

Universidad de Sevilla

*Departamento de Fisiología
Médica y Biofísica*

CABIMER

*Centro Andaluz de Biología
Molecular Y Medicina
Regenerativa*

***DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS
TRONCALES EMBRIONARIAS HUMANAS
HACIA UN LINAJE BETA-PANCREÁTICO:
ESTUDIOS ENFOCADOS A PROCESOS DE
MADURACIÓN***

Tesis Doctoral para optar al título de Doctor

Presentada por:

Daniela Pezzolla

Dirigida por:

Dr. Bernat Soria Escoms

Dr. Abdelkrim Hmadcha

Sevilla, 2014

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La Diabetes Mellitus.....	1
1.1.1. Clasificación de la Diabetes Mellitus	2
1.1.2. Fisiopatología del páncreas	4
1.1.3. Terapia de la Diabetes Mellitus	7
1.2. Desarrollo pancreático	9
1.3. Las células troncales	16
1.3.1. Clasificación de las células troncales	17
1.3.2. Derivación y cultivo de las células troncales embrionarias humanas	19
1.3.3. Derivación y cultivo de las células troncales pluripotenetes inducidas	22
1.3.4. Caracterización de las células troncales pluripotentes.....	23
1.4. Diferenciación a derivados de linaje endodérmico y obtención de células β -pancreáticas	26
1.5. El resveratrol	30
1.5.1. Efectos del resveratrol sobre la célula β	33
2. OBJETIVOS	36
2.1. Objetivos específicos	36
3. MATERIALES Y METODOS	37
3.1. Cultivo celular	37
3.2. Diferenciación de las células troncales embrionarias humanas y de las células troncales inducidas	38
3.3. Técnicas de biología molecular	40

3.3.1.	Análisis de expresión génica	40
3.3.2.	Inmunoprecipitación de la cromatina	42
3.3.3.	Immunofluorescencia	43
3.3.4.	Western blot	44
3.4.	Estudios funcionales <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	46
3.4.1.	Medición de calcio intracelular	46
3.4.2.	ELISA	46
3.4.3.	Transplante en ratones diabéticos	47
3.5.	Ánalisis estadístico	48
4.	RESULTADOS	49
4.1.	Efectos del resveratrol sobre la línea celular INS-1E	49
4.1.1.	Caracterización del modelo celular utilizado	49
4.1.2.	Efectos del resveratrol sobre el contenido y la secreción de insulina	50
4.1.3.	Determinación del mecanismo de acción	52
4.2.	Diferenciación de las células troncales embrionarias humanas hacia células β -pancreáticas.....	54
4.2.1.	Obtención de endodermo definitivo	54
4.2.2.	Desarrollo de un protocolo de diferenciación.....	56
4.2.3.	Optimización del protocolo de diferenciación para la obtención de células β -pancreáticas.....	59
4.3.	Efectos del resveratrol en la maduración celular.....	63
4.3.1.	Mecanismo de acción del resveratrol	71
4.4.	Xenotrasplante en ratones diabéticos	74
5.	DISCUSIÓN	78
5.1.	Efectos del resveratrol en las INS-1E	78
5.2.	Diferenciación de las células troncales embrionarias hacia endodermo definitivo	79
5.3.	Diferenciación de las células troncales embrionarias hacia	

células β -pancreáticas	80
5.4. Efectos del resveratrol en la maduración celular	83
5.5. Mecanismo de acción del resveratrol	84
6. CONCLUSIONES	86
7. BIBLIOGRAFÍA	88
8. ANEXOS	98

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

DM	Diabetes Mellitus
DG	Diabetes Gestacional
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
FIV	Fecundación <i>In Vitro</i>
MCI	Masa Celular interna
CTEh	Células Troncales Embrionarias humanas
hiPS	Células troncales humanas pluripotentes inducidas
CTG	Células Troncales Germinales
CTT	Células Troncales de Teratoma y Teratocarcinoma
CTA	Células Troncales Adultas
RA	Ácido Retinóico
FGF	Fibroblast Growth Factor
BMP	Bone Morphogenic Protein
SHH	Sonic Hedgehog
TGF	Tumor Growth Factor
q-PCR	PCR cuantitativa
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
GFP	Green Fluorescent Protein
GSIS	Glucose Stimulate Insulin Secretion
NOD	No Obese Diabetic
SCID	Severe Combined Immunodeficient
STZ	Estreptozotocina
WAT	White Adipose Tissue
FFA	Free Fatty Acids

1. INTRODUCCIÓN

Una de las áreas más fascinante y prometedora de la biología moderna se basa en el estudio de las células troncales. Unas células con un gran potencial diferenciativo, capaces teóricamente de formar cualquier célula del organismo adulto. Su descubrimiento y estudio ha llevado al desarrollo de un nuevo concepto de medicina conocido como la *medicina reparativa* o *regenerativa*. Este nuevo tipo de medicina se vincula estrechamente a la terapia celular que se basa en el uso de células troncales de distinto origen para generar un tejido o célula sustitutos a otros enfermos o dañados y así conseguir un posible medicamento para enfermedades sin tratamiento como el Parkinson, el Alzheimer, las Distrofias Musculares o la Diabetes Mellitus (DM).

1.1 La Diabetes Mellitus

La DM es un síndrome clínico caracterizado por hiperglicemia y otras alteraciones metabólicas derivantes de una falta absoluta o relativa de insulina que puede llevar a complicaciones crónicas como neuropatía, retinopatía, cardiopatía y pie diabético. La hiperglucemia crónica, incluso en ausencia de síntomas, conlleva lesiones en múltiples tejidos, con daños especialmente sensibles en los pequeños vasos de la retina, los riñones y los nervios periféricos. Por ello, la diabetes es una de las principales causas de ceguera, amputaciones y enfermedad renal terminal en las sociedades desarrolladas (*Figura 1.1*).

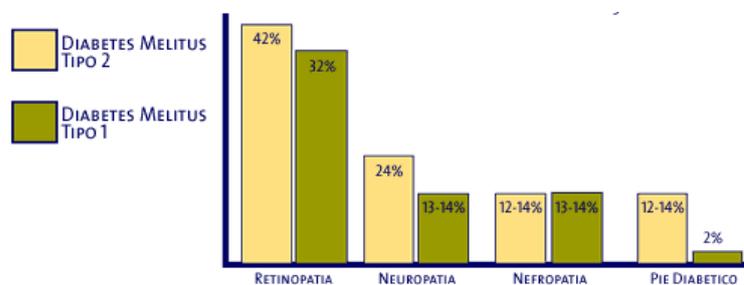


Figura 1.1 Prevalencia de las complicaciones crónicas de la diabetes. Estudio de la prevalencia de las principales complicaciones a las que se enfrentan los pacientes con DM tipo 1 y DM tipo 2. Fuente: www.fundaciondiabetes.org Imagen de A. Goday.

Adicionalmente, la diabetes conlleva un importante riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECV), tanto por sí misma como por su asociación a otros factores de riesgo, como hipertensión arterial y dislipemia. Los costes derivados del tratamiento y prevención de la diabetes se convierten en una de las principales partidas presupuestarias que debe asumir el sistema sanitario. La prevalencia de DM en España se sitúa en torno al 13,8% [2] en mayores de 18 años según lo reportado en el estudio di@bet.es (Tabla 1). Se han recogido datos de personas con diabetes conocidas y de otras que han sido diagnosticadas a raíz del estudio, de los que se desprende que el 43,5 % de los afectados desconoce que padece la enfermedad [2].

Tabla 1. Prevalencia de la diabetes y trastornos relacionados en España (2010)

	Prevalencia (%)
Diabetes Mellitus Total	13.8
Diabetes Mellitus conocida	7.8
Diabetes Mellitus no conocida	6
Intolerancia a la glucosa	9.2
Glucemia basal alterada	3.4

1.1.1 Clasificación de la Diabetes Mellitus

Existen diferentes tipos de diabetes clasificados por la American Diabetes Association en DM tipo 1 y tipo 2, diabetes gestacional y diabetes secundarias (otros tipos específico de diabetes) [3].

La DM tipo 1 (DM1) corresponde a la diabetes insulino dependiente o juvenil, en la que la destrucción de las células β del páncreas conduce a una deficiencia absoluta de insulina. En la clasificación actual, la DM1 se subdivide en dos subtipos:

- DM1 A (o autoinmune) en la que existe una destrucción selectiva de las células β del páncreas mediada por linfocitos T activados en sujetos con haplotipos HLA de predisposición. Después de un período preclínico de duración variable, durante el cual el paciente permanece asintomático, cuando la masa de células productoras de insulina llega a un valor crítico el paciente presenta la

sintomatología clásica: poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso y una progresiva cetosis que puede acabar en cetoacidosis, si no se instaura tratamiento con insulina exógena.

- DM1 B (o idiopática) la cual engloba a aquellos pacientes con mismas o iguales características, en los que no se encuentran datos de autoinmunidad ni haplotipos HLA de predisposición. Como entidad de reciente descripción se conoce poco de su etiología, evolución y pronóstico.

Para la DM1 la prevalencia se sitúa entre 0,2 y 0,3%, representando entre un 10 y un 15% del total de personas con DM. Aunque la DM1 normalmente representa tan sólo una minoría de la carga total de la diabetes en la población, es la forma predominante de la enfermedad en los grupos de edad más jóvenes en la mayoría de los países desarrollados.

La DM de tipo 2 (DM2) se produce en cambio con el avance de la edad en sujetos de riesgo (anamnesi familiar, hipertensión, obesidad, etc.) y se caracteriza por hiperglicemia debida a:

- una alterada secreción de insulina, a nivel del páncreas
- una aumentada producción de glucosa, en el hígado
- una reducida captación periférica de la glucosa (insulino-resistencia), en los tejidos periféricos

La DM2 se ha convertido en uno de los problemas sanitarios más graves de nuestro tiempo. Sus proporciones son ya epidémicas en la mayor parte del mundo, se estima que actualmente existen 382 millones de personas afectadas en todo el planeta, una cifra que puede llegar a los 592 millones en el año 2035 si se cumplen las últimas predicciones [4].

La diabetes gestacional (DG) se produce durante el embarazo y se caracteriza por una alterada secreción y una aumentada resistencia a la insulina. Normalmente desaparece después del embarazo aunque puede dejar un aumentado riesgo de presentar en futuro DM2 en la mujer.

El grupo de las **diabetes secundarias** incluye:

- Pacientes con defectos genéticos en la función de la célula β (MODY) o en la acción de la insulina
- Patologías pancreáticas como pancreatitis, fibrosis cística y otros

- Endocrinopatías
- Diabetes inducida por fármacos, tóxicos o agentes infecciosos
- Enfermedades asociadas con la diabetes como Síndrome de Down y otras

Para conseguir un beneficio terapéutico en pacientes con DM es necesario comprender como funcionan las células beta y cuales son los mecanismos involucrados en el desarrollo de la patología diabética.

1.1.2 Fisiopatología del páncreas

En la diabetes el tejido comprometido está formado por las células β -pancreáticas, uno de los cuatro tipos celulares que constituyen los islotes de Langerhans, responsables de la secreción de insulina y del mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en el torrente sanguíneo (Figura 1.2).

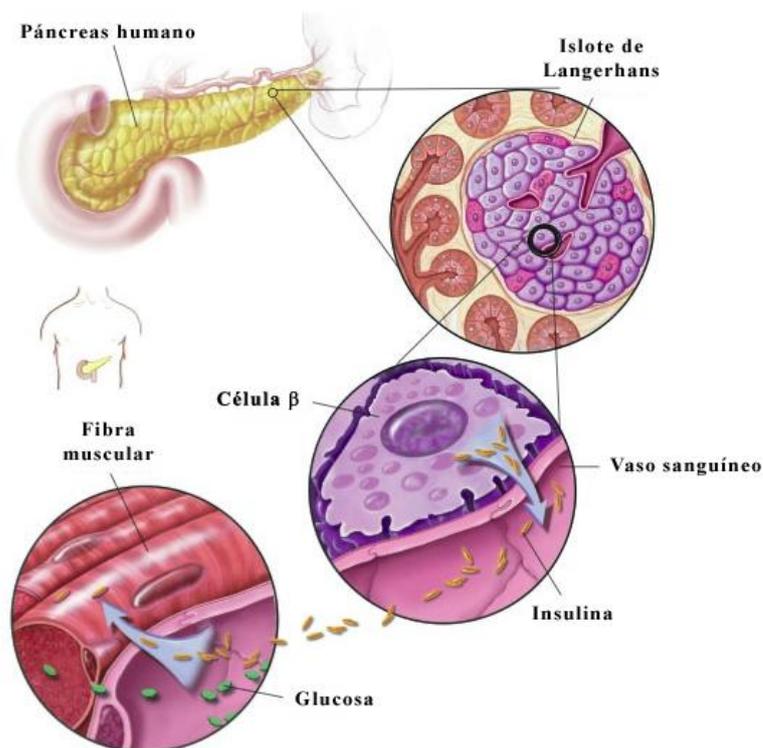


Figura 1.2 Representación esquemática de la función de las células β . Las células β como parte de los islotes de Langerhans presentes en el páncreas mantienen la homeostasis de la glucosa secretando la insulina en el torrente sanguíneo. Fuente: © 2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk.

El páncreas es un órgano heterogéneo constituido de dos partes, una con función endocrina y otra con función exocrina (*Figura 1.3*).

El **páncreas exocrino** se compone de las *células exocrinas*, responsables de la secreción de enzimas digestivas (proteasas, lipasas, amilasas) y de las *células ductales*, responsables del pasaje de los jugos gástricos desde las células exocrinas al intestino.

El **páncreas endocrino** se compone en cambio de los islotes de Langerhans con sus 5 diferentes tipos celulares:

- células α responsables de la secreción del glucagón, una hormona con función hiperglicemiante
- células β responsables de la secreción de insulina, una hormona con función hipoglicemiante
- células δ responsables de la secreción de la somatostatina
- células PP responsables de la secreción del polipéptido pancreático (PP)
- células ϵ responsables de la secreción de la ghrelina

Las células β representan entre el 50-55% de las células totales en los islotes de Langerhans [5, 6]. Los islotes a su vez constituyen un 1% del páncreas entero.

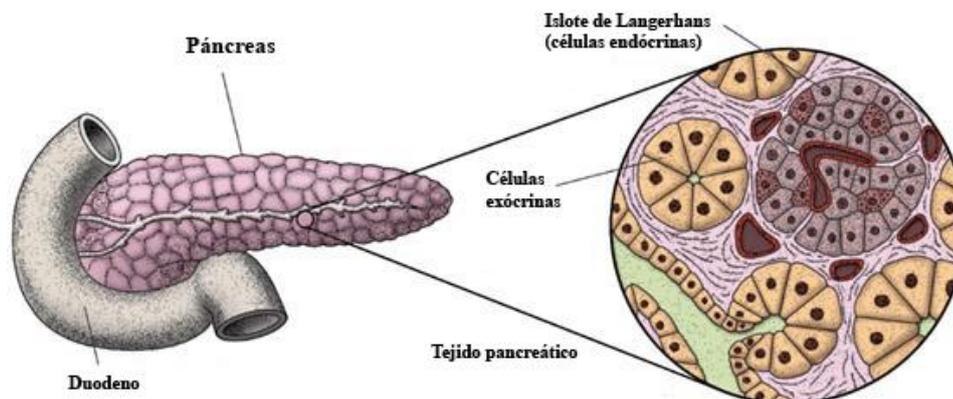


Figura 1.3 Representación esquemática del páncreas. Páncreas entero y sección transversal para la visualización de los tejidos endócrinos y exócrinos.

La célula β funciona como sensor de los niveles de glucosa en la sangre y cuando esta alcanza una concentración > 5 mM se activa un mecanismo altamente regulado que

lleva a la secreción de insulina (*Figura 1.4*). Durante este proceso la glucosa entra rápidamente en la célula gracias a un receptor específico de membrana (GLUT2) y viene fosforilada por la glucoquinasa (GK). El metabolismo de la fosfo-glucosa (F-glucosa) produce un aumento del ratio ATP/ADP intracelular que provoca el cierre de los canales de potasio ATP dependientes. Esto causa una despolarización de la membrana plasmática que produce la apertura de los canales de calcio voltaje-dependientes. La entrada de calcio (Ca^{2+}) en la célula favorece la fusión de las vesículas secretorias con la membrana plasmática y la liberación de insulina. El Ca^{2+} también actúa a nivel de transcripción activando el gen de la insulina y promoviendo así la síntesis de nueva pre-pro-insulina. La maduración de la insulina se produce en el aparato de Golgi mediante la acción enzimática de las proconvertasas PC1/3 y PC2 [7].

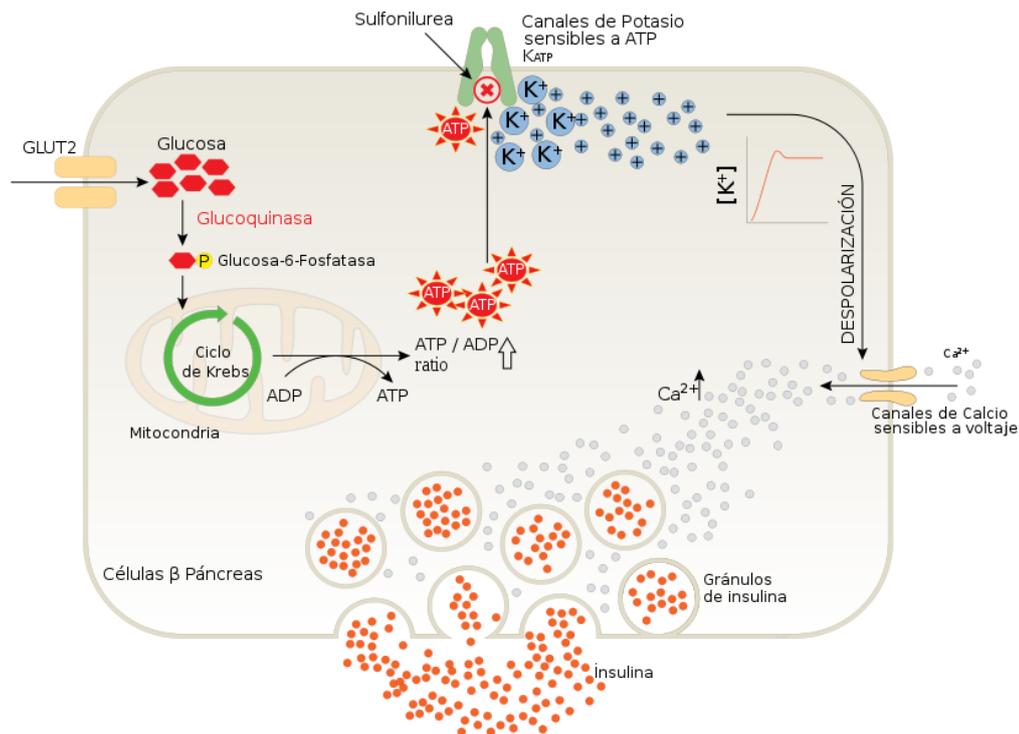


Figura 1.4 Mecanismo de secreción de la insulina dependiente de glucosa. Fuente: www.escaademic.com

La falta de una respuesta adecuada al aumento de la glucosa por parte de las células β -pancreáticas se transforma en una situación de hiperglicemia (niveles de glucosa en la sangre > 126 mg/dl en ayuna) la cual, si no se trata, puede causar el desarrollo de la

diabetes. Actualmente no existe cura para esta enfermedad metabólica pero si es posible intentar prevenir su desarrollo o relentizar la aparición de sus complicaciones mediante el desarrollo de tratamientos que permitan de manera segura, efectiva y estable mantener la normogluemia.

1.1.3 Terapia de la Diabetes Mellitus

El descubrimiento de la insulina en 1922 fue el primero gran éxito para el tratamiento de la DM. Desde entonces la terapia con insulina exógena ha avanzado mucho gracias al desarrollo de nuevas formulaciones que mejoran tanto su farmacocinética como su farmacodinámica permitiendo así un control siempre más fino sobre la glucemia de los pacientes [8]. También ha mejorado mucho el sistema de suministro de insulina (plumas dosificadoras, bombas de infusión o sistemas inhalatorios) y los aparatos para el auto-monitoreo de la glucosa (sistema de monitorización continua). Lamentablemente, el tratamiento de la diabetes mediante el aporte exógeno de insulina no siempre es capaz de conseguir niveles estables de glucosa en la sangre, de manera que con frecuencia se producen casos de severa hipogluemia o hipergluemia. Otros problemas son el sistema invasivo debido a las inyecciones continuas de insulina, la dosificación imprecisa o el alto coste de los sistemas más avanzados (bomba de infusión de insulina, monitorización continua de la glucosa). Hasta la fecha la única solución para reestablecer de manera más permanente la normogluemia se consigue mediante el trasplante de páncreas o de islotes pancreáticos. El primer trasplante de páncreas de donante cadavérico llevado a cabo con éxito remonta al 1966. De los trasplantes de páncreas efectuados el 67,6% van asociados con trasplante simultaneo de riñón, en el 19% de los casos, en cambio, el trasplante de páncreas sigue el de riñón y en el 13,4% de los casos se procede al trasplante del sólo páncreas [9]. Gracias a las mejoras en la técnica quirúrgica y en las terapias inmunosopresivas la supervivencia del trasplante ha aumentado sensiblemente en las últimas décadas (*Figura 1.5*) llegando a una supervivencia media de 7-14 años [10]. Sin embargo los problemas, como en todos los casos de trasplantes de órganos, son varios y entre ellos, la escasez de donantes, el riesgo de la operación, el rechazo inmunológico, la duración del trasplante y también

los efectos secundarios de la terapia inmunosupresiva que acompaña de por vida al paciente son algunos ejemplos.

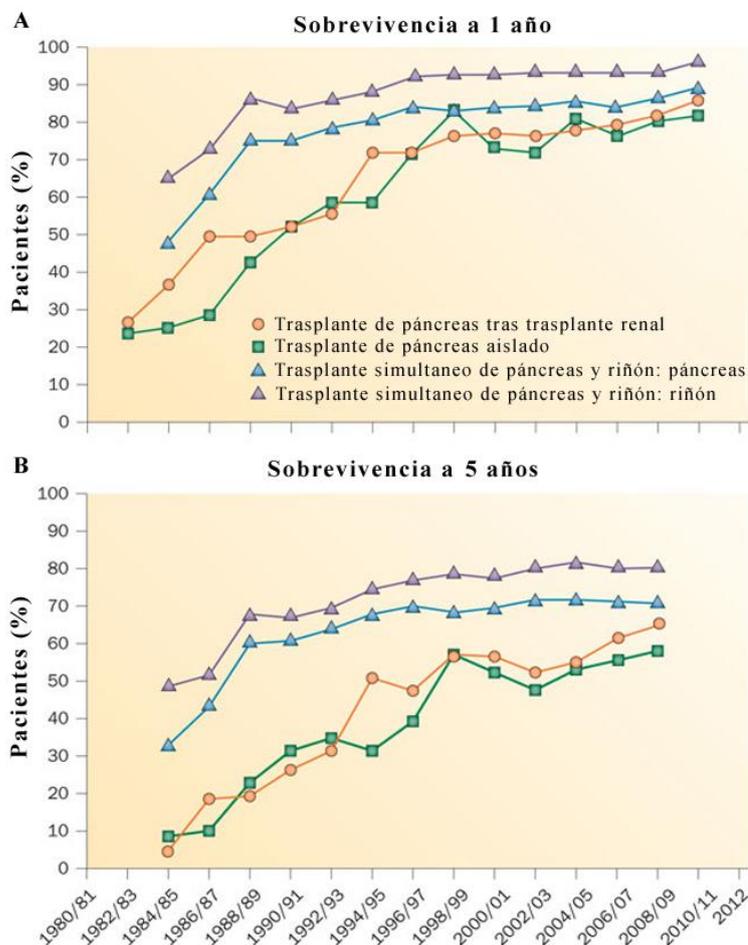


Figura 1.5 Sobrevivencia del trasplante de páncreas y riñón. Porcentaje de pacientes que a 1 año (A) y a 5 años (B) de distancia de la operación siguen manteniendo el trasplante. Fuente: Gruessner y colaboradores [10]

Otra técnica, que no resuelve muchos de los problemas arriba mencionados pero que resulta ser bastante menos invasiva para el paciente consiste en transplantar sólo los islotes pancreáticos. De esta forma el trasplante se lleva a cabo con tiempos mucho más cortos (menos de una hora), con anestesia local y bajo monitoreo ecográfico. Brevemente, el páncreas se extrae del donante cadáver y se pone en la Cámara de Ricordi donde una serie de pasos químicos y mecánicos digieren el páncreas liberando los islotes del tejido exócrino. Los islotes de Langerhans vienen finalmente purificados

mediante centrifugación con gradiente de densidad e infundidos percutáneamente mediante catéter en la vena porta. Para el trasplante se necesita una gran cantidad de islotes (1300/Kg) debido a la alta mortalidad de células observada en el inmediato post-trasplante en consecuencia a la reacción inflamatoria. El trasplante de islotes es mucho más efectivo de la terapia con insulina en reducir la progresión de las complicaciones diabéticas (retinopatía y nefropatía) pero resulta menos duradero que un trasplante de páncreas ya que a los 3 años solo el 44% de los pacientes sigue sin necesitar insulina exógena [11]. Sin embargo, a medida que se incrementa el número de centros especializados en el trasplante de islotes, mayor es la necesidad de islotes para su trasplante lo que hace del problema de escasez de donantes una gran limitación.

Por tanto, el estudio de nuevas fuentes de células productoras de insulina así como de nuevos tratamientos que permitan preservar o incluso aumentar la masa de células β en los pacientes con DM representa un objetivo de primera necesidad en este campo. En este sentido, las células madre constituyen una alternativa muy prometedora, ya que la terapia celular permitiría sustituir el tejido dañado por otro sano capaz de restablecer la funcionalidad perdida eliminando además muchos de los problemas mencionados arriba. El conocimiento de la biología celular y de los mecanismos moleculares que regulan las distintas etapas del desarrollo pancreático son de fundamental importancia para la terapia celular de los pacientes diabéticos, proporcionando las líneas a seguir para dirigir la diferenciación *in vitro* de las células troncales embrionarias humana (CTEh) hacia un fenotipo β -pancreático que pueda ser utilizado en la clínica para revertir la diabetes.

1.2 Desarrollo pancreático

El páncreas es un órgano complejo y la historia de su complejidad empieza durante el desarrollo. La organogénesis pancreática se activa, de hecho, en dos distintas regiones endodérmicas, cada una caracterizada por una serie de señales extrínsecas muy diferentes derivantes de los distintos tejidos mesodérmicos que las rodean. Solo más

adelante durante el desarrollo los dos nichos pancreáticos se fundirán para dar lugar a lo que es el páncreas (*Figura 1.6*).

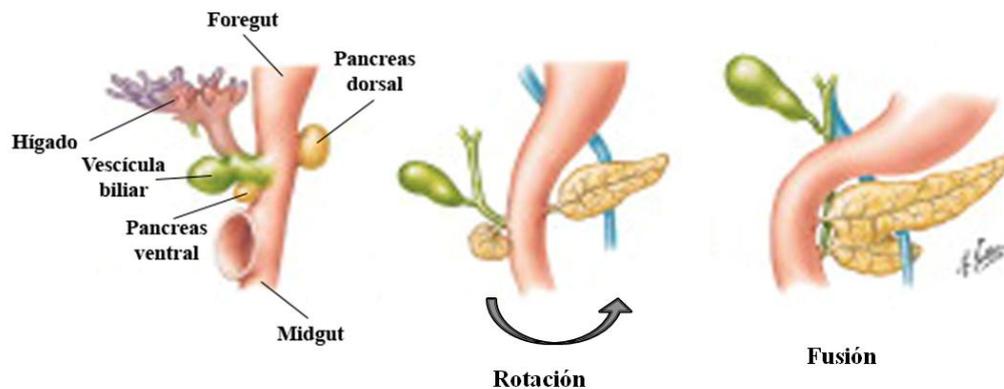


Figura 1.6 Desarrollo del páncreas. Representación esquemática de las etapas del desarrollo pancreático: brote de los primordios dorsal y ventral, rotación del tubo intestinal y fusión de los dos esbozos pancreáticos. Imagen modificada desde: Elsevier, www.netterimages.com.

Gracias a los numerosos estudios de desarrollo embrionario llevados a cabo en los modelos animales murino es posible conocer los procesos celulares, las vías de señalizaciones y los factores intrínsecos involucrados en la formación de este órgano. Durante la gastrulación (E 6.5) el endodermo se organiza para formar el gut tube gracias a movimientos morfogénéticos y a las señales extrínsecas, principalmente Nodal, proveniente de la notocorda. Al mismo tiempo el “gut tube” empieza a regionalizarse a lo largo de los axes antero-posterior (“foregut”, “midgut” y “hindgut”) y dorso-ventral. Las tres zonas antero-posterior se caracterizan por una expresión diferencial de algunos genes, en particular *Sox/Hhex/Pdx1* en el foregut, *Pdx1/Cdx2* en el midgut y *Cdx2/Cdx1* en el “hindgut” (E8.5). Sucesivamente cada una de esas tres zonas del “gut tube” empiezan a subdividirse en lo que serán las alocaiones específicas de cada uno de los primordios que de ellas derivan mediante la expresión local de factores de transcripción intrínsecos oragano-específicos inducidos por las moléculas de señalización secretadas por los derivados mesodérmicos más próximos [12, 13] (*Figura 1.7*). De fundamental importancia para esta delicada fase, es el preciso control espacio-temporal de las interacciones entre los tejidos y el desarrollo pancreático.

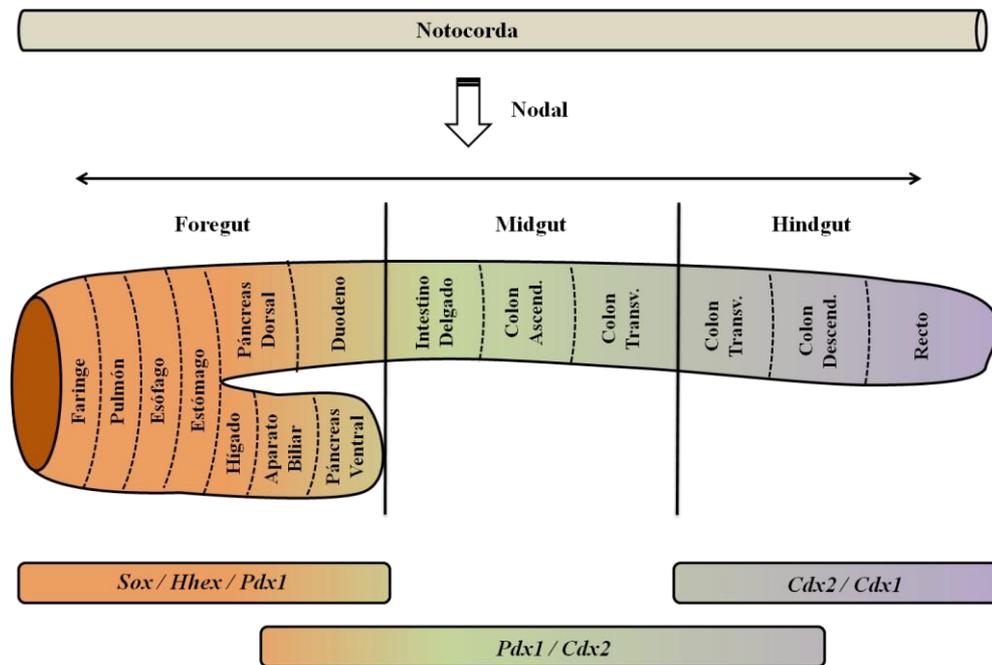


Figura 1.7 Regionalización del gut tube. Redistribución de las células a lo largo de los ejes antero-posterior y dorso-ventral mediante la influencia de moléculas de señalización derivantes de la notocorda y de los derivados mesodérmicos cercano. Expresión de factores de transcripción regionales necesarios para la sucesiva especificación de los varios órganos derivantes del gut tube.

En el día 9,5 (E 9,5) empieza a brotar el primordio pancreático dorsal. El primordio pancreático dorsal se origina desde el posterior “foregut” y está flanqueado por el estómago y por el duodeno. La notocorda antes y la aorta después son los derivados mesodérmico con estrecho contacto con el endodermo pancreático y las señales que envían, Activina y bFGF principalmente, tienen un papel fundamental en la división entre las regiones endodérmica anteriores y posteriores al páncreas. Dichas señales inhiben la expresión de Sonic Hedgehog (*Shh*), una proteína de la familia HH que es fundamental para la formación de estómago y duodeno pero detrimente para la formación del páncreas [14-16]. Otra señal muy importante para el desarrollo del páncreas es la del ácido retinóico (RA) lo cual es fundamental para inducir el primordio dorsal mientras que es menos importante para la inducción del páncreas ventral [17]. Esto es probablemente debido a la gran diferencia que hay entre los dos primordios pancreático que difieren por posición, señales extrínsecas provenientes de los diferentes derivados mesodérmicos cercanos y por las mismas señales intrínsecas que derivan de

una diferente activación génica. Todos estos factores determinan un programa de organogénesis completamente diferente entre los dos nichos pancreáticos caracterizados por una línea más inductiva en el caso del primordio dorsal y una más permisiva en el caso del primordio ventral, donde el destino pancreático parece ser la opción por defecto. Contrariamente al primordio dorsal el brote pancreático ventral se activa en el día E10 escapando de las señales del mesodermo cercano que, en este caso, favorecen el desarrollo de los otros derivados del “foregut” ventral como por ejemplo el hígado y el sistema biliar. Durante la morfogénesis del “foregut” el endodermo ventral se sitúa en proximidad del septum transversum y del mesodermo cardíaco dejando sobresalir la parte más posterior, aquí es donde empieza a expresarse *Pdx1* caracterizando lo que será el primordio pancreático ventral. La parte más anterior en cambio estará sometida al efecto de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) y de las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs) secretadas por los derivados mesodérmico que activan el desarrollo hepático y que inhibiendo *Pdx1* marcan el límite entre el rudimento biliar y el pancreático [18] (Figura 1.8).

