





# **Estrategias para la diferenciación *in vitro* de células ES de ratón a células acinares pancreáticas**

por Meritxell Rovira Clusellas

Barcelona, 2006

Programa de doctorado en Ciencias de la  
Salud y de la Vida

Universidad Pompeu Fabra  
(2001-2003)

Unidad de Biología Celular y Molecular

IMIM

Dipòsit legal: B.39025-2007  
ISBN: 978-84-690-8314-7

# **Estrategias para la diferenciación *in vitro* de células ES de ratón a células acinares pancreáticas**

Memoria presentada por Meritxell Rovira Clusellas  
para optar al grado de doctor  
por el Departamento de Ciencias de la Salud y de la Vida  
Universidad Pompeu Fabra

Tesis dirigida por la Dra. Anouchka Skoudy  
Unidad de Biología Celular y Molecular  
Institut Municipal d'Investigació Mèdica

Dra. Anouchka Skoudy  
Director de tesis

Meritxell Rovira Clusellas  
Doctorando



# ÍNDICE

---

## ABREVIATURAS

## INTRODUCCIÓN

1

### 1. EL PÁNCREAS

3

1.1. Anatomía del páncreas

3

1.2. Histología

4

1.3. Composición del jugo pancreático

8

1.4. La secreción pancreática

10

### 2. DESARROLLO PANCREÁTICO

20

2.1. Especificación pancreática temprana

21

2.2. Crecimiento y formación del árbol ductal

26

2.3. Diferenciación de los linajes endocrinos y exocrinos

29

2.4. Factores de transcripción implicados en el desarrollo pancreático

35

### 3. PATOLOGÍAS PANCREÁTICAS

45

3.1. Pancreatitis aguda

45

3.2. Pancreatitis crónica

46

3.3. Cáncer de páncreas

47

### 4. MODELOS CELULARES ACINARES *IN VITRO*

48

### 5. CÉLULAS MADRE

50

5.1. ¿Qué es una célula madre?

50

5.2. Tipos de células madre según su origen

50

### 6. CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS (ES)

56

6.1. Utilización terapéutica de las células ES

62

6.2. Diferenciación *in vitro* de células madre embrionarias (ES)

66

### 7. DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS ES A CÉLULAS $\beta$ PANCREÁTICAS

71

7.1. Diferenciación espontánea de células ES a células  $\beta$

71

7.2. Diferenciación de células  $\beta$  a partir de células que expresan nestina

72

7.3. Utilización de factores de crecimiento para la diferenciación

76

7.4. Expresión ectópica de factores de transcripción

79

7.5. Selección genética de las células diferenciadas	80
<b>8. DIFERENCIACIÓN <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS ES A CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS</b>	<b>82</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>83</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>87</b>
<b>1. CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS CÉLULAS ES CGR8 INDIFERENCIADAS</b>	<b>89</b>
1.1. Mantenimiento de las células CGR8 indiferenciadas	89
1.2. Condiciones de trypsinización de las células CGR8	90
1.3. Condiciones de descongelación de las células CGR8	90
<b>2. VECTORES DE EXPRESIÓN GÉNICA: ADENOVIRUS Y LENTIVIRUS</b>	<b>91</b>
2.1. Construcción de los vectores de expresión génica: adenovirus y lentivirus	91
2.2. Vectores adenovirales y lentivirales usados en este estudio	<b>92</b>
2.3. Producción de las partículas virales: adenovirus y lentivirus	92
2.4. Establecimiento de las líneas genéticamente modificadas mediante infección adenoviral	93
2.5. Infección de las células CGR8 con adenovirus recombinantes	95
<b>3. GENERACIÓN DE CÉLULAS ES <i>REPORTER</i> MEDIANTE TRANSFECCIÓN DEL PLÁSMIDO DE SELECCIÓN GENÉTICA pELAS</b>	<b>96</b>
3.1. Construcción del plásmido de selección: pELAS	96
3.2. Análisis de la funcionalidad del plásmido pELAS por transfección en líneas celulares pancreáticas (266-6 Y AR42J) y no pancreáticas (293 Y NIH 3T3)	97
3.3. Generación de las líneas celulares ES reporter	98
3.4. Análisis de los clones aislados por PCR de DNA genómico	100
3.5. Amplificación de los clones positivos por PCR de DNA genómico	102
<b>4. OBTENCIÓN DE LOS SOBRENADANTES</b>	<b>102</b>
4.1. Obtención de sobrenadantes pancreáticos fetales (SNP) a partir del cultivo de rudimentos pancreáticos de embrión de ratón	102
4.2. Obtención del sobrenadantes del cultivo de mesénquima pancreático a partir de embriones de E12.5	103
4.3. Obtención del sobrenadante del cultivo de líneas celulares (AR42J, 266-6, NIH 3T3 y INS-1E)	104

<b>5. DETECCIÓN DE FOLISTATINA EN EL SN MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA</b>	<b>105</b>
<b>6. PROTOCOLOS DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS ES</b>	<b>106</b>
6.1. Protocolo de diferenciación utilizando factores solubles y sobrenadantes pancreáticos fetales (SNP) (EB7P7)	106
6.2. Protocolo de diferenciación mediante infección adenoviral y el uso de sobrenadantes pancreáticos (EB7P14)	108
6.3. Protocolo de selección genética (EB7P28)	109
6.6. Productos de cultivo celular utilizados en este estudio	111
<b>7. EXTRACCIÓN DE RNA Y RT-PCR</b>	<b>112</b>
7.1. Extracción de RNA de células y tratamiento con DNAsa	112
7.2. RT-PCR semicuantitativa	112
7.3. RT-PCR cuantitativa	115
<b>8. WESTERN BLOT</b>	<b>115</b>
<b>9. INMUNHISTOQUÍMICA</b>	<b>118</b>
9.1. Inmunohistoquímica con métodos enzimáticos	118
9.2. Inmunofluorescencias indirectas	119
9.3. Inmunofluorescencias mediante amplificación con el método TSA	119
9.4. Inmunofluorescencias anti-bromodioxiuridina (BrDu)	120
9.5. Anticuerpos utilizados en este estudio	122
<b>10. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD <math>\beta</math>-GALACTOSIDASA</b>	<b>122</b>
10.1. <i>In situ</i> : X-gal	122
10.2. Bioquímicamente en los lisados celulares: ONPG	123
<b>11. UNIÓN DE CCK RADIOACTIVA A SU RECEPTOR (CCKr)</b>	<b>124</b>
11.1. Preparación de membranas crudas para el experimento de unión radioactiva a su receptor (CCKr)	124
11.2. Unión de CCK radioactiva a las preparaciones crudas de membranas celulares	125
<b>12. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO CITOSÓLICO</b>	<b>126</b>
<b>13. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD AMILASA EN ENSAYOS DE SECRECIÓN</b>	<b>127</b>

**14. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA 129**

**RESULTADOS 131**

**1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO 133**

1.1. Análisis del efecto del sobrenadante pancreático fetal (SNP) en la diferenciación de las células ES a células acinares pancreáticas 133

1.2. Análisis del efecto de los sobrenadantes obtenidos del cultivo de mesénquima pancreático del estadio embrionario E12.5 en la diferenciación de las células ES a células acinares pancreáticas 135

1.3. Análisis del efecto del sobrenadante del cultivo de las líneas celulares NIH3T3, 266-6, AR42J e INS1-E en la diferenciación de las células ES a células acinares pancreáticas 137

1.4. Análisis del efecto de factores solubles implicados en el desarrollo pancreático sobre la diferenciación de las células ES a células pancreáticas acinares 139

**Transforming growth factor (TGF) $\beta$ , fibroblast growth factor (FGF) and retinoid signalling pathways promote pancreatic exocrine gene expression in mouse embryonic stem cells.** 141

1.5. Análisis del efecto de folistatina en la diferenciación de las células ES a células acinares pancreáticas 149

**2. SOBREEXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN EL DESARROLLO PANCREÁTICO, MEDIANTE EL USO DE VECTORES VIRALES 153**

**Viral mediated co-expression of Pdx1 and p48 regulates exocrine pancreatic differentiation in mouse ES cells.** 159

**3. SELECCIÓN GENÉTICA DE LAS CÉLULAS ES COMPROMETIDAS AL LINAJE ACINAR 185**

3.1. Establecimiento de una línea de células ES *reporter*: pELAS 187

3.2. Establecimiento del protocolo de selección genética de las células comprometidas al linaje acinar 191

3.3. Análisis de la capacidad proliferativa de las células ES diferenciadas 200

3.4. Caracterización molecular de las células diferenciadas obtenidas con el protocolo de selección utilizando SNP y co-infección múltiple 201

3.5. Análisis de la expresión de marcadores de diferenciación mediante inmunofluorescencia 203

3.6. Caracterización <i>in vitro</i> de la funcionalidad de las células diferenciadas obtenidas con el protocolo de selección utilizando SNP y co-infección múltiple	213
3.7. Caracterización ultraestructural por microscopía electrónica de las células diferenciadas seleccionadas	218
3.8. Análisis de la expresión de enzimas digestivos: Células seleccionadas versus líneas celulares acinares células y acinos pancreáticos aislados	220
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>223</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>243</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>247</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

### A

Ach: Acetilcolina.

Ad: Adenovirus.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AMPc: Ácido Monofosfato cíclico.

ARN: Ácido Ribonucleico.

### B

bHLH: Basic Helix Loop Helix.

BM: Membrana Basal.

BMP: Bone Morphogenetic Protein.

BrDu: Bromo-Desoxiuridina.

### C

CCK: Colecistoquinina.

CCKr: Receptor de Colecistoquinina.

CCH: Carbacol.

CK: Citoqueratina.

CMV: Citomegalvirus

Cx32: Conexina 32.

### E

EB: Embryoid Body.

EC: Embryonic Carcinoma.

ECM: Componentes de Matriz

Extracelular.

EG: Embryonic Germ.

EGF: Epidermal Growth Factor.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

ES: Embryonic Stem.

### F

FACS: Fluorescent Activated Cell Sorting.

FBS: Fetal Bovine Serum.

FGF: Fibroblast Growth Factor.

### G

GFP: Green Fluorescent Protein.

### H

Hh: Hedgehog.

HRP: Horseradish Peroxidase

### I

ICM: Inner Cell Mass.

Id: Inhibitory of Differentiation.

Ihh: Indian Hedgehog.

IP3: Inositol 1,4,5-Trifosfato.

IP3R: Receptor del Inositol 1,4,5-Trifosfato.

### K

KO: Knock-out.

### L

LacZ: gen que codifica para  $\beta$ -galactosidasa.

LIF: Leukemia Inhibitory Factor.

## **M**

M3r: Receptor Muscarínico 3.  
MOI: Multiplicidad de Infección.  
MEFs: Mouse Embryonic Fibroblasts.  
MMP: Metaloproteinasas de Matriz.

## **O**

O/N: Over Night.  
ONPG: Ortho Nitro Phenyl  
Galactopyranoside.

## **P**

PC: Pancreatitis Crónica.  
PcG: Policomb.  
PCR: Reacción en Cadena de la  
Polimerasa.  
PBS: Phosphate Buffered Saline.  
PFA: Paraformaldehído  
PGC: Primordial Germinal Cells.  
PKC: Proteína Quinasa C.  
PMP: Pancreas Derived Multipotent  
Precursors.  
PP: Polipéptido Pancreático.

## **R**

RA: Ácido Retinoico.  
Raldh2: Retinaldehído Deshidrogenasa  
2.  
RNAi: RNA de Interferencia.  
RT-PCR: Transcriptasa Reversa-  
Reacción en Cadena de la Polimerasa.

## **S**

Shh: Sonic Hedgehog.  
SN: Sobrenadante.  
SNARE: Soluble N-ethylmaleimide-  
Sensitive Factor Attachment Receptor.  
SNP: Sobrenadante Pancreático Fetal.  
SSEA: Stage Specific Embryonic  
Antigens.

## **T**

TA: Temperatura ambiente.  
TGF: Transforming Growth Factor.  
TGN: Trans Golgi Network.

## **V**

VIP: Polipéptido Vasoactivo Intestinal.

## **W**

WT: Wild Type.

## **X**

X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-  
beta-D-galactopyranoside

## **Z**

ZG: Zymogen Granule

**INTRODUCCIÓN**

**OBJETIVOS**

**MATERIALES Y MÉTODOS**

**RESULTADOS**

**DISCUSIÓN**

**CONCLUSIONES**

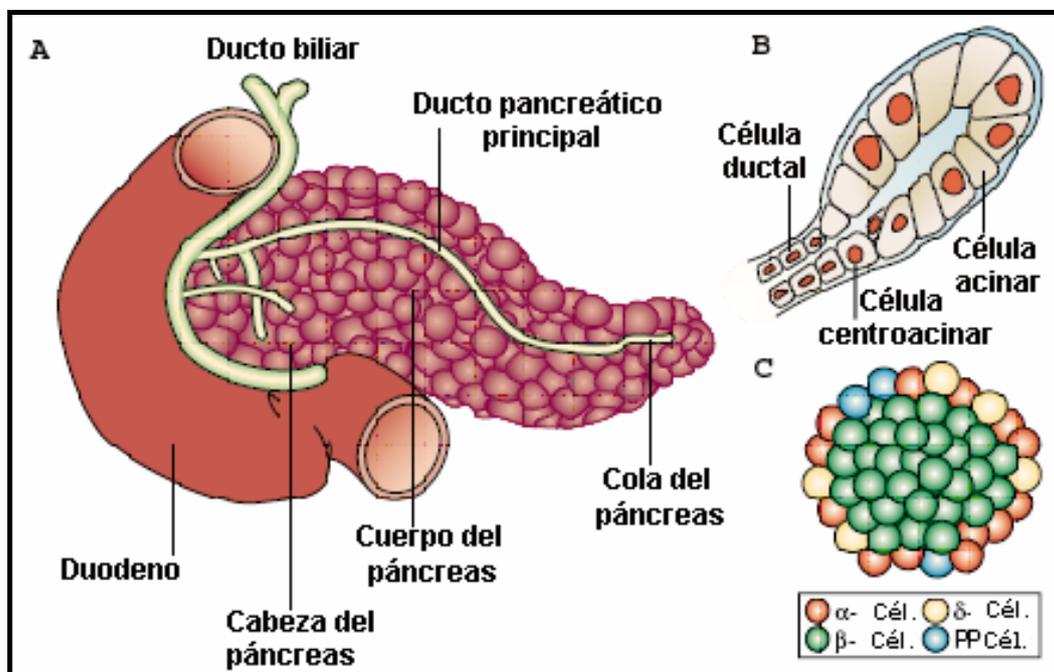
**BIBLIOGRAFÍA**



# 1. EL PÁNCREAS

## 1.1. ANATOMÍA DEL PÁNCREAS

El páncreas es una glándula de consistencia blanda, aplanada y alargada que se localiza en el cuadrante superior de la cavidad retroperitoneal del abdomen. El páncreas se divide en 3 regiones: cabeza, cuerpo y cola (Figura 1.1A). La cabeza del páncreas es la porción más expandida, que descansa sobre el duodeno y se une a éste por tejido conectivo. El cuerpo y la cola se extienden por la línea media del cuerpo a través del hilum del bazo.

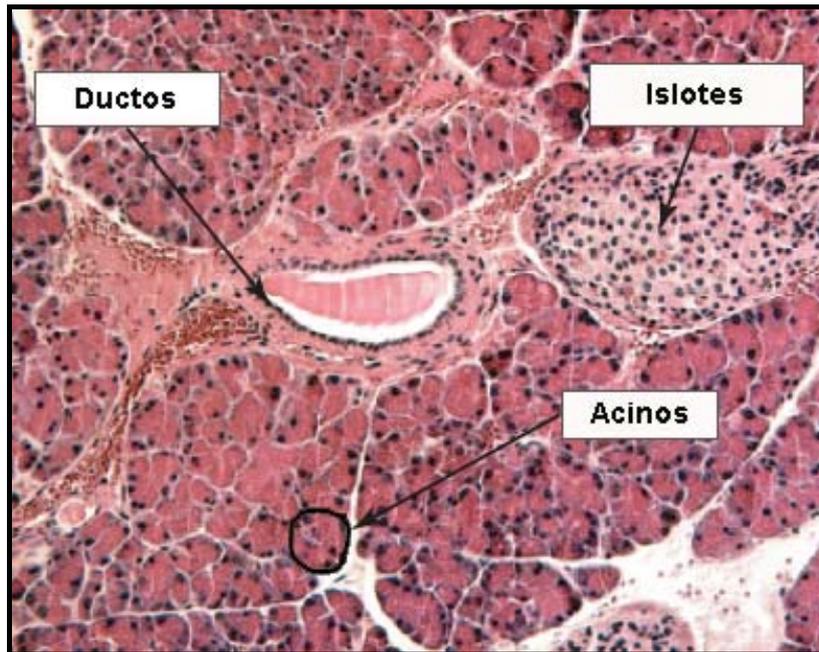


**Figura 1.1: Anatomía del páncreas:** A) Partes diferenciadas del páncreas adulto adyacente al duodeno. B) Acino pancreático y ducto pancreático formados por células acinarias y células ductales, respectivamente. C) Islole pancreático y tipos celulares endocrinos: células  $\beta$  (verde), células  $\alpha$  (rojo), células  $\delta$  (amarillo) y células PP (azul). Cél. = célula. *Figura adaptada de Edlund H., 2002.*

Los jugos pancreáticos llegan al duodeno a través del ducto pancreático principal que se abre al duodeno por la misma región por la que lo hace el conducto biliar principal, vía la ampolla de Vater.

### **1.2. HISTOLOGÍA**

El páncreas es una glándula mixta que consta de un componente endocrino y exocrino (Figura 1.1B-C y 1.2). El páncreas está formado por un 85% de células acinares, un 10% de componentes de la matriz extracelular, un 4% de células ductales, células centroacinares y vasos sanguíneos, y únicamente un 2% de células endocrinas.



**Figura 1.2: Histología del páncreas.** Sección histológica de páncreas de ratón donde se indican los principales compartimentos de la glándula. *Figura adaptada de Nir T. 2005.*

#### **1.2.1. PÁNCREAS ENDOCRINO**

Las células endocrinas se agrupan formando los Islotes de Langerhans que se distribuyen por todo el páncreas (siendo más abundantes en la cola), y quedan rodeadas por los acinos.

Hay 4 tipos de células endocrinas en el páncreas que son las encargadas de producir y secretar hormonas (Figura 1C).

1. Células  $\beta$ : representan la población celular más abundante del islote (60-80%); se localizan en el centro del islote y son las productoras y secretoras de insulina.

2. Células  $\alpha$ : representan la segunda población celular más abundante del islote (15-20%); se localizan en la periferia del islote y son las productoras y secretoras de glucagón.

3. Células  $\delta$ : representan sólo un 5-10% de las células del islote; se localizan en la periferia del islote y son las productoras y secretoras de somatostatina.

4. Células PP: representan la población celular menos abundante del islote (1-2%); se localizan también en la periferia del islote y son las productoras y secretoras de polipéptido pancreático.

Las hormonas insulina y glucagón tienen un papel importante en el metabolismo de la glucosa actuando a nivel sistémico y desempeñan un papel antagónico. La insulina es secretada por las células  $\beta$  al torrente sanguíneo al aumentar los niveles de glucosa en sangre después de la ingesta de comida. Este aumento sirve de señal a los tejidos diana (hígado, músculo y tejido adiposo) para utilizar la glucosa. Además, la insulina secretada inhibe la producción de glucosa por parte del hígado (de las reservas de glucosa en forma de glucógeno). La insulina tiene una acción paracrina, pero también autocrina, siendo capaz de inhibir la liberación de más insulina por parte de la propia célula  $\beta$  y de las que están a su alrededor. La secreción de glucagón, por el contrario, se estimula cuando los niveles de glucosa en sangre son bajos, movilizando las reservas de glucógeno del hígado.

Por otro lado, la somatostatina actúa localmente de forma paracrina inhibiendo la secreción de glucagón e insulina por parte de las células  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente, e inhibe también las secreciones acinares y ductales. El polipéptido pancreático también actúa de manera paracrina inhibiendo la secreción de enzimas digestivos por parte de las células acinares (292).

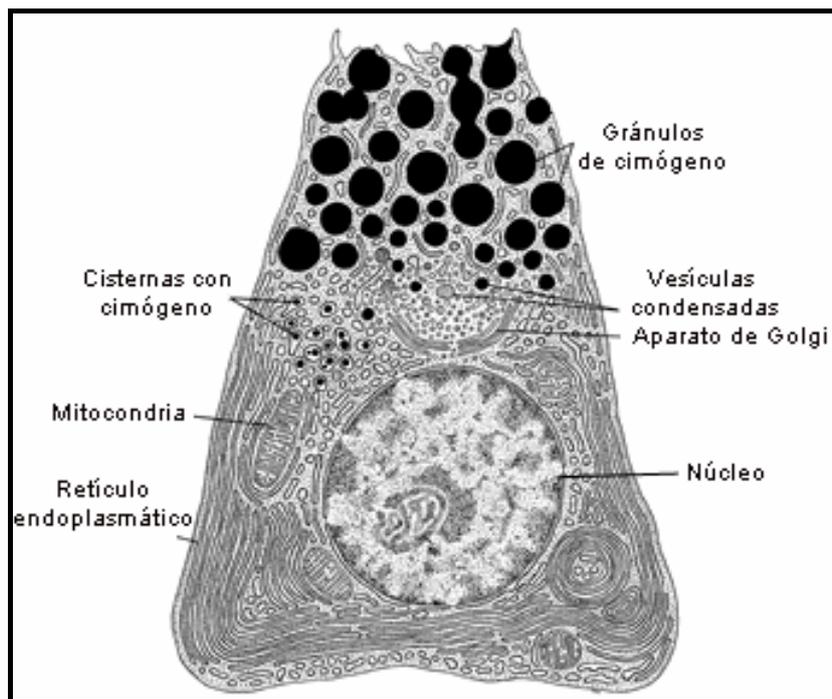
### **1.2.2. PÁNCREAS EXOCRINO**

El componente exocrino del páncreas representa más del 85% de la totalidad de la glándula. Está compuesto por lóbulos con forma de racimos de uva que se hallan

separados por septos de tejido conjuntivo que contienen vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. Cada uno de estos lóbulos engloba numerosos acinos formados por masas tubulares o esféricas de células, que constituyen la subunidad funcional del lóbulo pancreático; estas células se juntan en una luz central, que es el origen del conducto secretor. Las luces de los diversos acinos de un lóbulo forman los ductos intralobulares, los cuales se unen para formar los ductos interlobulares, que convergen hasta originar el ducto pancreático principal.

El páncreas exocrino está formado por células acinares, células ductales y células centroacinares (Figura 1.1B).

1. Las **células acinares** (que se agrupan en los acinos) son las responsables de la síntesis, almacenamiento y secreción de los enzimas digestivos. Las células acinares son células epiteliales, de forma piramidal, cuya base se apoya en una membrana basal y son células polarizadas (como el resto de células secretoras). Pueden ser células mononucleadas o binucleadas y el/los núcleos se localizan en la parte basal. El citoplasma de estas células contiene en su porción apical numerosas acumulaciones acidófilas denominadas gránulos de zimógeno, donde se acumulan los enzimas digestivos. En la superficie apical presentan microvellosidades. En la posición basal presentan un retículo endoplasmático rugoso muy abundante (lugar de producción de los enzimas digestivos), que le confiere una intensa basofilia. Entre el núcleo y los gránulos de zimógeno se encuentra un aparato de Golgi muy bien desarrollado, y distribuidas por toda la célula hay un elevado número de mitocondrias. En la región basal se localizan los receptores de hormonas y neurotransmisores que estimulan la secreción de los enzimas pancreáticos (Figura 1.3).

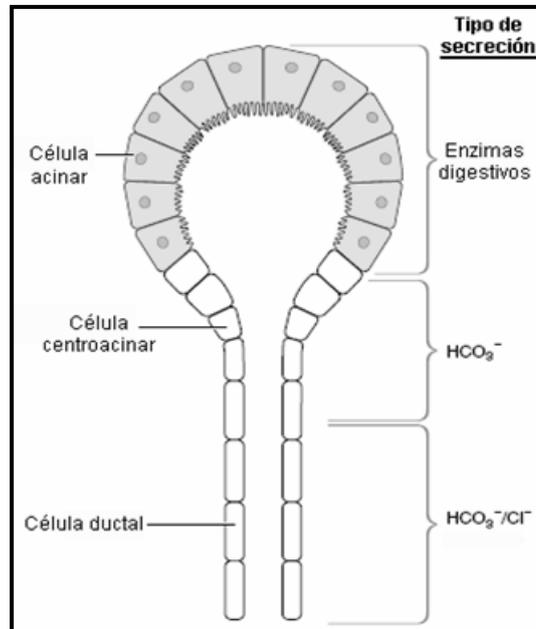


**Figura 1.3:** Esquema de los orgánulos intracelulares de una célula acinar pancreática. *Figura adaptada de*

En la membrana lateral las células acinares forman uniones estrechas, uniones adherentes y uniones de comunicación. Las uniones estrechas actúan como una barrera impermeable que impiden el paso de macromoléculas del lumen al interior del tejido pancreático. Estas uniones a su vez son permeables al paso de agua y iones entre el espacio intersticial y el lumen de los acinos. Las uniones adherentes permiten las interacciones célula-célula, localizándose próximas a la superficie apical. Las proteínas que forman estas uniones son las cadherinas, principalmente E-cadherina, que interacciona con el citoesqueleto de actina a través de  $\beta$ -catenina y  $\alpha$ -catenina. Las uniones de comunicación conectan el citoplasma de las células adyacentes siendo permeables a moléculas pequeñas y permiten la transmisión rápida de cambios en el potencial de membrana. Las proteínas que forman estas uniones son las conexinas, y en los acinos especialmente la conexina 32 y 26 (247).

2. Las **células centroacinares** (que quedan más próximas a las células acinares) y las **células ductales**, son más pequeñas que las acinares, no contienen gránulos de zimógeno y su aparato de Golgi y retículo endoplasmático están escasamente desarrollados y, por ello, no son células activas en la síntesis de proteínas (92). Las células centroacinares y ductales son las encargadas de la secreción de agua y electrolitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ...), siendo el bicarbonato el más abundante de todos. Esta

secreción de bicarbonato sirve para neutralizar la acidez del contenido luminal del estómago. Son células escamosas que presentan un núcleo en posición central y forman un epitelio simple columnar. Presentan también uniones estrechas y uniones de comunicación (Figura 1.4).



**Figura 1.4: Esquema de los tres tipos celulares exocrinos y sus productos de secreción.** Figura adaptada de ; [www.fleshandbones.com/readingroom/pdf/105.pdf](http://www.fleshandbones.com/readingroom/pdf/105.pdf)

### **1.3. COMPOSICIÓN DEL JUGO PANCREÁTICO**

El jugo pancreático contiene: agua, electrolitos (secretados por las células ductales y centroacinares) y enzimas digestivos (secretados por las células acinares).

#### **1.3.1. AGUA Y ELECTROLITOS**

El jugo pancreático es isotónico y los electrolitos más abundantes son HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> y en menor medida Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. La concentración de estos electrolitos es similar a la plasmática, pero el jugo pancreático es alcalino porque presenta un elevado contenido de bicarbonato (226).

La función de la secreción alcalina del páncreas es servir de vehículo para el transporte de los enzimas digestivos pero también y junto con las otras secreciones alcalinas (biliares e intestinales) es neutralizar el jugo ácido que viene del estómago. Esto es importante por distintas razones:

1. Los enzimas pancreáticos requieren un pH neutro o ligeramente alcalino para su actividad.
2. La absorción de las grasas depende de la formación en el lumen intestinal de miscelas, proceso que solo tiene lugar a pH neutro o ligeramente alcalino.
3. Protección de la mucosa intestinal, ya que un exceso de ácido en el duodeno puede dañar la mucosa e implicar la formación de úlceras.

### **1.3.2. ENZIMAS DIGESTIVOS**

Las células acinares producen, almacenan y secretan los enzimas digestivos que son vertidos a los ductos por exocitosis. Estos enzimas comprenden la mayoría de los enzimas implicados en la digestión de los alimentos ingeridos. La gran mayoría de estos son almacenados en forma de pro-enzima en los gránulos de zimógeno para evitar la auto-digestión del tejido pancreático como sucede en la pancreatitis. El páncreas exocrino es el órgano que presenta una mayor tasa de síntesis proteica, y aproximadamente el 80% de las proteínas sintetizadas son los enzimas digestivos y por ello se usan como marcadores de diferenciación pancreática acinar.

Los 4 grupos principales de enzimas digestivos secretados por las células acinares son: amilolíticos, lipolíticos, proteolíticos y nucleolíticos (Tabla 1.1).

Los enzimas más abundantes son los enzimas proteolíticos: tripsinógeno, quimiotripsinógeno, procarboxipeptidasa, proelastasa y proteasas. Debido a su potencial para digerir el propio tejido pancreático son secretadas como pro-enzimas inactivos y una vez en el lumen duodenal el tripsinógeno es activado por acción de la enteroquinasa secretada por la mucosa duodenal y se convierte en tripsina, la cual a su vez, es capaz de activar el tripsinógeno y también de convertir el resto de enzimas proteolíticos en sus

formas activas (Tabla 1.1). Las formas activas de estos enzimas son: tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidasa y elastasa.

El jugo pancreático también contiene inhibidor de tripsina, que protege al órgano de la posible auto-digestión por posibles residuos de tripsina que pudieran hallarse en los conductos pancreáticos. El resto de enzimas:  $\alpha$  amilasa (enzima amilolítica), lipasa, fosfolipasa, carboxilesterasa (enzimas lipolíticas), desoxiribonucleasa y ribonucleasa (enzimas nucleolíticas) son secretadas por las células acinares en sus formas activas.

<b>Enzimas</b>	<b>Activador</b>
<b>Enzimas Proteolíticos</b>	
Tripsinógeno	Enteroquinasa, tripsina
Quimiotripsinógeno	Tripsina
Proelastasa	Tripsina
Proproteasa E	Tripsina
Procarboxipeptidasa A y B	Tripsina
<b>Enzimas Amilolíticas</b>	
Amilasa	
<b>Enzimas Lipolíticas</b>	
Lipasa	
Profosfolipasa A2	Tripsina
Colipasa	
Carboxilesterasa	
<b>Enzimas nucleolíticas</b>	
Ribonucleasas	
Desoxiribonucleasas	

**Tabla 1.1: Lista de los enzimas digestivos sintetizados y secretados en las células acinares.** La columna 1 muestra los enzimas digestivos agrupados según su sustrato, en la columna 2 se muestra el enzima que cataliza el paso de proenzima inactivo a enzima activo.

## **1.4. LA SECRECIÓN PANCREÁTICA**

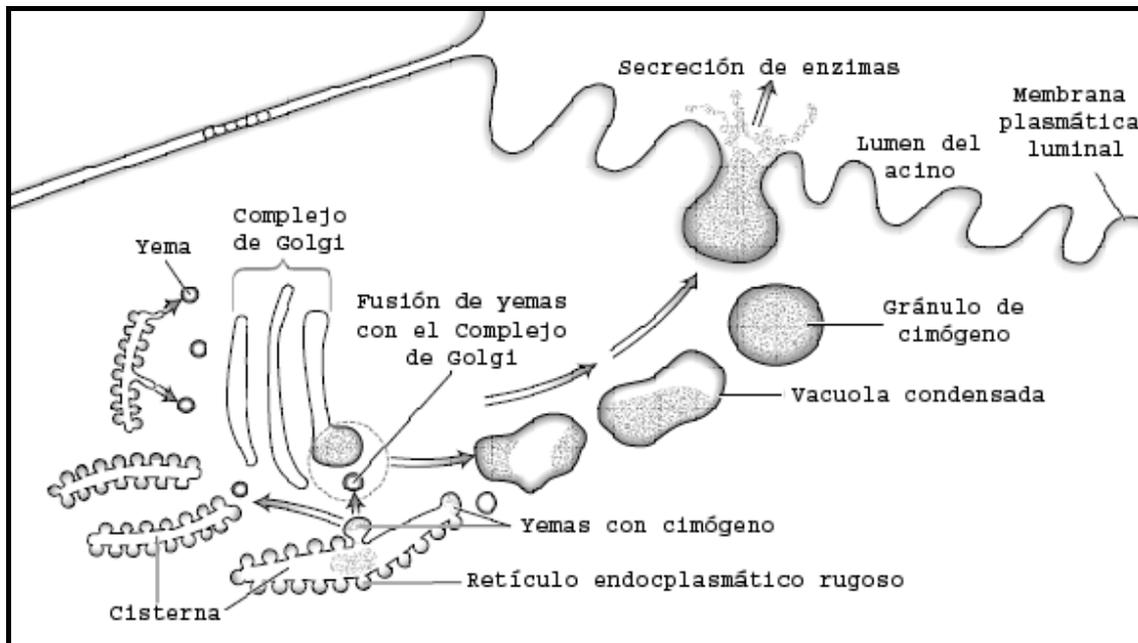
### **1.4.1. SECRECIÓN DE LOS ENZIMAS DIGESTIVOS**

El mecanismo de secreción de los enzimas digestivos en el páncreas se ilustra en la Figura 1.5. Los enzimas o precursores son sintetizados en el retículo endoplasmático rugoso, posteriormente se almacenan en las cisternas del retículo endoplasmático y unas pequeñas vesículas se liberan de las membranas de las cisternas

y se fusionan a las membranas del complejo de Golgi, formándose así pequeñas vacuolas condensadas que contienen los enzimas. Éstas se desplazarán hacia la zona apical aumentando su condensación y su acidofilia, denominándose entonces gránulos de cimógeno. La secreción de los gránulos requiere la fusión de la membrana del gránulo con la membrana plasmática apical de la célula acinar. Este proceso tiene lugar en cuatro pasos (Figura 1.6). Primero, los gránulos de cimógeno tienen que moverse del trans-Golgi a la región apical de la célula; este proceso requiere la actividad de los elementos contráctiles, como actina. Segundo, una vez en la región apical, los gránulos tienen que reconocer la membrana plasmática. Tercero, los gránulos se unen a la membrana y por último, se fusionan con la membrana apical. En este mecanismo de reconocimiento y fusión de los gránulos con la membrana están implicadas principalmente dos familias de proteínas, las proteínas SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Receptor) y las proteínas G de la familia Rab. Las proteínas Rab están implicadas en el reconocimiento y unión del gránulo con la membrana y las proteínas SNARE están implicadas en la fusión proporcionando la energía necesaria para ésta (Figura 1.6). También juega un papel importante en la exocitosis, el citoesqueleto de la célula, tanto indirectamente, en el mantenimiento de la arquitectura y compartimentación de la célula, como directamente, proveyendo la fuerza motriz para el movimiento de los gránulos y para la regulación de la exocitosis.

Las proteínas Rab son pequeños monómeros de proteínas G de la superfamilia de Ras. Un elevado número de proteínas Rab han sido identificadas en los gránulos de cimógeno de las células acinares: Rab 3D, 4, 5, 11, 27B (46, 123, 216, 217, 219, 287). Los más importantes en la exocitosis de los gránulos son Rab3D y Rab27B. Trabajos recientes de expresión mediante adenovirus que expresan dominantes negativos de Rab3D en acinos aislados, muestran que la secreción de amilasa en respuesta a CCK (ver apartado 1.4.2) se inhibe un 40-50% y sugieren que Rab3D juega un papel importante en la regulación de la unión de los gránulos de cimógeno con la membrana plasmática para su exocitosis (46). Sin embargo, el ratón *knock-out* (KO) de Rab3D carece de defectos en el proceso de secreción regulada por secretagogos, aunque se observan gránulos de tamaño muy grande. Este fenotipo sugiere un posible papel de Rab3D en la maduración de los gránulos de cimógeno, posiblemente previniendo la fusión de distintos gránulos (237). Recientemente, también se ha demostrado el papel de

Rab27B en la regulación de la exocitosis regulada, y no en la formación de los gránulos, con el uso de mutantes de Rab27B expresados con adenovirus (46).



**Figura 1.5: Mecanismo de secreción de los gránulos de cimógeno en la célula acinar pancreática.** Figura adaptada de *Pancreas exocrine function*; [www.fleshandbones.com/readingroom/pdf/105.pdf](http://www.fleshandbones.com/readingroom/pdf/105.pdf)

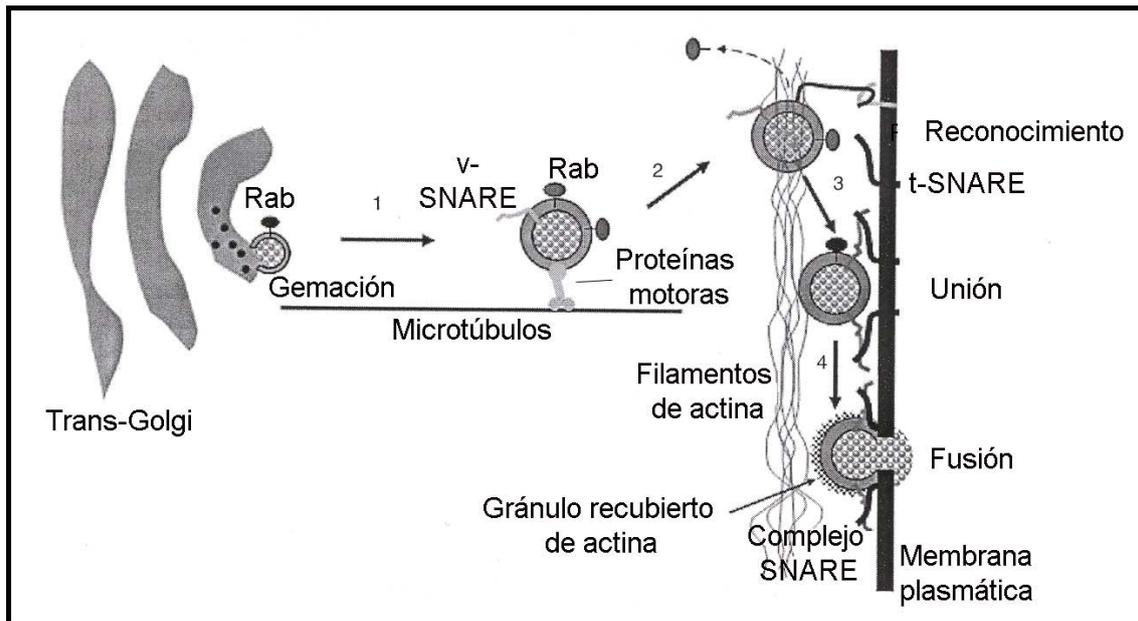
Las proteínas SNARE se localizan tanto en la membrana plasmática como en la membrana de los gránulos. Las v-SNARE se encuentran en los gránulos y se unen a las t-SNARE que hay en la membrana plasmática formando un complejo sináptico SNARE que permite la fusión de las membranas (Figura 1.6). En el páncreas se conocen las siguientes proteínas SNARE: VAMP-1 (sinaptobrevina), VAMP-3 (celulobrevina) y VAMP-8 (endobrevina) en los gránulos (80, 83, 288); Sintaxina 2 en la membrana plasmática apical, sintaxina 4 en la membrana basolateral, sintaxina 3 en los gránulos (80), y SNAP-23 en la membrana basolateral (84). VAMP-8 es muy importante para la exocitosis de los gránulos como se ha observado en el ratón KO, que muestra un bloqueo total en la exocitosis regulada y además las células acinares de estos ratones presentan tres veces más gránulos de cimógeno (288). Se han identificado las proteínas que formarían el complejo SNARE con VAMP-8, siendo éstas SNAP-23 (82, 119) y sintaxina 4 (288), aunque no queda muy claro todavía el mecanismo exacto con el que acontece. Por otro lado, parece que sintaxina 2 mediaría la fusión entre gránulo y membrana apical y sintaxina 3 mediaría la fusión entre gránulos (103).

