramación mediante extractos reprogramadores son las siguientes (Collas, 2003):

- Los factores reprogramadores acceden al interior celular directamente.
- Se pueden utilizar muchos tipos de “células donantes” en diferentes estados fisiológicos y del desarrollo.
- Se pueden producir células autólogas para trasplante.
- A diferencia de la reprogramación por transferencia nuclear y sus limitaciones, las “células donantes” pueden ser expandidas en cultivo como fuente de material reprogramador.
- Es un proceso más dirigido que la fusión de dos células.
- Se evitan cuestiones de tipo ético o legal, a diferencia de la clonación terapéutica.

6. Reprogramación celular mediante extractos reprogramadores.

En la literatura sólo aparece descrito un método para introducir los extractos celulares en las “células diana”: la permeabilización controlada con estreptolisina-O. Esta toxina pertenece a la familia de las exotoxinas que se unen al colesterol, formando grandes poros en la membrana plasmática de las células de los mamíferos. De hecho, permite la introducción en el citosol de moléculas de hasta 100 kDa (Walev et al., 2001).

Para ello, la membrana plasmática de las células “diana” se permeabiliza con la toxina bacteriana estreptolisina-O. A continuación se incuban dichas células permeabilizadas durante una hora con un extracto nuclear, citoplásmico o total obtenido de las células donantes y suplementado con un sistema regenerador de ATP (ATP, creatin kinasa y fosfocreatina) CTP, GTP y UTP para promocionar el importe fisiológico de factores nucleares dentro del núcleo y favorecer la supervivencia celular. Así, la pérdida de los gradientes electroquímicos de membrana que se da al abrir los poros con la estreptolisina-O impide que la célula regenere el ATP consumido, por lo que se ha de aportar externamente esta fuente de energía. Al final de la incubación las células se sellan cultivando con CaCl_2 durante 2 h. Luego el medio se cambia, retirando las células muertas y el CaCl_2 y prosiguiendo con el cultivo (figura 7).

Las desventajas de este método es que al permeabilizar con esta toxina hay una pérdida incontrolada de componentes que pueden ser vitales para el funcionamiento celular, además de la pérdida de viabilidad de un gran número de células , llegando hasta el 50% (Hakelien et al., 2004)

Este grupo ha publicado varios artículos en los que se muestran varios ejemplos de reprogramación partiendo tanto de células diferenciadas, cambiando en algunos casos de linaje celular (Hakelien et al., 2004; Hakelien et al., 2002), como de células madre adultas (Gaustad et al., 2004) o embrionarias (Qin et al., 2005)

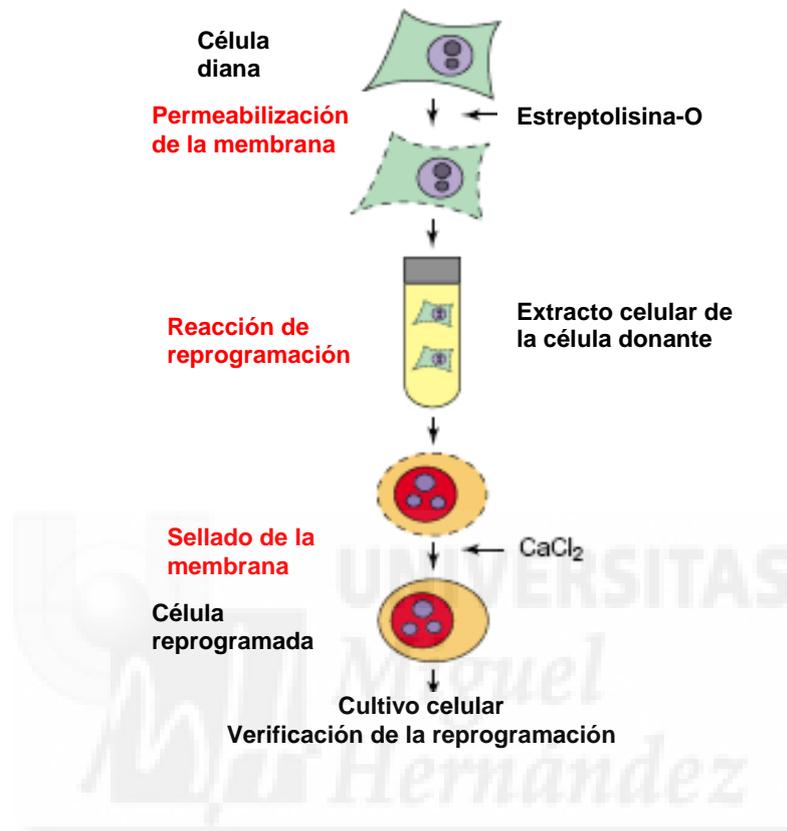


Fig.7. Reprogramación mediante cócteles reprogramadores. Modificado de Collas y Hakelien, 2003.

En el artículo de Hakelien y cols (Hakelien et al., 2002) la reprogramación de fibroblastos 293T (mesodermo) con un extracto de células T (mesodermo) se evidencia por la activación de genes específicos de las células linfoides, así como la expresión de receptores de superficie específicos de la célula T. El nuevo fenotipo se mantuvo durante 100 divisiones in vitro, sugiriendo la reprogramación de la función nuclear de los linfocitos por el extracto de células T de Jurkat. Sin embargo, respecto a sus características morfológicas y su crecimiento, las células se parecían más a los fibroblastos originales que a las células hematopoyéticas, por lo que parece que la reprogramación fue parcial.

En el 2004 publicaron 2 artículos, uno en el que reprogramaban células madre humanas de tejido adiposo (mesodermo) a cardiomiocitos (mesodermo) (Gaustad et al., 2004) y otro en el que se daba una reprogramación transitoria de fibroblastos de rata (mesodermo) a célula β (endodermo)(Hakelien et al., 2004).

En el primer artículo se consigue que tras 3 semanas de cultivo las células expresaran laminina A/C, marcador de células diferenciadas, así como distintos marcadores de cardiomiocitos. También se consiguió la expresión de una proteína “gap junction”, conexina 43 y células binucleadas (40%) y estriadas, latiendo espontáneamente en cultivo.

En el segundo artículo reprogramaron fibroblastos con extractos de INS-1, que es una línea celular de insulinoma de rata que ha demostrado ser un buen modelo de célula β pancreática (Asfari et al., 1992). Se obtuvieron entre un 5 y un 30% de células positivas a insulina, detectada por inmunofluorescencia en 7 de 30 experimentos. Esta reprogramación fue además transitoria y a tiempos muy diferentes en cada experimento. No se hicieron pruebas de detección de péptido C para poder determinar la biosíntesis endógena de insulina, aunque por otras pruebas indirectas llegaron a demostrarlo:

- Había un 70% de células permeabilizadas y sólo unas pocas (5-30%) eran positivas a insulina.
- Tardaban 2 días en detectarse los transcritos de insulina.

- El extracto contenía insulina en vesículas, e hicieron un experimento en el que etiquetaban las vesículas y no detectaron entrada de las vesículas en las células.
- Incubaron durante 1 h las células permeabilizadas adicionando al extracto insulina recombinante soluble conjugada con FITC 50 veces más concentrada que en el extracto normal y no se detectó que entrara.
- No se detectó insulina en el medio de cultivo y a los fibroblastos control cultivados en dicho medio no se les detectó insulina.

Aunque la inmunocitoquímica revelaba la presencia de la hormona en estructuras similares a vesículas, no pudo demostrarse una secreción regulada por glucosa quizás por el bajo porcentaje de células reprogramadas o bien porque la reprogramación no había sido completa.

Por último, en el 2005 se publicaba un artículo de Qin en colaboración con Collas en el que se partía por primera vez de células madre embrionarias de ratón, y se reprogramaban hacia neumocitos tipo II (endodermo). Además se complementaba la reprogramación con una estrategia de selección (trampas celulares), transfectando las células madre embrionarias indiferenciadas con un constructo que tenía el gen reportero GFP bajo el control del promotor de la proteína C surfactante, un marcador de neumocitos tipo II. A pesar de ello sólo se alcanzó entre un 5-10% de células positivas a GFP a los 7 días de la exposición al extracto, por lo que habría que optimizar el protocolo para enriquecer el cultivo, modificando factores como el volumen de extracto y tiempo de exposición o adicionando determinados factores de crecimiento al medio extracelular.



OBJETIVOS

El objetivo global es diseñar un protocolo de reprogramación celular para la obtención de células productoras de insulina a partir de células madre embrionarias de ratón de la línea D3 (mESC-D3). Para ello se utilizó el método de introducción de extractos proteicos mediante un vector peptídico comercializado con el nombre de Chariot (Active Motif). Todo ello se completó con un protocolo de selección de trampas celulares transfectando las células D3 con una construcción de ADN en la que un gen de resistencia a neomicina está bajo el control del promotor del gen de la insulina. En concreto nos proponemos:

- Comprobar la aplicabilidad de los métodos descritos por la literatura de reprogramación celular mediante cócteles reprogramadores para la obtención de células productoras de insulina.
- Poner a punto el método Chariot para reprogramar células madre embrionarias de ratón D3.
- Estudiar el efecto de los ácidos nucleicos y las proteínas presentes en los extractos proteicos sobre la reprogramación.
- Estudiar la reproducibilidad del método Chariot para reprogramar las células D3 indiferenciadas y formando EB con extractos de INS-1.
- Caracterizar molecularmente las células diana (D3), las donantes (INS-1 y yemas pancreáticas) y las células reprogramadas.
- Estudiar la expresión de insulina en el tiempo en células reprogramadas con extractos proteicos de yemas pancreáticas mediante Chariot.
- Seleccionar una población homogénea de células que expresen insulina tras la reprogramación.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Técnicas de cultivo celular.

1.1. Líneas celulares utilizadas.

La línea de células madre embrionarias utilizada fue la línea comercial D3 (ATCC, *American Type Culture Collection*), derivada de la masa celular interna de blastocisto de ratón. Para las pruebas de optimización de la transfección con Chariot se usó la línea celular de insulinooma INS-1, establecida por el grupo de Volheim (Dpto. de Medicina, Universidad de Ginebra, Suiza) (Asfari et al., 1992).

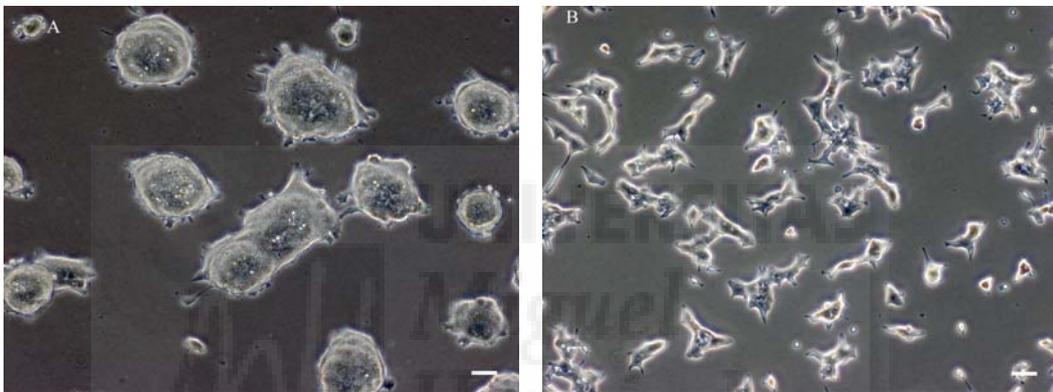


Fig.8. Cultivo de células madres embrionarias de ratón D3 (A) y células de insulinooma INS-1(B). Micrografías tomadas a 10x, barra de tamaño equivalente a 10 μ m.

1.2. Medios de cultivo utilizados.

Para el cultivo de las ESC D3 se usó DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco), con glutamax (sustituto estable de la glutamina), 4.5 g/l de D-glucosa (25 mM) y HEPES 25 mM. Este medio se suplementó con los siguientes reactivos, todos de Gibco (Invitrogen): penicilina-estreptomina (100 U/ml-100 μ g/ml), aminoácidos no esenciales (0.1 mM), β -mercaptoetanol (100 μ M). Para mantener el estado indiferenciado de las células se añadió un 15% de suero fetal bovino (Biochrom) y 1000 U/ml de LIF (factor inhibidor de la leucemia) (Chemicon). En cambio, el medio de diferenciación contenía un 10 % de suero bovino fetal y carecía de LIF.

Para el cultivo de las células de insulinoma INS-1 se usó medio RPMI 1640 (creado en el Roswell Park Memorial Institute) (Gibco) con glutamax y con 11mM de glucosa. A este medio se le añadió suero bovino fetal en un 10% (Biochrom), penicilina-estreptomicina (100 u/ml-100 µg/ml)(Gibco), piruvato sódico (1 mM) (Sigma), β-mercaptoetanol 50 µM (Gibco) y HEPES (Sigma), pH 7.4 (10 mM). Para hacer el medio condicionado de células INS-1, se cultivaron éstas hasta llegar a una confluencia del 80%, se tomó el medio, se filtró y se guardó a 4° C hasta su uso inmediato.

Para el cultivo tanto de las D3 como las INS-1 se emplean distintos soportes, añadiendo distintos volúmenes de medio según el soporte empleado y manteniéndose en unas condiciones de 37 °C, 95% de O₂ y 5% de CO₂.

1.3. Tripsinización de células.

Una vez que se alcanza una confluencia de las células en cultivo del 80%, éstas deben tripsinizarse. En el caso de haber sido sembradas las células mESC-D3 en placas de 6 multipocillos, a una densidad de 5×10^4 células la confluencia se alcanza en unos 3 ó 4 días. En cambio las células INS-1 se siembran a una densidad de 3×10^6 células en frascos de 75 cm², alcanzando una confluencia del 80% en 7-8 días, pues no se dividen a una tasa tan vertiginosa como las células madre embrionarias. Habitualmente el medio de las ESC se renueva cada día o cada 2 días, dependiendo del grado de confluencia de las células. El medio de cultivo tiene un indicador de pH, el rojo fenol, de forma que el medio adquiere un color amarillo si se acidifica debido a una alta proliferación celular, o rosado si éste se basifica.

Para proceder a la tripsinización, en primer lugar hay que retirar el medio de cultivo, pues el suero del medio inactiva la enzima, y lavar la placa o el frasco de cultivo con PBS. Una vez eliminado el PBS del medio se añade una solución de 0.05% de tripsina y 0.002% de Na₄EDTA (Gibco) a 37°C, empleando un determinado volumen según la superficie del soporte empleado. El soporte con esta solución debe incubarse a 37° C durante 2 min.

A continuación se para la reacción añadiendo el doble de medio que el volumen de solución de tripsina con EDTA empleado, repipeteando bien la solución para que las células queden bien disgregadas, de forma enzimática, química y mecánica. A continuación se procede al recuento de las células para sembrarlas o congelarlas posteriormente.

1.4. Protocolos de diferenciación espontánea. Formación de cuerpos embrionarios.

1.4.1. Método masivo.

Consiste en sembrar 9×10^4 células madre indiferenciadas en una placa bacteriológica de $\varnothing=60$ mm (Soria) en un medio de diferenciación (unos 3 ml por placa). Cada dos días de cultivo a 37°C y 5% de CO_2 , se cambia el medio y la placa, pasando la suspensión celular a un tubo cónico de 15 ml y separando por sedimentación por gravedad los cuerpos embrionarios de las células muertas y restos celulares, de menor densidad. Se retira el sobrenadante por aspiración y los cuerpos embrionarios se resuspenden en medio nuevo, pasándolos a una placa nueva. El medio debe cambiarse cada 2 días o antes si se acidificara éste al aumentar la biomasa.

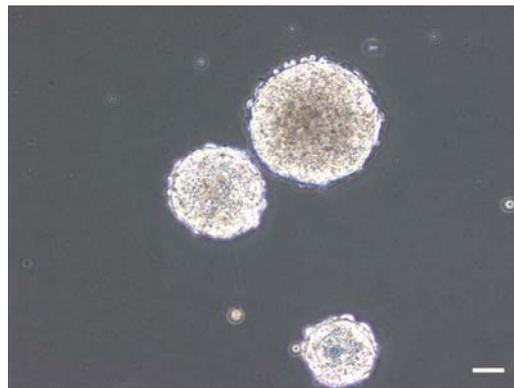


Fig.9. Micrografía de cuerpos embrionarios a día 2 cultivados por el método masivo. Fotografía tomada a a 10x, barra de tamaño equivalente a $10 \mu\text{m}$

1.4.2. Método por gota colgante.

Se parte de una suspensión celular de células madre embrionarias indiferenciadas en medio de diferenciación, tal que al tomar 20 μ l de medio haya 600 células, pues así la diferenciación se dirige mejor hacia endodermo. Se toma una placa Petri de 100 mm tratadas (TPP) y se siembran 50 gotas de 20 μ l cada una en la tapa de la placa (la concentración final será de 3×10^4 cél/ml, con 3×10^4 cel/placa). En la base de la placa se añaden de 10 a 15 ml de PBS 1x. De esta forma las células crecen con una atmósfera húmeda, saturada en agua para que las pequeñas gotas no se evaporen.

Incubar un día a 37°C y 5% de CO₂, como las D3 se duplican cada 12-15 horas habrá de $6-12 \times 10^4$ cél/placa. Entonces se coge la tapa, se voltea y se añade 3 ml de medio, recogéndolos con cuidado y pasándolos a un tubo cónico de 15 ml. A continuación se centrifuga 5 min a 800 r.p.m. para eliminar las células muertas que quedarán en el sobrenadante, y se pasan los cuerpos embrionarios a una placa de 60 mm de diámetro nueva, con 3 ml de medio de diferenciación cada una. El medio y la placa se renuevan cada 2 días como en el caso anterior.



Fig.10. Micrografía de cuerpos embrionarios cultivados a día 2 por el método de gota colgante. Fotografía tomada a a 10x, barra de tamaño equivalente a 10 μ m

1.5. Disgregación de cuerpos embrionarios.

Los cuerpos embrionarios se disgregan para poder sembrar las células previamente diferenciadas tridimensionalmente en monocapa.

1.5.1. Disgregación con tripsina.

Se parte de unos 40 cuerpos embrionarios en el día elegido y se pasan a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se dejan sedimentar por gravedad y se retira el sobrenadante por aspiración, lavándose un par de veces con PBS 1x estéril frío. A continuación se centrifuga a 800 r.p.m 5 min y se vuelve a retirar el PBS por aspiración, añadiendo 200 μ l de tripsina a 37°C. Se incuba 2 min a 37°C en el incubador y seguidamente se añade 800 μ l de medio de cultivo de cuerpos embrionarios. Se pipetea durante 1 min la suspensión celular para acabar de disgregar los cuerpos embrionarios mecánicamente. A continuación se hace recuento celular, calculándose la viabilidad y se siembran 3×10^4 cél/pocillo en una placa multipocillo de 24 (Costar).

1.5.2. Disgregación combinada con collagenasa y tripsina.

Tomar 40 cuerpos embrionarios en el día elegido y pasar a un tubo eppendorf de 1.5 ml, dejar que sedimenten por gravedad. Eliminar el sobrenadante por aspiración y lavar con PBS 1x estéril.

A continuación se centrifuga a 800 r.p.m 5 min y se vuelve a retirar el PBS por aspiración, añadiendo 500 μ l de collagenasa a 37 °C de una solución stock de 2000 U en 1 ml. Mantener 5 minutos a 37 °C en el baño termostatzado. Retirar la collagenasa y añadir 1 ml de tripsina fría. Mantener a 37 °C durante 2 minutos en el baño termostatzado y aspirar 750 μ l del sobrenadante en la campana de flujo laminar. Añadir otros 750 μ l de medio de cultivo, de manera que el volumen final sea de 1 ml. Pipetear muy bien la suspensión celular para acabar de disgregar los cuerpos embrionarios mecánicamente. Seguidamente se hace recuento celular, calculándose la viabilidad y se siembran 3×10^4 cél/pocillo en una placa multipocillo de 24 (Costar).

1.6. Microscopía.

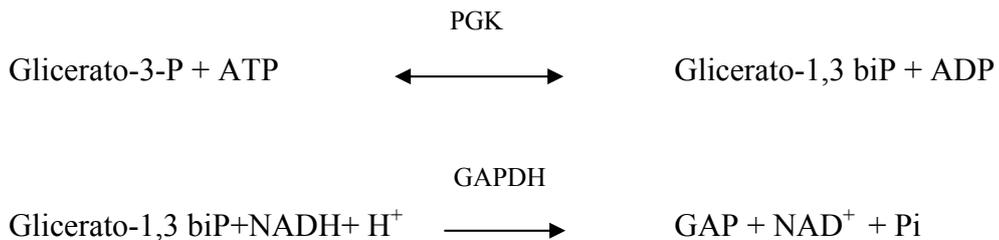
El microscopio usado para tomar las imágenes y ver las células es un microscopio invertido marca Nikon, modelo Eclipse TE200 con contraste de fases y lámpara de mercurio, unido a una cámara digital Kappa DX30 (Kappa, Gleichen, Alemania). El software para trabajar con la cámara digital es el programa Kappa Image Base, versión 2.5.2.

En cuanto a la fluorescencia, se usó un filtro azul (FITC) B-2 A (Nikon, Tokio, Japón) con filtro de excitación de 450-490 nm y filtro barrera a 520 nm. También se usó un filtro verde (TRITC) G-2A (Nikon), con filtro de excitación a 510-560 nm y filtro barrera a 590.

2. Técnicas de Bioquímica.

2.1. Medida de la actividad enzimática de la GAPDH.

Este método se basa en la disminución de la Abs_{340} debido a la conversión de NADH en NAD^+ por las dos reacciones siguientes:



La medida se hace mediante un fluorímetro (Versafluor, Bio-Rad) El filtro de emisión empleado es el EM 460/10 y el de excitación el EX 360/40. El tampón de reacción se conserva a 4 °C, y se precalienta 3 min a 37 °C en una cubeta de cuarzo hasta la estabilización horizontal de la señal. El tampón de reacción contiene tampón trietanolamina, pH 7.6 (Sigma), 83 mM, ATP pH 7.0 1mM (Roche), GAP 6.2 mM (Sigma), NADH 0.04 mM (Sigma), EDTA 0.86 mM (Sigma), $MgSO_4$ 2.0 mM (Prolabo) y PGK 1.3 U (Sigma).

La GAPDH se adiciona con el extracto total y hace que el NADH se vaya consumiendo en función a la cantidad de GAPDH contenida en la muestra y aparezca una pendiente negativa en la fluorescencia. La adición de un exceso de extracto proporciona una pendiente paralela al eje de ordenadas hasta el retorno a una señal horizontal que indica el agotamiento del NADH. De esta manera la GAPDH, que es una enzima citosólica, nos indica la integridad celular.

La actividad enzimática es el número de unidades enzimáticas por miligramo de proteína, midiéndose la actividad enzimática como micromoles de sustrato transformado por minuto. También hay que tener en cuenta la estequiometría de la reacción (ver página anterior) que en este caso es 1:1, asociándose la transformación de 1 mol de sustrato a la oxidación de 1 mol de NADH.

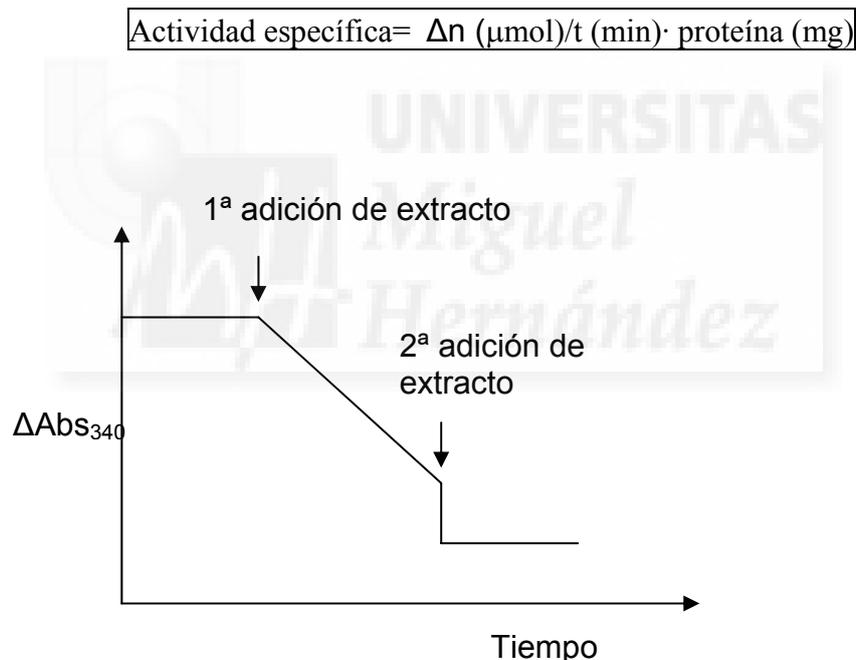


Fig.11. Registro característico de la medida de la actividad de la GAPDH.

Cabe mencionar que en este experimento en concreto se determinó la variación en el número de moles en los 3 minutos comprendido entre la primera y la segunda adición del extracto. Para calcular dicha variación (Δn) entre la primera y la segunda adición del extracto hay que aplicar la ley de Lambert-Beer, según la cual la absorbancia de una muestra es igual al producto del coeficiente de

extinción molar (Σ), el camino óptico recorrido por la radiación (l) y la concentración de la muestra (c):

$$A_{340} = \Sigma_{340} \cdot l \cdot c$$

3. Técnicas de Biología Molecular.

3.1. Extracción de ARN total.

Para extraer el ARN total se usó el reactivo Trizol, que es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidinio (Invitrogen) basado en el método de extracción de ARN desarrollado por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987). Se siguieron las instrucciones del fabricante, consistiendo el método en 5 pasos:

1. Homogeneización.

Las células de partida pueden estar bien cultivadas en monocapa, bien en suspensión o pueden formar parte de un tejido, por ejemplo cerebro de ratón adulto o fetal.

- Células en monocapa.
 - Lavar las células con PBS tres veces.
 - Lisar las células con 3ml de Trizol por cada P-100. Repipetear. Pasar a un eppendorf de 2 ml.

- Células en suspensión.
 - Lavar las células con PBS
 - Con una pipeta Pasteur, recoger las células, pasar a un tubo cónico Falcon de 15 ml.

- Centrifugar, a velocidad mínima (800 rpm, p.ej.), 1 ó 2 min para hacer un sedimento. Eliminar sobrenadante. Añadir 1 ml de PBS, resuspender y volver a centrifugar.
- Lisar las células con Trizol (1 ml Trizol por cada 10^7 cél.),¹ repipetear. Pasar a un eppendorf de 2 ml.
- Tejido.
 - Descongelar la muestra de tejido en hielo.
 - Pesar 100 mg (máx.) exactamente, en un eppendorf/papel de aluminio.
 - Poner 1 ml de trizol por cada 100 mg en el eppendorf. Homogeneizar bien en un potter. Mantener siempre en hielo.
 - Pasar a un tubo Falcon de 50 ml y pasar por el homogeneizador eléctrico, a la velocidad mínima, tres veces.
 - Lavar el Falcon con 1 ml.

2. Separación de fases.

Se incuban las muestras homogeneizadas a temperatura ambiente durante 10 min. Se añaden 200 μ l de cloroformo (Merck) por cada ml de Trizol empleado. El cloroformo extraerá el ARN de la solución. Para ello hay que agitar la muestra a mano con fuerza durante 15 seg. e incubar a temperatura ambiente durante 2 ó 3 min. A continuación hay que centrifugar las muestras a 12.000 xg, 15 min., a 4 °C. Se observa entonces una fase inferior roja (las proteínas), una fase intermedia (a veces blanca, contiene el ADN) y una fase superior donde está el ARN. Retirar la fase incolora superior con cuidado y pasar a otro eppendorf.

3. Precipitación del ARN.

El ARN se precipita añadiendo 500 μ l de isopropanol (J.T. Baker) al 100% por ml de Trizol. Agitar suavemente. Incubar a temperatura ambiente 10 min y centrifugar a 12.000 xg durante otros 10 minutos a 4 °C. El ARN precipita en

¹ P-100 al 100% de confluencia = 10^7 células

forma de gel, similar a un sedimento en el fondo del tubo. En caso de que se parta de poca cantidad de tejido (1 a 10 mg) o un número pequeño de células (10^2 a 10^4 células) hay que añadir sólo 800 μ l de Trizol y seguir con el procedimiento establecido. Cuando haya que precipitar el ARN con el isopropanol se puede añadir 10 μ g de glucógeno libre de RNAsas (Sigma) que coprecipita con el RNA y hace que sea más visible.

4. Lavado del ARN.

Tras la precipitación del ARN, se elimina el sobrenadante y se lava el pellet de ARN con 1 ml de etanol (J.T. Baker) al 75% en agua DEPC por ml de Trizol empleado. El dietilpicrocarbonato (DEPC) se usa para tratar el agua de forma que quede libre de RNAsas. Resuspender suavemente y centrifugar a 7.500 g 5 minutos, 4 °C. Eliminar el sobrenadante.

5. Disolución del ARN.

A continuación se deja secar el ARN durante 5-20 min. a temperatura ambiente. Una vez seco se disuelve el ARN en agua libre de RNAsas, en unos 50 μ l, y se resuspende suavemente. Se incuba a 58°C, durante 10 min y se hacen alícuotas de 10 μ l. Introducir en hielo la alícuota si se va a medir inmediatamente la concentración de ARN o congelar a -80°C, pues el ARN se degrada muy fácilmente con la temperatura.

6. Medida de la concentración de ARN.

El RNA se mide espectrofotométricamente a 260 nm, calculando la bondad de la extracción mediante el ratio Abs 260 nm/Abs 280 nm., usando un GeneQuant RNA/DNA Calculador (Pharmacia LKB Biochrom, Inglaterra). Para ello se toma como blanco el tampón TNE (TNE 10x: Tris Base 0.1 M, EDTA 10 mM, NaCl 2 M).

3.2. Extracción de ARN de menos de 5×10^5 células.

En los casos en los que había un número bajo de células a las que había que extraerles el ARN se empleó el kit de extracción ARNeasy de Qiagen.

En primer lugar hay que preparar los reactivos que se usarán: redissolver a 37°C el tampón RTL del kit, ya que forma precipitados; preparar etanol al 80% y etanol al 70% (Baker) en agua libre de RNAsas, mezclar 1ml de tampón RTL con $10\ \mu\text{l}$ de β -mercaptoetanol; añadir 44 ml (4 volúmenes) de etanol absoluto al tampón RPE liofilizado (al abrir el kit); añadir $550\ \mu\text{l}$ de agua del kit al sólido DNase y cuando hay menos de 5×10^3 células hay que añadir 1 ml de agua del kit al carrier sólido de RNA, de manera que la solución stock tenga $310\ \text{ng}/\mu\text{l}$, que habrá que llevar a $4\ \text{ng}/\mu\text{l}$ para su uso.

Para llevar a cabo el protocolo se siguieron las instrucciones del fabricante:

1. En primer lugar se lisan las células, bien directamente de la placa con un rascador, o de un sedimento, procurando eliminar bien el medio de cultivo, añadiendo $350\ \mu\text{l}$ de tampón RTL (poner $75\ \mu\text{l}$ si hay menos de 10^5 células). Se agita enérgicamente o se pipetea durante 1 min. (hasta que desaparezcan los agregados).
2. Homogeneizar, sin formar espuma, 30 seg. con un rotor-stator autoclavado. También se puede pasar a un tubo de cultivo de bacterias para que funcione mejor el rotor-stator y se homogeneiza 2 min. a máxima velocidad. Si hay menos de 5×10^3 células, se añaden 20 ng de carrier antes de homogeneizar.
3. Añadir el mismo volumen de etanol al 70% que de tampón RTL. Mezclar bien por pipeteo.
4. Aplicar a una minicolumna. Poner sobre un eppendorf de 2 ml (kit). Cerrar tubo y centrifugar $8000 \times g$ 15 seg. Desechar el sobrenadante.
5. Añadir $350\ \mu\text{l}$ tampón RW1. Centrifugar $8000 \times g$ 15 seg a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante.