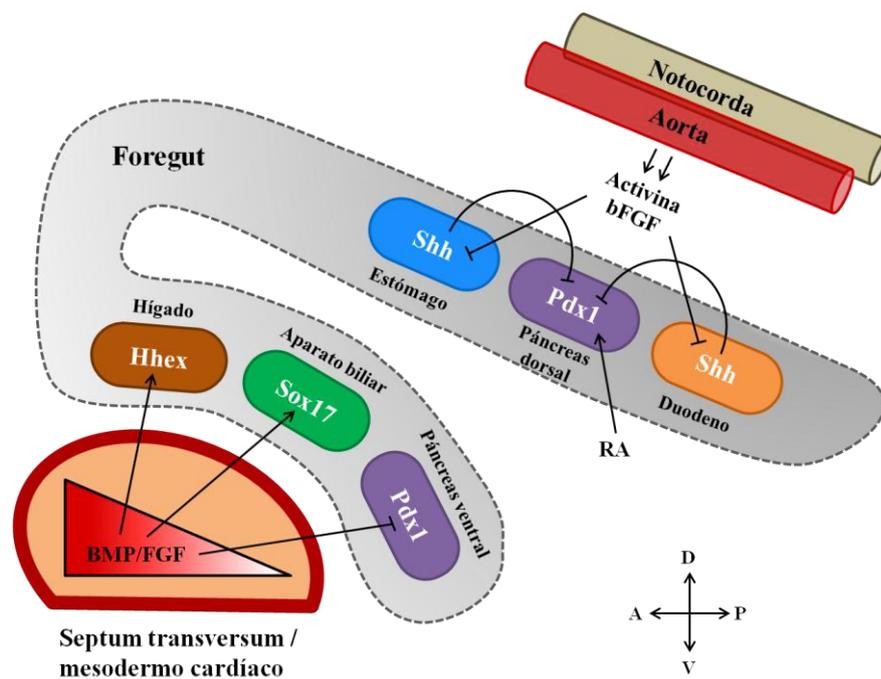


Figura 1.8 Esquema de la inducción pancreática en el foregut dorsal y ventral. En el foregut ventral las señales del mesodermo cardíaco (BMP/FGF) promueven la formación hepática (*Hhex*) e inhibiendo la especificación pancreática (*Pdx1*) permiten la inducción del aparato biliar (*Sox17*). En el endodermo

dorsal se necesita el RA para la inducción del páncreas y Activina y bFGF para inhibir el Shh. D: dorsal, V: ventral, A: anterior, P: posterior.

Los días siguientes están caracterizados por una proliferación activa de los progenitores pancreáticos para formar primero un epitelio estratificado rico en microlúmenes que posteriormente se fundirán para formar un plexo y una continua expansión epitelial que con sus protuberancias invade el mesenquima circunstante. Entre el día E11.5 y E12.5 el “*gut tube*” empieza a rotar llevando el primordio pancreático ventral y dorsal a contacto para así fusionarse en un único órgano. Durante estos procesos de morfogénesis epitelial y remodelación se compartimentalizan las células pancreáticas multipotentes (MPC) dividiéndose entre *tip*- y *trunk*- MPC según la distribución más apical o troncal a lo largo de las ramificaciones pancreáticas en formación. En esta primera fase del desarrollo pancreático (E9.5-E12.5), llamada transición primaria es posible encontrar las primeras células endócrinas diferenciadas, principalmente α -cell y algunas células insulina⁺ o glucagon⁺/insulina⁺. La segunda fase del desarrollo pancreático (E13.5-E15.5), definida como transición secundaria, se caracteriza por una diferenciación másiva hacia los tres linajes pancreáticos principales: el acinar, el ductal y el endócrino (Figura 1.9A). Los *tip*-MPC se caracterizan por la expresión de *Ptf1a* y reducen su plasticidad a lo que será el fenotipo exócrino mientras que los *trunk*-MPC expresan *Sox9*, *Hnf1b* y *Nkx6.1* y serán responsables de la diferenciación endocrina y ductal (progenitores bi-potentes). *Ptf1a* y *Nkx6.1* se antagonizan mutuamente para especificar un fenotipo exócrino o endócrino/ductal [19] mientras que dentro de los progenitores troncales hace falta una elevada activación de *Ngn3* para segregar los precursores endocrinos de los ductales. Recientemente se ha descrito como la vía de señalización celular de Notch está involucrada en la inducción de los tres linajes pancreático. En particular si la vía está inactiva se favorece la formación de páncreas exócrino mientras que es necesaria una elevada actividad de Notch para activar *Sox9* y *Hes1* que a su vez inhibe *Ngn3* para favorecer una diferenciación ductal. Finalmente una baja actividad de Notch induce la activación de *Sox9* pero no de *Hes1* haciendo así posible la inducción de *Ngn3* y la subsiguiente iniciación de la diferenciación endócrina [20]. Del mismo modo, para mantener el justo equilibrio entre proliferación y diferenciación de los progenitores endócrino/ductales se ha hipotizado un mecanismo de inhibición lateral

mediante lo cual los progenitores endócrinos producen Notch para activar la expresión de *Hes1* en las células cercanas y así inhibir, en esas células, la expresión de *Ngn3* [21]. Todos los cinco diferentes linajes endócrinos que componen el islote pancreático derivan de un único precursor común que expresa *Ngn3* [22] aunque el exacto mecanismo para inducir los diferentes fenotipos no ha sido todavía aclarado. Parece que un papel fundamental lo tiene la sincronización de la activación de *Ngn3* ya que una activación temprana induce la formación de células α , mientras que su inducción a partir de E11.5 favorece la generación de células β y PP y una expresión más tardía (E14.5) permite la diferenciación de las células δ [23]. Todo esto está acompañado de la activación de una compleja red cross-regulatoria de factores de transcripción que guiarán la diferenciación y maduración de cada uno de los fenotipos endócrinos (*Figura 1.9B*). Los actores principales hasta ahora conocidos, responsables de la especificación hacia uno u otro linaje endócrino son *Nkx2.2*, *Pax4* y *Arx* siendo el primero indispensable para la formación de las células β y al mismo tiempo inhibitorio para las células ϵ . La interacción entre *Nkx2.2* y *Arx* afecta la formación de las células PP mientras que *Pax4* y *Arx* se antagonizan para inducir un fenotipo β o α respectivamente [24-26]. Finalmente otra serie de factores de transcripción entra en juego para completar el proceso de diferenciación favoreciendo los procesos de maduración y garantizando la correcta función celular. En el caso de las células β la diferenciación terminal está inducida por la activación de *Pdx1*, *MafA*, *FoxA2*, *Glut2*, *Ins* y todo el panel de genes que caracteriza una célula β funcional. Todo lo descrito hasta ahora se basa en el desarrollo embrionario murino pero también hay algunos datos sobre el desarrollo del páncreas en humanos que indican que los eventos morfogenéticos y los cambios transcripcionales del desarrollo pancreático son altamente conservados entre las dos especies. El páncreas humano, como en el modelo murino, origina de los primordios dorsal y ventral entre las semanas 4 y 5 de gestación (G4-5w) para fusionarse en un único órgano una semana después. Una primera diferencia se encuentra en la falta de la transición primaria probablemente responsable del retraso del inicio de la diferenciación endócrina observado en humanos con respecto al modelo murino. No obstante ese retraso, la organización de las células endócrinas en estructura parecida a los islotes empieza bastante antes en humanos que en ratones [26, 27]. Otra gran diferencia reside en la arquitectura y en la composición celular de los islotes siendo el islote murino

compuesto por un 77% de células β organizadas en la parte central mientras que el humano tiene menos células β (55%) [5] que se mezclan con las células α y δ por todo el islote [28]. El patrón de expresión de los factores de transcripción en ambas especies es en general muy similar, a excepción de algunas diferencias cuales por ejemplo la expresión más tardía de *PDX1* en los primordios endodérmico humanos respecto a los murinos, una expresión más prolongada de *NGN3* durante la diferenciación endócrina humana, la expresión de *NKX2.2* después de la especificación endocrina y no antes como en el modelo murino y finalmente la expresión de *MAFB* en las células β adultas humanas y no en las murinas [29-31].

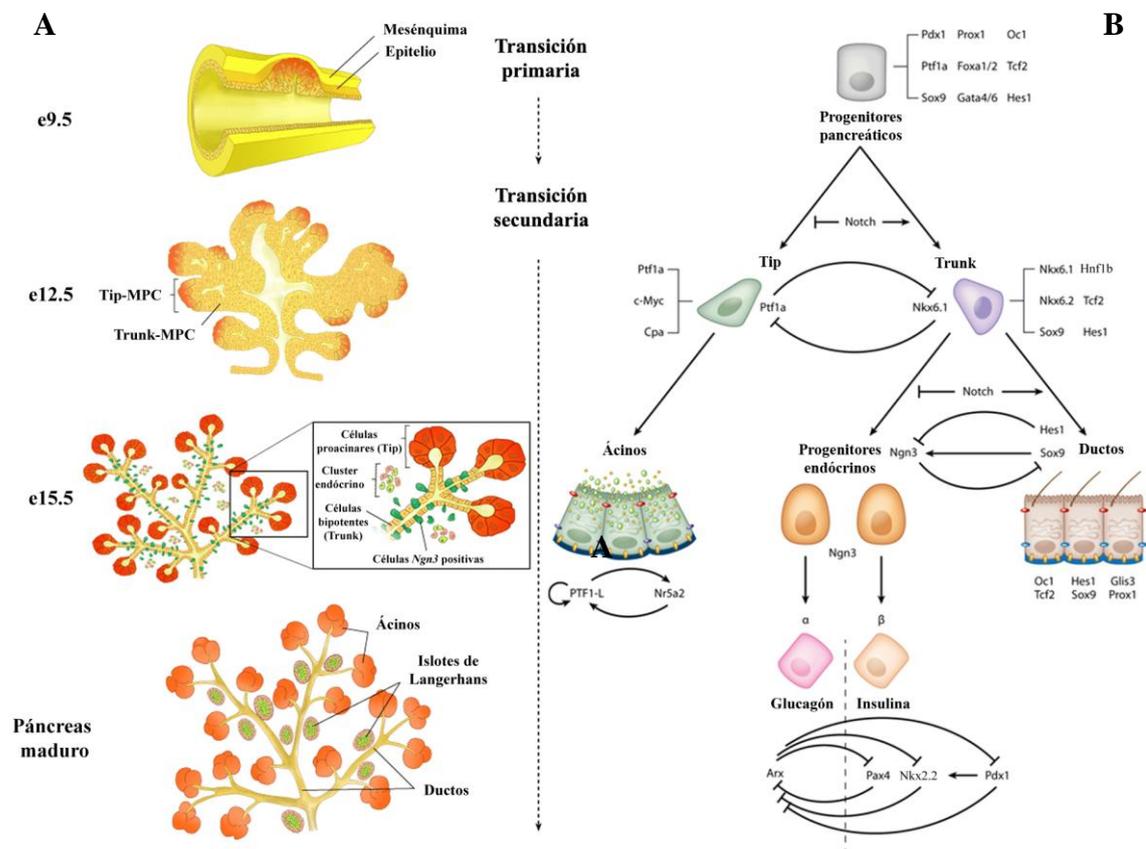


Figura 1.9 Desarrollo pancreático: transición primaria y secundaria. **A:** Morfogénesis epitelial y remodelación de las ramificaciones pancreática. Formación y realocación de las células pancreáticas multipotentes y siguiente diferenciación hacia el linaje exócrino, endócrino y ductal. **B:** Durante la transición primaria la expresión de diferentes factores de transcripción (*Pdx1*, *Ptf1a*, *Sox9*, *Hes1* y otros) asegura la expansión de los progenitores pancreáticos y el mantenimiento de la identidad pancreática. Entrando en la transición secundaria los progenitores se dividen en tip y trunk MPC. Las células tip adoptará un fenotipo acinar mientras que las trunk darán origen al fenotipo ductal y endócrino según la

intensidad de Notch. Finalmente los precursores endócrinos se diferenciarán en los 5 tipos celulares que componen el islote de Langerhans mediante activación y represión cruzada de diferentes factores de transcripción. Aquí se reporta la red de genes implicada en la decisión de liaje entre las células α y las β . *Imagen A modificada de Cano y colaboradores [26] e imagen B de Shih y colaboradores [32].*

1.3 Las células troncales

Las protagonistas de la terapia celular son las células troncales, unas células con gran capacidad regenerativas que se conservan durante toda la vida adulta en nichos específicos en diferentes tejidos mediante un proceso de división asimétrica que le permite regular su número y al mismo tiempo restablecer la homeostasis celular en respuesta a los estímulos microambientales.

Todas las células troncales se caracterizan por dos importantes propiedades que las distinguen de los otros tipos celulares. Antes todo son células no especializadas que pueden auto-renovarse (“*self-renewal*”) indefinidamente mediante la división celular; en segundo lugar esas células pueden ser inducidas, bajo ciertas condiciones fisiológicas o experimentales a diferenciarse (“*pluripotency*”) en células maduras como neuronas, cardiomiocitos o células sanguíneas (*Figura 1.10*).

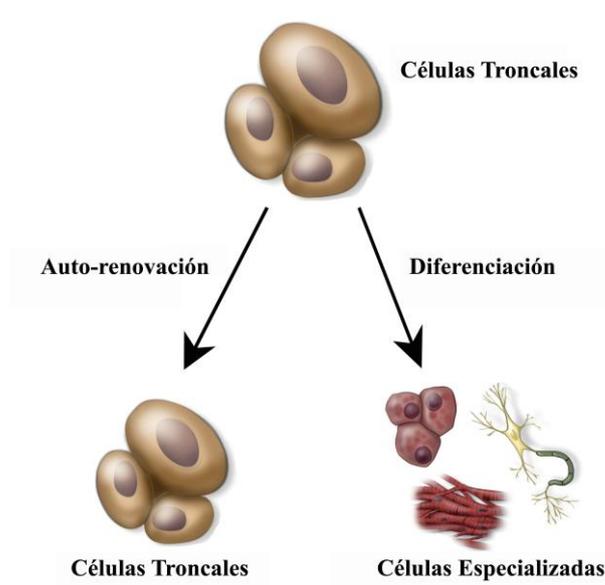


Figura 1.10 Características de las células troncales. La capacidad de auto-renovarse y de diferenciar hacia células especializadas son las dos características principales de una célula troncal. *Imagen modificada de Tapia-Limonchi.*

1.3.1 Clasificación de las células troncales

Existen varios tipos de células troncales según su potencial de diferenciación y su origen, se pueden clasificar como [33, 34]:

Células troncales totipotentes: células troncales extraídas de embriones con menos de 8 células (morula), capaces de autorenovarse de forma indefinida manteniendo un estado altamente no diferenciado. Tienen la capacidad de producir cualquier célula diferenciada de las tres capas germinales del organismo (endodermo, mesodermo y ectodermo) y también tejidos extraembrionarios como por ejemplo la placenta.

Células troncales pluripotentes: células troncales capaces de autorenovarse indefinidamente manteniendo su estado no diferenciado. Pueden dar lugar a células de los tejidos y órganos dentro de cualquiera de las tres capas germinales, pero no de tejidos extraembrionarios. Se consideran células pluripotentes:

- células troncales embrionarias (CTE) [35, 36], derivadas de la masa celular interna (MCI) del blastocisto
- células troncales germinales (CTG) [37], derivadas de la cresta germinal de los fetos, lugar donde se produce la diferenciación de la línea germinal
- células troncales de los teratomas y teratocarcinomas (CTT) [38], se localizan en las gónadas en forma de tumoración. Las células diferenciadas del tumor se forman a partir de células madre pluripotentes de carcinoma embrionario que derivan, a su vez, de células primordiales germinales del embrión
- células troncales pluripotentes inducidas (iPS) [39], derivadas de la reprogramación *in vitro* de células somáticas adultas para que vuelvan a adquirir el potencial de diferenciación de una célula pluripotente embrionaria

Células troncales multipotentes: células troncales extraídas de tejidos adultos (CTA) capaces de autorenovarse de forma no indefinida manteniendo su estado no diferenciado y capaces de dar origen a células de su mismo tejido de origen (viejo dogma) o de otros tejidos (plasticidad). Comúnmente nos referimos a este tipo celular como células troncales fetales (placenta y cordón umbelical) o adultas (mesenquimales, hematopoyéticas y de otros tejidos).

Células troncales unipotentes: células troncales capaces de formar solamente un tipo celular. Un ejemplo de éstas son las células troncales epidérmicas ubicadas en la capa basal de nuestra piel.

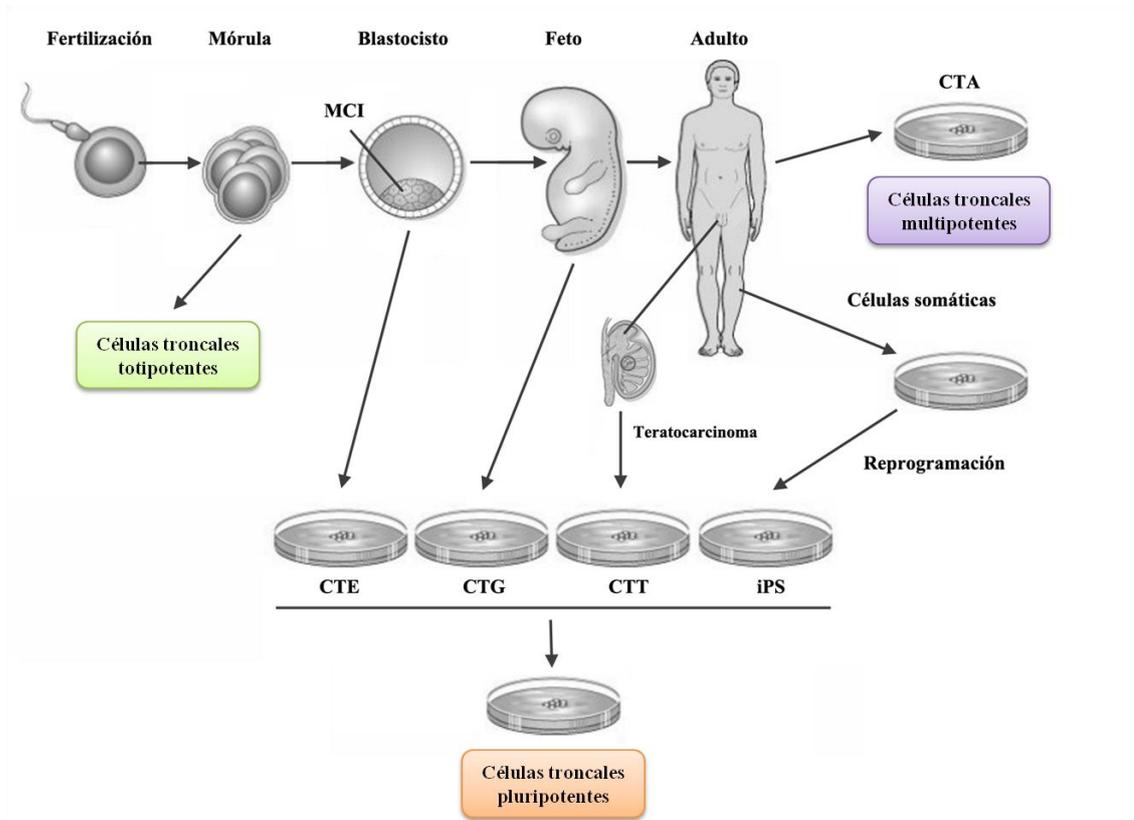


Figura 1.11 Clasificación de las células troncales según su plasticidad y origen. MCI, masa celular interna; CTA, células troncales adultas; CTE, células troncales embrionarias; CTG, células troncales germinales; CTT, células troncales de teratocarcinoma; iPS, células troncales pluripotentes inducidas. Imagen modificada de Donovan y colaboradores [40].

Una de las ventajas de utilizar las células troncales de tejidos adultos es que las células del paciente pueden ser extraídas, expandidas en cultivo y finalmente reimplantadas en el paciente mismo sobrepasando así el gran problema del rechazo del trasplante heterólogo por parte del sistema inmunitario. Por otro lado una de las mayores desventajas de las CTA es la escasa presencia de esas células en el tejido adulto y un limitado potencial diferenciativo. Por lo contrario las CTE, además de tener un mayor potencial diferenciativo, son relativamente fáciles de cultivar y expandir *in vitro*, y eso, visto en la óptica de la terapia celular, es una importante distinción ya que disponer de un gran

número de células es condición fundamental para tener resultados tanto experimentales como clínicos. Finalmente, las hiPS tienen todas las ventajas de las CTE y de las CTA razón por la cual su descubrimiento fue muy importante para la investigación y su uso representa la mejor opción para la terapia celular.

1.3.2 Derivación y cultivo de las células troncales embrionarias humanas

Una nueva época en el campo de la biología de las células troncales empezó en 1998 cuando Thomson y colaboradores [36] consiguieron derivar y mantener en cultivo CTEh derivadas de la MCI de un blastocisto obtenido mediante fertilización *in vitro* (FIV). No obstante las CTE murinas hayan sido aisladas por primera vez en 1981 [35] han sido necesarios casi 20 años de estudios para obtener un resultado similar en humano. El problema se debía a que el terreno de cultivo utilizado para mantener en cultivo los embriones humanos obtenidos de las FIVs no permitía que el embrión de una sola célula sobreviviera lo suficiente para obtener blastocisto del que derivar una línea celular. Además las diferencias especie-específicas entre humano y ratón han contribuido a ralentizar aún más el proceso como ha sido demostrado por el hecho de que fue necesario derivar líneas celulares troncales embrionarias de dos primates no humanos (*Rhesus monkey* y *common Marmoset*) para mejorar el proceso y así poder derivar líneas humanas. Los embriones utilizados para obtener las CTEh son, en general, creados mediante FIV destinadas a tratar algunos tipos de infertilidad y solo después vienen donados a la investigación bajo consentimiento informado del donante. Un blastocisto en el quinto día de su desarrollo está constituido por alrededor de 200-250 células de las cuales la mayoría forman el trofoectodermo y solo unas 30-34 células forman la MCI (*Figura 1.12*), zona de donde se derivan las células troncales embrionarias.

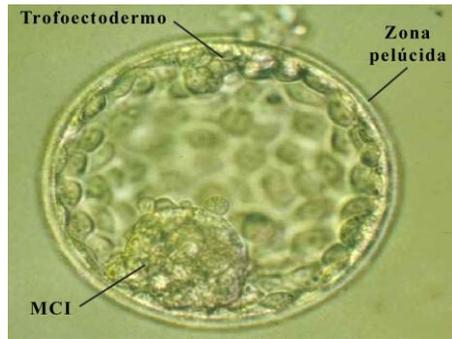


Figura 1.12 Blastocisto humano. En la imagen se puede observar la MCI, el trofoectodermo y la zona pelúcida.
Imagen de © Instituto Dexeus, Barcelona

La MCI del blastocisto puede ser aislada de dos formas diferentes, mediante aislamiento inmunquirúrgico o mecánico (*Figura 1.13*) [41].

Aislamiento Immuno-quirúrgico: esta técnica permite aislar selectivamente la MCI del blastocisto aprovechando la reacción inmunitaria entre los anticuerpos y el tejido cada uno de una especie diferente; brevemente se empieza con la digestión de la zona pelúcida (ZP) para así exponer el embrión a la acción del suero completo, anti-mouse o anti-human según el origen del blastocisto. Los anticuerpos presentes en el suero atacan indistintamente cualquier tipo celular pero gracias a la estrecha conexión entre las células del trofoblasto ellos no pueden llegar al interior del blastocisto; en ese punto el embrión se incuba con un medio de cultivo que contiene las proteínas del complemento que actúa lisando solo las células del trofoblasto, esas células que están unidas a los anticuerpos del suero, dejando así intacta la MCI.

Aislamiento mecánico: esta técnica está basada en la selección directa de la MCI mediante disección mecánica con parcial eliminación del trofoblasto o directamente sembrando el embrión, sin la zona pelúcida, sobre fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) mitoticamente inactivados (capa celular nodosa llamada “*feeder layer*”). El blastocisto adhiere así al “*feeder layer*” permitiendo el crecimiento de la MCI a costa del trofoblasto.

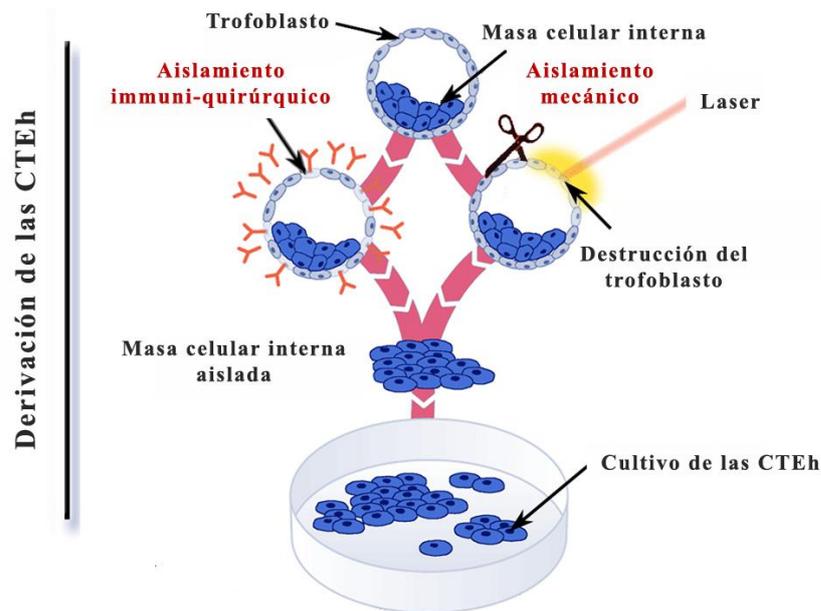


Figura 1.13 Técnicas de aislamiento de la masa celular interna de un blastocisto humano.

Imagen modificada desde Zeichnung.

Las CTEh fueron originariamente derivadas y crecidas sobre una capa celular de fibroblastos murinos inactivados en presencia de suero bovino; dos condiciones que limitan la posible utilización en clínica de las células troncales humanas. Numerosos son por lo tanto los investigadores que están tratando de definir cuales son los factores capaces de mantener las CTEh en un estado no diferenciado para poder poner a punto sistemas de cultivo libres de *xeno* contaminantes (“*xeno-free*”) en los que sea totalmente eliminada la exposición de esas células a cualquier producto animal. Para hacer que las células troncales murinas se mantengan no diferenciada en ausencia de algún “*feeder layer*” es necesario añadir al medio de cultivo una citoquina, Leukemia Inhibitory Factor (LIF), por el contrario en las células troncales humanas la vía del LIF/STAT3 no parece estar involucrada debido a una baja expresión del receptor del LIF (RLIF). La administración de BMPs, que en las células murina induce inhibición de la diferenciación, tiene un efecto opuesto en las células humanas donde las vías para el mantenimiento del estado no diferenciado son las vías controladas por Wnt y por el bFGF [41]. Por estas razones las CTEh se cultivan utilizando medios de cultivos suplementados con bFGF. El cultivo se mantiene sobre un “*feeder layer*” de

fibroblastos humanos inactivados o utilizando matrices protéicas (Matrigel o Laminina) y medio de cultivo previamente condicionado (utilizado para el cultivo de los fibroblastos).

1.3.3 Derivación y cultivo de las células troncales pluripotentes inducidas

Tres líneas de investigación inspiraron el descubrimiento de la reprogramación y la obtención de las iPS; la reprogramación celular por transferencia nuclear, iniciada por John Gurdon en 1962 [42], que mostró la posibilidad de dar marcha atrás en el proceso de diferenciación. El descubrimiento de los factores de transcripción a partir de los experimentos de Schneuwly desde 1987 [43], esenciales para conocer el mecanismo de la dediferenciación, y los trabajos de aislamiento y cultivo de células troncales pluripotenciales de origen embrionario, que comenzaron con la primera obtención de las de ratón en 1981 [35]. Los numerosos intentos de reprogramar el núcleo de una célula somática transfiriéndola a un oocito, sugerían la existencia de una combinación de factores en los óvulos y/o en las células embrionarias capaces de dediferenciar una célula madura. En el momento en que el equipo de Yamanaka comienza su estudio se conocían unos 24 factores de pluripotencialidad y a lo largo de sus estudios se consiguió reducir el número de factores necesarios para la reprogramación a 4: *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4* [39]. Al año siguiente se demostró que el uso de *c-Myc* en la reprogramación no era seguro para la aplicación en humano ya que en algunos casos se observó formación de tumores en ratones trasplantados con las iPS debido a la reactivación del oncogen *c-Myc* [44]. Por esta razón se decidió eliminar este factor de transcripción del cocktail de reprogramación diseñado por Yamanaka. Ese mismo año Thomson y colaboradores derivaron iPS humanas utilizando *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, and *LIN28* como factores de reprogramación [45]. A corto plazo, las células de pacientes reprogramadas están siendo útiles para crear modelos celulares de enfermedades, en las que estudiar los procesos patológicos y probar fármacos [46-50]. Para su utilización en terapia celular también se está avanzando mucho y los resultados en animales [51, 52] y también preclínicos [53, 54] están dando buenos resultados a

pesar de algunas críticas como la baja eficiencia de reprogramación, las técnicas utilizadas para su derivación, la observación de algunos defectos genéticos [55, 56] y sobre todo la gran diferencia que hay en la plasticidad y en los perfiles génicos y epigenéticos de las muchas hiPS derivadas hasta ahora [57]. La generación de células iPS ha propiciado también el desarrollo de otras técnicas, como por ejemplo, la transdiferenciación por la que recientemente se ha conseguido convertir directamente *in vivo* fibroblastos cardiacos en miocitos [58]. En línea general las iPS se derivan de fibroblastos de la piel, después de la infección con los factores de reprogramación las células se cultivan bajo las mismas condiciones de medio y “*feeder layer*” que las CTE hasta que empiezan a formar colonias morfológicamente parecidas a las que forman las células embrionarias. Una vez estabilizada la línea se empieza con la caracterización para comprobar, como en el caso de las CTE, la capacidad de autorenovación y el potencial de diferenciación.

1.3.4 Caracterización de las células troncales pluripotentes

Para poder hablar de líneas celulares troncales embrionarias, las células obtenidas de un blastocisto tienen que mantenerse en estado no diferenciado, conservar el potencial de diferenciación y presentar un cariotipo normal durante por lo menos 6 meses de cultivo. Todo esto viene evaluado mediante observación morfológica de las colonias, que tienen que ser formadas por pequeñas células con un ratio nucleo-citoplasma elevado, y mediante el estudio de reconocidos marcadores de indiferenciación (*Figura 1.14*) como por ejemplo:

- Elevada expresión de factores de transcripción como Oct3/4, Nanog y Sox2
- Detección de marcadores de membranas como SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y TRA-1-81
- Altos niveles de la actividad de fosfatasa alcalina y telomerasa
- Estabilidad genética (cariotipo normal)

Para evaluar la plasticidad de las CTEh hay que observar su capacidad de diferenciación hacia los diferentes tipos celulares que derivan de las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. Las células tienen que ser capaces de diferenciarse hacia los tres linajes tanto *in vitro*, mediante la formación de cuerpos embrionarios, como *in vivo* mediante la formación de teratomas tras implantar estas células en ratones inmunodeficientes.

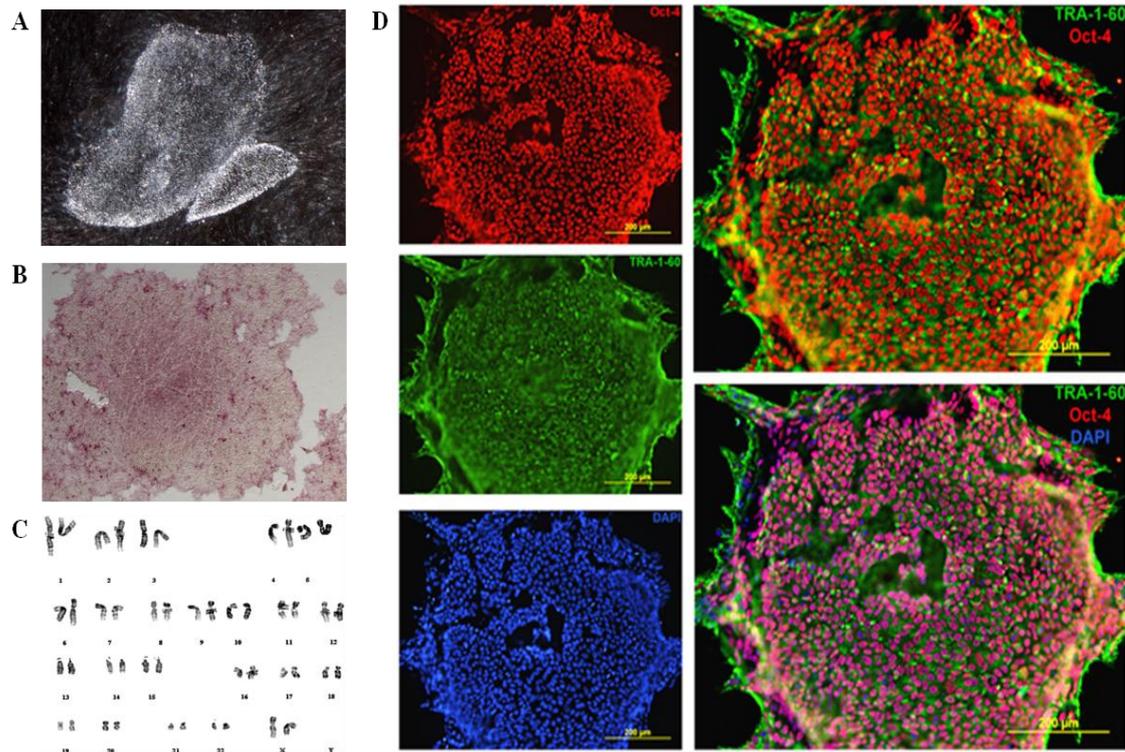


Figura 1.14 Caracterización de las células troncales pluripotentes. **A:** morfología de una colonia de CTE sobre “feeder layer” de fibroblastos fetales humanos inactivados. **B:** coloración mediante fosfatasa alcalina de una colonia de CTE. **C:** comprobación de cariotipaje normal (46, XX) en las células HS181 (Imagen de Hovatta y colaboradores [59]). **D:** detección mediante técnica de inmunofluorescencia de dos marcadores de pluripotencia OCT3/4 (rojo) y TRA-1-60 (verde). Los núcleos están marcados con DAPI (azul). Imágenes de Aguilera Y, Mellado-Damas N (CABIMER).

Una vez caracterizadas las células y habiendo comprobado su plasticidad tanto *in vivo* como *in vitro* las células pueden utilizarse para la investigación. Sean CTE o iPS lo difícil es controlar su gran potencial para poder obtener a partir de ellas células de tejidos específicos. Para ello hay que poner a punto protocolos de diferenciación dirigida que mediante diferentes estrategias puedan guiar las células troncales hacia

precursores y células especializadas de cualquiera de las tres capas germinales (*Figura 1.15*). Algunas de las técnicas utilizadas para alcanzar este objetivo son:

- formación de cuerpos embrionarios
- activación de factores de transcripción endógenos
- transfección de las células con factores de transcripción exógenos
- exposición a diferentes factores de crecimiento
- co-cultivo con otros tipos celulares capaces de inducir un determinado fenotipo

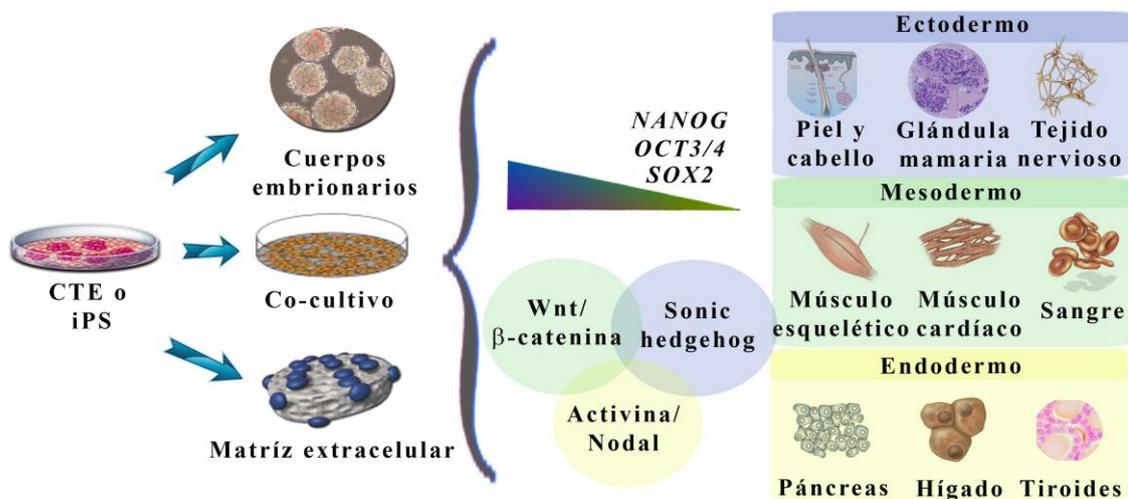


Figura 1.15 Diferenciación dirigida. Diferentes técnicas de cultivo utilizadas para guiar las células troncales hacia células especializadas derivantes de las tres capas germinales mediante activación de las vías de señalización linaje-específicas y pérdida progresiva de los genes de mantenimiento de la pluripotencia. (Imagen modificada de Tapia-Limonchi R).