Recientemente se ha descrito el papel de sincolina, una proteína presente en la membrana luminal de los gránulos, en la regulación de su exocitosis. El ratón deficiente para la expresión de esta proteína no tiene problemas en la secreción de amilasa, aunque presenta anomalías en la vía secretora tanto en la síntesis como en el transporte de los gránulos (8). Recientemente, otro grupo ha demostrado al contrario, que estos ratones presentan un defecto en la secreción de amilasa, la cual se inhibe un 50%, debido a un problema en la fusión secundaria de gránulos con otros gránulos que ya han iniciado su fusión con la membrana plasmática (289).

También juegan un papel importante en la secreción de los gránulos los receptores de proteínas cargo, que están asociadas a la membrana luminal del aparato de Golgi y son importantes para la selección de las proteínas desde el TGN (trans-golgi network) hasta la formación de los gránulos. Entre ellas, se ha descrito la importancia de pro-muclina (53, 54), que se procesa en el TGN a muclina y que une las proteínas que formarán los gránulos a pH ácido. Su sobreexpresión en una línea celular acinar de rata, AR42J, que no presenta secreción regulada y carece de gránulos, es suficiente para inducir la formación de éstos y la secreción regulada en respuesta a un estímulo (55). Además se ha descrito que a pH medio ácido pro-muclina se une a amilasa, pro-lipasa, pro-carboxipeptidasa A, pro-elastasa II y quimiotripsinógeno B. Estas uniones son pH dependientes y tienen lugar gracias a los grupos sulfato O-glicosilados de su cola luminal (C-terminal) (30).

#### **1.4.2. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN PANCREÁTICA**

El control de la secreción exocrina y ductal del páncreas están reguladas por mecanismos hormonales (colecistoquinina (CCK), secretina, gastrina y somatostatina) y por mecanismos neurales, por neurotransmisores (acetilcolina (Ach) y polipéptido vasoactivo intestinal (VIP)) (Figura 1.7).



**Figura 1.6:** Esquema del mecanismo de secreción de los gránulos de zimógeno en el que se muestra el papel de las proteínas más importantes implicadas en la exocitosis. 1) Formación de las vesículas con los enzimas en el Trans-Golgi y desplazamiento de éstas a través de los microtúbulos gracias a proteínas motoras. 2) Reconocimiento de la membrana plasmática gracias a las proteínas Rab (que después del reconocimiento se disocian). 3) Unión del gránulo de zimógeno a la membrana a través de proteínas SNARE (v-SNARE en el gránulo y t-SNARE en la membrana) formándose el complejo SNARE. 4) Gracias a la formación del complejo SNARE tiene lugar la fusión del gránulo con la membrana plasmática y con ello la secreción de los enzimas digestivos. *Figura adaptada del libro Physiology of the gastrointestinal tract, cuarta edición volumen 2, capítulo 53: 1358.*

### 1.4.2.1. CONTROL HORMONAL

#### 1.4.2.1.1. ESTIMULACIÓN DE LA SECRECIÓN PANCREÁTICA

La secretina, CCK y gastrina son hormonas secretadas por células del estómago y el duodeno en respuesta a la ingesta de comida y regulan la secreción pancreática.

La secretina es el más potente estimulador de la secreción del jugo pancreático, promoviendo principalmente la estimulación de la secreción hidroelectrolítica por parte de las células ductales. La secretina se produce en el intestino delgado proximal y el principal regulador de la liberación de ésta es el pH duodenal (166). La secretina también inhibe la secreción de insulina y glucagón.

La secretina y el VIP actúan sobre la célula acinar induciendo un incremento en los niveles intracelulares de AMPc (Figura 1.7) y este incremento potencia el efecto de

CCK y gastrina, de manera que la secreción de enzimas es mayor cuando los dos tipos de secretagogos actúan juntos.

La gastrina y la CCK estimulan la secreción y síntesis de enzimas digestivos actuando sobre el mismo receptor (Figura 1.7). CCK es secretada por células del intestino delgado proximal y su producción está estimulada por la presencia de ácidos grasos y Aa (aminoácidos) en el intestino. La gastrina es secretada por las células del estómago y su principal efecto es la estimulación de la secreción y la síntesis de enzimas digestivos en las células acinares a través del incremento del calcio intracelular. Pero la CCK también ejerce otras acciones como: estimular la liberación de enzimas de la mucosa del intestino delgado, como secretina, estimular el incremento del flujo biliar y estimular la liberación de polipéptido pancreático (PP).

La insulina, que es secretada por las células  $\beta$  del páncreas, actúa directamente sobre la célula acinar y potencia la respuesta secretora de la secretina en combinación con la CCK (183). Otros estimuladores de la secreción pancreática son la bombesina, la neurotensina y el óxido nítrico.

#### **1.4.2.1.2. INHIBICIÓN DE LA SECRECIÓN PANCREÁTICA**

La regulación de la secreción pancreática depende de un equilibrio entre estímulos secretores e inhibidores. Los factores inhibidores de la secreción pancreática son mucho menos conocidos. La secreción de glucagón inhibe la secreción pancreática exocrina. Otras hormonas inhibidoras de la secreción exocrina son la somatostatina y el PP que actúan a través de mecanismos colinérgicos, y también el péptido YY y el péptido glucagón-like, liberados en el íleon y en el colon (225).

Por otra parte, la propia acción de las proteasas pancreáticas es capaz de regular la secreción pancreática por un mecanismo de retroalimentación; de este modo la administración intraduodenal de tripsina y quimiotripsina inhibe la liberación de CCK y de los enzimas digestivos. Por último, la secreción biliar también inhibe la liberación de CCK.

### **1.4.2.2. CONTROL NEURAL**

#### **1.4.2.2.2. ESTIMULACIÓN DE LA SECRECIÓN PANCREÁTICA**

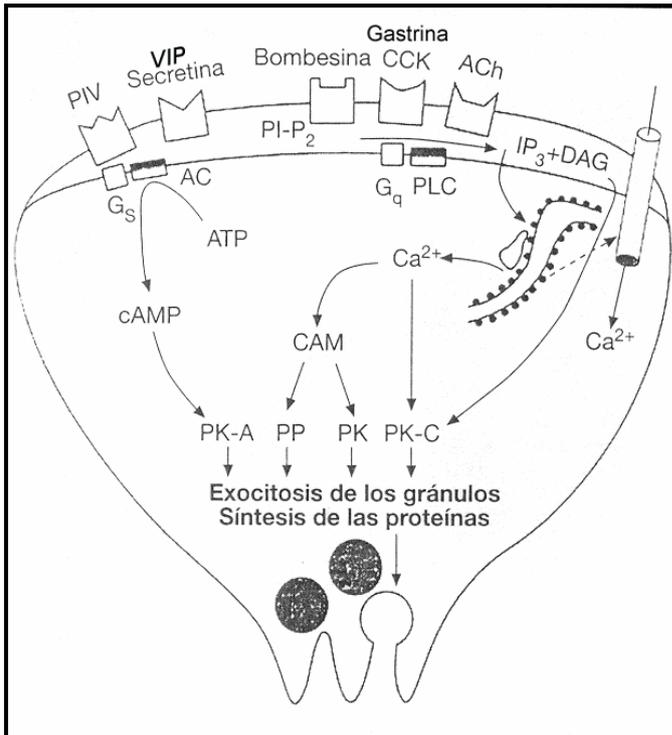
El control neural de la secreción pancreática viene mediada por el sistema parasimpático y el sistema simpático. La estimulación de fibras colinérgicas en el nervio vago induce la secreción de enzimas y de hidroelectrolitos. Se han identificado receptores muscarínicos en las células acinares y además, parece que el papel del sistema colinérgico en la estimulación de la secreción pancreática se realiza a través de la modulación de la secreción de secretina y de CCK (225).

##### **1.4.2.2.1. INHIBICIÓN DE LA SECRECIÓN PANCREÁTICA**

El sistema nervioso simpático inhibe la secreción pancreática endocrina y exocrina, sobretodo la secreción de agua y bicarbonato y este efecto se halla mediado, al menos en parte, por la producción de vasoconstricción.

### **1.4.3. MECANISMOS INTRACELULARES DE CONTROL DE LA SECRECIÓN PANCREÁTICA.**

El proceso de secreción de los enzimas digestivos por las células acinares está controlado fisiológicamente por hormonas y neurotransmisores (secretagogos). Para que tenga lugar la exocitosis de los gránulos, los secretagogos pueden inducir la secreción de manera dependiente de calcio o dependiente de AMPc (Figura 1.7). En general CCK y ACh al unirse a su receptor inducen un incremento de la concentración de calcio intracelular y una concomitante activación de la proteína quinasa C (PKC), teniendo lugar una exocitosis dependiente de calcio. Por otro lado el VIP y la secretina incrementan los niveles de AMPc que en otros tipos celulares inician o potencian la exocitosis. Trabajos recientes demuestran que en las células acinares ni la activación de PKC ni el AMPc, por si solos, pueden dirigir la exocitosis de los gránulos de cimógeno, pero que ambos pueden potenciar el efecto de la exocitosis calcio-dependiente (159). Aunque la activación de la PKC y el incremento de AMPc sí que pueden, por si solos, inducir la secreción hidroelectrolítica.



**Figura 1.7: Mecanismos intracelulares de control de la secreción pancreática.** La unión de los secretagogos a sus receptores (localizados en la membrana plasmática basal de la célula acinar) inducen la activación de proteínas G que conducen a la formación de mensajeros intracelulares (calcio y AMPc). La activación de los receptores de VIP y secretina y su unión con una proteína G ( $G_s$ ), promueven la activación de la adenilato ciclasa (AC) y la formación de AMPc, que activan a la fosfoquinasa-A (PK-A) la cual induce la secreción de agua y bicarbonato en las células ductales. Por otra parte, la activación de los receptores de bombesina, CCK y ACh y su unión con proteínas G ( $G_q$ ), activa la fosfolipasa C (PLC).

La PLC hidroliza el fosfatidil-inositol (PI-P<sub>2</sub>) y produce inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). Este IP<sub>3</sub> se une a su receptor en el retículo, liberando el calcio del orgánulo. Este calcio puede unirse a calmodulina (CAM) y se activan varias proteínas quinasas (PP, PK, PK-C) que favorecerán tanto la síntesis de enzimas digestivos como la exocitosis de los gránulos de cimógeno. *Figura adaptada del libro Physiology of the gastrointestinal tract, cuarta edición volumen 2, capítulo 53: 1357.*

Los receptores a los cuales se unen los secretagogos pancreáticos son proteínas G con 7 segmentos transmembrana (125) y se encuentran en la membrana basal de la célula acinar. Hay dos tipos de receptores para CCK, el A y el B. El receptor A es el más específico para CCK además de ser el más abundante en las células acinares de roedores, mientras que el receptor B une tanto CCK como gastrina. Los receptores de ACh son los receptores muscarínicos, siendo la isoforma 3 (M<sub>3</sub>) (126) la más abundante en las células acinares.

Por otro lado, las isoformas 2 y 3 del receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>R) son las más abundantes en los acinos. La isoforma 3 ha sido la más bien caracterizada en el páncreas. Este receptor está localizado en el retículo endoplasmático y media la movilización de calcio del retículo hacia el citoplasma en respuesta al segundo mensajero, inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>). Se ha descrito que el ratón deficiente para ambas isoformas no secreta enzimas digestivos en respuesta a CCK, indicando el importante papel del IP<sub>3</sub>R2 y 3 en la secreción regulada (79). Se ha descrito que los almacenes de calcio intracelular de la zona apical de la célula (donde se encuentran los

gránulos de zimógeno) son más sensibles al IP<sub>3</sub> de manera que esto permite una respuesta secretora localizada y rápida (125).

### **1.4.3.1. Señales de calcio intracelular**

Las señales de calcio que muchos mensajeros intracelulares producen pueden medirse con sondas fluorescentes unidas a grupos de ésteres de acetoximetil que una vez retenidas dentro de la célula son sensible a cambios de calcio que se pueden medir a tiempo real mediante microscopía de fluorescencia; así que la intensidad de fluorescencia de la sonda se corresponde a la cantidad de calcio en el citoplasma.

El calcio juega un papel central en el control de la secreción de los enzimas digestivos al mobilizarse de los orgánulos intracelulares donde se almacena en el citoplasma. Esta movilización tiene lugar después de la unión de los secretagogos a sus receptores de la membrana plasmática de las células acinares, que implica la activación de distintas vías de señalización.

En los acinos pancreáticos en presencia de colecistoquinina (CCK) o Acetilcolina (Ach), pueden tener lugar dos tipos de respuesta de las variaciones de calcio intracelular: una respuesta transitoria a concentraciones máximas de CCK de 10-100 nM (Figura 1.8A) y de Ach de 200-500 nM o una respuesta oscilatoria a concentraciones bajas, casi fisiológicas, de 1-50 pM para CCK y de 50-400 nM para Ach (Figura 1.8B).

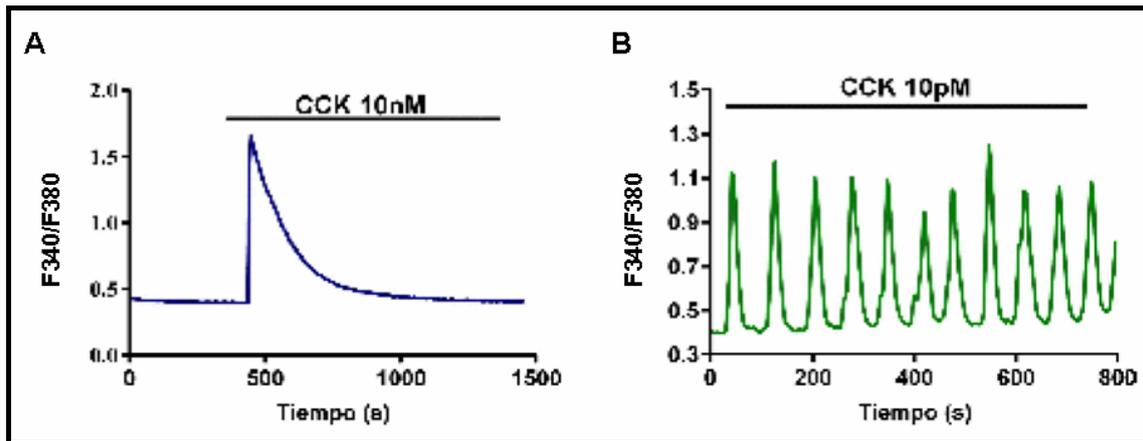
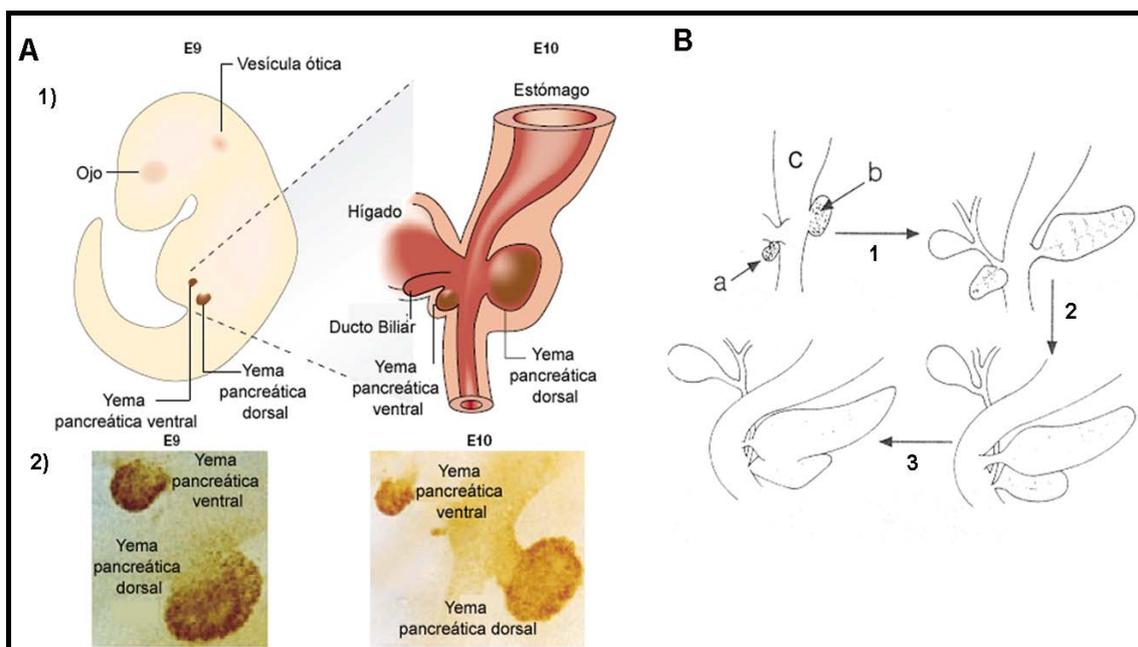


Figura 1.8: Gráficas que representan el aumento de la concentración de calcio citosólico en células acinares de páncreas cargadas con el indicador Fura-2 en respuesta a secretagogos. **A)** Concentraciones máximas de secretagogos inducen una **respuesta transitoria** de las concentraciones de calcio intracelular, que resultan en una salida rápida de calcio de los almacenes intracelulares que declina rápidamente hasta llegar al nivel basal inicial. **B)** Bajas concentraciones de secretagogos inducen una **respuesta oscilatoria** de las salidas de calcio de sus almacenes intracelulares. Figura adaptada de [www.ciencia.cl](http://www.ciencia.cl).

## 2. DESARROLLO PANCREÁTICO

El páncreas se desarrolla a partir de la mitad del período de gestación en el ratón, a partir de una yema dorsal y una ventral que emergen del endodermo intestinal primitivo a partir de E8.5 (Figura 1.9A) y posteriormente cuando tiene lugar la rotación del estómago y del duodeno las dos yemas se posicionan en el mismo lado y se fusionan, aproximadamente en el estadio E13-14, para dar lugar al páncreas (Figura 1.9B). La yema dorsal dará lugar a la parte de la cabeza del páncreas, al cuerpo y la cola, y la yema ventral dará lugar al resto de la cabeza del páncreas. El epitelio pancreático es especificado por señales inductivas a E8.5 y a partir de este momento empieza a proliferar y tienen lugar un proceso de ramificación y morfogénesis. En el estadio de E9-10, se inicia la diferenciación del epitelio observándose las primeras células endocrinas asociadas al epitelio ductal. La aparición de las primeras células acinares tiene lugar pocos días después (E12-13). Posteriormente, el desarrollo endocrino tendrá lugar a partir de la migración de las células pre-diferenciadas de los ductos, que se organizan primero en pequeños grupos de células, que a partir de E17.5 formarán islotes maduros. A E14-15 se distinguen histológicamente los ductos y los acinos. Post-natalmente, tiene lugar un incremento en la masa del páncreas durante las primeras semanas.



**Figura 1.9: A) El páncreas deriva del endodermo intestinal primitivo a partir de una yema dorsal y ventral.** 1) Representación esquemática del páncreas en el estadio de E9-10 en el ratón. 2) Imágenes de inmunohistoquímica de muestras de embriones de ratón de los

correspondientes estadios con un anticuerpo anti-Pdx1. *Figura adaptada de Edlund H., 2002.*  
**B) Fusión de las yemas dorsal y ventral.** 1) Páncreas ventral (a) y dorsal (b) que derivan del endodermo del tubo digestivo primitivo (c). 2) Rotación del páncreas ventral hasta quedar anclado junto al páncreas dorsal. 3) Fusión de ambas porciones *Figura adaptada del libro Physiology of the gastrointestinal tract, cuarta edición volumen 2, capítulo 53: 1357.*

La inducción de la formación del páncreas está regulada por señales enviadas por las células y los tejidos vecinos. Durante el desarrollo embrionario, las yemas pancreáticas están en contacto con distintos tejidos, de manera que las señales que reciben durante su diferenciación no son las mismas. Inicialmente, el endodermo dorsal está en contacto con la notocorda, más tarde con la aorta dorsal y por último, con el mesénquima pancreático. En cambio, el endodermo ventral está en contacto primero con el mesodermo lateral y más tarde con el septum transversum, el mesodermo cardíaco, las venas vitelinas y por último, el mesénquima pancreático (Figura 1.10, Tabla 1.2). Las señales que regulan el desarrollo de la yema dorsal se conocen mejor que las que regulan la yema ventral. Para estudiar los factores y los tejidos implicados en el desarrollo del páncreas se han hecho muchos estudios *in vitro* con explantes en ensayos de recombinación de tejidos o bien con factores solubles. Para el estudio de las vías de señalización implicadas en la diferenciación pancreática han sido muy útiles los modelos animales genéticamente modificados.

Páncreas Dorsal	Páncreas ventral
Notocorda	Mesodermo lateral
Aorta Dorsal	Septum Transversum
Mesénquima pancreático	Mesodermo cardíaco
	Venas vitelinas
	Mesénquima pancreático

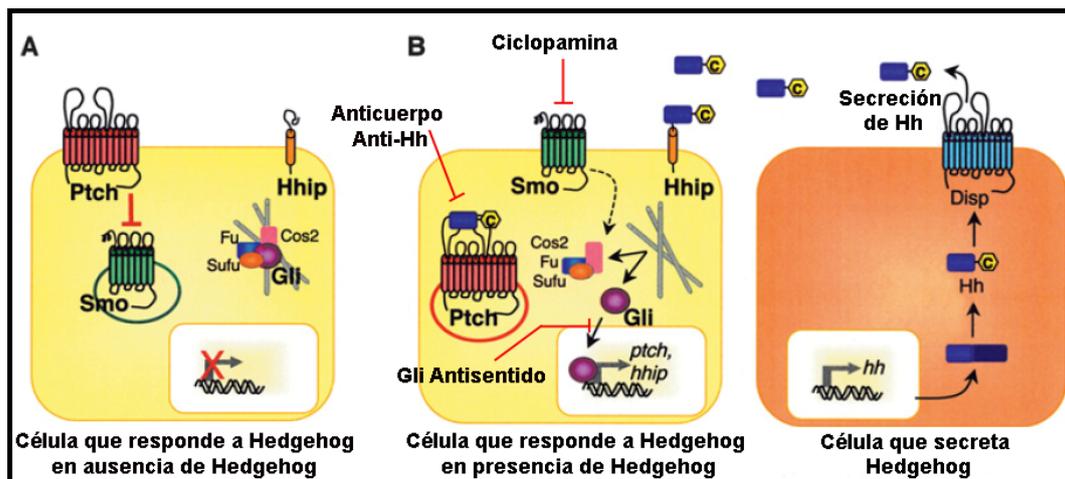
**Tabla 1.2: Resumen de los tejidos cuyas señales regulan la formación del páncreas, en orden cronológico.**

## **2.1. ESPECIFICACIÓN PANCREÁTICA TEMPRANA**

### **2.1.1. LA NOTOCORDA Y LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE HEDGEHOG**

Alrededor del estadio E8.5 el endodermo pancreático que dará lugar a la yema dorsal está en contacto con la **notocorda** hasta que tiene lugar la fusión de las aortas dorsales. En los cultivos de explantes de endodermo dorsal de pollo, en ausencia de la notocorda, no se observa la inducción de la diferenciación pancreática que se

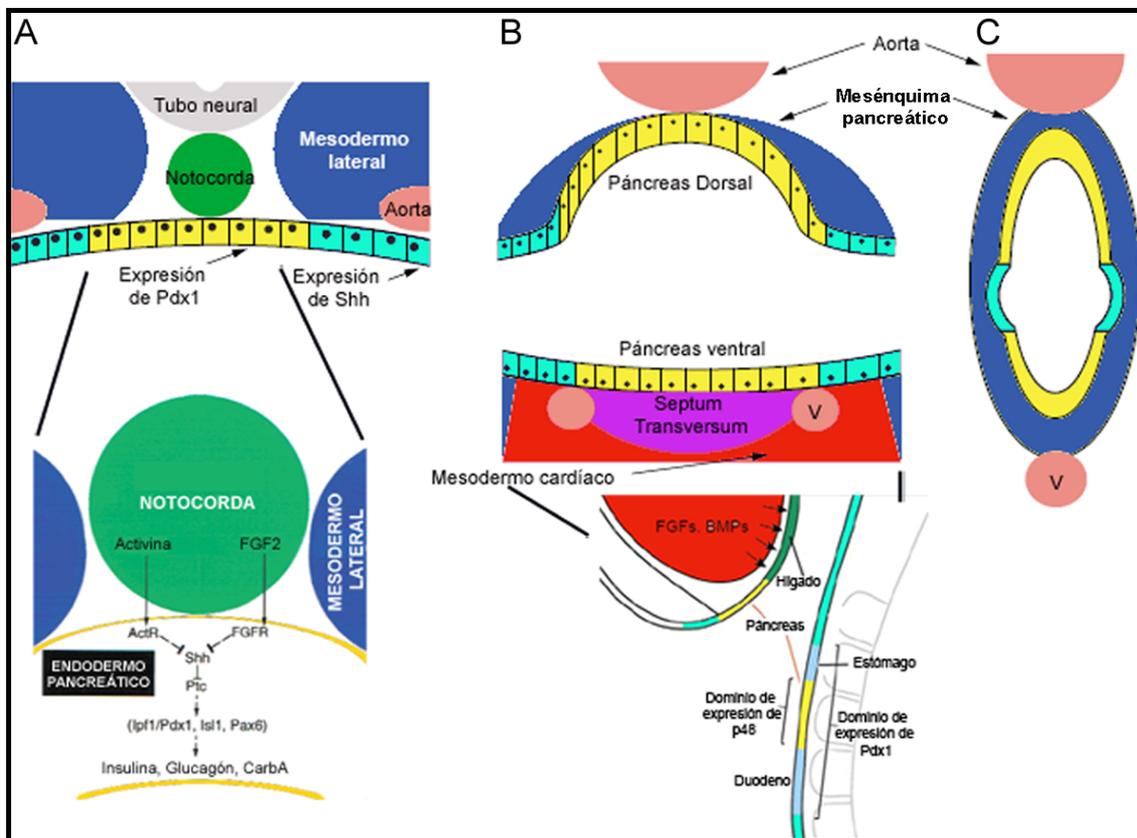
reestablece en cultivos en que se reintroduce ésta. Esto indica que la notocorda envía señales permisivas para la diferenciación pancreática (140). Esta región del endodermo dorsal no expresa ni **Sonic hedgehog (Shh)** ni **Indian hedgehog (Ihh)**, que se expresan en el endodermo adyacente que dará lugar a estómago y duodeno (108). Shh e Ihh son miembros de la familia Hh (hedgehog) (Figura 1.10); los distintos miembros de esta familia juegan un papel crucial durante el desarrollo embrionario en la diferenciación y la morfogénesis de distintos tejidos.



**Figura 1.10: Vía de señalización de Hh.** **A) Célula que responde a Hh en ausencia de Hh:** En ausencia del ligando Hh, el receptor Patched (Ptch) se localiza en la membrana celular, donde inhibe la re-localización de las vesículas con Smo (Smothened) en la membrana. El factor de transcripción Gli está unido al citoesqueleto por un complejo de proteínas que incluye Fused (Fu), Supresor de Fused (Sufu) y Costal (Cos2). Hhip (Hh interacting protein) se encuentra en la membrana. **B) Célula que responde a Hh en su presencia y célula que secreta Hh.** La célula que secreta Hh, transcribe y procesa los ligandos Hh. La secreción de los ligandos procesados tiene lugar a través de Dispatched (Disp). El ligando secretado se une al receptor Ptch, que es internalizado, y las vesículas con Smo se re-localizan en la membrana. En la membrana, Smo activa vías de señalización que al final inducen la liberación de Gli de su unión con el citoesqueleto y su translocación al núcleo, donde actúa como activador transcripcional de genes diana de Hh. Hhip puede unir el exceso de ligando a la superficie celular. Se ha conseguido inhibir la vía de Hh en distintos puntos, a nivel del receptor Smo con ciclopamina, a nivel de ligando Hh con un anticuerpo anti-Hh y con una sonda antisentido para Gli. *Figura adaptada de Lau J., 2006.*

La inhibición de la expresión de Shh y Ihh en el endodermo pre-pancreático dorsal es muy importante, ya que se ha demostrado que la expresión ectópica de Shh bajo el control del promotor de Pdx1 en ratón induce la conversión de mesodermo pancreático a mesénquima intestinal (9). Se han identificado activina B y FGF2 como los factores secretados por la notocorda que inhiben la expresión de Shh e Ihh (Figura 1.11A) (9, 108). El efecto principal de esta inhibición es la inducción de la expresión de Pdx1 en el endodermo pre-pancreático, que es un factor de transcripción con homeobox

que se expresa en progenitores pancreáticos, la ausencia del cual implica agénesis pancreática (130, 213). Pdx1, en el estadio de E8.5, no sólo se expresa en el endodermo pancreático dorsal y ventral sino que también se expresa en el endodermo duodenal y del estómago, pero el desarrollo pancreático sólo tiene lugar en aquella región en que la expresión de Shh está reprimida. La inhibición de la vía de señalización de Shh con ciclopamina (compuesto químico que bloquea la vía de señalización de HH) implica el desarrollo ectópico tanto de células endocrinas como exocrinas en el duodeno y el estómago (142). Por otra parte, en el ratón KO para Shh el desarrollo pancreático no se ve muy afectado, pero se observa una expansión del dominio pancreático tanto anterior como posterior (109) (Figura 1.11A).



**Figura 1.11: Interacciones secuenciales entre el endodermo primitivo intestinal y tejidos derivados del mesodermo.** **A)** A E8 la notocorda (verde) está en contacto directo con el endodermo pre-pancreático dorsal, inhibiendo la expresión de Shh (amarillo), inhibición que a su vez permite la expresión de Pdx1. Los factores secretados por la notocorda que median esta inhibición son Activina B y FGF2. El endodermo adyacente expresa Shh (azul). También se observan el mesodermo lateral y las aortas dorsales que más tarde estarán en contacto con el endodermo pancreático dorsal. **B)** En el estadio de E8.5-9 se observa la formación de la yema dorsal y la yema ventral. Esta última estará en contacto con el septum transversum y expresará también Pdx1. Posteriormente el mesodermo cardíaco (rojo) induce la expresión de marcadores hepáticos (verde) en el endodermo primitivo intestinal que le queda más próximo. El endodermo pre-pancreático ventral que no recibe las señales del mesodermo cardíaco expresa marcadores pancreáticos (amarillo) por defecto. No todas las células del endodermo que

expresan Pdx1 darán lugar al páncreas (azul claro). La expresión de p48 (Ptf1a) junto con Pdx1 define la región del endodermo que dará lugar al páncreas (amarillo). También el endotelio de los vasos sanguíneos manda señales al endodermo pancreático ventral para su diferenciación. C) A E9.5 el mesénquima rodea tanto el endodermo pancreático dorsal como ventral que estarán separados por el endodermo duodenal que expresa Shh. *Figura adaptada d. Kim S et al., 2000; 2002.*

### 2.1.2. CÉLULAS ENDOTELIALES: AORTA DORSAL Y VENAS VITELINAS

Posteriormente, la notocorda deja de estar en contacto con el endodermo pre-pancreático porque tiene lugar la fusión de las **aortas dorsales**. Ahora pues, es la aorta dorsal la que está en contacto con el endodermo pancreático dorsal y esta interacción regula los siguientes procesos: la formación de la yema (40), el mantenimiento de la expresión de Pdx1 e insulina (153) y la inducción de la expresión de p48 (303), un factor de transcripción de la familia de bHLH que, como Pdx1, es clave para el desarrollo temprano del páncreas. Además, el contacto del endodermo pancreático con células endoteliales favorece la diferenciación endocrina en experimentos de recombinación del endodermo con endotelios de aorta, arteria umbilical y mesodermo lateral (153) (Figura 1.11A-C).

También se ha descrito que las venas vitelinas podrían jugar un papel importante en el desarrollo del endodermo pancreático ventral, pudiendo tener un papel similar al de la aorta en el endodermo pancreático dorsal, en el mantenimiento de la expresión de Pdx1 y la diferenciación endocrina; pero no son necesarias para la inducción de p48 en la yema ventral (303).

### 2.1.3. MESODERMO LATERAL, MESODERMO CARDÍACO Y SEPTUM TRANSVERSUM

Como ya se ha comentado, debido a las diferencias de posicionamiento entre la yema dorsal y la yema ventral, las primeras señales que recibe el endodermo pre-pancreático ventral derivan del **mesodermo lateral** (Figura 1.11B). Experimentos en explantes de pollo demuestran que dichas señales son instructivas ya que por si solas inducen, en el endodermo anterior al pancreático, la expresión de distintos marcadores pancreáticos e incluso generan estructuras *islet-like* en el endodermo en cultivo (150).

Los posibles factores implicados en este efecto son miembros de la familia de BMPs (bone morphogenetic protein), ácido retinoico (RA) y activina, según ensayos *in vitro* donde mimetizan el efecto del mesodermo lateral. Aunque todavía no está claro si estos factores son los encargados de reprimir la expresión de Shh en el endodermo ventral. Se han hecho estudios *in vitro* de cultivo del endodermo pancreático ventral y se ha observado que no expresa Shh y que éste por defecto activa un programa de diferenciación pancreática. Si este endodermo se cultiva con **mesodermo cardíaco** o **septum transversum** el programa de diferenciación pancreático se reprime y se favorece la diferenciación hepática, hecho que apoyaría la hipótesis de un posible progenitor bipotencial hepato-pancreático en el endodermo ventral (58). FGF2 (Fibroblast growth factor-2) y BMP4 se expresan en el mesodermo cardíaco y el septum transversum, respectivamente; así pues, se ha analizado el efecto de estos dos factores para identificar si eran los responsables de la decisión, por parte del precursor bipotencial, entre diferenciación hepática o pancreática (245). Se ha observado que FGF2 tiene un papel dual en la diferenciación pancreática, siendo necesario en el endodermo dorsal para la represión de Shh, (promoviendo la diferenciación pancreática), pero contrariamente su efecto fuera del dominio endodérmico pancreático promueve la expresión de Shh y también el destino hepático (Figura 1.11B).

Modelos de animales modificados genéticamente han demostrado que las vías de señalización implicadas en el desarrollo de las yemas no son tampoco las mismas. Por ejemplo, el ratón KO de Hlxb9 (104, 164) o Isl-1 (4) no desarrolla la yema dorsal mientras que la ventral no está afectada. Por otro lado, la inactivación de p48, que se expresa en los progenitores pancreáticos, implica un pobre desarrollo del árbol ductal dorsal, mientras que los progenitores de la yema ventral adquieren un destino intestinal (137).

## **2.2. CRECIMIENTO Y FORMACIÓN DEL ÁRBOL DUCTAL**

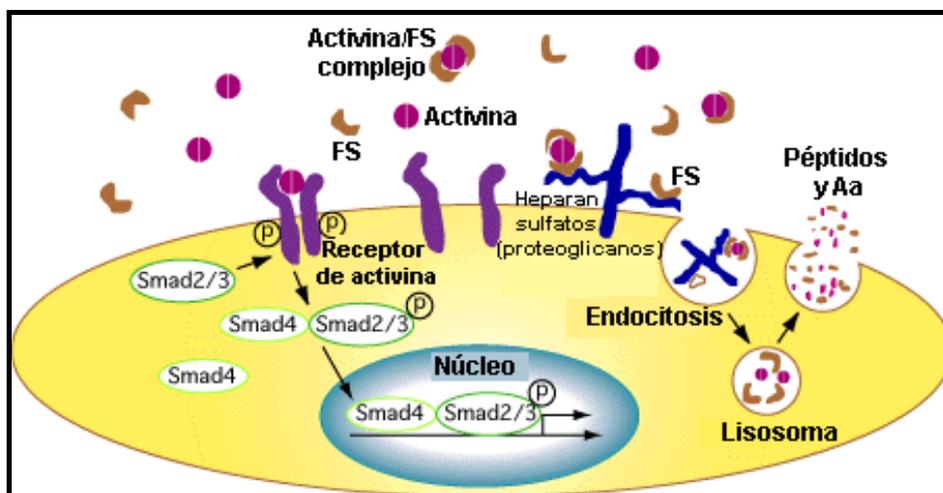
### **2.2.1. MESÉNQUIMA PANCREÁTICO (INTERACCIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA)**

Después de la especificación inicial del endodermo pancreático y la formación de las yemas tiene lugar el crecimiento de la yema y la formación del árbol ductal. En esta fase, el epitelio pancreático está en contacto con el **mesénquima pancreático** que lo envuelve (Figura 1.11B-C). Para la formación del mesénquima pancreático es necesaria la expresión de Isl-1, Pbx-1 y N-cadherina (4, 68, 143). El ratón KO para Pbx-1 presenta hipoplasia pancreática dorsal y pérdida del desarrollo acinar. Experimentos de recombinação de tejido muestran que el epitelio dorsal del ratón KO de Pbx1 en contacto con mesénquima salvaje, rescata la diferenciación acinar, pero no el crecimiento del epitelio (141).