6. Añadir 10 μ l de DNase (stock) y 70 μ l tampón RDD. Mezclar sin vortex. Pipetear sobre la membrana de la columna. Dejar 15 min a temperatura ambiente.
7. Añadir 350 μ l tampón RW1. Centrifugar a 8000xg 15 seg a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante.
8. Transferir la columna a un nuevo tubo. Añadir 500 μ l de tampón RPE. Centrifugar a 8000 g 15 seg a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante.
9. Añadir 500 μ l etanol al 80 %. Centrifugar a 8000xg 2 seg a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante. Retirar la columna sin que entre en contacto con el sobrenadante. Pasar a un tubo nuevo de 2ml.
10. Centrifugar a 14000 r.p.m. 5 min a temperatura ambiente con la tapa de la columna abierta.
11. Transferir la columna a un tubo de 1,5 ml (del kit). Añadir 14 μ l agua (del kit) al centro de la membrana. Esperar de 2 a 5 min a temperatura ambiente. Cerrar el tubo, centrifugar a 14000 r.p.m. durante 1 minuto.
12. El sobrenadante (aprox. 12 μ l) contiene el RNA.

3.3. Extracción de ARN de islotes y yemas pancreáticas.

El páncreas es un tejido muy rico en RNAsas endógenas, por lo que con este tejido se ha seguido un protocolo de extracción de RNA basado en el método de Chomczynski (Chomczynski and Sacchi, 1987). En él un homogeneizado de tiocianato de guanidinio se extrae con fenol: cloroformo a pH reducido. El tiocianato de guanidinio es un agente caotrópico que rompe las células, solubiliza sus componentes y desnaturaliza las RNAsas endógenas.

En primer lugar, se parte de 100 mg de tejido, añadiéndosele 3 ml de solución desnaturalizante (solución D) sin sarcosyl. La solución D está formada por: tiocianato de guanidinio 4M (Fluka); citrato sódico 25 mM (Merck); lauril sarcosinato sódico (sarcosyl) 0.5% (p/v) (Sigma) y β -mercaptoetanol 0.1M (Merck). Se puede preparar una solución stock, estable durante meses con todos

los componentes excepto el β -mercaptoetanol, que debe añadirse al volumen de solución D que vaya a usarse ese día.

A continuación se homogeneiza el tejido mecánicamente mediante un potter y finalmente por pipeteo, añadiéndose 50 μ l de solución D con sarcosyl al 10% por ml de solución D empleado. El sarcosyl es un detergente que rompe las membranas y ayuda a lisar las células, favoreciendo la extracción de RNA.

En eppendorf autoclavados ponemos 500 μ l de homogeneizado y añadimos: 50 μ l de acetato sódico 2M a pH 4 (Prolabo), 500 μ l de fenol bidestilado y saturado con agua DEPC (Fluka) y 200 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (ambos de Merck), en proporción 49:1. Se agita muy bien para que no quede RNA en la fase fenólica. Se deja en hielo o a -20°C durante 10 min y se centrifuga 20 min a 4°C a 13000 rpm. Se recoge la fase acuosa (superior), transparente, aproximadamente unos 500 μ l. Es muy importante no llevarse el fenol.

Se añade un volumen de isopropanol (J.T.Baker) igual a la cantidad de fase acuosa que tenemos. Agitar por inversión. Se deja una hora a -20°C (puede dejarse también toda la noche).

Centrifugar 20 min a 4°C y desechar el sobrenadante con cuidado de que no se vaya el sedimento. Se añaden 150 μ l de solución D (con sarcosyl). Se resuspende bien hasta que no se vea el sedimento. Se añaden 150 μ l de isopropanol (J.T.Baker). Agitar enérgicamente. Se deja una hora a -20°C , no es recomendable dejar más tiempo.

Se centrifuga 20 min a 4°C y se desecha el sobrenadante con cuidado de que no se vaya el sedimento. Se ponen 200 μ l de etanol (J.T.Baker) al 75% en agua DEPC autoclavada. Se deja una hora a -20°C (puede dejarse también toda la noche).

Se desprende el sedimento de la pared y se centrifuga 10 min a 4°C .

Se quita el etanol y se deja secar al aire. Resuspender en 50 μ l de agua DEPC autoclavada, agitando bien hasta que no se vea el sedimento. Si no se resuspende bien se pone unos minutos en el baño a 65°C .

3.4. Extracción de ADN.

Para extraer el ADN total se usó el reactivo Trizol, igual que para la extracción de ARN. Para ellos se siguieron las instrucciones del fabricante, las mismas que para la extracción del ARN hasta la separación de fases. Habría tres pasos.

1. Precipitación del ADN.

Una vez adicionado el cloroformo (Merck) y separada la suspensión en tres fases tras la centrifugación se retira la fase acuosa (con el ARN) y se precipita con etanol al 100% el ADN contenido en la interfase y la fase orgánica. Se añade 300 μ l de etanol por cada 1 ml de Trizol empleado y se mezcla por inversión. A continuación se incuban las muestras a temperatura ambiente durante 2-3 min y se sedimenta el ADN por centrifugación a 2.000 xg durante 5 min a 4°C.

2. Lavado del ADN.

Se retira el sobrenadante, que contiene las proteínas, y se lava el sedimento de ADN dos veces en una solución de citrato sódico 0.1M (Sigma) en etanol 10% (J.T.Baker) Se añade 1 ml de solución por cada ml de Trizol empleado. En cada lavado se incuba el ADN durante 30 min en la solución de lavado, a temperatura ambiente y agitando periódicamente y se centrifuga a 2.000 xg durante 5 min a 4 °C.

A continuación se resuspende el sedimento en etanol al 75% en agua DEPC (2 ml de etanol al 75% por cada ml de Trizol empleado), incubar 15 min a temperatura ambiente, agitando periódicamente. Centrifugar a 2.000xg durante 5 min a 4 °C.

3. Resuspensión del ADN.

Dejar secar el ADN de 5 a 15 min en un tubo eppendorf abierto. Disolver el ADN en NaOH 8 mM (Merck) de forma que la concentración del ADN esté entre 0.2-0.3 μ g/ μ l. Ajustar el pH a 8.4 con HEPES 0.1 M (Sigma) y adicionar EDTA (Sigma) hasta una concentración final de 1mM.

3.5. Retrotranscripción de los ARN mensajeros.

El proceso de obtención de ADNc a partir de ARN se podría dividir en dos etapas: la primera consistiría en la desnaturalización de la hebra molde y la unión de un oligo desoxitimidina (T_{20}) a la cola poliadenilada los ARNm. En una segunda etapa, se procede, seguidamente a la síntesis del ADNc, a la copia del ARNm mediante la actividad retrotranscriptasa inversa (Expand Reverse Transcriptase, Roche) y múltiples copias de ambas hebras.

En todos los casos la primera etapa se llevó a cabo a partir de 1 μg de ARN total, 1 μl de oligo desoxitimidina (20 μM) y agua libre de RNAsas hasta un volumen de 10.5 μl . La mezcla se introdujo en el termociclador (GeneAmp PCR Systems 9700, Applied Biosystems) a 65°C durante 10 min. A continuación, tras la desnaturalización, se añadieron los componentes (todos de Roche) necesarios para que tuviera lugar la segunda etapa de la reacción: Tampón, 10 mM DTT, 1 mM dNTPs, 20 unidades de inhibidor de RNAsas, RNAsa OUT (Invitrogen) y 50 unidades de la enzima de retrotranscripción. En este punto se introdujo la mezcla total en el termociclador a 37 °C durante 60 min. La reacción se detuvo desnaturalizando la enzima calentando a 93°C durante 5 min.

3.6. Reacción en cadena de la polimerasa.

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es un método enzimático que utiliza dos oligonucleótidos complementarios de los extremos 3' del molde con sus terminales 3'OH enfrentados como cebadores (ver tablas 3 y 4) y que permite sintetizar numerosas copias del fragmento de ADN comprendido entre ambos oligos. La sucesión de una serie de ciclos en los que tiene lugar la desnaturalización del molde, hibridación de los cebadores y extensión de las síntesis por acción de la ADN polimerasa termorresistente, origina una acumulación exponencial de fragmentos específicos (2^n , siendo $n=n^\circ$ de ciclos) cuyos extremos estarán definidos por los extremos 5' de los cebadores.

En el presente estudio se ha caracterizado molecularmente las yemas pancreáticas y las células INS-1 que se han usado para la reprogramación, así como las células madre embrionarias de ratón D3 de partida y durante la

diferenciación. Para la reacción se empleó el kit Expand High Fidelity PCR System (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las reacciones se hicieron en un volumen final de 25 μ l, con una concentración final de cada cebador de 0.5 μ M, más 0.2 μ M de dNTPs y 1.5 unidades de enzima. Las condiciones de reacción fueron una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguida del número adecuado de ciclos, consistentes en tres fases de 30 seg a 94°C, 30 seg a la temperatura de hibridación de los cebadores y 30 seg a 72°C. Por último se procedió a una elongación final de 10 min a 72 °C. Las tablas 1 y 2 contienen las secuencias de los cebadores empleados, con el tamaño del amplicón y las condiciones de la reacción.



Genes	Oligo sentido	Oligo antisentido	Producto (pb)	Tm/ no ciclos	GeneBank no acceso
ESCs					
Oct-3/4	AGGCCCGGAA GAGAAAGCGA ACTA	TGGGGGCAGAGG AAAGGATACAGC	265	67°C/26	X52437
Ectodermo					
Otx-2	CCATGACCTAT ACTCAGGCTTC AGG	GAAGCTCCATAT CCCTGGGTGGAA AG	211	67°C/35	BC027104
N-200	GAGTGGTTCCG AGTGAGGTTGG AC	GACGTTGAGCAG GTCCTGGTACTC	343	67°C/32	M35131
N-3	GCCGAGCAGA ACAAGAGGCC ATT	CTGGATGGTGTC CTGGTAGCTGCT	186	60°C/25	NM_008691.1
GFAP	CTGTTTGCCAG GCTCAGTCCC AC	GGAAACTTCCAG CTCTGGCAACGG	297	67°C/32	K01347
AChE	CCGGGTCTATG CCTACATCTTT GA	CACAGGTCTGAG CAGCGCTCCTGCT TGCTA	483	67°C/35	BC046327
TH	AGTTCTCCAG GACATTGGACT T	ACACAGCCAAA CTCCACAGT	100	67°C/35	NM_009377
GS	GGTGTGCGAA GACTTTGGG	GCCTGTTTCGTTG AGGAGACAC	414	67°C/35	X16314
MBP	GTGCAGTTGT TCGACTCCG	ATGCTCTCTGGCT CCTTGGC	153	67°C/35	NM_010777
Nestina	CGGCCACGCA TCCCCATCC	AGCGGCCTTCCA ATCTCTGTTCC	258	67°C/32	NM_016701
Mesoderm o					
Brachyury	GTCATCGGAA CAGCTCTCCAA CC	GGAGAACCAGAA GACGAGGACGTG	319	67°C/30	NM_009309

Tabla 1. Secuencia de los cebadores (1ª parte, ver tabla 4) y las condiciones empleadas para el análisis de los genes de interés (Tm: Tª de hibridación de los cebadores con la cadena molde; pb: pares de bases).

Genes	Oligo sentido	Oligo antisentido	Producto (pb)	Tm/ no ciclos	GeneBank no acceso
Endodermo					
AFP	CCTTGGCTGCT CAGTACGACA AGG	CCTGCAGACACT CCAGCGAGTTTC	301	67°C/26	NM_007423
FoxA2	GTAAAGTAT GCTGGGAGCC G	CGCCCACATAGG ATGACATG	219	61°C/30	NM_010446
FoxA3	CGGGCGAGGT GTATTCTCCA	GCCCAGTAGGAG CCTTTGCC	520	62°C/32	NM_008260
GATA4	GGCCCTCAT TAAGCCTCAG	CAGGACCTGCTG GCGTCTTA	249	61°C/30	NM_008092
GATA5	GCGTCTGTCCT CATCCCGAA	CTGGAGGCCTGG GAGGTGATA	354	62°C/30	NM_008093
Neuroectodermo y células β					
Pax6	AGTGAATCAG CTTGGTGGTG	TCTGTCTCGGATT TCCCAAG	294/336	60°C/32	AF443223
Isl1	CACTATTTGCC ACCTAGCCAC	AAATCATGATTA CACTCCGCAC	255	60°C/32	AJ132765
Pdx1	ACACAGCTCT ACAAGGACCC GTGC	GCACAATCTTGCT CCGGCTCTTCG	655	60°C/32	NM_008814
Insulina	CCCACCCAGG CTTTTGTCAAA CAGC	TCCAGCTGGTAG AGGGAGCAGATG	250	60°C/32	NM_008386/87
Insulina I	TAGTGACCAG CTATAATCAG AG	ACGCCAAGGTCT GAAGGTCC	288	56°C/38	X04725
Insulina II	CCCTGCTGGC CCTGCTCTT	AGGTCTGAAGGT CACCTGCT	212	56°C/40	XO4724
Control positivo					
GAPDH	GCCATCAATG ACCCCTTCATT G	CACCACCTTCTTG ATGTCATCA	692	62°C/32	NM_008084
B-actina	TGGGAATGGG TCAGAAGGAC	TGAAGCTGTAGC CACGCTCG	468	60°C/30	NM_007393.1

Tabla 2. Secuencia de los cebadores y las condiciones empleadas para el análisis de los genes de interés (Tm: Tª de hibridación de los cebadores con la cadena molde; pb: pares de bases).

3.7. Resolución de los productos de PCR.

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (agarosa MS-8, de Pronadisa) al 1.5% en tampón TBE 0.5x conteniendo 0.5 µg/ml de bromuro de etidio (agente fluorescente que se intercala entre las bases nitrogenadas y es visible cuando se ilumina con luz ultravioleta). Dicho tampón (5x) se compone de trizma base 0.45 M (Sigma), EDTA 9.94 mM (Sigma) y ácido bórico 0.44 M (Fluka), en 1 litro de agua. Se cargaron 10 µl del producto suplementado con 1 µl de tampón de carga (Mobio) y se corrieron las muestras a 90 V hasta que el frente de colorante que tiene el tampón de carga llegó al extremo del gel.

Se visualizaron las bandas de ADN mediante un transiluminador (Gel Doc, 2000, de BioRad) y se tomaron imágenes de dichos productos.

3.8. Tratamiento con DNAsa y RNAsa de los extractos celulares totales nativos.

Se partió de un cultivo de INS-1 confluyente al 80-90% crecido en un T-flask de 75 cm², del cual se obtuvo un extracto celular total en condiciones nativas. A este extracto se le midió la concentración de proteínas, ARN y ADN, y se separaron varias alícuotas de 20 µl. El tratamiento con DNAsas y RNAsas (ambas de Sigma) se aplicó en las alícuotas del extracto celular por separado y de forma combinada (50 µg/ml de RNAsa y 500 µg/ml de DNAsa) y a distintas concentraciones (20,30,40,50 y 60 µg/ml, para la RNAsa y 100, 200,300, 400 y 500 µg/ml para la DNAsa) para ver la concentración restante de ácido nucleico que quedaba en el extracto tras el tratamiento correspondiente. Las muestras se incuban con la enzima a temperatura ambiente durante 1 h, y a continuación se dejan 1 h a 4°C, para parar la reacción.

3.9. Tratamiento con proteinasa K de los extractos celulares totales en condiciones nativas.

Los extractos celulares totales en condiciones nativas se trataron con proteinasa K (Sigma) a concentraciones finales de 0 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml y 200 µg/ml. Para ello se incubaron las muestras con la proteinasa K durante 1 h a 37°C, y luego se congelaron las muestras.

3.10. Electroforesis de ARN.

Para ver si el ARN de partida estaba degradado en el extracto celular o se degradaba durante la propia extracción, se hizo una electroforesis. Para ello se corrió la muestra en un gel de agarosa al 1% en TAE 1x. El TAE 50x se compone de Tris 2M (Amresco), EDTA 0.05 M (Sigma) y ácido acético glacial 1M (Panreac), para la electroforesis se diluye 50 veces.

3.11. Electroforesis de proteínas.

Los extractos celulares totales en condiciones nativas de INS-1 se tomaron como muestras para hacer una electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Este tipo de electroforesis fue descrita por Laemmli (Laemmli, 1970). Es un tipo de electroforesis desnaturizante en el que las muestras se desnaturizan por calor en presencia de agentes desnaturizantes (β -mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro y SDS que desnaturiza y recubre a la proteína con cargas netas negativas) y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas.

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador (la bis-acrilamida) en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se suele usar TEMED (N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina) y como catalizador el ión persulfato ($S_2O_8^-$) que se añade en forma de persulfato amónico (APS). La velocidad de polimerización viene determinada por la concentración de persulfato y TEMED. La porosidad del gel la determina las proporciones relativas de poliacrilamida y bis-

acrilamida, siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida en relación a la acrilamida se use. El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida determina el rango de separación del gel. En este caso se ha usado un porcentaje del 10% de acrilamida. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño. En el esquema (fig.12) se muestran secuencialmente la situación a) al principio de la electroforesis, b) durante el proceso de apilamiento y c) durante la separación en el gel resolutivo. El primer gel (empaquetador) es de mayor poro y tiene un pH más ácido que el segundo gel, que es el que realmente separa las proteínas.

Para ello se preparó en primer lugar el APS (BIO-RAD) al 10% y se guardó a 4°C hasta su uso. Una vez limpiados los cristales con etanol y montado el complejo formado por los cristales, espaciadores y el peine, se prepara el gel separador (con acrilamida/bisacrilamida (30:1) al 10%).

El gel separador contiene agua bidestilada (4.02 ml), lower buffer (2.5 ml), acrilamida (3.33 ml), APS (10%) (50 µl) y TEMED (5 µl) (BIO-RAD). El lower buffer está constituido por Tris Base (Sigma) 1.5 M y SDS (Sigma) 0.4%, con un pH de 8.8. La acrilamida se prepara en proporción 30:1 con respecto a la bisacrilamida. Por tanto se disuelven 75 g. de acrilamida (BIO-RAD) y 2.5 g de bisacrilamida (BIO-RAD), en 250 ml de agua destilada. Se filtra con un papel de filtro y se mantiene a 4°C.

A continuación se introduce el gel entre los cristales y se introduce un poco de agua por un lado del gel para que polimerice la superficie superior en línea recta. Se espera a que polimerice alrededor de una hora y una vez pasado este tiempo se vuelca el aparato para eliminar el agua y se seca con cuidado de no distorsionar el gel con papel de filtrar.

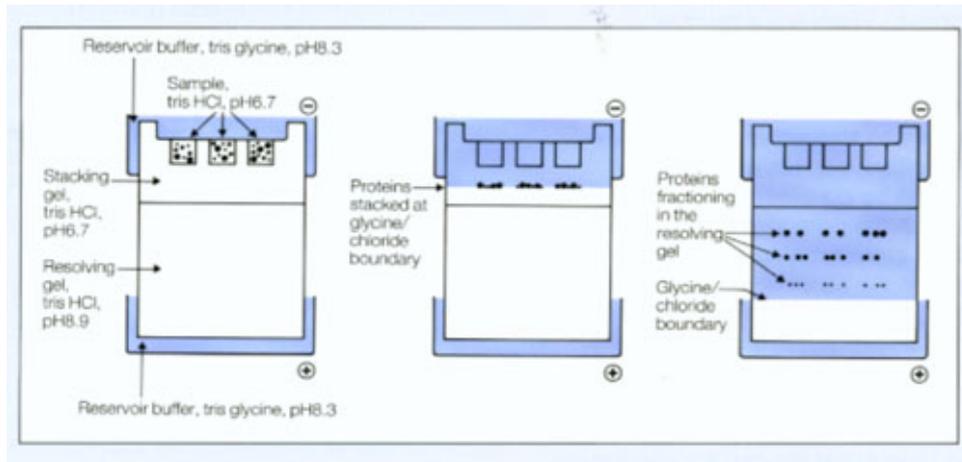


Fig 12. Esquema de una electroforesis en gel de poliacrilamida. Obtenido del Dpto.de Biología Celular de la Universidad de Barcelona, www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/page.htm.

Seguidamente se prepara el gel empaquetador, formado por agua bidestilada (3.6 ml), 5 ml de Upper Buffer (0.5 M Tris Base, 0.4% SDS, pH6.8). 1.3 ml de acrilamida/bisacrilamida, 0.005 ml de APS, y 0.01 ml de TEMED. Se coloca el peine y se agrega el gel empaquetador, con cuidado de no hacer burbujas, por un extremo del peine. Se deja que polimerice alrededor de media hora. Mientras se preparan las muestras.

Las muestras deben contener unos 25 μg de proteína, y un volumen final, junto con el tampón de muestras (Upper Buffer, 2.5 ml, SDS 10%, 4 ml, glicerol, 2 ml (Prolabo), bromofenol 0.4% 400 μl (BIO-RAD) y β -mercaptoetanol, 1 ml (Merck)) de 25 μl . A continuación las muestras se desnaturalizan por calor manteniéndolas a 95°C durante 3 ó 5 minutos.

Una vez polimerizado el gel, se retira el peine con cuidado y se sacan a presión los cristales, colocándolos también a presión en el otro aparato que se introducirá en la cubeta para que migren las muestras.

Se prepara el tampón de electroforesis (5x: 15.1 gr.de Tris Base, 94 gr de glicina (Sigma), 5 gr.SDS y se lleva a 1 litro con agua destilada, pH. 8.3-8.6). Se llena la cubeta con el buffer de electroforesis y se colocan con cuidado las muestras en los pocillos. Se aplican los electrodos y se corren las muestras, a

unos 70V en la zona de concentración y hasta 120V en la zona de separación. Una vez que haya corrido el gel lo pasamos a una batea con azul Coomassie (BIO-RAD). La tinción con azul de Coomassie permite detectar hasta 0.2 a 0.6 μg de proteína y es cuantitativo (lineal) hasta 15 a 20 μg . El azul Coomassie se prepara al 0.2% en un 40% de metanol (Baker), un 10% de ácido acético (Panreac) y un 50% de agua destilada. Para la tinción se deja el gel en la solución del colorante entre 30 min y 1 h en agitación suave. Y para desteñir el gel se emplea una solución con un 40 % de metanol y un 10% de ácido acético en agua destilada y se deja en agitación hasta que se destiña completamente.

3.12. Transfección de células D3 con el plásmido HIP-bgeo-PGKHygro.

3.12.1. Generación del vector y descripción de la construcción.

Se diseñó una construcción que contiene el promotor del gen de la insulina humano/gen βgeo y el gen de resistencia a fosfoglicerato kinasa-higromicina en un vector común pBSII-SK (Stratagene). El gen del promotor humano de la insulina se obtuvo por digestión con *NcoI* (Roche) de pHins300 clonado en PbsII-SK. La orientación correcta se verificó tras la ligación. El fragmento βgeo se obtuvo tras doble digestión del plásmido pSA- βgeo con *HindIII-XhoI*. Este nuevo constructo (GB2) se digirió entonces con *XhoI*. Finalmente el constructo se digirió con *KpnI* para insertar el pGK-hygro (*SmaI-KpnI*). El constructo HIP/ βgeo /pGK-Hygro^r se insertó en el sitio de unión de *SmaI-KpnI*, que está dentro del gen LacZ del vector pBluescriptks.

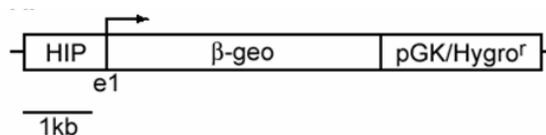


Fig.13. Esquema de la construcción empleada.

3.12.2. Hacer las bacterias competentes.

En primer lugar hay que preparar las bacterias para poder inocularlas con el plásmido, es decir hacerlas competentes. Para ello se usan bacterias de tipo *E. coli*, estirpe DH5 α y se permeabiliza la membrana haciéndoles poros por choque osmótico, como se explica a continuación.

Se hace un cultivo durante toda la noche con 5 μ l de DH5 α (se puede picar una colonia o picar en el glicerol de un criotubo) en 10 ml de medio LB (Luria-Bertani) (Pronadisa) a 37°C, en agitación. Éste es un medio líquido para el cultivo de bacterias, lleva por cada litro de medio 10 g de Triptona, 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 1 g de bactodextrosa (o 2.5 ml de glucosa al 49%) y se ajusta el pH del medio hasta 7-7.2 con NaOH. El medio se autoclava a 120 °C durante 30 min. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se conserva a temperatura ambiente o a 4° C.

El día siguiente se aparta un poco del cultivo de *E. coli* DH5 α para almacenar en glicerol. También se pasa 1ml del cultivo a 100 ml de LB en un frasco Erlenmeyer de 500 ml, a 37°C con agitación, a 250 r.p.m. durante unas 3 horas. La absorbancia se va midiendo a 600 nm (suele tardar entre 3 h y 3.5 h.), usar 1 ml de medio LB como blanco. Cuando llegue a 0.5-0.6 el cultivo habría alcanzado la fase exponencial y se para, poniéndolo en hielo durante 5 min. De esta forma, se consigue una densidad bacteriológica de 5×10^7 bacterias/ml.

A continuación se transfiere la suspensión celular a 4 tubos Falcon de 50 ml, en hielo. Se centrifuga 5 min, a 3.500 r.p.m. a 4°C (en centrífuga refrigerada Gs-6R con rotor JA-20). Se decanta el sobrenadante de cada tubo y se resuspende el sedimento en 10 ml de TFB I frío, a partir de ahora se trabaja en hielo. El medio TFB I se compone de acetato potásico 30 mM, cloruro de rubidio 100 mM (Merck), cloruro cálcico 10 mM, cloruro de manganeso tetrahidratado 6.82 mM (Merck) y glicerol al 15%. Todos los reactivos son de Prolabo excepto los especificados.

Se juntan los 40 ml en dos tubos (20 ml de volumen por tubo) y se centrifuga otra vez a 3500 r.p.m. durante 5 min.

Luego se resuspende el sedimento en 4 ml de TFB II frío (8 ml en total). Este medio se compone de MOPS 10 mM, cloruro cálcico 75 mM, cloruro de rubidio 10 mM y glicerol al 15%.

Finalmente, se alícuota en tubos eppendorf (200 µl/tubo) y se congela en N₂ líquido o en hielo seco y se guarda a -80°C.

3.12.3. Transformación por CaCl₂ de células competentes.

Una vez las células son competentes se puede proceder a su transformación, es decir, a la inoculación del plásmido en el cultivo bacteriano para incorporarlo desde el medio exterior por choque térmico.

Para ello hay que trabajar en hielo, pues a temperatura ambiente se sellarían los poros previamente hechos en la membrana y el plásmido no podría entrar en el interior de la bacteria. Para mantener las condiciones de esterilidad se debe trabajar al lado de un mechero encendido.

El siguiente paso consistiría en añadir 10 ng de ADN en 10-25 µl de agua estéril (concentración entre 1 y 0.4 ng/µl) en un tubo Falcon de 15 ml y ponerlo en hielo. Rápidamente se descongelan las células competentes calentándolas con las manos y se dispensan 100 µl inmediatamente en los tubos que contienen el plásmido y 100 µl en un tubo sin ADN para usarlo como control negativo. Se agita y se mantiene en hielo durante 30 minutos.

Se realiza el choque térmico incubando a 42°C durante 2 min. A continuación se añade 1 ml de medio LB sin ampicilina a cada tubo y se incuba en el agitador (a 250 r.p.m.) a 37°C durante 1 h para permitir la expresión del gen de resistencia a la ampicilina. Se puede guardar un stock de células a 4°C y a -80°C, con glicerol.

Luego se siembra por extensión en placas de medio LB con ampicilina. El stock de la ampicilina tendría una concentración de 50 mg/ml en agua autoclavada y se usaría a una concentración final de 50 µg/ml de medio de cultivo. Se harían dos

diluciones de cultivo una con un factor de dilución 5 y otra con un factor de dilución 10. Incubar a 37°C durante 12-16 h.

A continuación hay que hacer una selección de las células competentes con ampicilina. Si se quiere mantener un stock de las células transformadas se hace lo siguiente. Se “pican” alrededor de 20 colonias y se depositan en 20 tubos de 15 ml con 1.5 ml de medio LB con 50 µg/ml de ampicilina. Se incuban durante 3 horas a 37°C en el agitador a 250 r.p.m. hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0.6. Se recogen 0.5 ml y se hace una dilución 1:1 con glicerol al 87% en criotubos y en hielo, para congelar a -80°C. Con el mililitro de muestra se llenan 20 eppendorfs, con 50 µl cada uno, se centrifugan a 14.000xg o 12500 r.p.m. y nos quedamos con el pellet para pasarlo a -20° C.

Para comprobar que las bacterias tienen el plásmido incorporado, se puede picar una colonia o picar en el glicerol de un criotubo, cultivar y hacer la selección de las células competentes con ampicilina, en primer lugar. Se trabajaría en condiciones estériles, alrededor del mechero. Se prepararía 1 ml de medio LB con una concentración final de ampicilina de 50 µg/ml por cada cultivo de bacterias que queramos hacer. Se tapan los tubos y se dejan en agitación a 250 r.p.m. a 37 °C toda la noche.

Al día siguiente ya se puede hacer una Mini prep para comprobar que las bacterias han incorporado el plásmido. Para ello se usa un kit de Mini prep (Promega), que consiste en lo siguiente:

- 1) Se parte de entre 1 y 10 ml de medio (por ejemplo, 2.5 ml) y se pone 1 ml en un eppendorf, centrifugando a temperatura ambiente y a 14.000 r.p.m. durante 5 min.
- 2) Se elimina el sobrenadante y se echa el resto de medio sobre el sedimento, volviendo a centrifugar en las mismas condiciones.
- 3) Se deja el sedimento totalmente seco, eliminar el sobrenadante al máximo. Añadir 250 µl de tampón de resuspensión (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5; EDTA 10 mM; RNAsa A 100µg/ml). Mezclar por inversión 4 veces.

- 4) Añadir 250 μl de tampón de lisis (NaOH 0.2 M y SDS al 1%) a cada muestra. Mezclar por inversión 4 veces y esperar de 1 a 5 minutos a que haya un parcial aclarado del lisado.
- 5) Añadir 10 μl de proteasa alcalina para inactivar endonucleasas y desnaturalizar las proteínas bacterianas. Mezclar por inversión 4 veces e incubar 5 min a temperatura ambiente.
- 6) Añadir 350 μl de tampón de neutralización (hidrocloruro de guanidinio 4.09 M; acetato potásico 0.759 M; ácido acético glacial 2.12 M, pH 4.2), que detiene la reacción. Mezclar 4 veces por inversión.
- 7) Centrifugar 10 min a temperatura ambiente, a la máxima velocidad (14000 r.p.m.).
- 8) Meter la columna en el tubo colector. Pasar el sobrenadante por la columna y centrifugar 1 min a temperatura ambiente a la máxima velocidad (14.000 r.p.m.). Descartar el eluido y volver a insertar la columna en un tubo colector.
- 9) Lavar la columna con 750 μl de tampón de lavado (acetato potásico 60 mM; Tris-HCl 8.3 mM, pH7.5; EDTA 40 μM y etanol al 60%). Centrifugar 1 min a temperatura ambiente a 14.000 r.p.m..
- 10) Tirar el eluido y volver a lavar con 250 μl de tampón de lavado. Centrifugar 2 min a temperatura ambiente a 14.000 r.p.m. Tirar el eluido.
- 11) Transferir la columna a un eppendorf estéril. Añadir 50 μl de agua libre de nucleasas para eluir el plásmido. Centrifugar 1 min a temperatura ambiente a 14.000 r.p.m..
- 12) Descartar la columna y almacenar el plásmido a -20°C .

Una vez obtenido el material genético se pasa a digerir el plásmido. Debido a las especificaciones del plásmido, se va a usar la enzima de restricción KpnI para la construcción GB2, siendo la enzima y los tampones de Roche.