Elegir una estrategia o combinarlas ha dado buenos resultados para la diferenciación de las células troncales hacia ectodermo y mesodermo consiguiendo grandes avances en el campo neuronal [60-62] y cardíaco [63-65] sobre todos. Bastante más complicado ha sido, en cambio, el camino hacia la obtención del endodermo y sus derivados, en particular el páncreas y las células β [66, 67].

1.4 Diferenciación a derivados de linaje endodérmicos y obtención de células β -pancreáticas

El primer intento de diferenciación hacia células productoras de insulina fue llevado a cabo mediante una combinación de diferenciación dirigida y selección celular. Células troncales embrionarias murinas (CTEm) que expresaban una resistencia antibiótica bajo el control del promotor de *Ins* o *Nkx6.1* fueron diferenciadas hacia el fenotipo β -pancreático y fueron capaces de normalizar la glucaemia tras el trasplante en ratones diabéticos tratados con estreptozotocina (STZ). Además el protocolo de selección celular permitió evitar la formación de tumores gracias a la eliminación de cualquier célula troncal no diferenciada [68, 69]. En cambio los primeros protocolos de diferenciación con CTEh, basados en la formación de cuerpos embrionarios, no resultaron ser exitosos ya que la insulina detectada en las células así diferenciadas se demostró no ser un producto de formación *de novo*, sino una absorción de la insulina presente en el medio de cultivo [70-73]. Mas adelante se demostró que la clave para una correcta diferenciación de las CTEh hacia células β -pancreática reside en la puesta a punto de un protocolo multi-etapa capaz de reproducir todas las fases que caracterizan el desarrollo pancreático *in vivo*. Por lo tanto, la nueva estrategia consiste en dirigir las células troncales a través de la formación secuencial del mesendoderma, endodermo definitivo, “*posterior foregut*”, endodermo pancreático, precursores endocrinos y finalmente células productoras de insulina siguiendo los conocimientos sobre los factores de transcripción y las vías de señalización descritas para el desarrollo embrionario del páncreas en ratón (*Figura 1.16*).

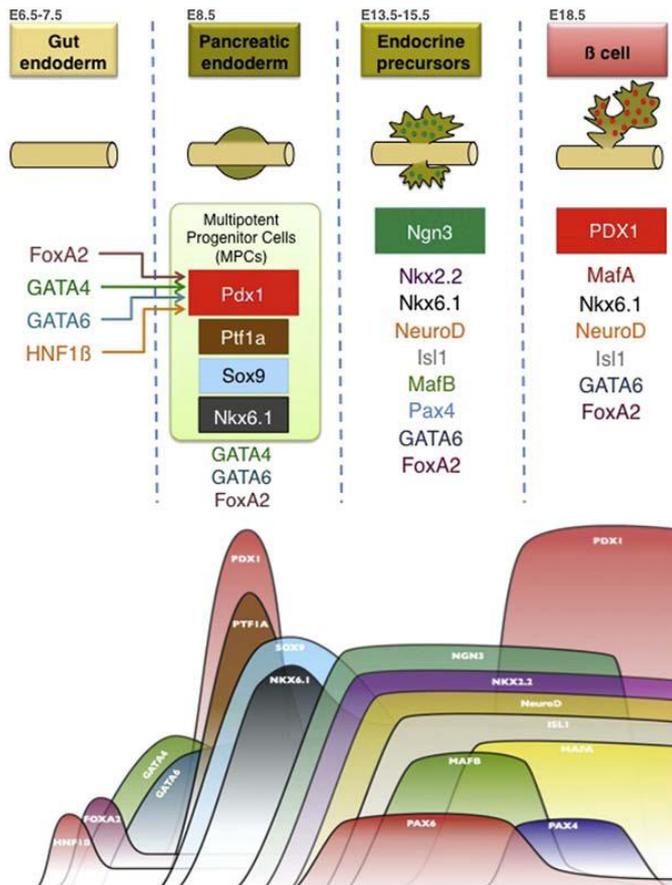


Figura 1.16 Desarrollo pancreático. Representación esquemática de la dinámica de expresión de algunos de los factores de transcripción involucrados en las diferentes etapas de la organogénesis pancreática murina. *Imagen de Soria y colaboradores [1].*

Numerosos investigadores han elegido ese camino para la inducción de la diferenciación y un elevado número de publicaciones ha sido generado con diferentes protocolos de diferenciación que intentan mimar la organogénesis pancreática. No obstante debido a su complejidad un protocolo que sea eficaz, eficiente y reproducible no ha sido todavía publicado. Para que el protocolo de diferenciación sea reproducible y eficaz hay que optimizar cada etapa centrándonos en el perfecto timing de activación secuencial de los factores de transcripción y de las distintas vías de señalización involucradas en la formación del páncreas. La problemática más grande surge en las etapas finales ya que los conocimientos sobre la maduración de las diferentes células endócrina en los modelos murinos y tanto menos en humano constituyen el anillo más débil de la cadena del desarrollo pancreático. Esta falta de conocimiento se refleja en la baja eficacia y eficiencia de los protocolos de diferenciación a la hora de producir células β maduras y funcionales y en cantidad suficiente para poder ser utilizadas en futuras aplicaciones clínicas. Para tener una visión general del estado del arte sobre la

obtención in vitro de células beta a partir de CTEh describiré ahora las estrategias utilizadas para dirigir la diferenciación a través de las etapas más importantes del proceso de diferenciación.

Obtención del endodermo definitivo. Para la obtención de una células β el primer paso es la generación eficiente del endodermo definitivo, lo cual ha sido largamente conseguido por D'Amour y colaboradores [74] utilizando una combinación de Activina A, para activar la vía de señalización de Nodal, Wnt3a para la inducción, mediante expresión de Brachyury, del mesendodermo, y un medio a baja concentración de suero, para inhibir la activación de la PI3K. Asimismo se puede incluir en esta primera etapa del protocolo el uso de dos inhibidores de la PI3K, LY 294002 [75, 76] y Wortmannin [77]. Otra estrategia es la de Melton y colaboradores que han identificados dos pequeñas molécula bioactiva inductoras de endodermo llamada IDE1 e IDE2 que muestran una eficiencia similar a la del tratamiento con Activina A para la formación de endodermo definitivo [78].

Compartimentalización del foregut. Una vez obtenido el endodermo definitivo el siguiente paso consiste en la especificación del foregut hacia el endodermo pancreático y la inhibición de los otros derivados endodérmicos. Este paso in vivo está regulado por una compleja intercomunicación entre el mesodermo y el endodermo, mediada por la liberación de gradientes de FGFs, BMPs, RA y SHH [79]. Durante la organización del foregut se ha observado que altas concentraciones de FGF4 promueven la formación de endodermo intestinal más posterior, mientras que bajos niveles de FGF4 inducen un fenotipo más anterior caracterizado por la inducción de páncreas y duodeno [79]. Asimismo, se ha demostrado que bFGF puede inducir el endodermo definitivo derivado de CTEh hacia diferentes linajes del foregut según su concentración. En particular, bajas concentración de bFGF promueven un destino hepático, niveles medios de bFGF inducen un fenotipo pancreático y altas dosis de bFGF favorecen la formación de progenitores del intestino delgado [80]. Los ácidos retinoicos son potentes morfógenos e inductores de la diferenciación tanto in vivo durante el desarrollo como in vitro durante la diferenciación de las CTE. Por esa razón el uso del RA es uno de los pocos elementos comunes a todos los protocolos de diferenciación pancreática, utilizado por muchos investigadores para inducir el endodermo pancreático después de la obtención del endodermo definitivo [77, 81-85]. Como ya descrito anteriormente, durante el

desarrollo temprano SHH se expresa con altos niveles en los nichos endodérmico que generarán el estomago y el duodeno pero no en el endodermo pancreático razón por la cual se ha introducido en los protocolos de diferenciación el uso de la Ciclopamina, inhibidor de SHH, que se a demostrado capaz de prevenir la especificación de estomago y duodeno a favor de un fenotipo pancreático [69, 86]. De la misma forma la inhibición de la via de señalización de BMP por medio de Noggin se ha demostrado ser efectiva para inhibir la diferenciación hepática[87]. En resumen, para inducir el endodermo pancreático a expensas de otros derivados del foregut, se ha introducido en muchos de los protocolos de diferenciación *in vitro* de las CTEh el uso combinado de Ciclopamina, Noggin y RA [85, 88, 89].

Inducción de los precursores endócrinos. La siguiente decisión de linaje para la formación de tejidos más especializados está regulada por Notch. Esta via de señalización inhibe la transcripción de *Ngn3*, un factor de transcripción clave para el desarrollo de todas las células endocrinas del páncreas. Su función es la de prevenir una diferenciación endócrina prematura durante el periodo de expansión de los precursores endócrinos. En algunos protocolos de diferenciación *in vitro*, para mantener activa la via de Notch, se ha utilizado EGF y FGF10 obteniendo así una expansión de la población de progenitores *Pdx1*⁺ [77, 81, 90]. Una vez obtenido un pool suficientemente grande de progenitores endócrinos la via de Notch tiene que inhibirse para que pueda activarse *Ngn3* y la diferenciación endocrina pueda seguir. No obstante la administración de (3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT), un inhibidor de las γ -secretasa, no mostró un efecto significativo en la inducción de la diferenciación endocrina *in vitro* [81, 91, 92], razón por la cual no se utiliza en muchos de los protocolos de diferenciación publicados.

Maduración de las células endócrinas. La última etapa de la diferenciación de las CTEh hacia células productoras de insulina consiste en promover la maduración de los precursores endocrinos hacia células especializada y funcionales, capaces de secretar las ormonas. No obstante el gran número de molécula biológicamente activas que han sidos provadas en los numerosos protocolos de diferenciación presentes en literatura, una combinación exitosa capaz de diferenciar las CTEh hacia células β maduras y funcionales no ha sido todavía encontrada. D'Amour y colaboradores [81] utilizaron en la última etapa de su protocolo de diferenciación una mezcla de “factores de

maduración” como IGF1, Exendina-4, HGF y B27 pero no observaron ninguna mejora en los procesos de diferenciación. Por otro lado Cho y colaboradores [92] demostró que la administración de Betacelulina y Nicotinamida aumentaba la expresión de *Pdx1* y la producción de insulina. No obstante estos resultados, las células productoras de insulina obtenidas de la diferenciación de las CTEh muestran generalmente un fenotipo inmaduro incapaz de responder a la glucosa. Como consecuencia muchos investigadores han cambiado de estrategia, trasplantando los precursores endocrinos obtenidos *in vitro* en ratones diabético para permitir así su maduración *in vivo* [85, 90, 93, 94]. Todo esto demuestra que aún estamos lejos de la obtención de un protocolo de diferenciación completo y eficiente por lo que hacen falta nuevas estrategias para mejorar y optimizar los procesos de maduración de los precursores endócrinos *in vitro*. Con este objetivo, nos hemos fijado en diferentes estudios que han demostrado el impacto del Resveratrol en la secreción de insulina [95-97] y también sus posibles efectos anti-diabéticos [98-100] tanto en modelos animales [101, 102] como en pacientes [103-105].

1.5 El resveratrol

El resveratrol es un polifenol presente en algunos frutos rojos como los arándanos, las moras y la uva (en productos derivados como vino y mosto) y en otros alimentos como los cacahuetes (maní) donde viene producido como parte de un mecanismo de defensa contra el estrés, el daño, la radiación ultravioleta o las infecciones. Su historia remonta al antiguo sistema ayurveda, una medicina tradicional originada en la India, donde se prescribía zumo de uva roja fermentado (darakchasava) como cardiotónico para algunas enfermedades [106]. La concentración del resveratrol en la piel de la uva varía entre 0.1 y 3.5 $\mu\text{g/g}$ de peso [107] mientras que su concentración en el vino puede variar desde los 0.2 hasta los 14 mg/l según el tipo de vino [108], una cantidad que puede llegar a considerarse terapéutica. Por esta razón en los 90s se propuso el resveratrol como posible explicación para la “paradoja francesa” atribuyendo así al alto consumo de vino la menor incidencia de enfermedades cardiovasculares observada en Francia no obstante allí la dieta sea más rica en grasas saturadas [109]. Desde que se publicó en 1997 un

artículo sobre los efectos anticancerígenos del resveratrol [110, 111], el número de publicaciones sobre este polifenol no ha parado de crecer. De gran relevancia ha sido la publicación del trabajo de Howitz y colaboradores donde se identifica el resveratrol como un potente activador natural de SIRT1 [112, 113]. SIRT1 es una enzima NAD⁺ deacetilasa [114, 115] altamente conservada, homólogo de la proteína Sir2 en levadura, que se activa en régimen de restricción calórica [116-118] y por lo tanto considerada responsable del retraso en el envejecimiento y en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad como diabetes, cáncer o enfermedades cardiovasculares [119]. A raíz de esta observación se despertó mucho interés sobre los activadores de las sirtuinas y en particular el resveratrol reconociéndole efectos benéficos como mimético de la restricción calórica contra el envejecimiento celular [112, 120-122], anti-diabético [100, 103, 123], anti-oxidante [124], anti-inflamatorio [125, 126] y con efectos protectivos contra enfermedades neurodegenerativas [127, 128], metabólicas [129, 130] y cardiovasculares [131] (*Figura 1.17*).

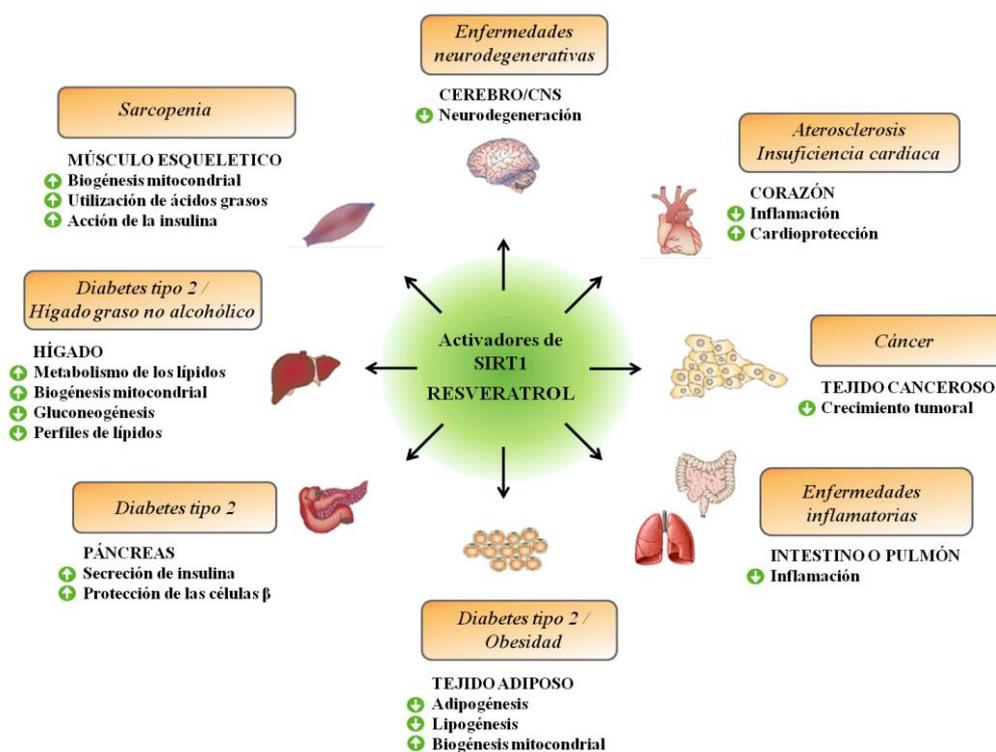


Figura 1.17 Efectos fisiopatológicos de los activadores de SIRT1 en el organismo. Representación de los múltiples órganos dianas en los cuales el resveratrol, como activador de SIRT1, podría tener efectos para el tratamiento de las diferentes enfermedades relacionadas con la edad. *Imagen modificada de Lavu y colaboradores y Catalgol y colaboradores [119, 132].*

El secreto del gran potencial terapéutico del resveratrol reside en la gran multitud de dianas que este polifenol tiene, pudiendo interactuar con diferentes vías de señalización según el órgano interesado y el proceso patológico presentado. Por esta razón averiguar el preciso mecanismo de acción del resveratrol en cada caso resulta tan difícil. Sólo tomando en cuenta la activación de SIRT1 por parte del resveratrol podríamos observar diferentes mecanismos de acción [119]:

- Adipogénesis, SIRT1 interactúa con NCOR (co-represor del receptor nuclear) para inhibir la transcripción de PAR- γ y así promover la movilización de los ácidos grasos
- Inflamación, SIRT1 reduce la liberación de citoquinas inflamatorias mediante inhibición de la actividad transcripcional de NF- κ B (factor nuclear κ B)
- Biogénesis mitocondrial, SIRT1 mediante la deacetilación de PGC1 α activa la mitobiogénesis y mejora la función metabólica celular
- Estrés oxidativo, SIRT1 promueve la sobrevivencia celular al estrés oxidativo mediante la inhibición de las proteínas FOXO
- Vía de señalización de la insulina, en las células β SIRT1 inhibe la transcripción de UCP2 promoviendo así la secreción de insulina mientras que en los tejidos periféricos mejora la sensibilidad a la hormona deacetilando su receptor (IRS2)

No obstante la evidente relación entre resveratrol y SIRT1, el mecanismo de activación directa de la sirtuina por parte del resveratrol [112, 113] ha sido muy cuestionado [133-135] indicando como no válidos los resultados de medición de la actividad de SIRT1 obtenidos en los trabajos de Howitz [112] y Milne [113]. Actualmente el mecanismo a través del cual resveratrol activa SIRT1 parece ser mediado por la activación de AMPK [136, 137], otra conocida diana del resveratrol [138, 139]. El mecanismo a través del cual RSV activa AMPK y consecuentemente SIRT1 ha sido recientemente descrito por Park y colaboradores [140] los cuales identificaron la enzima fosfodiesterasa (PDE1) como diana directa del polifenol.

1.5.1 Efectos del resveratrol en la célula β

Analizando el papel de Sirt1 en la vía de señalización de la insulina, podemos ver como esta proteína interacciona con diferentes substratos según la localización tisular (*Figura 1.18*) [141].

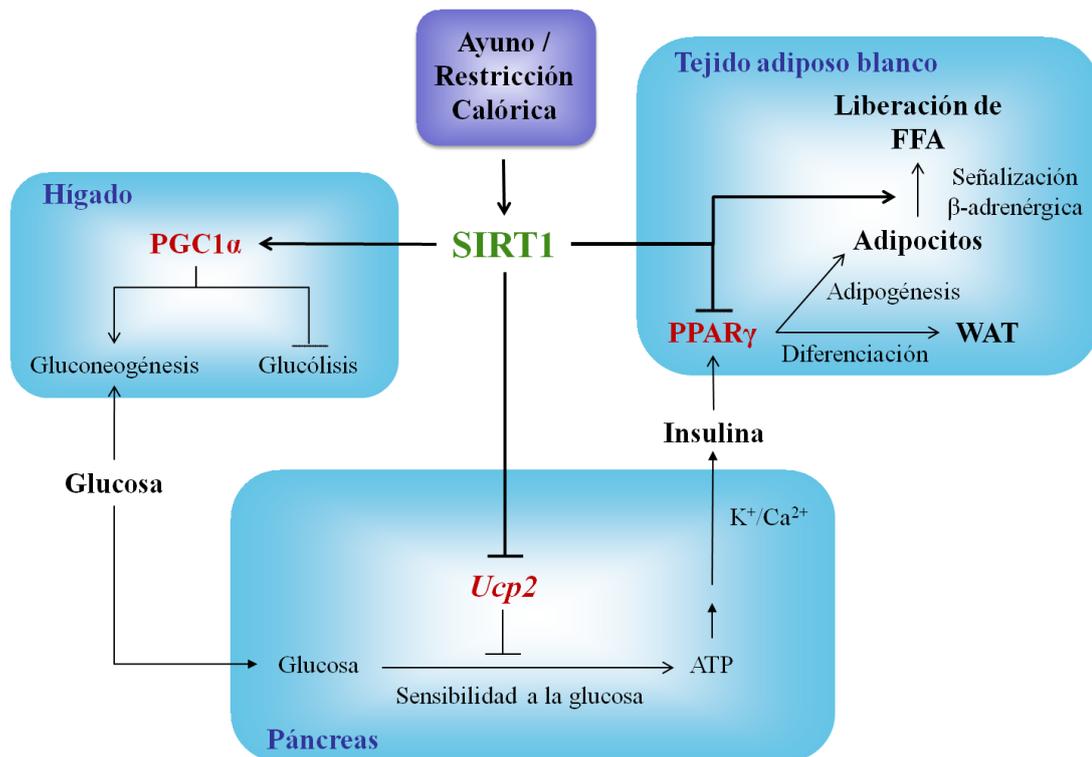


Figura 1.18 Papel de SIRT1 en la vía de señalización de la insulina. Mecanismos de acción activados por SIRT1 en los diferentes órganos. FFA, ácidos grasos libres; WAT, tejido adiposo blanco. *Imagen modificada de Yang y colaboradores [141].*

SIRT1 aumenta en condición de restricción calórica (CR) o en ayuno en diferentes tejidos sugiriendo así una implicación en la respuesta fisiológica al ayuno. De hecho, en esta condición el cuerpo moviliza las reservas energéticas a nivel de tejido adiposo y de hígado para mantener los niveles de grasas y de glucosa normales en la sangre. En particular, Sirt1 actúa en el hígado favoreciendo la movilización de la glucosa mediante gluconeogénesis. En el tejido adiposo, Sirt1 interacciona con otro de los principales mediadores que responden a la insulina, PPAR γ (Peroxisoma Proliferator-Activated Receptor γ). La unión entre Sirt1 y PPAR γ reprime la actividad transcripcional de

PPAR γ reduciendo así la adipogénesis y la diferenciación de los adipocitos y favoreciendo la liberación de los ácidos grasos. Finalmente, en el páncreas Sirt1 actúa inhibiendo UCP2, lo que conduce a un aumento de la producción de ATP, la apertura de los canales de Ca²⁺ y la consecuente liberación de insulina [142].

Las UCPs son una familia de proteínas de la membrana interna de las mitocondrias y actúan disipando el gradiente electroquímico necesario para la formación de ATP durante la fosforilación oxidativa (Figura 1.19). Estas proteínas juegan un papel importante en el metabolismo de los lípidos, en la insulino-resistencia, en el uso celular de la glucosa, en la regulación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y en la respuesta inmunitaria mediada por macrófagos.

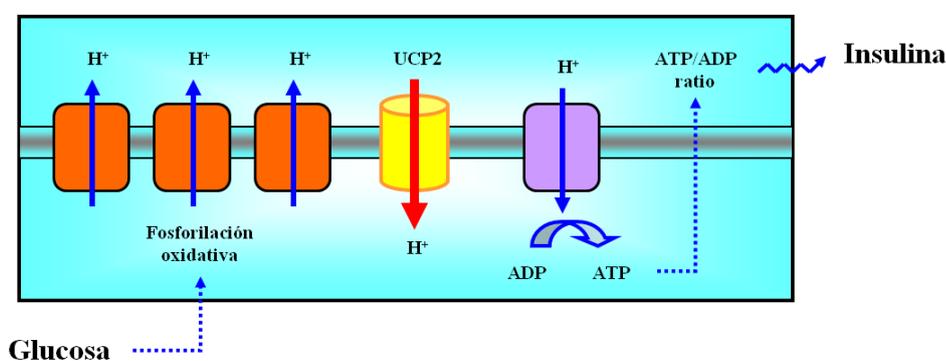


Figura 1.19 Representación de la función desacoplante de UCP2. Esta proteína actúa disipando el gradiente electroquímico asociado a la fosforilación oxidativa de la glucosa causando una menor producción de ATP y una consiguiente menor secreción de insulina.

Se ha demostrado que ratones *knock-out* de UCP2 producen elevados niveles de ATP en los islotes de Langerhans y un consiguiente aumento de secreción de insulina en respuesta al metabolismo de la glucosa [142]. En cambio, la sobre-expresión de UCP2 en las células INS-1E bajan los niveles de ATP y la secreción de insulina dependiente de glucosa [143]. Asimismo, estudios *in vivo* en modelos animales de ratones diabéticos demostraron que la inhibición de UCP2 mediante siRNA es capaz de revertir la diabetes inducida por la dieta [144]; mientras que estudios de sobre-expresión de UCP2 en modelos animales de ratones diabéticos, muestran una disminución de la secreción de insulina [145]. No obstante, para una evidencia directa del efecto del resveratrol en las células β hay que esperar hasta el 2011, cuando Vetterli y colaboradores [96]

demostraron, tanto en las INS-1E como en islotes humano, que el resveratrol mejoraba el metabolismo mitocondrial y la secreción de insulina. Estos efectos se atribuyeron tanto a la activación de AMPK como al aumento de expresión de algunos genes claves para el funcionamiento de la célula β (*Pdx1*, *Glut2*, *Gk*, *Hnf1 α* y *Tfam*). También se ha observado un aumento de *PDX1* y otros factores de transcripción en respuesta al tratamiento con resveratrol en islotes de primates no humanos [102] y en una línea celular de células α de ratón [146]. En ambos casos se demuestra como el tratamiento con resveratrol es importante para el mantenimiento de la identidad de célula β , proporcionando en el caso de los primates no humano un mecanismo de protección contra la dediferenciación y en el caso de las células α un estímulo para la transdiferenciación hacia un fenotipo β celular. A raíz de estos resultados y de los muchos resultados obtenidos *in vivo* en modelos animales de diabetes y obesidad [120, 136, 147-149] la investigación sobre el uso del resveratrol para el tratamiento de la diabetes tipo 2 ha llegado ya a la clínica (*Anexo 2*). Sin embargo, no obstante el número creciente de ensayos clínicos, algunos de los cuales con buenos resultados [103, 104], los efectos reales del resveratrol sobre los pacientes diabéticos siguen siendo controvertidos [123, 150].

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es la optimización de un protocolo de diferenciación capaz de generar a partir de las CTEh una población celular con un fenotipo β -pancreático de manera eficiente y reproducible. Por ello se ha utilizado un protocolo de diferenciación que reproduce las etapas del desarrollo pancreático, implementado con la adición del RSV en la etapa final de maduración.

2.1 Objetivos específicos

Efecto del RSV en las células β murinas

Estudio del papel del RSV en la secreción de insulina en la línea celular de insulinoma de rata INS-1E.

Diferenciación de las CTEh

Puesta a punto de un protocolo de diferenciación capaz de reproducir la organogénesis pancreática y dirigir las CTEh hacia células β -pancreáticas.

RSV en los procesos de maduración de los precursores β -pancreáticos

Estudio de los efectos del RSV en la etapa final del protocolo de diferenciación de las CTEh y su posible mecanismo de acción.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo celular

INS-1E. Línea clonal derivada de insulinoma de rata (INS-1). La INS-1E se caracteriza, a diferencia de la línea parental, por ser clonal, omogénea y más estable en cultivos prolongados; su fenotipo y su capacidad de secretar insulina en respuesta a la glucosa se mantiene por más de 116 pases [151]. Las células INS-1E fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI 1640 (Lonza) con 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado y suplementadas con L-glutamina 2 mM (Gibco), HEPES 10 mM, piruvato 1 mM, 2-mercaptoetanol 50 μ M, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 μ g/ml (Gibco) e incubadas en estufa a 37°C y con una atmósfera de CO₂ al 5%. Para cada experimento las células fueron cultivadas en medio de crecimiento durante tres días para luego ser tratadas durante 48 horas con diferentes concentraciones de RSV y sirtinol (SRT).

HS-181. CTEh derivada en la Unidad de fertilidad del Hospital universitario Karolinska. Esta línea fue derivada de un embrión que no pudo ser utilizado para el tratamiento de infertilidad de una pareja la cual firmó el consentimiento para su donación a la investigación con el objetivo de derivar una línea celular troncal permanente. La línea celular HS181 está incluida en el registro de CTEh de la Unión Europea. Las células fueron cultivada según lo descrito en el trabajo de Hovatta y colaboradores [59]. Brevemente las placas de cultivo fueron tratadas con Matrigel (1:60) y las células fueron mantenida en medio condicionado con fibroblastos humanos: Knockout DMEM (Gibco, 10829-018) con 20% Serum Replacement (SR) (Gibco, 10828-028), L-Glutamina [2 mM] (Gibco, 25030-032), Aminoácidos no esenciales (NAA) [1%] (Gibco 11140-035), Penicilina [50 U/ml] /Estreptomycin [50 μ g/ml] (P/S) (Gibco, 15140-122), 2-Mercaptoethanol [0,1 mM] (Gibco, 31350-010) y bFGF [8ng/ml] (R&D System, 234-FSE).

MSUH-001. hiPS obtenida de la Biobanca del ISCIII (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad). Estas células fueron cultivada según lo descrito para las HS181.

3.2 Diferenciación de las células troncales embrionarias humanas y de las células troncales pluripotentes inducidas

Ambas líneas celulares fueron sembradas en placas previamente tratadas con Matrigel a una densidad de 2500 cells/cm² y fueron mantenidas en cultivo con medio de indiferenciación hasta conseguir un 80% de confluencia (8-10 días). El protocolo de diferenciación utilizado está esquemáticamente resumido en la *Figura 2.1*; se utilizó RPMI (Gibco, 61870) suplementado con Penicilina [50 U/ml]/Estreptomicina [50 µg/ml] (P/S) como medio de diferenciación pancreática (día 0-14) y Knockout™ DMEM 12% SR, L-Glutamina [2 mM], Aminoácidos no esenciales (NAA) [1%], Penicilina [50 U/ml]/Estreptomicina [50 µg/ml] (P/S) y 2-Mercaptoethanol [0,1 mM] como medio para la maduración de los islotes (días 14-22). Brevemente, para inducir el mesendodermo se utilizó al día 0 RPMI sin suero suplementado con Activina A [100 ng/ml] (R&D Systems, 338-AC) y Wnt3a [25 ng/ml] (R&D Systems, 1324-WN); al día 1 el medio fue suplementado con un 0,2% de suero fetal bovino (FBS Lonza, DE14-801F) y desde el tercer día en adelante se utilizó RPMI al 2% de FBS. La Activina A fue añadida diariamente durante los primeros 5 días para la obtención de endodermo definitivo. Sucesivamente, para inducir el endodermo pancreático, se añadieron al medio de cultivo RA [2 µM] (Sigma, R2625) y bFGF [64 ng/ml] (R&D Systems, 234-FSE) durante tres días. Para enriquecer el endodermo pancreático a expensas de otros derivados endodermicos se añadió al medio de cultivo primero el Noggin [50 ng/ml] (R&D Systems, 6057-NG) durante tres días y después la Ciclopamina [0,25 µM] (Calbiochem, 239804) durante los siguientes tres días. En este punto de la diferenciación las células fueron levantadas y disociadas mecánicamente para pasar de un cultivo en adherencia a uno en suspensión necesario para promover la agrupación de las células en estructuras tridimensionales (clusters) parecidas a los islotes. Para el

cultivo en suspensión se utilizó el medio de maduración descrito arriba suplementado con fibronectina [5 µg/ml] (Sigma, F0895) e insulín-transferrín-selenio (ITS) (Gibco, 51300) durante 6 días. Finalmente para incrementar la maduración de las células β-pancreáticas se añadió al mismo medio de cultivo el resveratrol (RSV) [75 µM] (Sigma, R5010) durante los restantes dos días de diferenciación.

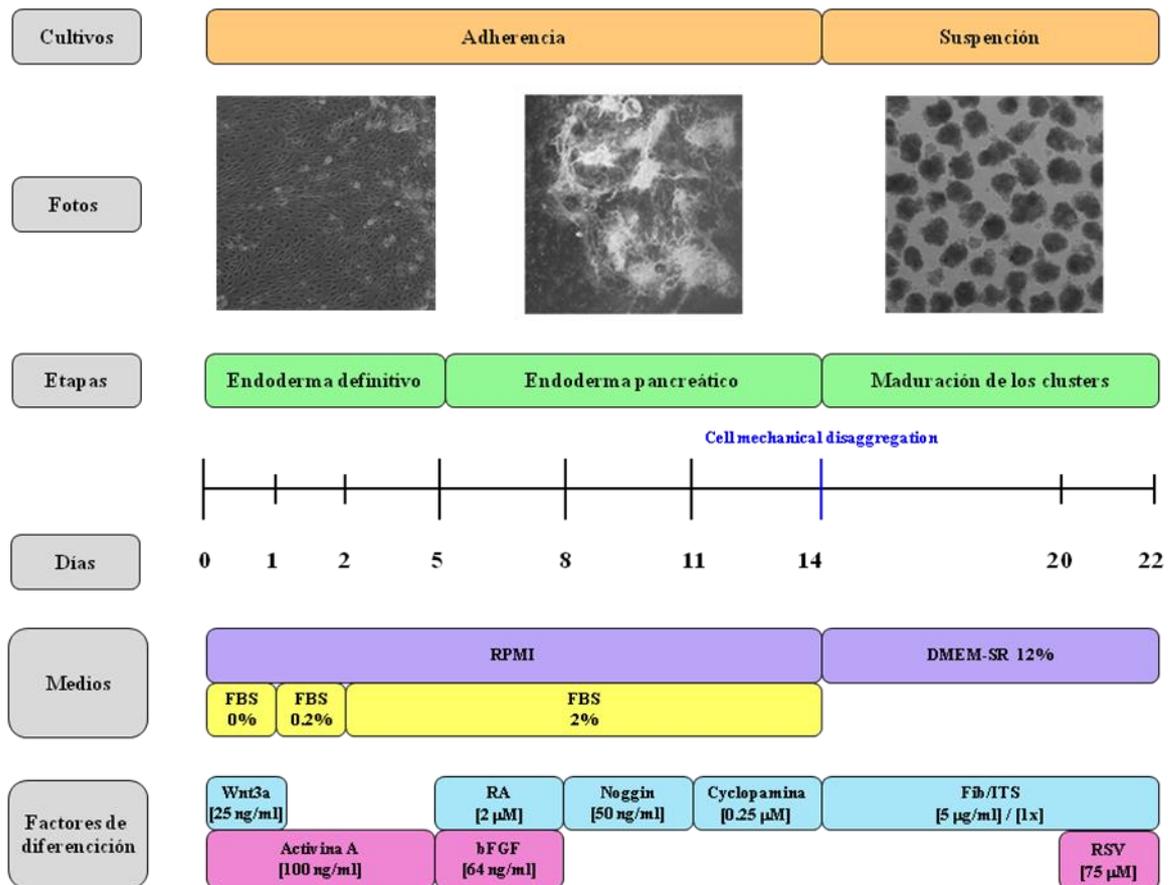


Figura 2.1 Esquema del protocolo de diferenciación optimizado.