La **interacción epitelio-mesénquima** pancreáticos es muy importante para la diferenciación, proliferación, crecimiento y ramificación del epitelio pancreático, pero todavía no se conocen claramente las señales mesenquimales que causan estos efectos (65). Estudios iniciales en los años 70 indican que la mayoría de los efectos del mesénquima están mediados por factores solubles secretados. Estudios *in vitro* con explantes de rudimentos pancreáticos de rata del estadio de E12.5 muestran que el epitelio pancreático por defecto, en ausencia de mesénquima, se diferencia a tejido endocrino y que en presencia de éste, se diferencia a tejido exocrino; así pues el mesénquima parece regular las proporciones relativas de tejido endocrino y exocrino (194). Recientemente, se ha descrito que el efecto del mesénquima sobre la diferenciación exocrina y endocrina puede venir mediada por la distancia entre epitelio y mesénquima (167); indicando quizás, un efecto concentración dependiente de los factores secretados por el mesénquima o el requerimiento de una interacción entre los dos tipos celulares.

### • SUPERFAMILIA DE TGF $\beta$ (Transforming Growth Factor)

Distintos miembros de la **superfamilia de TGF $\beta$**  (folistatina, TGF $\beta$ 1 y activina A) son secretados por el mesénquima durante el desarrollo embrionario y están implicados en la diferenciación y proporción de los linajes tanto endocrinos como exocrinos. Tanto **TGF $\beta$ 1** como **activina A** favorecen la diferenciación endocrina e inhiben la diferenciación acinar tanto *in vivo* como *in vitro* (29, 139, 180). En cambio, **folistatina** es capaz de promover la diferenciación de células acinares a expensas de la diferenciación endocrina (194), y es capaz de mimetizar tanto las señales inductivas como represivas observadas con el mesénquima. Folistatina (Figura 1.12) es un inhibidor de diferentes miembros de la familia de TGF $\beta$  que se expresa en el mesénquima pancreático entre E10.5-12.5 y su expresión vuelve a detectarse en el epitelio pancreático e islotes a E18, expresándose en el adulto únicamente en las células  $\beta$ . Folistatina inhibe la función de Activina A, a la cual se une con elevada afinidad, aunque también puede unirse a Activina B, inhibinas y BMPs. El ratón KO de folistatina presenta defectos similares a los ratones deficientes para TGF $\beta$  y BMP5, aunque el fenotipo en el páncreas no ha sido caracterizado.



**Figura 1.12: Modelo propuesto de inhibición de la unión de activina por folistatina.** Folistatina (FS) se une a activina de manera que ésta no puede unirse a su receptor y activar la vía de Smad y con ello la transcripción de sus genes diana. FS se une a los heparan sulfatos de los proteoglicanos de la membrana (sola o unida a activina) y posteriormente será endocitada y degradada en los lisosomas. *Figura adaptada de [www.ier.tokushima-u.ac.jp](http://www.ier.tokushima-u.ac.jp)*

Los BMPs también juegan un papel importante en el desarrollo embrionario de distintos órganos. En el páncreas se expresan BMP4, BMP5 y BMP7 y sus receptores

BMPR-II, BMPR-1A y BMPR-1B (59). Se ha descrito la importancia de BMP4 como regulador de la expansión de los progenitores pancreáticos a través de la regulación de la expresión de Id2 (117). También se ha demostrado que la falta de expresión de BMP6 resulta en agénesis pancreática y en una reducción del tamaño del estómago y bazo, además de la fusión del duodeno y el hígado (59).

### • FGFs (Fibroblast Growth Factor) y EGFs (Epidermal Growth Factor)

Otra vía de señalización importante es la de los FGFs (Fibroblast Growth Factor) y EGFs (Epidermal Growth Factor), factores que también son secretados por el mesénquima. El papel de los EGFs en el crecimiento y proliferación del epitelio pancreático se ha observado tanto *in vitro* como *in vivo* (41, 189). En el páncreas, se expresan en distintos momentos y a distintos niveles durante el desarrollo embrionario los siguientes FGFs: FGF1, FGF7, FGF9, FGF10, FGF11 y FGF18, así como sus receptores FGFR1b, FGFR1c, FGFR2b, FGFR2c, FGFR3b y FGFR4 (59). La vía de señalización de los FGFs ha sido implicada en el desarrollo de distintos órganos que son dependientes de interacciones epitelio-mesénquima (135, 272). Estudios independientes indican el papel de la vía de señalización de FGFs en el desarrollo pancreático y su importancia para la funcionalidad de las células  $\beta$  (21, 38, 106, 156, 195, 220). Cultivos *in vitro* con rudimentos pancreáticos demuestran el efecto proliferativo de distintos FGFs en el epitelio pancreático. Entre ellos se ha descrito que FGF7 no sólo tiene efecto en la proliferación del epitelio pancreático, sino que también mimetiza el efecto del mesénquima sobre la diferenciación acinar (194) y en cultivos *in vitro* la eliminación de éste implica la diferenciación de los progenitores al linaje endocrino (66). También se ha descrito que el ratón KO de FGF10, que se expresa en el mesénquima pancreático dorsal y ventral, presenta alteraciones en el crecimiento, diferenciación y ramificación pancreática (21). El principal defecto en estos ratones es la ausencia de expresión de Pdx1. Así, FGF10 permite mantener la expresión de Pdx1 *in vivo* e *in vitro* es capaz de restaurar la expresión de Pdx1 en explantes de epitelio del KO de FGF10 que carecen de éste.

Recientemente se ha descrito que FGF 7 y 10 son expresados por el mesénquima pancreático humano durante el desarrollo embrionario y que *in vitro* son capaces de inducir la proliferación de las células epiteliales pancreáticas (301). Además, se ha

analizado el efecto de la falta de expresión de FGF4 en ratón observando que tiene lugar una disrupción de la morfología pancreática, con reducción del tejido exocrino a unas pocas células dispersas y una interrupción del crecimiento del árbol ductal y de la formación de los acinos (59).

### **2.2.2. ÁCIDO RETINOICO (RA)**

Otra vía de señalización importante en el desarrollo pancreático es la del ácido retinoico (RA), que consiste en una familia compleja de ligandos y receptores implicados en numerosos procesos de diferenciación. Existen evidencias del papel de RA en el desarrollo pancreático en vertebrados no mamíferos (199). En el pollo, RA es suficiente para inducir la expresión de Pdx1 en el endodermo anterior al pancreático (150). Trabajos *in vitro* con rudimentos pancreáticos indican que RA induce la formación de acinos sin efectos obvios en el compartimento endocrino (132). Aunque datos más recientes indican que RA promueve la diferenciación endocrina a expensas de la exocrina en el páncreas dorsal de *Xenopus*, y en el páncreas ventral incrementa la expresión de genes exocrinos (47). Además, experimentos en pez zebra demuestran que RA es una señal instructiva del mesodermo que induce directamente la diferenciación de los precursores del páncreas endocrino (266). Por otro lado, recientemente se ha descrito que en los ratones deficientes para *Raldh2* (enzima que controla la síntesis de RA) se observa una pérdida de la expresión de Pdx1 en el endodermo dorsal, indicando que el RA sintetizado en el mesénquima es necesario para el desarrollo del endodermo pancreático dorsal (179).

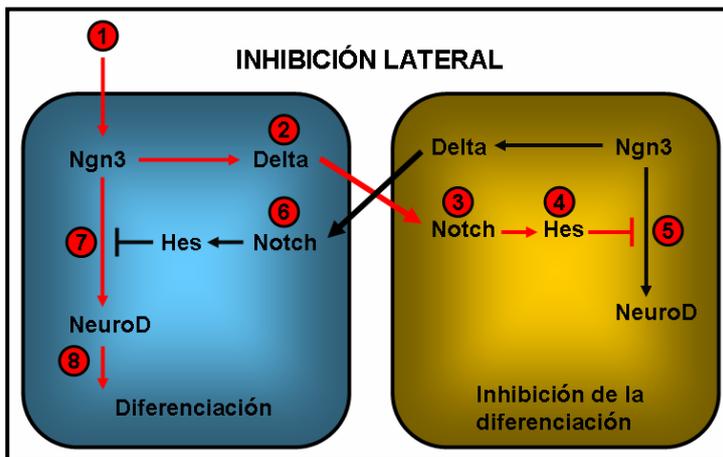
## **2.3. DIFERENCIACIÓN DE LOS LINAJES ENDOCRINOS Y EXOCRINOS**

La diferenciación de los linajes celulares pancreáticos tiene lugar tempranamente en el desarrollo pancreático, iniciándose ya cuando las yemas pancreáticas empiezan a evaginarse (Figura 1.9A). Aunque está claro que todos los linajes pancreáticos derivan de un progenitor pancreático que expresa Pdx1 y p48, no se sabe mucho todavía sobre cómo se regula la decisión de estos progenitores de adquirir

un destino exocrino o endocrino. Se ha descrito que factores secretados por el mesénquima alteran la proporción de los tejidos exocrino/endocrino, pero no se conoce su influencia directa en la decisión de la adquisición del destino celular.

### 2.3.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH

Otra vía implicada en la diferenciación pancreática, es la vía de señalización de Notch (Figura 1.14). En el caso de la diferenciación endocrina, determina el destino celular endocrino por la vía clásica de especificación por inhibición lateral (Figura 1.13), que también se ha descrito que está implicada en otros procesos de diferenciación como la neurogénesis.



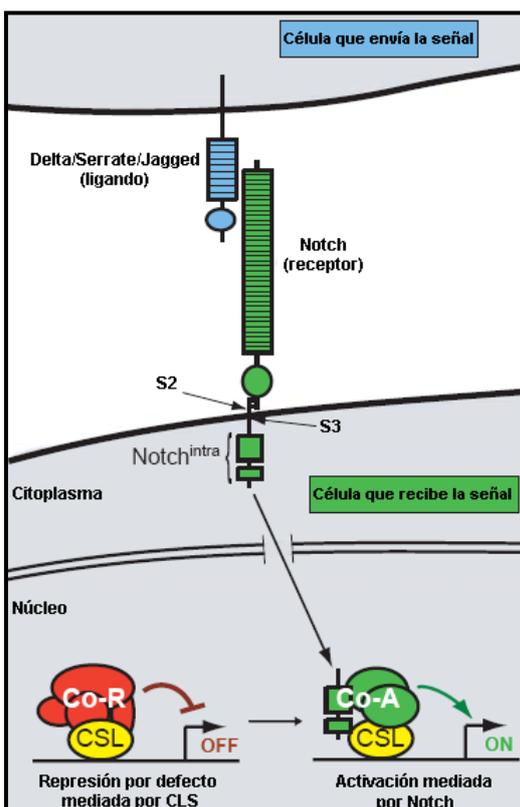
**Figura 1.13: Inhibición lateral.** El proceso de selección de un precursor pro-endocrino tiene lugar por una señalización, a través de la vía de Notch, entre células vecinas del epitelio pancreático. Esta señalización tiene lugar a través del progresivo incremento de expresión de Ngn3 en las células en diferenciación (izquierda) y una débil expresión en las células vecinas (derecha). La señal lateral viene

mediada por el ligando de notch (delta), cuya expresión es controlada por Ngn3. La expresión del ligando en las células en diferenciación activa el receptor de notch en las células vecinas, que a su vez activará la expresión del gen diana Hes1. Hes1 reduce la expresión de Ngn3 en estas células, silenciando otros inputs pro-endocrinos que pueda recibir esta célula. *Figura adaptada de Jensen J., 2004.*

Se han hecho varios estudios con ratones transgénicos mutantes para distintos miembros de la vía de señalización de Notch que han permitido analizar el papel de esta vía en el desarrollo pancreático. Así pues, se ha descrito que la regulación a la baja de la vía implica la depleción de los precursores pancreáticos acompañada por un incremento de la diferenciación endocrina (10, 124). Este hecho se acompaña también con un incremento de la expresión de Ngn3, que es un factor de transcripción de la familia bHLH expresado exclusivamente en progenitores endocrinos, y cuya expresión disminuye durante la diferenciación (90). Además se ha observado que en el ratón transgénico que sobreexpresa un represor de la vía de Notch (Notch3), hay una

disminución de la expresión de p48 (10). Así pues se puede concluir, en base a estos experimentos, que la vía de señalización de Notch puede regular la especificación endocrina versus la exocrina. Aunque experimentos recientes muestran que la expresión del receptor de Notch1 constitutivamente activo (98) previene la diferenciación de las células acinares y atenúa el desarrollo endocrino. Esto indica un nuevo papel de la vía de Notch en el desarrollo pancreático, siendo éste el mantenimiento del estado indiferenciado de los precursores pancreáticos por un mecanismo distinto al de especificación por inhibición lateral (202).

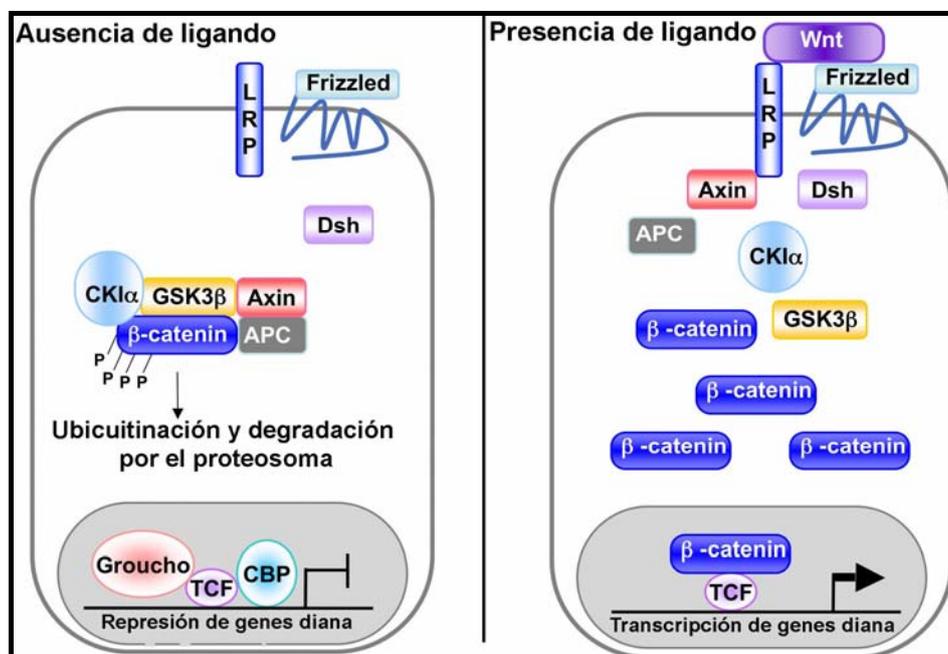
Trabajos recientes describen una estrecha relación entre el efecto de la vía de Notch sobre el desarrollo pancreático y el papel de FGF10. La sobreexpresión de FGF10 en ratones transgénicos implica hiperplasia pancreática y la inhibición de la diferenciación de todos los linajes pancreáticos (105, 211). En estos ratones las células epiteliales pancreáticas expresan marcadores característicos de progenitores pancreáticos y además Notch1, Notch2 y Hes1. Un modelo propuesto es que FGF10, que es expresado por el mesénquima pancreático, podría mantener la vía de Notch activa, permitiendo la expansión de los progenitores pancreáticos antes de que tuviera lugar la segunda transición (E13). Este hecho correlacionaría con el período de expresión de FGF10 que está comprendido entre E9.5 y E11.5.



**Figura 1.14: Vía de señalización de Notch.** Los componentes básicos de la vía de Notch son los ligandos *delta-like* (Delta, Jagged y Serrate), el receptor Notch y los factores de transcripción tipo CSL (CBF1/RBPJ $\kappa$ /RBPL). Delta y Notch son proteínas transmembrana que contienen en su parte extracelular repeticiones de dominios EGF (marcadas como triángulos). La activación de Notch por sus ligandos implica la proteólisis de Notch en dos puntos de escisión (S2 y S3). La proteólisis en S3 implica la escisión del dominio intracelular de Notch (Notch<sup>intra</sup>), que se transloca al núcleo. Notch<sup>intra</sup> activa CSL y el complejo co-represor de CSL (Co-R, rojo) es desplazado por un complejo activador que contiene Notch<sup>intra</sup> (Co-A, verde) que media la activación de genes diana de Notch. En ausencia de Notch<sup>intra</sup>, CSL se asocia al complejo co-represor, que reprime la transcripción de los genes diana de Notch. *Figura adaptada de EC. Lai., 2004.*

### 2.3.2. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE WNT

Otra vía de señalización implicada en esta etapa del desarrollo pancreático es la vía de Wnt (Figura 1.15), que está implicada en interacciones epitelio-mesénquima y proliferación celular en distintos tejidos. La delección de  $\beta$ -catenina (un miembro de la vía de señalización de Wnt) en el páncreas, conduce a la ausencia de células acinares pero no altera la formación de los islotes ni la función de los linajes endocrinos (201), observándose sin embargo una reducción en el número de islotes (57). Esto indica que  $\beta$ -catenina juega un papel autónomo celular necesario para la especificación de las células acinares (201). La sobreexpresión de un dominante negativo de Frz8 (Frizzled, receptor de la vía de Wnt) en precursores pancreáticos altera el crecimiento del árbol ductal (227). Recientemente, se ha descrito que la estabilización de la expresión de  $\beta$ -catenina durante el desarrollo temprano del páncreas implica una reducción de su masa por la pérdida de expresión de Pdx-1 en los progenitores pancreáticos, pero su estabilización en estadios más avanzados implica un incremento de la proliferación celular y de la masa del páncreas. Esto sugiere, un papel espacio/temporal de la vía de Wnt en el crecimiento del órgano (110).



**Figura 1.15: Vía de señalización canónica de Wnt.** En ausencia de señal (ligando)  $\beta$ -catenina se une a un complejo proteico formado por CK1 $\alpha$ , GSK3 $\beta$ , APC y Axin que inducen la hiperfosforilación de  $\beta$ -catenina que es señal para su ubiquitinización y su degradación por el proteosoma. La unión del ligando de Wnt al receptor Frizzled/LRP-5/6 implica la estabilización de  $\beta$ -catenina hipofosforilada, que se transloca al núcleo e interacción con los factores

transcripcionales TCF/LEF para activar la transcripción de los genes diana de la vía. Figura adaptada de

### **2.3.3. INTERACCIÓN CÉLULA-MATRIZ EXTRACELULAR Y CÉLULA-CÉLULA**

También son muy importantes para la diferenciación de los linajes endocrinos y exocrinos las interacciones célula-matriz y célula-célula. La matriz extracelular (ECM) es un complejo molecular dinámico que sirve de andamiaje celular y juega un papel importante en la diferenciación, establecimiento de la polaridad celular, regulación de la proliferación y la supervivencia de distintos linajes. La habilidad de la ECM en el control del destino celular depende de su unión a una familia de receptores transmembrana, las integrinas. Estas se unen a los ligandos de la ECM formando agregados y se asocian al citoesqueleto intracelular y a proteínas señalizadoras en agregados multiproteicos denominados uniones focales. Muchos factores de crecimiento están físicamente asociados a las integrinas y su activación es necesaria para las vías de señalización de los factores de crecimiento. Las integrinas de la familia  $\beta 1$  se expresan en la mayoría de las células epiteliales y se unen a colágeno, fibronectina y laminina de la matriz extracelular (28). En la interfase entre el compartimento endocrino y exocrino existe una membrana basal (BM) que es una capa fina de ECM, que comprende mayoritariamente laminina y colágeno IV. Esta BM rodea tanto los acinos como los ductos, pero no los islotes. Éstos sólo presentan BM en las zonas que están en contacto con los capilares sanguíneos (110, 208).

Se ha descrito la expresión de la laminina  $\alpha 1$  en el epitelio ductal pancreático de estadios comprendidos entre E13.5 y E17.5, pero no se detecta en el páncreas adulto. Se ha sugerido que esta laminina podría estar implicada en la proliferación del árbol ductal (a través de la integrina  $\alpha 6$ ) y la diferenciación de los precursores pancreáticos (a través del  $\alpha$ -dístroglicano) (127, 285). En la BM de los acinos adultos, se expresa la laminina 10 ( $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ ) y en los vasos sanguíneos del páncreas se detecta laminina 2 ( $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ ), laminina 8 ( $\alpha 4\beta 1\gamma 1$ ) y laminina 10 ( $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ ). En el páncreas adulto, se expresa en los acinos y en los ductos la integrina  $\alpha 6\beta 1$ ; en ductos, acinos y islotes la integrina  $\alpha 3\beta 1$  y exclusivamente en los ductos la integrina  $\alpha 6\beta 4$  (127).

La importancia de la interacción de las integrinas con la ECM se ha descrito ampliamente cuando tiene lugar la formación de los islotes (248), ya que para su formación, los distintos tipos celulares que la componen migran desde el epitelio ductal hasta el mesénquima, y además dicha interacción también es importante para la proliferación y la diferenciación de las células  $\beta$ . La organización del islote se regula mediante integrinas, y la falta de la interacción de las integrinas como  $\alpha 6\beta 1$  con las ECM, provoca una pérdida de la respuesta a glucosa de las células  $\beta$ , como se observa en cultivos *in vitro* de islotes (28). Esta respuesta sólo se recupera si se cultivan con preparaciones de ECM. Recientemente, se ha demostrado que los precursores endocrinos y los islotes presentan una disminución de la expresión de muchas proteínas de la BM (191) y que las células endoteliales de los capilares sanguíneos son necesarias para la formación de la BM en estas estructuras. Además, se ha descrito que las señales de la BM vascular regulan la expresión de insulina y que la unión entre la  $\beta 1$ -integrina de las células  $\beta$  con la laminina de la BM vascular estimulan la proliferación de estas células (208).

Respecto al páncreas exocrino, se ha analizado la expresión de laminina-1 en la organogénesis pancreática, demostrando que ésta induce la diferenciación acinar y ductal (42). Se ha descrito recientemente en el adulto el papel de las lamininas  $\alpha 2$  y  $\alpha 4$ , que son las más abundantes en la BM de los acinos, demostrando que son necesarias para la correcta localización en la membrana basal, de los receptores a los cuales se unen, distroglicano e integrina  $\alpha 6\beta 4$  (191). También se ha sugerido que la BM puede inducir la diferenciación y morfogénesis ductal en el epitelio pancreático indiferenciado (87).

Además de las proteínas de la matriz extracelular son importantes para la formación del islote las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) (193). Se han encontrado dos MMPs, MMP2 y MMP9, que se expresan durante el desarrollo pancreático, y su actividad en los islotes está regulada por TGF $\beta$ .

Varios estudios han demostrado que señales a través de receptores de EGF inducen la secreción de MMPs, y el nivel de MMPs activo está reducido en ratones

mutantes para el receptor de EGF (189, 283). Estos ratones presentan una morfología normal del páncreas, pero la organización y distribución de los islotes está alterada. Por lo tanto, la degradación de la matriz y su remodelación es crucial para la morfogénesis epitelial y la migración de los precursores endocrinos.

Las interacciones célula-célula son también necesarias para la correcta arquitectura del órgano. Estas interacciones están formadas por moléculas de adhesión independientes de calcio (CAMs) y dependientes de calcio (N, R y E-cadherina) (51, 70, 246).

## **2.4. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN EL DESARROLLO PANCREÁTICO**

El desarrollo pancreático es un proceso complejo que implica la integración de diferentes vías de señalización y también la expresión de distintos factores transcripcionales espacio-temporalmente. Algunos de estos factores juegan un papel dual, siendo importantes tanto tempranamente en el desarrollo para la especificación y diferenciación pancreática, como más tarde en el adulto para la funcionalidad y el mantenimiento del fenotipo diferenciado. En la Tabla 1.3 se citan los factores transcripcionales más importantes para el desarrollo pancreático, además de su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario y en el adulto, así como el fenotipo de los ratones KO. La Figura 1.18 esquematiza los factores de transcripción más importantes para el desarrollo pancreático según un modelo jerárquico consensus de expresión génica necesaria para la progresión continua hacia un estadio de diferenciación más avanzado.

### **2.4.1. Hlxb9**

Hlxb9 es un factor de transcripción con homoeodominio que se expresa tempranamente a E8 tanto en el endodermo pancreático dorsal como ventral. En la yema dorsal su expresión precede a la de Pdx1 y en el adulto, su expresión se restringe a las células  $\beta$ . En el ratón KO para el gen de Hlxb9, el endodermo pre-pancreático dorsal no expresa Pdx1 de manera que no se inicia nunca la gemación de la yema dorsal (104,

158). El páncreas ventral sin embargo, se desarrolla normalmente hasta estadios avanzados cuando Hlxb9 es necesario para la maduración de las células  $\beta$ . Así, en el páncreas adulto los islotes son pequeños y con un número bajo de células  $\beta$ . Esto demuestra que Hlxb9 actúa por encima de Pdx1 únicamente en la yema dorsal.

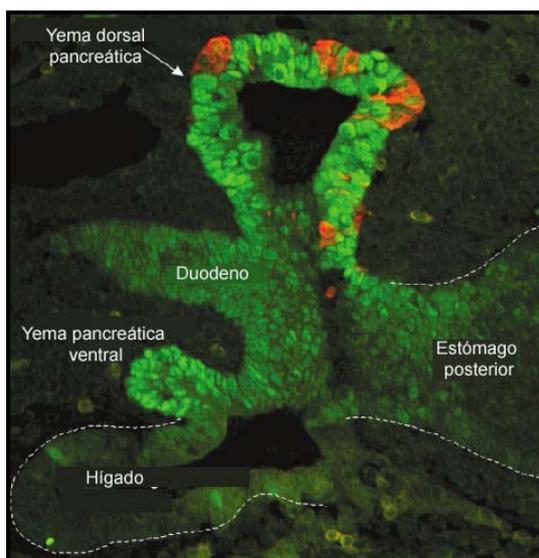
### 2.4.2. Pdx1

Pdx1 es un factor de transcripción con homeobox, y un regulador crucial del desarrollo pancreático y de la diferenciación de los progenitores endocrinos y exocrinos (96, 97, 267). Pdx1, en el estadio de E8.5, no sólo se expresa en el endodermo pancreático dorsal y ventral sino que también se expresa (de manera más baja) en el endodermo duodenal y del estómago (Figura 1.16). En el estadio de E9.5, su expresión se observa tanto en la yema dorsal como en la ventral y su expresión se mantiene en todo el epitelio pancreático durante la formación de las yemas y el crecimiento del árbol ductal (E9.5-E13.5). A partir de la segunda transición, momento en el que la expresión de Pdx1 empieza a ser heterogénea, se expresa en el compartimento endocrino (E14-15). Pdx1 en el adulto es detectable en células  $\beta$  a niveles elevados (213, 215), en alguna subpoblación de células  $\delta$  y PP, y muy raramente en alguna célula  $\alpha$  (95, 190, 215). En el estadio de E13.5 hay co-localización de algunas células amilasa con Pdx-1, pero su expresión disminuye en células acinares y ductales en diferenciación, expresándose en el adulto en las células acinares a niveles muy bajos (99).

Se ha descrito que Pdx1 está implicado en la regulación de la expresión de insulina, polipéptido amiloide del islote (IAPP), glucoquinasa y Glut-2 (43, 228, 255). En las células  $\delta$ , también regula la expresión de genes como somatostatina y en las células acinares regula la expresión de los enzimas digestivos formando parte de un complejo trimérico con Pbx1b y Meis2b, dos proteínas TALE (Figura 1.16). Este trímero coopera con PTF1 (ver apartado 2.4.3) para activar el *enhancer* del promotor del gen de la elastasa (171). Además, las células  $\beta$  no expresan Pbx1b y muy bajos niveles de Meis2; así pues, el complejo trimérico no se puede formar y la actividad de Pdx1 en estas células es independiente del complejo, de manera que la expresión de linaje celular específica de Pbx1b y Meis2 parece sugerir que estas proteínas TALE controlan la naturaleza de la actividad transcripcional de Pdx1 en las células exocrinas versus las endocrinas (270).

Pdx1 interacciona físicamente con Pbx1 que es un miembro de la familia TALE de factores de transcripción con homeodominio que confieren especificidad de unión a otras proteínas con homeodominio. El complejo Pdx1/Pbx1 puede ser importante para discriminar la actividad de Pdx1 en el linaje endocrino y el exocrino, ya que la unión de este complejo difiere según se trate de genes endocrinos (insulina) y exocrinos (elastasa) (271). Pbx1 se expresa en el epitelio y el mesénquima pancreáticos y es importante para el desarrollo pancreático temprano ya el KO de Pbx1 presenta hipoplasia pancreática y reducción de la diferenciación tanto endocrina como exocrina (143). Además se ha descrito que el complejo Pdx1/Pbx1 es necesario para la proliferación de las células pancreáticas durante el desarrollo (64).

El ratón KO de Pdx1 es viable pero muere pocos días después de nacer. Estos animales presentan agénesis pancreática (130, 213). Durante el desarrollo, se inicia la formación de las yemas tanto dorsal como ventral pero luego tiene lugar una regresión de éstas. El mesénquima pancreático se desarrolla normalmente en el KO de Pdx1, pero el epitelio es incapaz de responder a las señales derivadas del mesénquima, necesarias para completar el programa de diferenciación (3). Unas pocas células insulina positivas se detectan tempranamente en el desarrollo del ratón KO (3) y aunque estudios de trazamiento de linaje revelan que las células endocrinas derivan de un precursor Pdx1, la presencia de células endocrinas en el desarrollo temprano indica que inicialmente el programa de diferenciación endocrino es independiente de Pdx1 o bien que existe una población endocrina de células  $\alpha$  y  $\beta$  que se diferencia tempranamente de manera independiente a las células endocrinas que derivan del precursor Pdx1 (93, 111). Por otro lado la expresión ectópica de Pdx1 expande el dominio dorsal de los precursores pancreáticos (91, 114).

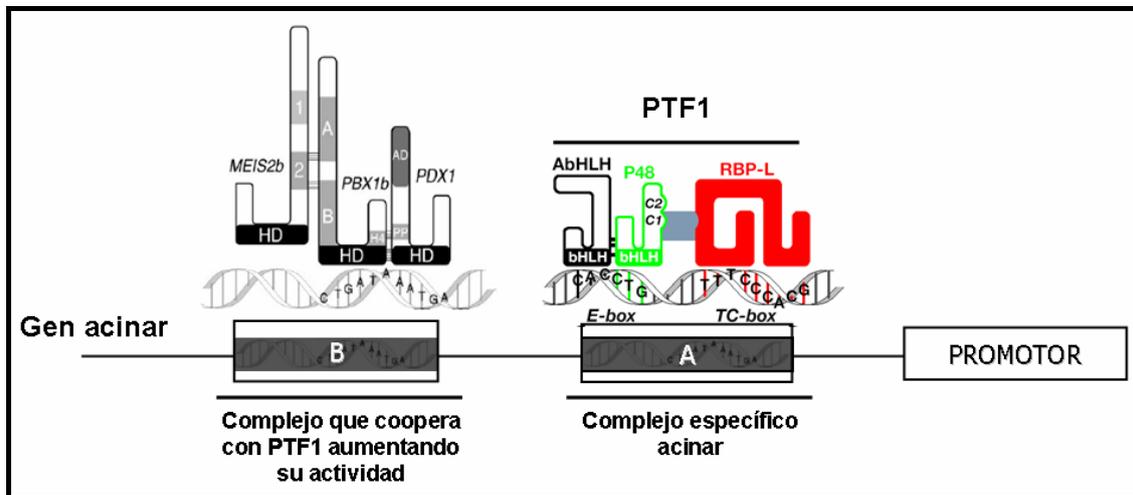


**Figura 1.16: Inmunofluorescencia del endodermo pancreático del estadio E10 que muestra la expresión de Pdx1 y glucagón.** El inicio del desarrollo pancreático se observa por la formación de dos yemas (una dorsal y otra ventral) a partir del endodermo primitivo intestinal. Se observa la expresión de Pdx1 (verde) de manera elevada tanto en la yema pancreática dorsal como en la ventral y a niveles más bajos, en el endodermo duodenal. En el endodermo que dará lugar a la parte posterior del estómago la expresión es prácticamente nula. Se observa la expresión de glucagón (rojo) en la yema dorsal. *Figura adaptada de Jensen J. 2004.*

### 2.4.3. p48 (PTF1a)

p48 (también llamado Ptf1a) es un factor de transcripción de tipo bHLH que fue originalmente identificado en los años 90 como un factor de transcripción específico exocrino (146). p48 forma parte de un complejo transcripcional denominado Ptf1 (Figura 1.17). Este complejo está formado por 3 factores de transcripción: 2 de la familia de los bHLH, uno de los cuales es ubicuo (E12/47 o HEB), y el otro es tejido específico (p48/Ptf1a) y por último un tercer factor denominado RBP-L (20). p48 fue inicialmente el único factor de transcripción descrito como específico del páncreas exocrino, aunque en los últimos años experimentos de trazamiento de linaje han demostrado que p48 se expresa en los progenitores pancreáticos, a partir de E9.5, que darán lugar a todos los linajes celulares epiteliales pancreáticos (137). Su expresión se restringe a las células acinares en diferenciación a partir de E14. Experimentos recientes también muestran que se expresa en regiones específicas del sistema nervioso central (cerebelo) y la médula espinal (88, 116, 254). Además, se expresa muy débilmente en el estómago (20). El ratón KO de p48 muere pocas horas después de nacer y carece de páncreas exocrino, mientras que las células endocrinas derivadas del páncreas dorsal migran y colonizan el bazo; además, el estudio de trazamiento de linaje ha demostrado que en ausencia de p48 los progenitores de la yema ventral adquieren un destino intestinal (137). En el adulto, p48 se expresa exclusivamente en las células acinares donde regula la expresión de los enzimas digestivos, formando parte del complejo PTF1, descrito anteriormente. Además, se ha descrito que, la sobreexpresión de p48

tanto en líneas celulares acinares pancreáticas y como no pancreáticas tiene un efecto antiproliferativo independiente del complejo PTF1 (239).



**Figura 1.17: Complejo PTF1 y complejo trimérico aumentador.** Complejo PTF1 (específico acinar) formado por 2 factores de transcripción de tipo bHLH (E12/47 o HEB y p48) y RBP-L, que se une a las cajas A de los promotores de los genes acinares. Complejo trimérico formado por Meis2b, Pbx1 y Pdx1 que se une a las cajas B de los genes acinares y aumenta la actividad de PTF1.

#### 2.4.4. Mist-1

Mist-1 es un factor de transcripción de tipo bHLH que se expresa en el páncreas a partir de E10 en las células acinares en diferenciación donde juega un papel muy importante en la diferenciación terminal de estas células. La delección del gen (128, 231) o la inhibición (247, 306) de la función de Mist-1 se traduce en una severa alteración en la arquitectura de la célula acinar, incluyendo pérdida de uniones de comunicación (pérdida de expresión de Cx32, cuya expresión se ha descrito que está regulada por Mist-1) (247) y uniones de adhesión intracelular (pérdida de la expresión de  $\beta$ -catenina,  $\gamma$ -catenina y  $\alpha$ -catenina) (128, 247). Además, las células no presentan los gránulos de cimógeno en la parte apical debido a alteraciones en la polarización celular (128, 231). Respecto a la expresión de genes implicados en la vía de señalización activada por secretagogos se produce un incremento en la expresión de CCKAR y VAMP-2, y una pérdida de la expresión de IP3R3. Por último, destacar que además las células presentan una activación prematura de los enzimas digestivos (173).

El ratón KO de Mist-1 desarrolla con el tiempo lesiones pancreáticas características de enfermedades pancreáticas como la pancreatitis (173). Por ello, se ha propuesto este modelo animal como un modelo genético representativo de esta enfermedad. De hecho, la inhibición de la actividad de Mist-1 mediada por un dominante negativo induce metaplasia acinar-ductal (306).

Recientemente, se ha descrito que el ratón deficiente de Mist-1 también presenta alteraciones en las células  $\beta$ , con una disminución de la acumulación de la proteína Glut-2 y de la tolerancia a la glucosa. Así pues, la pérdida de un gen regulador del compartimento exocrino puede afectar al compartimento endocrino (72).

### **2.4.5. Nkx2.2 y Nkx6.1**

Nkx2.2 y Nkx6.1 son miembros de la familia de factores de transcripción NK2 y son reguladores de la diferenciación endocrina pancreática (269). Nkx2.2 se expresa tempranamente en las yemas pancreáticas y más tarde, restringe su expresión a las células  $\beta$ ,  $\alpha$  y PP. Nkx6.1 se expresa en las células  $\beta$  del adulto. La ausencia de expresión tanto de Nkx2.2 como Nkx6.1 implica la muerte del ratón poco después de nacer debido a una severa diabetes. En estos ratones, el páncreas carece de células  $\beta$  y presenta una disminución de células  $\alpha$ , aunque el páncreas exocrino es histológicamente normal. El ratón KO de Nkx2.2 presenta un bloqueo de la diferenciación de los precursores endocrinos que expresan proteínas específicas del páncreas endocrino (N-CAM, péptido amiloide...) pero no hormonas. El ratón deficiente para Nkx6.1 presenta una reducción selectiva de las células  $\beta$  manteniendo el resto de células endocrinas en una proporción normal (250).

### **2.4.6. Hex**

Hex es un factor de transcripción con homeobox que se expresa a partir de E8.5 en las células en proliferación del endodermo lateral-ventral que darán lugar al páncreas ventral y al hígado. El ratón KO de Hex presenta defectos en el crecimiento del endodermo próximo al mesodermo cardíaco permitiendo sólo la especificación hepática pero no la pancreática. Sin embargo, cuando el endodermo pre-pancreático ventral se

aísla, previamente a su interacción con el mesodermo cardíaco y se cultiva *in vitro*, este activa genes pancreáticos tempranos mostrando que el endodermo mantiene la competencia intrínseca para iniciar el programa de diferenciación pancreática (27).

#### **2.4.7. Ngn3**

Ngn3 es un factor de transcripción de tipo bHLH que juega un papel muy importante en el desarrollo endocrino, expresándose únicamente en los progenitores pancreáticos endocrinos (94). El KO de Ngn3 no desarrolla ninguno de los 4 linajes endocrinos pancreáticos y el páncreas exocrino es prácticamente normal, presentando solamente algún defecto en la polaridad celular (90).

Estudios recientes sugieren que la vía de Notch está implicada en la regulación de la diferenciación pancreática tanto endocrina como exocrina. Notch restringe la expresión de Ngn3 a células dispersas en el epitelio pancreático. Estas células darán lugar a los linajes endocrinos, mientras que las células que no expresen Ngn3 se especificarán al linaje exocrino (ver apartado 2.3.1) (158).