Para ello se prepara: 3 μl de plásmido; 2 μl de tampón L 10x ;0.2 μl de BSA para la GB2; 0.5 μl de enzima con una concentración final de 1 U/ μl y se completa con agua bidestilada hasta 20 μl . Se deja incubando a 37°C durante 1 hora. Para comprobar que se ha aislado el plásmido se corre en un gel de electroforesis de agarosa al 1% en TAE, junto con un control de plásmido sin digerir. El tampón

TAE (50x) se compone de Tris 2M (Sigma), EDTA 0.02 M (Sigma) y 57.1ml de ácido acético glacial (Panreac), llevándose a 1 litro. En el pocillo de muestra se añade 10 µl del plásmido digerido junto con 1 µl de tampón de carga 10x (Mobio). En el pocillo del control sin digerir se añade 1 µl de plásmido sin digerir, 1 µl de tampón de carga y 9 µl de agua bidestilada. Como marcador de peso molecular se usa λ-HindIII (Promega), añadiendo al pocillo 5 µl, 5 µl de agua bidestilada y 1 µl de tampón de carga. En el pocillo del control sin digerir debe salir una banda de mayor tamaño, ya que no está digerido, mientras que en el plásmido digerido con KpnI un fragmento de 10 Kb.

3.12.4. Aislamiento del plásmido.

Para aislar el plásmido usamos un kit de purificación de plásmidos (QIAfilter Plasmid Midi Kit, de Qiagen). Se puede picar una colonia o se pica en el glicerol de un criotubo y se pasaría a un tubo de 13 ml con 1 ml de medio LB con una concentración final de ampicilina de 50 µg/ml por cada cultivo de bacterias que queramos hacer. Se tapan los tubos y se dejan en agitación a 250 r.p.m. a 37 °C. Todo esto se hace en condiciones estériles, al lado del mechero.

Al término de 3 h se cogen de 50-100 µl del cultivo bacteriano y se inoculan en 50 -100 ml de medio LB con ampicilina, y se deja creciendo a 37 °C y 250 r.p.m. durante 12-16 h. A continuación se hacen alícuotas 1:1 de 300 µl con glicerol al 87% y se centrifuga el resto a 6000 r.p.m. a 4°C en la centrífuga con el rotor JA-10.

Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 4 ml del tampón de resuspensión P1 (Tris-HCl 50 mM a pH 8.0; EDTA 10 mM y RNAsa A 100 µg/ml). A continuación se añaden otros 4 ml de tampón de lisis P2 (200 mM NaOH y SDS al 1%). Se mezcla por inversión 5 veces y se incuba durante 5 min a temperatura ambiente.

Mientras las bacterias se van lisando se prepara el cartucho QIAfilter, añadiendo un tubo apropiado a su tamaño y tapando la salida de los filtros con un tapón. Luego se añade 4 ml de tampón de neutralización P3 frío (acetato potásico 3 M,

pH 5.5), se mezcla por inversión 5 veces y se pasa el lisado al barril del cartucho QIAfilter, donde se deja incubando 10 min a temperatura ambiente.

Mientras tanto se equilibra una columna denominada QIAGEN-tip 100 usando 4 ml de tampón QBT (NaCl 750 mM, MOPS 50 mM pH 7.0, 15 % isopropanol, y 0.15% de Tritón X-100).

Una vez pasados los 10 min se quita el tapón del barril y se inserta con cuidado el émbolo, se filtra con cuidado el lisado en la columna QIAGEN-tip previamente equilibrado.

La columna se lava dos veces con 10 ml del tampón QC (NaCl 1.0 M, MOPS 50 mM pH 7.0, isopropanol 15%). Una vez lavado se eluye el ADN con 5 ml de tampón QF (NaCl 1.25 M, Tris-HCl 50 mM pH 8.5, isopropanol 15%) y se recoge en un tubo de 10 ml.

Luego se precipita el ADN añadiendo 3.5 ml de isopropanol y se pipetea bien. Incubar uno o dos días a 4 °C.

Se centrifuga la suspensión a 15.000 xg (11.200 r.p.m.) 30 min a 4°C en el rotor JA-20. Se lava el sedimentno con 2 ml de etanol (J.T.Baker) al 70% a temperatura ambiente y se vuelve a centrifugar a 15.000 xg 10 min a 4°C, volviendo a decantar el sobrenadante. A continuación se deja secar el sedimento durante 1 ó 2 h a 37°C, y se resuspende en 50-100 µl de agua autoclavada, midiendo la concentración de DNA obtenida por espectrofotometría, a una densidad óptica de 260 nm. En este caso fue de 2.07 µg/ µl de GB2. Para ello tomamos como blanco tampón TNE. El TNE 10x se compone de Tris Base 0.1 M (Sigma), EDTA 10 mM (Sigma) y NaCl 2 M (Merck).

3.12.5. Linealización y precipitación del plásmido.

Antes de linealizar todo el plásmido se hace una prueba. Se toman 2 µl de cada plásmido obtenido en la MIDI-prep y se ponen en un eppendorf. Se les añade 2 µl de tampón L para GB2, 0.5 µl de la enzima de restricción KpnI (40 U/ µl), junto con 0.2 µl de BSA para esta última, completando en ambos casos hasta 20

µl con agua destilada. Se incubó todo a 37 °C durante toda la noche, y después se comprueba la presencia del plásmido por electroforesis usando un gel de agarosa al 1% en TAE, a 80 V. En el pocillo del control sin digerir debe salir una banda de mayor tamaño, ya que no está digerido, mientras que en el plásmido digerido con KpnI un fragmento de 10 Kb.

A continuación ya se puede linealizar toda la muestra. Se mezcla en un tubo 12.5 µl del plásmido (25 µg de DNA), 3 µl de tampón de restricción (tampón L), 1 µl de Kpn I, 0.3 µl de BSA y 13.2 µl de agua bidestilada, para hacer un volumen total de 30 µl. Se deja incubarlo toda la noche a 37 °C. Como comprobación de la digestión se hace una electroforesis con 0.5 µl de la digestión, con las mismas condiciones que la anterior.

Para la precipitación se cogen los 30 µl del DNA digerido, y se le añaden 0.1 volúmenes de acetato sódico (Prolabo) pH 5.2 a 4 °C. A continuación se añaden 2 volúmenes de etanol 100% (Baker) a -20 °C, se mezcla bien y se deja precipitar toda la noche a -20 °C. Al día siguiente se centrifuga 20 minutos a 14000 r.p.m. a 4 °C. Se decanta el sobrenadante y se deja secar el sedimento en la campana. Resuspender en 100 µl de PBS frío y estéril.

3.12.6. Transfección del plásmido a las células D3 indiferenciadas por electroporación.

En primer lugar se descongelaron cuatro viales con 5×10^5 células D3 cada uno (pase 18), y se sembraron en una P-100 previamente gelatinizada con 10 ml de medio de cultivo con LIF. A los 10 d alcanzó el cultivo una confluencia del 70%, se tripsinizó y se hizo un recuento celular mediante la cámara de Neubauer. A continuación se introdujo 25 µg del vector linealizado en una cubeta de electroporación de 4 mm previamente enfriada, junto a 15×10^6 células, en un volumen final de 1 ml. en PBS frío. Se mezclaron bien y se dejaron 5 min en hielo. Seguidamente se sometió a un pulso de 250 voltios y 1 ms en un electroporador de ondas cuadradas T820. Una vez finalizado el pulso, se dejó reposar la cubeta durante 5 min a temperatura ambiente, tras lo cual la mitad de la suspensión celular se sembró en una P-100 previamente gelatinizada, con una

densidad celular aproximada de 7.5×10^6 células en medio de cultivo para mantener las células indiferenciadas (descrito en el apartado 1.2.).

Este mismo protocolo se realizó en paralelo con células en ausencia de construcción, como control de la electroporación.

3.13. Selección y amplificación de clones transfectados.

Tras 48 h de la electroporación, se cambió el medio de las células y se añadió el mismo medio, pero suplementado con 300 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina (Invitrogen). En torno a 10-12 días después de la adición de la higromicina al medio de cultivo, se aprecian clones resistentes, mientras que en la placa control no queda ninguna célula viva.

A continuación se sembraron en medio de cultivo para mantenerlas indiferenciadas durante 3 d con idea de expandir las células y tener un alto número de células transfectadas con el plásmido. Ello permitió congelar una parte de las células y apartar un pequeño número de ellas para realizar la reprogramación mediante Chariot.

3.14. Reprogramación celular y selección de las células productoras de insulina.

Células de la línea celular D3 fueron reprogramadas por introducción de extractos celulares de yemas pancreáticas mediante Chariot, como se describe en el apartado 4.8. Las células se expandieron durante tres días tras la incubación con Chariot, y entonces a la mitad de los cultivos con células transfectadas se les adicionó 300 $\mu\text{g/ml}$ de neomicina al medio de diferenciación, descrito en el apartado 1.2., durante 14 d, con el objeto de seleccionar las células productoras de insulina reprogramadas mediante el Chariot. Por otra parte, se tomó la otra mitad de los cultivos como control negativo de la selección con neomicina, añadiendo el medio de diferenciación sin la neomicina.

4. Técnicas de Biología Celular.

4.1. Tinción de núcleos con Hoechst.

La característica principal del Hoechst 33342 (Sigma) es su permeabilidad y afinidad para unirse a los pares A-T (adenina-timina) selectivamente, de manera que este marcaje se realiza directamente sobre el ADN de las células en cuestión. Las células no requieren permeabilización para la tinción, pero requieren condiciones fisiológicas ya que la internalización del pigmento es un proceso de transporte activo. El Hoechst se excita a una longitud de onda entre 353 y 365 nm (luz UV) y emite fluorescencia a 480 nm.

El procedimiento para teñir los núcleos con Hoechst es el siguiente: hay que añadir Hoechst hasta una concentración final de 5 µg/ml (8 µM); si las células están fijadas con PFA, etanol o metanol, sólo es necesaria una concentración de 1 µM y 15 minutos como máximo de incubación, pues las células ya están permeabilizadas cuando se fijan. Ello equivaldría a 0,28 µl/ml (concentración final de 0.56 µg/ml) si se usa una solución de trabajo de 2 µg/µl.

A continuación habría que incubar a 37°C durante 10-30 min, según la concentración empleada para luego mirar al microscopio.

4.2. Aislamiento de islotes.

Los islotes pancreáticos se usan como controles positivos para la RT-PCR. Los ratones usados eran adultos hembra de la cepa OF1 (Charles Rivers Laboratoires, Francia) de 3 ó 4 meses de edad, aproximadamente.

Antes de comenzar con la extracción hay que preparar el tampón de aislamiento de islotes, denominado solución de Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB). Este tampón está compuesto de NaCl 115 mM (Merck), KCl 5 mM (Prolabo), NaHCO₃ 10 mM (Merck), MgCl₂ (Prolabo), NaH₂PO₄ 1.2 mM (Merck), HEPES

25 mM (Sigma), albumina de suero bovino 1% (Sigma) y glucosa 5.6 mM (Prolabo) La solución se ajusta a pH 7.4 con NaOH (Merck).

En primer lugar, los animales se sacrifican por dislocación cervical. La manipulación del animal se hace bajo la lupa binocular. El ratón se sitúa boca arriba con las patas extendidas, dejando al descubierto el abdomen. Se moja el abdomen con etanol (J.T.Baker) al 70% y se secciona la piel y el tejido muscular del tórax, hasta el esternón.

Después, se fija el hígado a la pared costal con una gasa, de forma que queda expuesta la vesícula biliar y la porción proximal del conducto biliar común. Se liga la desembocadura del conducto pancreático principal a nivel de la ampolla de Water para evitar la salida de la solución con colagenasa al duodeno.

Se busca la porción distal del conducto biliar común, a unos dos o tres milímetros por debajo de la vesícula biliar, por donde se introduce una aguja de insulina, previamente doblada en ángulo recto y suavizada su punta. A continuación se pasa una ligadura que fija la aguja en su posición.

Se inyecta en el páncreas 8 ml de tampón de aislamiento de islotes, a 4°C , con 8 mg de colagenasa tipo V (Sigma). De esta forma se logra una buena distensión del páncreas, facilitando su extracción.

Tras extraer el páncreas de la cavidad abdominal por disección, se transfiere a un tubo de 15 ml y se sumerge en un baño termostatzado a 37 °C durante 11 min. Después se añade más tampón de aislamiento a 4°C, para parar la digestión. A partir de ese momento se empieza a lavar la muestra, se agita suavemente con una pipeta Pasteur para disgregar y resuspender el tejido, y después se sedimenta mediante centrifugación (1200 r.p.m., 50 seg). Se decanta el sobrenadante, quedando el sedimento. Se vuelve a llenar con tampón de aislamiento y se repite otras dos veces, con el fin de lavar el sedimento de colagenasa.

Del sedimento se recuperan los islotes, uno a uno, pescándolos con la pipeta automática bajo una lupa estereoscópica para lavar bien los islotes del resto del

tejido pancreático. Una vez recogidos todos se centrifugan a 800 r.p.m. a 4°C 5 min, se descarta el sobrenadante y se congelan a -80°C, para la posterior extracción de ARN.

4.3. Aislamiento de yemas pancreáticas.

Las yemas pancreáticas se usarán para hacer extractos celulares y reprogramar mediante el Chariot las mESC-D3.

Para ello se parte de ratones hembra de la cepa OF1 preñadas en el día 16.5 (e16.5), las cuales se sacrifican por dislocación cervical.

La manipulación del animal se hace bajo la lupa binocular. El ratón se sitúa boca arriba con las patas extendidas, dejando al descubierto el abdomen. Se moja el abdomen con etanol (J.T.Baker) al 70% y se secciona la piel y el tejido muscular del tórax, hasta el esternón.

Se saca un embrión, se pone boca arriba y se gira sobre su lateral derecho. Se busca el páncreas, que se ve como un punto blanco a través de la piel, justo debajo del bazo. Se rasga la piel con las pinzas justo en ese punto, quedando expuestas las yemas pancreáticas, las cuales se extraen por disección. Así se procede para cada embrión, que se va sacando uno a uno del útero de la madre. Las yemas se ponen en un eppendorf y se añade PBS para lavarlas y eliminar otros tejidos que hayan arrastrado. Se centrifugan a 800 r.p.m. 5 min a 4°C y se descarta el sobrenadante. A continuación se procede a hacer los extractos celulares de las mismas o se congelan a -80°C para extraer RNA para hacer una RT-PCR.

4.4. Extractos celulares totales en condiciones nativas.

Se han hecho extractos celulares totales de células INS-1 partiendo de cultivos de dichas células y de yemas pancreáticas previamente aisladas.

En el caso de los extractos de INS-1, se parte de un cultivo confluyente al 80% crecido en un T-flask de 75 cm². Se aspira el medio de cultivo y se lava dos veces con PBS frío. Se pone el frasco de cultivo en hielo y se añade 5 ml de PBS frío, rascando suavemente con el rascador. Se añade más PBS para recoger el máximo número posible de células y se pasa a un Falcon de 50 ml. Apartar una alícuota con un poco de suspensión para ver los núcleos con Hoechst.

Centrifugar a 1000-1300 rpm y retirar el sobrenadante. Tiene que quedar un pellet totalmente seco.

En el caso de yemas recién aisladas o congeladas, habría que proceder en hielo.

En ambos casos se añadirían 300 µl de tampón de lisis a 4°C y 12 µl de cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Solution for protease inhibition, de Roche). El tampón de lisis estaría compuesto por 10 mM HEPES pH 8.2 (Sigma), 50 mM NaCl (Merck), 5 mM MgCl₂ (Prolabo) y 1 mM DTT (Invitrogen). Resuspender muy bien.

A continuación se sonica la muestra en hielo mediante un sonicador (Dr. Hielscher, GMBH). Dar tres pulsos de 5 min de 0.8 ciclos y 80% de amplitud. Entre pulso y pulso la muestra se mete en hielo para evitar la posible degradación del extracto. Una vez finalizada la sonicación hay que esperar a que se enfríe el extracto, manteniéndolo en hielo durante 10 min. Mientras se añade Hoechst hasta una concentración final de 5 µg/ml a una alícuota de la muestra y se compara en el microscopio de contraste de fases con la muestra que teníamos antes de la sonicación, para ver si las células se han lisado.

Se pasa la suspensión celular a un eppendorf estéril, intentando recoger el máximo con una pipeta automática. La suspensión debe estar fuera del hielo el mínimo tiempo posible.

Y por último se centrifuga a 14.000 r.p.m. 15 min a 4°C. Alicuotar (20 µl extracto/tubo) y se pone la fecha. Guardar a -80 °C, excepto una alícuota en la

que se determinará la concentración de proteína del extracto por el método de Bradford.

4.5.Extractos de proteínas nucleares.

Este protocolo tiene 2 partes:

1. Extracción de núcleos.

Se parte de un cultivo confluyente al 80% crecido en un T-75. Se aspira el medio de cultivo y se lava dos veces con PBS frío. Se pone el frasco de cultivo en hielo y se añade 5 ml de PBS frío, rascando suavemente con el rascador. Se añade más PBS para recoger el máximo número posible de células y se pasa a un tubo cónico de 15 ml, manteniéndolas en hielo. Apartar una alícuota con un poco de suspensión para ver posteriormente los núcleos con Hoechst.

Centrifugar 5 min a 500 xg a 4 °C. Descartar el sobrenadante y deshacer el sedimento agitando suavemente durante 5 seg.

Coger una pipeta e ir añadiendo el tampón de lisis NP-40 muy poco a poco hasta llegar a 4 ml, mientras se golpea el sedimento suavemente con la mano. El tampón de lisis está constituido por Tris 10 mM pH 7.4 (Amresco), NaCl 10 mM (Merck), MgCl₂ 3mM (Prolabo) y 0.5% de Nonidet P-40 (Fluka).

Una vez añadido el tampón, continuar vorteando las células durante 10 seg más (este procedimiento permite la resuspensión uniforme e inhibe la formación de agregados). Incubar las células lisadas en hielo 5 min.

A continuación hay que centrifugar 5 min a 500 xg a 4 °C y eliminar el sobrenadante que contiene el RNA citoplasmático.

2. Extracción de las proteínas nucleares.

En primer lugar, resuspender los núcleos en 1 ml de tampón de lisis 0.5% NP-40. Observar los núcleos al microscopio tras teñirlos con Hoechst y compararlos con la suspensión celular original.

Seguidamente se centrifuga la suspensión 5 minutos a 1000 xg a 4 °C y descartar el sobrenadante.

Mientras vorteamos fuertemente para romper el núcleo, añadir gota a gota 100 µl de tampón para la extracción de proteínas nucleares. Este tampón se compone de NaCl 400 mM, Hepes 10 mM pH 7.9, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.1 mM, glicerol 5% y DTT 0.5 mM. Añadir a continuación 2 µl de PMSF 100 mM (concentración final de 2 mM) y pasar los 100 µl de la suspensión a un eppendorf.

Continuar la extracción durante al menos 30 min en hielo con agitación suave. A continuación se centrifuga la suspensión a 20000 xg durante 10 min a 4 °C. Se recupera el sobrenadante y se hacen alícuotas con los extractos de proteínas nucleares. Se mide la concentración de proteína por Bradford y se guardan rápidamente los extractos a -80°C.

4.6.Extractos proteicos citosólicos.

En primer lugar hay que preparar un tampón de homogeneización , constituido por sucrosa 250 mM (Prolabo), EDTA 4 mM (Sigma), Hepes 10 mM pH 7.4 (Sigma), EGTA 1 mM (Sigma) y cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Solution for protease inhibition, de Roche).

Todos los pasos se realizan a 2-4 °C. Hay que lavar las células 2 veces con la solución adecuada (PBS e inhibidores de proteasas). Añadir el volumen adecuado de tampón de homogeneización frío (1 ml para una placa Petri de 5.5 cm de diámetro). En primer lugar se añade la mitad del volumen (500 µl), se rascan las células con un rascador y se lava la placa con la otra mitad. Las

células se transfieren a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se sonicán con una intensidad de 1.2, durante 1 seg., 5 veces, a 4 °C. Se confirma la rotura de las células mediante el test del azul Tripán. Se pone un volumen de células rotas y otro de azul Tripán al 0.4%. Se mezcla bien y se mira bajo el microscopio.

Centrifugar el homogeneizado a 2500 rpm, durante 3 min a 4 °C. Descartar el sedimento (núcleo y células intactas). Centrifugar el sobrenadante a 100.000 g, 1 h a 4°C. El sedimento es la fracción particulada y el sobrenadante la fracción soluble correspondiente al citosol. Medir proteína mediante el método de Bradford y almacenar las muestras a -20 °C.

4.7. Permeabilización de células madre embrionarias indiferenciadas con estreptolisina-O.

Este protocolo procede de varios artículos del grupo del Dr. Collas (Hakelien et al., 2004; Hakelien et al., 2002).

En primer lugar se parte de 4×10^4 células (si se va a trabajar en placas de 24 pocillos) ó 12×10^3 (si son placas de 96 pocillos), previamente tratadas con poli-L-lisina (0.1 mg/ml).

A continuación se lavan las células 2 veces con tampón de Hanks's (HBSS, de Gibco) libre de calcio y magnesio, pues el calcio inhibe la actividad de la estreptolisina-O (SLO). El HBSS libre de calcio y magnesio lleva KCl 5.4 mM, KH_2PO_4 0.4 mM, NaHCO_3 4.2 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.3 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 149.4 mM, glucosa 5.5 mM y HEPES 8 mM.

A continuación se activa la SLO. Para ello se prepara una solución con 0.5 µl de SLO (Sigma), 49.5 µl de agua autoclavada fría y 50 µl de Solución I por pocillo, de tal forma que la concentración final de SLO sea de 200 ng/ml. La Solución I está compuesta por HBSS libre de calcio y magnesio, BSA 1mg/ml y DTT 100 mM, todo de Sigma. La solución con la SLO se mezcla en un eppendorf y se incuba 15 min a temperatura ambiente. Como control negativo se emplea 50 µl de agua autoclavada fría y 50 µl de Solución I por pocillo.

Seguidamente se añaden 100 μ l de la mezcla por pocillo y se incuba 30 min a 37°C en el incubador, y luego 30 min a 4°C. Se aspira la SLO y se lava 2 veces con HBSS.

Para asegurarse de que ha habido permeabilización se hace lo mismo en paralelo con una placa y se tiñe con yoduro de propidio (2 μ l de yoduro de propidio y 98 μ l de HBSS por pocillo). Se incuba 30 min a 4 °C y en oscuridad. Se lava con HBSS 2 veces y se observa la fluorescencia.

4.8. Incubación con el extracto proteico tras la permeabilización.

Tras permeabilizar las células se elimina la solución de SLO y se añaden 30 μ l de extracto proteico junto al sistema generador de ATP por pocillo. Este sistema lleva creatin fosfato 10 mM, 25 μ g/ml de creatin kinasa y 1mM de ATP, CTP, GTP Y UTP (Roche). El extracto se suplementa con un sistema regenerador de ATP (ATP, creatin kinasa y fosfocreatina, todo de Roche) y CTP, GTP y UTP pues la pérdida de los gradientes electroquímicos de membrana que se da al abrir los poros la estreptolisina-O impide que la célula regenere el ATP consumido, por lo que se ha de aportar externamente esta fuente de energía. Una vez añadido el extracto con el sistema generador de ATP hay que incubar 1h a 37 °C. Los controles llevarán en lugar de extracto, HBSS y sistema generador de ATP.

A continuación se añaden 275 μ l de medio DMEM (Gibco), 10 % FCS (Biochrom), 2 mM de CaCl₂ (Prolabo) e incubar 2 h a 37° C. Se aspira el medio con alto contenido en calcio, se añade el medio normal y se mantiene en cultivo.

4.9.Introducción de proteínas en células madre embrionarias indiferenciadas o cuerpos embrionarios mediante Chariot.

Chariot (Active Motif) es un sistema de introducción de proteínas basado en un pequeño vector peptídico llamado Pep-1. Pep-1 es un pequeño péptido portador anfipático, con tres dominios: uno hidrofóbico, otro hidrofílico y una secuencia espaciadora. El dominio hidrofóbico es rico en triptófano, su diana es la membrana y forma interacciones hidrofóbicas con las proteínas. El dominio

hidrofílico es rico en lisina y mejora la introducción de la molécula y la solubilidad del péptido vector. La secuencia espaciadora separa los dos dominios anteriores y contiene un residuo de prolina que mejora la flexibilidad y la integridad de ambos dominios.

Chariot no es citotóxico y se ha demostrado que mediante él se pueden introducir proteínas en las siguientes líneas celulares: 293, CEM-SS, NIH/373, Jurkat, CHO, LLC-PK, HS-68, COS-7, C2C12, PC-12, NCI-H295, NRK, HeLa, MDA-MB-231, HepG2, CV-1. SIGC, Arabidopsis. Se puede usar tanto en células adheridas a un sustrato como en suspensión y es un proceso independiente de la presencia de suero. Por otra parte se ha demostrado que puede mediar la introducción de moléculas a 4 °C, lo cual descarta la posibilidad de que estén entrando las proteínas vía endosómica.

La base de Chariot radica en el establecimiento de un complejo no covalente estable entre las proteínas y los péptidos mediante interacciones hidrofóbicas. Este complejo estabiliza la proteína, protegiéndola de la degradación durante la introducción y preservando su función. Una vez adicionado el complejo a las células, rápidamente se internaliza, disociándose el péptido portador de la proteína. El péptido portador se localiza en el núcleo celular donde se degrada, dejando la proteína libre para que vaya a su orgánulo diana. En condiciones de cultivo estandar, Pep-1 localiza en menos de 10 min en el núcleo de células humanas HS-68, fibroblastos murinos NIH-373 o células Cos.

El protocolo puesto a punto en esta tesis es el siguiente:

En primer lugar hay que sembrar las D3 o las células de los cuerpos embrionarios disgregados en placas tratadas multiwell de 24 pocillos de Costar (Corning). Dichas placas deben estar previamente gelatinizadas con gelatina al 0.2% en PBS durante 30 min. Se deben sembrar 2.5×10^4 células por pocillo y dejarlas en cultivo durante 16-20 h de manera que al iniciar la transfección la confluencia de las células sea del 40%.

Se preparan para cada pocillo dos eppendorfs, cada uno con un volumen final de 50 μ l. En el primero se pone la muestra (extracto celular, por ejemplo), tal que su contenido de proteína sea de 1 μ g (debe haber 1 μ g de proteína por cada 200 μ l de reacción) y se completa el volumen con PBS. A continuación el Chariot se sonica en el baño de ultrasonidos durante 1 min. En el eppendorf 2 se pone 2 μ l de Chariot (Active Motif) y 48 μ l de agua destilada autoclavada y se mezclan los 50 μ l del eppendorf 1 sobre los del eppendorf 2 pipeteando suavemente. Se deja incubando a temperatura ambiente durante 30 min. Durante la puesta a punto del método se probaron distintos controles negativos, tanto la incubación del extracto en ausencia de Chariot como la incubación con PBS en ausencia de Chariot y extracto, no observándose reprogramación con ninguno de ellos y funcionando por tanto como controles negativos.

A continuación se lavan las células con PBS una vez y se añaden los 100 μ l de la mezcla suavemente, dejando caer por la pared del pocillo. Seguidamente se añaden 100 μ l de medio de cultivo sin suero y sin LIF y se deja 2 horas a 37°C y un 5% de CO₂ en el incubador.

Después se añade 1 ml de medio de diferenciación completo y se cultiva normalmente en el incubador. A las 48 h se tripsiniza y se pasa a una placa tratada multiwell de 6 pocillos, (Costar). En ocasiones es necesario volver a hacer una tripsinización y sembrar en una placa tratada de 100 mm de diámetro (TPP) cuando la confluencia llega al 80%.

4.10. Tinción con X-Gal .

Previamente a la tinción hay que preparar varias soluciones:

- Solución fijadora: PFA al 4%
- X-gal a una concentración de 50 μ g/ μ l de DMSO o DMF. Guardar a -20 °C máximo 1 mes y protegerlo de la luz. (Sigma)
- Solución A: 400 mM de Ferricianuro Potásico (Sigma)
- Solución B: 400 mM de Ferrocianuro Potásico (Sigma)
- Solución C: 200 mM de MgCl₂ (Prolabo)

Estas 3 soluciones se conservan a -20°C .

En primer lugar se elimina el medio de las placas y se lavan 2 veces con PBS. Se retira el PBS y se fijan con paraformaldehído al 4% durante 10 min a temperatura ambiente. El PFA (Sigma) se prepara en campana, para ello se cogen 80 ml de PBS (si es filtrado, mejor) y se calienta en un vaso de precipitados a 70°C , aproximadamente. Se añaden 4 g exactos de PFA y se agita con una mosca hasta disolución. Se prepara una solución saturada de NaOH (Merck) y se añade gota a gota hasta que la solución esté transparente. Se ajusta el pH hasta 7.4-7.6 y se afora a 100 ml con PBS.

Se retira el fijador y se lava 3 veces con PBS. Se retira el PBS y se añade la solución de tinción. La solución de tinción se compone (por cada ml) de 10 μl de Solución A, 10 μl de Solución B, 10 μl de Solución C, 20 μl de X-gal y se completa hasta 1 ml con PBS.

Incubar a 37°C durante 0.5-20 h, protegiendo las placas de la deshidratación con parafilm y en oscuridad. Por último se observa al microscopio, las células positivas se ven de color azul.

4.11. Revelado de la peroxidasa.

En primer lugar se fijan las células con PFA al 4 % durante 30 min a temperatura ambiente y a continuación se elimina el PFA lavando con PBS 3 veces consecutivas.

Seguidamente se trata con tritón (Merck) al 0.2 % durante 15 min y se lava 2 veces con PBS.

Se disuelve una pastilla de DAB (Sigma) en 1 ml de agua destilada y se añade inmediatamente cubriendo las células. Se deja que se produzca el revelado observando al microscopio (aproximadamente de 15 a 20 min). En esta reacción el agua oxigenada actúa como un sustrato enzimático y el DAB es el donante de

electrones. Como resultado el DAB se oxida y forma un precipitado coloreado marrón e insoluble. Se para la reacción lavando con agua.

Por último se analiza al microscopio óptico.

4.12. Técnicas inmunocitoquímicas.

El día anterior al que se quiere hacer la inmunocitoquímica se siembra en placa multiwell de 6 pocillos de Costar (Corning) 5×10^4 células β -INS-1 o 2.5×10^4 células ESC-D3.

En primer lugar se aspira el medio y se lava con PBS. A continuación ya pueden fijarse las células con paraformaldehído (PFA) al 4%. Se incuba 10 min con el PFA al 4% a temperatura ambiente en agitación suave. A continuación se elimina el PFA y se lava con PBS 2 veces durante 5 min cada una a temperatura ambiente y en agitación suave. Seguidamente se sigue el protocolo pertinente para detectar la insulina.

- **Inmunocitoquímica de insulina.**

Se añade una solución de bloqueo hecha en PBS y se deja incubando 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave. La solución de bloqueo se compone de: albúmina de suero bovino (Sigma) al 1%, un 3% de suero preinmune del animal en el que está hecho el anticuerpo secundario (Jackson Immunoresearch) y tritón X-100 (Merck) al 1%.

El anticuerpo primario se diluye (dilución 1:200) en la solución de bloqueo pero sin tritón, ya que puede desnaturalizar el anticuerpo. Se incuba toda la noche, a 4°C en agitación suave. El anticuerpo primario usado es anti-insulina de ratón, monoclonal (IgG)(Sigma).

Al día siguiente se lavan las células con PBS durante 10 min, a temperatura ambiente. Mientras se diluye 125 veces el anticuerpo secundario en una solución

de PBS con albúmina de suero bovino al 1%, y suero del animal del anticuerpo secundario al 1%.El anticuerpo secundario es un anti IgG de ratón-FITC desarrollado en cabra (Sigma).

Se incuba 45 min a temperatura ambiente y con agitación suave, en oscuridad.

Se lava con PBS 5 min, tres veces para eliminar el anticuerpo secundario que no está unido al primario.

Se añaden 0.56 μ l de Hoechst/ml de PBS (la solución stock es de 1 μ g/ μ l), de forma que la concentración final sea de 1 μ M, se incuba 5 min, y se visualiza el marcaje en el microscopio.





RESULTADOS

1. Permeabilización de las células madre embrionarias de ratón D3 con estreptolisina-O.

En una primera aproximación se intentó utilizar el método puesto a punto por el grupo del Dr. Collas (Hakelien et al, 2004). En éste se reprogramaron fibroblastos fetales de rata con extractos celulares de INS-1, una línea tumoral de célula β , permeabilizando con estreptolisina-O. En nuestro ensayo se partió de células madre embrionarias de ratón D3 para permeabilizar con 200 ng/ml de estreptolisina-O, tal y como había sido descrito por este grupo. Para la reprogramación se utilizaron extractos celulares de células INS-1.