3.3 Técnicas de biología molecular

3.3.1 Análisis de expresión génica

Extracción de ARN. Para la extracción de ARN se utilizó el Trizol (Invitrogen, 15596026) según las instrucciones del fabricante y de acuerdo al protocolo descrito por Chomczynsky [152]. El Trizol es una solución monofásica de fenol y guanidina isotiocinato que lisa las células y disuelve los componentes celulares manteniendo intacto el ARN. La adición de cloroformo permite separar, mediante centrifugación, la fase acuosa contenente el ARN de la fase orgánica (ADN y proteínas). El ARN obtenido se precipita con Isopropanol, se lava con etanol al 75% y se diluye en agua DEPC, ARNsi-free, dependientemente del pellet obtenido. El ARN total fue cuantificado mediante absorción espectrofotométrica (Nanodrop™ ND-1000) midiéndose su concentración a longitudes de onda de 260 nm y utilizados los ratios 260/280 y 260/230 como criterios de pureza del ARN obtenido. Posteriormente, las muestras fueron conservadas a -80°C hasta el momento de su utilización.

Transcripción inversa. La transcripción inversa se realizó a partir de 1 µg de ARN total de cada muestra. Para la síntesis del ADNc se utilizó la enzima MMLV (Promega, M1701) según las instrucciones del fabricante.

PCR convencional (RT-PCR). Para la PCR convencional se utilizó la BioTaq DNA Polimerasa (Bioline, BIO-21040) y el siguiente protocolo: una fase inicial de desnaturalización de 3 min a 94°C, seguida de 35 ciclos (94°C 30 sec, hibridación 55-68°C 1min, 72°C 1min) y una incubación final de 10 min a 72°C para la elongación de los fragmentos amplificados. Los cebadores utilizados se detallan en la *Tabla 2*. El análisis de los productos de amplificación obtenidos se realizó mediante electroforesis (100 mV) en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed (0.5 µg/ml) (Sigma) y su posterior visualización bajo luz ultravioleta (Transiluminador Bio-Rad).

Tabla 2. Cebadores para RT-PCR.

Gen	Cebador directo	Cebador inverso	Temp.	Tamaño
			Hibrid. (°C)	Amp. (pb)
<i>SOX17</i>	TGGACCGCACGGAATTTGAACA	TGTGTAACACTGCTTCTGGCCT	68	221
<i>FOXA2</i>	TTGCTGGTCGTTTGTGTGGCT	TTCATGTTGCTCACGGAGGAGT	68	153
<i>NGN3</i>	TAAGAGCGAGTTGGCACTGAGCAA	TTTGAGTCAGCGCCAGATGTAGT	68	200
<i>ISL1</i>	GTGCGGAGTGTAATCAGTATTTGG	GTCATCTCTACCAGTTGCTCCTTC	55	500
<i>PDX1</i>	TACTGGATTGGCGTTGTTTGTGGC	AGGGAGCCTTCCAATGTGTATGGT	68	133
<i>NKX2.2</i>	CGGACAATGACAAGGAGACCCCG	CGCTCACCAAGTCCACTGCTGTGG	68	492
<i>KIR6.2</i>	CGCTGGTGGACCTCAAGTGGC	CCTCGGGGCTGGTGGTCTTGCG	65	500
<i>SUR1</i>	TGCACATCCACCACAGCACATGGCTTC	GTGTCTTGAAGAAGATGTATCTCCTCAC	65	490
<i>GLUT2</i>	GGTTTGTAACCTTATGCCTTAAG	GCCTAGTTATGCATTGCAG	60	213
<i>GK</i>	GACGAGTTCCTGCTGGAGTATGAC	GACTCGATGAAGGTGATCTCGCAGCTG	60	525
<i>PCI3</i>	TTGGCTGAAAGAGAACGGGATACATCT	ACTTCTTTGGTGATTGCTTTGGCGGTG	60	456
<i>PC2</i>	GCATCAAGCACAGACCTACACTCG	GAGACACAACCACCCTTCATCCTTC	60	314
<i>INS</i>	TTTGTGAACCAACACCTGTGCGG	TTGTTCCACAATGCCACGCTTCTG	68	210
<i>GCG</i>	CCAGATCATTCTCAGCTTCC	GGCAATGTTATTCCTGTTC	60	180
<i>SST</i>	CGTCAGTTTCTGCAGAAGTCCCTGGCT	CCATAGCCGGGTTTGAGTTAGCAGATC	68	160
<i>PP</i>	CTGCTGCTCCTGTCCACCTGCGTG	CTCCGAGAAGGCCAGCGTGTCTC	65	207
<i>ACTB</i>	CGTACCCTGGCCTCGTGAT	TTCTCCTTAATGTCACGCAC	65	206

PCR cuantitativa (q-PCR). La PCR cuantitativa se realizó en el termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando PerfeCTa SYBER® Green SuperMix Low ROX (Quanta Biosciences) siguiendo el protocolo: 5 minutos a 95°C para activar la Taq Polimerasa, y 40 ciclos con 95°C 15 segundos y 60°C un minuto. Para determinar la cantidad relativa de cada diana en cada muestra se utilizó el método CT comparativo ($\Delta\Delta CT$) que compara los CTs (ciclo umbral) entre los tratamientos después de la normalización con el control endógeno. Los cebadores utilizados se detallan en la *Tabla 3*. Como controles endógenos se utilizaron TBP y UBC (TataBox).

Tabla 3. Cebadores para q-PCR.

Gene	Forward primer	Reverse primer	Temp. Hibrid. (°C)	Tamaño amplicón (bp)
<i>Ucp2</i> *	CGTCTGTTCAAAGCGTCTCA	CCAGCTGGAGTCTTCTCCTT	60	225
<i>SOX17</i>	TGGACCGCACGGAATTTGAACA	TGTGTAACACTGCTTCTGGCCT	64	221
<i>FOXA2</i>	TTGCTGGTCGTTTGTGTGGCT	TTCATGTTGCTCACGGAGGAGT	64	153
<i>HNF1B</i>	TCACAGATACCAGCAGCATCAGT	GGGCATCACCAGGCTTGTA	64	74
<i>HNF4A</i>	CATGGCCAAGATTGACAACCT	TCCCATATGTTCTGCATCAG	64	113
<i>PDX1</i>	TACTGGATTGGCGTTGTTTGTGGC	AGGGAGCCTTCCAATGTGTATGGT	64	133
<i>NGN3</i>	TAAGAGCGAGTTGGCACTGAGCAA	TTTGAGTCAGCGCCAGATGTAGT	64	200
<i>NKX2.2</i>	GGCCTTCAGTACTCCCTGCA	GGGACTTGGAGCTTGAGTCCT	64	67
<i>INS</i>	TTTGTGAACCAACACCTGTGCGG	TTGTTCCACAATGCCACGCTTCTG	64	210
<i>GLUT2</i>	TTCCGGAATCAATGGCATT	TGTTTACAGCGCAACTCCA	60	101
<i>GK</i>	CCTGGGTGGCACTAACTTCAG	TAGTCGAAGAGCATCTCAGCA	60	141

*Secuencia de los cebadores utilizados para ChIP del promotor del gen *Ucp2* de rata.

3.3.2 Inmunoprecipitación de la cromatina

Las células fueron tratadas con paraformaldeído 1% para favorecer la unión covalente de las proteínas que se encuentran físicamente cerca del ADN. Luego han sido lisadas y sonicadas para obtener una fragmentación del ADN alrededor de 500 pb. Este proceso no rompe la unión del formaldeído así que las proteínas se quedan unidas a sus sitios de unión en el ADN. Los fragmentos de ADN unidos a la proteína Sirt-1 han sido separados de los demás fragmentos mediante interacción con 1 µg de anticuerpo anti-Sirt-1 (Millipore, 07-131). Como control negativo se ha utilizado 1 µg de anticuerpo anti-GFP (Cell Signaling Technology) con el mismo isotipo del anticuerpo anti-Sirt1. El complejo anticuerpo-proteína-ADN ha sido precipitado utilizando “beads” tratadas con proteína A y esperma de salmón (Upstate). Para revertir la unión de las proteínas con el ADN se ha calentado el inmunoprecipitado a 65°C durante 4 horas. Para eliminar las proteínas el inmunoprecipitado ha sido posteriormente incubado con proteínasa K a

45°C durante una hora. Sigue el protocolo de extracción de ADN con fenol-cloroformo-isoamílico y precipitación con etanol 100%, NaAc 3M y glicogeno como carrier durante toda la noche a -20°C. El ADN inmunoprecipitado fue analizado mediante q-PCR de una región reguladora del gen di *Ucp2* previamente descrita por Bordone y colaboradores [142]. Para la cuantificación relativa del CHIP se ha utilizado el método $\Delta\Delta\text{CT}$ normalizando cada muestra con su *input*.

3.3.3 Inmunofluorescencia

Para los experimentos de inmunofluorescencia se procedió a la fijación de las células con paraformaldéido al 4% en PBS durante 20-30 minutos. Tras 3 lavados con PBS frío, las células se permeabilizaron con una solución al 0,3% de Tritón X-100 en PBS durante 30 minutos. Las muestras se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente, en una solución compuesta por 4% de BSA y 0.3% de Tritón X-100 en PBS y sucesivamente se incubaron con el anticuerpo primario over night a 4°C. Después de tres lavados con PBS se procedió con la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se marcaron los nucleos con 1 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 (Sigma, B2261) en PBS. Todos los anticuerpos utilizados están listados en la *Tabla 4*. Las imágenes de fluorescencia fueron capturadas con un microscopio invertido Olympus IX71 equipado con los siguientes programas para el procesamiento de las imágenes digitales DPController y DPManager. Las imágenes confocales fueron obtenidas utilizando el microscopio confocal Leica SP5. Para el análisis de cuantificación de la florescencia se utilizó el programa MetaMorph versión 7.5.1.0.

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios.

Anticuerpos Primarios			
Gen	Anticuerpo	Casa comercial y REF	Dilución
INS*	Mouse Monoclonal	Sigma, I2018	1:500
INS	Guinea pig Polyclonal	Dako, A0564	1:500

GCG	Mouse Monoclonal	Sigma, G2656	1:500
PDX1	Rabbit Polyclonal	Millipore, AB3505	1:1000
C-PEP	Mouse Monoclonal	Millipore, 05-1109	1:500
GLUT2		Chemicon, AB1342	1:1000
Anticuerpos secundarios			
	Anticuerpo	Casa comercial y REF	Dilución
Alexa Fluor 488	Goat anti-mouse	Invitrogen, A11029	1:500
Alexa Fluor 488	Goat anti -rabbit	Invitrogen, A11034	1:500
Alexa Fluor 594	Goat anti-mouse	Invitrogen, A11032	1:500
Alexa Fluor 594	Goat anti -rabbit	Invitrogen, A11037	1:500
DyLight 549	Goat anti-guinea pig	Rockland, 606-142-129	1:4000

3.3.4 Western Blot

Las células se lisaron en RIPA buffer (Sigma, R0278) suplementado con inhibidores de proteasas (Complete, Roche, 11 697 498 001) y de fosfatasas (Sigma, P0044 y P5726) durante 45 min en hielo, luego se sonicaron y se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 min a 4°C. La cuantificación ha sido realizada con el método de Bradford utilizando una curva de BSA como standard. Las proteínas (30-40 µg) fueron separadas mediante 10% SDS-PAGE. Para la electroforesis se utilizó un voltaje constante entre 120 y 150 V durante 2-3 horas, luego las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Amersham) mediante transferencia over night a 90 mA. Las membranas fueron bloqueadas over night a 4°C en una solución al 5% de BSA en TBS-T (TBS y Tween 0,1%) y luego fueron incubadas over night a 4°C con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo. Finalmente, después de varios lavados con TBS-T, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario durante 45 min a temperatura ambiente y fueron reveladas utilizando el ECL-Prime Kit (Amersham, RPN-2232). En la *Tabla 5* están listados los anticuerpos utilizados. Para el estudio densitométrico de las bandas inmunoreactiva las película fueron escaneadas para su cuantificación con el

programa ImageQuant Software versión 5.2 (Molecular Dynamics). Los datos han sido graficados como unidades densitométricas relativas.

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios.

Anticuerpos Primarios			
Gen	Anticuerpo	Casa comercial y REF	Dilución
INS	Mouse Monoclonal	Sigma, I2018	1:500
UCP2	Rabbit Polyclonal	Calbiochem, 662047	1:1000
AMPK α	Mouse Monoclonal	Cell Signaling, 2793S	1:1000
pAMPK α	Rabbit Monoclonal	Cell Signaling, 2535S	1:1000
PI3K p85	Rabbit Polyclonal	Cell Signaling, 4292S	1:1000
pPI3K p85	Rabbit Polyclonal	Cell Signaling, 4228S	1:1000
AKT	Rabbit Polyclonal	Cell Signaling, 9272S	1:1000
pAKT	Rabbit Polyclonal	Cell Signaling, 9271S	1:1000
MAPK p44/42	Rabbit Polyclonal	Cell Signaling, 9102S	1:1000
pMAPK p44/42	Mouse Monoclonal	Cell Signaling, 9106S	1:1000
β -actina	Mouse Monoclonal	Sigma, A5441	1:10000
Anticuerpos secundarios			
	Anticuerpo	Casa comercial y REF	Dilución
Peroxidase	Goat anti-mouse	Jakson, 115-035-003	1:20000
Peroxidase	Goat anti -rabbit	Jakson, 111-035-003	1:20000

3.4 Estudios funcionales *in vitro* e *in vivo*

3.4.1 Medición de calcio intracelular

La fluorescencia fue detectada con un microscopio invertido TS-100 Nikon equipado con un objetivo 20X fluor (0,75 NA) como se describió anteriormente [153]. Las células fueron incubadas en DMEM con 2 mM fura-2 AM durante 30 min a 37°C a continuación se lavaron las células. Las imágenes de fluorescencia de 20 a 30 células, se registraron y analizaron con un sistema digital de imágenes de fluorescencia (InCyt IM2, Imsol, Reino Unido) equipados con una cámara CCD sensible a la luz (Cooke PixelFly, ASI, EE.UU.).

Los cambios de Ca^{2+} se representan como la ratio de la fluorescencia de fura-2 inducida a una emisión de longitud de onda a 510 nm y excitada a 340 nm y 380 nm (ratio = F340/F380). Los experimentos se realizaron en una solución estándar (en mM): 120 NaCl, 2 CaCl₂, 4.7 KCl, 1 MgCl₂, 0,2 EGTA, 10 HEPES. Los cambios de Ca^{2+} se determinaron a partir de los cambios en la fluorescencia de fura-2 después de re-incorporación de glucosa (25 mM).

3.4.2 ELISA

Para los ensayos de medición de la secreción de insulina de las INS-1E, las células se trataron según el protocolo experimental y después de un lavado con PBS se incubaron a 37°C durante 1 hora con una solución de Krebs (129 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 5 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES y BSA 0.1% a pH 7.4) sin glucosa. Finalmente las células fueron estimuladas con la misma solución de Krebs suplementada con diferentes concentraciones de glucosa (2.7 mM y 16.8 mM) durante 30 minutos a 37°C para favorecer la liberación de insulina. Para los ensayos en las CTEh, los clusters derivados de la diferenciación espontánea y los obtenidos al día 20 del protocolo de diferenciación fueron sembrados en plaquitas previamente tratadas

con Matrigel. Los clusters derivantes del protocolo de diferenciación fueron divididos en dos subgrupos: unos fueron tratados con RSV y los otros no. Pasadas 48 horas todos los clusters fueron estimulados según el protocolo descrito arriba, siendo la única diferencia el periodo de estimulación de 1 hora en lugar de los 30 minutos descritos anteriormente. Como en el caso de las INS-1E, los sobrenadantes fueron recogidos y el contenido de insulina secretada fue medido con los kits de ELISA de Mercodia según el protocolo de la casa comercial.

3.4.3 Transplante en ratones diabéticos

Tratamiento con estreptozotocina. Los ratones utilizados para el transplante fueron NOD/SCID (NOD.CB17-Prkdc scid/J) machos de 8 semanas (Charles River Laboratories). Para inducir la diabetes los ratones recibieron una singola inyección de STZ (Sigma, S0130) de 170 mg/Kg disuelta en una solución de citrato a pH4.5. Los niveles de glucosa en la sangre fueron monitorados diariamente durante la primera semana desde la inyección de STZ y luego cada dos días. Las medidas fueron tomadas con un glucómetro (Roche, AccuCheck Compact Plus) desde la cola de los ratones previamente puestos en ayunas durante tres horas. Los animales se consideraron diabéticos cuando mostraron niveles de glucosa en la sangre superiores a 300 mg/dl durante por lo menos tres días consecutivos.

Trasplante. El día del trasplante se recogieron los clusters obtenidos al día 22 del protocolo de diferenciación de las CTEh y se inyectaron debajo de la capsula renal de los ratones diabéticos. Brevemente, los ratones fueron anestesiados con Ketamina (100 mg/Kg) y Xilacina (10 mg/Kg), el riñon fue expuesto mediante una incisión lumbar de 1 cm aproximadamente y la suspensión (10-20 µl) contenente los agragados celulares fue inyectada por debajo de la capsula renal por medio de un catéter conectado a una micropipeta (*Figura 3.1*). El peso y la cantidad de glucosa en la sangre fueron monitorados cada dos días como indicado arriba. A las 4-6 semanas el trasplante fue asportado y el ratón fue sacrificado. Todos los procedimientos experimentales que

incluyen el trabajo con animales han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación con Animales (CEEA 1/2012) de nuestro centro.

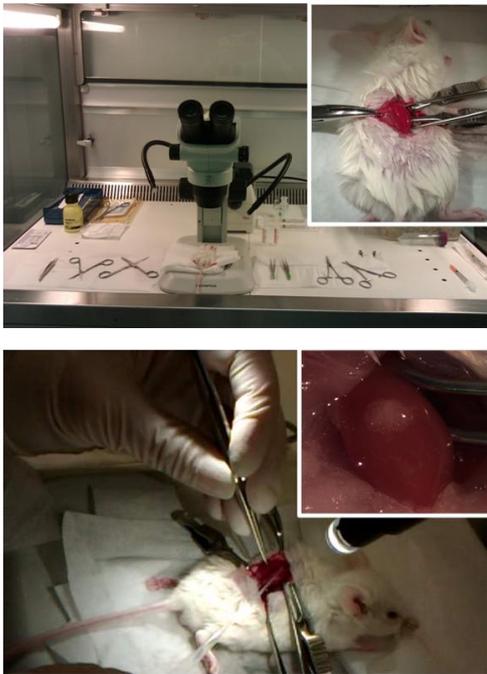


Figura 3.1 Trasplante de los clusters en ratones diabéticos. Los animales previamente anestesiados se operan bajo cabina de flujo laminar. El riñón viene expuesto mediante incisión lumbar y los clusters vienen inyectados bajo la cápsula renal mediante catéter.

Análisis histológico. El riñón trasplantado fue fijado en paraformaldeído al 4% over night a 4°C, sucesivamente se lavó con PBS y se transfirió a una solución de sacarosa al 30% durante una noche (o hasta su precipitación al fondo del falcon) a 4°C. Finalmente se incluyó en OCT (SAKURA, Tissue-Tek) para ser sucesivamente cortado con criostato en secciones de 10 μm y analizado mediante inmunohistoquímica y/o tinción de ematosilina/eosina.

3.5 Análisis estadístico

Los datos se han expresado como la media aritmética \pm el error estándar. Las comparaciones entre las diferentes condiciones experimentales fueron analizadas mediante análisis de variación unidireccional (ANOVA) utilizando la prueba-T. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Efectos del resveratrol sobre la línea celular INS-1E

4.1.1 Caracterización del modelo celular utilizado

Los primeros experimentos efectuados fueron los de caracterización de la línea celular INS-1E. Eligimos esta línea celular para estudiar el efecto del RSV en la secreción de insulina puesto que necesitábamos de un modelo de células β maduras que no sólo liberase insulina sino que también fuese capaz de responder a los estímulos de la glucosa de manera proporcional a la dosis utilizada. La expresión de insulina en la INS-1E ha sido observada tanto a nivel de ARN mensajero (*Figura 4.1A*) mediante RT-PCR, como a nivel de proteína, mediante un ensayo de inmunofluorescencia (*Figura 4.1B*). Para comprobar la capacidad de las INS-1E de liberar insulina en respuesta a la glucosa las células han sido estimuladas con una solución de Krebs con diferentes concentraciones de glucosa (*Figura 4.1C*). Como se puede observar en la gráfica de ELISA las células secretan cantidades crecientes de insulina de manera proporcional a la concentración de glucosa con la que han sido estimuladas.

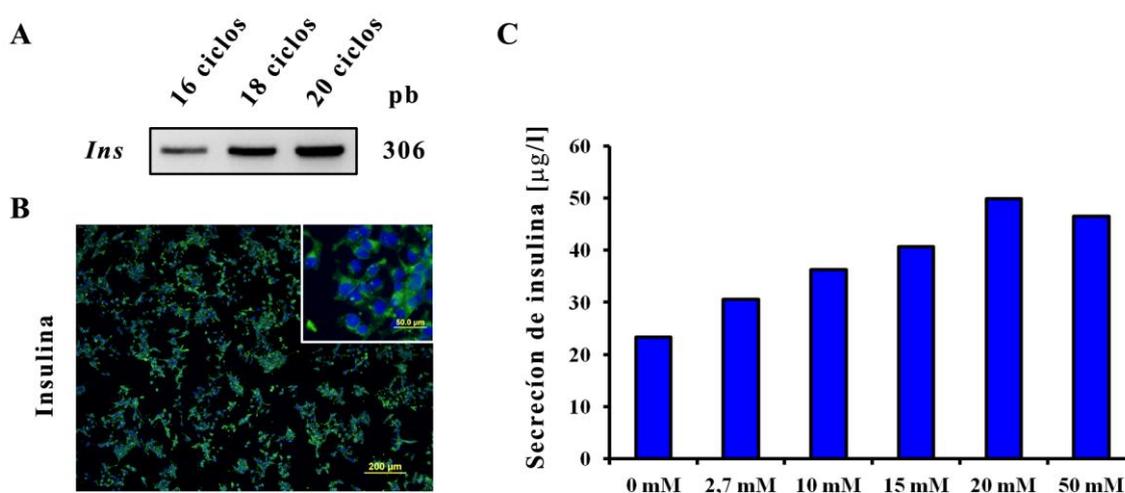


Figura 4.1 Caracterización de la línea celular INS-1E. **A:** Análisis mediante RT-PCR semi-cuantitativa de la expresión de ARNm de insulina. **B:** Detección de insulina (verde) mediante inmunofluorescencia.

Los núcleos están teñidos en azul con Hoechst. **C:** Medición de la liberación de insulina mediante ELISA en células estimuladas con diferentes concentraciones de glucosa.

4.1.2 Efectos del resveratrol sobre el contenido y la secreción de insulina

Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de RSV (50 y 75 μM) y con el SRT (50 μM) durante 48 horas y el contenido y la secreción de insulina fueron medidos mediante inmunofluorescencia y ensayo de ELISA. Como se puede observar en la *Figura 4.2* las células tratadas con altas concentraciones del polifenol muestran un pequeño pero significativo incremento en el contenido de insulina en comparación con las otras condiciones.

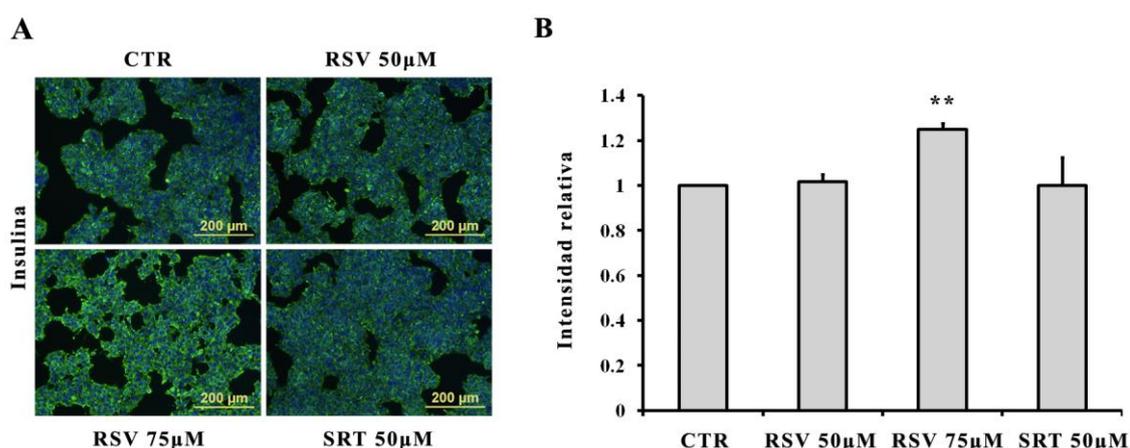


Figura 4.2 Medición del contenido de insulina. Las células INS-1E fueron divididas en tres grupos: CTR, células sin ningún tratamiento; RSV 50 μM , células tratadas durante 48 horas con RSV (50 μM); RSV 75 μM , células tratadas durante 48 horas con RSV (75 μM); SRT 50 μM , células tratadas durante 48 horas con SRT (50 μM). **A:** imágenes representativas de los niveles de expresión de la insulina mediante técnica de inmunofluorescencia. **B:** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia medida mediante análisis con el programa MetaMorph. Los datos representan la media \pm SEM de 2 experimentos independientes. (**) $p < 0.01$.

La secreción de insulina ha sido medida con un kit de ELISA que nos permitió cuantificar la insulina liberada en el sobrenadante después de estimular las células con

glucosa. Como nos esperábamos, las células tratadas con 50 y 75 μM de RSV secretaron respectivamente 3.2 y 15.6 veces más insulina que las células control (*Figura 4.3*).

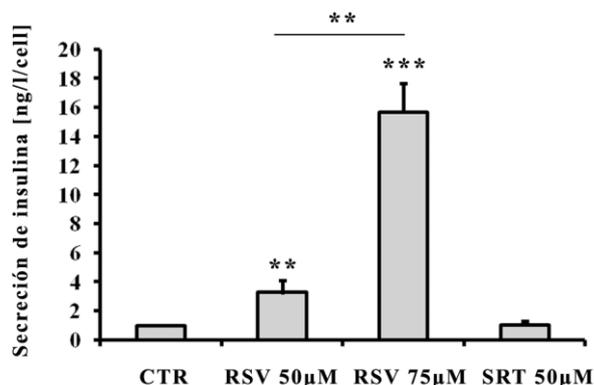


Figura 4.3 Medición de la secreción de insulina. Tras el tratamiento con RSV y SRT las células fueron estimuladas mediante incubación de 30 min con una solución contenente glucosa (20 mM). Los datos representan la media \pm SEM de 4 experimentos independientes. (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$.

Para confirmar los resultados de ELISA hemos estudiado otro de los componentes clave en el proceso de liberación de insulina, como es el Ca^{2+} . Para que las vesículas que contienen almacenada la insulina funcionen con la membrana plasmática se necesita la entrada de Ca^{2+} en la célula. Hemos llevado a cabo unos experimentos de medición de Ca^{2+} intracelular con Fura-2AM en células controles, en células tratadas con el RSV a diferentes concentraciones y en células tratadas con SRT. Como se puede observar en la *Figura 4.4* la estimulación con glucosa induce una mayor entrada de Ca^{2+} en las células tratadas con RSV, mientras que la acción del SRT se traduce en una reducción de la entrada de Ca^{2+} con respecto a la respuesta obtenida en células controles. En la *Figura 4.4A* se muestran los registros de los flujos de Ca^{2+} más representativos entre los varios experimentos efectuados mientras que el resultado total del estudio está resumido en la *Figura 4.4B*.

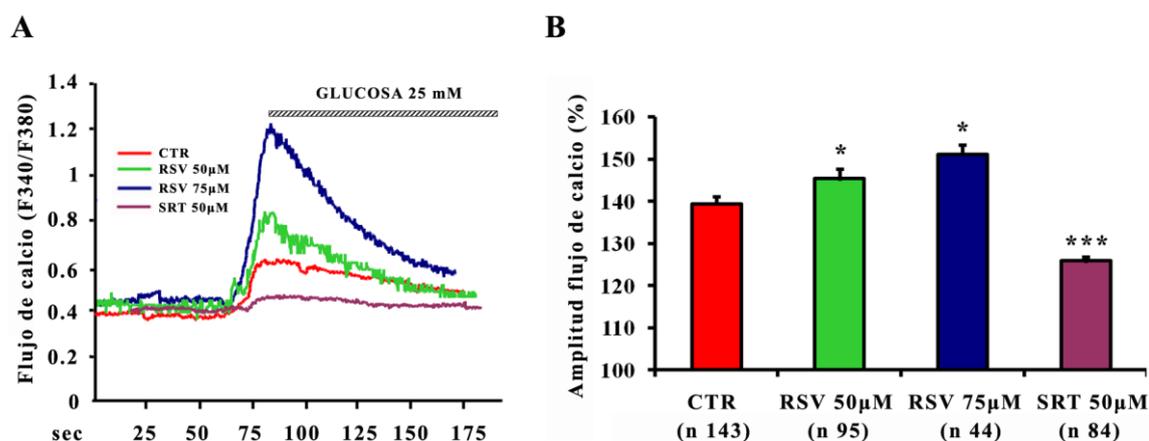


Figura 4.4 Variaciones en los niveles de Ca^{2+} intracelular. **A:** Representación de los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} mediante visualización de los registros de flujo de calcio más representativos. **B:** % de la variación en la amplitud de la señal fluorescente en las diferentes condiciones. Los datos representan la media \pm SEM de n células (n indicado en la figura) de varios experimentos independientes. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$.

4.1.3 Determinación del mecanismo de acción

Una de las dianas más conocida y estudiada del RSV es la proteína deacetilasa SIRT1. Según lo descrito en literatura SIRT1 podría tener un efecto positivo en la secreción de insulina mediante inhibición directa del gen de *Ucp2*, lo cual se traduciría en un mejor acoplamiento entre el metabolismo de la glucosa y la secreción de la insulina. Para investigar si el posible mecanismo de acción a través del cual el RSV induce un aumento de la secreción de insulina estaba relacionado con la activación de SIRT1 y la consiguiente unión de este al promotor de *Ucp2* llevamos a cabo unos experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Efectivamente confirmamos la unión de SIRT1 al promotor de *Ucp2* en las INS-1E demostrando que tal unión aumentaba en las células previamente tratadas con RSV (Figura 4.5).

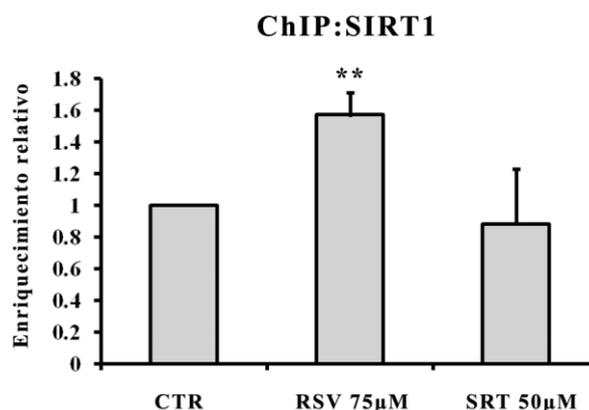


Figura 4.5 Unión del SIRT1 al promotor de Ucp2. Las células INS-1E fueron tratadas con RSV 75µM o SRT 50µM durante 48 horas. Tras la inmunoprecipitación de la cromatina mediante anticuerpo anti-SIRT1 la cantidad de promotor de *Ucp2* presente en el inmunoprecipitado ha sido cuantificada mediante q-PCR de una zona reguladora del promotor de *Ucp2*. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. (**) $p < 0.01$.

A pesar de los resultados obtenidos con los ensayos de ChIP, no ha sido posible detectar cambios de expresión a nivel de UCP2. Contrariamente a lo esperado, tanto los resultados de q-PCR como los de western blot no mostraron ninguna disminución de la expresión de UCP2 tras el tratamiento con RSV (Figura 4.6).

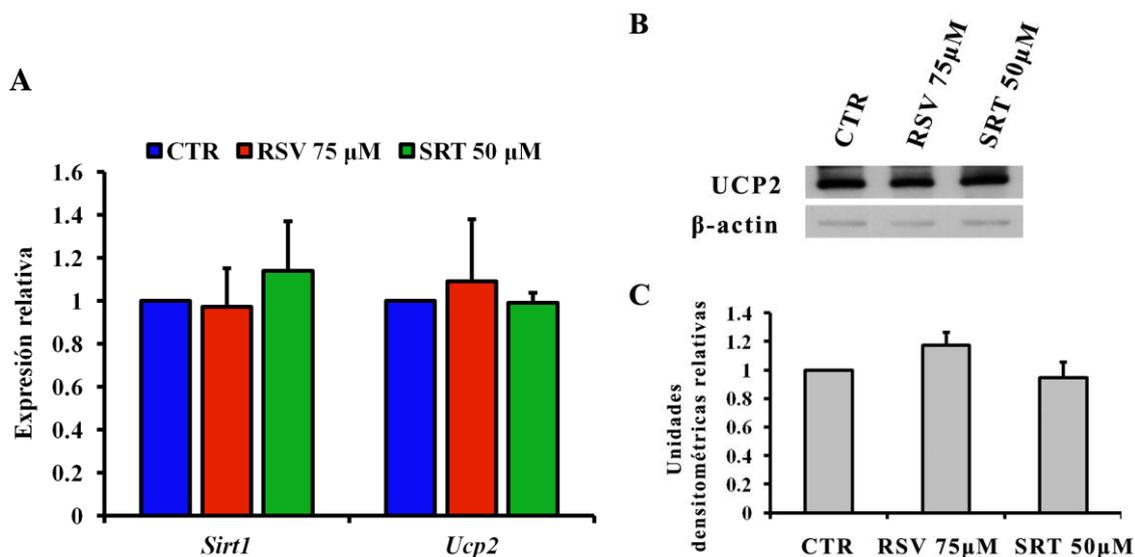


Figura 4.6 Estudio de los niveles de expresión de UCP2. Las células INS-1E fueron tratadas durante 48 horas con RSV y con SRT (inhibidor de SIRT1). **A:** medición mediante q-PCR de los niveles de

expresión de Sirt1 y Ucp2. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes; **B**: análisis mediante western blot de los niveles de la proteína UCP2. La β -actina ha sido utilizada como control de carga. **C**: cuantificación densitométrica de las bandas inmunoreactivas detectadas mediante WB de UCP2. Los datos representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes.