#### **2.4.8. Beta2/NeuroD**

Beta2/NeuroD es un factor de transcripción de tipo bHLH que regula la expresión del gen de la insulina en las células  $\beta$ . La expresión de Beta2/NeuroD se inicia a E9.5 en una pequeña población de células del epitelio pancreático que co-expresan glucagón (203). A E14.5 se detecta su expresión en el epitelio ductal y a E17.5 queda restringida a los islotes (205). El ratón deficiente para Beta2/NeuroD muere pocos días después de nacer por una elevada hiperglicemia debida a que los islotes que presenta son dismórficos con una reducción de células endocrinas (205).

#### **2.4.9. Isl-1**

Isl-1 es una proteína con homeodominio de la familia LIM. Se expresa en el mesénquima dorsal a E8-9, en las células endocrinas a partir de E9 y en el adulto, en todas las células endocrinas. El ratón KO de Isl-1 bloquea el desarrollo pancreático tempranamente a E9.5 (229). El desarrollo del mesénquima dorsal está bloqueado y no

se desarrollan células endocrinas. Por el contrario, el mesénquima y epitelio ventral se desarrollan normalmente (4).

### **2.4.10. Pax4 y Pax6**

Pax4 y Pax6 son homeoproteínas con dominios *paired-box*. Pax4 se expresa a partir de E9-9.5 tanto en la yema dorsal como ventral y en el adulto se restringe su expresión a las células  $\beta$ . El ratón KO de Pax4 muere pocos días después de nacer por una severa hiperglicemia y deshidratación. Carece de células  $\beta$  y  $\delta$  e incrementa el número de células  $\alpha$ , lo que demuestra que Pax4 está implicado en la diferenciación de las células  $\beta$  y  $\delta$  (263).

Pax6 se expresa en el epitelio pancreático a partir de E9-9.5 en la yema dorsal y ventral y en el adulto en los cuatro linajes endocrinos. Una mutación en Pax6 (Small eye) conlleva a una desorganización de los islotes y una reducción de los cuatro linajes endocrinos (249). Por otra parte, el ratón deficiente para Pax6 carece de islotes (265).

Estos modelos animales indican que tanto Pax4 como Pax6 juegan un papel importante en la regulación de la diferenciación terminal endocrina.

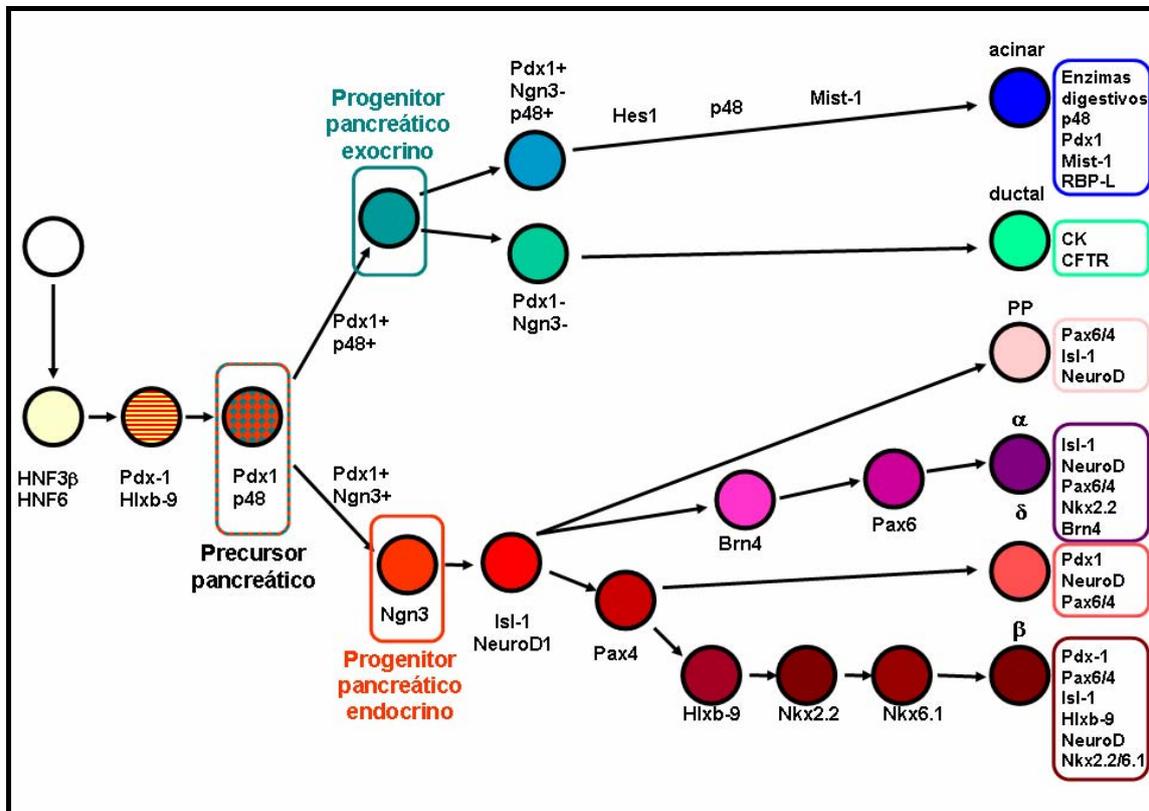
### **2.4.11 MafA y MafB**

MafA y MafB son factores de transcripción de los cuales se había descrito su importancia en el desarrollo de las lentes del ojo. Recientemente, se ha descrito que MafA se expresa en el páncreas sobre E14 en células  $\beta$  y Maf B se expresa un día más tarde en células  $\alpha$  y  $\beta$  (12, 182, 222).

### **2.4.12. IA1**

IA1 es un factor de transcripción con dedos de zinc que se expresa en el epitelio pancreático alrededor de E10.5 (186), aumentando su expresión hasta E15.5 cuando su expresión empieza a decaer desapareciendo totalmente a E18.5. Recientemente, se ha descrito que IA1 es diana directa de Ngn3, siendo un efector de las funciones de ésta ya que la

inhibición de la expresión de IA1 en el páncreas implica una reducción del 40% de células  $\alpha$  y  $\beta$  (186).



**Figura 1.18:** Esquema de los factores de transcripción más importantes implicados en el desarrollo y diferenciación pancreática. Este modelo no contempla los posibles circuitos de regulación entre los distintos factores de transcripción que se han descrito recientemente.

Factor de transcripción	Patrón de expresión en el páncreas durante el desarrollo embrionario	Patrón de expresión en el páncreas adulto	Fenotipo del ratón KO en el páncreas
<b>Hlx9</b>	Expresión muy temprana E8-9 en precursores pancreáticos y células $\beta$ en diferenciación.	Células $\beta$ .	Agénesis del páncreas dorsal y alteraciones en islotes del páncreas ventral.
<b>Pdx1</b>	Elevada expresión en progenitores pancreáticos a E8-10 y células endocrinas en diferenciación.	Elevada expresión en células $\beta$ y baja expresión en células acinares.	Agénesis pancreática, formación de un árbol ductal dorsal muy rudimentario que se detiene en E10.5.
<b>p48</b>	Expresado en progenitores pancreáticos a partir de E9.5 y posteriormente restringe su expresión a células acinares en diferenciación.	Células acinares.	Pérdida del páncreas exocrino. Pocas células endocrinas localizadas en el bazo. Los progenitores pancreáticos asumen un destino intestinal.
<b>Ngn3</b>	Expresado a partir de E9 en progenitores pancreáticos endocrinos y deja de expresarse a partir de E13.5.	No se expresa.	Pérdida de todos los linajes endocrinos y polaridad acinar perturbada.
<b>Nkx2.2</b>	Expresada a partir de E8.5-9 en precursores pancreáticos endocrinos y posteriormente su expresión se restringe a células endocrinas en diferenciación.	Células $\beta$ , $\alpha$ y PP.	Reducción del número de células $\beta$ , $\alpha$ y PP. Las células $\beta$ no expresan insulina.
<b>Nkx6.1</b>	Expresado a partir de E9-9.5 en progenitores endocrinos y posteriormente se restringe a células $\beta$ en diferenciación	Células $\beta$ .	Reducción del número de células $\beta$ .
<b>Isl1</b>	Expresado en el mesénquima dorsal a E8-9 y en las células endocrinas a partir de E9.	En los cuatro linajes endocrinos.	Pérdida del mesénquima dorsal y ausencia de células endocrinas diferenciadas.
<b>Pax6</b>	Expresado en células endocrinas a E9 -9.5.	En los cuatro linajes endocrinos.	Disminución en el número de células endocrinas y reducción de la expresión de hormonas.
<b>Pax4</b>	Expresado en progenitores endocrinos a E9-9.5.	No expresado o expresado a muy bajos niveles en células $\beta$ .	Pérdida de células $\beta$ y $\delta$ . Incremento de células $\alpha$ .
<b>NeuroD</b>	Expresado a partir de E9.5 en células endocrinas.	En los cuatro linajes endocrinos.	Disminución del número de células endocrinas y alteraciones en la polaridad de las células acinares.
<b>Mist1</b>	Expresado a partir de E10 en células acinares en diferenciación.	Células acinares.	Alteración en la arquitectura de la célula acinar, pérdida de polaridad celular, expresión alterada de genes de la vía de secreción de enzimas digestivos y desarrollo de lesiones exocrinas con el tiempo. Disminución de Glut-2 y disminución de la tolerancia a la glucosa.
<b>Pbx1</b>	Expresado a partir de E10.5 en el mesénquima y epitelio. A partir de E14.5 se expresa en el mesénquima, el epitelio ductal y las células acinares.	Todos los linajes pancreáticos.	Hipoplasia pancreática, pérdida de la diferenciación endocrina, reducción en la expresión de Isl1 y Ngn3, y defectos en la diferenciación exocrina.

**Tabla 1.3:** Tabla de los factores de transcripción más importantes para el desarrollo pancreático. Se indica el patrón de expresión durante el desarrollo embrionario pancreático y en el páncreas adulto, además del fenotipo del ratón mutante para cada factor.

### **3. PATOLOGÍAS PANCREÁTICAS EXOCRINAS**

Las principales patologías pancreáticas son debidas a una insuficiencia funcional de la glándula y afectan tanto al componente exocrino como al componente endocrino del páncreas.

Las principales patologías que afectan al páncreas exocrino son: la pancreatitis aguda y crónica y el cáncer de páncreas; y respecto al páncreas endocrino la principal patología es la diabetes mellitus.

#### **3.1. PANCREATITIS AGUDA**

La pancreatitis aguda es una enfermedad de elevada incidencia en los países occidentales de 10 a 20 casos por 100.000 habitantes por año. Alrededor del 80% se asocian a dos factores de riesgo: enfermedad del conducto biliar por cálculos obstructivos y alcoholismo. Otras causas frecuentes son algunas infecciones por virus, o por *Mycoplasma pneumoniae*, alteraciones metabólicas (ej: hipertrigliceridemia, hipercalcemia, isquemia aguda) y algunos fármacos (ej: sulfonamidas, furosemida, estrógenos y tetraciclina).

Las principales alteraciones asociadas a esta patología son consecuencia de la activación de los enzimas digestivos dentro del mismo órgano antes de liberarse al lumen intestinal. Dichos enzimas provocan la autodestrucción del tejido pancreático, proteólisis, edema, hemorragia intersticial por la destrucción de los vasos sanguíneos, reacción inflamatoria, necrosis de las células parenquimales y necrosis grasa por acción de los enzimas lipolíticos.

El tratamiento de la pancreatitis aguda se basa principalmente en el tratamiento del dolor con fuertes analgésicos y bloqueo de la secreción gástrica de ácido.

### **3.2. PANCREATITIS CRÓNICA**

La pancreatitis crónica se caracteriza por brotes repetidos de inflamación pancreática leve o moderada, con la pérdida progresiva del parénquima pancreático y la sustitución de éste por tejido fibroso. Histológicamente, la lesión se caracteriza por una reducción del número y talla de los acinos, con conservación relativa de los islotes cuando la lesión no es muy severa, aparición de complejos ductales, fibrosis de distribución irregular y obstrucción variable de los conductos pancreáticos. Suele encontrarse inflamación crónica alrededor de los lóbulos y conductos. El epitelio ductal puede aparecer atrofiado o hiperplásico o incluso mostrar metaplasia escamosa.

La mayor parte de los episodios de pancreatitis crónica son secundarios a la ingesta de alcohol; el 70% de los casos mundiales de pancreatitis crónica son inducidas por alcohol. Este porcentaje puede ascender al 90% en aquellos países donde la ingesta de alcohol es elevada. Es difícil conocer los datos exactos sobre la incidencia y la prevalencia de la pancreatitis crónica, ya que es posible la existencia de casos no diagnosticados debido a que las manifestaciones clínicas de la enfermedad no son siempre evidentes ni precoces. De manera aproximada se podría decir que la incidencia de la pancreatitis crónica en el mundo occidental es de 4 casos por 100.000 habitantes por año. La causa más importante de pancreatitis crónica es el alcoholismo, aunque hay otros factores de riesgo como la colelitiasis, el hipertiroidismo y la hiperlipidemia. Una pequeña proporción de casos se presenta sin factores etiológicos conocidos; en estos casos se la denomina pancreatitis crónica ideopática. Existe una pequeña proporción de casos de pancreatitis crónica hereditaria con un patrón autosómico dominante y es consecuencia de mutaciones en el gen del tripsinógeno catiónico (295).

La relación entre la pancreatitis crónica y el cáncer de páncreas ha sido ampliamente estudiada (18, 19) y diferentes trabajos confirman que ambas patologías podrían estar asociadas un 5-10% de las veces.

El tratamiento de la pancreatitis crónica está encaminado a mejorar la calidad de vida del paciente y se basa en, el tratamiento del dolor con distintos analgésicos y a la

mala absorción de los alimentos con la administración oral de medicamentos que contienen enzimas digestivos, que ya no son producidos por el páncreas.

### **3.3. CÁNCER DE PÁNCREAS**

El cáncer de páncreas es la quinta causa de muerte por cáncer en los países desarrollados, a pesar de que su incidencia es tan sólo de 10 casos por 100.000 habitantes por año. La elevada tasa de mortalidad del cáncer de páncreas es consecuencia de la dificultad de un diagnóstico temprano y de la agresividad del tumor.

Se trata del cáncer en el cual se han producido menos avances terapéuticos en los últimos 30 años. La probabilidad de supervivencia después de 2 años de su diagnóstico es de menos del 5%.

El factor de riesgo más importante es el tabaco. Otros factores de riesgo son la pancreatitis crónica, la historia familiar de cáncer de páncreas y algunos síndromes de cánceres hereditarios, el alcoholismo, la diabetes y ciertos hábitos alimenticios.

Actualmente, el único tratamiento curativo para la enfermedad es el procedimiento quirúrgico Whipple, técnica que consiste en una pancreatoduodenotomía parcial. Para tumores no resecables, el único tratamiento es la quimioterapia y la radioterapia.

### **4. MODELOS CELULARES ACINARES *IN VITRO***

En modelos de regeneración pancreática en el adulto, como la ligación del ducto, se ha observado que tiene lugar una transdiferenciación acinar-ductal. En la pancreatitis y el cáncer de páncreas también tiene lugar este tipo de transdiferenciación, denominada metaplasia acinar-ductal (26). *In vitro*, al intentar cultivar las células acinares aisladas se observa que éstas empiezan a perder la expresión de marcadores de diferenciación (amilasa y gránulos de cimógeno) y empiezan a expresar marcadores ductales (citoqueratina 20 (CK20)), teniendo lugar también una transdiferenciación acinar-ductal (11, 154). Se ha descrito que ésta transdiferenciación se inhibe en presencia de nicotinamida (241), manteniéndose el fenotipo acinar del 80% de las células. Distintos grupos han intentado optimizar las condiciones de cultivo para detener y/o modular esta transdiferenciación acinar-ductal (241, 264). Si se cultivan las células acinares de ratón con medio CME o WHME se observan fenotipos claramente diferenciados (264). Con CME, las células forman colonias epiteliales y retienen los gránulos de cimógeno y el retículo endoplasmático aunque expresan tempranamente CK7 (citoqueratina 7), sugiriendo un estado de transdiferenciación intermedio. Con WHME, forman una monocapa que se desdiferencia a estructuras *ductales-like*, y se asocia con una pérdida de gránulos de secreción y marcadores de diferenciación acinar como amilasa. También se ha descrito en modelos de rata, que el tratamiento con dexametasona inhibe la pérdida de la expresión de amilasa obteniéndose así un estado de transición en que las células co-expresan CK20 y amilasa, además de encontrar también células que co-expresan amilasa e insulina (240). Así pues, a pesar de los intentos de optimización de las condiciones de cultivo de las células acinares, no se ha conseguido inhibir el proceso de transdiferenciación acinar-ductal, aunque se han conseguido estudiar estadios intermedios de ésta.

Existen muy pocas líneas celulares en cultivo con fenotipo acinar. Entre ellas, la línea celular AR42J que deriva de un carcinoma acinar de rata inducido químicamente y la línea 266-6 que deriva de un tumor pancreático inducido mediante la expresión de un gen de fusión de elastasa I y el antígeno SV-40 en ratón. Las células AR42J son diferentes a las células acinares al menos en tres características: proliferan rápidamente, sintetizan enzimas (pero raramente los almacenan en gránulos de cimógeno) y no

presentan secreción regulada, sino constitutiva. Además, presentan también características neuroendocrinas, como vesículas neuroendocrinas y neurotransmisores; por ello se dice que estas células son anficrinas (48). Se ha descrito que en determinadas condiciones de cultivo pueden diferenciarse a células productoras de insulina (180, 280), y el subclon AR42J-B13 puede transdiferenciarse a hepatocitos (256) y neuronas (218). Las células 266-6 expresan marcadores de diferenciación acinares (enzimas digestivos), pero han sido pobremente caracterizadas. Datos no publicados de nuestro grupo indican que estas células expresan también transcritos de RNAm que codifican para marcadores endocrinos.

En conclusión, los modelos celulares de diferenciación acinar de los que se dispone son muy limitados. Una alternativa posible sería generar modelos *in vitro* de diferenciación acinar a partir de células madre con el fin de estudiar que vías de señalización y que factores de transcripción están implicados en los distintos estadios dicha diferenciación.

## **5: CÉLULAS MADRE**

---

### **5.1. ¿QUÉ ES UNA CÉLULA MADRE?**

Dos características definen a las células madre; en primer lugar su capacidad de autorreplicación ilimitada, y en segundo lugar, su capacidad de diferenciación a uno o más tipos celulares especializados. Por lo tanto, el concepto de célula madre incluye un amplio rango de células con diferentes capacidades de proliferación y diferenciación.

### **5.2. TIPOS DE CÉLULAS MADRE SEGÚN SU ORIGEN**

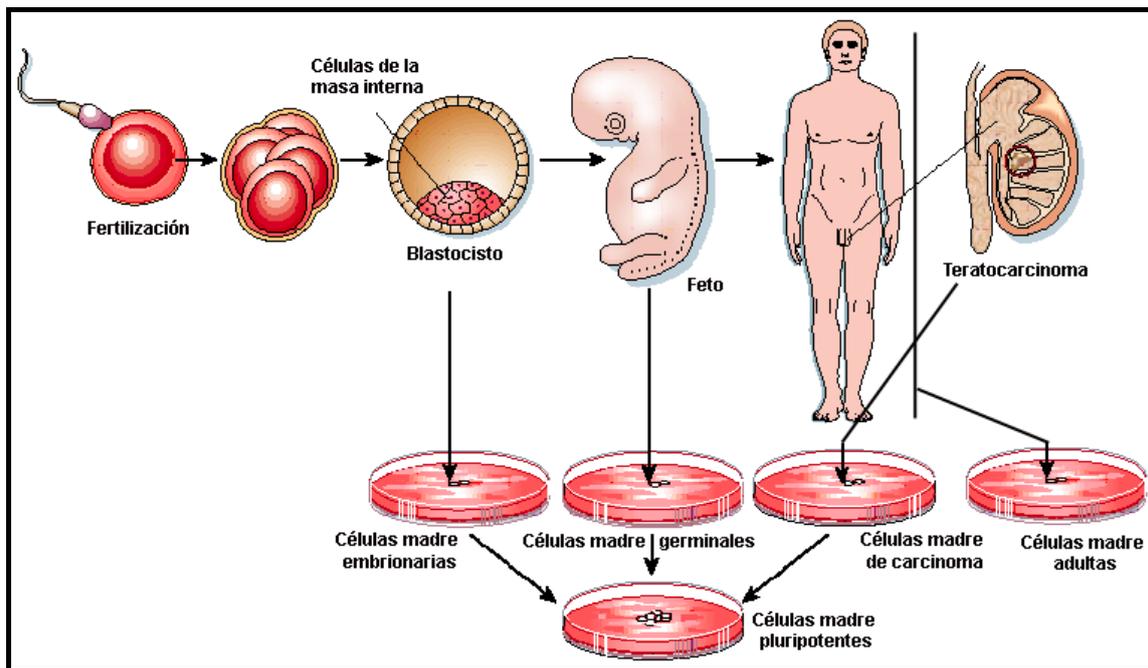
De manera general se pueden clasificar las células madre según su origen en 4 tipos: células madre de carcinoma (EC), células madre germinales (EG), células madre embrionarias (ES) y células madre adultas (Figura 1.19). Las tres primeras líneas celulares (EC, EG, ES) son pluripotentes y las células madre adultas pueden ser multipotentes o unipotentes.

Estudios *in vivo* demuestran que cuando las células ES y EG son introducidas en la masa interna del blastocisto, dan lugar a quimeras y contribuyen a la formación de todos los linajes del embrión. También se ha descrito que las células EC sólo en algunos casos pueden generar quimeras debido a la dificultad que tienen de colonizar la línea germinal (192). Esta incapacidad refleja el hecho de que las células EC tienen un cariotipo aneuploide inestable. Por otro lado, las células madre adultas no son pluripotentes, por lo cual no pueden formar quimeras.

#### **5.2.1. CÉLULAS MADRE DE CARCINOMA (EC)**

Las primeras células madre que se establecieron en los años 70 por Khan y Ephrussi, fueron las células madre de carcinoma (Figura 1.20), que derivan de los teratocarcinomas (74). Los teratocarcinomas son tumores complejos que contienen una mezcla de distintos tipos celulares diferenciados y una población de células indiferenciadas; de éste compartimento indiferenciado es del cual derivan las células EC. Estas células pueden expandirse de manera indefinida en cultivo y pueden

diferenciarse a todos los linajes derivados de las tres capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo). Al ser células derivadas de un tumor presentan alteraciones genéticas y pueden perder la capacidad de diferenciación, por eso no son utilizadas para terapia (62). A pesar de esta limitación, el estudio de las células EC ha permitido entender mejor qué moléculas juegan un papel importante en el desarrollo embrionario y regulan la diferenciación de las células madre embrionarias. Además, la experiencia obtenida con las células EC permitió construir las bases para el desarrollo y el cultivo de las células ES.

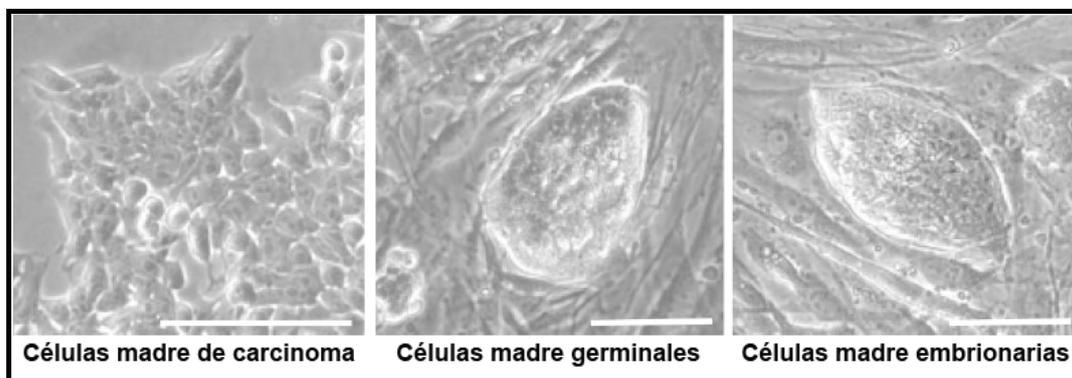


**Figura 1.19: Tipos de células madre según su origen.** Células madre embrionarias (ES), derivadas de la masa interna (ICM) del blastocisto. Células madre germinales (EG), derivadas del primordio germinal (PGC). Células madre de carcinoma (EC), derivadas de teratocarcinomas. Células madre adultas, derivadas de los tejidos adultos en los cuales residen. *Figura adaptada de Donovan JP., 2001.*

### 5.2.2. CÉLULAS MADRE GERMINALES (EG)

Las células madre germinales (EG) (Figura 1.20) derivan de las células del primordio germinal (PGC) de un embrión del estadio de E7.5. El cultivo de los PGCs con un cóctel específico de factores de crecimiento permite establecer el cultivo de las células EG, que pueden diferenciarse a todos los linajes derivados de las tres capas embrionarias y también, a las células germinales. Este proceso de conversión de los PGCs a células EG es un proceso similar al de reprogramación nuclear, en el cual un núcleo somático es reprogramado en el citoplasma de un óvulo convirtiendo el núcleo

de una célula nulipotente en un núcleo pluripotente (61). Por esto las células EG, junto con las células EC, fueron inicialmente de gran ayuda para entender qué factores de crecimiento y que vías de señalización eran necesarias para el establecimiento de las células madre embrionarias.



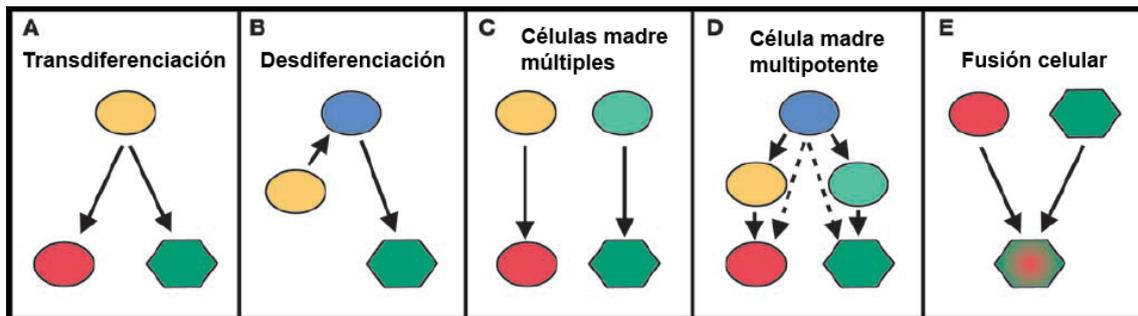
**Figura 1.20: Morfología de células EC, EG y ES en cultivo.** Barra 100  $\mu\text{m}$ . *Figura adaptada de Wobus A., 2005.*

### 5.2.3. LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS

Las células madre adultas son aquellas que encontramos en el tejido adulto y cuya función es la regeneración y el mantenimiento de los linajes celulares del tejido en el cual se encuentran. En el tejido adulto, estas células se encuentran en un microambiente que permite su establecimiento, mantenimiento, activación y control. Estos nichos están compuestos, no sólo de células madre adultas, sino de las células diferenciadas del tejido y la matriz extracelular. En este microambiente, las células madre adultas reciben señales de las células somáticas diferenciadas, por interacción célula-célula, por el conjunto de factores que éstas secretan, y por último también por la interacción con la matriz extracelular (78). Así pues, cada célula madre adulta reside en un nicho específico del tejido en el cual se encuentra.

Las células madre adultas pueden diferenciarse a uno o más linajes del tejido del cual derivan (hablamos entonces de unipotencialidad o multipotencialidad), aunque en los últimos años distintos estudios han demostrado que las células madre adultas fuera de su nicho pueden diferenciarse a linajes celulares derivados de otros tejidos. A esta capacidad se la ha denominado plasticidad celular. Así pues, por ejemplo, las células madre de médula ósea pueden contribuir a la regeneración de cerebro (32), corazón

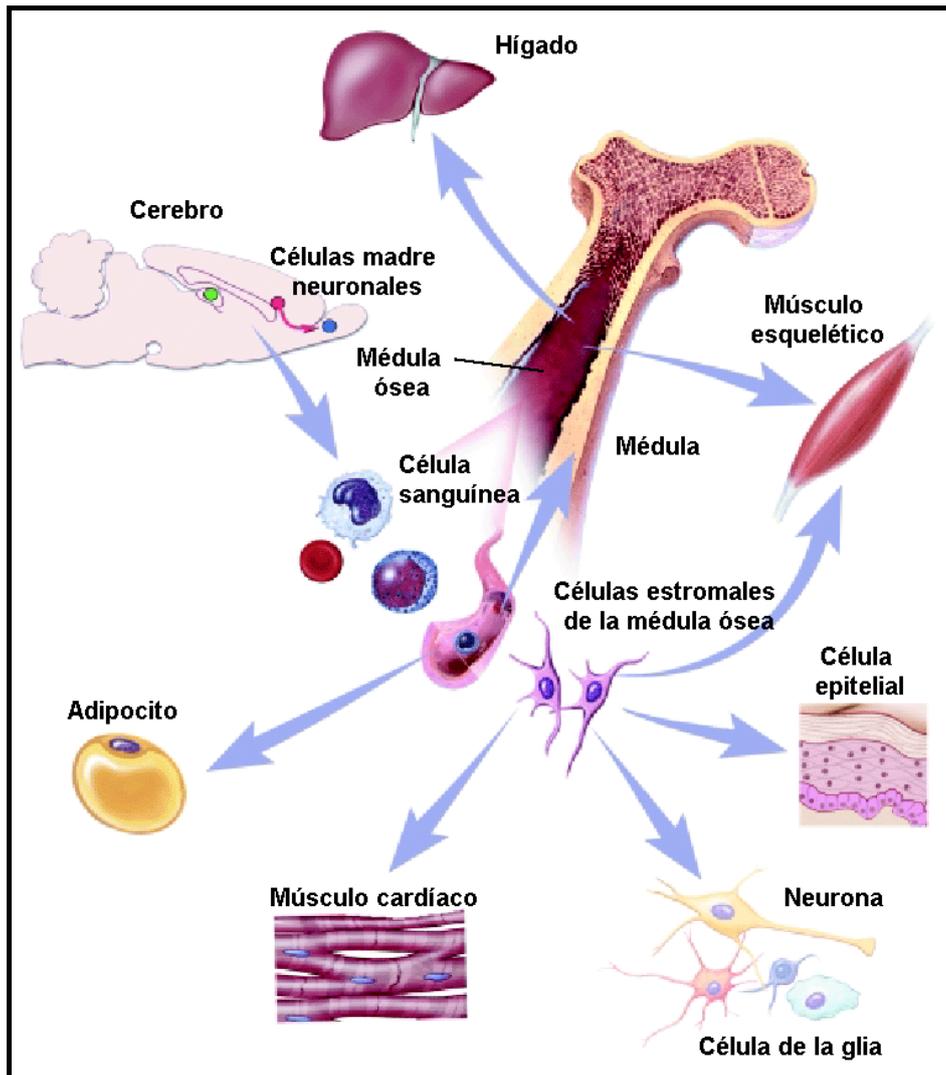
(223) y músculo (122) (Figura 1.22). Se han descrito distintos mecanismos por los cuales las células madre adultas pueden dar lugar a distintos linajes demostrando así su plasticidad (Figura 1.21). Aunque hay mucha controversia cuando se habla sobre la plasticidad de células madre adultas, ya que recientemente se ha demostrado que el hecho que tiene lugar no es una transdiferenciación celular sino una fusión celular, es decir, las células madre adultas adoptan el fenotipo de la célula del tejido por fusión espontánea (276) (Figura 1.22), aunque la frecuencia de este fenómeno es muy baja.



**Figura 1.21: Diagrama esquemático que describe el potencial y los mecanismos conocidos de plasticidad de las células madre adultas (A-E).** Los círculos amarillos o verdes representan células madre adultas tejido específicas; los círculos azules representan células multipotentes; los círculos rojos y los hexágonos verdes representan células diferenciadas tejido específicas. *Figura adaptada de Trucco M., 2005.*

### 5.2.3.1 Células madre adultas pancreáticas

Las células madre adultas se han identificado en varios tejidos como, en la médula ósea, intestino, piel, cerebro e hígado, entre otros. En el páncreas adulto tiene lugar la regeneración de las células  $\beta$  del islote, aunque no está claro todavía si este hecho acontece por neogénesis, a partir de una hipotética célula madre residente en el páncreas, o por autorreplicación de la propia célula  $\beta$  (63). En búsqueda del mecanismo de regeneración de las células  $\beta$  en el adulto, en los últimos cuatro años distintos estudios han intentado confirmar la existencia de células madre adultas en el páncreas. De todos estos trabajos se han descrito como posibles células madre: 1) las células ductales; 2) células que expresan Ngn3; 3) PMPs (pancreas derived multipotent precursors) 4) células que expresan el filamento intermedio nestina y 5) las células acinares (Figura 1.23).

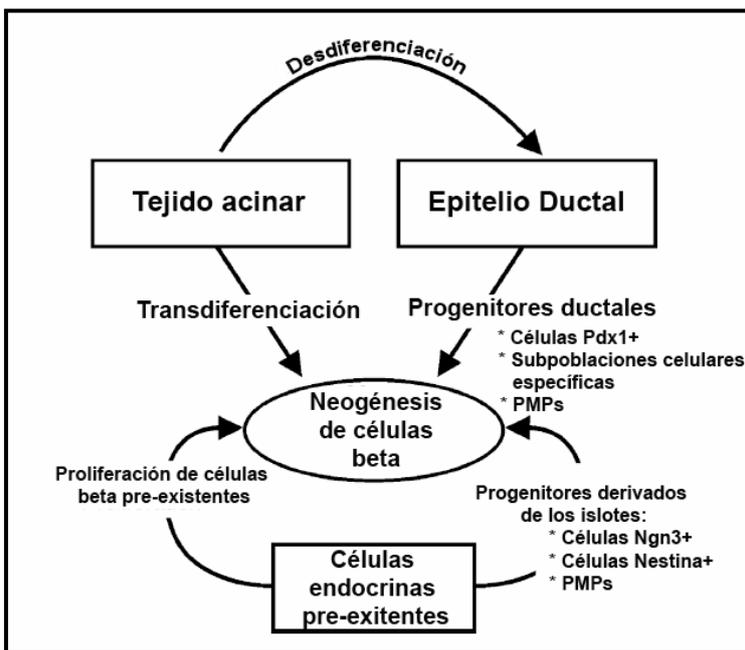


**Figura 1.22: Evidencias descritas de plasticidad de células madre adultas de ratón.** En la imagen se muestran los distintos linajes derivados a partir de células madre de la médula ósea como células del músculo esquelético, músculo cardíaco o hepatocitos. *Figura adaptada de Report on stem cells, 2001.*

Inicialmente se describió que las células ductales en cultivo podían diferenciarse a células productoras de insulina (235) y más recientemente, se ha demostrado que las células ductales fetales pueden diferenciarse también a células productoras de insulina (214). Las células endocrinas derivan de un precursor pancreático que expresa Ngn3 y datos recientes indican la posibilidad de la existencia en el adulto de células que expresan Ngn3 y que también en el adulto sería marcador de una población de precursores endocrinos (93). En búsqueda de una población de células madre en el páncreas se han conseguido derivar precursores multipotentes pancreáticos (PMPs) de manera clonal (de islotes y de ductos) a partir de los cuales se pueden diferenciar linajes pancreáticos y neurales (252). Por último, muy recientemente experimentos de

trazamiento de linaje han demostrado que las células acinares pueden transdiferenciarse a células productoras de insulina en presencia de EGF y nicotinamida (15).

También se ha descrito la posibilidad de que las células madre del páncreas sean células que expresan nestina, que es un filamento intermedio que fue inicialmente descrito como marcador de células madre neuronales. A pesar de que se ha descrito la diferenciación de células endocrinas (121), exocrinas y hepatocitos a partir de células pancreáticas que expresan nestina (307), ha habido mucha controversia sobre el uso de nestina como marcador de progenitores epiteliales pancreáticos. Sin embargo, trabajos recientes demuestran mediante trazamiento de linaje que las células nestina positivas marcan una población de precursores pancreáticos exocritos durante el desarrollo pancreático (56, 69). También se ha demostrado que en el adulto durante la metaplasia acinar-ductal las células acinares se desdiferencian generando una población celular nestina positiva similar a la observada durante el desarrollo pancreático (185), aunque esta observación está pendiente de ser confirmada por otros grupos.



**Figura 1.23: Esquema general de las posibles fuentes de neogénesis de islotes en el páncreas adulto.**

a) Transdiferenciación directa de la célula acinar a célula  $\beta$  o indirectamente mediante la desdiferenciación de la célula acinar a célula ductal. b) Desdiferenciación de la célula ductal a célula  $\beta$  o presencia en el epitelio ductal de progenitores Pdx1+, subpoblaciones celulares específicas o PMPs. c) Proliferación de células  $\beta$  preexistentes en el islote o presencia de progenitores Ngn3+, o nestina+ o PMPs en

los islotes. *Figura adaptada de Street CN., 2004.*

## **6. CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS (ES)**

Las células madre embrionarias de ratón fueron aisladas por primera vez en 1981 (71, 178), utilizando técnicas de cultivo basadas en la experiencia obtenida del cultivo de células EC. Las células ES murinas derivan de las células de la masa interna de un blastocisto antes de su implantación (3.5 dpc) (Figura 1.24). Las células ES pueden diferenciarse a todos los linajes celulares derivados de las tres capas embrionarias. Aunque las células de la masa interna tienen una vida corta en el embrión *in vivo*, pueden propagarse de manera indefinida en cultivo en un estado indiferenciado, creciéndolas en presencia de LIF (leukemia inhibitory factor) y/o sobre una capa de fibroblastos embrionarios (MEF) (294).

Para el establecimiento de las células ES a partir de las células de la masa interna del blastocisto (ICM), se aíslan las células de la ICM y se transfieren a una placa de cultivo con medio rico en nutrientes y factores de crecimiento. Además estas células necesitan crecer sobre un soporte de fibroblastos fetales de ratón irradiados (MEFs) o inactivados con mitomicina para impedir su proliferación, sobre los cuales se adhieren y a su vez les suministran nutrientes. Las células forman colonias que luego son disgregadas y vuelven a poner en una capa de MEFs estableciéndose así los cultivos de células ES (Figura 1.24). Unos años más tarde, se derivaron líneas de células ES que no requieren co-cultivarse con células nodrizas ya que están adaptadas al suplemento con LIF. Esta condición es suficiente para el mantenimiento de la pluripotencialidad y la capacidad de autorenovación de las células, como las líneas CGR8 y E14Tg2a (113, 277).