Como control para comparar las señales de expresión se usaron células D3 cultivadas en monocapa durante 6 días con medio condicionado de INS-1. En estas condiciones, nuestro laboratorio había descrito la inducción del gen de la insulina II (Roche et al., 2005b). Se determinó y se estudió la expresión de diferentes marcadores de célula β y neuroectodermo mediante PCR, tales como insulina, Pdx-1 e Isl-1. Los resultados (fig.14A) muestran la expresión de dichos marcadores, confirmando resultados preliminares (Roche et al., 2005b). También se observa la expresión del gen constitutivo GAPDH (fig.14B).

En cambio, no se observó la expresión de ninguno de estos genes en las células D3 permeabilizadas con estreptolisina-O e incubadas con extracto de INS-1 (fig.14C), así como tampoco del gen constitutivo GAPDH (fig.14D).

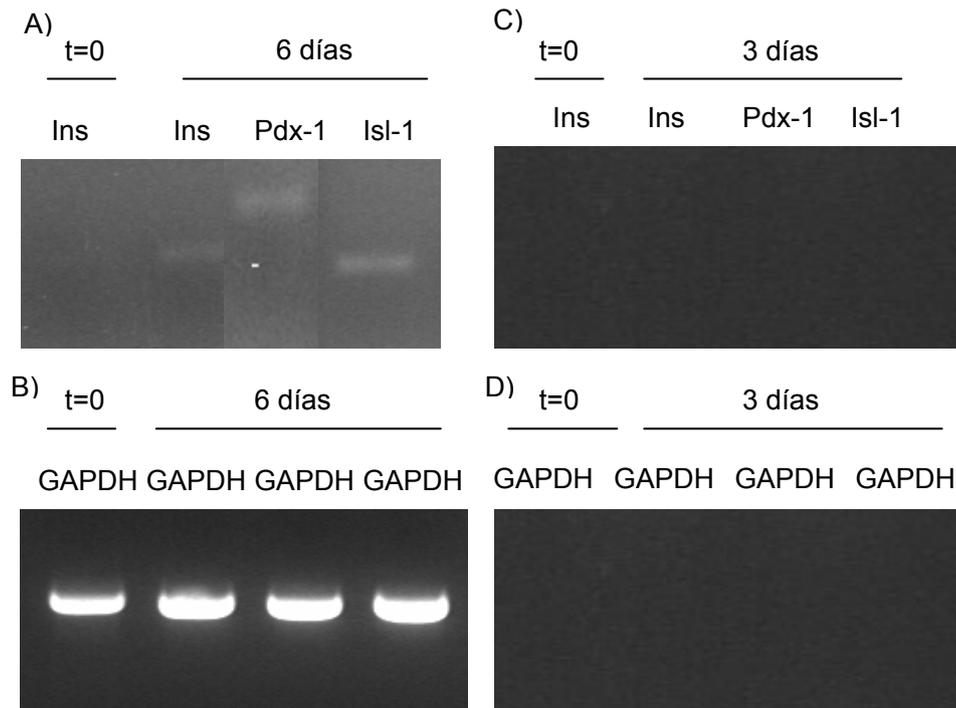


Fig. 14. Análisis por PCR de la expresión de marcadores de célula beta y neuroectodermo tras la permeabilización con 200 ng/ml de estreptolisina-O. A). Expresión de los genes de la insulina, Pdx-1 e Isl-1 al inicio y tras 6 días de cultivo con medio condicionado de INS-1. B). Expresión de GAPDH en las mismas células y con las mismas condiciones. C). Expresión de los mismos marcadores en células D3 permeabilizadas con estreptolisina-O tras 3 días de cultivo con el medio habitual de diferenciación. D) Expresión de GAPDH en esas células y en las mismas condiciones de permeabilización.

El elevado porcentaje de células flotando hizo sospechar que el tratamiento con estreptolisina-O podía causar una alta tasa de muerte celular. Por ello se decidió medir la actividad de la GAPDH. Dicha proteína es una enzima citosólica que proporciona información sobre la integridad celular. Para ello se midió la actividad enzimática de la GAPDH en extractos totales de D3 tratados o no con estreptolisina-O, a los 3 días de la permeabilización o del inicio del cultivo, respectivamente. Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Condiciones	Act. GAPDH (U/ μ g proteína)
D3 m. indiferen.	1.62 \pm 0.20
D3 m.condicionado	1.29 \pm 0.02
D3 SLO	0.44 \pm 0.07

Tabla 3. Relación entre las distintas condiciones de cultivo y la actividad de la GAPDH registrada por triplicado para cada una de ellas. Los datos representan la media junto a la desviación estándar correspondiente (n=3). SLO= estreptolisina-O.

Como se puede observar en la tabla los datos obtenidos se corresponden con actividades de la GAPDH bajas, pues las D3 no son células glicogénicas, a diferencia de las células musculares, por ejemplo. Cuando las D3 se permeabilizaron con la estreptolisina-O hubo un descenso significativo (del 70%, aproximadamente) en la actividad de la GAPDH respecto a las condiciones de cultivo sin permeabilización habituales, ya sea manteniendo las D3 indiferenciadas o induciendo la diferenciación. Los datos parecen sugerir una pérdida de proteínas de las células durante la permeabilización, y la activación de procesos de muerte celular, tal y como confirman experimentos complementarios de inclusión de azul tripán. Por otra parte las células pegadas que habían sobrevivido a la permeabilización se despegaban de la placa a los 5 días de cultivo y tampoco eran viables.

Por último, se hicieron pruebas a distintas concentraciones de estreptolisina-O. A una concentración menor de la toxina, a 100 ng/ml, las células no incluían el azul tripán, sugiriendo problemas para permeabilizar. Y cuando se aumentaba la concentración a 400 ng/ml, el doble de la que aparecía en la bibliografía (Hakelien et al, 2004), todas las células flotaban y se teñían con el colorante, lo que podría estar relacionado con un aumento de la muerte celular.

Los resultados parecen indicar una alta sensibilidad de las células a la estreptolisina-O, sugiriendo la posibilidad de probar otros mecanismos de reprogramación.

2. Elección de un método alternativo para introducir proteínas en el interior celular.

Vistos los resultados obtenidos sobre la viabilidad celular con la estreptolisina-O decidimos explorar otros métodos alternativos. Hasta ahora los métodos comúnmente utilizados para la introducción de proteínas en las células eran la microinyección, la electroporación y la toxina estreptolisina-O. Todos estos métodos presentaban sus limitaciones. En el caso de la microinyección el usuario requería ciertas habilidades técnicas además de tener la limitación de trabajar con una única célula cada vez que se aplicaba la técnica. Respecto a la electroporación y la permeabilización con estreptolisina-O, las limitaciones eran la baja viabilidad de las células y la baja especificidad del método, pues una vez rota la membrana celular no se podía controlar lo que entraba ni lo que salía de la célula.

Otra alternativa presentada recientemente es la de los dominios de transducción de proteínas (PTD), que son secuencias peptídicas cortas que permitían la entrada en las células cuando se añadían al medio de cultivo. Los dominios de transducción de proteínas más comúnmente estudiados son tres: los derivados del factor de transcripción homeótico Antennapedia de *Drosophila*, la proteína VP22 del virus del Herpes simple (HSV), y el activador transcripcional TAT del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)-1. Para el dominio TAT, la introducción de una proteína en el interior celular requería la unión covalente entre ambos, teniendo que estar además dicha proteína desnaturalizada previamente para aumentar la accesibilidad al interior celular.

Ello hizo que los investigadores estudiaran la estructura de otros PTDs que se daban en la naturaleza y diseñaran PTDs sintéticos más eficaces que los primeros, capaces de introducir moléculas activas en las células in vivo. De esta manera, sacaron al mercado Chariot (Acitve Motif), un sistema de introducción de proteínas basado en un pequeño péptido señalizador llamado Pep-1. La diferencia con respecto a otros PTDs tanto naturales como sintéticos, es que no necesitaba estar unido covalentemente a la proteína que se pretendía introducir.

Además no hacía falta desnaturalizar la proteína introducida en la célula, sino que ésta accedía al interior celular en su conformación activa y funcional, y finalmente no hacía falta fijar las células durante el proceso.

Chariot es fácil de usar, los pasos a seguir según el fabricante aparecen esquematizados en la figura siguiente:



Fig. 15. Esquema del procedimiento a seguir para introducir las proteínas en las células con el Chariot.

El protocolo que se detalla a continuación es el recomendado a nivel comercial (ver anexo) para trabajar con células adheridas a un soporte, aunque también se puede hacer con células en suspensión:

1. En primer lugar se parte de 3×10^5 células (si se va a trabajar con células adheridas a una placa de 6 pocillos) ó de 5×10^4 células (para una placa de 24 pocillos).
2. Se mezcla el Chariot con las proteínas o péptidos que se quieren introducir y se incuba durante 30 min. para que se forme el complejo. En el caso de que vaya a hacerse sobre células crecidas en una placa de 6 pocillos las proteínas deberían diluirse en un volumen de 100 μ l de PBS (la mitad de volumen si se trata de placas de 24 pocillos), añadiéndole este mismo volumen de Chariot diluido en PBS, y teniendo, por tanto, un volumen final de 200 μ l (100 μ l para las placas de 24 pocillos). Si se quieren introducir proteínas hay que partir de una cantidad de 0.5 a 1 μ g de proteína por reacción, y si son

anticuerpos, de diluciones de 1/500, 1/1000 y 1/2000 respecto al volumen final de reacción.

3. Aspirar el medio de las células cultivadas y lavar con PBS.
4. Cubrir las células con 200 μ l del complejo (100 μ l si es una placa de 24 pocillos) y añadir 400 μ l de medio sin suero (100 μ l si es una placa de 24 pocillos). Incubar durante 1 h a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂.
5. Añadir el medio completo a las células. No eliminar el complejo Chariot-proteína. Continuar incubando a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂ de 30 min a 2 h.
6. Procesar las células para hacer ensayos de detección o para observar las variaciones. Las células pueden fijarse u observarse directamente.

Teniendo en cuenta este protocolo experimental procedimos a incubar las células D3 en presencia de Chariot. Con respecto a la estreptolisina-O observamos que Chariot no era citotóxico, puesto que las células no se despegaron durante los tiempos en los que la estreptolisina-O presentaba un alto porcentaje de células flotando. Así mismo, el 100% de las células excluyeron el azul tripán, lo cual sugirió que el uso de Chariot no afectaba a la viabilidad de las células y que podía usarse como método alternativo para introducir proteínas en ellas.

El objetivo principal de este trabajo era reprogramar células madre embrionarias a células productoras de insulina. Como Chariot cumplía el requisito de viabilidad, que no se daba con estreptolisina-O, y casaba con el objetivo de esta tesis, procedimos a poner a punto este método para nuestro sistema experimental.

3. Puesta a punto del método Chariot para reprogramar células madre embrionarias de ratón D3.

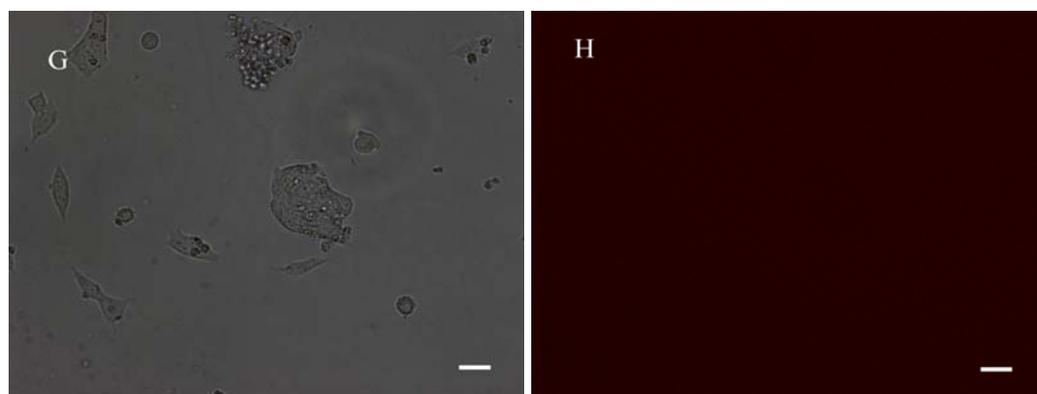
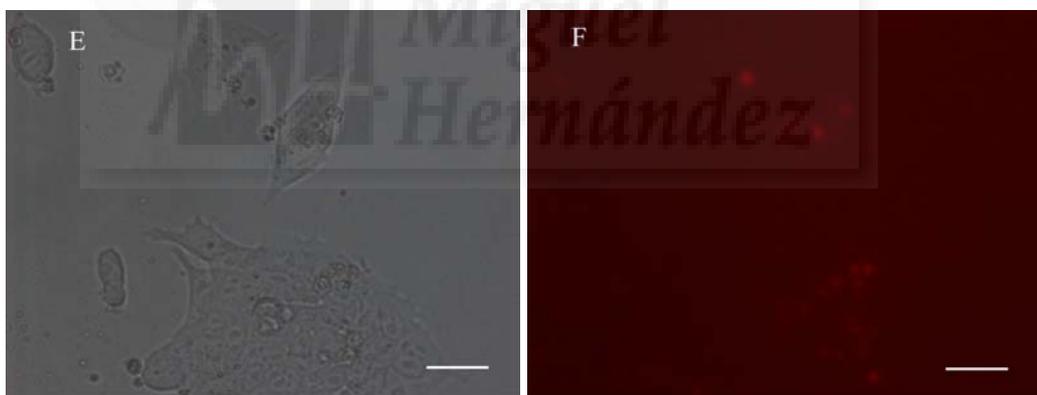
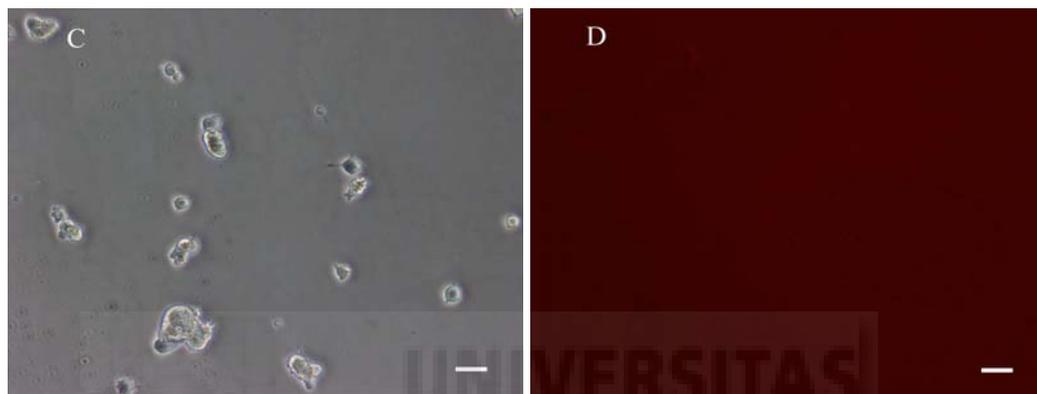
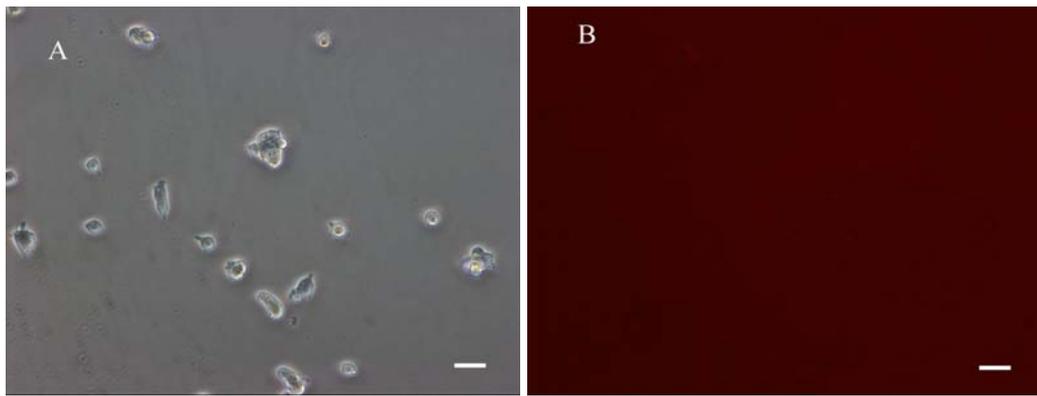
La idea inicial era tener controladas todas las variables que pudieran influir sobre el rendimiento final del proceso de reprogramación. Aunque el fabricante daba una serie de instrucciones, como se verá más adelante, éstas diferían de lo que nosotros observamos en nuestras condiciones experimentales.

3.1. Cinética temporal.

El primer factor a considerar era el tiempo de incubación de los extractos proteicos con las células diana.

En una primera aproximación se partió de 4×10^4 células crecidas en placas de 24 pocillos (el orden de concentración de células era el recomendado por el fabricante de acuerdo al tipo de soporte empleado) y una dilución 1/200 respecto al volumen de reacción de un anticuerpo anti IgG de conejo-Cy3 (Jackson) desarrollado en cabra y revelado con rodamina. Se decidió utilizar anticuerpos ya que, debido a su alto peso molecular, éstos presentarían una cinética de entrada más lenta y que serviría como punto de partida para diseñar experimentos en los que se añadirían extractos proteicos con una gran variedad de pesos moleculares.

Como control negativo se empleó un cultivo con igual número de células, incubado también con la misma dilución de anticuerpo, pero con PBS, en vez de Chariot. Como se observa en la figura 16, a las 24 h desde el inicio de la incubación de las células con el complejo se observó la entrada de parte de los anticuerpos, pero no fue hasta las 48 horas cuando se constató claramente la máxima entrada de los anticuerpos en la célula.



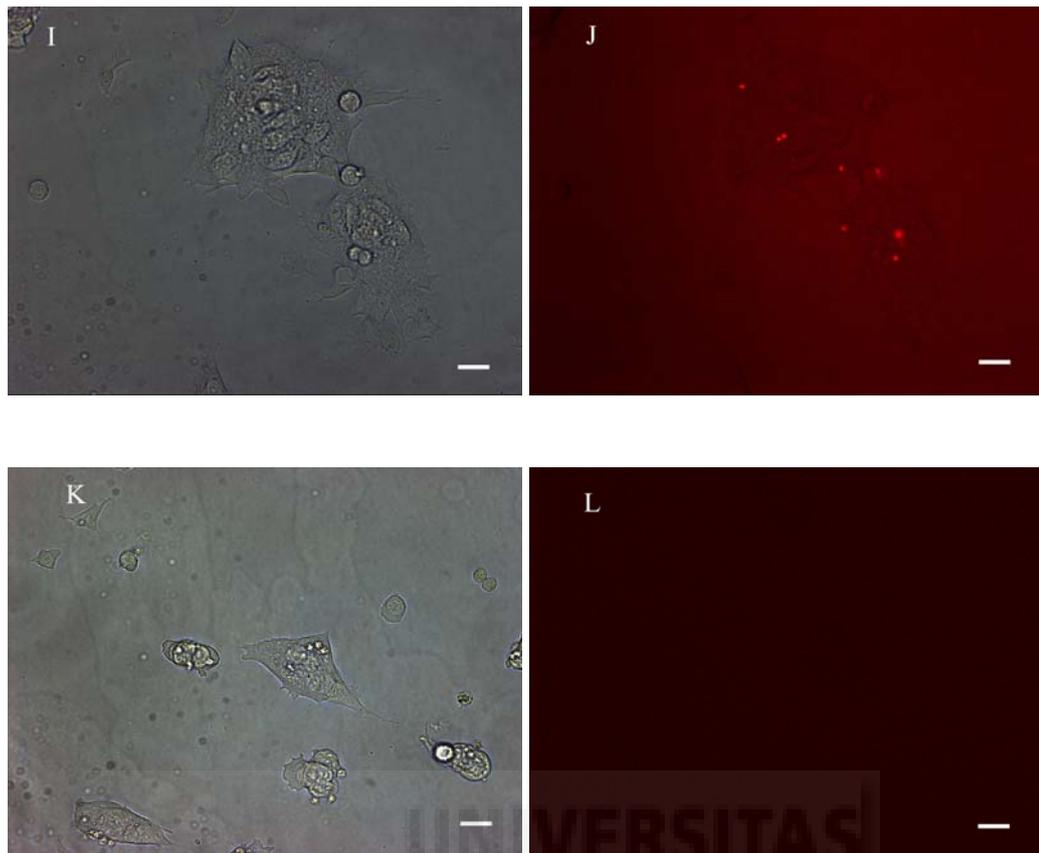


Fig. 16. Cinética temporal de entrada de un anticuerpo con una dilución 1/200 en células D3. A y B) Células D3 a tiempo cero en transmisión y fluorescencia, respectivamente. Se considera tiempo cero el inicio de la incubación del complejo con las células D3. C y D) Células D3 cultivadas en ausencia de Chariot a tiempo cero en transmisión y fluorescencia, respectivamente. F y J) Micrografías de fluorescencia de células D3 incubadas con Chariot en presencia de anticuerpo 1/200 a las 24 y 48 h respectivamente. E e I) Imágenes de transmisión correspondientes a F y J. H y L) Micrografías de fluorescencia de células D3 incubadas en ausencia de Chariot a las 24 y 48 h respectivamente. G y K) Imágenes de transmisión correspondientes a H y L. Fotografías tomadas a 40x (E-F). Fotografías tomadas a 20x (A-D y G-L). Barra de tamaño equivalente a 10 μm .

En los experimentos realizados se apreció variabilidad, constatándose una entrada del anticuerpo en un porcentaje alrededor del 10%.

Para descartar un efecto del tipo de anticuerpo y de la dosis se llevó a cabo la siguiente aproximación, en la que se aumentaba la concentración de ambos anticuerpos, pasando de una dilución 1/200 a una dilución 1/100, 1/50, 1/25 y 1/12.5 partiendo de las condiciones iniciales comentadas anteriormente. El nuevo anticuerpo era un anti IgM de ratón-TRITC (Jackson) desarrollado en cabra y revelado con rodamina. Los resultados vuelven a mostrar de nuevo que la entrada más efectiva ocurre a las 48 horas incluso para altas concentraciones de anticuerpo. En este caso también se observó variabilidad en los experimentos, con porcentajes de entrada entre el 5 y el 15 %.

DILUCIÓN ANTICUERPO	ENTRADA MÁXIMA	
	24 h	48 h
1/200	-	+
1/100	-	+
1/50	-	+
1/25	-	+
1/12.5	-/+	+

Tabla 4. Resultados observados con 2 anticuerpos distintos para las diferentes diluciones (n=3).

+: Máxima entrada observada en las células.

-/+ : Entrada parcial de los anticuerpos en las células.

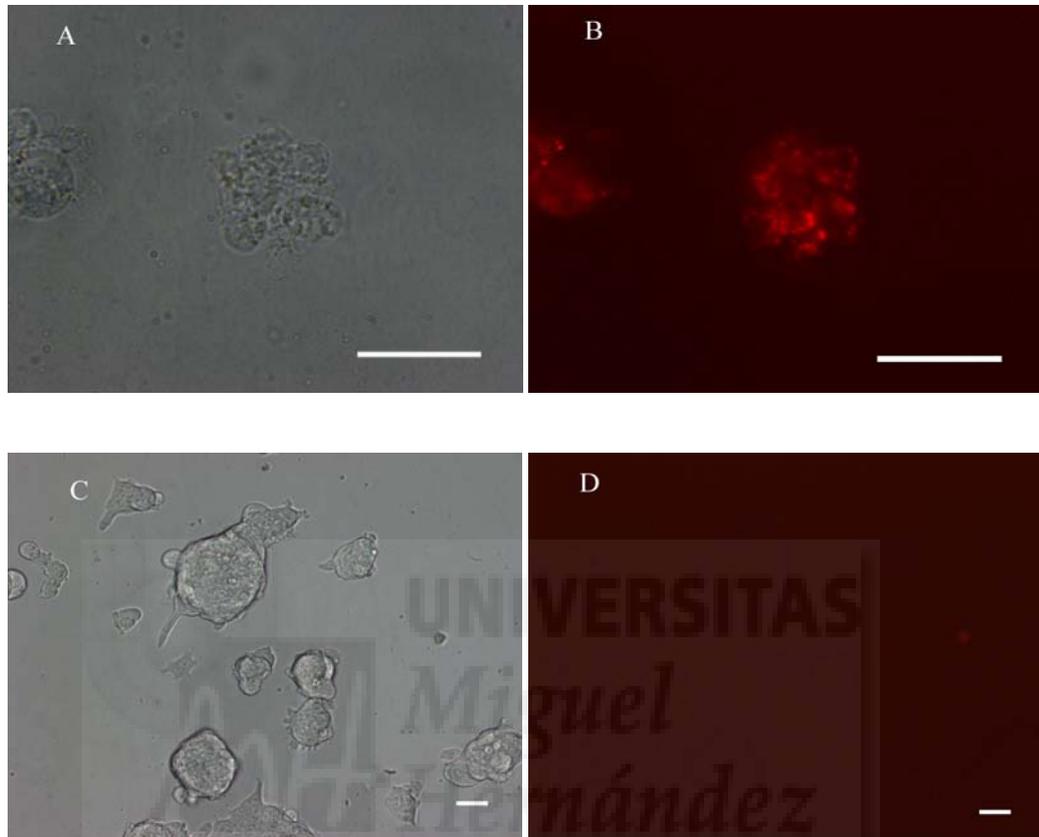


Fig. 17. Cinética temporal de entrada de un anticuerpo anti IgM de ratón-TRITC con una dilución 1/12.5 en las D3. B) Micrografía de fluorescencia de células D3 incubadas con Chariot en presencia de anticuerpo 1/12.5 a las 48h. A) Imagen de transmisión correspondiente a B. D) Micrografía de fluorescencia de células D3 incubadas en ausencia de Chariot a las 48h. C) Imagen de transmisión correspondiente a D. Fotografías tomadas a 40x (A-B). Fotografías tomadas a 20x (C-D). Barra de tamaño equivalente a 10 μm .

Estos resultados difieren bastante de los que cabría esperar de acuerdo a las indicaciones del fabricante, pues se recomendaba hacer diluciones de los anticuerpos de 1/500, 1/1000 ó 1/2500. Además se indicaba que a las 3 h tras la incubación de las células con el complejo ya se podían hacer ensayos de detección del anticuerpo, reduciéndose este tiempo a 1h30 min-2h si se trataba de péptidos y de 2h-3h en el caso de proteínas. Esto podría explicarse debido a un mayor grado de impermeabilidad del tipo celular con el que se está trabajando (células madre embrionarias de ratón) comparado con los tipos celulares con las que el fabricante puso a punto el método (consultar el apartado anterior).

3.2. Cinética temporal dependiente del peso molecular.

El siguiente factor a considerar en la puesta a punto del método fue el peso molecular de las proteínas a introducir en las células. El estudio anterior ya había demostrado la posibilidad de entrada de los anticuerpos (alto peso molecular) a las células a las 48 h. Se pretendía verificar si esta cinética era repetitiva con otras proteínas de menor peso molecular.

Para ello se partió de unos cultivos con las mismas condiciones de número de células y soporte que en el caso anterior. Se incubaron las células en presencia de 3 proteínas que cubrían un amplio rango de pesos moleculares: el anticuerpo anti IgM de ratón-TRITC (Jackson) desarrollado en cabra (150-200 kDa), con una dilución 1/12.5 (ver apartado anterior), 3 μ g de β -galactosidasa (Sigma) (119 kDa) y 3 μ g de peroxidasa (Sigma) (50 kDa).

Como se observa en la figura 18, las células se tiñeron positivamente tras efectuar el revelado de la β -galactosidasa y la peroxidasa a las 24 h de la incubación con el complejo Chariot-proteína. Las cinéticas de entrada con estas proteínas son más rápidas que las observadas con el anticuerpo, cuyo máximo era a las 48 h, observándose un porcentaje de entrada del 5 % para el anticuerpo y alrededor del 20% para la β -galactosidasa y la peroxidasa.

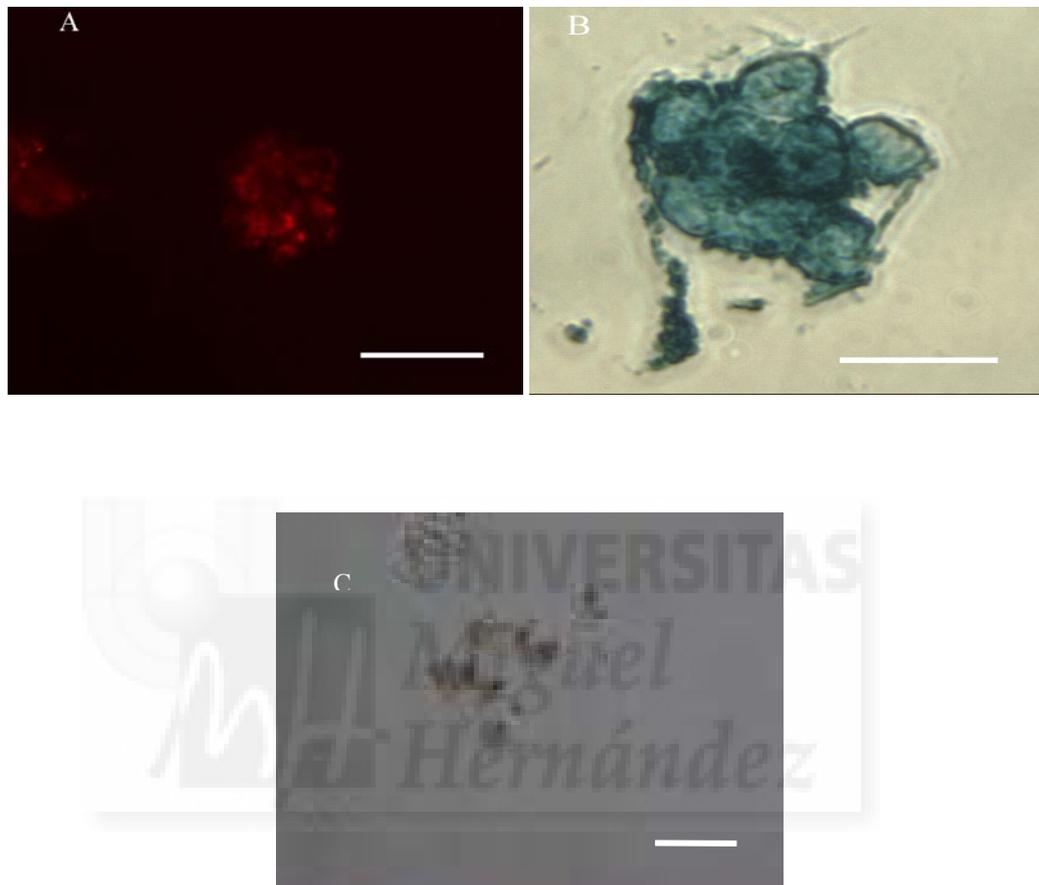


Fig. 18. Cinética temporal de entrada de proteínas de distinto peso molecular en las células D3. A) Micrografía de fluorescencia de células D3 incubadas con un anticuerpo de 150-200 kDa a las 48 h. B y C) Micrografías de transmisión de células D3 incubadas y reveladas con β -galactosidasa (119 kDa) y peroxidasa (50 kDa), respectivamente, a las 24 h. Fotografías tomadas a 40x (A y B) y 20x (C). Barra de tamaño equivalente a 10 μ m.

Tomando conjuntamente los resultados, éstos parecen sugerir que, para pesos moleculares intermedios y pequeños la velocidad de entrada de proteínas en las células incubadas con Chariot es más rápida y el porcentaje de entrada sensiblemente mayor.

3.3. Tipo celular.

A la vista de los resultados obtenidos con las células madre embrionarias de ratón D3 y su disparidad respecto a las indicaciones del fabricante, se optó por intentar reproducirlos con otro tipo celular. Para ello se utilizó la línea celular INS-1, que es una línea tumoral de insulinoma de rata que ha demostrado ser un buen modelo para estudios de célula β pancreática.