4.2 Diferenciación de las células troncales embrionarias humanas hacia células β -pancreáticas

4.2.1 Obtención de endodermo definitivo

El primer paso hacia la obtención de células productoras de insulina a partir de CTEh es la formación del endodermo definitivo. El protocolo más reproducible y eficiente descrito hasta ahora es el publicado por D'Amour y colaboradores en 2005 [74]. Por lo tanto nuestro primer objetivo ha sido reproducir este protocolo (*Figura 4.7*) en la línea celular de CTEh HS181 y caracterizar las células obtenidas.

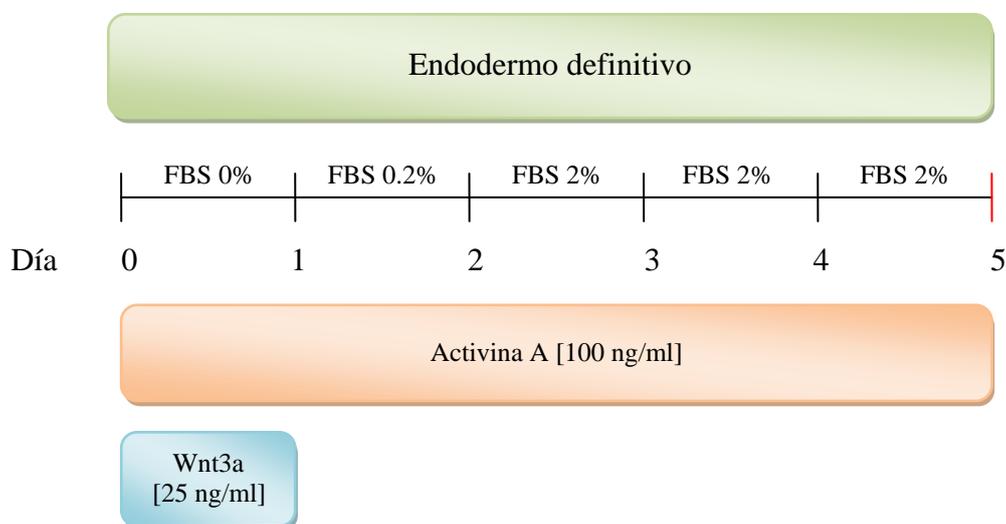


Figura 4.7 Representación esquemática del protocolo de diferenciación hacia endodermo. Reproducción del protocolo diseñado por D'Amour y col. para la obtención de endodermo definitivo. FBS, suero fetal bovino.

Los estudios de expresión genica mediante RT-PCR muestran una activación de los marcadores de endodermo (*Figura 4.8B*) a expensas de los marcadores de pluripotencia (*Figura 4.8A*).

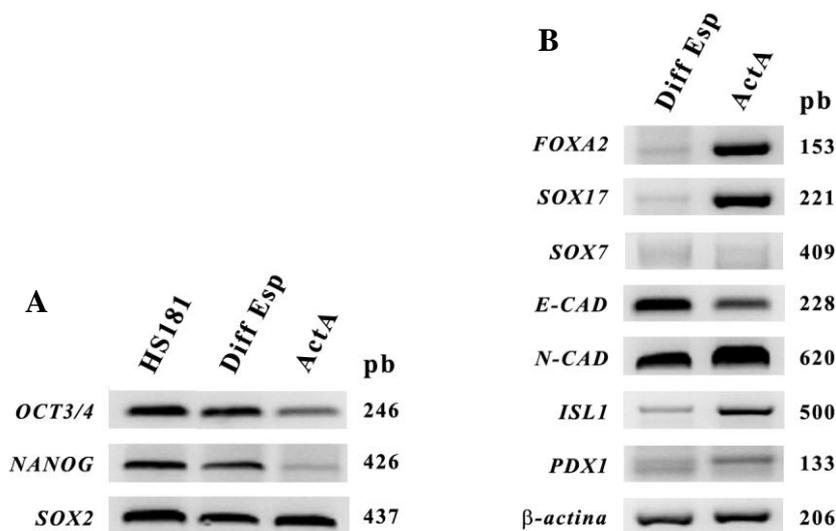


Figura 4.8 Caracterización mediante RT-PCR de marcadores de pluripotencia y diferenciación. Las células HS181 fueron divididas en tres grupos: células indiferenciadas (HS181); células diferenciadas espontáneamente durante 5 días (Diff Esp); células diferenciadas según el protocolo de diferenciación arriba descrito (ActA). **A:** Detección de genes de pluripotencia. **B:** Detección de genes de endodermo definitivo y pancreático.

Durante el desarrollo embrionario, antes de formarse el endodermo definitivo y el mesodermo, las células pasan por un estado intermedio llamado mesendodermo. Un papel importante para su formación lo cumple la activación de la vía de Wnt, por eso D'Amour y colaboradores [74] utilizaron Wnt3a durante el primer día del protocolo de diferenciación. Para comprobar la formación sucesiva de mesendodermo y endodermo definitivo en nuestros cultivos analizamos la expresión de tres genes durante los días 1, 2 y 5 del protocolo de diferenciación y comparamos entre el tratamiento con Activina A con y sin la adición de Wnt3a (*Figura 4.9*). Brachyury es un marcador de mesodermo y el pico de expresión observado en el día 2 es indicativo de la formación de mesendodermo mientras que su sucesiva inhibición y la activación de *SOX17* y *FOXA2* en el día 5 indican la obtención de endodermo definitivo. En concordancia con los resultados de D'Amour y colaboradores [74] el protocolo más eficaz ha demostrado ser el con Activina A y Wnt3a.

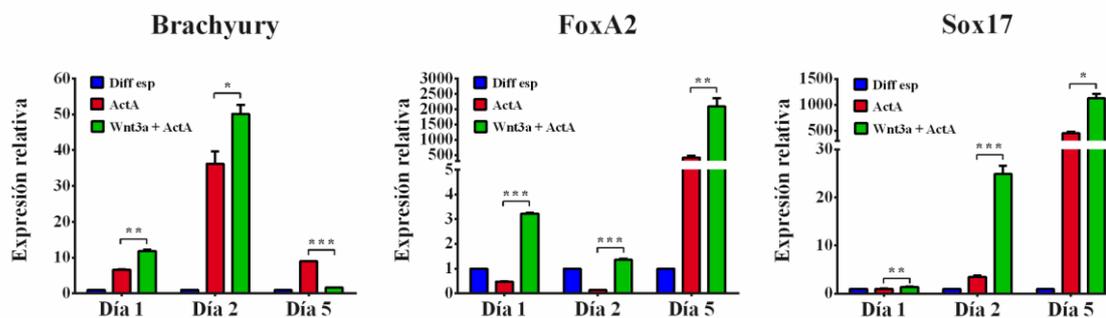


Figura 4.9 Dinámica de expresión durante el protocolo de diferenciación. Análisis mediante q-PCR de la dinámica de expresión de genes de mesodermo y endodermo definitivo a lo largo del protocolo en células diferenciadas espontáneamente (Diff Esp), diferenciadas utilizando solo Activina A (Act A) y en células tratadas con Wnt3a y Activina A (Wnt3a + Act A). Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$.

Como se puede observar en la *Figura 4.10* el protocolo para la obtención de endodermo definitivo resulto muy eficiente siendo alta la expresión de SOX17 detectada a día 5 mediante inmunofluorescencia.

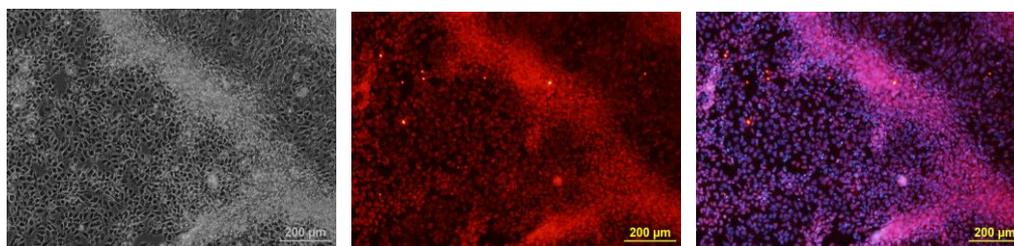


Figura 4.10 Células positivas para SOX17. Morfología y marcaje mediante inmunofluorescencia de SOX17 (rojo) en células sometida al protocolo de diferenciación hacia endodermo definitivo. Los núcleos están teñidos en azul con Hoechst.

4.2.2 Desarrollo de un protocolo de diferenciación

En base a los resultados obtenidos con el protocolo de D'Amour para la obtención de endodermo definitivo, se ha seguido con la diferenciación hacia un fenotipo β -

pancreático reproduciendo el protocolo descrito por Kroon y colaboradores [85] (Anexo 1) con el objetivo de conseguir células β -pancreáticas capaces de secretar insulina. Sin embargo para alcanzar este objetivo tuvimos que añadir al protocolo la fase de maduración de los precursores endocrinos ya que en el artículo de Kroon esta etapa se consiguió solo *in vivo* mediante trasplante en ratones diabéticos. Para la fase de maduración elegimos un protocolo sencillo basado en lo publicado por Shim y colaboradores (anexo 1) con la adición de bFGF a concentraciones decrecientes durante la primera fase del cultivo en suspensión ya que hemos observado una mejoría en la supervivencia celular cuando las células se trataban con este factor de crecimiento. También se añadió al protocolo una última etapa para el tratamiento de las células con el RSV según el esquema reportado en la *Figura 4.11*.

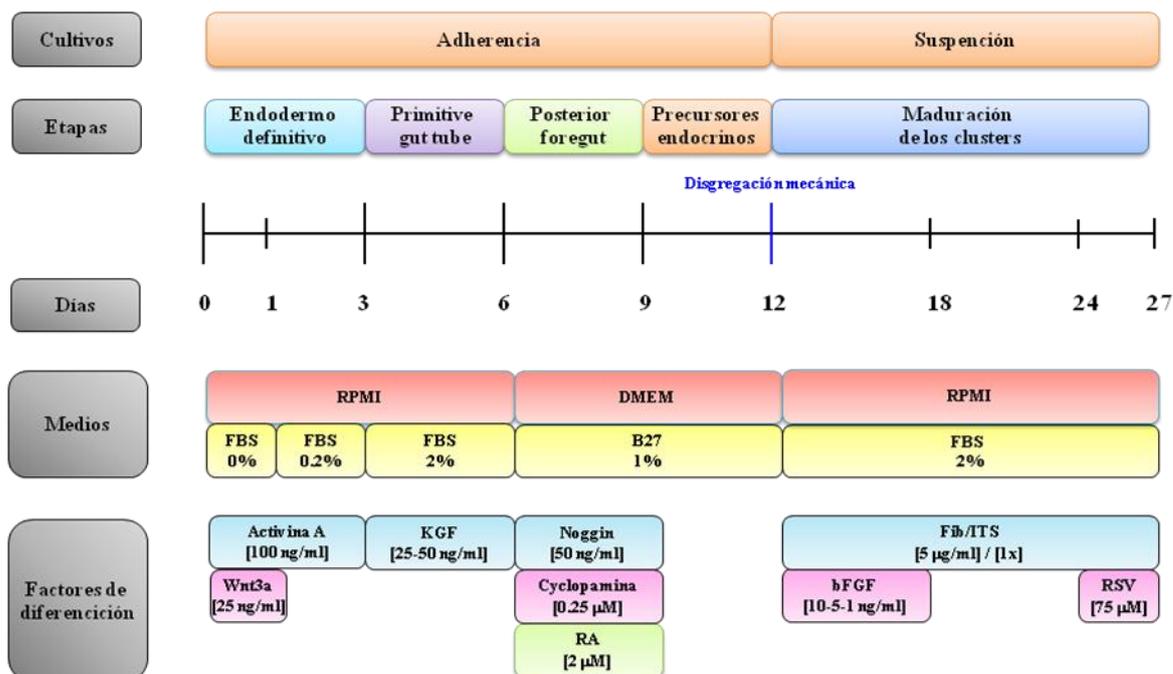


Figura 4.11 Representación esquemática del protocolo 1 de diferenciación hacia células β -pancreáticas. Reproducción del protocolo de Kroon y colaboradores hasta el día 12 seguido de la fase en suspensión utilizada por Shim y colaboradores con la adición del bFGF y RSV.

Desafortunadamente la aplicación de este protocolo, en nuestra línea celular, no ha dado buenos resultados ya que la diferenciación obtenida resulta dirigida hacia un fenotipo neuronal más que pancreático como se puede observar en la *Figura 4.12* donde las fotos

en campo claro muestran formación de rosetas y prolongaciones típicamente neuronales en buena parte de los cultivos celulares.

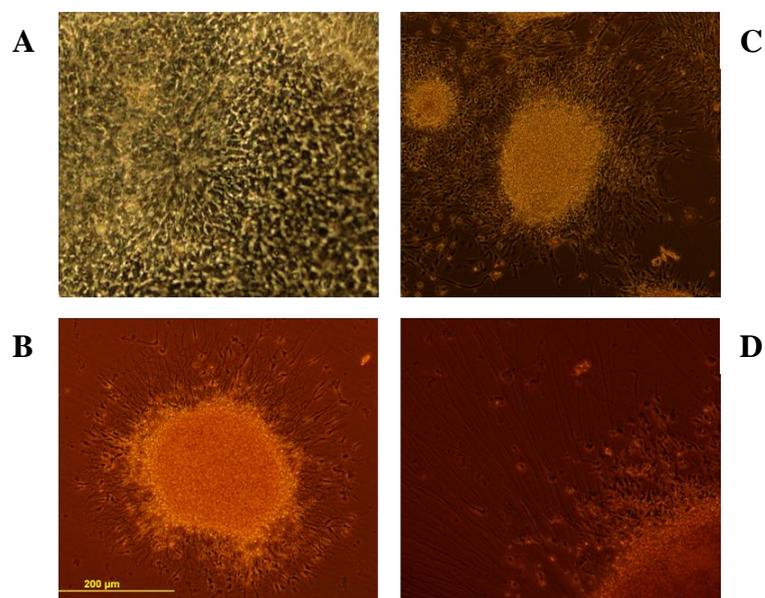


Figura 4.12 Morfología de los cultivos. En el día 22 la mayoría de las colonias tenían un aspecto parecido a células neuronales en la imagen **A** se observa un fenotipo característico de las rosetas neuronales mientras que en las fotos **B-D** se pueden ver abundantes prolongaciones alrededor de las colonias.

Tanto por RT-PCR como por inmunofluorescencia no ha sido posible detectar genes de endodermo (*SOX17* y *FOXA2*) ni marcadores pancreáticos (*PDX1* e *INS*) mientras que sí se ha detectado la expresión de la proteína neuronal *TUJ1* (*Figura 4.13A-B*).

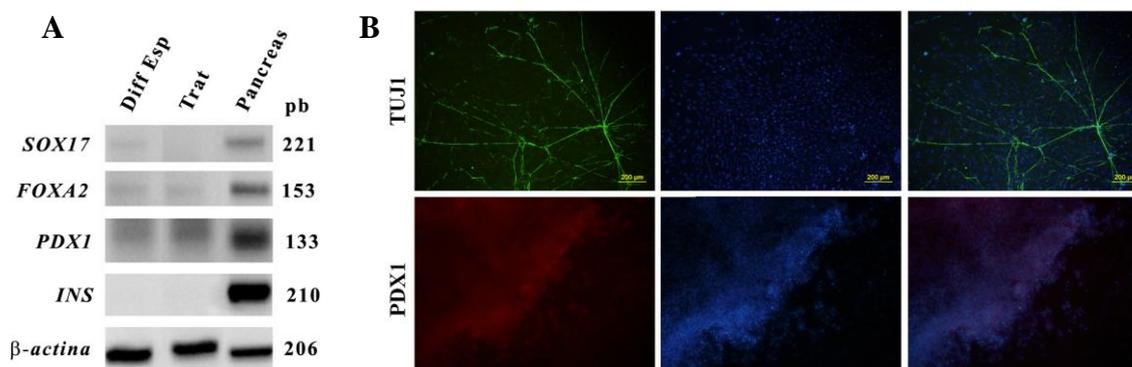


Figura 4.13 Caracterización de las células obtenidas al final del protocolo de diferenciación. **A:** El análisis mediante RT-PCR muestra una completa ausencia tanto de marcadores endodérmicos (*SOX17* y *FOXA2*) como pancreáticos (*PDX1* e *INS*). Diff Esp: células diferenciadas espontáneamente; Trat: células sometidas al protocolo de diferenciación hacia endodermo definitivo; Pancreas: cDNA derivado de páncreas humano como control positivo para la RT-PCR. **B:** Mediante técnica de inmunofluorescencia ha sido posible confirmar la ausencia de expresión de PDX1 (rojo) y al mismo tiempo se observó una marcada expresión del marcador neuronal TUJ1 (verde). Los nucleos están teñidos en azul con Hoechst.

Después de reproducir el protocolo de Jiang y colaboradores [84] (Anexo 1) y probar con algunas modificaciones sin obtener resultados positivos decidimos volver a recurrir a la literatura pero esta vez para rediseñar un protocolo nuevo basado en las etapas de la organogenesis pancreáticas.

4.2.3 Optimización del protocolo de diferenciación para la obtención de células β -pancreáticas

Para el nuevo protocolo de diferenciación utilizamos la misma estrategia que D'Amour para la obtención de endodermo definitivo y de allí seguimos hasta obtener el “*posterior foregut*” (PF), el endodermo pancreático (EP), los precursores endócrinos (PE) y finalmente las células productoras de insulina (CB). Para ello nos hemos basados en los estudios de desarrollo embrionario en ratones, modulando mediante el uso de factores de crecimiento y molécula bioactivas, las vías de señalización involucradas en la formación del páncreas que resumimos en el siguiente esquema (*Figura 4.14*).

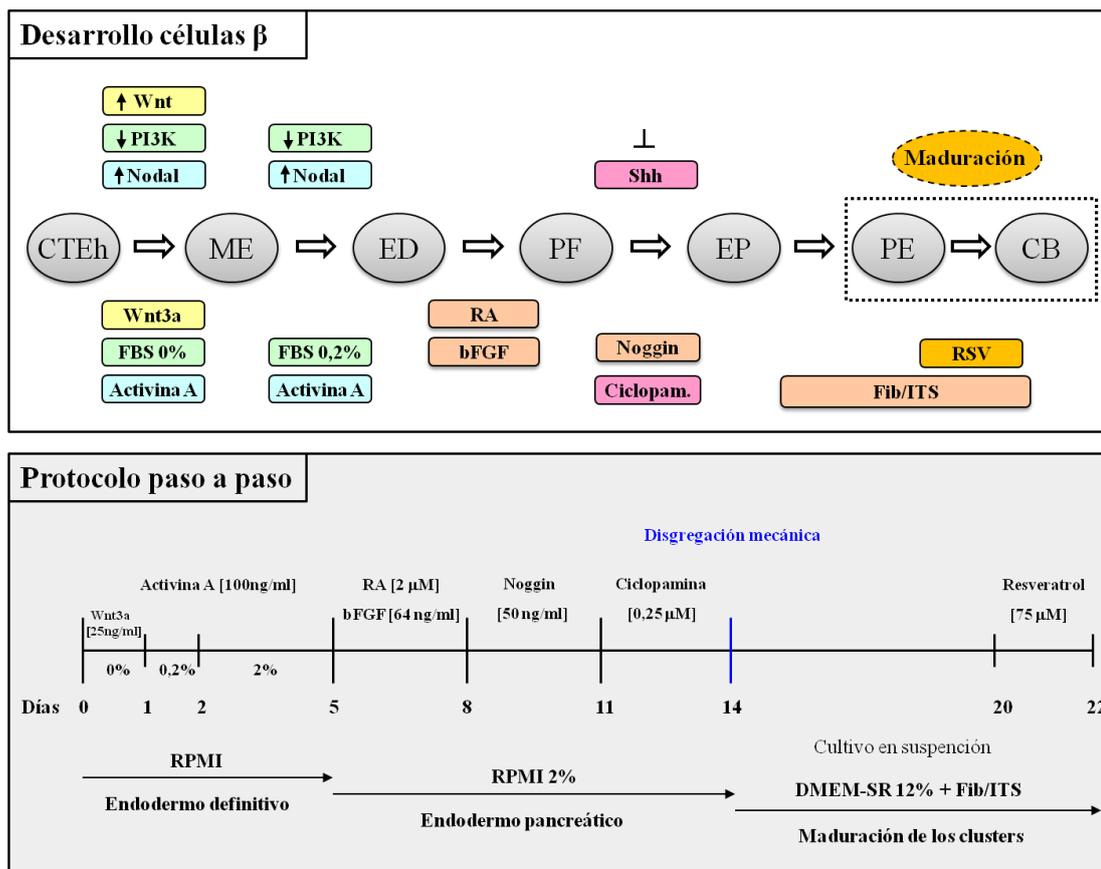


Figura 4.14 Recapitulación de la organogénesis pancreática para una diferenciación más eficiente de las CTEh. **A:** Representación esquemática de las etapas mas importantes involucradas en la diferenciación de las CTEh hacia un fenotipo β -pancreático y de los factores de diferenciación y las vías de señalización implicadas en el proceso. CTEh: células troncales embrionarias humanas; ME: mesendodermo; ED: endodermo definitivo; PF: posterior foregut; EP: endodermo pancreático; PE: precursores endócrinos; CB: células β . **B:** Representación esquemática del nuevo protocolo de diferenciación diseñado en base a las etapas del desarrollo embrionario.

Para comprobar la eficacia de nuestro protocolo de diferenciación se ha analizado la expresión de algunos de los factores de transcripción involucrado en la organogénesis del páncreas durante diferentes etapas del protocolo. Como se puede observar en la *Figura 4.15*, a día 5 del protocolo de diferenciación empiezan a expresarse los marcadores de endodermo definitivo, *SOX17* y *FOXA2*. Al mismo tiempo se activan los genes *HNF1B* y *HNF4A* siendo el primero necesario para la sucesiva activación de *NGN3* y el segundo para la inducción hepática. Su expresión se reduce durante el

protocolo de diferenciación hasta el día 14 indicando una especificación del endodermo pancreático a expensas de otros derivados endodérmicos.

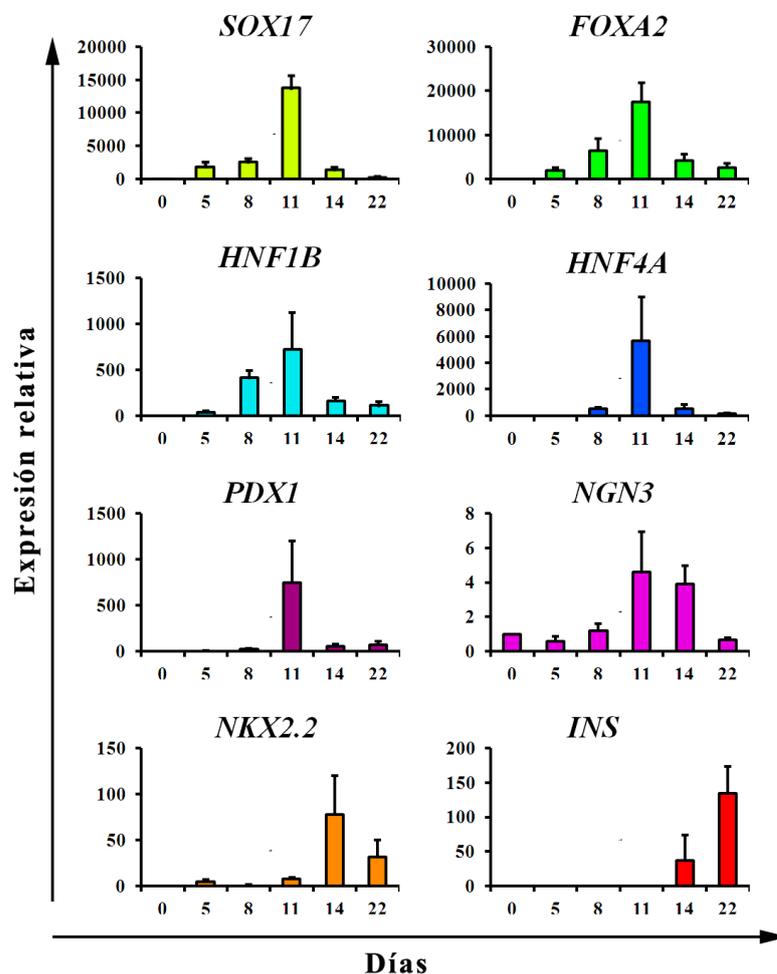


Figura 4.15 Dinámica temporal de expresión génica durante el proceso de diferenciación de las CTEh.

Las células HS181 fueron diferenciadas según el protocolo descrito arriba. Las muestras fueron recojidas a diferentes etapas del protocolo, precisamente en los días 0, 5, 8, 11, 14 y 22 y la expresión de *SOX17*, *FOXA2*, *HNF1B*, *HNF4A*, *PDX1*, *NGN3*, *NKX2.2* e *INS* fue analizada mediante q-PCR normalizando a la expresión del día 0. Los datos representan la media \pm SEM de 3-6 experimentos independientes.

PDX1 muestra su primer pico de expresión en el día 11 para luego disminuir sus niveles en el día 14, durante la etapa de proliferación endócrina, para finalmente reactivarse al final del protocolo de diferenciación en las que serán las células β -pancreáticas maduras. La diferenciación y proliferación de los precursores endócrinos se induce entre los días 11 y 14 como se puede observar por el pico de expresión del marcador de progenitores

endócrinos *NGN3*. Este a su vez baja sus niveles al día 14 en concomitancia con la activación de *NKX2.2*, específico para los precursores de las células β , y la insulina que finalmente aumenta su expresión hasta el final del protocolo de diferenciación (día 22). La *Figura 4.16* es un resumen gráfico de la dinámica de expresión de los genes estudiados y permite una mejor apreciación de los diferentes y secuenciales estadios del desarrollo pancreático los cuales han sido reproducidos con éxito a lo largo de nuestro protocolo de diferenciación.

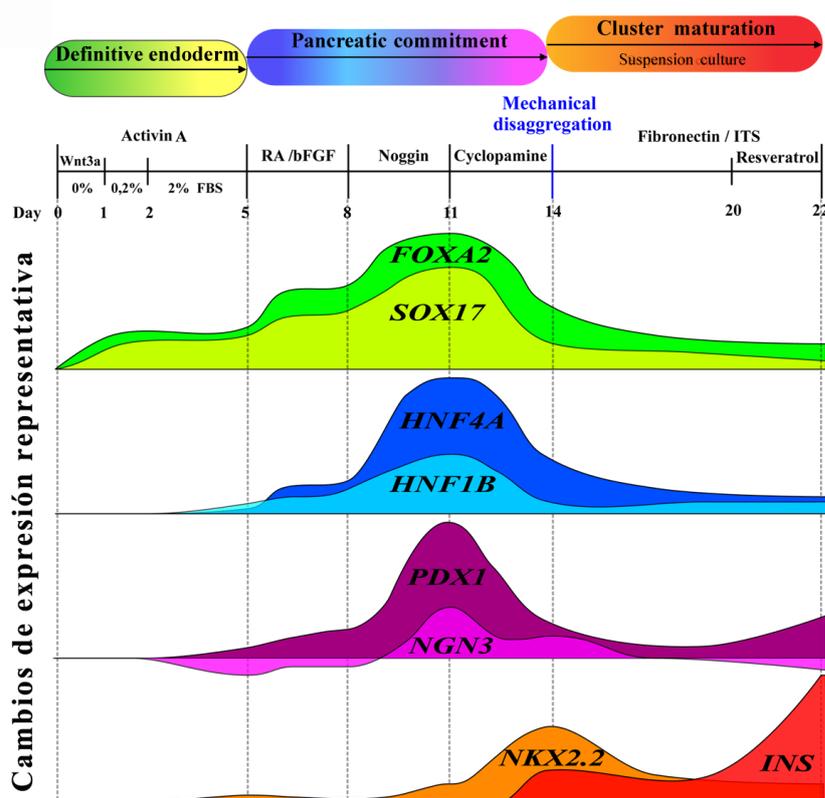


Figura 4.16 Resumen gráfico de los cambios temporales de expresión génica a lo largo del protocolo. Representación esquemática de la expresión secuencial y de las variaciones temporales de expresión de los genes estudiados mediante q-PCR.

Para comprobar la eficacia y la reproducibilidad del protocolo de diferenciación repetimos este proceso en la línea de células hiPS MSUH-001. Los resultados de RT-PCR muestran la expresión de algunos marcadores pancreático (*Figura 4.17A*) aunque la detección de insulina ha sido posible sólo mediante q-PCR probablemente debido a que los niveles de expresión, tanto de la hormona como de *PDX1*, son bastante más

bajos en las células β -pancreáticas derivadas de las hiPS comparadas con las obtenidas a partir de las CTEh (Figura 4.17B).

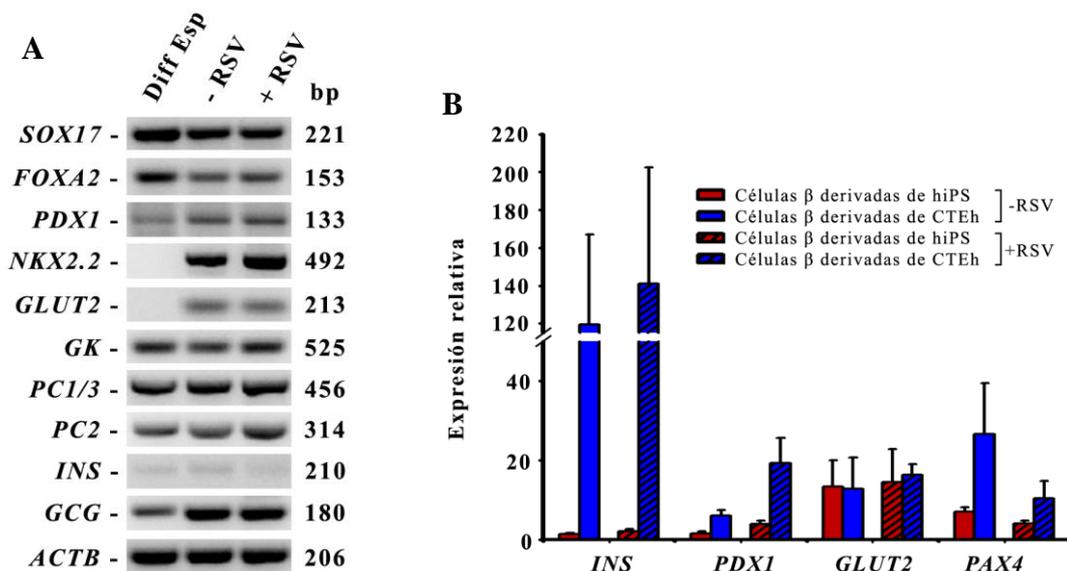


Figura 4.17 Reproducibilidad del protocolo en células hiPS. **A:** Detección mediante RT-PCR de marcadores de endodermo definitivo, precursores endocrinos e islote en células β -pancreáticas derivadas a partir de hiPS. Diff Esp: células diferenciadas espontáneamente; -RSV: células sometidas al protocolo de diferenciación sin RSV; +RSV: células sometidas al protocolo de diferenciación completo (con RSV). **B:** Comparación de los niveles de expresión de algunos marcadores de célula β en células diferenciadas a partir de hiPS (columnas rojas) o de CTEh (columnas azules) con o sin adición de RSV (+RSV, -RSV). Los datos representan la media \pm SEM de 3-6 experimentos independientes para las hiPS y de 3-8 para las CTEh.

4.3 Efectos del resveratrol en la maduración celular

Dados los efectos del RSV observados en la línea celular INS-1E decidimos investigar si este polifenol era capaz, de la misma manera, de aumentar la secreción de insulina en las células β -pancreáticas derivadas mediante nuestro protocolo de diferenciación para así solucionar el problema de la escasez de insulina obtenida en los diferentes protocolo de diferenciación hasta ahora publicados. Para ello hemos dividido el cultivo de las CTEh en tres grupos: un grupo control donde las células han sido cultivada con el

mismo medio de cultivo del protocolo de diferenciación pero sin la adición de ningún factor de diferenciación durante 22 días, este grupo se identificará como diferenciación espontánea (Diff Esp); un grupo de diferenciación donde las células se han sometido al protocolo de diferenciación durante 22 días pero sin añadir el RSV, este grupo se identificará como -RSV; y un último grupo de diferenciación donde las células se someterán al protocolo de diferenciación completo con la adición del RSV durante los últimos dos días de cultivo, este grupo se identificará como +RSV. Las células obtenidas de las tres condiciones de cultivo fueron caracterizadas mediante RT-PCR para detectar la expresión de un panel de marcadores de genes pancreático (Figura 4.18) entre los cuales destacan marcadores de endodermo definitivos, *SOX17* y *FOXA2*, precursores endócrinos, *PDX1*, *NGN3* e *ISL1*, precursores de células β , *NKX2.2*, y finalmente marcadores de células β maduras cuales *GLUT2*, *GK*, *PC1/3* e *INS*.

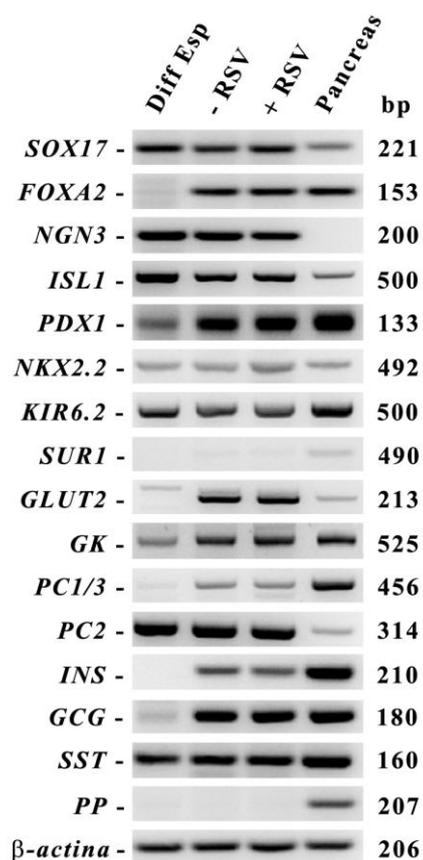


Figura 4.18 Caracterización de los clusters obtenidos al final del protocolo de diferenciación. Detección mediante RT-PCR de marcadores de endodermo definitivo, precursores endócrinos e islote en células β -parecidas derivadas a partir de las CTEh. Diff Esp: células diferenciadas espontáneamente; -RSV: células sometidas al protocolo de diferenciación sin RSV; +RSV: células sometidas al protocolo de diferenciación completo (con RSV). Pancreas: cDNA derivado de páncreas humano como control positivo para la RT-PCR.