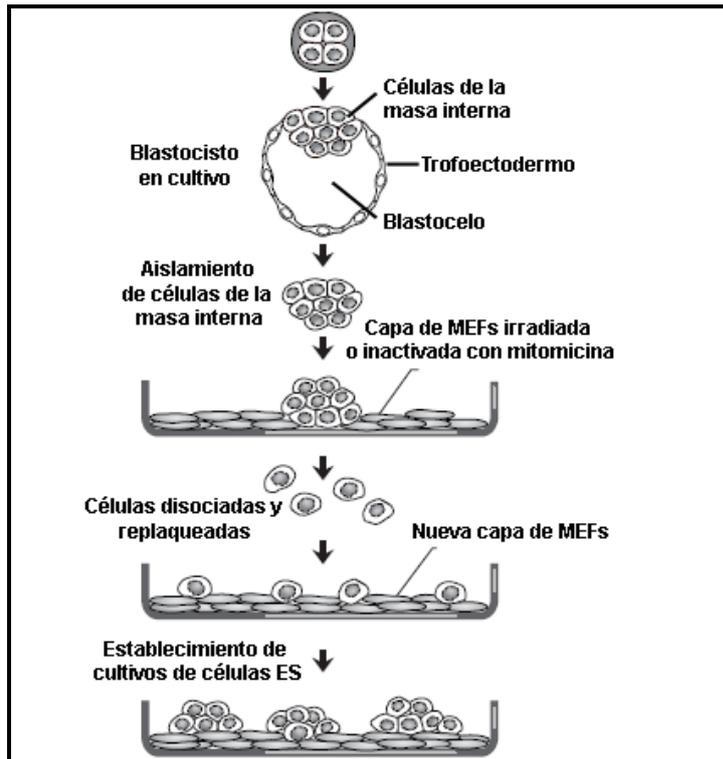


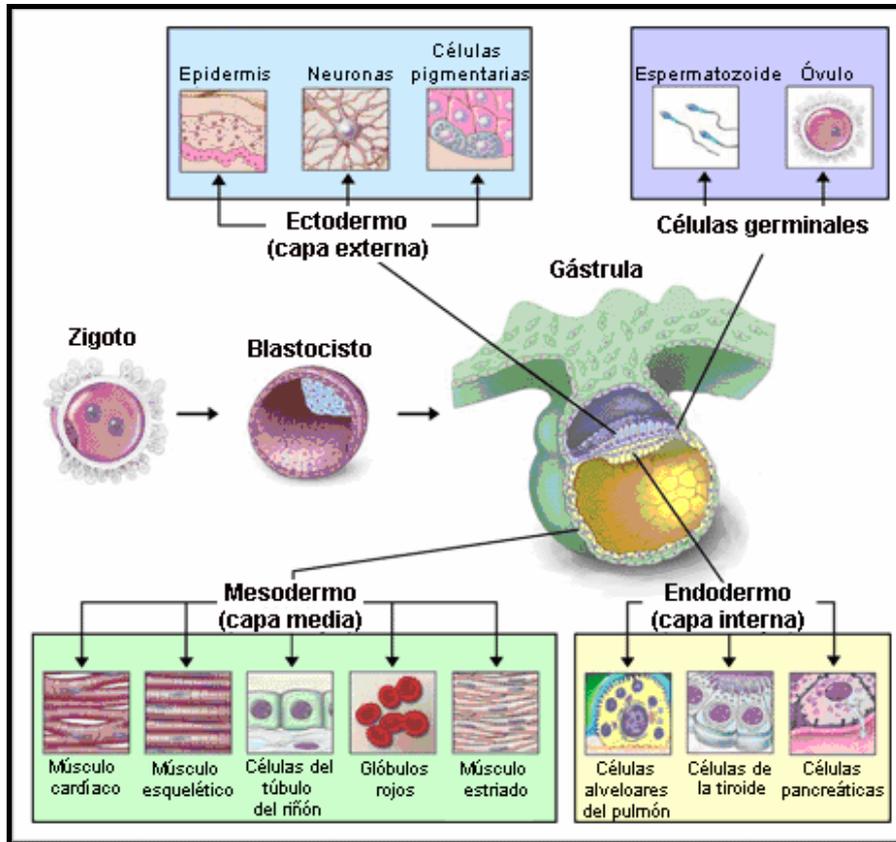
Figura 1.24: Establecimiento de una línea de células ES en cultivo.

**Las características principales de las células ES son:**

1. Son células indiferenciadas que pueden propagarse indefinidamente en cultivo, con capacidad clonogénica, es decir, una única célula es capaz de dividirse de manera simétrica y formar una población entera de células genéticamente idénticas a ella misma (Figura 1.20).
2. Son células pluripotentes, que pueden diferenciarse a todos los linajes celulares derivados de las tres capas embrionarias: endodermo, ectodermo y mesodermo, y también a células germinales (Figura 1.25).
3. Tienen un cariotipo diploide estable.
4. Generan teratomas si se transfieren a ratones inmunodeprimidos.
5. Capaces de integrarse en el blastocisto de un embrión en desarrollo y formar quimeras.
6. Se caracterizan por la expresión de determinados marcadores de superficie e intracelulares, entre los cuales destacar, los antígenos específicos de superficie SSEA 1-4 (stage specific embryonic antigens), la expresión de factores de transcripción como Nanog (37) y Oct-4 (181), así como la expresión enzimática

de fosfatasa alcalina y telomerasa, la actividad de la cual podría explicar, en parte, la capacidad ilimitada de división de las células ES.

7. Además son células fáciles de modificar genéticamente.



**Figura 1.25: Tejidos derivados de las distintas capas embrionarias.**

*Figura adaptada de Report on stem cells, 2001.*

Con el fin de definir una célula madre en base a un perfil de expresión génica, concepto que se ha denominado *stemness*, en estos últimos años se ha trabajado mucho en el estudio de marcadores expresados y mecanismos o vías de señalización comunes en los distintos tipos de células madre. El interés por identificar marcadores característicos de células ES es debido a que los hasta ahora conocidos no se expresan exclusivamente en células ES y por ello es necesario analizar la expresión de una batería de marcadores. Los marcadores que se muestran en la Tabla 1.4 son los que se han ido describiendo como aquellos marcadores característicos de células madre embrionarias indiferenciadas.

En estos años también se han estudiado las bases moleculares para el mantenimiento de la capacidad de autorenovación y el fenotipo indiferenciado de las

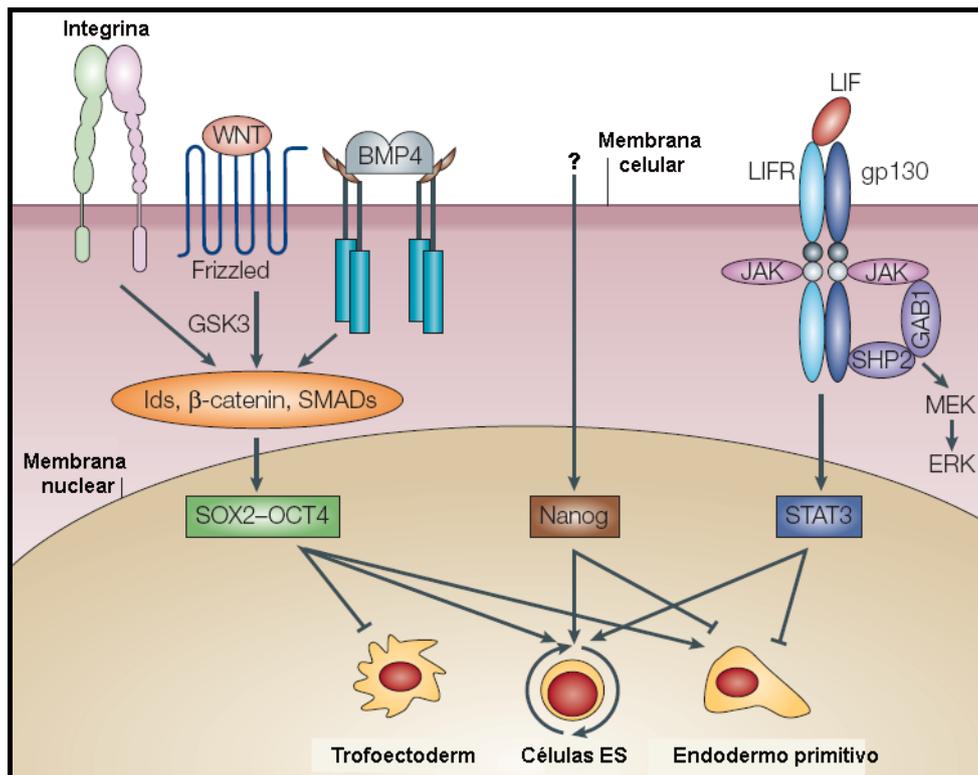
células ES. Se ha descubierto la importancia de la expresión de los factores transcripcionales Nanog (44, 196) y Oct4 (Octamer-binding transcription factor-4) (207) principalmente, pero también de Sox2 (14), FoxD3 (102) y la activación de la vía de señalización de Stat3 (signal transducer and activator of transcription-3) (181, 210, 294). Más recientemente se ha descrito la importancia de los BMPs (bone morphogenetic protein) (302) y la vía de señalización de Wnt (251).

<b>Marcador</b>	<b>Localización</b>	<b>Expresión en células ES de ratón</b>
<b>Fosfatasa alcalina</b>	<b>Superficie</b>	✓
CD9	Superficie	✓
CRTR-1	Intracelular	✓
EHOX	Intracelular	✗
FoxD3	Intracelular	✓
Hsp27	Intracelular	✗
<b>Nanog</b>	<b>Intracelular</b>	✓
Nucleostemin	Intracelular	✓
<b>Oct-4</b>	<b>Intracelular</b>	✓
Pramel-4	Intracelular	✓
Pramel-5	Intracelular	✓
Rex-1	Intracelular	✓
Sox-2	Intracelular	✓
<b>SSEA-1</b>	<b>Superficie</b>	✓
<b>SSEA-3</b>	<b>Superficie</b>	✗
<b>SSEA-4</b>	<b>Superficie</b>	✗
<b>Telomerasa</b>	<b>Intracelular</b>	✓
Thy-1	Superficie	✗

**Tabla 1.4: Marcadores expresados en células ES de ratón:** ✓ Marcador expresado en células indiferenciadas, cuya expresión decrece durante la diferenciación. ✗ Marcador que no se expresa en células indiferenciadas cuya expresión aumenta durante la diferenciación.

Nanog, Oct4 y Stat3 son importantes para el mantenimiento de la capacidad de autorenovación y del estado indiferenciado de las células ES. Oct4 es necesario para la regulación del destino celular en el embrión, se expresa en la ICM y su expresión disminuye durante la diferenciación del trofoblasto. Nanog es importante para la especificación de las células pluripotentes del embrión temprano. Sox2 y FoxD3 están

implicados en el mantenimiento del epiblasto después de la implantación. La activación de Stat3 por LIF en las células ES en cultivo les permite mantener su capacidad de autorenovación (aunque LIF no es necesario durante el desarrollo embrionario). En los primeros estudios del mantenimiento del estado indiferenciado y la capacidad de autorenovación de las células ES se descubrió el papel crucial de Oct4 y Stat3 (LIF) (181, 210), pero más tarde se ha demostrado que la sobreexpresión de Nanog permite que las células ES mantengan su estado indiferenciado de manera independiente al estímulo de Oct4/Stat3. Por otra parte, también se ha observado en células que sobreexpresan Nanog que la capacidad de formar colonias incrementa en presencia de LIF, hecho que parece indicar que Nanog y Stat3 actúan de manera sinérgica (44, 196). Además se ha descrito recientemente que la presencia de nuevas señales en el suero contribuye a mantener la capacidad de autorenovación y que Stat3 no es suficiente para mantener esta capacidad (Figura 1.26).



**Figura 1.26: Combinación de vías de señalización implicadas en el mantenimiento del fenotipo indiferenciado y la pluripotencialidad de las células ES.** Los receptores de superficie inician la activación de vías de señalización que afectan factores de transcripción implicados en la pluripotencialidad (Oct-4 y Nanog) y en la autorenovación (STAT3). Cuando LIF se une a su receptor (LIFR) tiene lugar la heterodimerización de éste con otra proteína transmembrana, glicoproteína-130 (gp130); esto implica la activación de quinasas que amplifican la señal y la dirigen hacia el núcleo. Además el heterodímero puede reclutar la tirosina quinasa janus (JAK) y la antifosfotirosina

quinasa inmunoreactiva (TIK) que fosforilan el heterodímero. Esta fosforilación implica la activación de la vía de STAT3. A nivel nuclear, STAT3, Oct-4 y Nanog activan o reprimen la expresión de genes implicados en el mantenimiento de las células madre. La función de Oct-4 puede conectarse con la de otros cofactores como Sox2. Las integrinas, la vía de Wnt y los BMPs también están implicados en estos procesos. *Figura adaptada de Yates A., 2005.*

La activación de la vía canónica de Wnt también juega un papel importante en el mantenimiento del fenotipo indiferenciado ya que en ausencia de LIF es capaz de mantener la expresión de Nanog y Oct4 (251). Por último se ha descrito la importancia de BMP4, que contribuye al efecto de LIF activando el factor de transcripción SMAD4 (similar to mothers against decapentaplegic homologue-4) que a su vez activa genes Id (inhibitor of differentiation). Se ha demostrado que la expresión de los Ids se induce por BMP/Smad en células neuroepiteliales, mioblastos y en cultivos de células ES en diferenciación (Figura 1.26) y que los BMPs bloquean la diferenciación neural mediante la inducción de Ids.

Recientemente también se ha descrito la importancia, en el mantenimiento del fenotipo indiferenciado y la capacidad de autorenovación de las células ES, de las proteínas del grupo Polcomb (PcG) y de la estructura de la cromatina, es decir, su estado de compactación. Las PcG forman complejos represivos (PRCs) que se unen a la cromatina y mediante modificaciones epigenéticas de la estructura de la cromatina promueven el silenciamiento de los genes (31, 161, 273). En las células ES, se ha descrito la importancia del complejo represivo PRC2, que contiene entre otras proteínas EZH2, SUZ12 y EED (131), ya que no se han conseguido derivar líneas de células ES a partir de blastocistos deficientes para Ezh2 (67, 212). Además se han mapeado los sitios de unión al DNA de SUZ12 en el genoma humano, revelando que PRC2 se asocia a regiones que contienen genes reguladores de procesos de desarrollo que están reprimidos en las células ES (161). Asimismo, se ha descrito que en muchos de los casos las regiones del DNA a las que se une PRC2 son también regiones a las que se unen Oct4, Sox2 y Nanog, sugiriendo que la función de los PcGs sería la de mantener la represión de genes establecida en las células ES por Oct4, Nanog y Sox2.

### **6.1. UTILIZACIÓN TERAPÉUTICA DE LAS CÉLULAS ES**

Actualmente, una de las limitaciones terapéuticas más importantes de la medicina regenerativa es la falta de órganos para el trasplante. Por ello, para ciertas patologías la terapia celular podría ser una buena alternativa. Estas células pueden venir del propio paciente (autotrasplante), de un donante de la misma especie (alotrasplante) o de un donante de otra especie (xenotrasplante). Las células diferenciadas especializadas son una herramienta óptima para corregir las funciones biológicas defectuosas, pero el problema principal es que tienen una capacidad de proliferación muy reducida, así que el número de células del cual se dispone es muy bajo.

Otra alternativa es el uso de células madre adultas, pero así como algunas de ellas están más bien caracterizadas, como las hematopoyéticas y las mesenquimales, hay otras que no lo están y son difíciles de identificar y de aislar, como las pancreáticas y las neuronales. Otro de los problemas de las células madre adultas es, en algunos casos, que su capacidad de diferenciación y su plasticidad es reducida (286).

Por este motivo, la utilización de las células madre embrionarias humanas para el desarrollo de nuevas terapias celulares es una estrategia prometedora. Por un lado, son una fuente importante de células debido a su inmortalidad y a su elevada tasa de replicación y por otro lado, debido a su pluripotencialidad son una posible fuente para los distintos linajes celulares. Los estudios con células madre de ratón apoyan el uso de células madre humanas, ya que las células diferenciadas derivadas de éstas al inyectarse en el órgano, normal o patológico, se integran en la estructura del órgano y en ciertas situaciones patológicas experimentales corrigen parcialmente y/o transitoriamente la función biológica defectuosa (35, 141, 144, 152, 184). Trabajos recientes con células ES humanas demuestran que, como las murinas, se integran eficazmente en el sistema nervioso (236, 305).

Así pues, parece posible el uso de las células ES humanas, para diferenciar *in vitro* un amplio espectro de linajes celulares especializados, susceptibles de ser usados en terapia celular para enfermedades degenerativas o debidas a la insuficiencia funcional de las células. Entre estas patologías, podrían encontrarse la diabetes, el

Parkinson, lesiones en la médula espinal, insuficiencias hepáticas, enfermedades cardiovasculares, distrofia muscular de Duchenne y ciertos cánceres.

### **6.1.1. LIMITACIONES DEL USO DE LAS CÉLULAS ES CON FINES TERAPÉUTICOS**

Para que sea posible el uso de las células ES humanas en terapia celular se tienen que solventar algunos obstáculos, para asegurarse de que no implican ningún riesgo para el hombre. Entre estos obstáculos cabe destacar (Figura 1.29):

1. Las posibles modificaciones genéticas y epigenéticas que pueden surgir a lo largo de los cultivos de estas células.
2. La obtención de poblaciones homogéneas diferenciadas en cultivo.
3. Asegurarse de la integración funcional de las células ES dentro del tejido.
4. Asegurarse de la compatibilidad inmunológica entre las células ES (donante) y el receptor, para que no haya problemas de rechazo.
5. Asegurarse de que el uso de estas células no pueda ser causa de la formación de tumores o transmisión de agentes infecciosos.
6. Solventar los problemas éticos que el uso de células ES conlleva.

Con el fin de intentar solucionar los límites que impiden actualmente el uso de células madre humanas en medicina regenerativa se están abordando distintas soluciones.

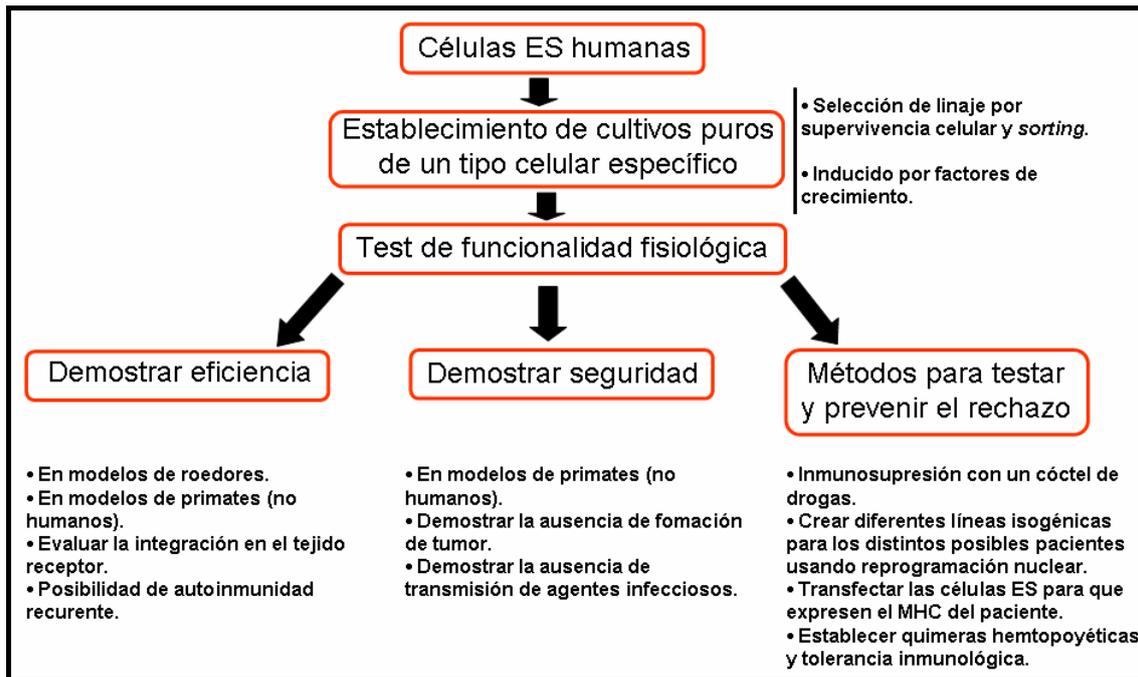


Figura 1.29: Objetivos a desarrollar para solventar las limitaciones de la terapia celular con células ES humanas. *Figura adaptada de Report on stem cells, 2001.*

### 6.1.2. CONTROL DE LA DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE LAS CÉLULAS ES EN UN TIPO CELULAR DE INTERÉS

La diferenciación *in vitro* de células ES se puede abordar con distintas estrategias:

- **La optimización de las condiciones de cultivo, con el uso de factores solubles inductores de la diferenciación.**

Para mejorar las eficiencias de diferenciación hacia los diferentes linajes de interés, en los últimos años se ha trabajado en el uso de factores solubles inductores o inhibidores de ciertos programas de diferenciación, añadiéndolos al medio de cultivo. Igualmente se han cribado moléculas y drogas que activan vías de señalización específicas.

- **Sobreexpresión de factores de transcripción implicados en el desarrollo embrionario.**

También con el interés de mejorar las eficiencias de diferenciación se ha trabajado en la sobreexpresión de factores de transcripción en las células ES gracias a técnicas de ingeniería genética, introduciendo mediante vectores de expresión el cDNA del gen de interés.

Las técnicas empleadas para hacer de vehículo del transgen han sido principalmente, la transfección (mediante agentes químicos, lipolíticos o por electroporación) o la transducción mediante vectores virales (adenovirus y lentivirus). Estas técnicas permiten la expresión del transgen de forma estable o transitoria, constitutiva o inducible y también regulada (controlada). Aunque la sobreexpresión de transgenes en células ES, no es fácil por distintos motivos. Primero, la eficiencia de transfección por los sistemas clásicos es muy baja y segundo, la expresión estable del transgen es difícil de mantener durante la diferenciación. Para solventar estos puntos se ha trabajado mayoritariamente en los últimos años en el uso de vectores virales y también con sistemas de expresión inducible mediante recombinación homóloga en el locus de ROSA26, usado por su accesibilidad a ser manipulado genéticamente y por su expresión ubicua.

Otro avance tecnológico que está siendo desarrollado es el de la aplicación de técnicas de interferencia de ARN (RNAi) con el fin de inhibir la expresión de genes de interés.

- **Selección del tipo celular de interés por marcadores de superficie o por selección genética**

Las técnicas de citometría de flujo (FACS, fluorescent activated cell sorting) han permitido seleccionar los tipos celulares de interés en base a la expresión de marcadores de superficie específicos.

El uso de vectores de expresión, portadores de promotores específicos de los linajes celulares de interés que controlan la expresión de un gen de resistencia a un

antibiótico (i.e. Neomicina, higromicina), y/o la expresión de un gen *reporter* (GFP o LacZ) han permitido seleccionar genéticamente los linajes diferenciados de interés. De esta manera se pueden purificar las células diana, mediante la expresión del gen *reporter* y/o por la resistencia al antibiótico.

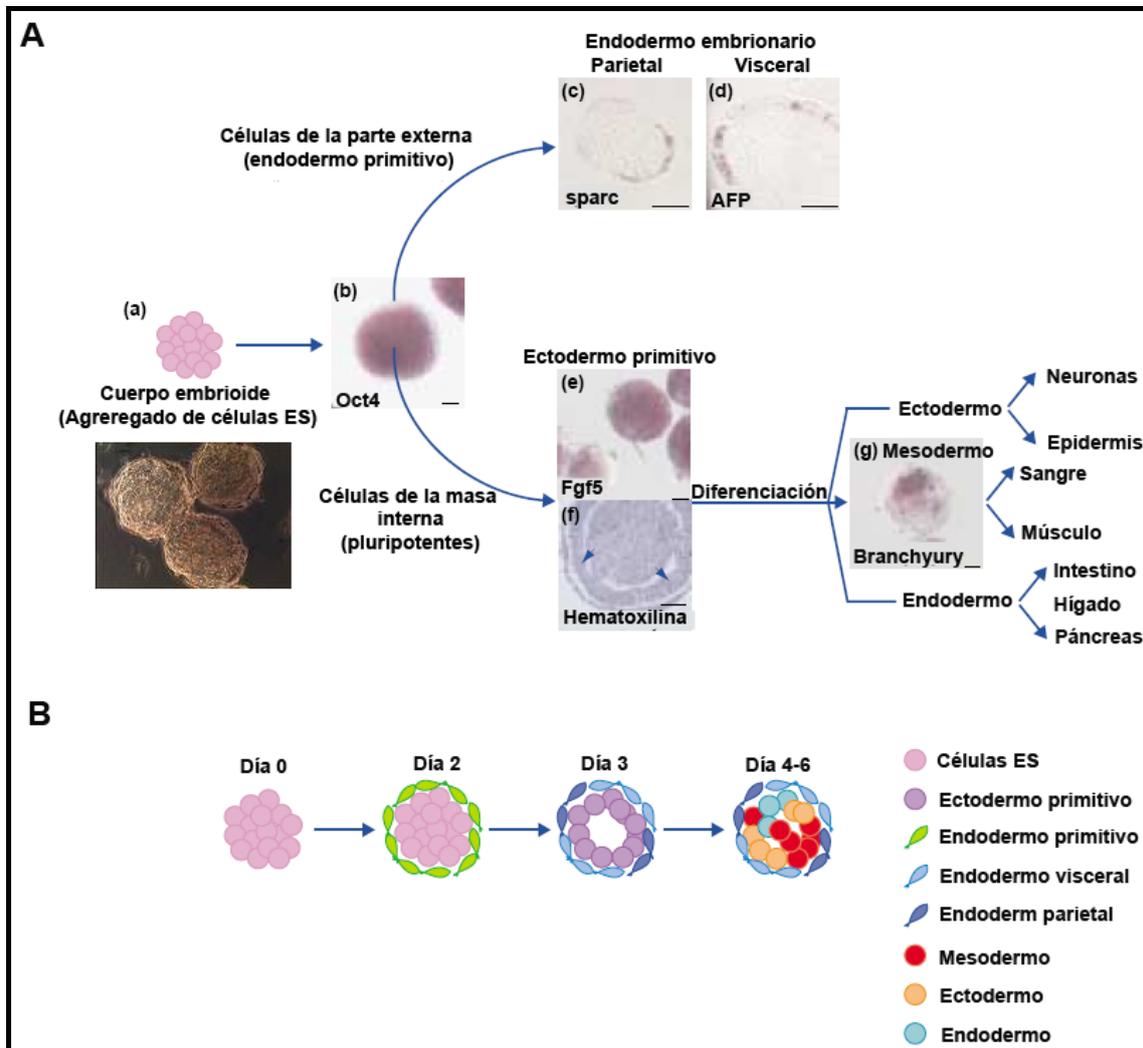
- **Uso de biomateriales (“scaffolds”) o cultivos en 3D (tres dimensiones)**

Más recientemente, se ha empezado a trabajar en la organización tridimensional de las células en diferenciación con las técnicas de ingeniería tisular. Con ello se favorecen los contactos entre células que son indispensables para la comunicación, diferenciación, maduración y organización de las células. Además los materiales usados para generar los andamiajes celulares podrían ser transplantados con ellas ya que en muchas ocasiones son biodegradables (76). Sobretudo, se han hecho estudios en este campo con células madre adultas para la diferenciación de osteoblastos y cardiomiocitos. Otros grupos también trabajan en cultivos 3D con distintos componentes de la matriz extracelular, así como laminina, matrigel o colágeno (45, 169, 170).

## **6.2. DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS (ES)**

Para la diferenciación de las células ES *in vitro* muchos protocolos se basan en la eliminación de los agentes que permiten el mantenimiento del fenotipo indiferenciado (LIF y/o MEFs) y la supresión de la adherencia a la placa. En estas condiciones, las células ES forman agregados celulares, denominados cuerpos embrioides (EBs), que se pueden generar de varias maneras como, mediante la técnica de gotas colgantes (296), en cultivos en suspensión líquida en placas bacteriológicas (60) o con el uso de medio semisólido de metilcelulosa (291). Los EBs son estructuras tridimensionales similares a embriones en la etapa de post-implantación *in vivo*. Las células ES en el EB empiezan a diferenciarse mimetizando el proceso de gastrulación y contienen células de las tres capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo), pero cabe destacar que el EB carece de polaridad antero-posterior. Los precursores mesodérmicos y ectodérmicos se forman en el EB en pocos días, mientras que los endodérmicos requieren de cultivos más prolongados cuando en el EB se forma una cavidad y se vuelve cístico (1, 157)

(Figura 1.27). Esto indica que el proceso de formación de las tres capas embrionarias se reproduce *in vitro*.



**Figura 1.27: Diferenciación de las células ES en suspensión formando EBs. A) Imágenes de inmunocitoquímicas de las distintas capas embrionarias que podemos encontrar en un EB. a) Agregado celular (día 0). b) Los destinos celulares quedan en parte determinados por su posición en el EB. Las células de la masa interna a día 2 expresan Oct4 y mantienen su pluripotencialidad. c, d) Las células pierden la expresión de Oct4 y expresan sparc (marcador de endodermo parietal) y AFP (marcador de endodermo visceral) a día 4. e, f) Posteriormente, tienen lugar cambios morfológicos y se forma una capa de células epiteliales (indicada con flechas) y se empiezan a expresar marcadores de ectodermo primitivo (Fgf5). g) Alrededor del día 4, las células pluripotentes empiezan a diferenciarse en células características de las tres capas embrionarias: mesodermo (branchyury), ectodermo y endodermo. Estas células pueden diferenciarse a los distintos linajes derivados de cada una de las capas. Barra = 75µM. B) Esquema de los distintos linajes celulares que se diferencian en los cuerpos embrioides (EB). Figura adaptada de Rathjen J. 2001.**

Tanto el tipo como la eficiencia de diferenciación de las células ES se ven afectados por parámetros como densidad celular, componentes del medio, factores de crecimiento, proteínas de la matriz extracelular, pH y osmolaridad.

Las células ES de ratón se han conseguido diferenciar *in vitro* a linajes derivados de mesodermo, ectodermo, endodermo (Figura 1.28) y más recientemente al linaje germinal.

### **6.2.1. DIFERENCIACIÓN A LINAJES CELULARES ECTODÉRMICOS**

La diferenciación de las células ES a células neuronales fue publicada de manera independiente por 3 grupos en 1995 (17, 77, 268). Diversos estudios también han demostrado la capacidad de las células ES de generar precursores neuronales (165, 221), neuronas serotonérgicas (75), GABAérgicas (160), glutaminérgicas (138), dopaminérgicas (160) y motoras (290). Además de células neuronales se han diferenciado a partir de células madre otros linajes de origen ectodérmico como, oligodendrocitos (34, 279) y astrocitos (275).

### **6.1.2. DIFERENCIACIÓN A LINAJES CELULARES MESODÉRMICOS**

Los linajes celulares derivados del mesodermo son los más fáciles de diferenciar a partir de células ES. El linaje más estudiado ha sido el hematopoyético (Keller 2005), pudiéndose diferenciar a partir de células madre tanto los linajes hematopoyéticos primitivos como definitivos (39, 136, 204, 209, 291). Además se han diferenciado células endoteliales (163, 238, 300), cardíacas (144, 176, 200, 297), adiposas (52), osteoblastos (23, 36) y condrocitos (145).

### **6.2.3. DIFERENCIACIÓN AL LINAJE GERMINAL**

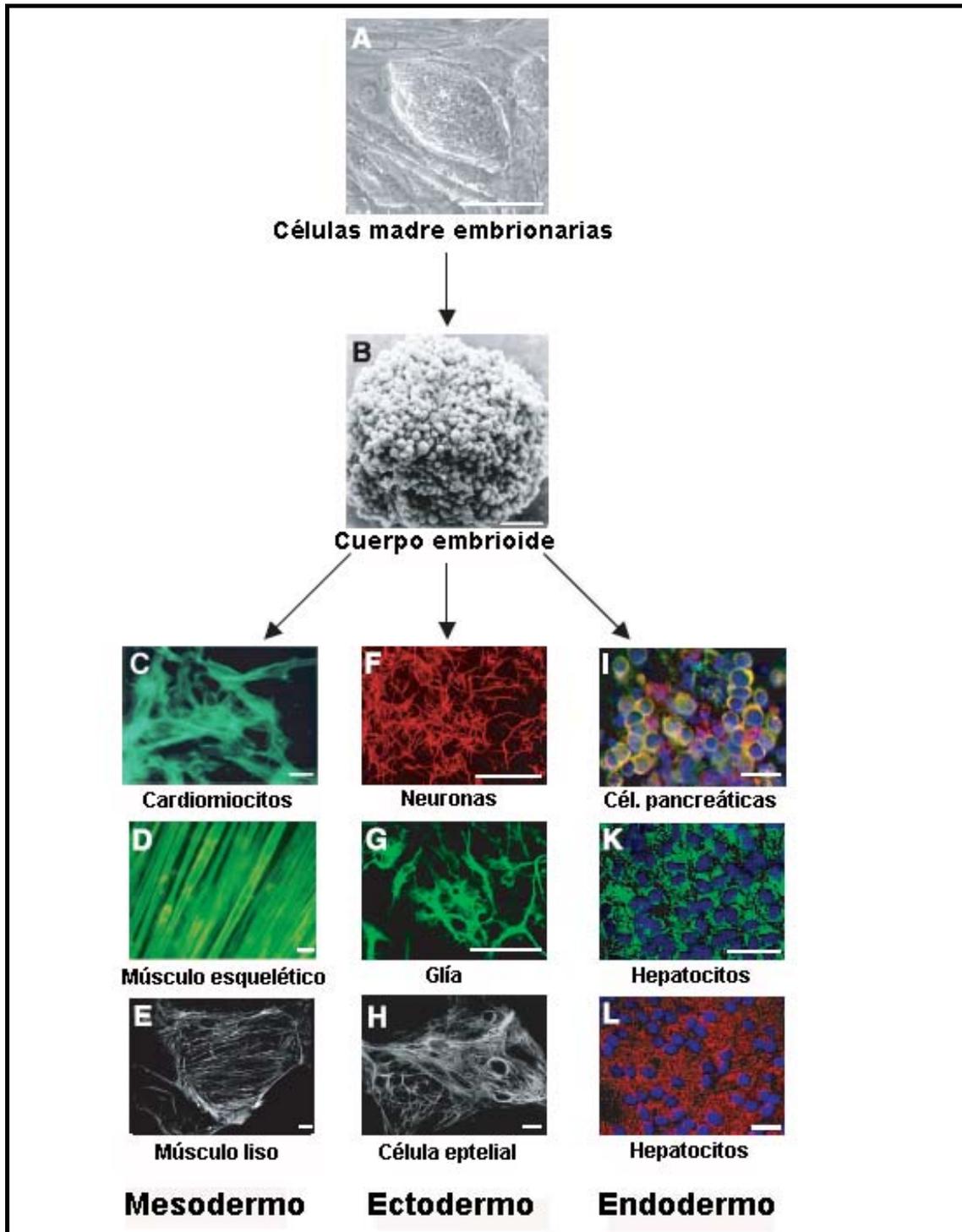
La diferenciación de células ES al linaje germinal, tanto femenino como masculino, se ha demostrado recientemente. Se han diferenciado células similares a oocitos (120) y células germinales masculinas (85, 278).

#### 6.2.4. DIFERENCIACIÓN A LINAJES CELULARES ENDODÉRMICOS

La diferenciación de las células ES a linajes endodérmicos se ha centrado principalmente en la diferenciación de células pancreáticas endocrinas (13, 24, 148, 151, 257, 262) y hepáticas (100, 101, 129, 234). También se han conseguido diferenciar tirocitos (168), células intestinales (299) y células pulmonares (5).

La eficiencia de diferenciación de las células ES a linajes celulares derivados del endodermo es mucho más baja que la diferenciación a linajes ectodérmicos y mesodérmicos. Esta baja eficiencia es debida a la falta de marcadores específicos del endodermo definitivo. Los marcadores clásicos de endodermo definitivo (Foxa2, HNF3 $\beta$ , Gata4 y Sox17), de desarrollo hepático ( $\alpha$ -fetoproteína y albúmina) y de páncreas (insulina y Pdx1) también se expresan en el endodermo visceral. El endodermo visceral deriva del endodermo extra-embriónico y éste no contribuye a la formación de los órganos. Debido a esta similitud en los perfiles de expresión es difícil distinguir el endodermo definitivo del visceral en los cultivos de células ES en diferenciación. Por otro lado, el suero fetal bovino (FBS) parece ser un buen inductor de la diferenciación mesodérmica pero no de la endodérmica (49, 149). Por último, los factores inductores específicos implicados en la diferenciación endodérmica son menos conocidos que los implicados en la diferenciación neuroectodérmica y mesodérmica.

Por ello en los últimos años distintos grupos se han centrado en el estudio de la diferenciación de las células ES en células del endodermo definitivo, con el fin de diferenciar a partir de ellas los distintos linajes derivados del endodermo. El principal problema ha sido definir que batería de marcadores identificaba correctamente al endodermo definitivo, expresándose muchos de ellos también en el mesodermo o mesoendodermo, entre ellos encontramos Foxa2, HNF3 $\beta$ , Gata4, Sox17, Mixl1, Gsc y Branchyury (49, 134, 149, 274). Los protocolos descritos para la diferenciación de células ES a endodermo definitivo se basan en el uso de Activina A en los cultivos así como bajas concentraciones o ausencia de FBS en el medio de cultivo.