Para ello se partió de unos cultivos con las condiciones de número de células y soporte anteriormente establecidas, incubándose en presencia de 3 μ g de β -galactosidasa, una proteína de peso molecular intermedio (ver apartado anterior). Como en el caso anteriormente descrito para las D3, no fue hasta las 24 h tras la incubación cuando se consiguió detectar la entrada de la proteína en las células (fig.19), consiguiéndose un porcentaje de entrada del 100%.

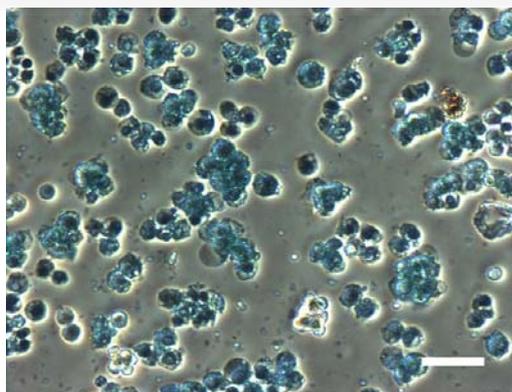


Fig. 19. Entrada de β -galactosidasa en las células de insulinoma de rata INS-1. Micrografía de transmisión de células INS-1 incubadas y reveladas en presencia de 3 μ g de β -galactosidasa (119 kDa) a las 24 h. Fotografía tomada a 20x, barra de tamaño equivalente a 10 μ m.

Nuevamente nuestros resultados parecen diferir de las indicaciones del fabricante: 3 h de incubación. Hay que señalar que el fabricante hizo los ensayos con 18 líneas celulares. Todo esto sugiere que cada laboratorio debe poner a punto estos parámetros cinéticos y buscar para cada caso particular el tiempo óptimo para el que se observa la mayor incorporación de proteína.

3.4. Concentración de proteína.

Otro factor a considerar en la puesta a punto del método fue la concentración de proteína y su influencia en la velocidad de entrada en las células.

Respecto a la concentración de las proteínas, el fabricante recomendaba hacer diluciones de 1/500, 1/1000 o 1/2500 respecto al volumen final de incubación en el caso de los anticuerpos, usar de 0.5 a 1 μg en el caso de proteínas de peso molecular intermedio y de 100 a 500 ng en el caso de péptidos o proteínas de bajo peso molecular. Así mismo, el número de células de partida depende del soporte en el que se cultiven, de forma que las células deben estar confluentes entre el 40 y el 50 % para conseguir los mejores resultados de entrada. Así, por ejemplo, para placas de 24 pocillos se recomienda partir de 5×10^4 células. Esta densidad celular (o similar) se ha confirmado como la óptima para la entrada de proteína, puesto que se obtiene una distribución más homogénea que si se emplean densidades celulares mayores.

Se realizaron todos los experimentos con un número de 4×10^4 células en todos los casos, correspondiente a una densidad celular del 40 %. De hecho, en el caso descrito de los anticuerpos (ver apartado de cinética temporal) se observó la máxima entrada a las 48 h y sólo cuando se concentró a una dilución de 1/12.5 se observó una entrada parcial a las 24 h. Un número similar de células INS-1 incubadas en las mismas condiciones y con los mismo anticuerpos no mostraron entrada a las 48 h incluso a altas concentraciones (1/25 y 1/12.5). Estos resultados sugieren particularidades estructurales en las membranas de las células diana y deben ser tenidas en cuenta al poner a punto el sistema.

Para proteínas de peso molecular medio y bajo y con el número de células recomendado por el fabricante tiene lugar la entrada de las proteínas en las células a las 24 h de la incubación aún partiendo de 0.5 μg de proteína, coincidiendo en este caso con las recomendaciones del fabricante.

PROTEÍNA	CANT.	Nº CÉL.	TIPO CELULAR	ENTRADA MÁXIMA
B-Galactosidasa	0.5 μg	4×10^4	D3	24 h
	1 μg	4×10^4	D3	24 h
	2 μg	4×10^4	D3	24 h
	3 μg	4×10^4	D3	24 h
	0.5 μg	3×10^4	INS-1	24 h
	3 μg	4×10^4	INS-1	24 h
Peroxidasa	0.5 μg	4×10^4	D3	24 h
	1 μg	4×10^4	D3	24 h
	2 μg	4×10^4	D3	24 h
	3 μg	4×10^4	D3	24 h

Tabla 5. Relación entre la concentración de proteína y el número de células de partida con respecto a la velocidad de entrada de proteínas de bajo y medio peso molecular en las células.

Cant. Cantidad de proteína diluida en el volumen final de reacción. (200 μl). Nº cél.: Nº de células de partida.

Los resultados sugieren que, en lo que respecta a las proteínas de alto peso molecular (por ejemplo los anticuerpos) presentan una velocidad de incorporación lenta (48 h) incluso a altas concentraciones. Por otro lado, parece intuirse una mayor permeabilidad de las células D3 frente a las células INS-1 respecto a la entrada de éstos.

En el caso de la introducción de proteínas de pesos moleculares bajos e intermedios se observó que no había ningún efecto de la concentración sobre la

velocidad de incorporación (24 h), aunque sí del tipo celular, observándose un porcentaje de entrada 5 veces mayor para las células INS-1 que para las D3.

3.5. Afinidad.

Otro factor importante a considerar sobre todo si se trabaja con muestras heterogéneas de proteínas es la posibilidad de que haya una afinidad mayor de unas proteínas que otras por el Chariot a la hora de entrar en las células.

Se realizó también una aproximación en la que 4×10^4 células cultivadas en placas de 24 pocillos se incubaron en presencia de 1 μg de extractos celulares totales obtenidos de células INS-1 mezclados con un anticuerpo anti conejo-FITC desarrollado en cabra (dilución 1/200), usando como control negativo un cultivo con igual número de células, incubado también con la misma mezcla de proteínas con idéntica concentración, pero con PBS en lugar de Chariot.

Como se observa en la figura 20, a las 60 h tras la incubación no se ve fluorescencia en el interior celular, a pesar de que en casos anteriores los anticuerpos entraban a las 48 h.

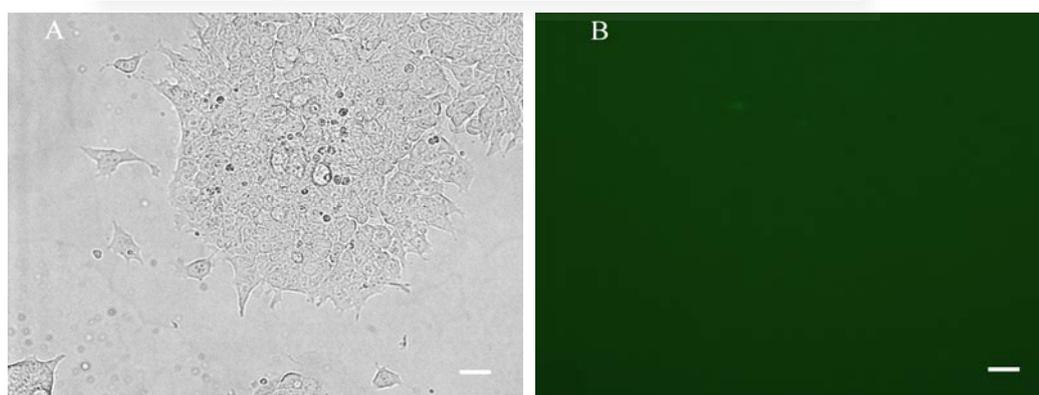


Fig. 20. Entrada de un anticuerpo (dilución 1/200) mezclado con extractos proteicos de INS-1 (1 μg) en células D3. A y B) Micrografías de células D3 a las 60 h de la incubación con el complejo en transmisión y fluorescencia. Fotografías tomadas a 20x, barra de tamaño equivalente a 10 μm .

Los resultados sugieren que la ausencia de fluorescencia intracelular a las 60 h de la incubación con los extractos y el anticuerpo podría deberse a una mayor

afinidad por el Pep-1 de las proteínas de un tamaño medio o pequeño del extracto que los anticuerpos, resultando en la no incorporación de las moléculas de mayor peso molecular.

3.6. Resumen de las modificaciones de las condiciones comerciales del Chariot.

Finalmente y a modo de resumen, se comentan las condiciones de utilización del Chariot para nuestro sistema y puesta a punto en nuestro laboratorio (ver anexo).

En primer lugar se decidió utilizar placas de 24 pocillos como soporte de las células para optimizar el uso de los reactivos. Por tanto, se siguieron las indicaciones del fabricante a la hora de partir de $4-5 \times 10^4$ células por pocillo, con una densidad celular óptima. Como sustrato se empleó gelatina al 0.2 % en PBS, el doble de la concentración utilizada habitualmente, para asegurar que las células no iban a despegarse con los lavados.

Por otra parte, en vez de diluir el Chariot en PBS, como indicaba el fabricante, se prefirió hacerlo en agua destilada autoclavada, para intentar evitar posibles interferencias por el tampón.

Respecto a la concentración de proteína a emplear, el fabricante sugería partir de 0.5 a 1 μg de proteína de peso molecular medio por reacción y de 100 a 500 ng de proteína de bajo peso molecular y, en el caso de usar anticuerpos, hacer diluciones de 1/500, 1/1000 y 1/2000. Como se ha mencionado antes, en el caso de las proteínas de medio y bajo peso molecular no se observó ningún efecto de la concentración sobre la velocidad de incorporación de la proteína para el rango de concentraciones recomendadas, manteniéndose constante en torno a las 24 h, independientemente del tipo celular empleado. Cabe destacar, por otra parte, que en el caso de los anticuerpos no se observó entrada de la proteína a las diluciones recomendadas. La velocidad de entrada se mantuvo constante a las 48 h para diluciones iguales y menores a 1/200. Y tuvo que bajarse la dilución hasta 1/12.5 para poder ver una entrada parcial a las 24 h

desde la incubación con el complejo Chariot-proteína, difiriendo notablemente de las diluciones sugeridas por el fabricante.

Si nos remitimos a las condiciones comerciales de tiempo de entrada de las proteínas tras la incubación:

- Anticuerpos: 3 h.
- Proteínas de peso molecular intermedio: 2-3 h.
- Péptidos: 1h30 min-2 h.

Concluiremos en que son totalmente distintas a las obtenidas experimentalmente, por lo que se sugiere la puesta a punto de estos parámetros cinéticos para cada tipo celular objeto de estudio.

4. Efecto de los ácidos nucleicos y las proteínas sobre la reprogramación.

4.1. Efecto de los ácidos nucleicos sobre la reprogramación.

El siguiente punto a verificar fue saber si los ácidos nucleicos que se aislaban conjuntamente con las proteínas podían jugar algún papel en la reprogramación celular.

Para ello se diseñó el siguiente experimento: en primer lugar había que partir de un cultivo de INS-1 al 80-90 % de confluencia y hacer un extracto celular total en condiciones nativas. En este extracto se medía la concentración de proteína, ARN y ADN (tabla 6). A una alícuota de 20 μ l se le hacía una extracción de ARN (0.59 μ g/ μ l) y de ADN (0.5 μ g/ μ l). A continuación se tomaban alícuotas del extracto de 20 μ l y cada una se trataba con una concentración de RNAsa de 20, 30, 40, 50 y 60 μ g/ml por una parte, y por otra con concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 μ g/ml de DNAsa. En ambos casos se mantenía el tratamiento con la enzima durante 1h a temperatura ambiente y 1h a 4 °C para parar la reacción. Seguidamente se extraía el ARN de las muestras tratadas con

RNAsa y se hacía una RT-PCR de β -actina (gen de expresión constitutiva) para determinar la presencia e integridad del ARN en la muestra. Por otra parte se extraía ADN de las muestras tratadas con DNAsa y se hacía una PCR con idéntico fin.

	ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ARN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Conc. en extracto nativo	0.90	0.76	2.33
Conc. tras aislamiento	0.50	0.59	-

Tabla 6. Determinación de las concentraciones de ADN, ARN y proteína una vez hecho el extracto (sin ningún tratamiento) y tras el aislamiento.

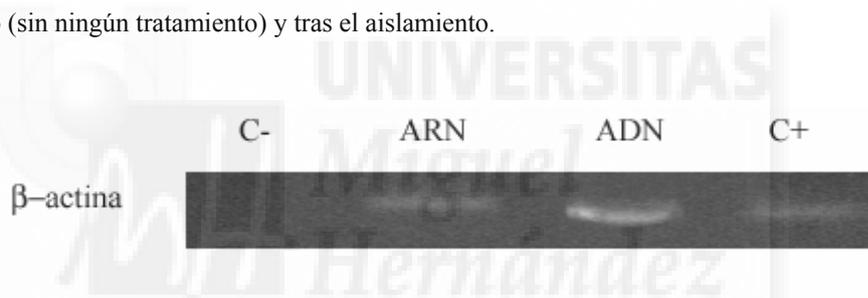


Fig. 21. Productos de PCR de los controles de ARN y ADN de los extractos celulares totales de células INS-1. Condiciones de PCR: 62 °C, 30 ciclos. Tamaño de amplicón: 467 pb. C-: Control negativo (agua DEPC), C+: ARN extraído de INS-1.

Como parecen sugerir los resultados, la extracción celular total en condiciones nativas es muy específica para proteínas, no preservando la integridad de los ácidos nucleicos frente a la liberación de nucleasas endógenas. Ello se pone de manifiesto con el bajo rendimiento obtenido tras el aislamiento de ácidos nucleicos (20 veces menor que el obtenido en una extracción normal siguiendo un protocolo específico) en los extractos y la baja señal obtenida por PCR.

De hecho, en la figura 22, se observa como si se hace una electroforesis en condiciones no desnaturizantes la señal de ácidos nucleicos es indetectable tras una extracción celular total en condiciones nativas, incluso si se aísla el ARN.

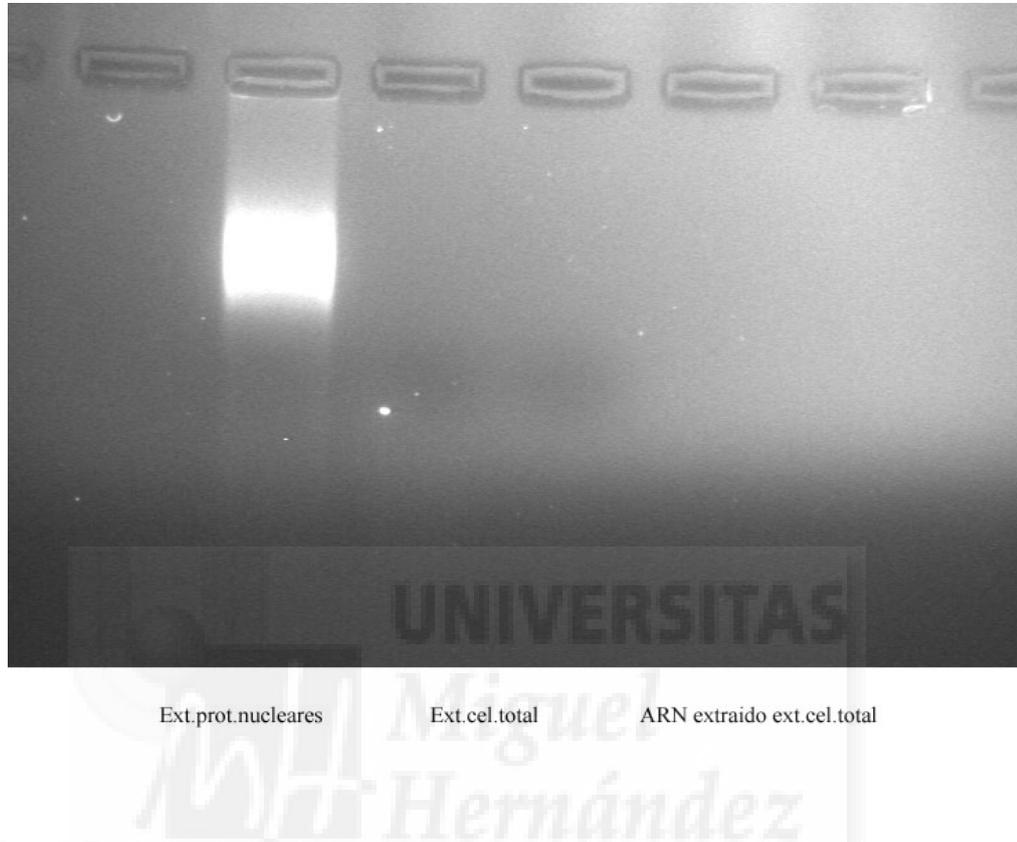


Fig. 22. Electroforesis de ácidos nucleicos en condiciones no desnaturalizantes de un extracto de proteínas nucleares, un extracto celular total en condiciones nativas y ARN aislado de dicho extracto.

En las siguientes tablas se resume las concentraciones de ARN y ADN en los extractos celulares totales en condiciones nativas tras el tratamiento con distintas concentraciones de RNAsa y DNAsa.

RNAsa $\mu\text{g/ml}$	20	30	40	50	60
ARN $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0.13	0.13	0.17	0.09	0.09

Tabla 7. Determinación de las concentraciones de ARN en el extracto celular tras el tratamiento con RNAsa.

DNAsa $\mu\text{g/ml}$	100	200	300	400	500
ADN $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0.26	0.23	0.37	0.15	0.08

Tabla 8. Determinación de las concentraciones de ADN en el extracto celular tras el tratamiento con DNAsa.

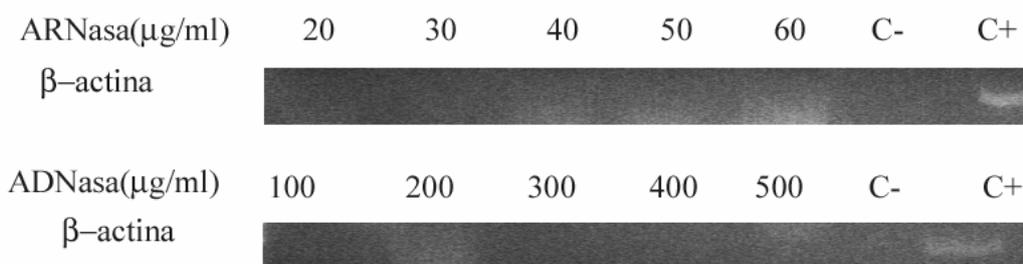


Fig. 23. Productos de PCR del extracto celular total tratado con concentraciones crecientes de RNAsa o DNAsa. Idénticas condiciones de PCR que en el caso anterior.

C-: Control negativo (agua DEPC), C+: ARN extraído de INS-1.

Como se desprende de las tablas 7 y 8, a partir de 50 y 500 $\mu\text{g/ml}$ de RNAsa y DNAsa respectivamente, se consigue la eliminación del ARN y del ADN de la

muestra, siendo por tanto, las concentraciones óptimas de RNAsa y DNAsa a emplear en posteriores experimentos.

A continuación se estudió el efecto conjunto de la RNAsa con la DNAsa sobre los ácidos nucleicos de los extractos celulares totales en condiciones nativas. Para ello se emplearon las concentraciones óptimas de de RNAsa y DNAsa (50 y 500 $\mu\text{g/ml}$), se dejaron actuar durante 1 h a temperatura ambiente y 1 h a 4°C.

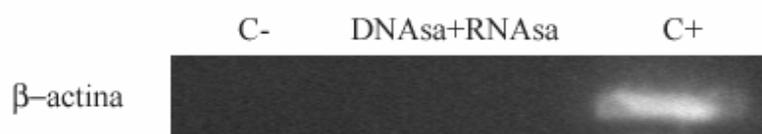


Fig. 24. Productos de PCR de los extractos celulares totales de células INS-1 tratados conjuntamente con DNAsa y RNAsa. Idénticas condiciones de PCR que en casos anteriores. C-: Control negativo (agua DEPC), C+: ARN extraído de INS-1.

Como se puede observar en la figura anterior, queda confirmado que al usar conjuntamente la RNAsa y la DNAsa a dichas concentraciones la señal correspondiente es indetectable por PCR, obteniendo la eliminación total de los ácidos nucleicos del extracto.

4.2. Efecto de las proteínas sobre la reprogramación.

A continuación, mediante una electroforesis de proteínas, se estudió el grado de integridad de las proteínas según el protocolo de extracción empleado. Como se observa en la siguiente figura, las proteínas del extracto celular total en condiciones nativas no parecen estar degradadas, presentando bandas nítidas en los geles de poliacrilamida.

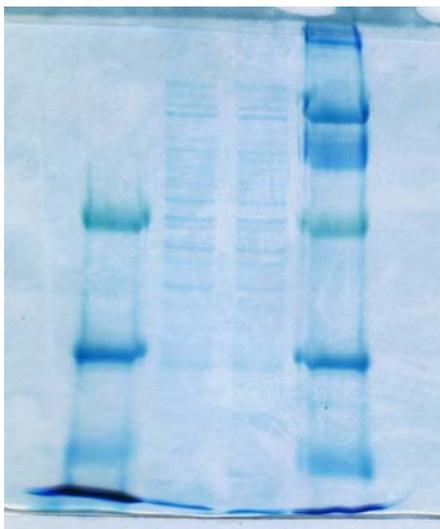


Fig. 25. Electroforesis de proteínas de un extracto celular total en condiciones nativas. En el primer pocillo hay un marcador de bajo peso molecular, en los 2 siguientes el extracto proteico (25 µg de proteína, n=2) y en el último un marcador de alto peso molecular.

Con la idea de estudiar el papel de las proteínas en los procesos de reprogramación se ensayaron varios agentes que pudieran alterar su integridad: el tratamiento a 100 °C durante 5 min y el tratamiento con proteinasa K. La proteinasa K es una proteinasa muy inespecífica y por ello se ensayó la dosis que pudiera alterar la integridad de las proteínas.

En primer lugar se tomaron alícuotas de 25 µg de extracto celular total nativo (sin inhibidores de proteasas) de las cuales 2 eran controles y se ensayaron 3 concentraciones de proteinasa K con otras 3 muestras, incubando las muestras con la proteinasa K durante 1 h a 37 °C, congelándolas posteriormente. El primer control fue el extracto celular sin tratar y congelado a tiempo cero. El segundo fue la muestra sin tratar pero incubada durante 1 h a 37 °C, para estudiar la existencia de una degradación espontánea por la actividad de las proteasas endógenas del extracto. Las concentraciones de proteinasa K fueron de 50, 100 y 200 µg/ml.

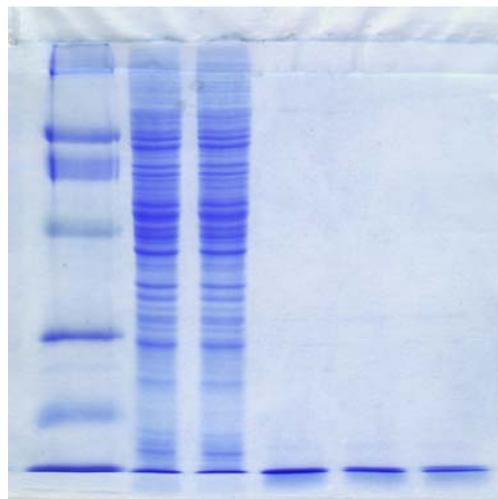


Fig. 26. Efecto de la proteinasa K sobre la integridad de la proteína del extracto mediante electroforesis de proteínas. El primer pocillo hay un marcador de alto peso molecular, en los siguientes un control a tiempo cero, un control a $t=1$ h a 37 °C y extracto tratado con 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ de proteinasa K durante 1 h a 37 °C (25 μg de proteína).

De los resultados obtenidos se deduce que las proteasas endógenas parecen no inducir cambios en los patrones de bandas. Sin embargo, la proteinasa K es muy potente, pues con la mínima concentración empleada (50 $\mu\text{g/ml}$) ya hay degradación total de las proteínas, evidenciada por una desaparición total de las bandas.

Seguidamente se estudió la estabilidad de los extractos frente a la degradación por las condiciones de manipulación. Para ello se partió de 2 extractos celulares totales nativos, uno sin inhibidores de proteasas y otro con inhibidores, con una cantidad fija de proteína (20 μg). De cada uno de ellos se congeló una alícuota de 15 μl a $t=0$, y otra se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 días. Además se apartaron 2 alícuotas más de cada extracto y se dejaron 1h a 37 °C, tratando una de ellas con 50 $\mu\text{g/ml}$ de proteinasa K y la otra no. De esta manera se comprobó el papel de los inhibidores para mantener la integridad de las proteínas incluso en presencia de la proteinasa K. Los inhibidores de proteasas a emplear y sus concentraciones finales fueron:

- PMSF: 10 $\mu\text{g/ml}$
- Leupeptina: 2.05 $\mu\text{g/ml}$

- Aprotinina: 4 $\mu\text{g/ml}$
- Pepstatina: 10 $\mu\text{g/ml}$
- Antipain: 10 $\mu\text{g/ml}$

TIEMPO	EXTRACTOS DE PROTEÍNAS	
	+ Inhibidores	- Inhibidores
0 min	20 μg	20 μg
1 h	20 μg	20 μg
1h (+ proteinasa K)	5.8 μg	0 μg
5 días	16.7 μg	12.5 μg

Tabla 9. Estudio de estabilidad de los extractos. En esta tabla se estudia la evolución del contenido de proteína del extracto frente al tiempo, en presencia o no de inhibidores de proteasas y de proteinasa K.

A la vista de los resultados se confirma la estabilidad de la muestra durante la manipulación experimental de los extractos en el tiempo habitual de manipulación (1 h) en condiciones extremas (37 °C) y la efectividad de los inhibidores de proteasas utilizados, que preservan en un 80% la integridad de las proteínas frente a las proteasas endógenas (un 20 % más que si no se usaran). Por otra parte, en presencia de una proteasa específica como es la proteinasa K, se mantuvo un 30% de la proteína inicial cuando se usaron los inhibidores de proteasas, degradándose la proteína en un 100% cuando no se usaron.

Por último, se ensayaron cultivos de células D3 a los que se les introdujo β -gal mediante el Chariot, tratándola con las concentraciones óptimas de RNAsa, DNAsa y proteinasa K obtenidas anteriormente para estudiar un posible efecto de dichas enzimas sobre el transporte de la proteína hacia el interior celular.

TRATAMIENTO EXTRACTO	MÁXIMA ENTRADA B-GAL
RNAsa (50µg/ml)	24 h
DNAsa (500µg/ml)	24 h
DNAsa+RNAsa (50 + 500 µg/ml)	24 h
Proteinasa K (50µg/ml)	-
100 °C, 5 min	+/- 24 h
Control	24 h

Tabla 10. Estudio del efecto de las enzimas para tratar los extractos proteicos sobre el transporte de las proteínas. Se estudia el tipo de tratamiento al que se ha sometido la β -galactosidasa (1 µg) la frente al tiempo en el que se ha detectado la máxima entrada de β -galactosidasa. +/-: Entrada parcial.

De la tabla 10 se desprende que no hay ningún tipo de inhibición en el transporte de las proteínas de peso molecular medio debido a las nucleasas con las que se tratarán los extractos proteicos en posteriores experimentos. También parece sugerir que las únicas moléculas que entran en las células y que podrían ejercer un efecto reprogramador son las proteínas, pues cuando actúa la proteinasa K la entrada es nula, dándose una entrada parcial a las 24 h al inactivar la proteína por desnaturalización térmica. De todas formas este punto será estudiado con más detalle en experimentos posteriores.

5. Reprogramación de células madre embrionarias de ratón D3 a células productoras de insulina.

5.1. Caracterización molecular.

Previamente a la aplicación del protocolo puesto a punto se procedió a la caracterización molecular del perfil de expresión génica tanto de la línea celular empleada (D3) como de las células cuyos extractos proteicos se iban a utilizar para la reprogramación (línea celular INS-1 y yemas pancreáticas de 16.5 días). Ello permitirá contrastar luego los resultados obtenidos con el perfil de expresión génica de las células reprogramadas, para ver qué genes se activan durante el proceso de reprogramación de las células D3.

5.1.1. Caracterización molecular de las células D3.

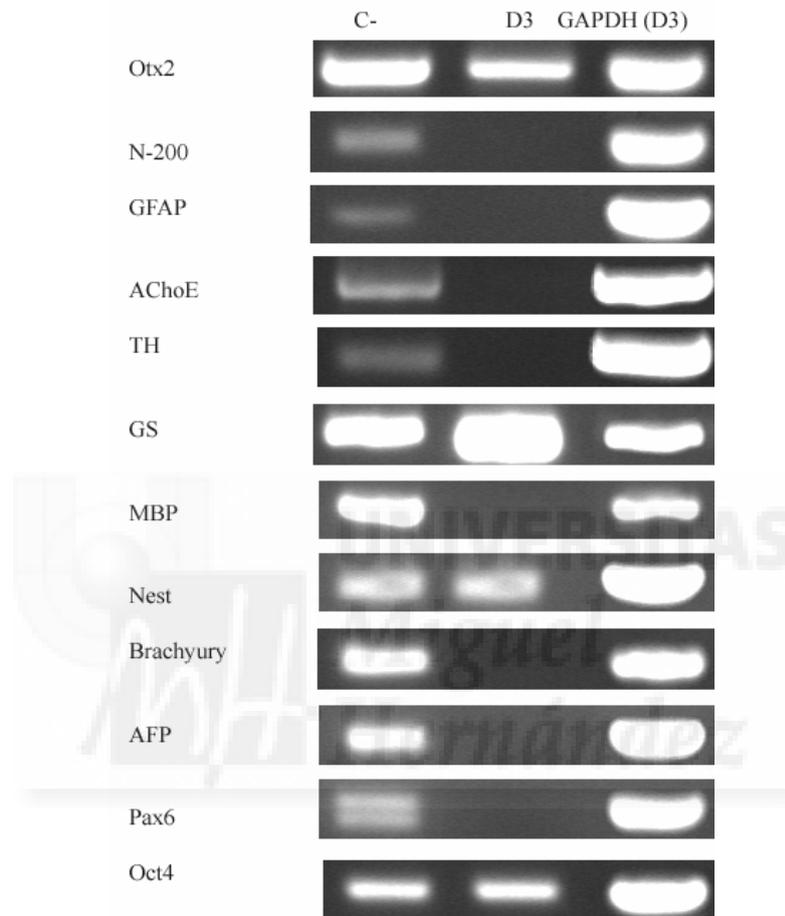


Fig. 27. Caracterización molecular de las células D3 de partida para la reprogramación (células diana). C+: Control positivo de la expresión del gen de interés (ojos de ratón adulto para Otx-2 y Pax-6; cerebro fetal de ratón de 16.5 días para N-200, GFAP, AChE, TH, GS, MBP y Nestina; EB de día 7 de D3 para Brachyury; EB de día 14 de R1 para AFP y ESC indiferenciadas de D3 para Oct4). GAPDH: Gen constitutivo empleado como control de la reacción en D3.

En primer lugar se procedió a la caracterización molecular de las células D3 en estado indiferenciado para tener una referencia en posteriores experimentos de reprogramación. Para ello se estudió la expresión de distintos genes marcadores de las capas embrionarias, distinguiéndose entre los marcadores de pluripotencialidad (como Oct4), los que se expresaban en ectodermo (Otx-2, N-200, GFAP, AChE, TH, GS, MBP y Nest), mesodermo (Brachyury), endodermo (AFP) y neuroectodermo y célula β (Pax-6). Como se observa en la figura 27, se detectó la expresión de los marcadores ectodérmicos Otx-2, GS y Nest en D3, así como de Oct-4, marcador de pluripotencialidad.

5.1.2. Caracterización molecular de las células INS-1.

Una vez caracterizadas molecularmente las D3 se procedió a la caracterización de las células INS-1, ya que éstas iban a proporcionar los extractos proteicos para la reprogramación.

En este caso se estudiaron los marcadores más significativos, centrándonos principalmente en endodermo definitivo. Se ampliaron los marcadores de endodermo a Foxa2 y Foxa3 (marcadores de endodermo primitivo y definitivo), Gata4 y Gata5 (marcadores de mesendodermo) y glucagón (marcador de célula α) y los de neuroectodermo y célula β a Isl-1, Pdx-1 e insulina.

Como se observa en la figura 28, las células INS-1 presentan un patrón de expresión englobado dentro del linaje endodérmico y con un alto grado de similitud con la célula β pancreática. Por ello consideramos este tipo celular como idóneo para realizar los experimentos preliminares de reprogramación celular.