Los marcadores de células endócrinas PDX1, GCG, INS y PEP-C fueron también detectados mediante inmunofluorescencia como se puede observar en la *Figura 4.19* con un mayor marcaje en las células tratadas con (+RSV) comparadas con las células sin tratar (-RSV).

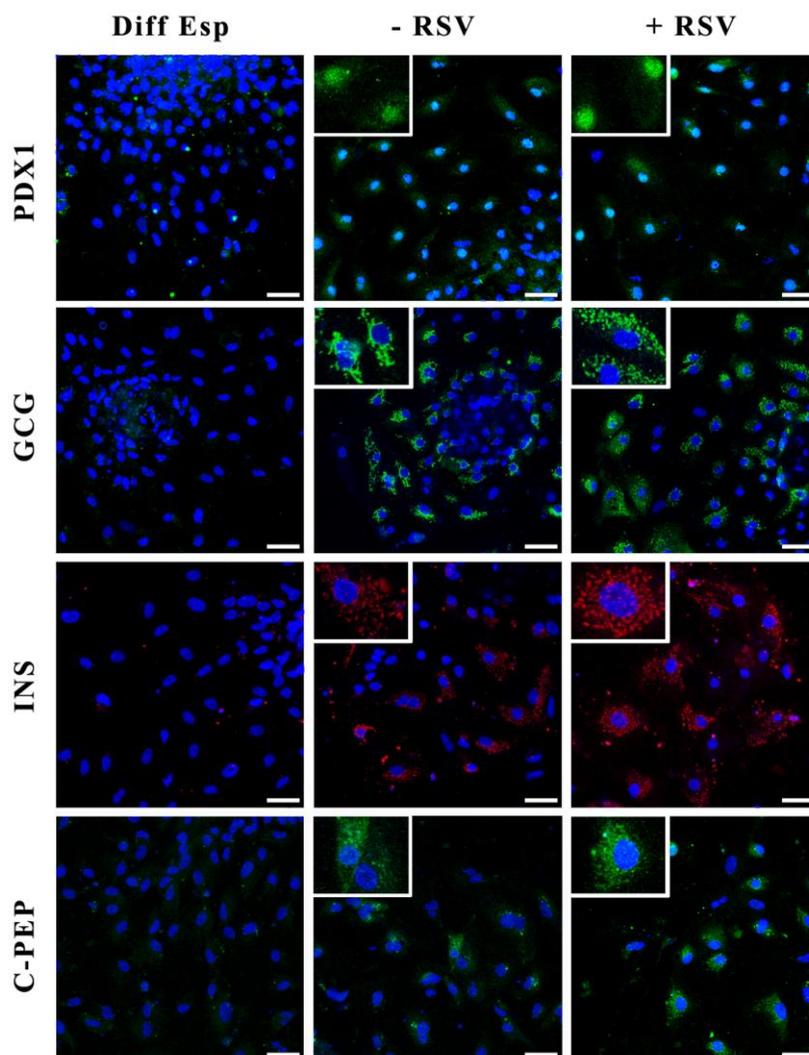


Figura 4.19 Caracterización de los clusters obtenidos al final del protocolo de diferenciación. Detección mediante inmunofluorescencia de PDX1, GCG, INS y PEP-C en los clusters derivados de la diferenciación de las CTEh. Diff Esp: células diferenciadas espontáneamente; -RSV: células sometidas al protocolo de diferenciación sin RSV; +RSV: células sometidas al protocolo de diferenciación completo (con RSV). Los núcleos están teñidos en azul con Hoechst. Escala 50 μ m.

Profundizando en la caracterización de las células obtenidas aplicando nuestro protocolo de diferenciación se ha llevado a cabo una doble inmunofluorescencia y mediante microscopía confocal se ha podido apreciar una perfecta colocación de insulina y péptido C en las células tratadas con RSV donde la señal fluorescente evidencia una morfología bastante más similar a lo que serían los granulos citoplasmáticos de una célula β madura, comparado con las células diferenciada sin RSV (*Figura 4.20*).

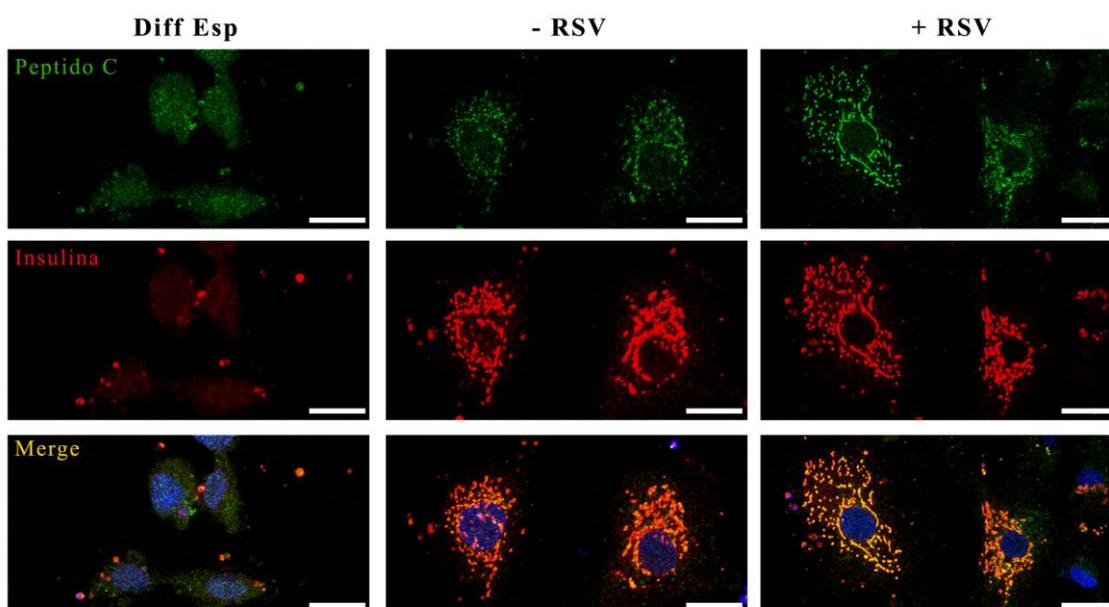


Figura 4.20 Caracterización de las células β -pancreáticas obtenidas al final del protocolo de diferenciación. Estudio de colocación de insulina (rojo) y péptido C (verde) mediante doble inmunofluorescencia. Diff Esp: células diferenciadas espontáneamente; -RSV: células sometidas al protocolo de diferenciación sin RSV; +RSV: células sometidas al protocolo de diferenciación completo (con RSV). Los núcleos están teñidos en azul con Hoechst. Escala 25 μ m.

Otra evidencia de la adquisición de un fenotipo más maduro de las células tratadas con RSV con respecto a las sin RSV se muestra en la *Figura 4.21* donde es posible apreciar el marcaje de membrana típico del GLUT2 sólo en las células positivas para insulina sometida al tratamiento con el polifenol.

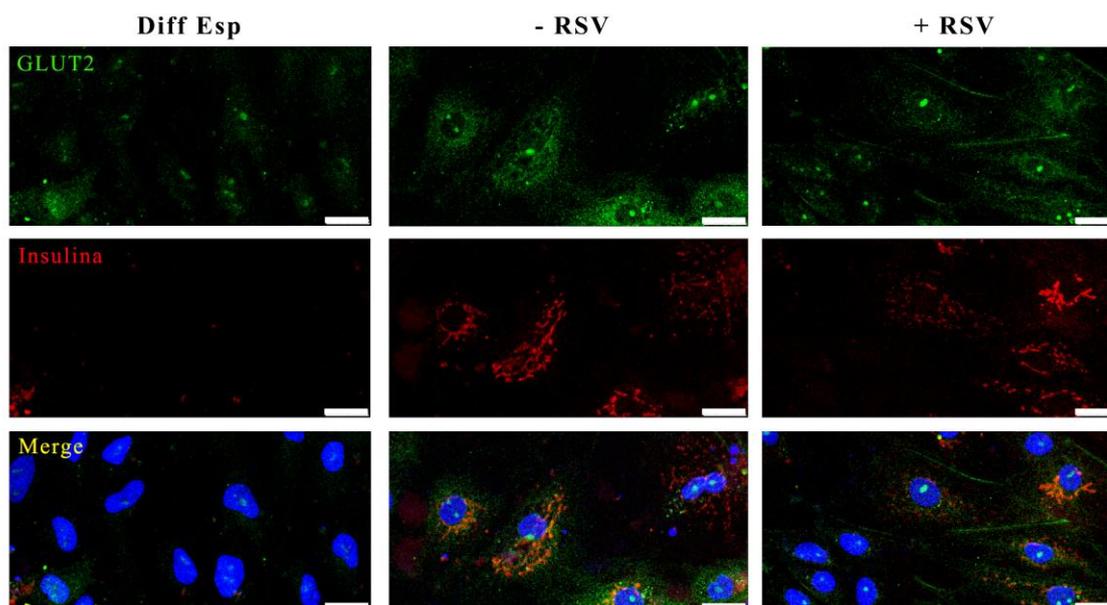


Figura 4.21 Caracterización de las células β -pancreáticas obtenidas al final del protocolo de diferenciación. Estudio de coexpresión de insulina (rojo) y GLUT2 (verde) mediante doble inmunofluorescencia. Diff Esp: células diferenciadas espontáneamente; -RSV: células sometidas al protocolo de diferenciación sin RSV; +RSV: células sometidas al protocolo de diferenciación completo (con RSV). Los núcleos están teñidos en azul con Hoechst. Escala 25 μ m.

Además de mostrar un fenotipo morfológicamente más parecido a una célula β madura, el análisis de cuantificación de la señal fluorescente mediante el programa MetaMorph muestra un aumento significativo del número de células positivas para el marcaje de insulina en los cultivos tratados con RSV comparados con los cultivos a los que no se ha suministrado el polifenol, respectivamente un 40% contra un 20% de células positivas (*Figura 4.22*).

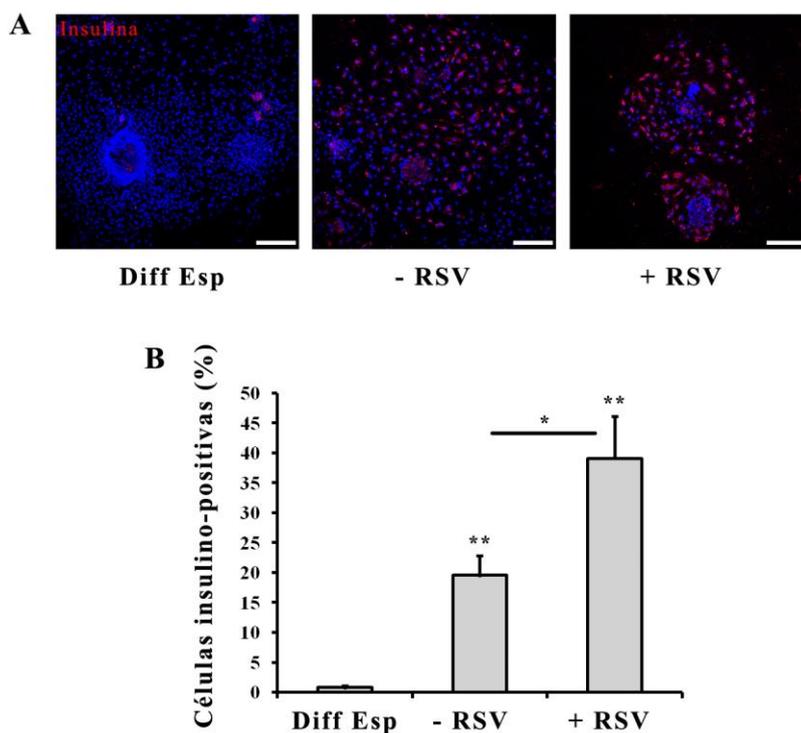


Figura 4.22 Efectos del RSV en los procesos de maduración de las células β -pancreáticas derivadas de las CTEh. **A:** Fotos de menor aumento representativas del porcentaje de células positivas para la insulina en diferentes clusters. Diff Esp: células diferenciadas espontáneamente; -RSV: células sometidas al protocolo de diferenciación sin RSV; +RSV: células sometidas al protocolo de diferenciación completo (con RSV). Los núcleos están teñidos en azul con Hoechst. Escala 250 μ m. **B:** Cuantificación del porcentaje de células positivas para el marcaje de insulina mediante análisis con MetaMorph. Los datos representan la media \pm SEM de 3-4 experimentos independientes. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$.

Siempre basándonos en los experimentos de inmunofluorescencia pudimos demostrar que el tratamiento con RSV no solo permite duplicar el número de células productoras de insulina, sino también induce un aumento del contenido celular de la hormona como muestran los resultados de cuantificación de la señal fluorescente representados en la *Figura 4.23*.

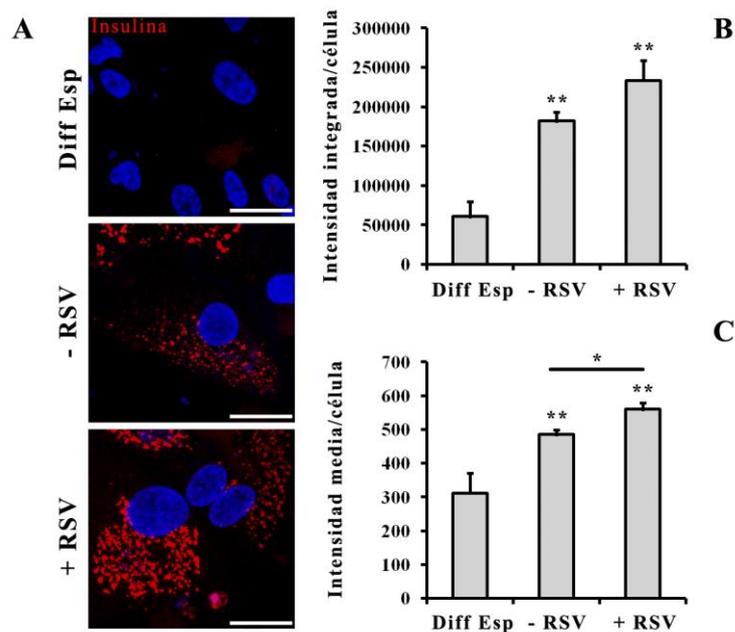


Figura 4.23 Efectos del RSV en los procesos de maduración de las células β -pancreáticas derivadas de las CTEh. **A:** Fotos de mayor aumento representativas del contenido de insulina por célula en las distintas condiciones de cultivo. Diff Esp: células diferenciadas espontáneamente; -RSV: células sometidas al protocolo de diferenciación sin RSV; +RSV: células sometidas al protocolo de diferenciación completo (con RSV). Los núcleos están teñidos en azul con Hoechst. Escala 25 μ m. Cuantificación del contenido de insulina mediante análisis de la intensidad integrada (**B**) y de la intensidad media (**C**) de la señal fluorescente con MetaMorph. Los datos representan la media \pm SEM de 3-4 experimentos independientes. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$.

Como se ha comentado con anterioridad, los resultados obtenidos con la línea celular INS-1E demostraron que el efecto del RSV en las células β maduras está principalmente asociado con un aumento de la secreción de insulina en respuesta al estímulo con glucosa. De la misma manera las células β -pancreáticas obtenida mediante diferenciación dirigida de las CTEh han sido capaces de secretar insulina en respuesta al estímulo de glucosa y como se esperaba las células tratadas con RSV mostraron un aumento en la secreción de insulina de 2.6 y 4.2 veces respectivamente comparadas con las células sin tratar (-RSV) y el grupo control de diferenciación espontánea (*Figura 4.24A*). No obstante, un estudio más detallado de la secreción de insulina dependiente de glucosa ha demostrado que tanto las células sin RSV como las tratadas con RSV no son capaces de responder correctamente a las variaciones de glucosa. Si bien en las

células tratadas con RSV la secreción de insulina resulta siempre aumentada, no se observa un aumento proporcional de insulina en respuesta a las concentraciones crecientes de glucosa (*Figura 4.24B*).

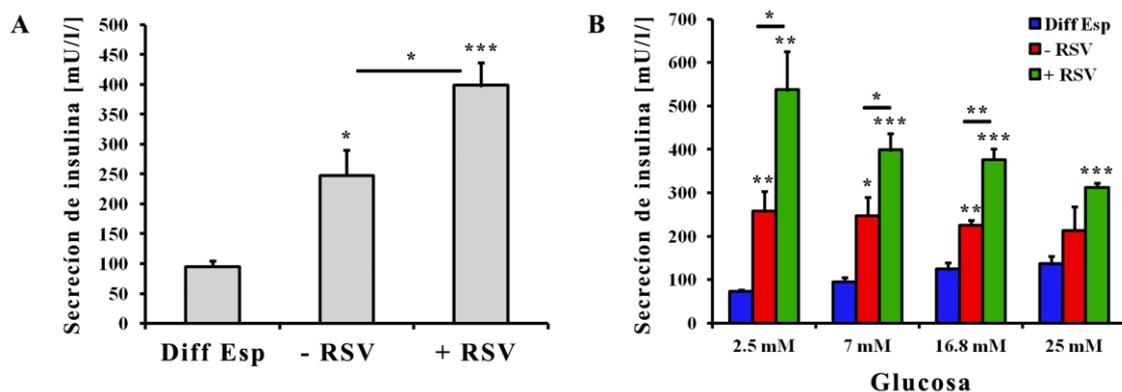


Figura 4.24 Estudios de funcionalidad in vitro. **A:** Cuantificación de la secreción de insulina mediante kit de ELISA en clusters previamente estimulados durante 1 hora con una solución conteniendo glucosa 7 mM. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. (*) $p < 0.05$, (***) $p < 0.001$. **B:** Cuantificación de la secreción de insulina mediante kit de ELISA en clusters previamente estimulados durante 1 hora con una solución conteniendo diferentes concentraciones de glucosa (2.5 mM, 7 mM, 16.8 mM y 25 mM). Los datos representan la media \pm SEM de 3-4 experimentos independientes. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$.

Finalmente se han analizado los niveles de expresión de *PDX1* para ver si la optimización del proceso de diferenciación en las células tratadas con RSV se veía reflejada en un aumento de la transcripción de este gen “master” de las células β . Efectivamente los resultados de q-PCR muestran un incremento en la expresión de *PDX1* de 3 veces comparado con las células sin RSV (*Figura 4.25*).

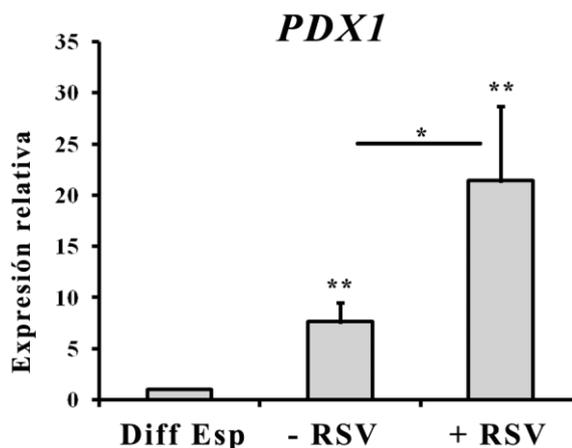


Figura 4.25 Efectos del RSV sobre la expresión de PDX1. Análisis de los niveles de expresión de PDX1 mediante q-PCR en las diferentes condiciones de cultivo. Diff Esp: células diferenciadas espontáneamente; -RSV: células sometidas al protocolo de diferenciación sin RSV; +RSV: células sometidas al protocolo de diferenciación completo (con RSV). Los datos representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$.

4.3.1 Mecanismo de acción del resveratrol

El efecto del RSV observado en células en proceso de diferenciación hacia una célula β va más allá de lo que puede ser el efecto de ese mismo polifenol en las células β maduras (como las INS-1E). En estas últimas se ha observado una mejoría de la secreción de insulina debida a una mayor sensibilidad a la glucosa mientras que en las células derivadas de las CTEh se observa un aumento de la funcionalidad y también una mejoría del proceso de diferenciación y de maduración, obteniéndose un número mayor de células positivas para insulina y un mayor contenido de insulina por células. Estos efectos se deben probablemente al aumento de expresión de *PDX1* observado en las células tratadas con RSV siendo su expresión esencial para conseguir la especialización de los precursores hacia un fenotipo β celular. Específicamente *PDX1* es fundamental para inducir la expresión de marcadores de células β como *GLUT2*, *GK* e *INS* típicos de una célula madura y funcional.

Con el objetivo de elucidar el mecanismo de acción del RSV en nuestras células se estudió el estado de fosforilación de diferentes quinasas involucradas en la activación de *PDX1* cuales las vías de señalización de AMPK y de PI3K/AKT (Figura 4.26).

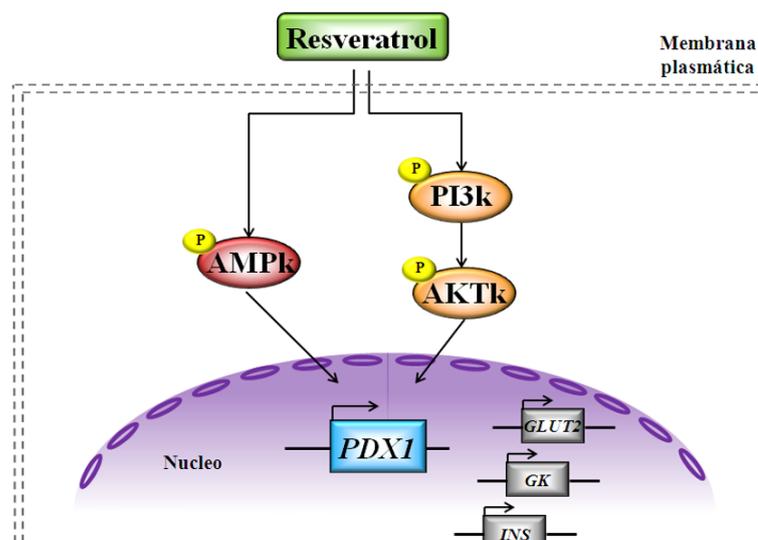


Figura 4.26 Mecanismo de acción propuesto para el RSV. Representación esquemática de las vías de señalización propuestas como dianas del RSV para la inducción de PDX1 y otros genes específico de célula β .

Los resultados de WB indican un aumento de la fosforilación de AMPK y de PI3K/AKT en las células tratadas con RSV en comparación con las células sin tratamiento (-RSV) (Figura 4.27) acompañado de un aumento de la expresión de *PDX1* y sus genes dianas *GLUT2*, *GK* e *INS* (Figura 4.28).

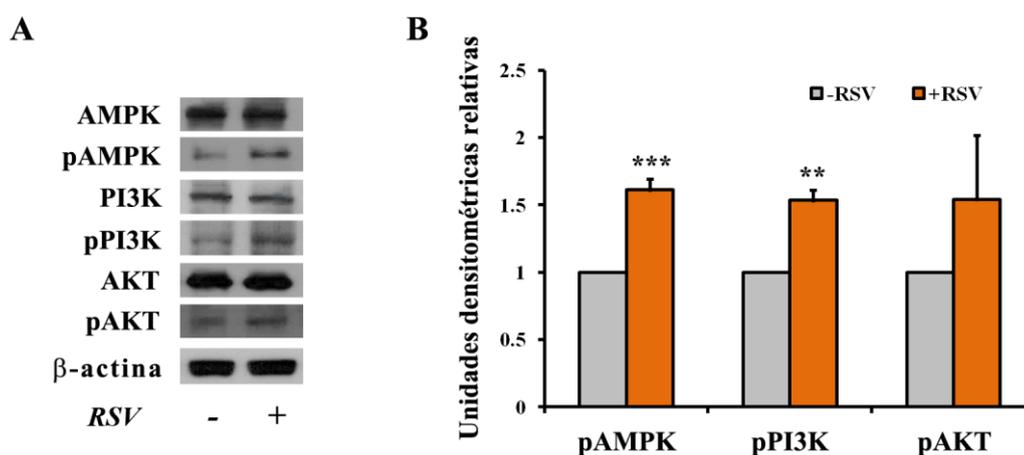


Figura 4.27 Efectos del RSV sobre la activación de las quinasas. **A:** análisis mediante western blot de los niveles de las proteínas fosforiladas y totales en las células β -pancreáticas tratadas y no tratadas con RSV. La β -actina ha sido utilizada como control de carga. **B:** cuantificación densitométrica de las bandas

inmunoreactivas detectadas mediante WB de las diferentes quinasas fosforiladas previamente estudiadas. Los datos representan la media \pm SEM de 3-4 experimentos independientes. (***) $p < 0.001$, (**) $p < 0.01$.

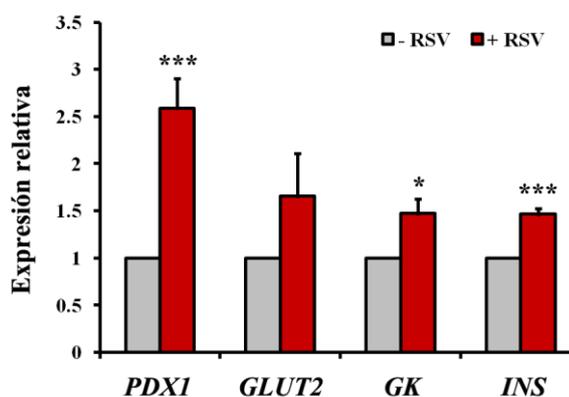


Figura 4.28 Efectos del RSV sobre la expresión de diferentes marcadores de célula β . Análisis de los niveles de expresión de *PDX1*, *GLUT2*, *GK* e *INS* mediante q-PCR en las diferentes condiciones de cultivo. -RSV: células sometidas al protocolo de diferenciación sin RSV; +RSV: células sometidas al protocolo de diferenciación con RSV. Los datos representan la media \pm SEM de 3-5 experimentos independientes. (*) $p < 0.05$, (***) $p < 0.001$.

Finalmente para comprobar que la activación de ambas cascadas de quinasas fuera realmente necesaria para la activación del gen de *PDX1* analizamos los niveles de fosforilación de AMPK, PI3K, AKT y MAPK en concomitancia con el primer pico de expresión de *PDX1* a lo largo del protocolo de diferenciación (día 11) y analizamos el efecto de diferentes inhibidores de la fosforilación de dichas quinasas en la transcripción de *PDX1* (Figura 4.29). Como se puede observar en la Figura 4.29B tanto la inhibición de la cascada PI3K/AKT/MAPK mediante tratamiento con Wortmannina o LY294002 como la inhibición de la AMPK por efecto de la Dorsomorfina se traducen en una dramática reducción de los niveles de expresión de *PDX1*.

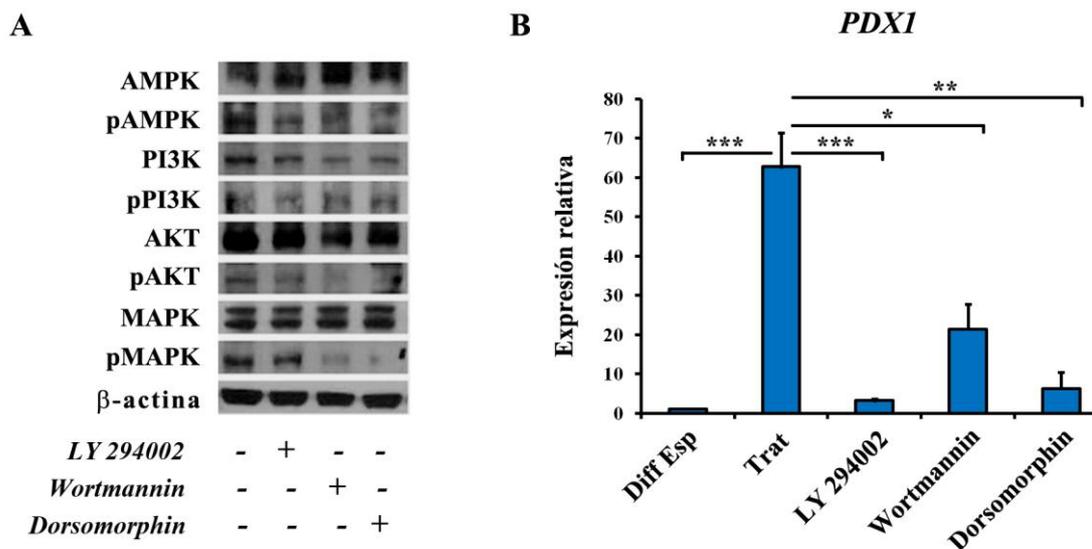


Figura 4.29 Inhibición de las quinasas y su efectos sobre *PDX1*. Estos experimentos han sido llevados a cabo utilizando células recogidas al día 11 del protocolo de diferenciación, en concomitancia con el primer pico de expresión de *PDX1*. **A:** análisis mediante western blot de los niveles de las proteínas fosforiladas y totales en células tratadas con diferentes inhibidores específicos de las quinasas estudiadas. La β -actina ha sido utilizada como control de carga. **B:** Variación en los niveles de expresión de *PDX1* analizados mediante q-PCR en células tratada y no tratadas con diferentes inhibidores. Diff Esp: células sometida a diferenciación espontanea durante 11 días; Trat: células sometidas al protocolo de diferenciación hasta el día 11; células sometidas al protocolo de diferenciación hasta el día 11 y previamente tratadas durante 48 horas con inhibidores específicos: LY294002 (50 μ M), Wortmannin (2 μ M) y Dorsomorphin (10 μ M). Los datos representan la media \pm SEM de 2 experimentos independientes. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$.

De todo lo anterior se demuestra como la activación de ambas cascadas de quinasas por el RSV es responsable de la activación de *PDX1* y por consiguiente induce unos procesos de maduración de las células β -pancreáticas más eficaces.

4.4 Xenotrasplante en ratones diabéticos

Finalmente para comprobar la funcionalidad *in vivo* de las células obtenidas mediante nuestro protocolo de diferenciación llevamos a cabo experimentos de trasplante en ratones diabéticos. El modelo animal elegido fueron machos de 8 semanas NOD/SCID a

los que se le indujo la diabetes mediante inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ). La tinción de ematosilina/eosina y la detección de insulina mediante técnicas de inmunohistoquímica mostradas en la *Figura 4.30* nos permitieron comprobar la efectiva destrucción de los islotes pancreáticos en el páncreas de los ratones tratados con STZ en comparación con los ratones control.

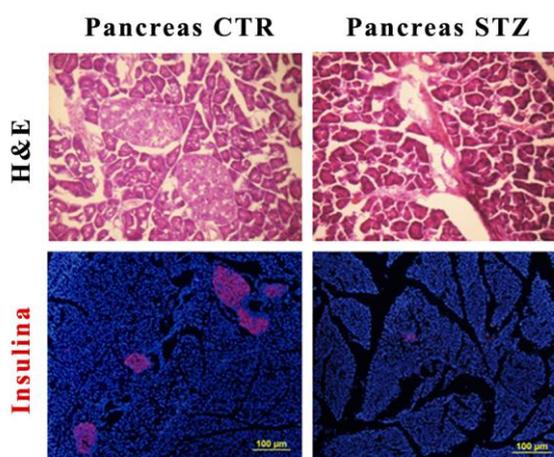


Figura 4.30 Efectos de la STZ en los islotes de Langerhans. Análisis inmunohistoquímica de secciones de páncreas de ratones control (Pancreas CTR) y de ratones inyectados con STZ (Pancreas STZ). En el panel superior se muestra mediante tinción con ematosilina/eosina la completa compromisión de los islotes de Langerhans en los ratones tratados con STZ. En el panel inferior se muestra mediante inmunofluorescencia la pérdida total del marcaje para la insulina (rojo) en los ratones tratados con STZ.

A día 22 del protocolo de diferenciación los animales fueron anestesiados y las células obtenidas (“clusters”) fueron reconstituidas en una pequeña suspensión celular (15-20 µl) para luego ser trasplantadas debajo de la capsula renal. Durante los 8 días siguientes al trasplante los ratones mostraron un estado activo y una constante normoglucemia en contraste con los ratones diabéticos siempre más débiles y hiperglucémicos (*Figura 4.31A*). Este estado de mayor bienestar se ve reflejado unos días más tardes en una mayor capacidad de mantener su peso en comparación a la pérdida de peso constante que caracteriza los ratones diabético que no recibieron el trasplante (*Figura 4.31B*). Sin embargo a la segunda semana después del trasplante los ratones volvieron a un estado hiperglucémico que nos obligó a sacrificar el animal en menos de dos meses desde la cirugía.

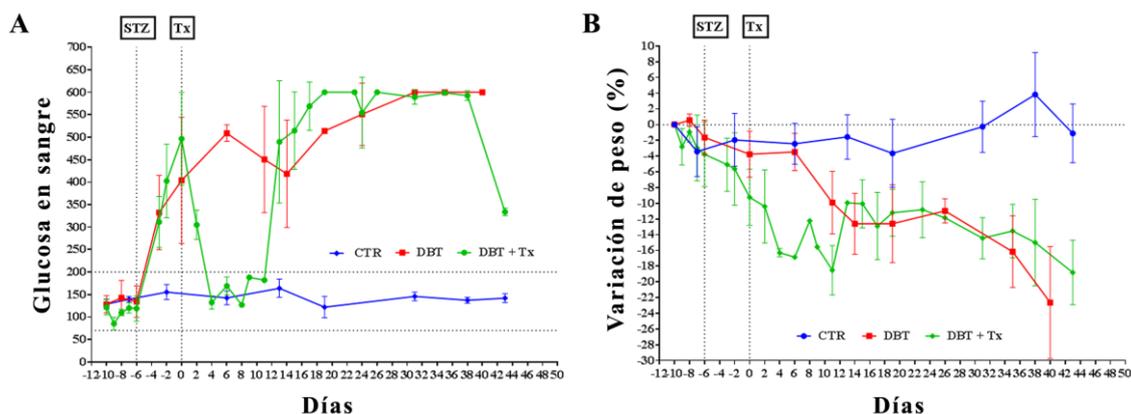


Figura 4.31 *Trasplante de los clusters en ratones diabéticos.* A: Monitoreo de las variaciones de las concentraciones de glucosa en la sangre (A) y de peso (B) en ratones control (línea azul, n=4), ratones inyectados con STZ y por lo tanto diabéticos (línea roja, n=3) y ratones inyectados con STZ y sucesivamente trasplantados con alrededor de 2000 clusters derivados de la diferenciación de las CTEh según la aplicación de nuestro protocolo de diferenciación (línea verde, n=3).

Probablemente, la causa por la cual estos animales vuelven a ser diabético se debe a la inhabilidad de mantener los clusters en el sitio del trasplante como se puede observar en la *Figura 4.32*. La tinción con ematosilina/eosina marca la zona de inyección del trasplante debajo de la capsula renal donde se observan muy pocas células con un fenotipo diferente a las renales. Es todavía posible detectar marcaje de insulina en los cortes de algunos riñones trasplantado aunque las células positivas se ven muy dispersas a lo largo del parénquima renal.