**Figura 1.28: Diferenciación *in vitro* de células ES.** Células ES indiferenciadas (A), se agregan en suspensión formando cuerpos embrioides (EBs) (B), que contienen células de las tres capas embrionarias. Se muestran distintos tipos celulares diferenciados a partir de las células ES marcadas con un anticuerpo específico de tejido (entre paréntesis). C: cardiomiocitos (titin Z-band epítipo). D: músculo esquelético (titin Z-band epítipo). E: músculo liso ( $\alpha$ -actina de músculo liso). F: neurona ( $\beta$ III tubulina). G: célula glial (proteína ácida fibrilar de la glía, GFAP). H: células epiteliales (citoqueratina 8). I: células pancreáticas endocrinas (insulina (rojo), péptido C (verde), insulina y péptido C colocalización (amarillo)). K y L: hepatocitos (K, albúmina; L,  $\alpha$ 1-antitripsina). Barras = 0.5  $\mu$ m (H), 20  $\mu$ m (I), 25  $\mu$ m (C, D, E), 30  $\mu$ m (K, L), 50  $\mu$ m (B, G), and 100  $\mu$ m (A, F). *Figura adaptada de Wobus A., 2005.*

## **7. DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS ES A CÉLULAS $\beta$ PANCREÁTICAS**

En los últimos años varios grupos han trabajado en la diferenciación de las células ES a células  $\beta$ , siendo las primeras publicaciones del año 2000 (262). Esencialmente, los estudios han sido realizados en células ES de ratón que han servido de base para los estudios en células ES humanas. Las estrategias usadas para obtener células  $\beta$  a partir de células ES han sido múltiples y a veces combinando varias de ellas, de entre las cuales las principales han sido:

1. Diferenciación espontánea de las células ES.
2. Diferenciación a partir de células que expresan nestina.
3. Diferenciación mediante la utilización de factores de crecimiento.
4. Diferenciación mediante la sobreexpresión de factores transcripcionales.
5. Selección genética de las células diferenciadas.

### **7.1. DIFERENCIACIÓN ESPONTÁNEA DE LAS CÉLULAS ES A CÉLULAS $\beta$**

Las células ES tanto humanas como de ratón son capaces de diferenciarse de manera espontánea en células que expresan insulina, es decir, en ausencia de factores inductores de la diferenciación pancreática y de sistemas de selección (13, 133, 162, 260, 262). Para la diferenciación de las células ES a células  $\beta$  se induce la formación de EBs, ya que como, se ha comentado en el apartado 2, el páncreas deriva del endodermo y con los EBs ya se obtiene el paso inicial e indispensable de formación de células endodérmicas.

El protocolo de diferenciación espontánea consiste en eliminar el LIF del medio de cultivo e inducir la formación de los EBs, mediante la técnica de gotas colgantes o mediante agregación espontánea. Según los protocolos estos EBs se mantienen en suspensión entre 2 y 8 días y posteriormente se cultivan en condiciones adherentes durante períodos de 7 a 28 días.

En estas condiciones de diferenciación espontánea la eficiencia de diferenciación de las células ES a células que expresan insulina es muy baja siendo según los protocolos del 0,1% (133, 260), 1% (262) o como máximo del 2% (162). Además las células obtenidas son inmaduras, considerándose por eso células *β-like*, porque el contenido de insulina por célula es del 0,01% (262) en comparación con una célula  $\beta$  y son incapaces de secretar insulina en respuesta a glucosa (13, 260).

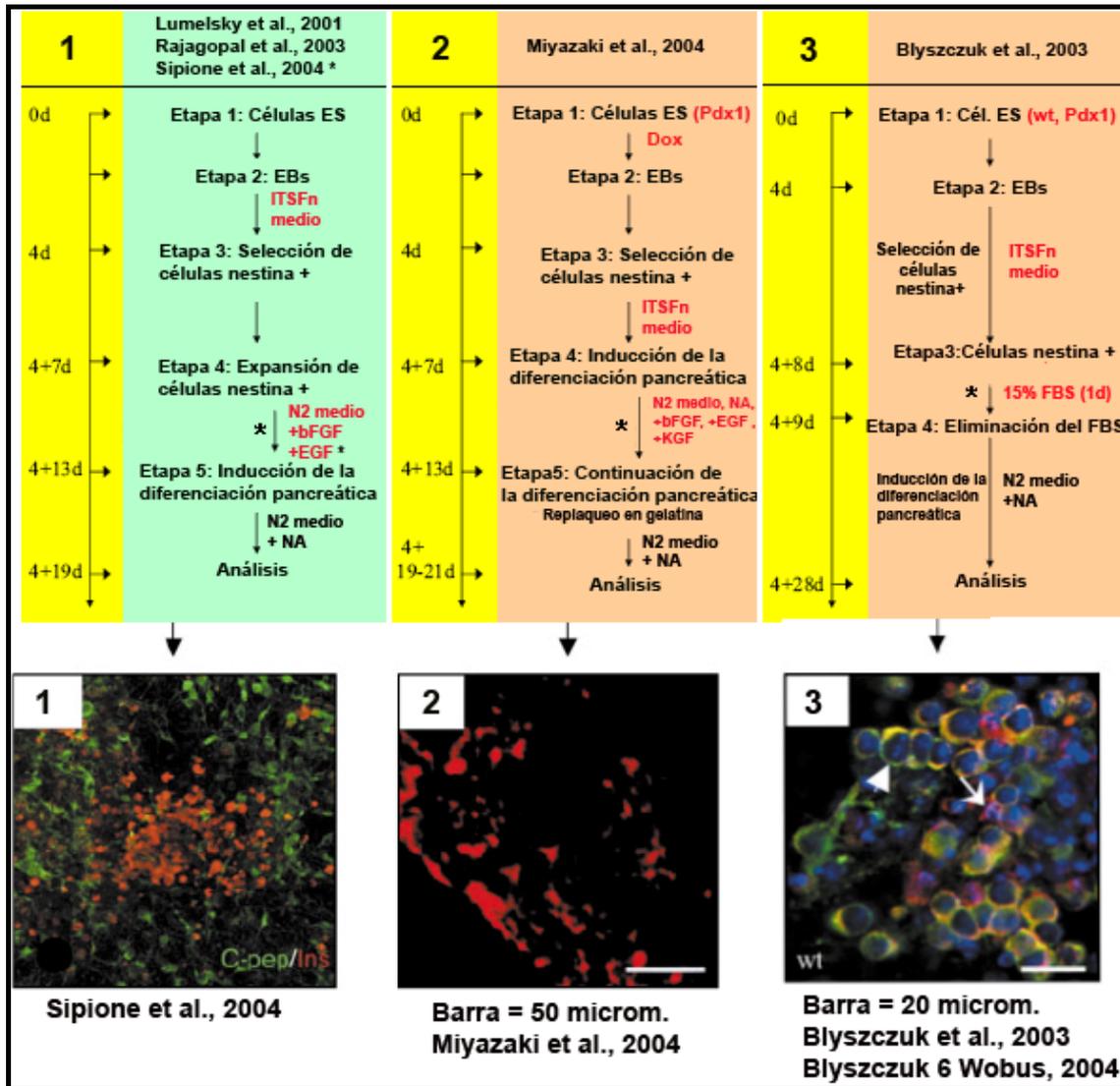
También se ha demostrado que al inducir la diferenciación espontánea de las células ES, la cinética de expresión de genes reguladores del desarrollo pancreático sigue una jerarquía reminiscente a la que tiene lugar durante el desarrollo embrionario (133, 261), lo que permite hipotetizar que se podrían propagar dichas células y con el uso de factores solubles activar vías de señalización adecuadas para la diferenciación al linaje celular de interés.

### **7.2. DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS $\beta$ A PARTIR DE CÉLULAS QUE EXPRESAN NESTINA**

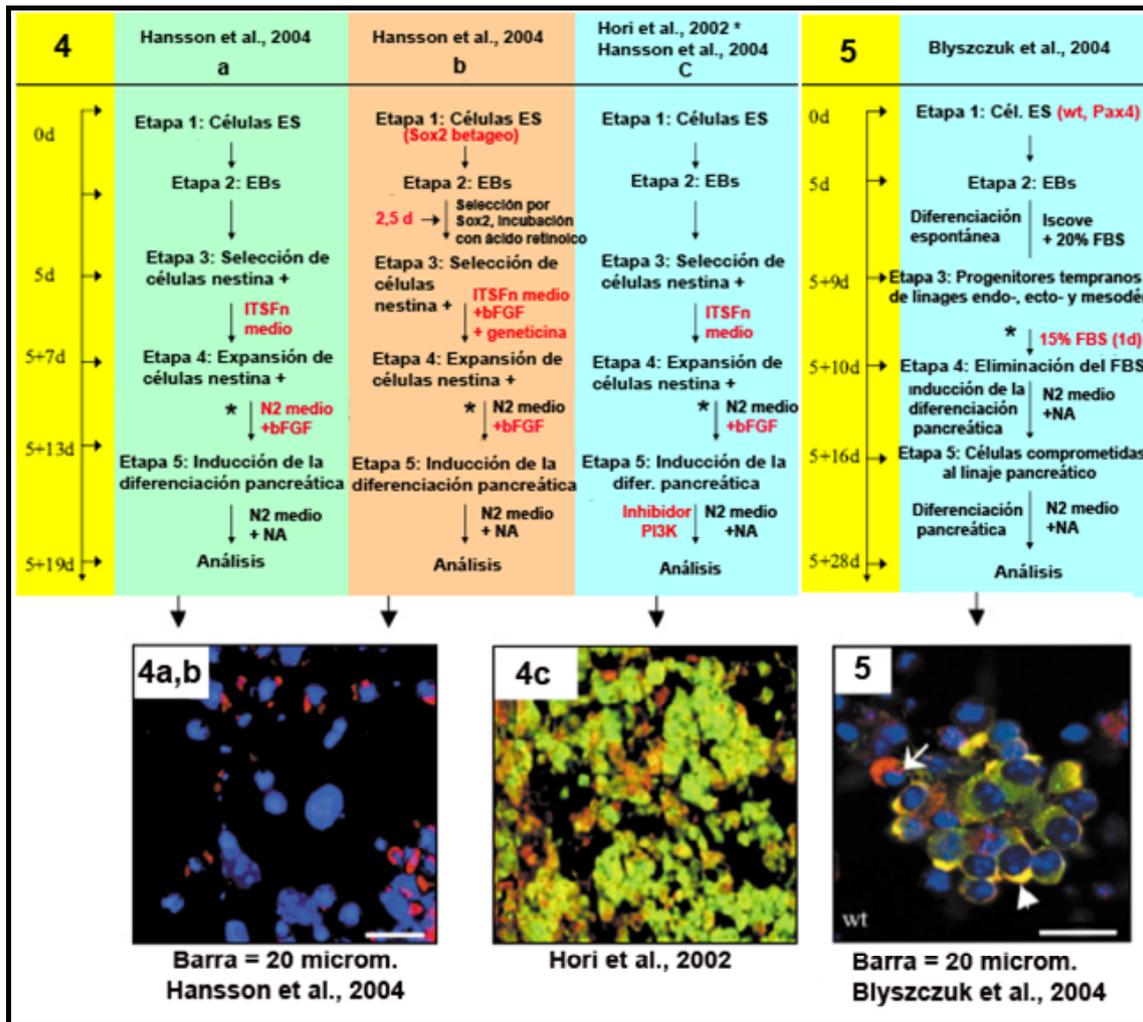
Debido a las similitudes que hay entre las células neuronales y las células pancreáticas endocrinas y también el hecho de haberse detectado la expresión de nestina (filamento intermedio utilizado como marcador de células madre neuronales) en el páncreas (121), distintos grupos han estudiado la posibilidad de obtener células productoras de insulina mediante la selección de células nestina, usando los protocolos de diferenciación inicialmente descritos para la diferenciación de neuronas (160). Lumelsky et al. fueron los primeros en abordar esta estrategia, obteniendo un 15% de células que expresan insulina 2, pero el contenido de insulina por célula es 50 veces menor que el de una célula  $\beta$ . Además no expresan ni insulina 1 ni Pdx-1, y no normalizan la glicemia en ratones diabéticos. A pesar de la ausencia de funcionalidad de las células generadas, distintos grupos trabajaron sobre el protocolo de Lumelsky intentando mejorarlo (25, 115, 197, 198, 253) (Figura 1.30).

Aún así, los resultados obtenidos no son significativamente mejores en cuanto al contenido de insulina por célula y a la normalización de la glicemia en ratones diabéticos. Incluso se observa en algunos casos que las células que expresan insulina son apoptóticas (25, 253). Este hecho generó mucha controversia debido a que no estaba claro si la insulina presente en las células era producida por éstas o endocitada del medio de cultivo, proponiéndose validar la expresión *de novo* de insulina mediante la coexpresión del péptido C, demostrando que la insulina detectada en las células no era sintetizada *de novo* sino que parece ser endocitada del medio de cultivo (233).

Sin embargo, recientemente otros estudios han intentado optimizar estos protocolos teniendo en cuenta dichas limitaciones (22, 24) (Figura 1.30). Las conclusiones principales de estos trabajos proponen que la eliminación de ITSFn y FGF-2 del medio de cultivo durante la preselección de los progenitores pancreáticos que expresan nestina y antes de la inducción de la diferenciación pancreática incrementa la eficiencia de diferenciación de células ES a células que expresan insulina y péptido C y disminuye el porcentaje de células apoptóticas (24).



**Figura 1.30 A: Comparación de 5 protocolos usados para la diferenciación de células ES a células productoras de insulina a partir de células que expresan nestina.** Las imágenes de la parte inferior muestran inmunofluorescencias de insulina o péptido C/insulina según el protocolo. **Protocolo 1:** Hay poblaciones celulares que expresan insulina (rojo) y otras que expresan péptido C (verde) pero no hay nunca coexpresión. **Protocolo 2:** Después de la etapa 5 se observan grupos de células que expresan péptido C (rojo), pero nunca hay coexpresión con insulina (Dox, doxiciiclina). **Protocolo 3:** Se observa coexpresión (amarillo), indicada con la punta de flecha, de péptido C (verde) con insulina (rojo). La flecha indica células que expresan insulina con núcleo condensado, que es signo de apoptosis. \*= replaqueo en poly-L-ornitina/laminina o poly-L-lisina/laminina. *Figura adaptada de Kania G., 2004.*



**Figura 1.30 B: Comparación de 5 protocolos usados para la diferenciación de células ES a células productoras de insulina a partir de células que expresan nestina.** Las imágenes de la parte inferior muestran inmunofluorescencias de insulina o péptido C/insulina según el protocolo. **Protocolo 4 a, b:** No se observa marcaje de péptido C y las células que expresan insulina (rojo) parecen ser apoptóticas. **Protocolo 4c:** Se observa coexpresión (amarillo) de péptido C (verde) e insulina (rojo), después de añadir un inhibidor de PI3K (fosfoinositol 3 quinasa) al medio de cultivo. **Protocolo 5:** Se observa coexpresión (amarillo), indicado con la cabeza de flecha, de péptido C (verde) e insulina (rojo). Pero también se observan células que expresan insulina y no péptido C, marcadas con la flecha, estas células podrían ser apoptóticas, si bien en un número inferior al de los otros protocolos. \*= replaqueo en poly-L-ornitina/laminina o poly-L-lisina/laminina. *Figura adaptada de Kania G., 2004.*

### **7.3. UTILIZACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO PARA LA DIFERENCIACIÓN**

#### **7.3.1. UTILIZACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO CONOCIDOS**

El conocimiento sobre el desarrollo embrionario ha permitido en estos últimos años diseñar protocolos de diferenciación de células ES a células  $\beta$ , basados en el uso de factores de crecimiento y moléculas de señalización implicadas en el desarrollo pancreático *in vivo*. Entre ellos encontramos: **activina A, ácido retinoico, GLP-1, extendina-4, activina  $\beta$ B, nicotinamida, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, FGF7, FGF10, FGF-2, EGF.**

Distintos miembros de la familia TGF $\beta$  se expresan en el páncreas durante el desarrollo embrionario entre E12 y P0 con distintos niveles de expresión como TGF $\beta$ -1, TGF $\beta$ -2 y TGF $\beta$ -3. Recientemente, se ha demostrado que TGF- $\beta$ 2 induce la diferenciación de las células ES a células que expresan Pdx-1 (259). También, se ha descrito extensamente que activina A juega un papel importante en la formación del endodermo definitivo (112, 150). Su uso en los cultivos de células ES en diferenciación (49, 149) aumenta induce la diferenciación endodérmica.

El ácido retinoico (RA) es un inductor de la formación del mesodermo, ectodermo y juega también un papel importante en la formación del páncreas. Se ha demostrado que RA puede regular la diferenciación de las células ES a células que expresan Pdx1, marcador de precursores pancreáticos (188). Recientemente, se ha demostrado que el uso de RA en combinación con Activina A induce la diferenciación de las células ES a células productoras de insulina (258).

El FGF-2 y activina  $\beta$ B son expresados por la notocorda y se ha descrito que activina  $\beta$ B es capaz de mimetizar la acción de la notocorda sobre el endodermo durante el desarrollo, inhibiendo la expresión de Shh en el territorio del endodermo pre-pancreático (108). En cultivos de células ES se han usado anticuerpos dirigidos contra Shh para inhibir la proteína, así como ciclopamina (compuesto químico que bloquea la

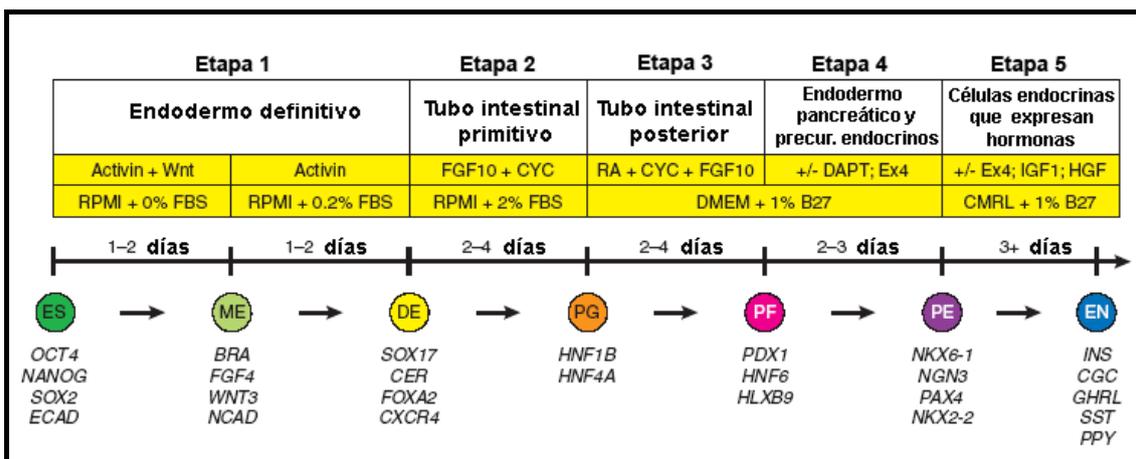
vía de señalización de Hh) (162) observándose un incremento en la expresión de marcadores endocrino (162).

Distintos miembros de la familia de FGFs están implicados en el desarrollo pancreático. Muy recientemente se ha descrito que FGF10 junto con ciclopamina inducen la expresión la expresión de transcritos de insulina en célula ES en diferenciación (Figura 1.31) (50).

El papel de los EGFs en el crecimiento y proliferación del epitelio pancreático se ha observado tanto *in vitro* como *in vivo* (41, 189). Los conocimientos sobre el efecto de los FGFs y EGFs en el desarrollo/diferenciación pancreática se han usado en los protocolos basados en la selección de células que expresan nestina para la diferenciación de células  $\beta$ , y en la etapa de diferenciación de estas células hacia células  $\beta$  pancreáticas, se incuban con FGF-2 y EGF para favorecer la diferenciación pancreática.

La nicotinamida es un inductor de la diferenciación endocrina (224, 258) y se ha descrito como en cultivos de células ES es capaz de inducir la proliferación y la diferenciación de células que expresan insulina (281). GLP-1 y extendina-4 (un agonista de éste), inducen la diferenciación de las células que expresan nestina en células productoras de insulina (16, 304).

Con el objetivo de incrementar la eficiencia de diferenciación de células ES a células productoras de insulina recientemente distintos grupos han abordando protocolos de difereciación de células ES basados en distintos pasos en los que se induce la diferenciación de las células ES a endodermo definitivo, con el uso de Activina A y ausencia de suero en los cultivos, para su posterior diferenciación a células productoras de insulina (50, 298). Estos estudios demuestran que la especificación inicial de las células ES a células del endodermo definitivo es crítica para una eficiente producción de células productoras de insulina (Figura 1.31).



**Figura 1.31:** Esquema del protocolo de diferenciación de células ES a células productoras de insulina basado en 5 etapas. Cyc = KAAD-ciclopamina. RA = ácido retinoico. DAPT: inhibidor de secretasas. Ex4 = exendina 4. ME = mesoendodermo. DE = endodermo definitivo. PG = tubo intestinal primitivo. PF = tubo intestinal posterior. PE = endodermo pancreático y precursores endocrinos. EN = células endocrinas productoras de hormonas. *Figura adaptada de D'Amour KA. et al. 2006.*

### 7.3.2. PÁNCREAS EMBRIONARIO COMO FUENTE DE FACTORES DIFERENCIADORES.

Aunque los estudios realizados sobre el desarrollo pancreático han permitido identificar factores implicados en la especificación y la diferenciación pancreática, muchos de ellos todavía son desconocidos. Por ello algunos grupos han trabajado con el co-cultivo de páncreas embrionarios o el suplemento de sobrenadantes del cultivo de éstos en los protocolos de diferenciación de las células ES a células pancreáticas  $\beta$ , bajo la hipótesis de que los páncreas embrionarios secretarían un cóctel de factores solubles implicados en el desarrollo pancreático, hecho que permitiría la diferenciación de las células ES a células pancreáticas (33, 261, 262, 282).

Con el uso de los sobrenadantes del cultivo de páncreas fetal del estadio de E16.5 como proveedores de factores solubles, se ha conseguido aumentar el porcentaje de células que expresan insulina (282). Estas células seleccionadas genéticamente (con el promotor de Nkx6.1) expresan péptido C y Glut-2, además de secretar insulina en respuesta a glucosa y de normalizar temporalmente la glicemia en ratones diabéticos temporalmente (162). Con todo podemos concluir que las células ES *in vitro* son capaces de responder a señales implicadas en el desarrollo pancreático.

Recientemente, se ha descrito que células ES humanas diferenciadas cotransplantadas con páncreas embrionario en la cápsula renal se diferencian a los distintos linajes epiteliales pancreáticos y que las células diferenciadas que expresan insulina comparten características con las células  $\beta$  adultas, incluyendo la síntesis y procesamiento de la proinsulina, y la expresión de factores de transcripción como Foxa2, Pdx1 e Isl-1.

#### **7.4. EXPRESIÓN ECTÓPICA DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN**

El conocimiento de los distintos factores de transcripción implicados en el desarrollo de las células  $\beta$ , ha permitido trabajar en la sobreexpresión de estos para facilitar la diferenciación de las células ES a células  $\beta$ , como ya se había hecho en otros modelos de diferenciación. Así pues se han sobreexpresado, de manera estable, los siguientes factores de transcripción implicados en el desarrollo de las células  $\beta$ : Foxa2, Pax4, Nkx2.2 y Pdx1.

La sobreexpresión de Pax4, por transfección del ADN plasmídico, usando los protocolos de Blyszczuk de selección de células nestina (Figura 1.28B), conduce a una mejora significativa de la diferenciación de células ES a células productoras de insulina respecto a los resultados obtenidos utilizando células parentales. Estas células consiguen normalizar la glicemia de ratones diabéticos. Sin embargo, la cantidad de insulina producida por célula sigue siendo muy baja.

La sobreexpresión de Nkx2.2, usando los protocolos de diferenciación espontánea, permiten aumentar 10 veces las células que expresan insulina (260) y 3,5 veces la secreción de ésta. Pero estas células no consiguen normalizar la glicemia de ratones diabéticos.

La sobreexpresión condicional de Pdx-1 en células ES de ratón (197) induce la expresión de marcadores como insulina 2, somatostatina, ngn3, glucoquinasa y pax6. Por otro lado, la sobreexpresión de Pdx-1 en célula ES humanas, incrementa la

expresión de insulina y favorece la diferenciación de células que coexpresan péptido C (151), aunque no es suficiente para estimular la expresión de Glut-2. Por otro lado, trabajos recientes aportan resultados contradictorios, puesto que la expresión ectópica de Pdx-1 no induce la diferenciación de las células ES humanas a células que expresen insulina (155).

Recientemente, se ha descrito que la inducción condicional de la expresión de Ngn3 en células ES en diferenciación induce un incremento de las células que expresan insulina, glucagón y somatostatina (298).

### **7.5. SELECCIÓN GENÉTICA DE LAS CÉLULAS DIFERENCIADAS**

En general, uno de los problemas principales de los protocolos de diferenciación de células ES es que los cultivos diferenciados de éstas son heterogéneos, al contener poblaciones mixtas de células diferenciadas. Por ello, ha sido importante el desarrollo de procesos de selección genética para purificar y enriquecer el linaje celular de interés en los cultivos.

Distintos grupos han abordado esta estrategia utilizando vectores de selección genética que contienen el promotor de insulina (262, 282) o de Nkx6.1 (162) que regulan la expresión del gen de resistencia a un antibiótico. En el primer caso (promotor de insulina), después de la selección y usando nicotinamida o sobrenadante pancreático fetal para forzar la diferenciación pancreática endocrina, se obtuvo un 91% de células que coexpresan insulina y péptido C y un 48% de células que coexpresan insulina y Glut-2 (282). En el segundo caso (promotor de Nkx6.1), después de selección el 100% de las células expresan Pdx1, Nkx6.1 e insulina (162). Ambos protocolos permiten obtener células que corrigen transitoriamente la glicemia en ratones diabéticos.

Referencia	Tipo celular	Protocolo	Secreción de insulina	Corrección de la glicemia
Soria et al. 2000	mESC	Selección pInsulina	+	+
Assady et al. 2001	hESC	Dif. Espontánea	-	N.d.
Lumelsky et al. 2001	mESC	Selección Nestina	+	-
Hori et al. 2002	mESC	Selección Nestina+ inhib. PI3K	+	+
Shiori et al. 2002	mESC	Dif. espontánea + DTZ	-	N.d.
Kahan et al. 2003	mESC	Dif. Espontánea	N.d.	N.d.
Moritoh et al. 2003	mESC	Selección Nestina + Selección pInsulina	+	-
Blyszczuk et al. 2003	mESC	Selección Nestina + Pax4	+	+
León-Quito et al. 2004	mESC	Selección pNkx6.1	+	+
Miyazaki et al. 2004	mESC	Selección Nestina	-	-
Segev et al. 2004	hESC	Selección Nestina	-	N.d.
Blyszczuk et al. 2004	mESC	Selección Nestina + Pax4	+	+
Ku et al. 2004	mESC	Activina $\beta$ B, extendina4, nicotinamida	N.d.	N.d.
Bieberich 2005	mESC	Selección Nestina	+	N.d.
Shi et al. 2005	mESC	Activina A, RA, Exendina4	+	+
Brolen et al. 2005	hESC	Dif. Espontánea	N.d.	N.d.
Shirio et al. 2006	mESC	Dif. Espontánea + DTZ + Nkx2.2	-	N.d.
Kwon et al. 2005	hESC	Dif. Espontánea + Tat-Pdx1	N.d.	N.d.
Lavon et al. 2006	hESC	Dif. Espontánea + Pdx1 o Foxa2	N.d.	N.d.
Vaca et al. 2006	mESC	Dif. Espontánea + SN + selección pIns.	+	+
D'Amour et al. 2006	hESC	Activina A +RA+ Ciclop. + FGF10 + DAPT + Exendina4	+	N.d.

**Tabla 1.6: Tabla recapitulativa de los estudios publicados sobre la diferenciación de células ES a células  $\beta$ .** mESC = células ES de ratón. hESC = células ES humanas. N.d. = no determinado. RA = ácido retinoico. DAPT = inhibidor de  $\gamma$ -secretasas. Inhib. PI3K = Inhibidor de la fosfatidil inositol 3 quinasa. DTZ = ditizona. Dif. = diferenciación.

## **8. DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS ES A CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS**

---

Hasta el momento la información que se tiene sobre la diferenciación de células ES a células pancreáticas acinares se basa en los resultados del análisis de la expresión de algún enzima digestivo (amilasa y carboxipeptidasa) por RT-PCR semicuantitativa en trabajos en que se estudia la diferenciación endocrina (187, 198).

Recientemente, se ha descrito que células ES humanas cotransplantadas con páncreas embrionario en la cápsula renal de ratón se diferencian a los distintos linajes epiteliales pancreáticos, tanto endocrinos como exocrinos (33).

En el momento de iniciar este estudio, trabajos previos de nuestro grupo demuestran que las células ES pueden adoptar un fenotipo pancreático acinar cuando se induce la diferenciación espontánea de estas células y que la cinética de expresión de genes reguladores del desarrollo exocrino pancreático siguen una jerarquía reminiscente a la que tiene lugar durante el desarrollo embrionario.

INTRODUCCIÓN  
**OBJETIVOS**  
MATERIALES Y MÉTODOS  
RESULTADOS  
DISCUSIÓN  
CONCLUSIONES  
BIBLIOGRAFÍA



Debido a la dificultad del mantenimiento del fenotipo de las células acinares en cultivo y los escasos modelos de líneas celulares acinares *in vitro* nos hemos interesado en el modelo de las células ES para diferenciar células acinares *in vitro*. Este modelo, por un lado puede ser usado como sistema alternativo para desarrollar modelos celulares en cultivo que representen diferentes estadios de la diferenciación acinar, y por otro lado nos ayudará a entender y conocer más sobre las vías de señalización, los factores solubles y los factores de transcripción implicados en las distintas etapas del desarrollo de las células acinares.

Para diferenciar las células ES a células acinares *in vitro* hemos abordado una estrategia múltiple basada en los siguientes objetivos:

1. La optimización de las condiciones de cultivo con el uso de factores solubles y sobrenadantes pancreáticos.
2. La sobreexpresión de factores de transcripción implicados en el desarrollo pancreático.
3. Selección genética de las células comprometidas al linaje acinar.



INTRODUCCIÓN  
OBJETIVOS  
**MATERIALES Y MÉTODOS**  
RESULTADOS  
DISCUSIÓN  
CONCLUSIONES  
BIBLIOGRAFÍA



## **1. CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS CÉLULAS ES CGR8 INDIFERENCIADAS**

### **1.1. MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS CGR8 INDIFERENCIADAS**

La línea de células ES que se ha utilizado en este estudio ha sido la línea de ratón CGR8 establecida en 1987 (113), que crece en cultivo sin necesidad de la presencia de una capa de células nodrizas (MEFs), facilitando algunos abordajes experimentales (i.e. transfección). Las células CGR8 se cultivan de manera indiferenciada bajo las siguientes condiciones:

- Para su adherencia a la placa de cultivo (Corning) es necesario incubar la placa con una solución de 0,1% gelatina-PBS 1X durante 30 min.
- El medio de cultivo utilizado es GMEM (Glasgow's Modified Eagle's Medium) suplementado con:

<b>Componentes del medio de cultivo de células ES indiferenciadas</b>	<b>Concentración</b>
GMEM	
FBS	10%
L-glutamina	1%
Penicilina/estreptomicina	1%
Aminoácidos no esenciales	1%
Piruvato sódico	1mM
$\beta$ -mercaptoetanol	0,1 mM
LIF	1000 U/ml

**Tabla 2.1: Composición del medio de cultivo de células ES indiferenciadas.**

- El cultivo se realiza a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 7,5%.
- El medio de cultivo se cambia diariamente y las células se tripsinizan cada 2 días.

## 1.2. CONDICIONES DE TRIPSINIZACIÓN DE LAS CÉLULAS CGR8

Las células CGR8 se tripsinizan cada dos días (cuando aproximadamente están a un 75% de confluencia), con el fin de mantenerlas a una densidad óptima que les permita mantener el estado indiferenciado y su capacidad de autorenovación y pluripotencialidad.

Antes de tripsinizar las células, éstas se pre-incuban una hora con medio de cultivo fresco y posteriormente se tripsinizan durante 1 minuto a 37°C con tripsina a una concentración 5X. Se inhibe la acción de ésta con el medio de cultivo que contiene FBS y seguidamente, se centrifugan las células a 1000 rpm durante 5 min. Las células son sembradas a una dilución 1:3 ( $1,8 \cdot 10^5$  cél./cm<sup>2</sup>).

## 1.3. CONDICIONES DE CONGELACIÓN DE LAS CÉLULAS CGR8

Para congelar las células ES, se tripsinizan (ver apartado 1.2), se cuentan y se congelan en el medio de congelación (Tabla 2.2) a razón de  $1 \cdot 10^7$  células/criotubo, para ser descongeladas posteriormente en placas de 100 mm Ø. Primero se colocan los criotubos en recipientes de congelación (Nalgen) que contienen isopropanol para que la congelación sea uniforme y progresiva al guardarlas a -80°C. Al día siguiente, se traspasan las células a N<sub>2</sub> líquido, en donde se almacenan.

Componentes del medio de congelación	Concentración
Medio células ES (Tabla 2.1)	50%
FBS	40%
DMSO	10%

**Tabla 2.2: Composición del medio de congelación celular.**

## 2. VECTORES DE EXPRESIÓN GÉNICA: ADENOVIRUS Y LENTIVIRUS

### 2.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN GÉNICA: ADENOVIRUS Y LENTIVIRUS

Los cDNAs de los genes codificantes para los factores de transcripción de interés fueron clonados en los vectores de expresión pShuttle-CMV para la generación de adenovirus (p48, Mist1, LacZ y GFP) y pW10 para la generación de lentivirus (Pdx1 y GFP).

1. En el plásmido pShuttle-CMV (107) los cDNAs de interés fueron clonados

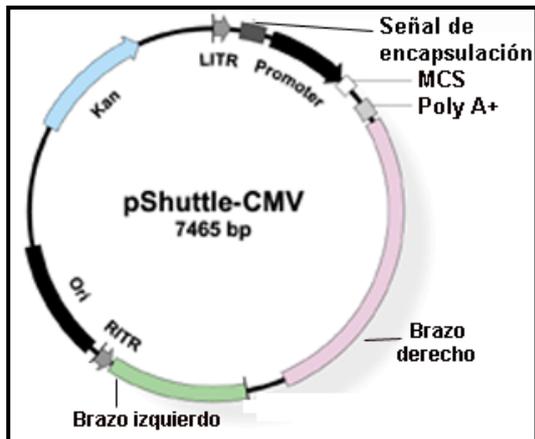


Figura 2.1: Vector pShuttle-CMV adenoviral.

en el sitio de clonaje múltiple de manera que la expresión del gen de interés queda bajo el control del promotor de CMV (Figura 2.1). Este vector es necesario para la posterior formación de las partículas recombinantes adenovirales, que fueron generadas por los laboratorios de CHU de Nantes, Francia.

2. En el plásmido pW10 (o R4SA-EFs-EGFP-W) (177) antes de clonar los

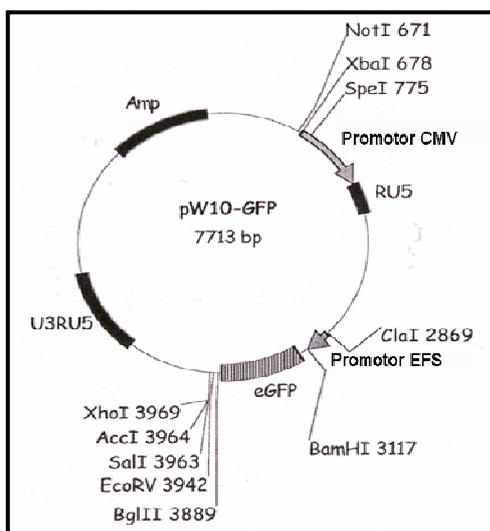


Figura 2.2: Vector pW10 lentiviral.

cDNAs de interés fue necesario escindir el cDNA de GFP que fue reemplazado por el cDNA de interés, de manera que la expresión de éste queda bajo el control del promotor de EF1 $\alpha$  (Figura 2.2). Este vector es necesario para la posterior formación de las partículas recombinantes lentivirales, que fueron generadas por el grupo del Dr. Savatier (INSERM, Lyon, Francia).

**2.2. VECTORES LENTIVIRALES Y ADENOVIRALES USADOS EN ESTE ESTUDIO**

Vector de expresión	cDNA Especie	cDNA Origen	cDNA Digestión	Plásmido Nombre	Plásmido Digestión
pShuttle-p48	Rata	P.K. Wellauer	KpnI-XhoI	pShuttle	KpnI-XhoI
pShuttle-Mist1	Ratón	K. Konieczny	BanII-NotI	pShuttle	EcoRV
pShuttle-GFP	Medusa	P.Savatier	NI	pShuttle	NI
pShuttle-LacZ	Bacteria	P.Savatier	NI	pShuttle	NI
pW10-Pdx1	Ratón	C.Wright	SalI-BglII	pW10-eGFP	BamHI-XhoI
pW10-GFP	Medusa	P.Savatier		pW10-eGFP	

Tabla 2.3: Descripción de la estrategia de clonajes de los factores de transcripción en los vectores de expresión. NI = Información no disponible.

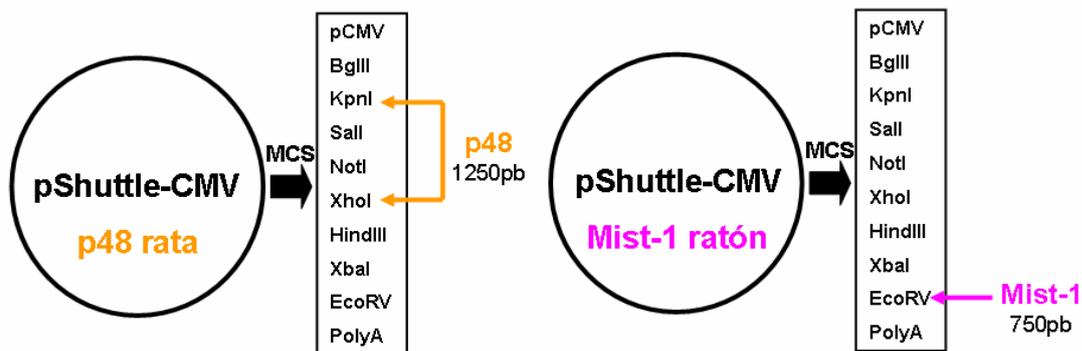


Figura 2.3: Esquema de los vectores pShuttle p48 y Mist-1. El cDNA de p48 fue escindido de su vector de origen (pcDNA3-48, del Dr. F.X. Real) por KpnI-XhoI del MCS siguiente: HindIII-KpnI-Asp718-BamHI-EcoRI-cDNA p48 rata-XhoI-PaeR71-XbaI; y fue clonado en el pShuttle por las mismas dianas de restricción (KpnI-XhoI). El cDNA de Mist-1 fue escindido de su vector de origen (pGEM-T-mMist-1, del Dr. Konieczny) por NotI-BanII del MCS siguiente: ApaI-AatII-SphI-NcoI-SacII-BanII-cDNA Mist-1 ratón- SpeI-NotI-PstI-SalI-NdeI-SacI-BstXI-NsiI; y posteriormente se clonó realizando extremos romos en el pShuttle digerido en EcoRV. MCS: sitio múltiple de clonaje.