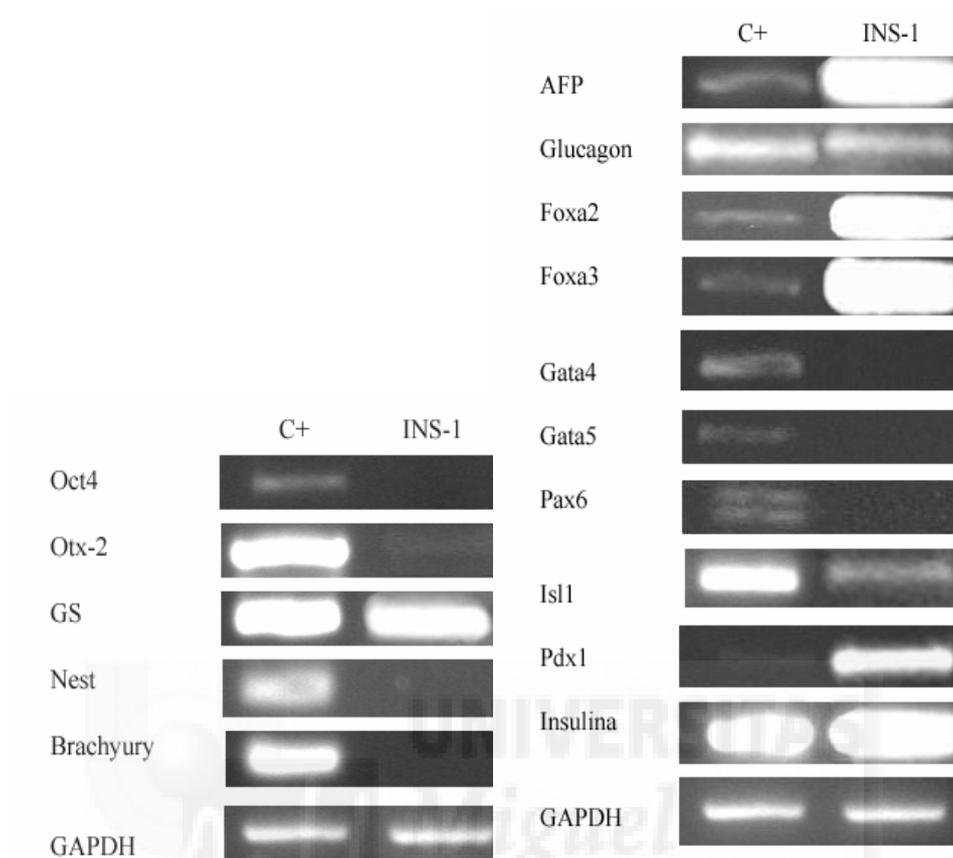


Fig. 28. Caracterización molecular de las células INS-1 (células donante). C+: Control positivo de la expresión del gen de interés (ESC indiferenciadas de D3 para Oct4; ojos de ratón adulto para Otx-2, Pax-6 y GAPDH; cerebro fetal de ratón de 16.5 días para GS y Nestina; EB de día 7 de D3 para Brachyury; EB de día 14 de R1 para AFP; células INS-1 para glucagón; hígado fetal de ratón de 16.5 días para Foxa2 y Foxa3; corazón fetal de ratón de 16.5 días para GATA4 y GATA5 e islotes para Isl-1, Pdx-1 e Insulina). GAPDH: Gen constitutivo empleado como control de la reacción en INS-1.

5.1.3. Caracterización molecular de yemas pancreáticas.

Seguidamente se estudió el perfil de expresión génica de las células de yemas pancreáticas de día 16.5 cuyos extractos proteicos se iban a usar también para la reprogramación.

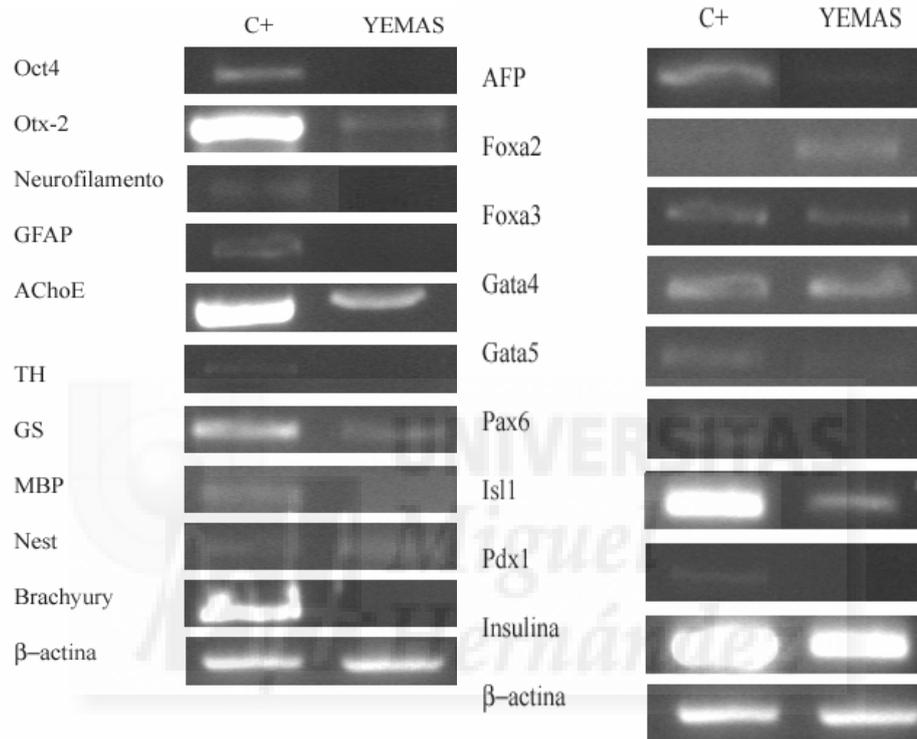


Fig.29. Caracterización molecular de las yemas pancreáticas (células donante). C+: Control positivo de la expresión del gen de interés (ESC indiferenciadas de D3 para Oct4; ojos de ratón adulto para Otx-2 y Pax-6; cerebro fetal de ratón de 16.5 días para Neurofilamento, GFAP, AChE, TH, GS, MBP y Nestina; EB de día 5 de D3 para Brachyury; EB de día 14 de R1 para AFP; hígado fetal de ratón de 16.5 días para Foxa2 y Foxa3; corazón fetal de ratón de 16.5 días para GATA4 y GATA5 ; islotes para Isl-1, Pdx-1 y β -actina y células INS-1 para insulina). β -actina: Gen constitutivo empleado como control de la reacción en yemas pancreáticas.

Se estudiaron los mismos marcadores que los empleados para la caracterización de las células D3, sustituyendo el N-200 por neurofilamento y ampliándose los de endodermo y neuroectodermo y células β como en el caso de las células INS-1. Como se observa en la figura 29, se detectó la expresión de los mismos marcadores que para las INS-1 (excepto Pdx-1), además de algunos marcadores ectodérmicos (Otx-2, AChE y Nestina) y endodérmicos (Gata4 y Gata5).

5.2. Reprogramación con extractos proteicos de INS-1.

5.2.1. Tipo de extracto.

Un punto clave en estos experimentos era averiguar si la reprogramación podía ser llevada a cabo por extractos obtenidos tras un fraccionamiento celular. La fracción nuclear tenía un evidente interés, ya que ésta albergaba factores de transcripción clave. Para ello se hicieron ensayos reprogramación en D3 con extractos totales, citosólicos y nucleares de INS-1.

Se hizo una PCR para observar la expresión del gen de la insulina a los 5 días de haber tratado las células D3 con Chariot más los correspondientes extractos proteicos. Como se observa en la figura 30, solo hay reprogramación cuando se emplea el extracto total, ya sea de INS-1 o de yemas pancreáticas de 16.5 días, siendo la banda correspondiente a las yemas pancreáticas la de mayor intensidad. Sin embargo, se observa una banda minoritaria con extractos nucleares y ausencia de banda con extractos citosólicos. No se ensayó con extractos nucleares o citosólicos de yemas porque el número de células era muy bajo y dichos extractos muy difíciles de obtener.

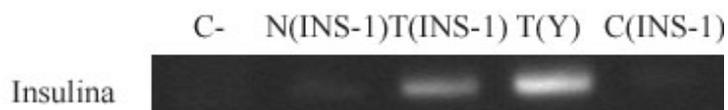


Fig.30. PCR del gen de la insulina en D3 reprogramadas con las distintas fracciones del extracto a los 5 días. C-:D3 no reprogramadas (sin Chariot e incubadas con PBS). N(INS-1):Extracto nuclear de INS-1. T(INS-1): Extracto total de INS-1. T(Y):Extracto total de yemas pancreáticas de 16.5 días. C(INS-1):Extracto citoplásmico de INS-1.

5.2.2. Reproducibilidad del protocolo de reprogramación en células D3 indiferenciadas con extractos de INS-1.

Aunque las yemas pancreáticas fueron las que rindieron resultados más consistentes en base a la expresión del gen de la insulina (ver la figura anterior) son un material relativamente difícil de conseguir. Por tanto se procedió a hacer experimentos de reproducibilidad del método de reprogramación mediante Chariot con extractos proteicos de células INS-1, de las que se puede conseguir más material biológico de una forma más sencilla.

Para ello se partió de 3×10^4 células por pocillo (P17), disgregadas y cultivadas en monocapa con una confluencia del 40%, en placas de 24 pocillos, incubadas a las 24 h con $1 \mu\text{g}$ de proteína en $200 \mu\text{l}$ de volumen de reacción. Se mantuvo un control negativo consistente en células cultivadas en idénticas condiciones pero en ausencia de Chariot y extractos de INS-1, añadiendo PBS en su lugar.

El estudio de la reproducibilidad del método se hizo mediante la detección por PCR del gen de la insulina e inmunocitoquímica de insulina en células a los 3 días de cultivo tras la reprogramación.

En la figura 31 se observa una banda débil de insulina, comparada con la banda del control positivo, confirmando resultados preliminares (ver figura anterior) Ello podría sugerir una reprogramación parcial de las células.

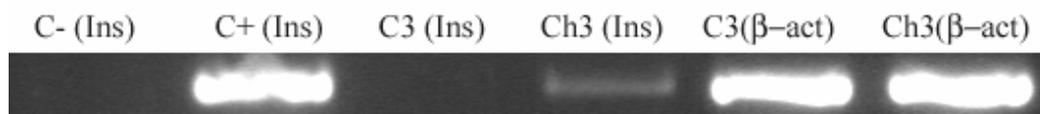


Fig.31. Análisis por PCR de la expresión de insulina en células D3 tras 3 días de la reprogramación. Condiciones de PCR: 60 °C, 32 ciclos (insulina); 62 °C.30 ciclos (β-actina). Tamaño del amplicón: 250 pb (insulina); 467 pb (β-actina) .C-(Ins): Control negativo de insulina (agua DEPC), C+(Ins): Control positivo de insulina (ADNc de INS-1), C3(Ins): Control de la reprogramación a día 3, Ch3 (Ins): Células reprogramadas mediante Chariot a día 3, C3 (β-act): Expresión de β-actina en el control de la reprogramación a día 3, Ch(β-act):: Expresión de β-actina en células reprogramadas mediante Chariot a día 3.

Respecto a las inmunocitoquímicas, se hizo un control de la técnica usando células INS-1 para la presencia de insulina, (fig. 32A y 32B) así como también se adicionó en uno de los pocillos sólo anticuerpo secundario, no observándose fluorescencia, de manera que se confirmó la especificidad del anticuerpo utilizado. Como se observa en la figura 32C, se ve un marcaje débil en todas las células de las inmunocitoquímicas del control a día 3. Ello podría deberse a una posible captación del medio de insulina exógena, procedente del suero del medio de cultivo tal y como se ha descrito en otras publicaciones (Rajagopal et al., 2003). Ello contrasta con las inmunocitoquímicas del Chariot a día 3 en las que se ve un marcaje de insulina perinuclear más intenso en todas las células, sugiriendo producción endógena de insulina, como se desprende también de los datos de la PCR (fig. 32E).

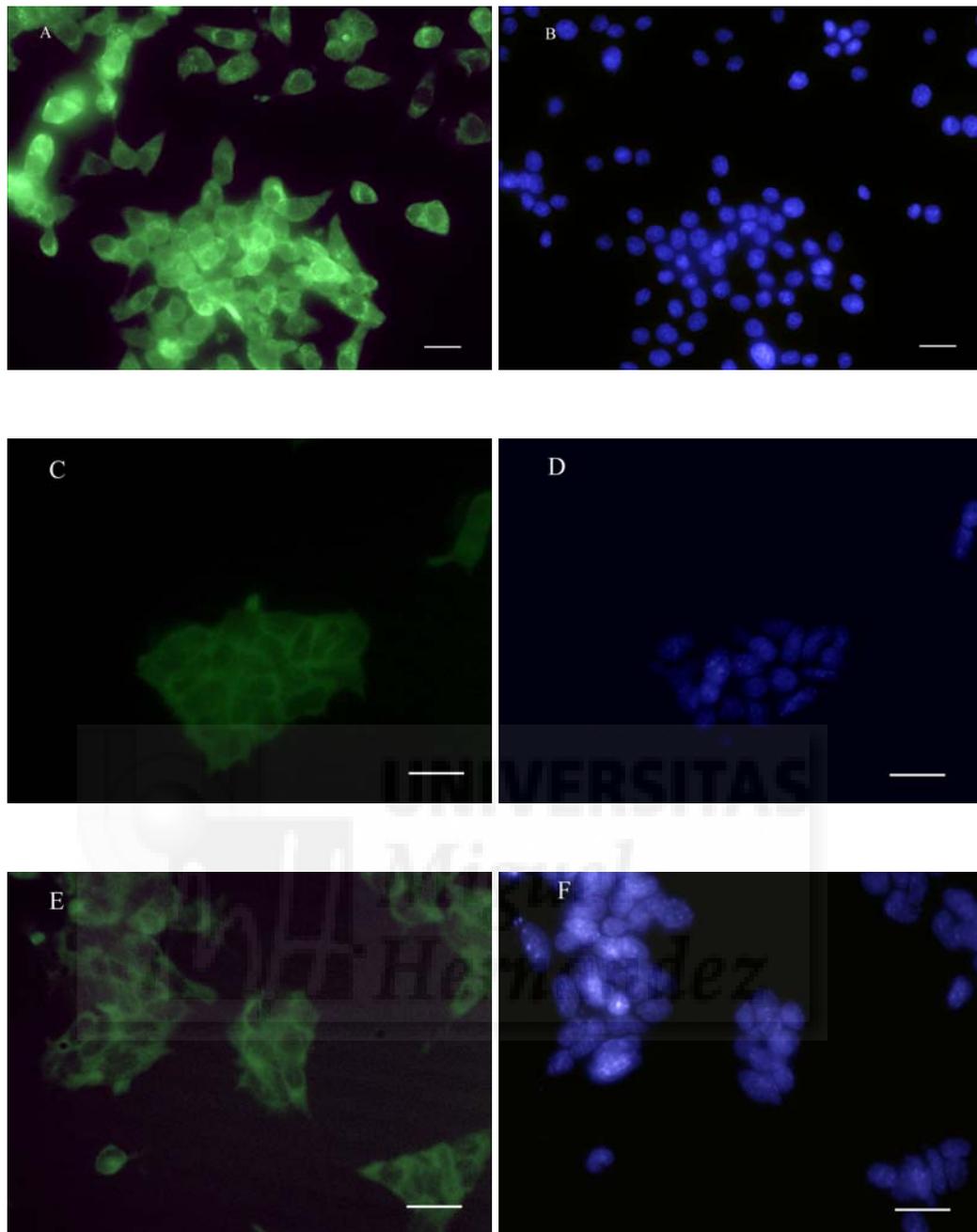


Fig. 32. Inmunocitoquímica de insulina en células D3 a día 3 tras la reprogramación con extractos proteicos de INS-1. A) Micrografía de fluorescencia de la inmunocitoquímica de insulina respectivamente en células INS-1, como control de la técnica. B) Micrografía de fluorescencia correspondientes a la imagen A, en la que los núcleos celulares están teñidos con Hoechst. C) Micrografía de fluorescencia de inmunocitoquímica de insulina en células D3 incubadas en ausencia de Chariot y extractos proteicos de INS-1 a día 3. (Control negativo de la reprogramación). D) Micrografías de fluorescencia de núcleos teñidos con Hoechst correspondientes a la imagen C. E) Micrografía de fluorescencia de inmunocitoquímica de insulina en células D3 incubadas en presencia de Chariot y extractos proteicos de INS-1 a día 3.

F) Micrografías de fluorescencia de núcleos teñidos con Hoechst correspondientes a la imagen E. Fotografías tomadas a 40x. Barra de tamaño equivalente a 10 μ m.

Aunque no se descarta que parte de la insulina detectada pueda provenir del medio de cultivo, la intensidad de la fluorescencia sugiere la biosíntesis endógena de insulina y por tanto la reprogramación de las células.

5.2.3. Reproducibilidad del protocolo de reprogramación en células D3 formando EB con extractos de INS-1.

También se probó la reproducibilidad del método con EB disgregados y cultivados en monocapa. La idea era partir de células en las que ya se hubiera dado un proceso espontáneo de diferenciación para ver si así se reprogramaban con más facilidad hacia células productoras de insulina, en lugar de utilizar las ESC indiferenciadas.

Para la disgregación de los EB se procedió como se indica en Materiales y Métodos, utilizando tripsina y disgregación mecánica por repipeteo. Hay que señalar que en estas condiciones no se lograban disgregar totalmente los agregados celulares (fig. 33A). La adición de colagenasa favoreció la disgregación pero resultó en un alto porcentaje de muerte celular.

Aún con todo se intentó realizar un ensayo de reprogramación en EB disgregados con tripsina. Para ello se hicieron diferentes aproximaciones, en las mismas condiciones de partida que con las células D3 indiferenciadas con EB de día 9 (pase 22). En primer lugar se incubaron con un anticuerpo anti IgG de cabra FITC (Jackson) desarrollado en burro, con una dilución 1/200 respecto al volumen de reacción. También se incubaron con extractos proteicos de INS-1 en segundo lugar, y con extractos proteicos de INS-1 inactivados a 100°C durante 5 min, en tercer lugar. En los 3 casos se usó un control negativo consistente en un cultivo con igual número de células, e incubado con las mismas condiciones pero con PBS en lugar de Chariot y extracto proteico o anticuerpo.

En el caso de las células incubadas con el anticuerpo cabe mencionar que no se observó fluorescencia a las 48 h desde la incubación, como sucedía con las ESC indiferenciadas en esas mismas condiciones durante la puesta a punto del método (ver figura 33).

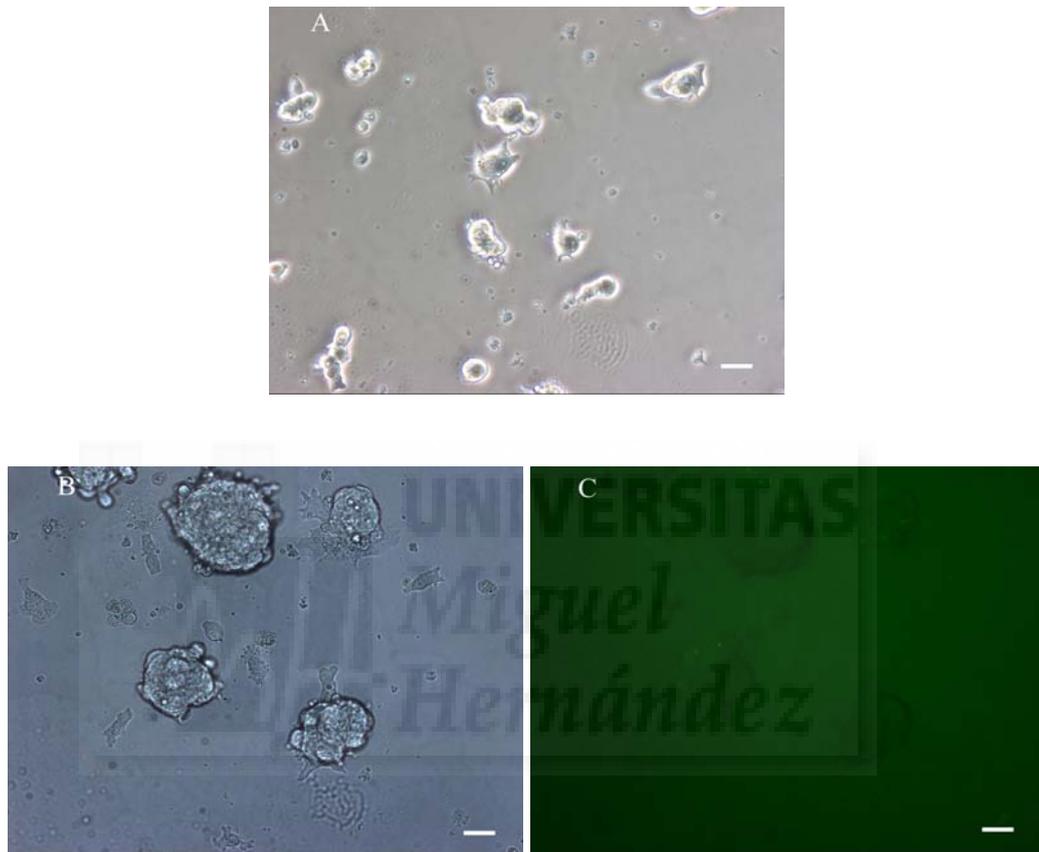


Fig.33. Micrografías de los cultivos de EB disgregados y sembrados en monocapa reprogramados con extractos proteicos de INS-1. A) Micrografía del cultivo de EB disgregados y en monocapa tomada a tiempo 0 de la reprogramación. B) Micrografía de transmisión del cultivo a las 48 h desde la reprogramación. C) Micrografía de fluorescencia correspondiente a B. Fotografías tomadas a 20x, barra de tamaño equivalente a 10 μ m.

Como se puede observar en la figura 34 tampoco se detectaron bandas de insulina a las 48 h desde la incubación con Chariot, ni con los extractos nativos ni inactivados, ni en los respectivos controles negativos.

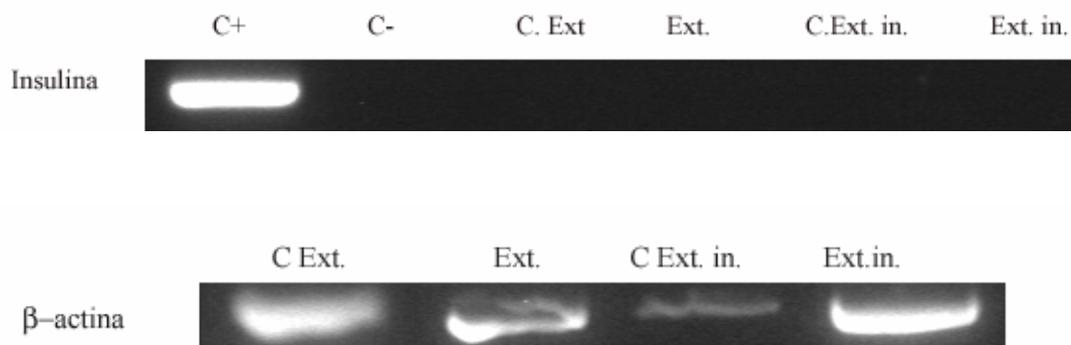


Fig. 34. Análisis mediante PCR de la expresión de insulina en las células de EB a las 48 h de la reprogramación. Condiciones de PCR: 60 °C, 32 ciclos (insulina); 62 °C.30 ciclos (β-actina). Tamaño del amplicón: 250 pb (insulina); 467 pb (β-actina) C+: Control positivo (ADNc de INS-1), C-: Control negativo (agua DEPC), C. Ext: Control negativo de extractos proteicos, Ext.: Extractos proteicos, C. Ext..In: Control negativo de extractos inactivados, Ext. In: Extractos inactivados.

Ello podría explicarse por un problema a la hora de realizar la disgregación. Como se observa en la figura 33A las células a tiempo 0 no están totalmente disgregadas. Estas fuertes asociaciones que establecen las células en estas condiciones podrían dificultar la acción del Chariot y evitar la reprogramación.

5.2.4. Reproducibilidad del protocolo de reprogramación en células D3 indiferenciadas con extractos de INS-1 tratados.

Una vez comprobado que a los 3 días de la incubación con Chariot de las células D3 indiferenciadas había expresión de insulina y por tanto, reprogramación, se procedió a confirmar que la reprogramación se estaba dando debido a la introducción de proteínas en las células y no de ácidos nucleicos presentes de forma minoritaria en el extracto, como se vio en el apartado 4.1. de Resultados.

Para ello se procedió en primer lugar a la incubación de un cultivo de células D3 en las condiciones descritas anteriormente con un extracto proteico total en condiciones nativas de INS-1 y Chariot, otro cultivo se incubó con un extracto tratado con 500 µg/ml de DNAsa, otro con 50 µg/ml de RNAsa y en el último caso se desnaturizó el extracto proteico someténdolo a 100 °C durante 5 min.

Una vez pasados 5 días desde la incubación con el complejo se analizó la reprogramación mediante la expresión de insulina por RT-PCR, tomando como control positivo de la misma ARN de páncreas (fig.35).

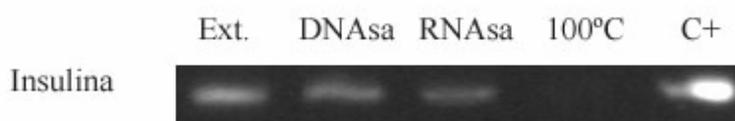


Fig.35. Análisis mediante PCR de la reprogramación en células D3 a los 5 días de la incubación con extractos proteicos de INS-1 tratados. Condiciones de PCR: 60 °C, 32 ciclos. Tamaño del amplicón: 250 pb. Ext: Extracto proteico sin tratar. DNAsa: Extracto proteico tratado con 500 µg/ml de DNAsa. RNAsa: Extracto proteico tratado con 50 µg/ml de RNAsa. 100°C: Extracto proteico inactivado por desnaturalización a 100°C durante 5 min. C+: ARN de páncreas.

De la figura anterior se deduce que la reprogramación de las células D3 se debe a las proteínas del extracto ya que cuando se inactivan no se observa expresión de insulina; en cambio al eliminar los ácidos nucleicos se mantiene la reprogramación, a unos niveles muy similares a los observados con el extracto sin tratar.

5.3. Reprogramación con extractos proteicos de yemas.

Una vez confirmada la reproducibilidad del método en células D3 con extractos proteicos de INS-1, se procedió a efectuar la reprogramación de las células con los extractos proteicos de yemas pancreáticas de día 16.5.

Para ello se partió de 2.5×10^4 células por pocillo (pase 15), disgregadas y cultivadas en monocapa con una confluencia del 30%, en placas de 35 mm de diámetro, incubadas a las 24 h con 1 µg de proteína en 200 µl de volumen de reacción. Se mantuvo un control negativo consistente en células cultivadas en idénticas condiciones pero en ausencia de Chariot y extractos de yemas pancreáticas, añadiendo PBS en su lugar.

Cabe mencionar que a los 8 días de cultivo desde la reprogramación se observó la aparición de células epitelioides en el cultivo reprogramado mediante Chariot,

constituyendo un 5% aproximadamente del total, mientras que en el cultivo control apenas se apreciaban, manteniéndose una morfología tridimensional correspondiente a células indiferenciadas. En el cultivo reprogramado con Chariot había un 50 % de confluencia mientras que en cultivo control se alcanzaba el 80%, ya que las células parecían mantener una mayor capacidad proliferativa. A partir de este día se observan distintas morfologías, repitiéndose siempre la misma estructura: unas células cúbicas o epitelioides rodeadas de células más alargadas (ver figura 36A y 36B). Hasta el día 13 la proliferación es mayor en la placa con Chariot que la del control, así como el porcentaje de células epitelioides. En cambio del día 13 al 15 disminuye el porcentaje de células epitelioides en el cultivo incubado con Chariot, hasta al alcanzar el equilibrio el día 16, a partir del cual ambas placas presentan igual confluencia, y por tanto capacidad proliferativa, y porcentaje de células epitelioides.

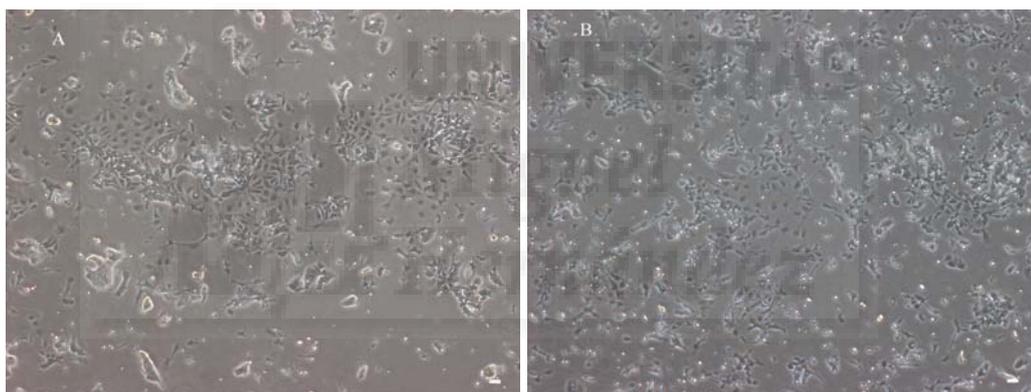


Fig.36. Micrografías tomadas de los cultivos a día 11. A) Micrografía del cultivo control. B) Micrografía del cultivo incubado con Chariot y el extracto proteico de yemas pancreáticas. Fotografías tomadas a 4x, barra de tamaño equivalente a 10 μm .

Por otra lado, se estudió la reprogramación mediante la expresión de insulina en los cultivos por RT-PCR siendo positivos los cultivos a día 6 y 11, y negativos los cultivos a día 24 y 30 (fig. 37). La bandas obtenidas a día 6 y 11 son débiles lo cual sugiere una reprogramación parcial del cultivo. De hecho, la señal de insulina desapareció a día 24 y 30, debido probablemente a una dilución de la señal de las pocas células reprogramadas frente a la gran mayoría de células del cultivo, las cuales mantuvieron una alta capacidad proliferativa. Todo ello

sugiere el uso de estrategias de selección para enriquecer el cultivo con las células de interés, que expresan insulina.