Riñón de ratones trasplantados

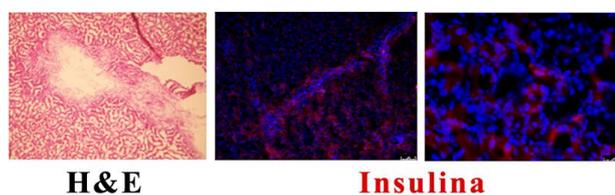


Figura 4.32 *Trasplante de los clusters en ratones diabéticos.* Análisis inmunohistoquímicas de los cortes de riñones derivantes de los ratones trasplantados. La tinción con emtosilina/eosina muestra el sitio del trasplante mientras que las imágenes de inmunofluorescencia muestran un marcaje de insulina (rojo) difundido a través del parénquima renal.

Introducir los clusters derivados de las CTEh en algún apósito o macrocapsula ayudaría probablemente a mantener las células trasplantadas vivas y funcionales durante un periodo mucho más largo. No obstante, en nuestro caso, para poder comprobarlo haría falta optimizar todo el proceso de trasplante y estudiar nuevas técnicas para preservar los “*clusters*” una vez trasplantados.

5. DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado la factibilidad de diferenciar CTEh hacia células productoras de insulina [72, 77, 81, 83, 84, 154, 155]. Sin embargo, hasta la fecha los numerosos protocolos de diferenciación descritos solo han conseguido obtener un porcentaje de células secretoras de insulina bajo y un fenotipo celular generalmente inmaduro. En este trabajo hemos puesto a punto un protocolo de diferenciación más eficiente consiguiendo alrededor de 40% de células productoras de insulina y también demostramos que el RSV es un factor clave para la inducción de un fenotipo celular β -pancreático.

5.1 Efectos del resveratrol en las INS-1E

Estudios previos en diferentes modelos animales de resistencia a la insulina demostraron que el RSV es capaz de mejorar la secreción de esta hormona, aunque el mecanismo exacto de su acción permanece aún poco claro [97, 119, 156]. Elegir la concentración correcta de RSV es un problema crucial para los estudios *in vitro* ya que se ha observado que el RSV tiene un rango de acción bastante amplio (desde μM a mM). Se han utilizado concentraciones muy diferentes del RSV en base a la diana objeto del estudio, por ejemplo concentraciones altas (0.75-1.5 mM) tienen un efecto antimicrobiano [157], concentraciones muy bajas en cambio (0.1-10 μM) son suficientes para inducir un efecto neuroprotector [158] y concentraciones intermedias (5-100 μM) se han descrito efectivas para obtener inhibición de la proliferación con efectos anti cancerígenos [159]. A diferencia de lo descrito por Vetterli y colaboradores [96], en nuestro caso utilizamos una concentración más alta de RSV (75 μM) basándonos en los estudios de secreción de insulina llevados a cabo en la línea celular INS-1E (Figura 4.3). Además observamos que el incremento de la secreción de insulina promovida por el tratamiento con RSV, se correlaciona con un incremento de la entrada

de Ca^{2+} en las células (*Figura 4.4*), demostrando así que el RSV interviene en la regulación de la vía convencional de secreción de la insulina. En este sentido, el grupo de Bordone y colaboradores [142] demostró que la sobreexpresión de SIRT1 provoca la inhibición de *Ucp2*, produciendo por lo tanto un mejor acoplamiento del metabolismo de la glucosa con la secreción de insulina. UCP2 es una proteína de desacoplamiento mitocondrial que fisiológicamente atenúa la secreción de insulina en las células β estimuladas por glucosa [143]. Usando una estrategia experimental similar a la utilizada por Bordone [142], realizamos experimentos de ChIP confirmando así que SIRT1 se une al promotor de *Ucp2* y que el RSV activando SIRT1 favorece esta unión (*Figura 4.5*). Es importante destacar que a través del análisis por q-PCR no fue posible detectar una disminución en los niveles del ARN mensajero de *Ucp2* (*Figura 4.6*), evidencia que, sin embargo, esta apoyada por los resultados de Vetterli y colaboradores [96] que no lograron detectar variaciones en los niveles de transcripción del ARNm de *Ucp2* en células tratadas con RSV. Este efecto podría deberse a la rápida y dinámica regulación del contenido de *Ucp2* tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional [160, 161], un mecanismo que es necesario para que las células β respondan al suministro fluctuante de nutrientes. A raíz de toda la información disponible en la literatura y de los resultados que hemos obtenidos con las células INS-1E, nos preguntamos si RSV podría producir efectos similares en las células diferenciadas a partir de las CTEh, con el objetivo de usar este potente polifenol como nueva estrategia para incrementar la cantidad de insulina producida por las células β -pancreáticas derivada *in vitro*. Para este propósito, nuestro primer objetivo fue la puesta a punto de un protocolo de diferenciación pancreática eficiente y reproducible.

5.2 Diferenciación de las células troncales embrionarias humanas hacia endodermo definitivo

El primer paso para dirigir las CTEh hacia un linaje pancreático consiste en la generación eficiente de endodermo definitivo (ED). Gracias a los estudios del desarrollo embrionario se ha observado que la expresión de Brachyury, mediada por la vía de señalización Wnt, es importante para la migración de las células precursoras a través de

la región anterior de la línea primitiva (“*primitive streak*”) y la formación de una población mesendodérmica desde la cual ambos linajes, endodérmico y mesodérmico, aparecerán dependiendo de la magnitud y duración de la señalización mediada por Nodal [87, 162, 163]. Por lo tanto en nuestro protocolo de diferenciación (*Figura 4.7*), así como en el protocolo de D’Amour [74], el endodermo definitivo fue generado tratando las células con Wnt3a, necesario para la inducción temporánea de Brachyury (*Figura 4.9*) y con Activina A, necesaria para la activación de Nodal, utilizando un medio de cultivo a baja concentración de suero (0-0.2%) para así evitar la activación de la PI3K. Utilizando este protocolo la formación del endodermo definitivo es bastante eficiente como lo demuestra la expresión de los marcadores específicos *SOX17* y *FOXA2* (*Figura 4.8* y *4.10*).

5.3 Diferenciación de las células troncales embrionarias humanas hacia células β -pancreáticas

En base a los resultados obtenidos reproduciendo el protocolo de diferenciación hacia endodermo definitivo diseñado por D’Amour, nuestro primer intento para la obtención de células β -pancreáticas ha sido basado en la reproducción de protocolos de diferenciación ya publicados. En particular reproducimos el protocolo de Kroon y colaboradores [85] (Anexo 1) para la obtención de precursores endócrinos y lo combinamos con la última etapa del protocolo de diferenciación utilizado por Shim y colaboradores [154] (Anexo 1) para la formación de “*clusters*” parecidos a los islotes pancreáticos mediante cultivo en suspensión. Debido a la elevada muerte celular observada sobre todo en los primeros días del cultivo en suspensión decidimos suplementar el medio de cultivo durante esa etapa del protocolo con concentraciones decrecientes de bFGF. No obstante, el protocolo final (*Figura 4.11*) resultó ser inefectivo ya que tanto de un punto de vista morfológico (*Figura 4.12*) como de caracterización (*Figura 4.13*) una tendencia de diferenciación hacia un fenotipo neuronal más que pancreático ha sido la más predominante. Estos resultados negativos nos llevaron a replantearnos el tipo de estrategia a aplicar para conseguir nuestro objetivo y decidimos así diseñar nuestro propio protocolo en lugar de reproducir y

modificar los que ya estaban publicados. Como muchos otros autores, para ello nos basamos sobre la bibliografía hasta ahora publicada sobre la organogénesis pancreática con el objetivo de poner a punto un protocolo de diferenciación de múltiples etapas capaz de reproducir las diferentes fases que llevan a la formación de las células β durante el desarrollo embrionario. Manteniendo la primera parte del protocolo de diferenciación hacia endodermo definitivo invariada, el siguiente paso consistió en promover la formación del “foregut”. Durante el desarrollo el modelamiento del “foregut” es el resultado de una compleja interacción entre el mesodermo y el endodermo llevada a cabo mediante gradientes de FGFs, BMPs, RA y SHH [79]. En particular se ha demostrado que el bFGF induce la especificación del endodermo definitivo derivado de las CTEh hacia diferentes derivados del “foregut” en una manera dependiente de dosis; por ejemplo se ha encontrado que bajas dosis de bFGF específicamente favorecen la diferenciación hepática, mientras que niveles intermedios de bFGF inducen un destino pancreático y altas concentraciones de bFGF inducen diferenciación hacia precursores del intestino delgado [80]. Por otro lado los retinoides son conocidos reguladores morfogenéticos e inductores de la diferenciación y su papel en la inducción del endodermo definitivo hacia endodermo pancreático está ampliamente descrito, por esto muchos investigadores incluyen el RA en sus protocolos de diferenciación hacia un linaje pancreático [77, 81-84]. Nuestros resultados de q-PCR confirmaron que el tratamiento de las CTEh con una combinación de bFGF y RA es esencial para inducir un incremento en la expresión de *PDX1* (Figura 4.15). Sin embargo este tratamiento también induce otros derivados endodérmicos del “foregut” como se puede observar por el pico de expresión de los genes *HNFs* entre los días 8 y 11 (Figura 4.15). Durante el desarrollo temprano, SHH es altamente expresado en las regiones endodérmicas de las cuales derivarán el estómago y el duodeno, pero no en el endodermo pancreático. En consecuencia, se ha demostrado que una inhibición específica de la vía de señalización del SHH promueve la diferenciación pancreática *in vitro* bloqueando la formación del estómago y del endodermo duodenal [86]. De la misma forma en que la inhibición de SHH evita la especificación hacia el estómago y el duodeno, la inhibición de la vía de señalización de las BMPs mediante administración de Noggin se ha demostrado efectiva para bloquear la diferenciación hepática [87]. Basándonos en estas evidencias incluimos a nuestro protocolo de diferenciación la

adición secuencial de Noggin y Ciclopamina con el objetivo de promover la especificación del endodermo pancreático a expensas de otros linajes endodérmicos derivantes del “foregut”. Nuestros resultados de q-PCR demuestran que esta combinación de factores favorece una especialización celular pancreática bastante efectiva como se puede observar por la drástica disminución en la expresión de los genes *HNFs* y el notable incremento de los marcadores de precursores pancreáticos *NGN3* y *NKX2.2* en el día 14 (Figura 4.15). Una vez obtenido el endodermo pancreático hay que promover la diferenciación endócrina, para ello los estudios del desarrollo embrionario apuntan a que la modulación de Notch puede tener un papel importante en la elección entre el linaje exócrino, endócrino o ductal [20]. Sin embargo, estudios de diferenciación *in vitro* de las CTEh hacia precursores endocrinos utilizando un inhibidor de γ -secretasa (DAPT) para la inhibición de Notch sólo tiene un ligero impacto en promover el compromiso endocrino [81, 92]. Probablemente esto se deba a la utilización de un inhibidor menos específico ya que la adición de otro inhibidor de Notch como el GsiXX, ha demostrado ser más eficaz en el establecimiento del linaje endocrino a expensas del exócrino [155]. En nuestro caso para promover la diferenciación endócrina decidimos favorecer la agregación de las células en estructuras tridimensionales similares a los islotes pancreáticos mediante el paso desde un cultivo celular en adherencia a un cultivo celular en suspensión como se ha descrito previamente por Shim y colaboradores [154]. La última etapa de nuestro protocolo de diferenciación consiste en dirigir la maduración de los precursores endocrinos derivados de las CTEh hacia células especializadas y funcionales secretoras de insulina. D’Amour y colaboradores [81] probaron una mezcla de diferentes “factores de maduración” tales como el IGF1, la Exendina-4, el HGF y el suplemento de B27 durante los últimos días de diferenciación, pero no consiguieron mejorar el proceso de maduración. Por otro lado, Cho y colaboradores [92] demostraron que la adición de Betacelulina y Nicotinamida al protocolo propuesto por D’Amour resultó en una expresión sostenida de *PDX1* y una subsecuente producción de insulina. Sin embargo hasta el momento, las células productoras de insulina, obtenidas por los numerosos protocolos de diferenciación publicados, son comúnmente inmaduras y por lo tanto incapaces de responder correctamente a la glucosa [66]. Como consecuencia, un gran número de investigadores ha omitido la última etapa del proceso de diferenciación celular para

trasplantar en ratones diabéticos los progenitores pancreáticos obtenidos *in vitro* y así permitir que las células se especialicen en células β funcionales mediante maduración *in vivo* [85, 90, 93, 94]. En nuestro caso las células fueron cultivadas en suspensión durante 6-8 días con un medio de cultivo suplementado con Fibronectina e ITS. La caracterización de las células derivadas mediante la aplicación de nuestro protocolo de diferenciación resultó en la obtención de "clusters" capaces de expresar diferentes marcadores típicos de islotes de Langerhans maduros. El análisis por RT-PCR pudo confirmar la expresión de algunas hormonas endocrinas como la insulina, glucagón y somatostatina y, también, la expresión de la mayoría de los marcadores típicos de una célula β madura como *GLUT2*, *GK*, *KIR6.2*, *PC1/3*, *PC2* e *INS* (Figura 4.18). Resultados similares fueron obtenidos cuando el protocolo de diferenciación fue aplicado a otro tipo de células troncales, la línea celular de hiPS MSUH001, lo cual corrobora la efectividad y reproducibilidad de nuestro protocolo de diferenciación optimizado aunque la eficiencia ha sido baja en estas células (Figura 4.17).

5.4 Efectos del resveratrol en la maduración celular

Una vez optimizado el protocolo de diferenciación quisimos comprobar los efectos del RSV sobre nuestras células productoras de insulina para demostrar que al igual que en las células INS-1E, el RSV podía incrementar el contenido celular y la secreción de insulina. Sorprendentemente la aplicación del RSV a los precursores β -pancreáticos derivados de las CTEh se reveló aún más efectiva. Durante el proceso de diferenciación de estas células, el RSV no sólo incrementó la cantidad de insulina secretada, sino también fue capaz de mejorar el proceso de maduración. En particular obtuvimos un porcentaje más alto de células positivas para la insulina (alrededor del 40%) (Figura 4.22) en comparación con la baja eficiencia conseguida por los protocolos publicados anteriormente (desde 6% hasta 25% de células positivas para insulina) [77, 81, 164]. También observamos un aumento en el contenido (Figura 4.23) y en la secreción de insulina (Figura 4.24) en las células tratadas con RSV en comparación con las células no tratadas (-RSV). No obstante, los ensayos de ELISA para el estudio de la funcionalidad *in vitro* indicaron que la vía de la secreción de la insulina dependiente de

glucosa (GSIS) en estas células no está finamente regulada, ya que las células no fueron capaces de responder correctamente a las variaciones en la concentración de glucosa (*Figura 4.24B*). Esto es un problema común en las células β -pancreáticas derivadas de las CTEh y está probablemente vinculado a un proceso de maduración no finalizado o alcanzado (carencia de algunos efectores clave en el GSIS) o a una insensibilidad provocada por la adaptación de estas células a la alta concentración de glucosa presente en el medio de cultivo usado durante los protocolos de diferenciación [164-167]. En nuestro caso la ausencia de detección de *SURI* (*Figura 4.18*) podría ser responsable de la alteración de la sensibilidad a la glucosa como también el uso de un medio de cultivo con alta glucosa durante la última etapa del protocolo de diferenciación. Sin embargo, las células son capaces de completar el proceso de maduración y ser perfectamente funcionales cuando son transplantadas en ratones diabéticos, como se puede observar en nuestros experimentos *in vivo* (*Figura 4.31*). La rápida reversión de la hiperglicemia observada en los ratones transplantados confirma el avanzado grado de especialización de nuestras células hacia un fenotipo celular casi maduro y funcional. No obstante no ha sido posible mantener el estado de normoglucemia por mucho tiempo probablemente debido a la muerte y/o a la dispersión de los “clusters” en el parénquima renal (*Figura 4.32*). Probablemente el uso de sistemas de encapsulación de los clusters o su inclusión en matrices extracelulares podrían preservar la sobrevivencia de las células trasplantadas y asegurar la perduración de la normoglucemia [168].

5.5 Mecanismo de acción del resveratrol

Los efectos benéficos del RSV sobre la diferenciación de las células β -pancreáticas derivadas de las CTEh están probablemente mediados por el incremento en la expresión de *PDX1* (*Figura 4.25*). El aumento en la expresión de *PDX1* tras el tratamiento con RSV ha sido previamente observado tanto en las células INS-1E como en primates no-humanos e islotes humanos [96, 102]. Además mediante la inducción de *PDX1* y otros marcadores de células β , el RSV tiene diferentes efectos en diferentes tipos celulares, a modo de ejemplo, el RSV favorece el mantenimiento de la masa de células β existentes previniendo su dediferenciación [102], puede inducir la expresión de una combinación

de marcadores de células β en células no β tales como las células α [146], o como en nuestro caso, fomentar la obtención de precursores β -pancreáticos.

Por otro lado, el mecanismo por el cual el RSV provoca un incremento en la expresión de *PDX1* permanece desconocido. Nuestra hipótesis se basa en la activación, mediada por RSV, de las vías de señalización aguas arriba del control de la expresión de *PDX1*. En particular estudiamos las cascadas de quinasas pertenecientes a la vía de señalización PI3K/AKT que regulan *PDX1* y que están involucradas en su activación transcripcional [169, 170] y la vía de señalización mediada por AMPK [171]. Ambas vías están incluidas entre las muchas dianas del RSV ya que tanto la activación de PI3K como la de la AMPK por parte del polifenol han sido ampliamente descritas [96, 136, 138, 172-174]. A raíz de estas observaciones decidimos estudiar el estado de fosforilación tanto de PI3K/AKT como de AMPK en las células secretoras de insulina derivadas de las CTEh, y observamos un incremento en la fosforilación de estas quinasas en las células tratadas con RSV (*Figura 4.28*) lo cual, en el caso de la AMPK, también está apoyado por los resultados previos publicados por Vetterli y colaboradores [96]. Por lo tanto proponemos que la activación de ambas vías, AMPK y PI3K puede ser el mecanismo principal por el cual el RSV incrementa la expresión de *PDX1*, lo cual es un requisito necesario para inducir la expresión de genes pancreáticos involucrados en la correcta funcionalidad de una célula β madura. De esta manera, demostramos en la presente tesis que el efecto de este polifenol no está solo restringido a la mejora en la secreción de insulina en células β ya diferenciadas, sino que también tiene un efecto en la inducción de la maduración de los precursores β -pancreáticos vía activación del gen *PDX1*.

6. CONCLUSIONES

De los resultados de la presente investigación se desprenden una serie de conclusiones relevantes que se enumeran a continuación:

1. El tratamiento con RSV de línea celular INS-1E, consideradas células β maduras, está asociado a un incremento en la secreción de la insulina y un aumento de la entrada de calcio intracelular a de forma dosis dependiente al polifenol utilizada
2. El mecanismo de acción a través del cual el RSV induce un aumento en la secreción de insulina en las células INS-1E está relacionado con la modulación de la vía SIRT1/*Ucp2*. Es decir, la activación de SIRT1 por el RSV se traduce en una mayor unión de la deacetilasa SIRT1 al promotor de *Ucp2* provocando así una inhibición de su transcripción y una relación más eficiente entre el metabolismo de la glucosa y la secreción de insulina
3. Se logro reproducir con éxito la aplicación del protocolo de diferenciación hacia endodermo definitivo descrito por D'Amour, para diferenciar las células troncales embrionarias humanas HS181 hacia el linaje endodérmico
4. El protocolo de diferenciación de multiples etapa descrito en este trabajo de tesis se ha demostrado ser efectivo para la inducción de la diferenciación de las HS181 hacia un fenotipo β -pancreático
5. El estudio de la expresión de los factores de transcripción aquí reportado permite una mejor apreciación de los diferentes y secuenciales estadios del desarrollo pancreático reproducidos con éxito a lo largo de nuestro protocolo de diferenciación

6. Nuestro protocolo de diferenciación resultó eficaz para la diferenciación de la línea celular pluripotente inducida MSUH001, por lo que la detección de los marcadores típicos de una célula β como *PDX1*, *NKX2.2*, *GLUT2*, *GK*, *PC1/3*, *PC2* e *INS* corrobora la efectividad y reproducibilidad de nuestro protocolo de diferenciación optimizado
7. La adición del RSV en los últimos 2 días del protocolo de diferenciación permitió mejorar el proceso de maduración de las células, observándose: un fenotipo más maduro con una perfecta co-expresión de insulina y péptido C; un porcentaje más alto de células positivas para la insulina; un mayor contenido de insulina por célula; una aumentada secreción de insulina en respuesta a la glucosa y un incremento en la expresión de *PDX1*
8. Las vías de señalización mediadas por la activación de PI3K/AKT y AMPK están involucradas en la activación transcripcional de *PDX1*
9. El RSV es capaz de inducir la fosforilación de las quinasas PI3K/AKT y AMPK y consecuentemente activar el *PDX1*
10. Las células β -pancreáticas obtenidas mediante la aplicación del protocolo de diferenciación descrito en esta tesis son capaces de revertir temporalmente la diabetes inducida por estreptozotocinas en ratones NOS/SCID

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Soria, B., et al., *Generation of pancreatic islets from stem cells*, in *Principles of Tissue Engineering*, R. Lanza, R. Langer, and J. Vacanti, Editors. 2014, Elsevier. p. 837-847.
2. Soriguer, F., et al., *Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study*. *Diabetologia*, 2012. **55**(1): p. 88-93.
3. *Standards of medical care in diabetes--2014*. *Diabetes Care*, 2014. **37 Suppl 1**: p. S14-80.
4. Guariguata, L., et al., *Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014. **103**(2): p. 137-49.
5. Cabrera, O., et al., *The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(7): p. 2334-9.
6. Brissova, M., et al., *Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy*. *J Histochem Cytochem*, 2005. **53**(9): p. 1087-97.
7. Soria, B., et al., *Engineering pancreatic islets*. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 2000. **440**(1): p. 1-18.
8. Stephen A. Brunton, A.S.R., Allen King, Michael K. Heile, Timothy S. Reid, *Integrating Advances in Insulin into Clinical Practice*. *The Journal of family practice*, 2013. **62**(9): p. 1-29.
9. Israni, A.K., et al., *OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report: pancreas*. *Am J Transplant*, 2014. **14 Suppl 1**: p. 45-68.
10. Gruessner, R.W. and A.C. Gruessner, *The current state of pancreas transplantation*. *Nat Rev Endocrinol*, 2013. **9**(9): p. 555-62.
11. Bruni, A., et al., *Islet cell transplantation for the treatment of type 1 diabetes: recent advances and future challenges*. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2014. **7**: p. 211-23.
12. Yuasa, Y., *Control of gut differentiation and intestinal-type gastric carcinogenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(8): p. 592-600.
13. Pan, F.C. and C. Wright, *Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland*. *Dev Dyn*, 2011. **240**(3): p. 530-65.
14. Hebrok, M., S.K. Kim, and D.A. Melton, *Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development*. *Genes Dev*, 1998. **12**(11): p. 1705-1713.
15. Soria, B., *In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells*. *Differentiation*, 2001. **68**(4-5): p. 205-19.
16. Hebrok, M., *Hedgehog signaling in pancreas development*. *Mech Dev*, 2003. **120**(1): p. 45-57.
17. Martin, M., et al., *Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient Raldh2 mutant mice*. *Dev Biol*, 2005. **284**(2): p. 399-411.
18. McCracken, K.W. and J.M. Wells, *Molecular pathways controlling pancreas induction*. *Semin Cell Dev Biol*, 2012. **23**(6): p. 656-62.

19. Schaffer, A.E., et al., *Nkx6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors*. *Dev Cell*, 2010. **18**(6): p. 1022-9.
20. Carolan, P.J. and D.A. Melton, *New findings in pancreatic and intestinal endocrine development to advance regenerative medicine*. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2013. **20**(1): p. 1-7.
21. Shih, H.P., et al., *A Notch-dependent molecular circuitry initiates pancreatic endocrine and ductal cell differentiation*. *Development*, 2012. **139**(14): p. 2488-99.
22. Desgraz, R. and P.L. Herrera, *Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors*. *Development*, 2009. **136**(21): p. 3567-74.
23. Johansson, K.A., et al., *Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types*. *Dev Cell*, 2007. **12**(3): p. 457-65.
24. Mastracci, T.L., et al., *Nkx2.2 and Arx genetically interact to regulate pancreatic endocrine cell development and endocrine hormone expression*. *Dev Biol*, 2011. **359**(1): p. 1-11.
25. Collombat, P., et al., *Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development*. *Genes Dev*, 2003. **17**(20): p. 2591-603.
26. Cano, D.A., et al., *Transcriptional control of mammalian pancreas organogenesis*. *Cell Mol Life Sci*, 2014. **71**(13): p. 2383-402.
27. Jeon, J., et al., *Endocrine cell clustering during human pancreas development*. *J Histochem Cytochem*, 2009. **57**(9): p. 811-24.
28. Stanger, B.Z. and M. Hebrok, *Control of cell identity in pancreas development and regeneration*. *Gastroenterology*, 2013. **144**(6): p. 1170-9.
29. Sarkar, S.A., et al., *Global gene expression profiling and histochemical analysis of the developing human fetal pancreas*. *Diabetologia*, 2008. **51**(2): p. 285-97.
30. Jennings, R.E., et al., *Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment*. *Diabetes*, 2013. **62**(10): p. 3514-22.
31. Dorrell, C., et al., *Transcriptomes of the major human pancreatic cell types*. *Diabetologia*, 2011. **54**(11): p. 2832-44.
32. Shih, H.P., A. Wang, and M. Sander, *Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2013. **29**: p. 81-105.
33. Hipp, J. and A. Atala, *Sources of stem cells for regenerative medicine*. *Stem Cell Rev*, 2008. **4**(1): p. 3-11.
34. Kolios, G. and Y. Moodley, *Introduction to stem cells and regenerative medicine*. *Respiration*, 2013. **85**(1): p. 3-10.
35. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. *Nature*, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
36. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. *Science*, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
37. Labosky, P.A., D.P. Barlow, and B.L. Hogan, *Embryonic germ cell lines and their derivation from mouse primordial germ cells*. *Ciba Found Symp*, 1994. **182**: p. 157-68; discussion 168-78.
38. Przyborski, S.A., *Isolation of human embryonal carcinoma stem cells by immunomagnetic sorting*. *Stem Cells*, 2001. **19**(6): p. 500-4.

39. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
40. Donovan, P.J. and J. Gearhart, *The end of the beginning for pluripotent stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 92-7.
41. Koestenbauer, S., et al., *Embryonic stem cells: similarities and differences between human and murine embryonic stem cells*. Am J Reprod Immunol, 2006. **55**(3): p. 169-80.
42. Gurdon, J.B., *Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells*. Dev Biol, 1962. **4**: p. 256-73.
43. Schneuwly, S., R. Klemenz, and W.J. Gehring, *Redesigning the body plan of Drosophila by ectopic expression of the homoeotic gene Antennapedia*. Nature, 1987. **325**(6107): p. 816-8.
44. Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka, *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 313-7.
45. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
46. Yamanaka, S., *Induced pluripotent stem cells: past, present, and future*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(6): p. 678-84.
47. Brennand, K.J., et al., *Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells*. Nature, 2011. **473**(7346): p. 221-5.
48. Israel, M.A., et al., *Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells*. Nature, 2012. **482**(7384): p. 216-20.
49. Tanaka, T., et al., *Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery*. Blood, 2012. **120**(6): p. 1299-308.
50. Fujikura, J., et al., *Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation*. Diabetologia, 2012. **55**(6): p. 1689-98.
51. Nori, S., et al., *Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(40): p. 16825-30.
52. Kobayashi, Y., et al., *Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52787.
53. Cyranoski, D., *Stem cells cruise to clinic*. Nature, 2013. **494**(7438): p. 413.
54. Politis, M. and O. Lindvall, *Clinical application of stem cell therapy in Parkinson's disease*. BMC Med, 2012. **10**: p. 1.
55. Gore, A., et al., *Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells*. Nature, 2011. **471**(7336): p. 63-7.
56. Hussein, S.M., et al., *Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency*. Nature, 2011. **471**(7336): p. 58-62.
57. Boulting, G.L., et al., *A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(3): p. 279-86.
58. Qian, L., et al., *In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes*. Nature, 2012. **485**(7400): p. 593-8.

59. Hovatta, O., et al., *A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells*. Hum Reprod, 2003. **18**(7): p. 1404-9.
60. Abdel-Salam, O.M., *Stem cell therapy for Alzheimer's disease*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2011. **10**(4): p. 459-85.
61. Rosser, A. and C.N. Svendsen, *Stem cells for cell replacement therapy: A therapeutic strategy for HD? Mov Disord*, 2014. **29**(11): p. 1446-54.
62. Goldschlager, T., et al., *Current and future applications for stem cell therapies in spine surgery*. Curr Stem Cell Res Ther, 2013. **8**(5): p. 381-93.
63. Ye, Z., et al., *Myocardial regeneration: Roles of stem cells and hydrogels*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(8): p. 688-97.
64. Matar, A.A. and J.J. Chong, *Stem cell therapy for cardiac dysfunction*. Springerplus, 2014. **3**: p. 440.
65. Budniatzky, I. and L. Gepstein, *Concise review: reprogramming strategies for cardiovascular regenerative medicine: from induced pluripotent stem cells to direct reprogramming*. Stem Cells Transl Med, 2014. **3**(4): p. 448-57.
66. Schiesser, J.V. and J.M. Wells, *Generation of beta cells from human pluripotent stem cells: are we there yet? Ann N Y Acad Sci*, 2014. **1311**: p. 124-37.
67. Abdelalim, E.M., et al., *Pluripotent stem cells as a potential tool for disease modelling and cell therapy in diabetes*. Stem Cell Rev, 2014. **10**(3): p. 327-37.
68. Soria, B., et al., *Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice*. Diabetes, 2000. **49**(2): p. 157-62.
69. Leon-Quinto, T., et al., *In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells*. Diabetologia, 2004. **47**(8): p. 1442-51.
70. Hansson, M., et al., *Artifactual insulin release from differentiated embryonic stem cells*. Diabetes, 2004. **53**(10): p. 2603-9.
71. Rajagopal, J., et al., *Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake*. Science, 2003. **299**(5605): p. 363.
72. Segev, H., et al., *Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters*. Stem Cells, 2004. **22**(3): p. 265-74.
73. Sipione, S., et al., *Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells*. Diabetologia, 2004. **47**(3): p. 499-508.
74. D'Amour, K.A., et al., *Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(12): p. 1534-41.
75. Hori, Y., et al., *Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16105-10.
76. McLean, A.B., et al., *Activin a efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed*. Stem Cells, 2007. **25**(1): p. 29-38.
77. Zhang, D., et al., *Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells*. Cell Res, 2009. **19**(4): p. 429-38.
78. Borowiak, M., et al., *Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(4): p. 348-58.

79. Johannesson, M., et al., *FGF4 and retinoic acid direct differentiation of hESCs into PDX1-expressing foregut endoderm in a time- and concentration-dependent manner*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4794.
80. Ameri, J., et al., *FGF2 specifies hESC-derived definitive endoderm into foregut/midgut cell lineages in a concentration-dependent manner*. Stem Cells, 2010. **28**(1): p. 45-56.
81. D'Amour, K.A., et al., *Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(11): p. 1392-401.
82. Shi, Y., et al., *Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid*. Stem Cells, 2005. **23**(5): p. 656-62.
83. Jiang, J., et al., *Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2007. **25**(8): p. 1940-53.
84. Jiang, W., et al., *In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells*. Cell Res, 2007. **17**(4): p. 333-44.
85. Kroon, E., et al., *Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(4): p. 443-52.
86. Kim, S.K. and D.A. Melton, *Pancreas development is promoted by cyclopamine, a hedgehog signaling inhibitor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13036-41.
87. Sulzbacher, S., et al., *Activin A-induced differentiation of embryonic stem cells into endoderm and pancreatic progenitors-the influence of differentiation factors and culture conditions*. Stem Cell Rev, 2009. **5**(2): p. 159-73.
88. Kelly, O.G., et al., *Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(8): p. 750-6.
89. Nostro, M.C., et al., *Stage-specific signaling through TGFbeta family members and WNT regulates patterning and pancreatic specification of human pluripotent stem cells*. Development, 2011. **138**(5): p. 861-71.
90. Schulz, T.C., et al., *A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37004.
91. Phillips, B.W., et al., *Directed differentiation of human embryonic stem cells into the pancreatic endocrine lineage*. Stem Cells Dev, 2007. **16**(4): p. 561-78.
92. Cho, Y.M., et al., *Betacellulin and nicotinamide sustain PDX1 expression and induce pancreatic beta-cell differentiation in human embryonic stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **366**(1): p. 129-34.
93. Rezaia, A., et al., *Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice*. Diabetes, 2012. **61**(8): p. 2016-29.
94. Rezaia, A., et al., *Enrichment of human embryonic stem cell-derived NKX6.1-expressing pancreatic progenitor cells accelerates the maturation of insulin-secreting cells in vivo*. Stem Cells, 2013. **31**(11): p. 2432-42.

95. Zhang, Y., et al., *Insulin secretion and cyclooxygenase enzyme inhibition by cabernet sauvignon grape skin compounds*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(2): p. 228-33.
96. Vetterli, L., et al., *Resveratrol potentiates glucose-stimulated insulin secretion in INS-1E beta-cells and human islets through a SIRT1-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2011. **286**(8): p. 6049-60.
97. Chen, W.P., et al., *Resveratrol enhances insulin secretion by blocking K(ATP) and K(V) channels of beta cells*. Eur J Pharmacol, 2007. **568**(1-3): p. 269-77.
98. Borriello, A., et al., *Dietary polyphenols: focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2010. **20**(8): p. 618-25.
99. Szkudelska, K. and T. Szkudelski, *Resveratrol, obesity and diabetes*. Eur J Pharmacol, 2010. **635**(1-3): p. 1-8.
100. Szkudelski, T. and K. Szkudelska, *Anti-diabetic effects of resveratrol*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1215**: p. 34-9.
101. Moynihan, K.A., et al., *Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice*. Cell Metab, 2005. **2**(2): p. 105-17.
102. Fiori, J.L., et al., *Resveratrol prevents beta-cell dedifferentiation in nonhuman primates given a high-fat/high-sugar diet*. Diabetes, 2013. **62**(10): p. 3500-13.
103. Brasnyo, P., et al., *Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients*. Br J Nutr, 2011. **106**(3): p. 383-9.
104. Crandall, J.P., et al., *Pilot study of resveratrol in older adults with impaired glucose tolerance*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2012. **67**(12): p. 1307-12.
105. Bashmakov, Y.K., et al., *Resveratrol promotes foot ulcer size reduction in type 2 diabetes patients*. ISRN Endocrinol, 2014. **2014**: p. 816307.
106. Paul, B., et al., *Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakhasava, an ayurvedic medicine from India*. J Ethnopharmacol, 1999. **68**(1-3): p. 71-6.
107. Baur, J.A. and D.A. Sinclair, *Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(6): p. 493-506.
108. Stervbo, U., O. Vang, and C. Bonnesen, *A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine*. Food Chemistry, 2007. **101**(2): p. 449-457.
109. Kopp, P., *Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'?* Eur J Endocrinol, 1998. **138**(6): p. 619-20.
110. Jang, M., et al., *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes*. Science, 1997. **275**(5297): p. 218-20.
111. Brown, V.A., et al., *Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis*. Cancer Res, 2010. **70**(22): p. 9003-11.
112. Howitz, K.T., et al., *Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan*. Nature, 2003. **425**(6954): p. 191-6.
113. Milne, J.C., et al., *Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes*. Nature, 2007. **450**(7170): p. 712-6.