**2.3. PRODUCCIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES: ADENOVIRUS Y LENTIVIRUS**

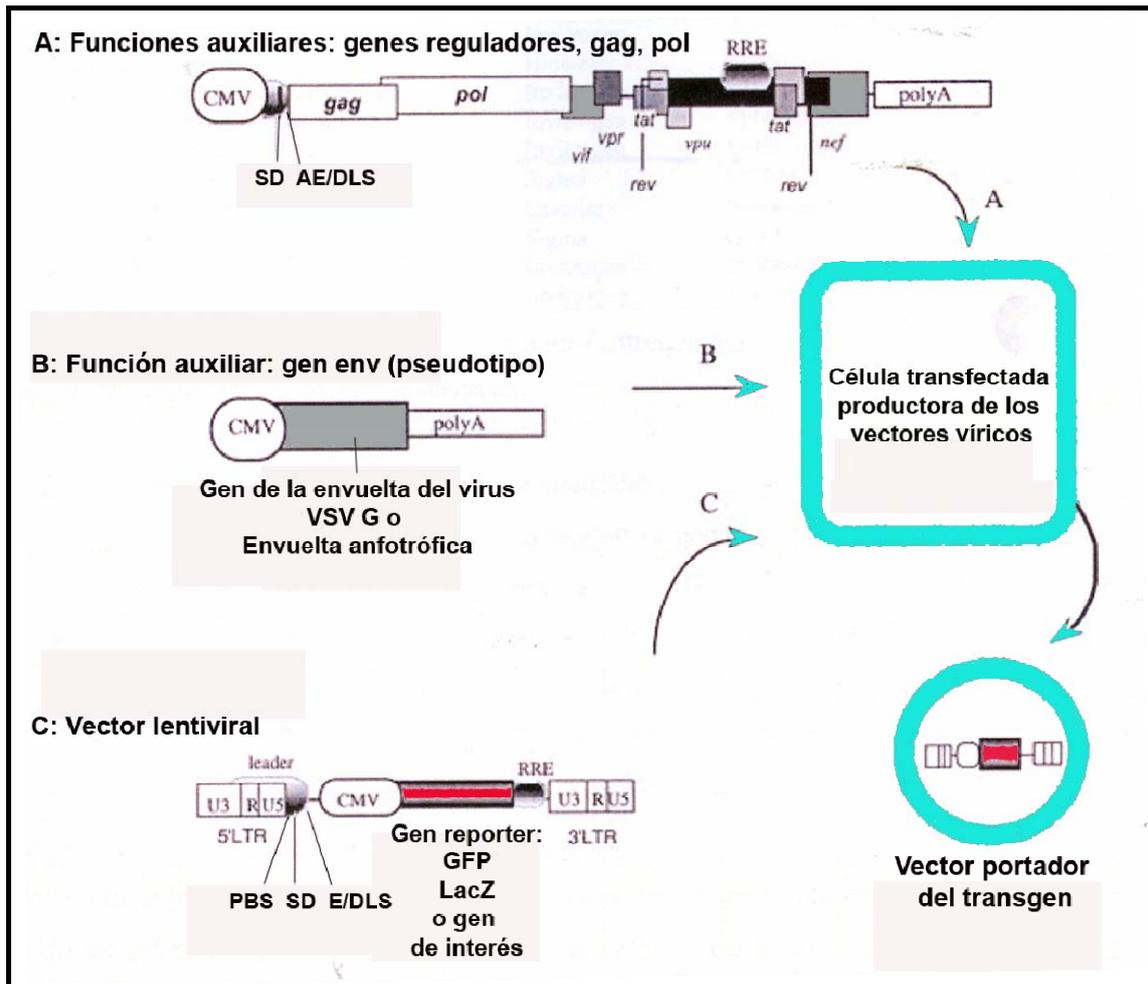
Las partículas virales recombinantes de tipo adenoviral fueron producidas con el sistema AdEasy (107) por los laboratorios de CHU de Nantes. Los lotes de adenovirus recombinantes están titulados por número de partículas virales infecciosas por mililitro (pi/ml).

Las partículas virales recombinantes de tipo lentiviral fueron producidas con el sistema descrito en Mangeot et al., 2000 (177) y Negre et al., 2000 (206) en el laboratorio del Dr. Pierre Savatier (INSERM, Lyon, Francia). La línea celular de riñón humana 293 (ATCC) ( $2 \cdot 10^6$  células) se transfecta mediante la técnica de fosfato cálcico con una mezcla de los siguientes vectores: 10  $\mu\text{g}$  del plásmido pGRev para la expresión de la glicoproteína viral VGV-G, 10  $\mu\text{g}$  del plásmido pSIV3+ para la expresión de las proteínas virales Gag, Pol, Tat y Rev, y 13  $\mu\text{g}$  del plásmido pW10-cDNA (con el transgén de interés) (Figura 2.4). El medio de cultivo de las células 293 transfectadas se cambia al día siguiente y se recoge el sobrenadante del cultivo que contiene las partículas virales producidas por las células transfectadas 24 horas después. Este sobrenadante es centrifugado y filtrado antes de ser usado. Para largas conservaciones el sobrenadante es concentrado por ultracentrifugación y guardado a  $-80^\circ\text{C}$  en glicerol 1%/PBS 1X.

Los adenovirus y lentivirus recombinantes generados fueron testados en la línea celular 293 analizando su expresión por la técnica de Western Blot.

#### **2.4. ESTABLECIMIENTO DE LAS LÍNEAS ES GENÉTICAMENTE MODIFICADAS MEDIANTE INFECCIÓN LENTIVIRAL**

Las células CGR8 ( $1 \cdot 10^5$  células) se infectan en suspensión monocelular durante 5 horas con el sobrenadante viral (1 ml) suplementado con LIF (1000 U/ml). Una vez infectadas y adheridas, las células se lavan con PBS 1X y se cultivan en condiciones estándar durante 48 horas. La población celular infectada es subclonada por la técnica de dilución límite en placas de 96 pozos (0,3 células/pozo). Los clones se amplifican por pases sucesivos, se analizan para la expresión del transgén de interés por Western Blot, y finalmente se congelan.



**Figura 2.4:** Esquema de la producción de los vectores lentivirales. Se cotransfectan las construcciones plasmídicas A, B y C, que contienen todos los elementos necesarios para la producción de los lentivirus en la línea celular 293.

**A:** Plásmido que contiene las funciones auxiliares. Excepto el gen de la envuelta, están presentes todos los genes del virus bajo la expresión del promotor de CMV. Esta construcción deriva del genoma salvaje del virus, añadiendo la secuencia AE/DLS que impide la encapsulación del virus en las partículas virales producidas.

**B:** Plásmido que codifica para la proteína de la envuelta del virus, en este caso VSV G, que permite a las partículas virales producidas infectar un gran número de líneas celulares.

**C:** Plásmido portador del transgén. La presencia de las secuencias E/DLS, PBS Y LTR en esta construcción permite la encapsulación del RNA del vector, su retrotranscripción y la integración del cDNA en el genoma de las células diana. La expresión del gen de interés o *reporter* está regulada por el promotor de CMV o EF1 $\alpha$ . En este estudio el promotor usado ha sido EF1 $\alpha$ , ya que su actividad se adapta mejor a los modelos de células ES. *Figura adaptada de Mangeot et al., 2001.*

El establecimiento de las líneas lentivirales fue realizado en el laboratorio del Dr. Pierre Savatier. Las líneas celulares establecidas utilizadas en este estudio han sido ES4 Pdx1 que sobreexpresa el factor transcripcional Pdx1, y ES3 GFP que expresa la proteína *reporter* GFP.

## 2.5. INFECCIÓN DE LAS CÉLULAS CGR8 CON ADENOVIRUS RECOMBINANTES

Las células CGR8 se inducen a diferenciar formando cuerpos embrioides (EBs) por agregación en suspensión durante 7 días (EB7) y posteriormente se adhieren a placas de cultivo (Corning) previamente gelatinadas. Después de 36 horas del plaqueo de los EBs (tiempo mínimo necesario para su correcta adhesión a la placa), se infectan con los adenovirus recombinantes a una MOI (multiplicidad de infección) de 20 pi/cel (partículas infecciosas por célula). Se analizaron distintas MOI, consiguiendo con una MOI de 20 pi/cel una eficiencia de infección elevada de aproximadamente el 70% de las células, así como una elevada viabilidad celular.

Para realizar el conteo de las células y calcular la cantidad de partículas infecciosas necesarias, se recogen las células de dos pozos independientes con PBS 1X frío, se centrifugan 4 min. a 1000 rpm y se resuspende el botón celular en 0,1% saponina/PBS 1X, que permite la disgregación de los EBs en una suspensión monocelular. Tras contar las células, se calcula para cada uno de los adenovirus la cantidad de partículas infecciosas necesarias para obtener una MOI de 20.

Adenovirus recombinante	Concentración del stock
Ad p48	$5,5 \cdot 10^8$ pi/ $\mu$ l
Ad Mist-1	$4,8 \cdot 10^7$ pi/ $\mu$ l
Ad LacZ	$2,5 \cdot 10^8$ pi/ $\mu$ l
Ad GFP	$2,8 \cdot 10^8$ pi/ $\mu$ l

**Tabla 2.4: Concentración de los adenovirus recombinantes. Pi = partículas infecciosas.**

Antes de infectar las células, se elimina el medio de cultivo y se lavan 3 veces con PBS 1X. La infección se realiza con el mismo medio de cultivo GMEM pero sin FBS. Después de 12 horas de haber añadido el adenovirus, se elimina el medio de cultivo y se lavan las células 3 veces con PBS 1X para eliminar los restos de adenovirus de las placas. Finalmente, se añade medio fresco GMEM suplementado con 10% FBS.

### **3. GENERACIÓN DE CÉLULAS ES *REPORTER* MEDIANTE TRANSFECCIÓN DEL PLÁSMIDO DE SELECCIÓN GENÉTICA pELAS**

#### **3.1. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO DE SELECCIÓN: pELAS**

Se inicia el clonaje utilizando el plásmido comercial PKS (Promega) del cual se substituye la diana de BamHI por BglII mediante la ligación en la diana BamHI de los siguientes oligonucleótidos previamente fosforilados:

<b>BglII PKS</b>	F 5'-GATCTAGATCTAGATCTT-3' R 5'-GATCAAGATCTAGATCTA-3'
------------------	--

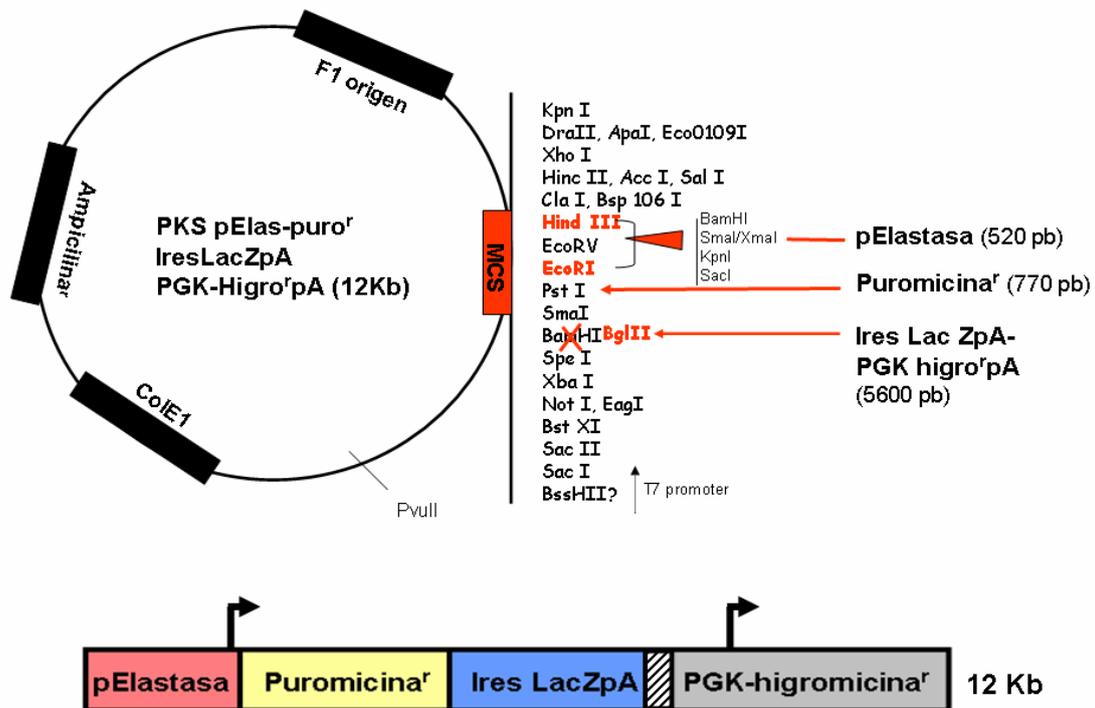
Posteriormente, se clona el gen de resistencia a puromicina (770 pb), amplificando el fragmento por PCR a partir del plásmido comercial pPur (Clontech) usando los siguientes oligonucleótidos que contenían en sus extremos 3' la diana de restricción PstI.

<b>Puro-PstI R</b>	R 5'-AACTGCAGTGTGGATGGCTGATTATGA-3'
<b>Puro-PstI F</b>	F 5'-AACTGCAGAACTCACAAGGAGACGACCTTC-3'

Una vez amplificado el gen de puromicina por PCR usando una Taq polimerasa de alta fidelidad (Pfx), éste fue clonado en la diana de restricción de PstI del vector PKS. Los clones obtenidos fueron secuenciados para comprobar la correcta integración del gen de resistencia a puromicina y la ausencia de mutaciones debidas a la amplificación por PCR.

Después se realizó el clonaje del promotor del gen de la elastasa (-500 +8), que obtuvimos del plásmido pUC119-pElastasa (Dr. Swift, Dallas, USA), usando las dianas de restricción de HindIII y EcoRI, de manera que el promotor queda clonado inmediatamente antes del gen de resistencia a puromicina. Finalmente, se clona el fragmento Ires LacZpA-PGK higropA (5600pb), que proviene del vector PEA6 (Dr. E. Maandas, The Netherlands Cancer Institut, Amsterdam, Holanda), usando la diana de restricción generada de BglII.

Así pues, se genera al final un plásmido para la selección genética de las células ES comprometidas al linaje acinar, que contiene una caja de selección en la cual el promotor del gen de la elastasa regula la expresión del gen de resistencia a puomicina y también el gen *reporter* LacZ en un RNAm bicistrónico. Por otra parte, contiene una caja en la cual el promotor de expresión constitutiva del gen de la fosfoglicerato quinasa (PGK) regula la expresión del gen de resistencia a la higromocina y nos sirve para la selección de las células transfectadas establemente (Figura 2.5).



**Figura 2.5:** Esquema del plásmido de selección genética pELAS: el promotor del gen de la elastasa I regula la expresión del gen de resistencia a puomicina y del gen *reporter* LacZ. Además, contiene un promotor constitutivo (PGK) que regula la expresión del gen de resistencia a higromicina.

### 3.2. ANÁLISIS DE LA FUNCIONALIDAD DEL PLÁSMIDO pELAS POR TRANSFECCIÓN EN LÍNEAS CELULARES PANCREÁTICAS (266-6 Y AR42J) Y NO PANCREÁTICAS (293 Y NIH3T3)

Para las transfecciones transitorias o estables de las líneas celulares acinares pancreáticas 266-6 (ratón, ATCC) y AR42J (rata, Dr. Vaysse, INSERM, Toulouse, Francia) y no pancreáticas 293 (humano, ATCC) y NIH3T3 (ratón, ATCC), se usó el kit comercial FuGene 6 Transfection Reagent de Roche.

### **3.3. GENERACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES ES *REPORTER***

#### **3.3.1. TRANSFECCIÓN DEL PLÁSMIDO pELAS MEDIANTE ELECTROPORACIÓN**

La técnica utilizada para la transfección del DNA del plásmido pELAS en las células ES fue la electroporación. Para ello, se trispinizan las células ES (ver apartado 1.2), se cuentan, se lavan con PBS 1X y se sigue el protocolo descrito a continuación:

- Mezclar  $5 \cdot 10^6$  células con 40  $\mu\text{g}$  del vector de selección linearizado usando la diana de restricción XhoI en un volumen final de 800  $\mu\text{l}$  de Optimem (medio sin FBS).
- Transferir esta mezcla a una cubeta de electroporación de 4 mm de grosor y electroporar a 260V y 500 $\mu\text{F}$  en un electroporador de BIORAD.
- Una vez electroporadas, se dejan reposar las células en la cubeta durante 20 min. a temperatura ambiente (TA) y posteriormente, se siembran en placas de cultivo gelatinadas de 100 mm  $\varnothing$  añadiendo  $1 \cdot 10^6$  células ES no electroporadas, con tal de tener la densidad celular adecuada para mantener las células indiferenciadas.
- Como control de selección se electroporan células sin DNA y se sigue el mismo protocolo.
- Reemplazar el medio de las células 24 horas después de haber sido plaqueadas.
- Añadir el antibiótico (higromicina 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) para seleccionar las células que han integrado establemente el vector 48 horas después de la electroporación.
- Durante los primeros 4 días lavar las células diariamente con PBS 1X para eliminar las células muertas. Durante el período de selección renovar el medio con antibiótico diariamente. Después de unos 10 días de cultivo se observan colonias de células ES resistentes al antibiótico.

#### **3.3.2. AISLAMIENTO DE LAS COLONIAS RESISTENTES AL ANTIBIÓTICO**

Al observar la aparición de colonias resistentes al antibiótico, se las deja crecer hasta que al ser visualizadas con el objetivo de 10X del microscopio óptico ocupen

aproximadamente la totalidad del campo. Para aislarlas se siguen los pasos descritos a continuación:

- Colocar el microscopio óptico debajo de la campana de cultivos. Reemplazar el medio de cultivo por PBS 1X y aislar las colonias manualmente con pipeta Gibson automática debajo del microscopio (en un volumen de 15  $\mu$ l).
- Tripsinizar cada colonia en un tubo eppendorf que contiene 25  $\mu$ l de tripsina y esperar 5 min. a TA a que las células se disocien.
- Pipetear la totalidad del volumen de cada eppendorf (15 $\mu$ l+25 $\mu$ l), transferir a un pozo de una placa de 96 pocillos y añadir 200  $\mu$ l de medio.
- Amplificar los clones renovando el medio diariamente (siempre con antibiótico) y cuando llegan a 75% de confluencia pasar los clones de placas de 96 pocillos a otras de 24 pozos.
- Se necesitan dos réplicas de placas de 24 pozos de todos los clones ya que una se congelará, y la otra servirá para hacer el análisis de los clones por PCR de DNA genómico.

Se aislaron 175 clones resistentes a higromicina.

### **3.3.3. CONGELACIÓN DE LOS CLONES AISLADOS EN PLACAS DE 24 POZOS**

Cuando las placas de 24 pozos (duplicados) están a 75% de confluencia, en una de ellas se congelan las células en la misma placa usando medio de congelación 2X (Tabla 2.5) como se describe a continuación:

- Tripsinizar las células en 100  $\mu$ l de tripsina/pozo sin sacarlas del pozo.
- Añadir a las células tripsinizadas 400  $\mu$ l de medio de cultivo completo suplementado con LIF y resuspender.
- Colocar la placa sobre hielo durante 15 min. y añadir lentamente 500  $\mu$ l/pozo de medio de congelación 2X frío.
- Envolver la placa en papel toalla y conservar a -80°C (las células se pueden conservar así durante un mes).

Componentes del medio de congelación 2X	Concentración
Medio células ES (Tabla1)	50%
FBS	30%
DMSO	20%

**Tabla 2.5: Composición del medio de congelación celular 2X.**

### 3.4. ANÁLISIS DE LOS CLONES AISLADOS POR PCR DE DNA GENÓMICO

#### 3.4.1. OBTENCIÓN DEL DNA GENÓMICO

Cuando las placas de 24 pozos (duplicados) están a 75% de confluencia, en una de ellas se lisan las células con un tampón de lisis para PCR de DNA genómico (Tabla 6):

- Retirar el medio de la placa y lavar con PBS 1X.
- Añadir 200 µl/pozo de tampón de lisis de PCR (Tabla 2.6).
- Transferir el lisado a un eppendorf e incubar O/N (toda la noche) a 56°C en agitación.
- Al día siguiente conservar a -20°C.

Componentes del tampón de lisis para la obtención de DNA genómico	Concentración
KCl	50 mM
Tris-HCl pH 8.3	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Tween-20	0,5%
Proteinasa K	0,5 mg/ml
RNAsa	10 mg/ml

**Tabla 2.6: Composición del tampón de lisis para la obtención de DNA genómico.**

### 3.4.2. PCR DE DNA GENÓMICO

Para el análisis de los clones obtenidos, se diseñaron oligonucleótidos compatibles con el inicio de la secuencia del promotor de elastasa y la secuencia del gen de resistencia a puromicina, con el fin de asegurarse de que los clones resistentes a higromicina habían integrado en su genoma también la caja de selección. Con este par de oligonucleótidos se amplifica una banda de 1200 pb.

<b>pElastasa</b>	F 5'-AGCAATCCTCACTCTTCA-3'
<b>puromicina</b>	R 5'-AACTGCAGTGTGGTATGGCTGATTATGA-3'

Composición de la PCR	Volumen	Concentración
DNA genómico + H <sub>2</sub> O	10,3 µl	200 ng
Tampón Ecotaq 10X	2,5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1 µl	2 mM
dNTPs 25 mM	0,2 µl	0,2 mM
Oligo. F (pElastasa) 10 µM	0,4 µl	0,28 µM
Oligo. R (puromicina) 10 µM	0,4 µl	0,28 µM
Ecotaq (5 U/µl)	0,2 µl	1 U
<b>Volumen final</b>	<b>15 µl</b>	

**Tabla 2.7: Composición de la PCR de DNA genómico.**

Condiciones de la PCR con DNA genómico	Temperatura	Tiempo
1. Desnaturalización inicial	94°C	5 min.
2. Desnaturalización	94°C	30 seg.
3. "Annealing"	52°C	45 seg.
4. Elongación	72°C	2 min.
<b>Número de ciclos (del paso 2 al 4)</b>		<b>40</b>
5. Elongación final	72°C	5 min.
6. Final	4°C	∞

**Tabla 2.8: Condiciones de la PCR de DNA genómico.**

Una vez realizada la PCR se migra todo el volumen de la reacción en un gel de agarosa al 1% esperando detectar una banda de 1200 pb. De los 75 clones analizados con este método, 15 fueron positivos.

### **3.5. AMPLIFICACIÓN DE LOS CLONES POSITIVOS POR PCR DE DNA GENÓMICO**

Los clones que fueron positivos por PCR de DNA genómico fueron descongelados según el siguiente protocolo:

- Descongelar la placa de 24 pozos con los clones guardada a  $-80^{\circ}\text{C}$  y dejarla 2-3 min. a TA.
- Añadir a los pozos que contienen los clones de interés 1 ml de medio de células ES precalentado a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Resuspender mediante pipeteo para descongelar los clones y si es necesario volver a añadir medio caliente hasta la total descongelación de éstos.
- Centrifugar los clones descongelados durante 5 min. a 1000 rpm.
- Resuspender el botón celular en 1 ml de medio de células ES y sembrar las células en placas de 24 pozos.
- A partir de este punto se amplifican las células (ver apartado 1.1) y se vuelven a congelar (ver apartado 1.3).

## **4. OBTENCIÓN DE SOBRENADANTES DE CULTIVO**

### **4.1. OBTENCIÓN DE SOBRENADANTES PANCREÁTICOS FETALES (SNP) A PARTIR DEL CULTIVO DE RUDIMENTOS PANCREÁTICOS DE EMBRIÓN DE RATÓN**

Se sacrifican ratonas (CD1) gestantes, de estadíos del desarrollo comprendidos entre E12.5 y E17.5, por dislocación cervical y se extraen los embriones que se mantienen en una placa con PBS 1X frío sobre hielo. Para la extracción de los páncreas de los embriones se usan unos recipientes rellenos de parafina con carbón activo (Tabla 2.9), a fin de trabajar sobre un fondo negro y sólido que permita tener al embrión inmóvil y distinguir bien el páncreas.

Una vez extraídos los páncreas se colocan en una placa de gelosa (Tabla 2.9) que se mantiene sobre hielo y posteriormente se traspasan a una placa de cultivo

previamente gelatinada. Se cultivan a razón de 8 páncreas por placa de 60 mm Ø con 5 ml de medio DMEM suplementado con 3% FBS y 0,04 mg/ml de gentamicina (para evitar contaminaciones bacterianas).

Los páncreas se mantienen en cultivo durante 10 días y después se desechan. Tras 24 horas en cultivo, el medio es eliminado y renovado (DMEM 3% FBS). A partir del segundo día de cultivo se recoge y renueva el medio diariamente y se conserva a 4°C. De manera que el medio se recoge durante 9 días y finalmente se filtra todo el sobrenadante recogido durante el cultivo y se alicuota (40 ml/flasco), conservándose a -80°C hasta su uso.

<b>Componentes de los recipientes de carbón activo</b>	<b>Concentración</b>
Parafina	
Carbón activo	5%
<b>Componentes de las placas de gelosa</b>	<b>Concentración</b>
Gelosa (agar/agar 10g/l)	25%
HAM/F10	75%
Gentamicina	0,04 mg/ml
<b>Componentes del medio de cultivo de páncreas embrionario</b>	<b>Concentración</b>
DMEM	
FBS	3%
Piruvato sódico	1 mM
L-glutamina	1%
Penicilina/estreptomicina	1%

**Tabla 2.9: Productos necesarios para la extracción de los páncreas embrionarios y la obtención de los SN.**

#### **4.2. OBTENCIÓN DEL SN DEL MESÉNQUIMA PANCREÁTICOS A PARTIR DE EMBRIONES DE E12.5**

Una vez aislado el páncreas embrionario éste se mantiene durante 30 min. a 37°C en medio RPMI con colagenasa (0,5 mg/ml). Se inactiva la colagenasa añadiendo

medio HAM F12/FBS 1:1 durante 30 min. a TA. Posteriormente, se separa el epitelio del mesénquima y este último se cultiva en placas previamente gelatinadas. En un pozo de 24 se cultiva el mesénquima obtenido de 2 páncreas embrionarios. Se cultiva en 0,5 ml de medio por pozo (Tabla 2.10).

Se recoge el sobrenadante del cultivo durante 10 días, desechando el sobrenadante del primer día, que finalmente se filtra. Se alicuota y se conserva a -80°C.

Componentes del medio de cultivo de mesénquima pancreático embrionario E12.5	Concentración
DMEM	
FBS	3%
L-glutamina	1%
Penicilina/estreptomicina	1%

**Tabla 2.10: Composición del medio de cultivo de mesénquima pancreático de embriones de E12.5**

#### **4.3. OBTENCIÓN DEL SN DEL CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES (AR42J, 266-6, NIH3T3 y INS-1E)**

Se siembran las células de las líneas 266-6, AR42J, INS1-E (ratón, Dr. R. Gomis, Hospital Clínic, Barcelona) a razón de  $5 \cdot 10^5$  células por placa de 60 mm y 5 ml de medio (Tabla 2.11) por placa y  $2,5 \cdot 10^5$  células en el caso de la línea celular NIH3T3, debido a que su tasa de duplicación es mayor. Se recoge el SN diariamente durante 4 días, se filtra, se alicuota y se guarda a -80°C.

Componentes del medio de cultivo de AR42J, 266-6 Y NIH3T3	Concentración
DMEM	
FBS	10%
L-glutamina	1%
Piruvato Sódico	1 mM
Penicilina/estreptomicina	1%

Componentes del medio de cultivo de INS-1E	Concentración
RPMI	
FBS	10%
L-glutamina	1%
Piruvato Sódico	1 mM
Penicilina/estreptomicina	1%
Hepes	10 mM
$\beta$ -mercaptoetanol	50 $\mu$ M

**Tabla 2.11: Composición del medio de cultivo celular de las líneas celulares AR42J, 266-6, NIH3T3 e INS-1E**

## **5. DETECCIÓN DE FOLISTATINA EN EL SNP MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA**

Para la detección de folistatina en el SNP se realizó la técnica de ELISA según el siguiente protocolo:

- Recubrir los pozos de las placas de 96 pocillos MaxiSorp de Nunc con el SNP de distintos estadios del desarrollo en diluciones sucesivas. Como control positivo se usa folistatina comercial (Sigma) a 0,06  $\mu$ g/ $\mu$ l, y como control negativo, gelatina a la misma concentración. Se utilizan duplicados de las placas para incubar una con un anticuerpo inespecífico y la otra con un anticuerpo anti-folistatina.
- Incubar la placa a 37°C O/N.
- Eliminar el sobrenadante y lavar 3 veces la placa con PBS 1X.
- Bloquear las uniones inespecíficas con gelatina 1% durante 30 min. a 37°C.
- Lavar 3 veces con PBS 1X-Tween 0,1%.

- Incubar, una placa con el anticuerpo primario específico anti-folistatina 1:1000 y otra con el anticuerpo inespecífico 1:1000 durante 1 hora a 37°C.
- Lavar 3 veces con PBS 1X-Tween 0,1%.
- Incubar el anticuerpo secundario acoplado a AP (fosfatasa alcalina) 1:1000 durante 1 hora a 37°C.
- Lavar 3 veces con PBS 1X-Tween 0,1%.
- Incubar con sustrato MUP 1g/ml en tampón de trietanolamina (0,18 g/ml) durante 30 min a 37°C en oscuridad.
- La lectura del resultado de la reacción se realiza con el Cytofluor 2300 system report a 420 nm.

## **6. PROTOCOLOS DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS ES**

### **6.1. PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN UTILIZANDO FACTORES SOLUBLES Y SOBRENADANTES PANCREÁTICOS FETALES (SNP) (EB7P7)**

Las células ES se mantienen indiferenciadas durante unos días (ver apartado 1.1) antes de iniciar el protocolo de diferenciación, para tener las células ES en las mejores condiciones posibles (indiferenciadas y pluripotentes). Las células ES se inducen a diferenciar en ausencia de LIF y de manera espontánea en suspensión en placas bacteriológicas mediante la formación de cuerpos embrioides (EBs). El medio de cultivo usado en esta fase es GMEM suplementado con 3% FBS (Tabla 2.12). La densidad celular a la cual se induce la formación de los EBs es de  $3,3 \cdot 10^4$  células/ml.

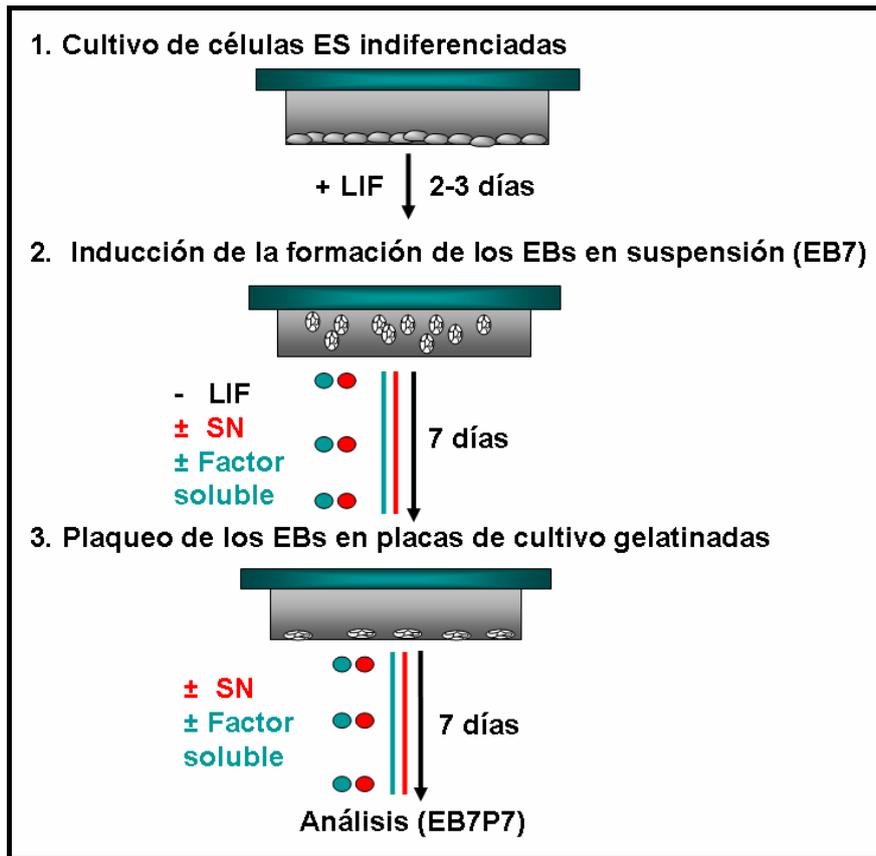
Los EBs se mantienen en suspensión durante 7 días, período en el cual se renueva el medio cada 2 días suplementado con los sobrenadantes de cultivo, (ver apartado 4) a razón de 1:1 con el medio de cultivo de los EBs en suspensión, obteniendo una concentración final de FBS del 3%. El recambio del medio de los EBs se realiza tras pasando los EBs a tubos estériles y dejándolos sedimentar (sin centrifugación). Tras eliminar el medio, estos se resuspenden en medio nuevo y se vuelven a cultivar en placas bacteriológicas.

Después de 7 días en suspensión (EB7), los EBs se adhieren a placas de cultivo previamente gelatinadas. Para el plaqueo, se siembran los EBs a una dilución 1:3. Para la dispensación de los EBs en las placas de cultivo, se usan puntas de pipeta cortadas a fin de no disociar las células de los EBs. El medio de cultivo utilizado en esta fase es GMEM suplementado con 10% FBS (Tabla 2.12). Se mantienen los EBs adheridos en placas de cultivo durante 7 días (P7), período en el cual se renueva el medio cada dos días usando, si es el caso, con los sobrenadantes, a razón de 1:1 con el medio de cultivo de EBs suplementado con 17% de FBS (a fin de tener 10% de FBS final). Después de estos 7 días en adhesión, se analizan las células diferenciadas obtenidas (EB7P7) (Figura 2.6).

De igual modo, en aquellos experimentos encaminados a regular las vías de señalización implicadas en el desarrollo pancreático el medio de cultivo es suplementado cada dos días con factores solubles (Activina A, BMP4, folistatina, FGF4, FGF6, FGF7, HB-EGF, ácido retinoico (RA) y ciclopamina (Figura 2.6).

Componentes del medio de cultivo de EBs	Concentración
GMEM	
FBS	3%
L-glutamina	1%
Penicilina/estreptomicina	1%
Aminoácidos no esenciales	1%
Piruvato sódico	1 mM
$\beta$ -mercaptoetanol	0,1 mM
FBS para EBs en suspensión	3%
FBS para EBs plaqueados	10%

**Tabla 2.12: Composición del medio de cultivos para EBs.**



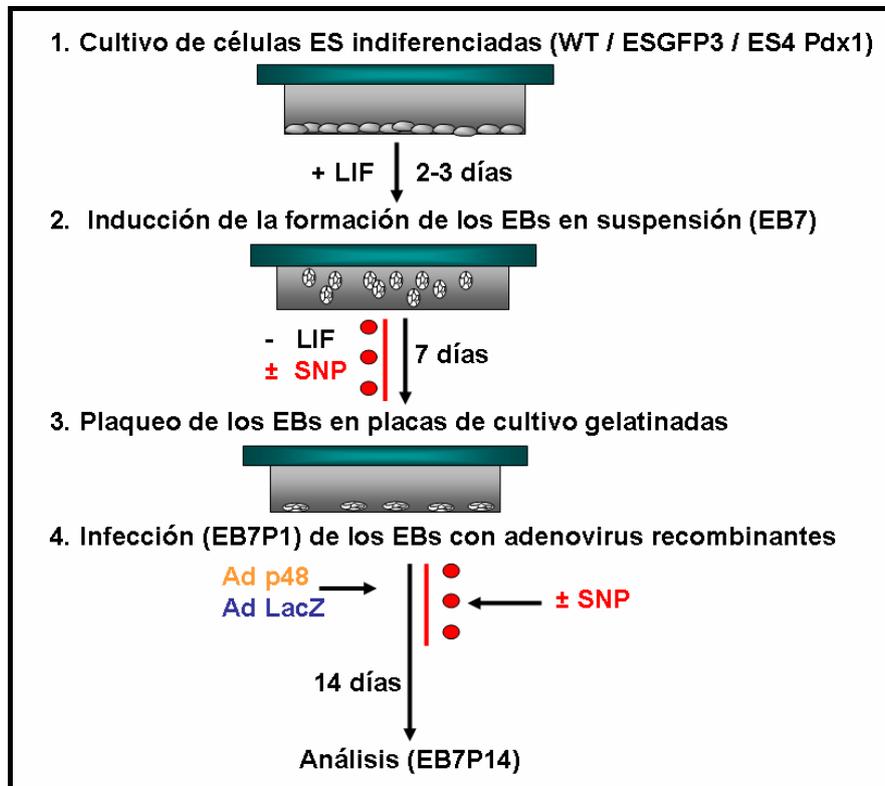
**Figura 2.6: Protocolo de diferenciación de células ES utilizando factores solubles o sobrenadantes.** Los círculos rojos indican las veces en que se adiciona SN a los cultivos y los círculos azules las veces en que se adiciona el factor soluble al medio. LIF = leukemia inhibitory factor; SN = sobrenadante; EBs = cuerpos embrioides; EB7 = cuerpos embrioides mantenidos siete días en suspensión; EB7P7 = cuerpos embrioides mantenidos siete días en suspensión + siete días plaqueados.