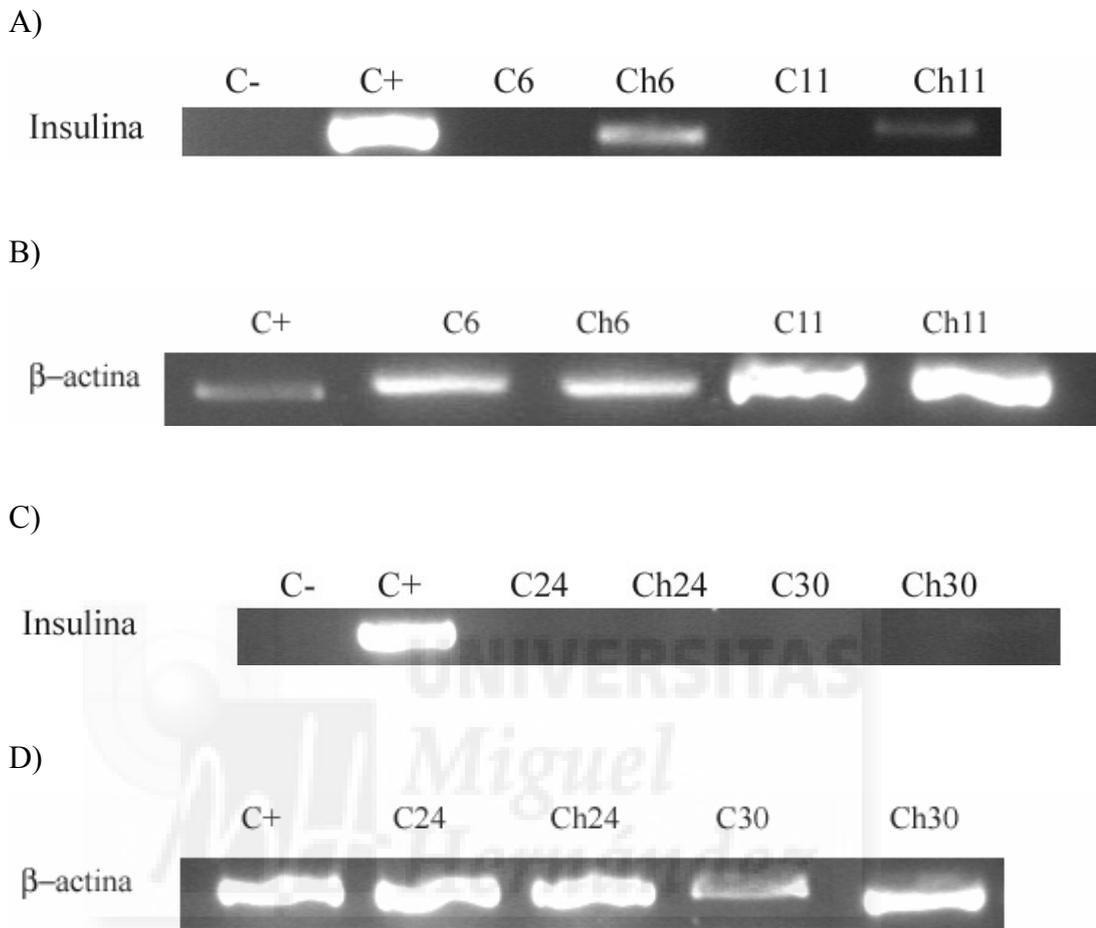
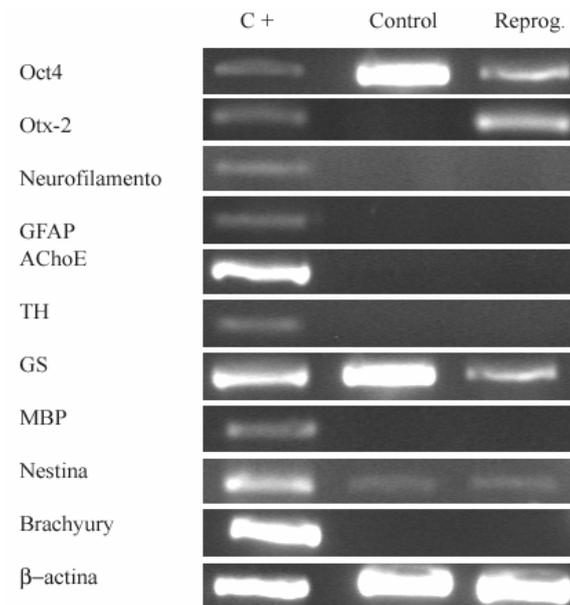


Fig.37. Análisis por PCR de la expresión de insulina en células D3 tras 6, 11, 24 y 30 días desde la reprogramación. Condiciones de PCR: 60 °C, 32 ciclos (insulina); 62 °C.30 ciclos (β -actina). Tamaño del amplicón: 250 pb (insulina); 467 pb (β -actina). C-: Control negativo de insulina (agua DEPC), C+: Control positivo de insulina (ADNc de INS-1), Cx: Control de la reprogramación a día x, Chx: Células reprogramadas mediante Chariot a día x. A y C) Expresión correspondiente a insulina. B y C) Expresión correspondiente a β -actina.

Por otra parte, también se caracterizaron las células reprogramadas a día 11 de cultivo tras la incubación con Chariot (fig.38), para ver que genes se expresaban tras la reprogramación y contrastar el perfil de expresión génica con el de las células D3 indiferenciadas y las yemas pancreáticas a día 16.5.

A)



B)

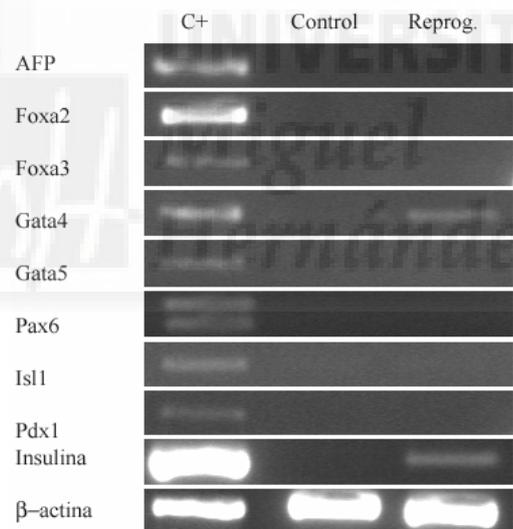


Fig.38. Caracterización molecular de las células a día 11 tras la incubación con Chariot, las del cultivo control y las células reprogramadas. C+: control positivo de la expresión del gen de interés (ESC indiferenciadas de D3 para Oct4; ojos de ratón adulto para Otx-2 y Pax-6; cerebro fetal de ratón de 16.5 días para Neurofilamento, GFAP, AChE, TH, GS, MBP y Nestina; corazón adulto para Brachyury; EB de día 14 de R1 para AFP; EB de día 5 de D3 para Foxa2; hígado fetal de ratón de 16.5 días para Foxa3; corazón fetal de ratón de 16.5 días para GATA4 y GATA5 y células INS-1 para Isl-1, Pdx-1, insulina y β -actina). β -actina: Gen constitutivo empleado como control de la reacción en las células cultivadas.

Como se observa en la figura 38, en las células reprogramadas se detectó la expresión de marcadores de pluripotencialidad (Oct4), ectodérmicos (Otx-2, GS y Nestina), endodérmicos (GATA4) y de célula β (insulina).

Así mismo, también se estudió la producción de insulina por inmunocitoquímica a los 18 días de cultivo (fig.39). Se volvió a usar un control de la técnica con células INS-1 para la presencia de insulina, obteniéndose un marcaje perinuclear y se probó la especificidad del anticuerpo secundario adicionando éste solo en uno de los pocillos y no observándose fluorescencia. Como se observa en las fig. 39B y 39C el marcaje era intenso aunque de membrana en el 100% de las células, lo cual sugeriría que la tinción débil debido a la insulina endógena estaría siendo enmascarada por captación de insulina del medio.



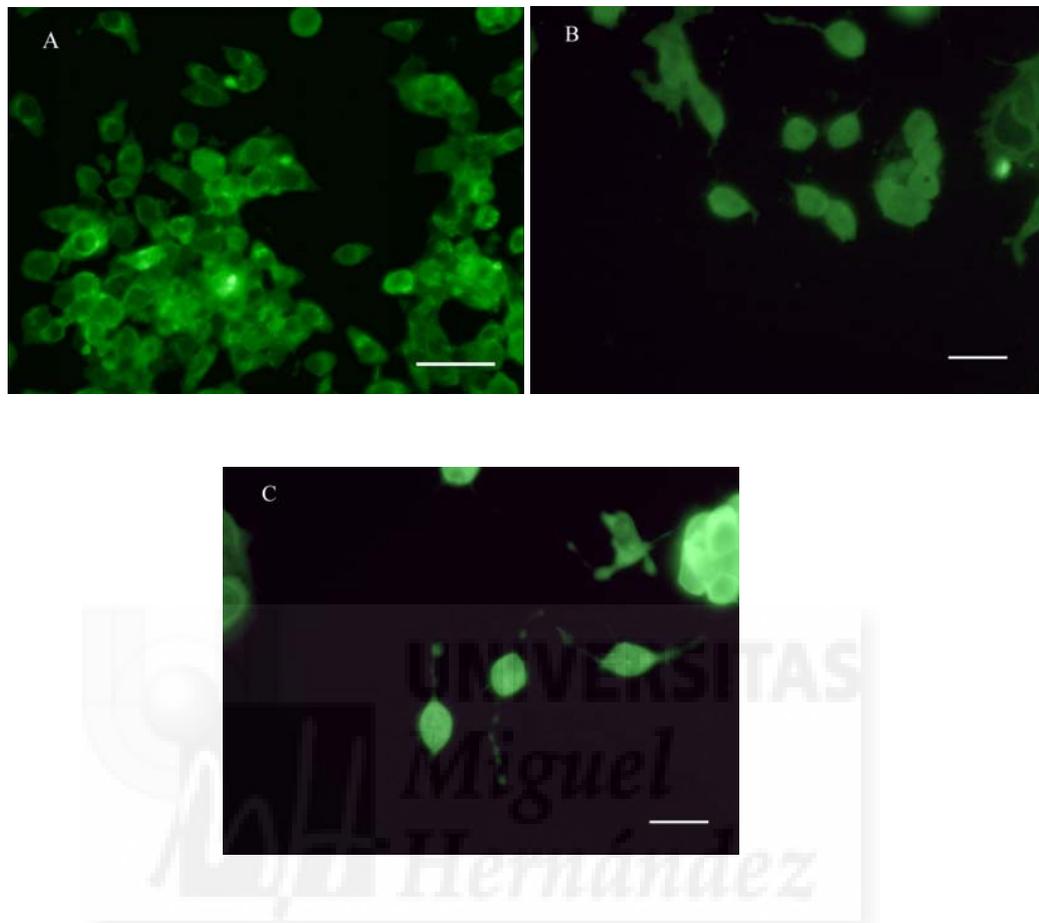


Fig.39. Inmunocitoquímica de insulina en células D3 a día 18 tras la reprogramación con extractos proteicos de yemas pancreáticas de día 16.5. A) Micrografía de fluorescencia de la inmunocitoquímica de insulina respectivamente en células INS-1, como control de la técnica. B) Micrografía de fluorescencia de inmunocitoquímica de insulina en células D3 incubadas en ausencia de Chariot y extractos proteicos de yemas pancreáticas a día 18. (Control negativo de la reprogramación). C) Micrografía de fluorescencia de inmunocitoquímica de insulina en células D3 incubadas en presencia de Chariot y extractos proteicos de yemas pancreáticas a día 18.. Fotografías tomadas a 40x. Barra de tamaño equivalente a 10 μ m.

6. Selección de las células que expresan insulina.

Como se vio en el apartado anterior la expresión de insulina era muy débil al no reprogramarse el 100% de las células y no obtener una población homogénea.

Para obtener una población pura de células positivas a insulina se decidió combinar la reprogramación con extractos de yemas de estadio embrionario E16.5 con una estrategia de selección de trampas celulares. Se transfectó las mESC-D3 con una construcción génica en la que un gen de resistencia a neomicina estaba bajo el control del promotor del gen de la insulina humana, el plásmido HIP-bgeo-PGKHygro. A continuación se seleccionaron las células que expresaban insulina añadiendo neomicina y manteniendo el medio de diferenciación anteriormente descrito (DMEM sin LIF).

En concreto se utilizó una concentración de neomicina de 300 $\mu\text{g/ml}$ durante 14 días, iniciando la selección el día 3 tras la reprogramación. Durante los primeros 3 días tras la adición de neomicina se observó una muerte masiva de las células que no expresaban insulina, cambiando el medio a diario durante esos días, y en días alternos a continuación. A día 6 desde la reprogramación se pudo ver que había un 5% de supervivencia, es decir, de células probablemente reprogramadas. Después las células supervivientes se mantuvieron en cultivo 17 días tras la reprogramación, proliferando muy poco y presentando una morfología redondeada.

Si se observa la figura 40B se puede apreciar como sin selección con neomicina, poco después de la reprogramación (3 días) hay una gran mayoría de células indiferenciadas, creciendo en estructuras tridimensionales, y algunas células diferenciadas alrededor de éstas. La figura 40C se corresponde con un cultivo a día 10 tras la reprogramación, pero en el que no se ha hecho la selección con neomicina. Como se puede observar ya no hay apenas células creciendo en agregados tridimensionales, sino que crecen en monocapa y están diferenciadas, observándose distintas morfologías. Por último la figura 40D es una fotografía del cultivo a los 17 días de la reprogramación, tras 14 días de selección con neomicina. Por ello se obtuvo una población homogénea de células redondeadas que posteriormente se caracterizó molecularmente mediante PCR.

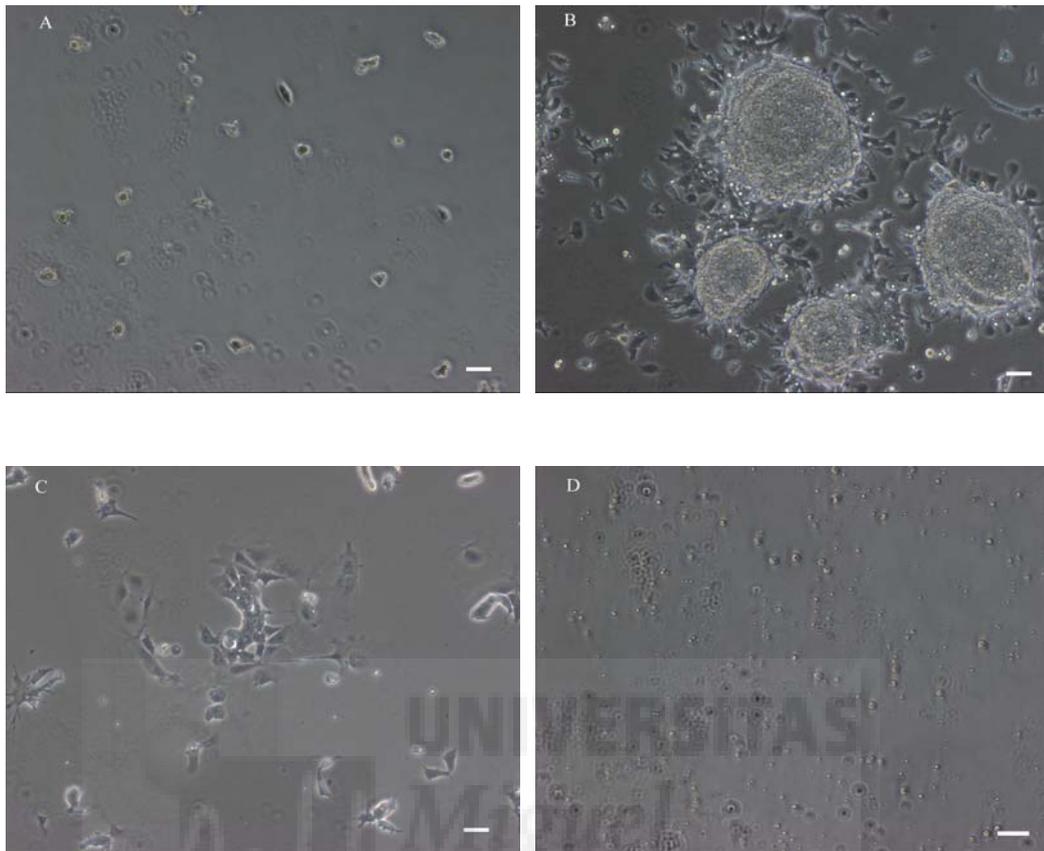


Fig.40. Fotografías de los cultivos de D3 durante la selección con neomicina. A) Micrografía del cultivo a $t=0$ de la reprogramación. B) Micrografía del cultivo a $t=3$ días tras la reprogramación, control negativo de la selección con neomicina. C) Micrografía del cultivo a $t=10$ días tras la reprogramación, sin selección con neomicina. D) Micrografía del cultivo a $t=17$ días tras la reprogramación, $t=14$ días de selección con neomicina. Fotografías tomadas a 10x (A-C) y 20x (D), barra de tamaño equivalente a 10 μm .

En concreto se hizo una caracterización de las células reprogramadas y seleccionadas a día 17 desde la reprogramación (día 14 de selección) y de un control de las células reprogramadas pero no seleccionadas con neomicina a día 10 desde la reprogramación (día 7 de selección con neomicina). Se tomó la muestra a día 10 y no a día 17 porque a partir del día 11 se diluía la señal de los marcadores para las células no seleccionadas, como se vio en el apartado anterior. Las células seleccionadas se tomaron a día 17 porque al hacer la selección sólo sobrevivieron una minoría y hubo que dejarlas proliferar para poder realizar el aislamiento del ARN y la RT-PCR. De hecho, si se observa la figura 41, se ve como las células seleccionadas y las no seleccionadas expresan los mismos marcadores (a excepción de N-200), siendo la banda más intensa para los distintos marcadores en el caso de las células seleccionadas.

De la figura siguiente se desprende que en las células reprogramadas tanto si seleccionan con neomicina como si no, los marcadores que se expresan son mayoritariamente de neuroectodermo (Otx-2, GS, nestina, Pax6, Isl1 y Pdx-1), no expresándose ningún marcador de mesodermo o endodermo (expresándose marcadores de esta capa embrionaria en las yemas pancreáticas empleadas para reprogramar). De hecho la insulina detectada es insulina tipo II, de origen extrapancreático. Las condiciones del cultivo (monocapa sin LIF) favorecieron la selección de esta población celular (Roche et al., 2005b).

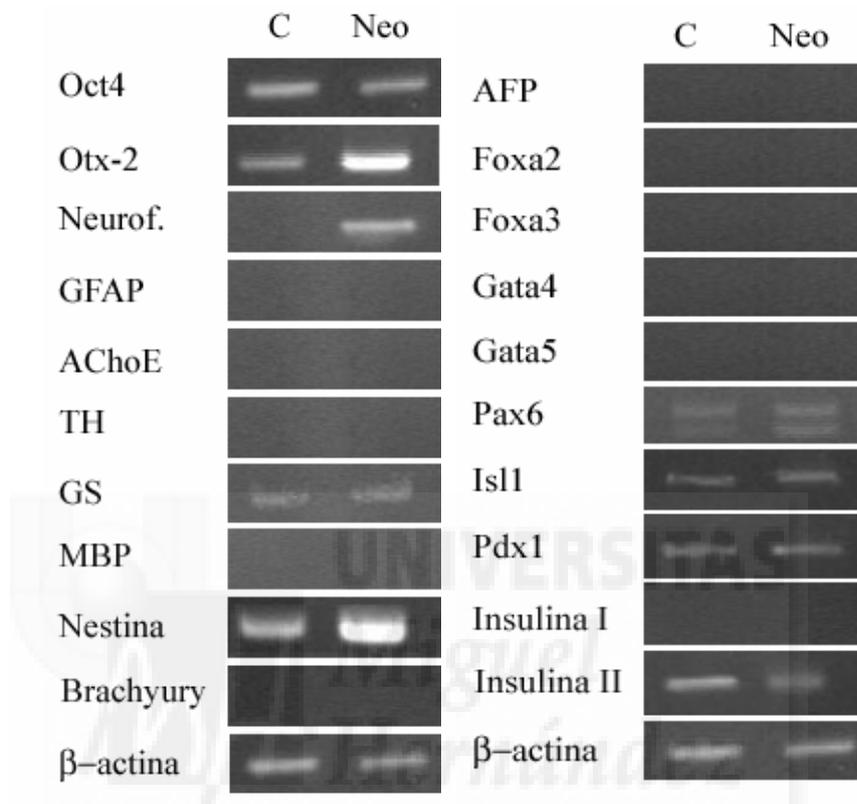


Fig.41. Caracterización molecular de las células reprogramadas (C) y seleccionadas (Neo) a día 10 y 17 desde reprogramación, respectivamente. β -actina: Gen constitutivo empleado como control de la reacción de las células reprogramadas.



DISCUSIÓN

1. Estado actual del campo de la reprogramación celular con extractos proteicos.

El campo de la reprogramación celular aplicada a la obtención de células susceptibles de ser usadas en terapia celular es muy joven, como también lo es la aproximación en la que se usa extractos proteicos para dirigir la diferenciación hacia el tipo celular de interés.

Como se comenta en el apartado 5.2.1 de la Introducción, este método de reprogramación fue introducido por el Dr. Collas de la Universidad de Oslo y sus colaboradores en el año 2002 (Hakelien et al., 2002). Desde entonces y sólo en unas pocas publicaciones se pone de manifiesto la gran versatilidad de esta aproximación, por los diferentes tipos celulares que se pueden obtener ya sea a partir de células totalmente diferenciadas, células madre adultas o células madre embrionarias, como queda recogido en la tabla 11. Sin embargo, en esta tabla se ve como independientemente de que la célula donante y la diana pertenezcan al mismo linaje embrionario o no, y de que se haga o no selección de las células de interés, la reprogramación obtenida ha sido siempre parcial. Además solo en la publicación de Hakelien de 2004 acerca de la reprogramación con extractos de INS-1 se intenta hacer un estudio funcional de las células reprogramadas, careciendo todas las publicaciones de datos funcionales y datos fisiológicos in vivo.

Para diseñar los protocolos de obtención de los extractos y los primeros protocolos de reprogramación, nos basamos por tanto, en los artículos del Dr. Collas, especialmente en el que se usan extractos de células INS-1 para reprogramar fibroblastos (Hakelien et al., 2004). En este artículo encontramos algunas semejanzas con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, teniendo en cuenta que nosotros utilizamos otro método para la introducción de los extractos en el interior celular:

-En el artículo tardaban 2 días en detectarse los transcritos de insulina. En nuestro caso eran 3 días, como aparece en el apartado 5.2.2 de Resultados, sobre

ARTÍCULO	C.DON ANTE	C.DIANA	EVIDENCIA DE LA REPROGRAMACIÓN	GRADO DE REP.
Hakelien et al, 2002	Células T humanas (mesodermo)	Fibroblastos 293 T (mesodermo)	<p>-La introducción en el núcleo y el ensamblaje de factores de transcripción.</p> <p>-La inducción de la actividad de un complejo remodelador de la cromatina.</p> <p>-Cambios en la composición de la cromatina.</p> <p>-La activación de genes específicos (estudio por RT-PCR)</p> <p>-Expresión de receptores de superficie específicos.</p> <p>-La inducción de una ruta de señalización intracelular específica para las células T.</p>	Parcial.
Gaustad et al, 2004	Cardiomiocitos de rata (mesodermo)	Cél.madre humanas de tejido adiposo (mesodermo)	<p>-Expresión de un marcador de células diferenciadas (60% de las células) por inmunofluorescencia.</p> <p>-Expresión de una proteína gap junction.</p> <p>-Obtención de células multinucleadas (40% de las cél.) y estriadas que laten en cultivo.</p>	Parcial

ARTÍCULO	C.DONANTE	C.DIANA	EVIDENCIA DE LA REPROGRAMACIÓN	GRADO DE REP.
Hakelien et al, 2004	INS-1 de rata (endodermo)	Fibroblastos de rata (mesodermo)	-Morfología similar a la de la célula donante (más pequeñas y redondeadas). -Expresión de genes específicos de célula β (estudio por RT-PCR). -Detección de proinsulina por inmunofluorescencia (5-30% entre los días 8 y 14)	Parcial (5-30%) y transitoria
Qin et al, 2005	Neumocitos tipo II de ratón (endodermo)	Cél. Madre embrionarias de ratón	-Expresión de marcadores específicos por PCR cuantitativa, inmuncitoquímica y microscopía electrónica.	Parcial (5-10%)

Tabla. 11. Resumen de las publicaciones acerca de la reprogramación celular con extractos proteicos. C. donante: Células donante. C. diana: Células diana. Grado de rep.: Grado de reprogramación.

la reproducibilidad del protocolo de reprogramación en células D3 indiferenciadas con extractos de INS-1.

-Sólo consiguieron indicios de reprogramación en 7 de 30 experimentos, y en 3 de ellos la señal de insulina desaparecía el día 9. En nuestro caso la señal desaparecía el día 11 (apartados 5.3 de Resultados) a pesar de haber usado un extracto total de yemas y no de insulinoma, con el cual la señal de insulina obtenida era mayor. La explicación que se le ha dado a este fenómeno ha sido la dilución de los factores de transcripción exógenos al dividirse las células y por tanto la represión gradual de la transcripción en el tiempo.

-Uno de los indicios de que efectivamente había habido reprogramación fue el cambio de morfología de las células. Al cabo de 1 ó 2 semanas, según el experimento, las células se redondearon, morfología que también se observó en las células seleccionadas con neomicina (apartado 6 de Resultados).

A pesar de ello sólo se consiguió entre un 5 y un 30% de células positivas a insulina en un 25%, aproximadamente, de los experimentos ensayados. En nuestro caso el rendimiento obtenido fue de un 5% cuando hicimos la selección con neomicina de las células que expresaban insulina, un rendimiento que sigue siendo bastante bajo, indicativo de que hay una reprogramación parcial y que hay que mejorar todavía muchos aspectos.

En el artículo también se menciona que no se detectó secreción de insulina en respuesta a estimulación con glucosa, pues como se ha comentado antes, la proporción de células productoras de insulina era muy baja. Por otra parte las células reprogramadas tenían un fenotipo de célula β inmadura, pues no se detectaron transcritos de Glut-2 o de prohormona convertasas. Por todo ello proponen una estrategia de selección de células secretoras de insulina, como por ejemplo la que nosotros llevamos a cabo, además de ser necesaria una estrategia de maduración para que las células fueran capaces de responder a la estimulación con glucosa y liberar insulina de forma más cercana a las condiciones fisiológicas.

En un artículo posterior en el que colabora Collas y en el que se reprograman células madre embrionarias hacia neumocitos de tipo II (Qin et al., 2005) se emplea finalmente un protocolo de selección. Éste consiste en transfectar las ESC con un constructo que tenía el gen reportero GFP bajo el control del promotor de un marcador específico de la célula donante, la proteína C surfactante (SPC). Sin embargo, no lo complementaron con ningún método de diferenciación dirigida (aparte de la reprogramación) pues las ESC transfectadas se cultivaron formando EB durante 10 días, se pasaron a cultivar en T-75 durante 3 días y a continuación se reprogramaron y se tuvieron 14 días en cultivo. De esta manera la expresión de SPC/GFP se detectó 3 días después de

la exposición al extracto, llegando a día 7 a un 5-10%, resultados similares a los obtenidos por nuestro grupo y comentados anteriormente.

Estos resultados vuelven a poner de manifiesto la necesidad de mejorar el proceso de reprogramación o dirigir mejor la diferenciación combinándolo con un método coaxial por ejemplo, para conseguir una reprogramación total. De todo esto se desprende que queda mucho trabajo por hacer para conseguir generar una población homogénea de células productoras de insulina que sean funcionales in vivo, que puedan controlar la homeostasis de la glucosa; que sea una biomasa suficiente para su trasplante, que mantenga cierta actividad proliferativa y que no formen tumores. En todo esto, el método de reprogramación abordado en esta tesis sea quizás una parte del proceso y que la combinación de diversas estrategias de los resultados esperados.

2. Elección de un método alternativo para introducir proteínas en el interior celular.

Como se comentó en el bloque de resultados, en un principio se intentó reproducir el protocolo del Dr. Collas con células madre embrionarias de ratón D3 y extractos proteicos de INS-1 (Hakelien et al., 2004). Pero al permeabilizar las células con la estreptolisina-O observamos un alto porcentaje de células muertas, cosa que cabía esperar teniendo en cuenta que el grupo de Collas comentaba en ese artículo que habían contabilizado un 50% de células muertas tras la permeabilización. Todo ello confirmaba la toxicidad de este compuesto y que las células D3 presentaban una mayor susceptibilidad que los fibroblastos.

De esta manera se ensayaron varias concentraciones de estreptolisina-O alrededor de 200 ng/ml (rango de concentración utilizado por Collas), no encontrándose ninguna concentración de compromiso que asegurara la correcta permeabilización de las células y su viabilidad. Otro inconveniente era la baja especificidad del método pues al abrir poros aleatoriamente en la membrana celular no se podía controlar el material biológico que entraba ni el que salía del interior de las células. En este sentido el grupo de Collas suele usar sistemas

regeneradores de ATP que permiten recuperar mucho mejor las células tras el procedimiento.

Debido a ello se planteó la posibilidad de buscar un método alternativo para la introducción de proteínas en el interior celular que no presentara estas limitaciones. Estudiamos los métodos tradicionales (microinyección o electroporación) y finalmente nos decantamos por Chariot. Éste es un método comercial no citotóxico de introducción de proteínas mediante un péptido vector, carente por tanto de construcciones génicas. Una vez hecha esta elección se diseñó el presente plan de trabajo:

- La puesta a punto del método Chariot para reprogramar células madre embrionarias de ratón D3.
 - Estudiar el efecto de los ácidos nucleicos y las proteínas presentes en los extractos proteicos sobre la reprogramación.
 - Estudiar la reproducibilidad del método Chariot para las células D3 indiferenciadas y formando EB con extractos de INS-1.
 - Estudiar la expresión de insulina en el tiempo en células reprogramadas con extractos proteicos de yemas pancreáticas mediante Chariot.
3. Puesta a punto del método Chariot para reprogramar células madre embrionarias de ratón D3.

En el protocolo comercial del Chariot se hacía referencia a 3 proteínas de distinto peso molecular, y por lo tanto en la puesta a punto del método se trabajó con los 3 tipos de proteínas, para cubrir el rango de peso molecular de todas las proteínas presentes en el extracto.

En el caso de los anticuerpos se indicaba el uso de diluciones 1/500, 1/1000 y 1/200, de las proteínas de peso intermedio había que partir de 0.5 a 1 µg, y en el caso de péptidos de 100 a 500 ng. Durante la puesta a punto se trabajó con diluciones de 1/200 a 1/12.5 (no se obtenía señal a diluciones mayores) para los

anticuerpos; en el caso de las proteínas de peso molecular intermedio de 1 a 3 μg y en el caso de los péptidos de 0.5 a 3 μg .

En dicho protocolo aparecía como tiempos orientativos de entrada de las proteínas los siguientes: 3h para los anticuerpos, de 2 a 3 h para las proteínas de peso molecular intermedio y de 1h 30 min a 2 h para los péptidos. En cambio, con nuestras células, D3 e INS-1 los tiempos fueron del orden de más de 10 veces mayores, 48 h en el caso de los anticuerpos y 24 h para las proteínas de peso molecular intermedio y péptidos. Para estos últimos se comprobó que la velocidad de incorporación era totalmente independiente de la concentración y del tipo celular.

Por tanto concluimos con la idea de que cada laboratorio debe poner a punto el método para el tipo celular de interés. De hecho, con las células INS-1 se ensayó la entrada de los mismos anticuerpos que con las células D3, con diluciones bajas de 1/25 y 1/12.5 y no se observó entrada a las 48 h.

4. Efecto de los ácidos nucleicos y las proteínas sobre la reprogramación.

También se comprobó el posible efecto de los ácidos nucleicos presentes en el extracto sobre la reprogramación. Como se desprende de las tablas 7 y 8 a partir de 50 y 500 $\mu\text{g/ml}$ de RNAsa y DNAsa se consigue la eliminación del ARN y el ADN del extracto, teniendo en cuenta que el rendimiento obtenido en ambos en una extracción normal es muy bajo.

Curiosamente en el artículo de la reprogramación de fibroblastos T (Hakelien et al., 2002) se emplean las mismas concentraciones de RNAsa y DNAsa I para verificar la síntesis de $\text{TCR}\alpha\beta$ (un receptor de superficie hematopoyético) de lo que se deduce que la expresión de la proteína se da por la transcripción en las células reprogramadas más que por los ácidos nucleicos que pueda contener el extracto.

Por otra parte también se confirmó la estabilidad de las proteínas de la muestra durante el tiempo habitual de manipulación de los extractos. Así como también la efectividad de los inhibidores de proteasas utilizados, que preservan las proteínas de las proteasas endógenas un 20% más que si no se usaran.

Por último, se puso de manifiesto que las únicas moléculas que llegan al interior celular con potencial efecto reprogramador son las proteínas, pues el tratamiento con proteinasa K es el único que afecta realmente a la reprogramación final. Para comprobar la reproducibilidad de dichos datos se hicieron varios ensayos de reprogramación, sin tratar el extracto, tratándolo con 500 $\mu\text{g/ml}$ de DNAsa, con 50 $\mu\text{g/ml}$ de RNAsa y con extractos desnaturalizados, estudiando la expresión de insulina a los 5 días por PCR. Como era de esperar en el único caso en el que no hubo reprogramación, ya que no había banda de insulina, fue en el de los extractos desnaturalizados, ratificándose así que los elementos reprogramadores del extracto eran las proteínas.