114. Smith, J.S., et al., *A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6658-63.
115. Landry, J., et al., *The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5807-11.
116. Cohen, H.Y., et al., *Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase*. Science, 2004. **305**(5682): p. 390-2.
117. Bordone, L. and L. Guarente, *Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(4): p. 298-305.
118. Bordone, L., et al., *SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction*. Aging Cell, 2007. **6**(6): p. 759-67.
119. Lavu, S., et al., *Sirtuins--novel therapeutic targets to treat age-associated diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(10): p. 841-53.
120. Baur, J.A., et al., *Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet*. Nature, 2006. **444**(7117): p. 337-42.
121. Wood, J.G., et al., *Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans*. Nature, 2004. **430**(7000): p. 686-9.
122. Agarwal, B. and J.A. Baur, *Resveratrol and life extension*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1215**: p. 138-43.
123. Timmers, S., M.K. Hesselink, and P. Schrauwen, *Therapeutic potential of resveratrol in obesity and type 2 diabetes: new avenues for health benefits?* Ann N Y Acad Sci, 2013. **1290**: p. 83-9.
124. Ghanim, H., et al., *An antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of Polygonum cuspidatum containing resveratrol*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(9): p. E1-8.
125. Kim, K.O., et al., *Immunomodulatory effects of high-protein diet with resveratrol supplementation on radiation-induced acute-phase inflammation in rats*. J Med Food, 2014. **17**(9): p. 963-71.
126. Olholm, J., et al., *Anti-inflammatory effect of resveratrol on adipokine expression and secretion in human adipose tissue explants*. Int J Obes (Lond), 2010. **34**(10): p. 1546-53.
127. Porquet, D., et al., *Neuroprotective Role of Trans-Resveratrol in a Murine Model of Familial Alzheimer's Disease*. J Alzheimers Dis, 2014.
128. Marambaud, P., H. Zhao, and P. Davies, *Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 37377-82.
129. Lagouge, M., et al., *Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha*. Cell, 2006. **127**(6): p. 1109-22.
130. Rivera, L., et al., *Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(6): p. 1053-63.
131. Magyar, K., et al., *Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease*. Clin Hemorheol Microcirc, 2012. **50**(3): p. 179-87.

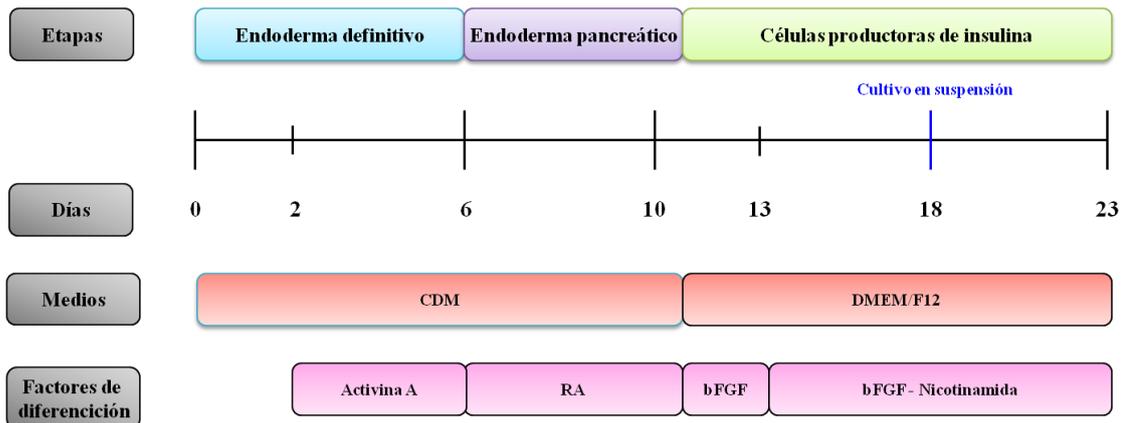
132. Catalgol, B., et al., *Resveratrol: French paradox revisited*. Front Pharmacol, 2012. **3**: p. 141.
133. Borra, M.T., B.C. Smith, and J.M. Denu, *Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17187-95.
134. Kaerberlein, M., et al., *Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17038-45.
135. Baur, J.A., *Resveratrol, sirtuins, and the promise of a DR mimetic*. Mech Ageing Dev, 2010. **131**(4): p. 261-9.
136. Um, J.H., et al., *AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol*. Diabetes, 2010. **59**(3): p. 554-63.
137. Canto, C., et al., *Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle*. Cell Metab, 2010. **11**(3): p. 213-9.
138. Dasgupta, B. and J. Milbrandt, *Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(17): p. 7217-22.
139. Park, C.E., et al., *Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase*. Exp Mol Med, 2007. **39**(2): p. 222-9.
140. Park, S.J., et al., *Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases*. Cell, 2012. **148**(3): p. 421-33.
141. Yang, T., et al., *SIRT1 and endocrine signaling*. Trends Endocrinol Metab, 2006. **17**(5): p. 186-91.
142. Bordone, L., et al., *Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells*. PLoS Biol, 2006. **4**(2): p. e31.
143. Affourtit, C. and M.D. Brand, *On the role of uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(7-8): p. 973-9.
144. De Souza, C.T., et al., *Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action*. FASEB J, 2007. **21**(4): p. 1153-63.
145. Zhang, C.Y., et al., *Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes*. Cell, 2001. **105**(6): p. 745-55.
146. Xie, S., et al., *Resveratrol induces insulin gene expression in mouse pancreatic alpha-cells*. Cell Biosci, 2013. **3**(1): p. 47.
147. Do, G.M., et al., *Resveratrol ameliorates diabetes-related metabolic changes via activation of AMP-activated protein kinase and its downstream targets in db/db mice*. Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(8): p. 1282-91.
148. Palsamy, P. and S. Subramanian, *Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats*. Biomed Pharmacother, 2008. **62**(9): p. 598-605.
149. Palsamy, P. and S. Subramanian, *Ameliorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidative stress, and pancreatic beta-cell dysfunction in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats*. J Cell Physiol, 2010. **224**(2): p. 423-32.
150. Poulsen, M.M., et al., *Resveratrol in metabolic health: an overview of the current evidence and perspectives*. Ann N Y Acad Sci, 2013. **1290**: p. 74-82.

151. Merglen, A., et al., *Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells*. Endocrinology, 2004. **145**(2): p. 667-78.
152. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
153. Smani, T., et al., *Role of Ca²⁺-independent phospholipase A2 and store-operated pathway in urocortin-induced vasodilatation of rat coronary artery*. Circ Res, 2007. **101**(11): p. 1194-203.
154. Shim, J.H., et al., *Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate*. Diabetologia, 2007. **50**(6): p. 1228-38.
155. Rezania, A., et al., *Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells*. Nat Biotechnol, 2014.
156. Timmers, S., J. Auwerx, and P. Schrauwen, *The journey of resveratrol from yeast to human*. Aging (Albany NY), 2012. **4**(3): p. 146-58.
157. Chan, M.M., *Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin*. Biochem Pharmacol, 2002. **63**(2): p. 99-104.
158. Chao, J., et al., *Protective effects of pinostilbene, a resveratrol methylated derivative, against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells*. J Nutr Biochem, 2010. **21**(6): p. 482-9.
159. Scott, E., et al., *Resveratrol in human cancer chemoprevention--choosing the 'right' dose*. Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(1): p. 7-13.
160. Azzu, V., et al., *Dynamic regulation of uncoupling protein 2 content in INS-1E insulinoma cells*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(10): p. 1378-83.
161. Brand, M.D., et al., *Mitochondrial uncoupling protein 2 in pancreatic beta-cells*. Diabetes Obes Metab, 2010. **12 Suppl 2**: p. 134-40.
162. Loh, K.M., et al., *Efficient endoderm induction from human pluripotent stem cells by logically directing signals controlling lineage bifurcations*. Cell Stem Cell, 2014. **14**(2): p. 237-52.
163. Guo, S., et al., *Activin A supplement in the hESCs culture enhances the endoderm differentiation efficiency*. Cell Biol Int, 2014. **38**(7): p. 849-56.
164. Bruin, J.E., et al., *Characterization of polyhormonal insulin-producing cells derived in vitro from human embryonic stem cells*. Stem Cell Res, 2014. **12**(1): p. 194-208.
165. Shiroy, A., et al., *Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone*. Stem Cells, 2002. **20**(4): p. 284-92.
166. Basford, C.L., et al., *The functional and molecular characterisation of human embryonic stem cell-derived insulin-positive cells compared with adult pancreatic beta cells*. Diabetologia, 2012. **55**(2): p. 358-71.
167. Hrvatin, S., et al., *Differentiated human stem cells resemble fetal, not adult, beta cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(8): p. 3038-43.
168. Muthyala, S., et al., *The reversal of diabetes in rat model using mouse insulin producing cells - a combination approach of tissue engineering and macroencapsulation*. Acta Biomater, 2011. **7**(5): p. 2153-62.

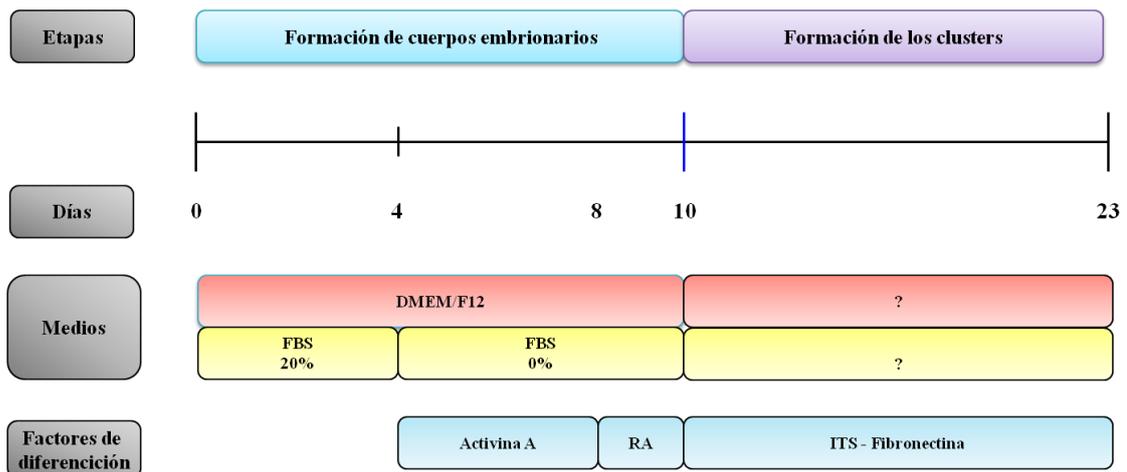
-
169. Elrick, L.J. and K. Docherty, *Phosphorylation-dependent nucleocytoplasmic shuttling of pancreatic duodenal homeobox-1*. *Diabetes*, 2001. **50**(10): p. 2244-52.
 170. Watanabe, H., et al., *Activation of phosphatidylinositol-3 kinase regulates pancreatic duodenal homeobox-1 in duct cells during pancreatic regeneration*. *Pancreas*, 2008. **36**(2): p. 153-9.
 171. Guo, H., et al., *AMPK enhances the expression of pancreatic duodenal homeobox-1 via PPARalpha, but not PPARgamma, in rat insulinoma cell line INS-1*. *Acta Pharmacol Sin*, 2010. **31**(8): p. 963-9.
 172. Pozo-Guisado, E., M.J. Lorenzo-Benayas, and P.M. Fernandez-Salguero, *Resveratrol modulates the phosphoinositide 3-kinase pathway through an estrogen receptor alpha-dependent mechanism: relevance in cell proliferation*. *Int J Cancer*, 2004. **109**(2): p. 167-73.
 173. Lin, C.Y., et al., *Flavonoids protect pancreatic beta-cells from cytokines mediated apoptosis through the activation of PI3-kinase pathway*. *Cytokine*, 2012. **59**(1): p. 65-71.
 174. Hou, X., et al., *SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(29): p. 20015-26.

8. ANEXOS

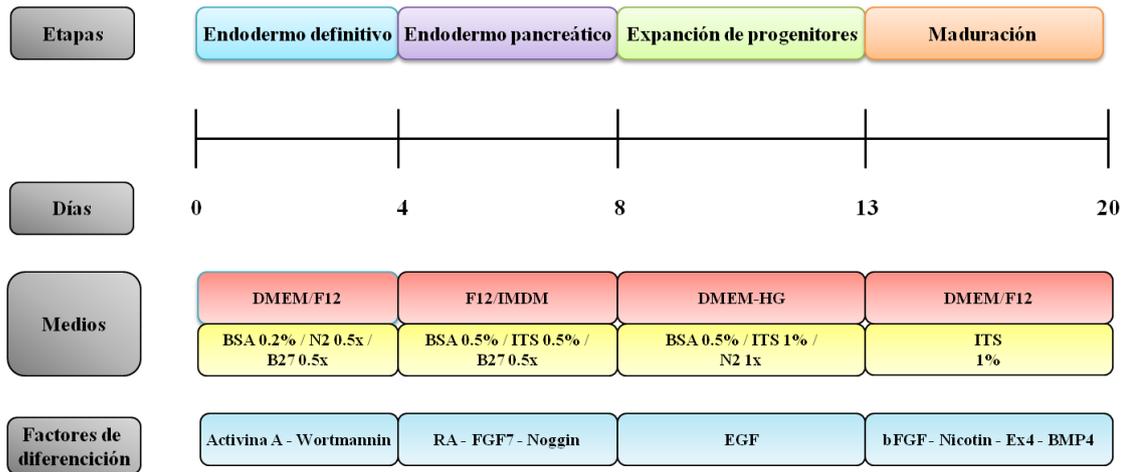
Anexo 1. Protocolos de diferenciación publicados



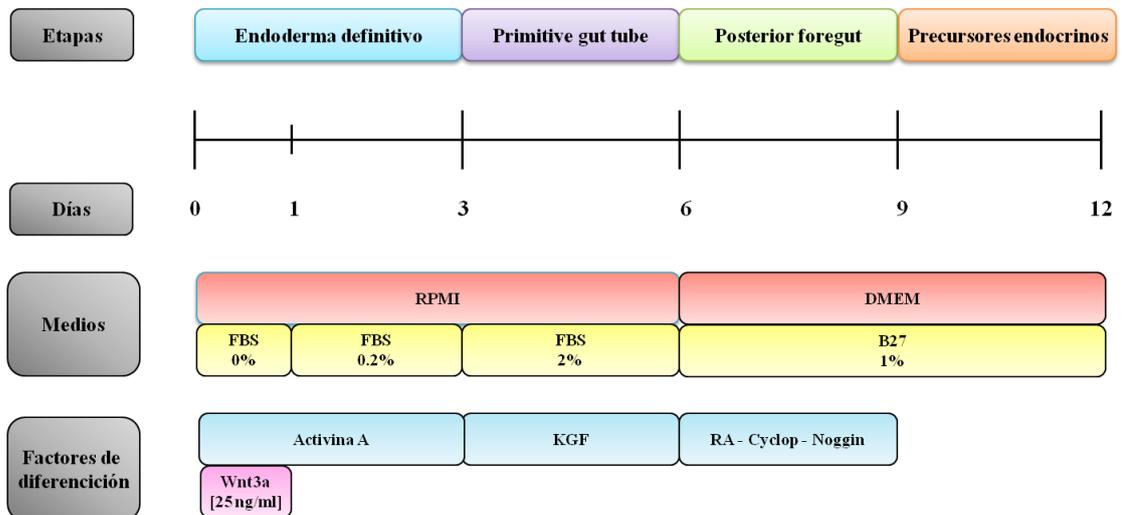
Jiang W *et al.* Cell Res, 2007



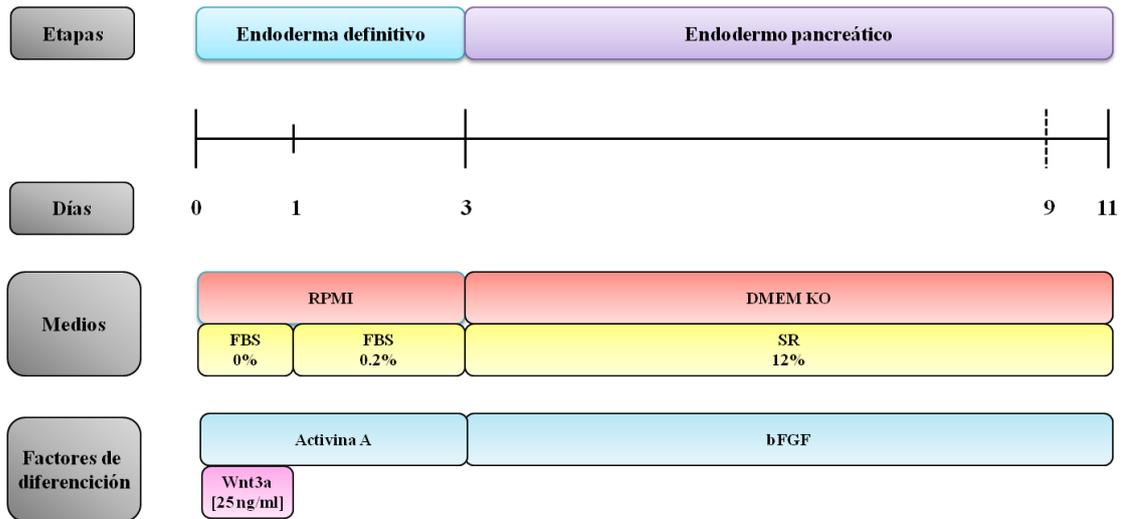
Shim JH *et al.* Diabetologia, 2007



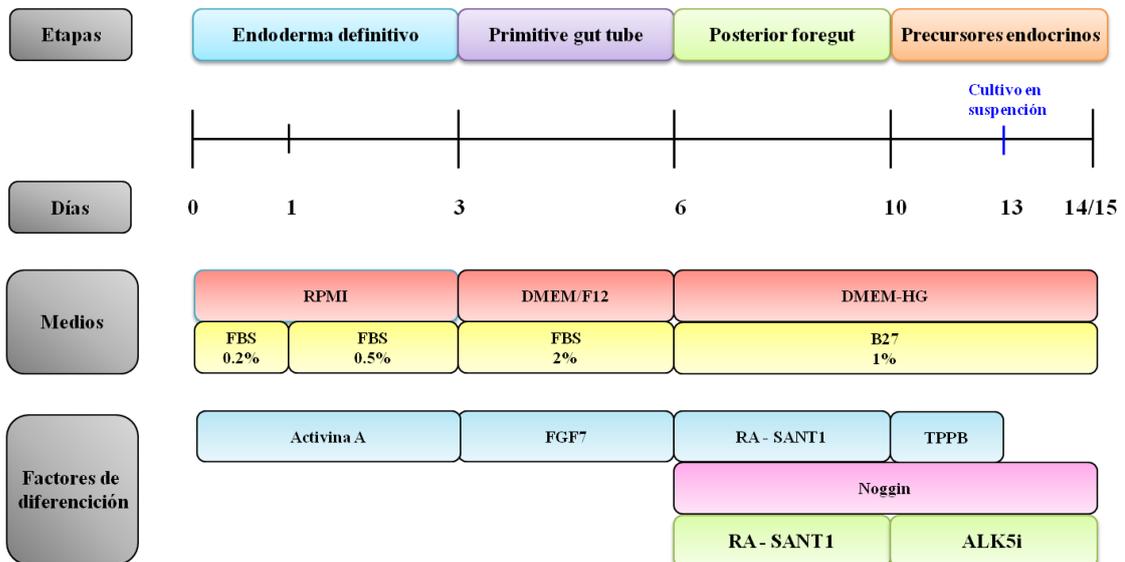
Zhang D *et al. Cell Res*, 2009



Kroon E *et al. Nat Biotechnol*, 2008



Ameri J *et al. Stem Cells*, 2010



Rezania A *et al. Diabetes*, 2012

8.2 Información adicional sobre resveratrol

Anexo 2. Tabla resumen de los ensayos clínicos sobre resveratrol

Authors	Participants (n)	Objective	Form and dose of resveratrol	Duration	Outcome
Bioavailability from resveratrol supplement (as capsules or in another matrix)					
Almeida et al. 2009 [24]	Healthy men (20) and women (20)	Bioavailability from resveratrol supplement	25, 50, 100, or 150 mg capsules	Multiple, 6x/day at 4h intervals for 13 doses	Peak plasma concentrations of trans-resveratrol were reached at 0.8-1.5 h post dose. Following the 13th dose of trans-resveratrol 25, 50, 100 and 150 mg, mean peak plasma concentration (C(max)) was 3.89, 7.39, 23.1 and 63.8 ng/mL. Inter-individual variability was high. Bioavailability was higher after morning administration. Resveratrol was well-tolerated, but with some mild adverse events reported.
Boocock et al. 2007 [25]	Healthy men (18) and women (22)	Bioavailability from resveratrol supplement	0.5, 1, 2.5, or 5 g capsules	Single dose	Consumption of resveratrol did not cause serious adverse events. Resveratrol and six metabolites were recovered from plasma and urine. Peak plasma levels of resveratrol at

					the highest dose were 539 ng/mL, which occurred 1.5 h post-dose. Peak levels of two monoglucuronides and resveratrol-3-sulfate were 3- to 8-fold higher. The AUC values for resveratrol-3-sulfate and resveratrol monoglucuronides were up to 23 times greater than those of resveratrol. Urinary excretion of resveratrol and its metabolites was rapid, with 77% of all urinary agent-derived species excreted within 4 h after the lowest dose.
Brown et al. 2010 [56]	Healthy men (22) and women (18)	Bioavailability from resveratrol supplement	0.5, 1, 2.5, or 5 g caplets	Multiple, once daily for 29 days	Plasma C _{max} was 958.6 µg/L following 29 days of 5 g. C _{max} and total AUC for the metabolites dramatically exceeded those for resveratrol. 2.5 g and 5 g caused mild to moderate gastrointestinal symptoms.
Burkon et al. 2008 [57]	Healthy males (9)	Bioavailability from resveratrol supplement	85.5 mg of piceid per 70 kg of body weight	Single dose, dissolved in 100 mL of 15% ethanol and made up with a low-fat milk (1.5%) to a total volume of 500 ml	Trans-resveratrol metabolites formed in the plasma and urine were identified and quantified. The metabolites were trans-resveratrol-3-sulfate, trans-resveratrol-3,4-disulfate, trans-resveratrol-3,5-disulfate, trans-resveratrol-3-glucuronide and trans-resveratrol-4-glucuronide. Up to 50% of the plasma trans-resveratrol-3-sulfate, trans-resveratrol-disulfates and trans-resveratrol-glucuronides were bound to proteins.
La Porte et al. 2010 [58]	Healthy men (3) and women (5)	Bioavailability of resveratrol supplement	2000 mg capsules; taken with standard breakfast or high-fat breakfast, quercetin (500 mg) or 100 mL 5% alcohol	Multiple, twice daily	Resveratrol in combination with a high-fat breakfast reduced the area under the plasma concentration-time curve and the C _{max} compared to a standard breakfast. Quercetin, or 5% alcohol (100 mL) did not influence trans-resveratrol pharmacokinetics. Resveratrol was well tolerated, although diarrhea was frequently observed.
Meng et al. 2004 [59]	Healthy men (3)	Bioavailability of resveratrol supplement	0.03, 0.5, or 1 mg/kg dissolved in 5 mL whisky mixed with 50 mL water	Single	Resveratrol levels were readily detected in the plasma and the urine. The recovery of resveratrol in the plasma suggested a rapid absorption of resveratrol in the gastrointestinal tract.

Meng et al. 2004 [59]	Healthy men (3)	Bioavailability of resveratrol supplement	0.32, 0.64, 0.96, or 1.92 mg delivered in grape juice (200, 400, 600, or 1200 mL)	Single	Resveratrol was only detected in the urine at when 600 and 1200 mL of grape juice were given. In grape juice, the level of free resveratrol is rather low. Cis- and trans-Piceid are the major resveratrol derivatives in grape juice.
Nunes et al. 2009 [60]	Healthy young men (6) and healthy young women (6) and elderly men (6) and elderly women (6)	Bioavailability of resveratrol supplement	200 mg capsules	Single, followed by multiple doses at 8-hour intervals for 3 days followed by a last single dose at day 4 (total of eight doses of 200 mg)	Pharmacokinetic and metabolite profile. Resveratrol was well tolerated by young and elderly subjects and the kinetic profile was independent of age and gender.
Patel et al. 2010 [61]	Colon cancer patients (20)	Bioavailability of resveratrol supplement	0.5, or 1 g/ day	Single dose for 8 days	Trans-resveratrol (674 nmol/g) and resveratrol-3-O-glucuronide (86 nmol/g) were recovered from colonic tissue.
Ortuno et al. 2010 [62]	Healthy men (11)	Bioavailability of resveratrol	Randomized, crossover, controlled trial 14 µg/ kg of resveratrol in different matrices: 250 mL red wine, 1 L grape juice, or 10 tablets (red wine extracts enriched with trans-resveratrol)	Single	Plasma trans-resveratrol increased as a response to all grape products and that of cis-resveratrol after wine and grape juice. Despite similar doses of trans-resveratrol being administered, the bioavailability of resveratrol from wine and grape juice is six fold higher than that from tablets.
Walle et al. 2004 [20]	Healthy men (3) and healthy women (3)	Bioavailability from 14C-resveratrol supplement	25 mg taken orally and intravenously	Single	Absorption is at least 70% with peak plasma levels of resveratrol and metabolites of around 491 ng/ml and a plasma half-life of 9.2 h. Most of the oral dose was recovered in the urine. Three main metabolic pathways were identified: sulfate and glucuronic acid conjugation of the phenolic groups, and hydrogenation of the aliphatic double bond.

Goldberg et al. 2003 [19]	Healthy men (12)	Bioavailability from three different matrices	25 mg/ 70 kg body weight dissolved in 100 mL of white wine (11.5% ethanol), white grape juice, or V8 vegetable juice/ homogenate	Single	Efficient absorption of resveratrol but significant differences in bioavailability pattern between matrices, with plasma resveratrol concentration decreasing most rapidly with V8 and least rapidly using grape juice.
Gresele et al. 2008 [63]	Healthy men (9) and women (11)	Bioavailability from moderate wine consumption	300 mL/d intake of red of white wine. Total polyphenolic concentration: Red wine 1.8 g/L; white wine 0.25 g/L	15 days	Plasma resveratrol concentrations increased from 0.72 to 1.33 $\mu\text{mol/L}$ for white wine and from 0.71 to 1.72 $\mu\text{mol/L}$ for red wine.
Urpi-Sarda et al. 2005 [64]	Healthy men (11)	Bioavailability from wine consumption	5.38 mg from 250 mL red wine	Single	Resveratrol metabolites were incorporated into low-density lipoproteins after a moderate intake of red wine. The metabolites identified in low-density lipoproteins were trans-resveratrol-3-O-glucuronide, cis-resveratrol-3-O-glucuronide, cis-resveratrol-3-O-glucoside, and free trans-resveratrol.
Vitaglione et al. 2005 [65]	Healthy men (14) and women (11)	Bioavailability from wine consumption	3.4, 7.5, or 33 $\mu\text{g/kg}$ from 300 or 600 mL red wine with three different dietary approaches: fasting, a standard meal, a meal with high and low amounts of lipids	Single	Free trans-resveratrol was found in trace amounts, only in some serum samples collected 30 minutes after red wine ingestion while after longer times resveratrol glucuronides predominated. Trans-resveratrol bioavailability was shown to be independent from the meal or its lipid content. However, Wide the wide variation in subject responses combined with low bioavailability suggests that the combination of polyphenols may account for the French paradox.

Zamora-Ros et al. 2006 [66]	Healthy men (10) and healthy women (10)	Bioavailability from wine consumption	0.357, 0.398, or 2.56 mg/day from 300 mL sparkling wine or 200 mL either white wine or red wine	Multiple; once daily, for 28 days	Significant increases in total resveratrol metabolites were observed in the urine after consumption of sparkling, white or red wine. Resveratrol metabolites in urine may be useful biomarkers of wine intake in epidemiological and intervention studies.
------------------------------------	---	---------------------------------------	---	-----------------------------------	---

Oxidative stress and inflammation

Ghanim et al. 2010 [53]	Healthy adults (20)	Oxidative stress and inflammation	Polygonum cuspidatum extract contain 40 mg of resveratrol Randomized, placebo controlled	Daily for 6 weeks	The extract induced a significant reduction in reactive oxygen species generation as shown by a decrease in the expression of P47 (phox), NFκB, JNK-1, PTP-1B, SOCS-3 in mononuclear cells, when compared to placebo and baseline. The extract also suppressed plasma concentrations of TNF-α, IL-6 and CRP.
--------------------------------	---------------------	-----------------------------------	---	-------------------	--

Ghanim et al. 2011 [67]	Healthy men (4) and women (6)	Markers of oxidative stress, inflammation, Nrf-2 binding activity, the concentrations of endotoxin (lipopolysaccharide) and lipoprotein binding protein	Crossover, placebo controlled. - High-fat high-carbohydrate meal with placebo - High-fat high-carbohydrate meal with 100 mg resveratrol and 75 mg grapeskin polyphenols	2 visits, 1 week apart	The supplement containing resveratrol and muscadine polyphenols suppresses the increase in oxidative stress, lipopolysaccharide and lipoprotein binding protein concentrations, and expression of TLR-4, CD14, IL-1β and SOCS-3 in mononuclear cells after a high-fat high-carbohydrate meal. It also stimulates specific Nrf-2 activity and induces the expression of the related antioxidant genes NQO-1 and GST-P1.
--------------------------------	-------------------------------	---	---	------------------------	--

Cardiovascular effects

Kennedy et al. 2010 [68]	Young healthy men (4) and women (20)	Cognitive performance and localized cerebral blood flow	Double-blind, placebo-controlled, crossover 250 or 500 mg capsules	Single; once daily on 3 separate days	Resveratrol dose-dependently increase flow during task performance, concentrations of haemoglobin, enhance cognitive function.
---------------------------------	--------------------------------------	---	---	---------------------------------------	--

Wong et al. 2010 [69]	Overweight/obese men (14) and post-menopausal women (5) with borderline hypertension	Endothelial function and cardiovascular health	30, 90, or 270 mg in a randomized double-blind crossover design	Each dose for 6 days	Flow-mediated dilation of the brachial artery increased 45 min following 30, 90, and 270 mg doses of resveratrol.
Cancer					
Nguyen et al. 2009 [70]	Colorectal cancer patients (8)	A phase-I pilot study in which the effects of resveratrol are examined on Wnt signalling in the normal colonic mucosa and colon cancer tissue	4 groups: - N=3: 80 g of grape powder dissolved in water - N=2 120 g of grape powder dissolved in water - N=2 20 mg of resveratrol (capsule containing also quercetin) - N=1 80 mg of resveratrol (capsule containing also quercetin)	Daily for two weeks	Grape powder (80 g), which contains low doses of resveratrol in combination with other bioactive components, can inhibit the Wnt pathway in colonic cancer patients but this effect is confined to the normal colonic mucosa.
Patel et al. 2010 [61]	Colon cancer patients (20)	Chemo preventive activity	0.5, or 1 g/ day	Single dose for 8 days	Resveratrol reduced tumour cell proliferation by 5%.
Chow et al. 2010 [71]	Healthy men (11) and women (31)	Effect on drug- and carcinogen-metabolizing enzymes	1 g caplets	Once daily for 28 days	Resveratrol intervention inhibited the phenotypic indices of CYP3A4, CYP2D6, and CYP2C9 and induced the phenotypic index of 1A2. Overall, GST and UGT1A1 activities were minimally affected by the intervention, although an induction of GST- π level and UGT1A1 activity was observed in individuals with low baseline enzyme level/activity.
Brown et al. 2010 [56]	Healthy men (22) and women (18)	Chemo preventive properties	0.5, 1, 2.5, or 5 g caplets	Multiple, once daily for 29 days	Resveratrol decreased circulating IGF-1 and IGFBP-3 in circulating plasma. The decrease was most marked at 2.5 g. The observed decrease might contribute to cancer chemo preventive activity.

Diabetes, obesity, and metabolism							
Elliot et al. 2009 [51]	Type 2 diabetics	Insulin sensitivity	2.5, or 5 g	Daily for 28 days	Decreased postprandial and insulin at 5 g.	fasting glucose and	
Brasnyo et al. 2011 [52]	Diabetic men (19)	Insulin sensitivity	5 mg capsules	Twice daily for 4 weeks	Resveratrol significantly decreased insulin resistance (as measured by HOMA index), while it increased the pAkt:Akt ratio in platelets.		
					Urinary ortho-tyrosine excretion (a measure of oxidative stress) decreased by resveratrol.		
Timmers et al. 2011 [18]	Healthy obese men (11)	Metabolic effects	75 mg of resveratrol in a randomized double-blind, placebo-controlled crossover design	Twice daily, for 30 days	Resveratrol improved the metabolic profile: resveratrol reduced sleeping and resting metabolic rate. In muscle, resveratrol activated the AMPK-SIRT1-PGC1 α axis. Resveratrol reduced blood glucose and insulin levels, reduced liver fat storage, improved muscle mitochondrial function and reduced inflammation markers in the blood.		
Crandall et al. 2012 [17]	Older men (3) and women (7) with impaired glucose tolerance	Glucose tolerance and vascular function	1, 1.5, or 2 g	Daily for 4 weeks	Decreased peak glucose and 3-h glucose AUC following a meal at 1.5 and 2 g. Matsuda index for insulin sensitivity improved at 1.5 and 2 g. Trend towards improved hyperemia index.		

Fuente: Timmers et al. Aging, 2012

LISTADO DE PUBLICACIONES

- ❖ Pezzolla D, López-Beas J, Lachaud CC, Domínguez-Rodríguez A, , Smani T, Hmadcha A, Soria B. *Resveratrol ameliorates the maturation process of β -cell-like cells obtained from an optimized differentiation protocol of human embryonic stem cells.* (en procesos de publicación).

- ❖ Soria B, Pezzolla D, Lopez-Beas J, Rojas A and Hmadcha A. *Generation of Pancreatic Islets from Stem Cells.* Principles of Tissue Engineering, 4th Edition 2014, 41:837-847.

- ❖ Lachaud CC, Pezzolla D, Domínguez-Rodríguez A, Smani T, Soria B and Hmadcha A. *Functional Vascular Smooth Muscle-like Cells Derived from Adult Mouse Uterine Mesothelial Cells.* PLoS One. 2013 Feb 6;8(2):e55181.

- ❖ Horrillo A, Pezzolla D, Fraga MF, Aguilera Y, Salguero-Aranda C, Tejedo JR, Martin F, Bedoya FJ, Soria B, Hmadcha A. *Zebularine regulates early stages of mESC differentiation: effect on cardiac commitment.* Cell Death Dis. 2013 Apr 4;4:e570.