5. Reprogramación con extractos proteicos de INS-1 y yemas pancreáticas.

Se estudió el efecto de la fracción celular sobre la reprogramación, usando extractos nucleares y totales de INS-1 y totales de yemas pancreáticas. No se ensayaron extractos nucleares o citosólicos de yemas porque el número de células eran muy escaso y estos extractos muy difíciles de obtener. De todas maneras, sólo se observó banda de insulina para los extractos totales de INS-1 y yemas pancreáticas de E16.5, siendo más intensa en este último caso. El extracto provee de factores de transcripción que alteran teóricamente la expresión de un conjunto de genes específicos. Por ello los extractos nucleares resultaban prometedores al contener factores de transcripción clave, sin embargo no dieron resultados tan óptimos como los totales, sugiriendo que durante el aislamiento de núcleos se pierde algún factor clave para la reprogramación.

A pesar de que la señal de insulina era mayor en el caso de las yemas, se usaron extractos de INS-1 para estudiar la reproducibilidad del protocolo de reprogramación, tanto en células D3 indiferenciadas como formando EB.

Con las células D3 indiferenciadas se observó una señal débil de insulina por RT-PCR a día 3 tras la reprogramación, sugiriendo una reprogramación parcial. Sin embargo, los datos de inmunocitoquímica indican un marcaje de insulina perinuclear en todas las células, igual que en las células del control (aunque menos intenso en este caso). Ello podría deberse a una posible captación del medio de insulina exógena (Hansson et al., 2004; Rajagopal et al., 2003; Sipione et al., 2004). Para confirmar que la reprogramación era parcial a pesar de que estaba habiendo captación de insulina exógena habría que complementar la RT-PCR con otras técnicas como por ejemplo inmunocitoquímica de péptido C, estudios funcionales de secreción de insulina y trasplante de dichas células, que están pendientes de realización.

Por otro lado, en los ensayos de reprogramación con EB no se observó entrada de anticuerpo en los mismos, así como tampoco expresión de insulina con los extractos nativos activos e inactivados, debido probablemente a algún problema en la disgregación. La reprogramación de EB pasaría por tanto por mejorar dicha técnica.

De esta manera quedó confirmada la reproducibilidad del método en células D3 con extractos de INS-1. Respecto a la utilización de los extractos de yemas, se observó la expresión de insulina en el tiempo a día 11, desapareciendo la señal a posteriori. Esto podría explicarse por la dilución de la señal al irse dividiendo las células no reprogramadas y quedar una menor proporción de reprogramadas frente al total, igual que argumentó el grupo del Dr. Collas en sus ensayos (Hakelien et al., 2004).

6. Caracterización molecular de las células donante, las células diana y las células reprogramadas.

Para poder estudiar los genes que se habían activado durante la reprogramación de las células diana procedía caracterizar molecularmente dichas células así como las células donantes empleadas (INS-1 y yemas pancreáticas de estadio embrionario E16.5) y las células diana (D3).

Como se observa en la tabla 12 hay 2 genes de ectodermo que se expresan por defecto en todas las células (incluidas las D3 indiferenciadas). Éstos son GS y nestina. La nestina es una proteína de los filamentos intermedios (Zhang et al., 2005) que se considera generalmente un marcador del linaje neuronal, pero se expresa abundantemente en células mesenquimales asociadas a islotes pancreáticos de rata y humanos (Gershengorn et al., 2004). También cabe mencionar que ninguno de los tipos celulares expresa brachyury (marcador de mesodermo).

Las células D3 apenas expresan marcadores de linajes comprometidos, como cabría esperar por su condición de células indiferenciadas, a excepción de los anteriormente comentados y de Otx-2 (neuroectodermo). También se observa expresión de Oct-3/4.

Por su parte, las células donantes, las células INS-1 y las yemas pancreáticas, expresan los mismos marcadores de endodermo y de neuroectodermo y célula β , excepto Pdx-1, el cual lo expresan las células INS-1 y no las yemas (Melloul et al., 2002b), GATA4 y GATA5. Respecto a los marcadores de ectodermo, en el caso de las INS-1 no se estudiaron apenas y en el caso de las yemas sólo expresaban Otx-2 y AChoE además de la GS y la nestina.

En lo referente a las células a día 11 tras la reprogramación así como en las no reprogramadas cabe mencionar que ambos mantienen el marcador de pluripotencialidad Oct-3/4 y apenas expresan marcadores a excepción de Otx-2,

GENES	D3	YEMAS	INS-1	CÉLULAS A DÍA 11 CONTROL	CÉLULAS A DÍA 11 CHARIOT
Pluripotencialidad					
Oct-3/4	+	-	-	+	+
Ectodermo					
Otx-2	+	+	-	-	+
N-200	-	NO	NO	NO	NO
Neurofilamento	NO	-	NO	-	-
GFAP	-	-	NO	-	-
AChoE	-	+	NO	-	-
TH	-	-	NO	-	-
GS	+	+	+	+	+
MBP	-	-	NO	-	-
Nestina	+	+	-	+	+
Mesodermo					
Brachyury	-	-	-	-	-
Endodermo					
AFP	-	+	+	-	-
Glucagón	NO	NO	+	NO	NO
FoxA2	NO	+	+	-	-
FoxA3	NO	+	+	-	-
GATA4	NO	+	-	-	+
GATA5	NO	+	-	-	-
Neuroectodermo y Células β					
Pax6	-	-	-	-	-
Isl1	NO	+	+	-	-
Pdx-1	NO	-	+	-	-
Insulina	NO	+	+	-	+
Housekeeping					
GAPDH/B-actina	+	+	+	+	+

Tabla 12. Caracterización molecular de las células donante, diana y reprogramadas y control a día 11. NO: No determinado.

GS y nestina (ectodermo), GATA-4 (mesoendodermo) e insulina (neuroectodermo y célula β) en el caso de las células reprogramadas. Eso podría explicarse por el hecho de que no se ha empleado ningún medio específico para dirigir la diferenciación, sólo el medio empleado para preservar las células indiferenciadas (DMEM) con un 5% menos de suero y en ausencia de LIF. Por lo que al mantenerse la capacidad proliferativa de una población de células indiferenciadas, fue disminuyendo la proporción de células reprogramadas, diluyéndose finalmente la señal. Ello nos lleva por tanto, a emplear una estrategia de selección de células que expresen insulina.

7. Selección de células que expresan insulina.

Como se comenta en el bloque de resultados se hizo un experimento de selección de células que expresaran insulina mediante una estrategia de trampas celulares. A la vez se mantuvo un control de células reprogramadas pero no seleccionadas.

Se confirmó que la reprogramación era parcial, al sobrevivir sólo un 5% de la población celular a la presencia de neomicina.

Las células seleccionadas se caracterizaron molecularmente a día 17 mientras las células no seleccionadas se caracterizaron a día 10 tras la reprogramación, puesto que la dilución de la señal era directamente proporcional al tiempo en cultivo de las células. De esta manera, el perfil de expresión génica entre las células reprogramadas a día 11 del apartado anterior y éstas es muy similar; en lo único en que se diferencian éstas últimas es en la ausencia de expresión de GATA-4 (endodermo) y la expresión de los 3 marcadores de neuroectodermo y célula β , Pax-6, Isl-1 y Pdx-1.

Por su parte, las células seleccionadas tienen prácticamente el mismo perfil de las células no seleccionadas, tanto los marcadores de neuroectodermo y célula β como los de ectodermo, estando entre ellos el N-200, del que carecen las células no seleccionadas. Pero lo más destacable es la ausencia de marcadores de

GENES	CONTROL	CÉLULAS SELECC.
Pluripotencialidad		
Oct-3/4	+	+
Ectodermo		
Otx-2	+	+
N-200	-	+
GFAP	-	-
AChE	-	-
TH	-	-
GS	+	+
MBP	-	-
Nestina	+	+
Mesodermo		
Brachyury	-	-
Endodermo		
AFP	-	-
FoxA2	-	-
FoxA3	-	-
GATA4	-	-
GATA5	-	-
Neuroectodermo y Células β		
Pax6	+	+
Isl1	+	+
Pdx-1	+	+
Insulina I	-	-
Insulina II	+	+
Housekeeping		
B-actina	+	+

Tabla 13. Caracterización molecular de las células reprogramadas a día 10 (control, no seleccionadas) y 17 (seleccionadas con neomicina).

endodermo y la expresión de insulina II y no de insulina I, que ratifica el origen neuroectodérmico de las células.

De hecho, en roedores hay 2 genes que codifican la insulina: la insulina I y la insulina II (Melloul et al., 2002a). La primera se expresa en tejido pancreático, mientras la insulina II se expresa en islotes, pero también en el saco vitelino y algunas neuronas.

Todo ello confirma resultados preliminares (Roche et al., 2005b; Ying et al., 2003) en los que las células madre embrionarias derivan en precursores neuroectodérmicos al cultivarse en monocapa en ausencia de LIF, pues la ruta que conduce hacia el linaje ectodérmico se activa por defecto en estas condiciones.

8. Planes de futuro.

Este trabajo plantea varios frentes de investigación a acometer. En primer lugar está el problema de la dilución de la señal por una reprogramación parcial. Para paliar dicho problema habría que buscar una estrategia para dirigir la diferenciación eficientemente. Ello podría consistir en complementar la reprogramación y la selección de las células productoras de insulina con métodos coaxiales que pasen por la formación de EB para evitar la activación de la ruta ectodérmica por defecto. Un ejemplo sería usar medio RPMI 1640 condicionado (medio de cultivo de INS-1) para enriquecer los EB en células comprometidas a endodermo, pero también habría que mejorar la disgregación de los mismos para luego poder reprogramarlos.

Otro aspecto sería el de hacer una selección de las células que expresen la insulina I preferentemente, que es la forma pancreática. Para ello habría que usar un constructo en el que el gen de resistencia a la neomicina estuviera bajo el control del promotor de la insulina I. Además habría que hacer pruebas funcionales de respuesta a estímulos de glucosa en dichas células y

transplantarlas en ratones a los que se les ha inducido la diabetes para ver si reversion total o parcialmente la patología.

Por último, mencionar que la reprogramación con extractos de yemas pancreáticas en principio no podría aplicarse en humanos tal cual, puesto que el estadio embrionario de 16.5 días en el ratón se corresponde con un feto humano de 7 meses. Sin embargo este modelo nos sirve para estudiar y perfeccionar la técnica, puesto que nuestro grupo está trabajando en su aplicabilidad a las células madre adultas, en concreto las mesenquimales, a partir de las cuales se podrían conseguir células productoras de insulina autólogas, que no provocaran rechazo inmunológico y que supusieran una alternativa al dilema de la clonación terapéutica.





CONCLUSIONES

1. El método Chariot es un método alternativo no citotóxico de introducción de proteínas en el interior celular para llevar a cabo la reprogramación celular mediante extractos proteicos.
2. Cada laboratorio deberá poner a punto los parámetros cinéticos del método Chariot para el tipo celular de interés.
3. Las únicas moléculas que llegan al interior celular con efecto reprogramador son las proteínas, no preservando el método de extracción proteico la integridad de los ácidos nucleicos y careciendo éstos de potencial reprogramador.
4. La única fracción celular con capacidad reprogramadora es el extracto total, siendo mayor en el caso de las yemas pancreáticas que en el de las células INS-1.
5. Al emplear la reprogramación mediante extractos proteicos utilizando Chariot se consigue una reprogramación parcial del 5% respecto a la población celular total.
6. Si no se complementa la reprogramación con ninguna estrategia de dirección de la diferenciación y/o de selección de las células de interés, la señal se acaba diluyendo debido a la proliferación de células indiferenciadas en el cultivo.
7. El uso de un método de selección de las células de interés supone un avance en los estudios de reprogramación hacia células productoras de insulina y permite obtener poblaciones más homogéneas.
8. Al cultivar las células en monocapa y en ausencia de LIF se obtienen células reprogramadas de origen neuroectodérmico que expresan insulina tipo II.



ANEXO

Tabla comparativa entre el método Chariot comercial y el puesto a punto en esta tesis.

En la siguiente tabla se resumen las diferencias entre las condiciones establecidas por el método comercial para introducir las proteínas en el interior celular mediante Chariot y las establecidas en esta tesis tras la puesta a punto para las mESC-D3 con extractos proteicos de INS-1 y D3. Se partió del soporte con menor superficie de cultivo de entre los establecidos comercialmente para optimizar así el volumen de Chariot a emplear, pues tiene un precio elevado, y la cantidad de proteína en cada reacción, pues las yemas pancreáticas son costosas también a la hora de obtenerlas.

CONDICIONES	MÉTODO COMERCIAL	MÉTODO PUESTO A PUNTO
Soporte	24 pocillos	24 pocillos
Sustrato	-	Gelatina al 0.2 % en PBS
Nº de células	$5 \cdot 10^4$ células	$4 - 5 \cdot 10^4$ células
% de confluencia	40-50 %	40%
µg de proteína	0.5-1 µg	1 µg
Volumen de Chariot	2 µl	2 µl
Control negativo	-	- Chariot (PBS), + extracto -Chariot, - extracto (sólo PBS)
Vol. final del complejo	100 µl	100 µl
Tiempo de incubación del complejo a temperatura ambiente	30 min	30 min
Vol. de medio de cultivo sin suero	100 µl	100 µl (medio – suero y – LIF)
Tiempo de incubación prev. al medio completo	1 h	2 h
Tiempo de entrada de proteínas	2-3 h	24-48 h



BIBLIOGRAFÍA

- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A., and Wollheim, C. B. (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* *130*, 167-178.
- Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, K. L., and Tzukerman, M. (2001). Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* *50*, 1691-1697.
- Ber, I., Shternhall, K., Perl, S., Ohanuna, Z., Goldberg, I., Barshack, I., Benvenisti-Zarum, L., Meivar-Levy, I., and Ferber, S. (2003). Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation. *J Biol Chem* *278*, 31950-31957.
- Blyszczuk, P., Asbrand, C., Rozzo, A., Kania, G., St-Onge, L., Rupnik, M., and Wobus, A. M. (2004). Embryonic stem cells differentiate into insulin-producing cells without selection of nestin-expressing cells. *Int J Dev Biol* *48*, 1095-1104.
- Blyszczuk, P., Czyz, J., Kania, G., Wagner, M., Roll, U., St-Onge, L., and Wobus, A. M. (2003). Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 998-1003.
- Bonner-Weir, S., and Sharma, A. (2002). Pancreatic stem cells. *J Pathol* *197*, 519-526.
- Bonner-Weir, S., Taneja, M., Weir, G. C., Tatarkiewicz, K., Song, K. H., Sharma, A., and O'Neil, J. J. (2000). In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 7999-8004.
- Bonner-Weir, S., and Weir, G. C. (2005). New sources of pancreatic beta-cells. *Nat Biotechnol* *23*, 857-861.
- Bouwens, L., and Kloppel, G. (1996). Islet cell neogenesis in the pancreas. *Virchows Arch* *427*, 553-560.
- Bretzel, R. G., Eckhard, M., and Brendel, M. D. (2004). Pancreatic islet and stem cell transplantation: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Panminerva Med* *46*, 25-42.
- Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F. A., and Robl, J. M. (1998). Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol* *16*, 642-646.
- Collas, P. (2003). Nuclear reprogramming in cell-free extracts. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *358*, 1389-1395.
- Collas, P., and Hakelien, A. M. (2003). Teaching cells new tricks. *Trends Biotechnol* *21*, 354-361.

Cowan, C. A., Atienza, J., Melton, D. A., and Eggan, K. (2005). Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 309, 1369-1373.

Chakrabarti, S. K., and Mirmira, R. G. (2003). Transcription factors direct the development and function of pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metab* 14, 78-84.

Cheung, A. T., Dayanandan, B., Lewis, J. T., Korbitt, G. S., Rajotte, R. V., Bryer-Ash, M., Boylan, M. O., Wolfe, M. M., and Kieffer, T. J. (2000). Glucose-dependent insulin release from genetically engineered K cells. *Science* 290, 1959-1962.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.

Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Marh, J., Lu, S. J., Johnson, J., Meisner, L., and Lanza, R. (2006). Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* 439, 216-219.

Do, J. T., and Scholer, H. R. (2004). Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. *Stem Cells* 22, 941-949.

Dor, Y., Brown, J., Martinez, O. I., and Melton, D. A. (2004). Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429, 41-46.

Dudek, R. W., Lawrence, I. E., Jr., Hill, R. S., and Johnson, R. C. (1991). Induction of islet cytodifferentiation by fetal mesenchyme in adult pancreatic ductal epithelium. *Diabetes* 40, 1041-1048.

Edlund, H. (2002). Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* 3, 524-532.

Efrat, S. (1998). Prospects for gene therapy of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 41, 1401-1409.

Eiselein, L., Schwartz, H. J., and Rutledge, J. C. (2004). The challenge of type 1 diabetes mellitus. *Ilar J* 45, 231-236.

Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.

Ferber, S., Halkin, A., Cohen, H., Ber, I., Einav, Y., Goldberg, I., Barshack, I., Seijffers, R., Kopolovic, J., Kaiser, N., and Karasik, A. (2000). Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* 6, 568-572.

Fernandes, A., King, L. C., Guz, Y., Stein, R., Wright, C. V., and Teitelman, G. (1997). Differentiation of new insulin-producing cells is induced by injury in adult pancreatic islets. *Endocrinology* *138*, 1750-1762.

Fujimoto, W. Y. (2000). The importance of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Am J Med* *108 Suppl 6a*, 9S-14S.

Fujita, Y., Cheung, A. T., and Kieffer, T. J. (2004). Harnessing the gut to treat diabetes. *Pediatr Diabetes* *5 Suppl 2*, 57-69.

Gaustad, K. G., Boquest, A. C., Anderson, B. E., Gerdes, A. M., and Collas, P. (2004). Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* *314*, 420-427.

Gershengorn, M. C., Hardikar, A. A., Wei, C., Geras-Raaka, E., Marcus-Samuels, B., and Raaka, B. M. (2004). Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells. *Science* *306*, 2261-2264.

Gräpin-Botton, A. (2005). Ductal cells of the pancreas. *Int J Biochem Cell Biol* *37*, 504-510.

Grunert, S., Jechlinger, M., and Beug, H. (2003). Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 657-665.

Guz, Y., Nasir, I., and Teitelman, G. (2001). Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinology* *142*, 4956-4968.

Habener, J. F., Kemp, D. M., and Thomas, M. K. (2005). Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology* *146*, 1025-1034.

Hakelien, A. M., Gaustad, K. G., and Collas, P. (2004). Transient alteration of cell fate using a nuclear and cytoplasmic extract of an insulinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* *316*, 834-841.

Hakelien, A. M., Landsverk, H. B., Robl, J. M., Skalhegg, B. S., and Collas, P. (2002). Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. *Nat Biotechnol* *20*, 460-466.

Halvorsen, T., and Levine, F. (2001). Diabetes mellitus-cell transplantation and gene therapy approaches. *Curr Mol Med* *1*, 273-286.

Hansson, M., Tonning, A., Frandsen, U., Petri, A., Rajagopal, J., Englund, M. C., Heller, R. S., Hakansson, J., Fleckner, J., Skold, H. N., *et al.* (2004). Artfactual insulin release from differentiated embryonic stem cells. *Diabetes* *53*, 2603-2609.

- Henquin, J. C. (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* *49*, 1751-1760.
- Hess, D., Li, L., Martin, M., Sakano, S., Hill, D., Strutt, B., Thyssen, S., Gray, D. A., and Bhatia, M. (2003). Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* *21*, 763-770.
- Hori, Y., Rulifson, I. C., Tsai, B. C., Heit, J. J., Cahoy, J. D., and Kim, S. K. (2002). Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 16105-16110.
- Hunziker, E., and Stein, M. (2000). Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun* *271*, 116-119.
- Hwang, W. S., Roh, S. I., Lee, B. C., Kang, S. K., Kwon, D. K., Kim, S., Kim, S. J., Park, S. W., Kwon, H. S., Lee, C. K., *et al.* (2005). Patient-Specific Embryonic Stem Cells Derived From Human SCNT Blastocysts. *Obstet Gynecol Surv* *60*, 587-589.
- Hwang, W. S., Ryu, Y. J., Park, J. H., Park, E. S., Lee, E. G., Koo, J. M., Jeon, H. Y., Lee, B. C., Kang, S. K., Kim, S. J., *et al.* (2004). Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* *303*, 1669-1674.
- Ianus, A., Holz, G. G., Theise, N. D., and Hussain, M. A. (2003). In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* *111*, 843-850.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., *et al.* (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* *418*, 41-49.
- Kahan, B. W., Jacobson, L. M., Hullett, D. A., Ochoada, J. M., Oberley, T. D., Lang, K. M., and Odorico, J. S. (2003). Pancreatic precursors and differentiated islet cell types from murine embryonic stem cells: an in vitro model to study islet differentiation. *Diabetes* *52*, 2016-2024.
- Kahn, S. E. (2003). The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* *46*, 3-19.
- Kim, S. K., and Hebrok, M. (2001). Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev* *15*, 111-127.
- King, H., Aubert, R. E., and Herman, W. H. (1998). Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* *21*, 1414-1431.

Kojima, H., Fujimiya, M., Matsumura, K., Younan, P., Imaeda, H., Maeda, M., and Chan, L. (2003). NeuroD-betacellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med* 9, 596-603.

Lacy, P. E. (1982). Pancreatic transplantation as a means of insulin delivery. *Diabetes Care* 5 *Suppl 1*, 93-97.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lang, J. (1999). Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem* 259, 3-17.

Lanza, R. P., Chung, H. Y., Yoo, J. J., Wettstein, P. J., Blackwell, C., Borson, N., Hofmeister, E., Schuch, G., Soker, S., Moraes, C. T., *et al.* (2002). Generation of histocompatible tissues using nuclear transplantation. *Nat Biotechnol* 20, 689-696.

Leon-Quinto, T., Jones, J., Skoudy, A., Burcin, M., and Soria, B. (2004). In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Diabetologia* 47, 1442-1451.

Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R., and McKay, R. (2001). Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292, 1389-1394.

Madsen, O. D., Jensen, J., Blume, N., Petersen, H. V., Lund, K., Karlsen, C., Andersen, F. G., Jensen, P. B., Larsson, L. I., and Serup, P. (1996). Pancreatic development and maturation of the islet B cell. Studies of pluripotent islet cultures. *Eur J Biochem* 242, 435-445.

Meissner, A., and Jaenisch, R. (2006). Generation of nuclear transfer-derived pluripotent ES cells from cloned Cdx2-deficient blastocysts. *Nature* 439, 212-215.

Melloul, D., Marshak, S., and Cerasi, E. (2002a). Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45, 309-326.

Melloul, D., Marshak, S., and Cerasi, E. (2002b). Regulation of pdx-1 gene expression. *Diabetes* 51 *Suppl 3*, S320-325.

Miyazaki, S., Yamato, E., and Miyazaki, J. (2004). Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes* 53, 1030-1037.

Moller, D. E. (2001). New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414, 821-827.

Moritoh, Y., Yamato, E., Yasui, Y., Miyazaki, S., and Miyazaki, J. (2003). Analysis of insulin-producing cells during in vitro differentiation from feeder-free embryonic stem cells. *Diabetes* 52, 1163-1168.

Munsie, M. J., Michalska, A. E., O'Brien, C. M., Trounson, A. O., Pera, M. F., and Mountford, P. S. (2000). Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Curr Biol* 10, 989-992.

Otonkoski, T., Beattie, G. M., Mally, M. I., Ricordi, C., and Hayek, A. (1993). Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells. *J Clin Invest* 92, 1459-1466.

Pang, K., Mukonoweshuro, C., and Wong, G. G. (1994). Beta cells arise from glucose transporter type 2 (Glut2)-expressing epithelial cells of the developing rat pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9559-9563.

Paris, M., Turrel-Cuzin, C., Plachot, C., and Ktorza, A. (2004). Review: pancreatic beta-cell neogenesis revisited. *Exp Diabetes Res* 5, 111-121.

Poitout, V., and Robertson, R. P. (1996). An integrated view of beta-cell dysfunction in type-II diabetes. *Annu Rev Med* 47, 69-83.

Ptasznik, A., Beattie, G. M., Mally, M. I., Cirulli, V., Lopez, A., and Hayek, A. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase is a negative regulator of cellular differentiation. *J Cell Biol* 137, 1127-1136.

Qin, M., Tai, G., Collas, P., Polak, J. M., and Bishop, A. E. (2005). Cell extract-derived differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells* 23, 712-718.

Rajagopal, J., Anderson, W. J., Kume, S., Martinez, O. I., and Melton, D. A. (2003). Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science* 299, 363.

Ramiya, V. K., Maraist, M., Arfors, K. E., Schatz, D. A., Peck, A. B., and Cornelius, J. G. (2000). Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 6, 278-282.

Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N., and Newsholme, E. A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1, 785-789.

Rideout, W. M., 3rd, Hochedlinger, K., Kyba, M., Daley, G. Q., and Jaenisch, R. (2002). Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* 109, 17-27.

Roche, E. (2003). Diabetes tipo 2: gluco-lipo-toxicidad y disfunción de la célula β pancreática. *Ars Pharmaceutica*, 44, 313-332.

Roche, E., Burcin, M.M., Esser, S., Rüdiger, M. and Soria, B. (2003). The use of gating technology in bioengineering insulin-secreting cells from embryonic stem cells. *Cytotechnology* 41, 145-151.

Roche, E., Reig, J. A., Campos, A., Paredes, B., Isaac, J. R., Lim, S., Calne, R. Y., and Soria, B. (2005a). Insulin-secreting cells derived from stem cells: Clinical perspectives, hypes and hopes. *Transpl Immunol* *15*, 113-129.

Roche, E., Sepulcre, M. P., Ensenat-Waser, R., Maestre, I., Reig, J. A., and Soria, B. (2003). Bio-engineering insulin-secreting cells from embryonic stem cells: a review of progress. *Med Biol Eng Comput* *41*, 384-391.

Roche, E., Sepulcre, P., Reig, J. A., Santana, A., and Soria, B. (2005b). Ectodermal commitment of insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells. *Faseb J* *19*, 1341-1343.

Roche, E., and Soria, B. (2004). Generation of new islets from stem cells. *Cell Biochem Biophys* *40*, 113-124.

Rolletschek, A., Chang, H., Guan, K., Czyz, J., Meyer, M., and Wobus, A. M. (2001). Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons is enhanced by survival-promoting factors. *Mech Dev* *105*, 93-104.

Rosenfeld, L. (2002). Insulin: discovery and controversy. *Clin Chem* *48*, 2270-2288.

Ruhnke, M., Ungefroren, H., Nussler, A., Martin, F., Brulport, M., Schormann, W., Hengstler, J. G., Klapper, W., Ulrichs, K., Hutchinson, J. A., *et al.* (2005). Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology* *128*, 1774-1786.

Sapir, T., Shternhall, K., Meivar-Levy, I., Blumenfeld, T., Cohen, H., Skutelsky, E., Eventov-Friedman, S., Barshack, I., Goldberg, I., Pri-Chen, S., *et al.* (2005). Cell-replacement therapy for diabetes: Generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 7964-7969.

Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. A., and Benvenisty, N. (2000). Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 11307-11312.

Schwitzgebel, V. M. (2001). Programming of the pancreas. *Mol Cell Endocrinol* *185*, 99-108.

Servitja, J. M., and Ferrer, J. (2004). Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function. *Diabetologia* *47*, 597-613.

Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., Korbitt, G. S., Toth, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M., and Rajotte, R. V. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* *343*, 230-238.

Shiroi, A., Ueda, S., Ouji, Y., Saito, K., Moriya, K., Sugie, Y., Fukui, H., Ishizaka, S., and Yoshikawa, M. (2005). Differentiation of embryonic stem cells

into insulin-producing cells promoted by Nkx2.2 gene transfer. *World J Gastroenterol* *11*, 4161-4166.

Shiroi, A., Yoshikawa, M., Yokota, H., Fukui, H., Ishizaka, S., Tatsumi, K., and Takahashi, Y. (2002). Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone. *Stem Cells* *20*, 284-292.

Sipione, S., Eshpeter, A., Lyon, J. G., Korbitt, G. S., and Bleackley, R. C. (2004). Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells. *Diabetologia* *47*, 499-508.

Sjoholm, A., Korsgren, O., and Andersson, A. (1994). Polyamine requirements in nicotinamide-stimulated beta-cell differentiation in fetal porcine islet-like cell clusters. *Endocrinology* *135*, 1559-1565.

Slack, J. M. (1995). Developmental biology of the pancreas. *Development* *121*, 1569-1580.

Soria, B., Roche, E., Berna, G., Leon-Quinto, T., Reig, J. A., and Martin, F. (2000). Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* *49*, 157-162.

Soria, B. et al (2003). "Células madre: de la investigación básica a sus usos terapéuticos." Premio "Junta General del Principado de Asturias –Sociedad Internacional de Bioética (SIBI)".

Soria, B., Skoudy, A., and Martin, F. (2001). From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia* *44*, 407-415.

Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Torres, M., Oliver, G., and Gruss, P. (1997). The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* *386*, 399-402.

Stainier, D. Y. (2002). A glimpse into the molecular entrails of endoderm formation. *Genes Dev* *16*, 893-907.

Strelchenko, N., Kukharenko, V., Shkumatov, A., Verlinsky, O., Kuliev, A., and Verlinsky, Y. (2006). Reprogramming of human somatic cells by embryonic stem cell cytoplasm. *Reprod Biomed Online* *12*, 107-111.

Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* *11*, 1553-1558.

Tam, P. P., Kanai-Azuma, M., and Kanai, Y. (2003). Early endoderm development in vertebrates: lineage differentiation and morphogenetic function. *Curr Opin Genet Dev* *13*, 393-400.

- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Treutelaar, M. K., Skidmore, J. M., Dias-Leme, C. L., Hara, M., Zhang, L., Simeone, D., Martin, D. M., and Burant, C. F. (2003). Nestin-lineage cells contribute to the microvasculature but not endocrine cells of the islet. *Diabetes* 52, 2503-2512.
- Trucco, M. (2005). Regeneration of the pancreatic beta cell. *J Clin Invest* 115, 5-12.
- Tsanadis, G., Kotoulas, O., and Lollis, D. (1995). Hepatocyte-like cells in the pancreatic islets: study of the human foetal pancreas and experimental models. *Histol Histopathol* 10, 1-10.
- Vaca, P., Berna, G., Martin, F., and Soria, B. (2003). Nicotinamide induces both proliferation and differentiation of embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Transplant Proc* 35, 2021-2023.
- Vaca, P., Martin, F., Vegara-Meseguer, J., Rovira, J., Berna, G., and Soria, B. (2005). Induction of differentiation of embryonic stem cells into insulin secreting cells by fetal soluble factors. *Stem Cells*.
- Wakayama, T., Tabar, V., Rodriguez, I., Perry, A. C., Studer, L., and Mombaerts, P. (2001). Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 292, 740-743.
- Walev, I., Bhakdi, S. C., Hofmann, F., Djonder, N., Valeva, A., Aktories, K., and Bhakdi, S. (2001). Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3185-3190.
- Wells, J. M., and Melton, D. A. (1999). Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 393-410.
- Wells, J. M., and Melton, D. A. (2000). Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 127, 1563-1572.
- Wobus, A. M. (2001). Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med* 22, 149-164.
- Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D., and Carpenter, M. K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 971-974.
- Yang, L., Li, S., Hatch, H., Ahrens, K., Cornelius, J. G., Petersen, B. E., and Peck, A. B. (2002). In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8078-8083.

Ying, Q. L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., and Smith, A. (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* *21*, 183-186.

Yu, J., Vodyanik, M. A., He, P., Slukvin, II, and Thomson, J. A. (2005). Human Embryonic Stem Cells Reprogram Myeloid Precursors Following Cell-Cell Fusion. *Stem Cells*.

Zalzman, M., Gupta, S., Giri, R. K., Berkovich, I., Sappal, B. S., Karnieli, O., Zern, M. A., Fleischer, N., and Efrat, S. (2003). Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 7253-7258.

Zhang, L., Hong, T. P., Hu, J., Liu, Y. N., Wu, Y. H., and Li, L. S. (2005). Nestin-positive progenitor cells isolated from human fetal pancreas have phenotypic markers identical to mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* *11*, 2906-2911.

Zimmet, P., Alberti, K. G., and Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* *414*, 782-787.

Zulewski, H., Abraham, E. J., Gerlach, M. J., Daniel, P. B., Moritz, W., Muller, B., Vallejo, M., Thomas, M. K., and Habener, J. F. (2001). Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* *50*, 521-533.