## 6.2. PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN MEDIANTE INFECCIÓN ADENOVIRAL Y EL USO DE SOBRENADANTES PANCREÁTICOS FETALES (SNP) (EB7P14)

La fase inicial (EB7) del protocolo es exactamente igual al protocolo anterior (ver apartado 6.1). Se usan en este caso tanto células CGR8 parentales (WT) como los clones ES4 Pdx1 y ES3 GFP.

Después de 36 horas de haber plaqueado los EBs, se infectan las células con los adenovirus recombinantes que expresan p48 o LacZ (como adenovirus control de infección) según se describe en el apartado 2.4. Durante los primeros 14 días (EB7P7), se suplementa el medio de cultivo con sobrenadantes pancreáticos (ver apartado 4). Los EBs se mantienen en cultivo en la fase de plaqueo durante 14 días (P14), tiempo en el

cual se renueva el medio (10% FBS) cada dos días. Se analizan las células diferenciadas obtenidas después de 21 días en cultivo (EB7P14) (Figura 2.7).



**Figura 2.7:** Protocolo de diferenciación de células ES WT/ES4 Pdx1/ES3 GFP mediante infección con adenovirus recombinantes y el uso de sobrenadante pancreático fetal (SNP). Los círculos rojos marcan las veces en que se adiciona SN. Se infectan los EBs un día después de ser plaqueados (EB7P1) con el Ad p48 o con Ad LacZ (control de infección). LIF = leukemia inhibitory factor; SNP = sobrenadante pancreático fetal; EBs = cuerpos embrioides; Ad p48 = adenovirus recombinante que expresa p48; Ad LacZ = adenovirus recombinante que expresa LacZ; EB7 = cuerpos embrioides mantenidos siete días en suspensión; EB7P14 = cuerpos embrioides mantenidos siete días en suspensión + catorce días plaqueados.

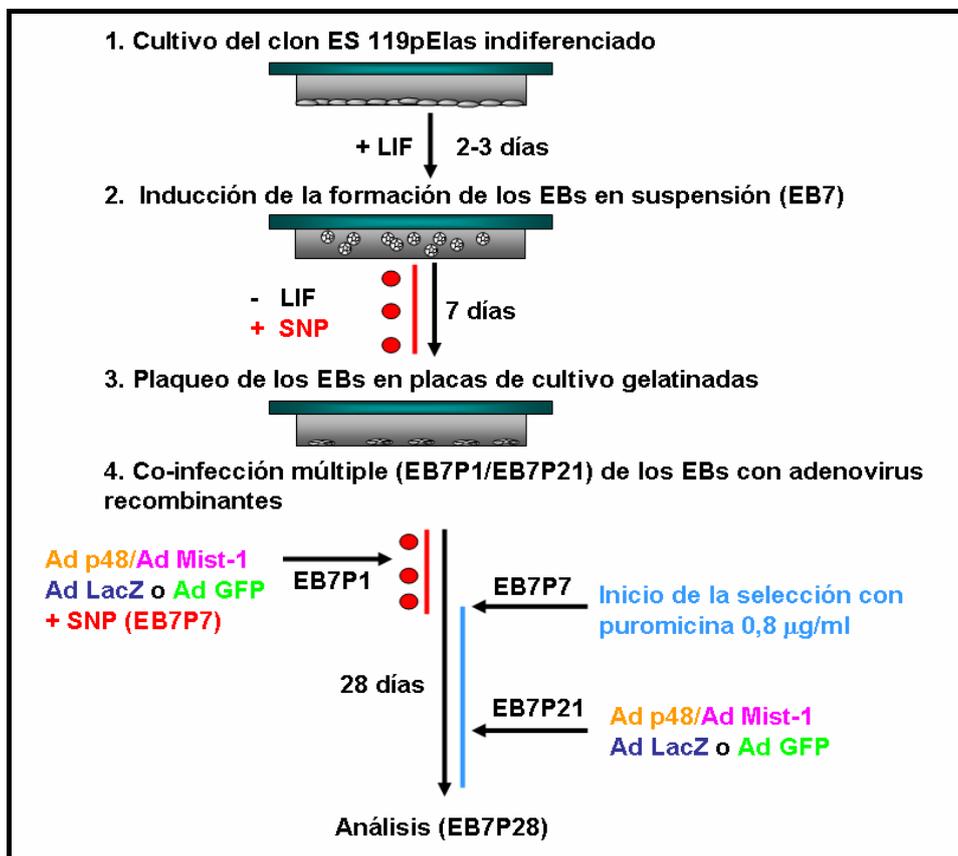
### 6.3. PROTOCOLO DE SELECCIÓN GENÉTICA (EB7P28)

La fase inicial (EB7) del protocolo es exactamente igual a los dos protocolos anteriores (ver apartado 6.1). Se usa en este caso el clon de células ES de selección 119pElas (ver apartado 3). También se adicionan durante los primeros 14 días (EB7P7) los sobrenadantes pancreáticos (ver apartado 6.1) al medio de cultivo.

En este protocolo se realiza una co-infección múltiple, es decir, se infectan las células con dos adenovirus recombinantes a la vez (Ad p48 y Ad Mist-1); y dos veces

en el tiempo. La primera infección se realiza 36 horas después de haber plaqueado los EBs (EB7P1) (ver apartado 6.2) y la segunda 21 días después de haber plaqueado los EBs (EB7P21). Se usa siempre un adenovirus control que puede ser Ad GFP o Ad LacZ.

Los EBs se mantienen en cultivo en la fase de plaqueo durante 28 días (P28), tiempo en el cual se renueva el medio (10% FBS) cada dos días. Se inicia la selección de las células añadiendo el antibiótico puromicina (0,8 µg/ml) al medio de cultivo 7 días después de haber plaqueado los EBs (EB7P7), que se mantiene en el cultivo hasta el final del experimento (EB7P28). Se analizan las células diferenciadas obtenidas después de 35 días en cultivo y 21 días en selección (Figura 2.8).



**Figura 2.8: Protocolo de selección del clon de células ES 119pELAS diferenciadas mediante incubación con sobrenadante pancreático fetal (SNP) e infección con adenovirus recombinantes.** Se realiza una primera infección de los EBs un día después de ser plaqueados (EB7P1) y una segunda infección 21 días después de ser plaqueados (EB7P21) con el Ad p48 y Ad Mist-1 o con Ad LacZ o Ad GFP (control de infección). Se inicia la selección con puromicina (0,8 µg/ml) siete días después de haber plaqueado los EBs (EB7P7) y se mantiene la puromicina hasta el final del experimento (EB7P28). Los círculos rojos marcan los días en que se adiciona SN a los cultivos. LIF = leukemia inhibitory factor; SNP = sobrenadante pancreático fetal; EBs =

cuerpos embrioides; EB7 = cuerpos embrioides mantenidos siete días en suspensión; EB7P7 = cuerpos embrioides mantenidos siete días en suspensión + siete días plaqueados. EB7P28 = cuerpos embrioides mantenidos siete días en suspensión + 28 días plaqueados. Ad p48 = adenovirus recombinante que expresa p48; Ad Mist1 = adenovirus recombinante que expresa Mist-1; Ad LacZ = adenovirus recombinante que expresa LacZ; Ad GFP = adenovirus recombinante que expresa GFP.

#### 6.4. PRODUCTOS DE CULTIVO CELULAR UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

Producto	Casa comercial	Referencia
Medio GMEM	Invitrogen	11966-025
Medio DMEM	Invitrogen	21710-0082
Medio HBSS	Invitrogen	14170-088
Medio RPMI	Invitrogen	21875
Medio HAM/F12	Invitrogen	31330-038
Optimem	Invitrogen	31985-047
$\beta$ -mercaptoetanol	Sigma	M-7522
L-Glutamina	Cambrex	BE17-605E
Piruvato Sódico	Invitrogen	11360-039
Penicilina/estreptomicina	Invitrogen	15140-122
Aminoácidos no esenciales	Invitrogen	11140-035
FBS (ES)	Biowest	S024748S1800
FBS (líneas celulares)	Invitrogen	10270-106
Folistatina	Sigma	F-2177
Higromicina	Invitrogen	10687-010
Puromicina	Calbiochem	540411
Gentamicina	Invitrogen	15710-049
Colagenasa P	Sigma	C-9722

Tabla 2.13: Descripción de los productos usados en los cultivos celulares.

## **7. EXTRACCIÓN DE RNA Y RT-PCR**

### **7.1. EXTRACCIÓN DE RNA Y TRATAMIENTO CON DNAsa**

Para la extracción del RNA de las células, se han utilizado dos tipos de kits de extracción de RNA comerciales, Genelute mammalian total RNA kit de Sigma y RNeasy Mini Kit de Qiagen.

Una vez extraído el RNA, éste es tratado con DNAsa usando el kit comercial DNA-free<sup>TM</sup> de Ambion. Posteriormente, se cuantifica el RNA con el espectrofotómetro a 260 nm, se diluye a 25 o 50 ng/ $\mu$ l, se alicuota (para evitar la degradación del RNA por congelación-descongelación) y se conserva a -80°C.

### **7.2. RT-PCR SEMICUANTITATIVA**

Para la realización de las RT-PCRs semicuantitativas, se ha usado el kit comercial OneStep RT-PCR de Qiagen utilizando las siguientes condiciones:

<b>Composición de la RT-PCR</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración</b>
RNA + H <sub>2</sub> O	16 $\mu$ l	100-250 ng
Buffer 5X	5 $\mu$ l	1X
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1 $\mu$ l	2 mM
dNTPs 10 mM	1 $\mu$ l	400 $\mu$ M
Oligo. F 10 $\mu$ M	1,5 $\mu$ l	0,6 $\mu$ M
Oligo. R 10 $\mu$ M	1,5 $\mu$ l	0,6 $\mu$ M
Mix de enzimas	1 $\mu$ l	X
<b>Volumen final</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>	

**Tabla 2.14: Composición de la RT-PCR semicuantitativa.**

Condiciones de la RT-PCR	Temperatura	Tiempo
1. Transcripción reversa	50°C	30 min.
2. Activación de la HotStarTaq	95°C	15 min.
3. Desnaturalización	94°C	30 seg.
4. Annealing	55-62°C (según la T <sub>m</sub> del oligo usado)	30 seg.
5. Elongación	72°C	30 -60 seg. (según la longitud del fragmento a amplificar)
Número de ciclos ( del paso 3 al 4)		22-40 según la abundancia del transcrito a amplificar
6. Elongación final	72°C	10 min.
6. Final	4°C	∞

**Tabla 2.15: Condiciones experimentales de la RT-PCR semicuantitativa.**

Los pares de oligonucleótidos usados han sido los siguientes:

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño (pb)
Hxb9	F 5'-ATTTCCGCATCGACGCCCTG-3' R 5'-GGTGAGCATGAGCGAGGTAG-3'	826
Pdx1	F 5'-GGACCCGTACTGCCTACACC-3' R 5'-GAGCCAGGTTGTCTAAATTG-3'	655
Ngn3	F 5'-CTTCACAAGAAGTCTGAGAACACCAG-3' R 5'-CTGCGCATAGCGGACCACAGCTTC-3'	232
Nkx6.1	F 5'-TCTTCTGGCCNNGGTTGATG-3' R 5'-CCTGCTTCTTCTTGGCGGTG-3'	311
Pax6	F 5'-AGAAGATCGTAGAGCTAGCT-3' R 5'-TACTGGGCTATTTTGCTTACA-3'	231
Pax4	F 5'-CAGCAGGACGGACTCAGCAG-3' R 5'-CAGGAAGGAGGGATTGGCAGT-3'	870
Isl-1	F 5'-CACTATTTGCCACCTAGCCAC-3' R 5'-AAATACTGATTACACTCCGCAC-3'	255
Glucagón	F 5'-GTGGCTGGATTGTTTGTAATGCTG-3'	236

## MATERIALES Y MÉTODOS

	R 5'-CGGTTCTCTTGGTGTTCATCAAC-3'	
<b>Insulina</b>	F 5'-TGCCCAGGCTTTTGTCAAACAGCACCTT-3' R 5'-CTCCAGTGCCAAGGTCTGAA-3'	<b>187</b>
<b>PP</b>	F 5'-CTGCCTCTCCCTGTTTCTCGT-3' R 5'-GGCCTGGTCAGTGTGTTGATG-3'	<b>179</b>
<b>P48 (rata/ratón)</b>	F 5'-TGCAGTCCATCAACGACGC-3' R 5'-GGACAGAGTTCTTCCAGTTC-3'	<b>714</b>
<b>P48 rata</b>	F 5'-GCCGGCCTGTGAGAGCTT-3' R 5'-CTGTCTCGCCTACCCTTGCA-3'	<b>648</b>
<b>RBPL</b>	F 5'-CTTGGTCTTGCATTGGCTTCA-3' R 5'-ATGCCAAGGTGGCTGAGAAAT-3'	<b>207</b>
<b>Mist-1</b>	F 5'-CCATGCAGGACACAGAAG-3' R 5'-CCTCTCTGAAGCTGTGGA-3'	<b>578</b>
<b>Elastasa</b>	F 5'-GTGGCTGCAGGCTATGACAT-3' R 5'-GGTGAAGACTGTGGGCTTC-3'	<b>410</b>
<b>Amilasa</b>	F 5'-CAGGCAATCCTGCAGGAACAA-3' R 5'-CACTTGC GGATAACTGTGCCA-3'	<b>483</b>
<b>Carboxipeptidasa</b>	F 5'-GAAATCGCAGGCAGGCACAG-3' R 5'-TGGTGGTTAGGAGGCAGTTTG-3'	<b>601</b>
<b>Quimiotripsinógeno</b>	F 5'-CATCCAGGTCCTGAAGATCG-3' R 5'-CTGCCCCAGGACACAATGCC-3'	<b>413</b>
<b>CCKAR</b>	F 5'-TCAGTGACCTCATGCTTGC-3' R 5'-ATGAGTCCGTAAGCCACCAC-3'	<b>442</b>
<b>M3</b>	F 5'-TGCTGGTGATCAGCTTGAC-3' R 5'-TTCGTGCCTTGTGTTGTAG-3'	<b>427</b>
<b>IP3R3</b>	F 5'-CCACACGGAGCTGCCACATTT-3' R 5'-TCAGCGGCTCATGCAGTTCTG-3'	<b>773</b>
<b>Sincolina</b>	F 5'-ATGTCCCTGCTGTGCCCACT-3' R 5'-TTGCAGTAGAGGGCAGAGAT-3'	<b>394</b>
<b>Cx32</b>	F 5'-GCAACCAGGTGTGGCAGTGC-3' R 5'-CGGAGGCTGCGAGCATAAAGAC-3'	<b>450</b>
<b>HPRT</b>	F 5'-TGCCTCATCTTAGGCTTTGT-3' R 5'-GGCCAGACTTTGTTGGATTTG-3'	<b>201</b>
<b>γ-Actina</b>	F 5'-TGAAACAACATAACAATTCCATCATGAAGTGT GAC-3' R 5'-AGGAGCGATAATCTTGATCTTCATGGTGCT-3'	<b>200</b>

**Tabla 2.16:** Lista y secuencia de oligonucleótidos usados para RT-PCR semicuantitativa.

### 7.3. RT-PCR CUANTITATIVA

Para la realización de la RT-PCR cuantitativa se usaron las sondas y los reactivos de TaqMan de Applied Biosystems (Tabla 2.17), analizándose la expresión de carboxipeptidasa A, elastasa I, quimiotripsinógeno, amilasa, p48, Ngn3, Nkx6.1 e insulina 1, y se usaron como sondas *housekeeping* HPRT y  $\beta$ -actina. La PCR cuantitativa se realizó con el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900HT y los datos fueron analizados con el software SDS 2.1 (Applied Biosystems).

Como controles de expresión de los marcadores acinares y endocrinos se usó el RNA de la línea celular acinar 266-6 y de la línea celular endocrina Min6, respectivamente.

Sonda TaqMan	Referencia
Carboxipeptidasa A1	Mm00465942-m1
Quimiotripsinógeno	Mm00481616_m1
Amilasa	Mm02342486_mH
Elastasa I	Mm00712898_m1
p48	Mm00479622_m1
Nkx6.1	Mm00454962_m1
Ngn3	Mm00437606_s1
Insulina 1	Mm01259683_g1
HPRT	Mm00446968_m1
$\beta$ -Actina	Mm00607939_s1
TaqMan Reverse Transcription Reagents	N8080234

**Tabla 2.17: Sondas y reactivos TaqMan usados para RT-PCR cuantitativa.**

## 8. WESTERN BLOT

Se lavan las células con PBS 1X y se lisan en tampón RIPA suplementado con los inhibidores de proteasas. Los extractos proteicos (50-80  $\mu$ g) se migran por electroforesis en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10% y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa durante 1 hora. Esta membrana se incuba en una solución de

bloqueo al 5% de leche durante una hora a TA en ligera agitación. El anticuerpo primario se añade a la misma solución de bloqueo entre 1 hora a TA hasta O/N a 4°C, según el anticuerpo. Se lava la membrana del anticuerpo primario durante 10 min. (3 veces), con TBS 1X-Tween 0,1%-5% leche, que se incuba posteriormente con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa (HPR, Horseradish Peroxidase) durante una hora en una solución TBS 1X-Tween 0,1%-0,5% leche. Seguidamente, se lava la membrana durante 10 min. (3 veces) tras lo cual la reacción se revela por quimioluminiscencia con ECL (Amersham).

La concentración de las proteínas de los lisados se mide con el método Bradford usando una recta patrón de BSA.

Las soluciones usadas para hacer los Western Blots se resumen en las siguientes tablas:

Tampón de lisis de proteínas: RIPA	Concentración
NP-40	0,5%
Tritón X-100	1%
Hepes pH7.5	20 mM
NaCl	150 mM
Glicerol	10%
DTT	1 mM

**Tabla 2.18: Tampón de lisis de proteínas RIPA.**

Tampón de carga de proteínas 10X	Concentración
Azul de bromofenol	0,42%
Ficol	25%
Etanol	20%

**Tabla 2.19: Tampón de carga de proteínas.**

Inhibidores de proteasas	Concentración
Pefabloc	2mM
Leupeptina	100 µg/ml
Pepstatina	10 µg/ml
Aprotinina	10 µg/ml

**Tabla 2.20: Inhibidores de proteasas.**

Gel separador 10%	Concentración
Tris HCl pH8.8	375 mM
Acrilamida/	8%
Bisacrilamida	
SDS	0,1%
Persulfato de amonio	0,1%
TEMED	

**Tabla 2.21: Gel separador.**

Gel acumulador 4%	Concentración
Tris HCl pH6.8	125 mM
Acrilamida/	4%
Bisacrilamida	
SDS	0,1%
Persulfato de amonio	0,1%
TEMED	

**Tabla 2.22: Gel acumulador.**

Tampón de bloqueo	Concentración
Tween	0,1%
TBS	1X
Leche en polvo	5% (bloqueo y ac. primario)
Leche en polvo	0,5% (ac. secundario)

**Tabla 2.24: Tampón de bloqueo.**

Tampón de electroforesis (TBS5X)	Concentración
Tris pH7.5	25 mM
Glicina	190 mM
SDS	0,1%

Tampón de transferencia 10X	Concentración
Tris pH7.5	200 mM
Glicina	1,5 M
Metanol	20%

**Tabla 2.23: Tampón de electroforesis y tampón de transferencia.**

## **9. INMUNOCITOQUÍMICA**

Para poder realizar las inmunocitoquímica de las células, éstas se siembran sobre cubreobjetos. Se esterilizan los cubreobjetos con etanol hasta su evaporación y posteriormente se incuban con una solución de PBS 1X-0,1% gelatina durante 30 min. a 37°C. Una vez eliminada la solución de gelatina, se siembran los EBs sobre los cubreobjetos y al final de los protocolos de diferenciación se lavan con PBS 1X (3 veces). Después, las células se fijan con paraformaldehído (PFA) 4%-PBS 1X durante 20 min. y se lavan con PBS 1X (3 veces). Se conservan en PBS-0,1% acida sódica a 4°C.

### **9.1 INMUNOCITOQUÍMICA MEDIANTE MÉTODOS ENZIMÁTICOS**

Se ha utilizado para las inmunocitoquímica el método enzimático HRP (Horseradish Peroxidase). Se usó un kit comercial, DAKO Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System de DAKO, según el siguiente protocolo:

- Permeabilizar con PBS 1X-Tritón 0,1%-Saponina 0,1% durante 45 min.
- Lavar tres veces con PBS 1X durante 5 min.
- Bloquear la peroxidasa endógena con la solución comercial de DAKO, que contiene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durante 2 min.
- Lavar tres veces con PBS 1X durante 5 min.
- Bloquear las interacciones inespecíficas con una solución de PBS-BSA 1%-Saponina 0,1% durante 45 min.
- Lavar tres veces con PBS 1X durante 5 min.
- Incubar con el anticuerpo primario en PBS 1X-BSA 1%-Saponina 0,1% durante 1 hora y 30 min.
- Lavar tres veces con PBS 1X durante 5 min.
- Incubar con el anticuerpo secundario en la solución Envision plus (del kit comercial) durante 30 min.
- Lavar tres veces con PBS 1X durante 5 min.
- Añadir la solución de revelado de la peroxidasa de rábano (HRP) con la solución del kit comercial de sustrato y cromógeno (DAB, diaminobenzidina).

- Incubar la reacción entre 2 y 15 min.
- Lavar tres veces con PBS 1X durante 5 min.
- Contrateñir con una solución de hematoxilina-eosina.
- Lavar tres veces con PBS 1X durante 5 min.
- Lavar tres veces con H<sub>2</sub>O durante 2 min.
- Montar las muestras sobre portaobjetos en medio acuoso (Aquatex).

## 9.2. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

- Incubar con NH<sub>4</sub>Cl 50 mM 5 min.
- Lavar tres veces con PBS 1X durante 5 min.
- Permeabilizar con PBS 1X-Tritón X-100 0,2% durante 5 min.
- Lavar tres veces con PBS 1X durante 5 min.
- Incubar con la solución de bloqueo PBS-BSA 1% durante 30 min. para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo.
- Incubar con el anticuerpo primario en PBS-BSA 1% entre 1 hora y 30 min. a TA u O/N a 4°C.
- Lavar tres veces con PBS 1X durante 10 min.
- Incubar con el anticuerpo secundario unido a fluoresceína (FITC) a una dilución 1:40 en PBS-BSA 1%, durante 1 hora. A partir de este paso, el protocolo se realiza manteniendo las muestras en oscuridad.
- Lavar tres veces con PBS 1X durante 5 min.
- Teñir los núcleos con To-pro3 (1 µM) diluido en PBS 1X, durante 5 min.
- Lavar tres veces con H<sub>2</sub>O.
- Montar las muestras sobre portaobjetos con mowiol.
- Conservar las muestras a 4°C en oscuridad.

## 9.3. INMUNOFLUORESCENCIA MEDIANTE AMPLIFICACIÓN CON EL MÉTODO TSA

Para realizar las inmunofluorescencias con sistemas de amplificación se ha usado el kit comercial TSA<sup>TM</sup> Fluorescent Systems Tyramide Signal Amplification de PerkinElmer. Este sistema amplificador se basa en el uso de un anticuerpo secundario

unido a biotina que a su vez será reconocido por la estreptavidina acoplada a HRP, y finalmente el fluorocromo unido a tiramida se deposita donde está la HRP inmovilizada.

- Permeabilizar con metanol 60% disuelto en H<sub>2</sub>O durante 30 min.
- Lavar tres veces con PBS 1X durante 5 min.
- Bloquear la peroxidasa endógena con el reactivo de bloqueo comercial durante 2-3 min.
- Lavar tres veces con PBS 1X durante 5 min.
- Añadir la solución de bloqueo comercial (TNB) durante 45 min. para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo.
- Incubar el anticuerpo primario en PBS-BSA 1%-saponina 0,1% durante 1 hora y 30 min.
- Lavar sucesivamente con PBS 1X durante 10 min., PBS 1X-Tween 0,2% durante 5 min. y PBS 1X durante 10 min.
- Incubar el anticuerpo secundario acoplado a biotina diluido en TNB a 1:350, durante 45 min.
- Lavar en PBS 1X durante 10 min., PBS 1X-Tween 0,2% durante 5 min. y PBS 1X durante 10 min.
- Incubar con estreptavidina/HRP diluida en TNB a 1:200, durante 35 min.
- Lavar sucesivamente con PBS 1X durante 10 min., PBS 1X-Tween 0,2% durante 5 min. y PBS 1X durante 10 min.
- Incubar el fluorocromo, cianina 3, unido a tiramida (el cual se deposita donde hay peroxidasa) diluido en el diluyente amplificador a 1:100, durante 5 min. A partir de este paso el protocolo se realiza manteniendo las muestras en oscuridad.
- Lavar tres veces con PBS 1X durante 5 min.
- Teñir los núcleos con To-pro3 (1 $\mu$ M) diluido en PBS 1X, durante 5 min.
- Lavar tres veces con H<sub>2</sub>O.
- Montar las muestras sobre portaobjetos con mowiol.
- Conservar las muestras a 4°C en oscuridad.

#### **9.4. INMUNOFLUORESCENCIA PARA LA DETECCIÓN DE BROMODIOXIURIDINA (BrDu)**

- Tratar las células con BrDu 1 $\mu$ M O/N.

- Lavar las células con PBS 1X tres veces. Tripsinizar las células, contarlas y preparar una suspensión monocelular de  $1 \cdot 10^6$  células por punto. Al ser una suspensión celular, después de cada paso, para eliminar las soluciones de trabajo se centrifugan las células 3 min. a 1000 rpm, y al añadir cada solución nueva es necesario pipetear bien las células para volver a resuspenderlas.
- Incubar las células con el fijador citofix del kit comercial Cytofix/Cytoperm de BD Company durante 20 min. a 4°C.
- Lavar las células con tampón de lavado del kit comercial Cytofix/Cytoperm tres veces durante 5 min.
- Desnaturalizar el DNA. Para ello se usa una solución de desnaturalización que se prepara al momento y contiene 0,5% BSA-2M HCl en PBS 1X. Esta solución se deja precipitar durante unos min. antes de ser usada. Se incuban las células con esta solución durante 20 min. a TA.
- Lavar las células con PBS 1X tres veces durante 5 min.
- Incubar con la solución de bloqueo PBS 1X-BSA 0,5%-Tween 0,5% durante 30 min.
- Incubar con el anticuerpo primario anti-BrDu diluido en la solución de bloqueo a 1:2000, durante 45 min.
- Lavar las células con PBS 1X-BSA 0,5%-Tween 0,5% tres veces durante 5 min.
- Incubar el anticuerpo secundario unido a fluoresceína diluido en la solución de bloqueo a 1:200. A partir de este punto se mantienen las células en oscuridad.
- Lavar las células con PBS 1X tres veces durante 5 min.
- Incubar con ioduro de propidio 5µg/ml y RNAsa A 150 µg/ml en PBS O/N a 4°C.
- Analizar las células por FACS, usando un citómetro de Becton Dickinson.

## 9.5. ANTICUERPOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

Marcador	Anticuerpo	Origen	Dilución	Dilución
			WB	ICQ
Pdx-1	Conejo (policlonal)	Dr. F.X.Real	1:2500	1:300
p48	Conejo (policlonal)	Dr. F.X.Real	0,5 µg/ml	5 µg/ml
Mist-1	Ratón (monoclonal)	Dr. Konieczny	1:500	1:2
Amilasa	Conejo (policlonal)	Sigma	0,5 µg/ml	10 µg/ml
Carboxipeptidasa	Conejo (policlonal)	Biogenesis	1:6000	1:1500
Quimiotripsinógeno	Ratón (monoclonal)	Biogenesis	X	1:1000
E-cadherina	Ratón (monoclonal)	Trans. Lab.	X	1:500
β-catenina	Ratón (monoclonal)	Trans. Lab.	X	1:500
Sintaxina-4	Conejo (policlonal)	Synaptic Systems	X	1:1500
CCKAR	Conejo (policlonal)	Euro-Diagnostica	X	1:2500
VAMP-8	Conejo (policlonal)	Abcam	X	1:500
BrDu	Ratón (monoclonal)	BD Biosciences	X	1:2000
Ig-FITC	Ratón	Dako Cytomation	X	1:40
Ig-FITC	Conejo	Dako Cytomation	X	1:40
Ig-HRP	Ratón	Dako Cytomation	1:2000	1:200
Ig-HRP	Conejo	Dako Cytomation	1:2000	1:200
Ig-Biotina	Ratón	Dako Cytomation	X	1:350
Ig-Biotina	Conejo	Dako Cytomation	X	1:350

Tabla 2.25: Anticuerpos usados en el estudio. WB = Western Blot; IF= Inmunofluorescencia; HM = autoproducción (home made).

## 10. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA

### 10.1. *IN SITU*: X-GAL

Para analizar la actividad del enzima β-galactosidasa *in situ* se usó la técnica de marcaje histoquímica con X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside).

- Eliminar el medio de cultivo y lavar las células con PBS 1X.
- Fijar las células con glutaraldehído 0,2% diluido en PBS 1X, durante 20 min.
- Lavar las células con PBS 1X.

- Incubar las células con la solución de revelado con X-gal (Tabla 2.26) a 37°C O/N en oscuridad.

Componentes de la solución de revelado	Concentración
Ferrocianuro de potasio	5 mM
Ferricianuro de potasio	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
X-gal	1mg/ml

**Tabla 2.26: Solución de revelado.**

- Lavar las células con PBS 1X.
- Conservar las células a 4°C en PBS 1X-acida sódica 0,1%.

## 10.2. BIOQUÍMICAMENTE EN LOS LISADOS CELULARES: ONPG

Para analizar la actividad del enzima  $\beta$ -galactosidasa a partir de los lisados celulares se usó el compuesto orgánico ONPG (Ortho Nitro Phenyl Galactopyranoside) según se describe a continuación:

- Tripsinizar las células y centrifugarlas 5 min. a 1000 rpm.
- Lavar el botón celular dos veces con PBS1X.
- Lisar las células con 200  $\mu$ l del tampón de lisis (Tabla 2.27) y tres ciclos de congelación y descongelación en nitrógeno líquido.
- Añadir 25  $\mu$ l de cada lisado a 135  $\mu$ l del tampón A (Tabla 28) e incubar 5 min. a 37°C.
- Añadir 50  $\mu$ l de ONPG a cada muestra e incubar de 1 a 16 horas. Para parar la reacción, se añaden 90  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M.
- Lectura de la actividad enzimática a 420 nm.

Componentes del tampón de lisis	Concentración
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7.5	100 mM
Tritón	0,2%
DTT	1 mM
Componentes del tampón A	
Tampón de lisis	
KCl	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
β-mercaptoetanol	50 mM

**Tabla 2.27: Composición del tampón de lisis y del tampón A.**

## **11. UNIÓN DE CCK RADIOACTIVA A SU RECEPTOR (CCKr)**

### **11.1. PREPARACIÓN DE MEMBRANAS CRUDAS PARA EL EXPERIMENTO DE UNIÓN DE CCK RADIOACTIVA A SU RECEPTOR (CCKr)**

En el laboratorio de la Dra. Marlène Dufresne (INSERM, Toulouse) se realizaron experimentos de unión de CCKA radioactiva en preparaciones de membranas crudas de las células diferenciadas obtenidas después del protocolo de selección.

- Lavar las células 3 veces con PBS 1X.
- Añadir a un pocillo de una placa de 6 pozos 500µl de la solución para la preparación de membranas crudas para el ensayo de unión de CCK radioactiva (Tabla 2.28), despegar las células con un raspador y transferir las células a un tubo que resista el nitrógeno líquido.
- Repetir tres veces un proceso de congelación con nitrógeno líquido (5 min.) y descongelación a 37°C (5 min.), para la lisis de las células.
- Centrifugar las células durante 20 min. a 16000 rpm a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en una solución de Hepes 50 mM + 17,4 µg/ml de PMSF.

Componentes de la solución para la preparación de membranas crudas	Concentración
Hepes pH 7	10 mM
Bacitracin	1 mg/ml
Inhibidor de tripsina (STI)	0,1 mg/ml
PMSF	17,4 µg/ml

**Tabla 2.28: Composición de la solución para la preparación de las muestras de membranas crudas para el ensayo de CCK radioactiva.**

## 11.2. UNIÓN DE CCK RADIOACTIVA A LAS PREPARACIONES CRUDAS DE MEMBRANAS CELULARES

Una vez obtenidas las preparaciones de las muestras de membranas crudas para la determinación de la unión de CCK se realizó el siguiente protocolo:

- Descongelar las muestras (cada preparación contiene el mismo número de células en el mismo volumen de tampón) y homogenizarlas con dounce a 4°C (15 veces) en 1 ml de tampón de unión (Tabla 2.29).
- Diluir la muestra en tampón de unión 1:4
- Recoger 400 µl de cada preparación de membrana e incubar 2 horas a TA con el ligando (CCK-I<sup>125</sup>) radioactivo (100000 cpm) en un volumen total de 500 µl. En estas condiciones, 100000 cpm corresponden a 80-100 pM de CCK marcada. Cada ensayo de unión se realiza por triplicado.
- La unión no específica se determina realizando la incubación de cada preparación en presencia del ligando no radioactivo CCK 1 µM.
- Después de 2 horas de incubación añadir 500 µl del tampón de unión con 1 % de BSA y centrifugar a 4°C a 10000 rpm durante 10 min.
- Aspirar el sobrenadante, lavar el botón celular, añadir 500 µl de tampón de unión con 1% de BSA y centrifugar a 4°C a 10000 rpm durante 5 min.
- Aspirar el sobrenadante y medir la radioactividad del *pellet* con un contador de centelleo gamma.
- Calcular la unión específica como resultado de unión total de CCK radioactiva menos la unión inespecífica.

Componentes del tampón de unión de CCK radioactiva	Concentración
Hepes pH 7	50 mM
Bacitracina	0,1%
Inhibidor de tripsina (STI)	0,01%
EGTA	1mM
NaCl	115 mM
BSA	0,2%
PMSF	17,4 µg/ml

**Tabla 2.29: Composición del tampón de unión de CCK radioactiva**

## **12. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO CITOSÓLICO**

Para las medidas de la concentración de calcio intracelular, se usan sondas fluorescentes unidas a grupos de ésteres de acetoximetil que inactivan las sondas y permiten su entrada a la célula al ser no polares. Una vez dentro de la célula, las esterasas intracelulares cortan los grupos ester, de manera que la sonda queda retenida dentro de la célula y es sensible a los cambios de calcio.

Para este estudio se usó la sonda Fura-2 (Molecular Probes) cuyo rango de excitación es de 340-380 nm y de emisión de 510 nm a la concentración de 4,76 µM. Se hicieron las medidas de calcio intracelular de las células diferenciadas obtenidas después del protocolo de selección.

- Incubar las células con una solución isotónica (ISO) precalentada a 37°C (Tabla 2.30) con 4,76 µM de Fura-2 durante 45 min. a TA.
- Lavar las células con la solución isotónica para eliminar el Fura-2.
- Se añade el estímulo (secretagogo), carbacol 5 µM, CCK  $10^{-9}$  M y  $10^{-12}$  M en la solución isotónica precalentada (Figura 2.9). La concentración de calcio se determina con un microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX70.

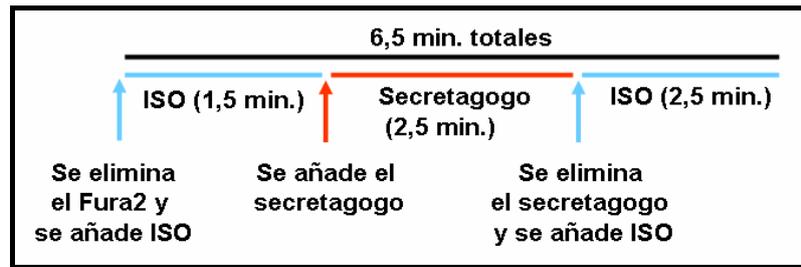


Figura 2.9: Protocolo de las medidas de la concentración de calcio intracelular.

Componentes de la solución ISO	Concentración
NaCl	140 mM
KCl	2,5 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
Hepes	10 mM
Glucosa	5 mM
Osmolaridad	303±4 mOsm
pH 7.25	

Tabla 2.30: Composición de la solución isotónica (ISO).

### 13. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD AMILASA EN ENSAYOS DE SECRECIÓN

Para analizar la amilasa intracelular secretada de las células diferenciadas obtenidas después del protocolo de selección, se usó un kit comercial que detecta la actividad enzimática del enzima, Infinity™ Amylase Liquid Stable Reagent (Termo Electron Corporation).

Para detectar la secreción de amilasa, se recoge el medio de cultivo de las células al final del protocolo (EB7P28) (ver apartado 6.3) y se mide la actividad amilasa; esta medida nos indicará la amilasa de secreción constitutiva no regulada, basal. Se añade medio nuevo suplementado con secretagogos: carbacol (CCH)  $5 \cdot 10^{-6}$  M,  $10^{-9}$  M; colecistoquinina (CCK)  $10^{-9}$  M,  $10^{-12}$  M y ceruleína  $10^{-9}$  M (Tabla 2.32). También se añade un punto control sin secretagogo. Las células se incuban con este medio durante 45 min. a 37 °C y posteriormente, tras recogerlo, se mide la actividad amilasa; esta

medida nos indicará la amilasa secretada en respuesta a un estímulo. Por último, las células se lisan con el tampón Krebs (Tabla 2.31) y se mide la actividad amilasa del lisado; esta medida nos indicará la actividad amilasa intracelular de las células en presencia de estímulo o sin estímulo (basal) (Figura 2.10). Para todas las medidas se hacen triplicados.

Componentes del Tampón de Krebs	Concentración
Hepes	24,5 mM
NaCl	115 mM
Glucosa	5 mM
Glutamina	2 mM
Aa esenciales	1X
Aa no esenciales	1X
KCl	4,8 mM
CaCl <sub>2</sub> (2 H <sub>2</sub> O)	0,5 mM
MgSO <sub>4</sub> (7 H <sub>2</sub> O)	4,8 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
STI (inhibidor de tripsina)	0,01%
BSA	0,20%

**Tabla 2.31: Composición del Tampón de Krebs.**

Para lisar las células con el tampón Krebs, es necesario previamente tripsinizarlas, resuspenderlas en el tampón y hacer tres ciclos de congelación (nitrógeno líquido) y descongelación (37°C). Los lisados se pueden conservar a -20°C.

Para el ensayo se mezclan 20 µl de cada muestra con 20 µl del reactivo del Kit y se incuban durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, se realiza la lectura de la actividad amilasa a 420 nm.

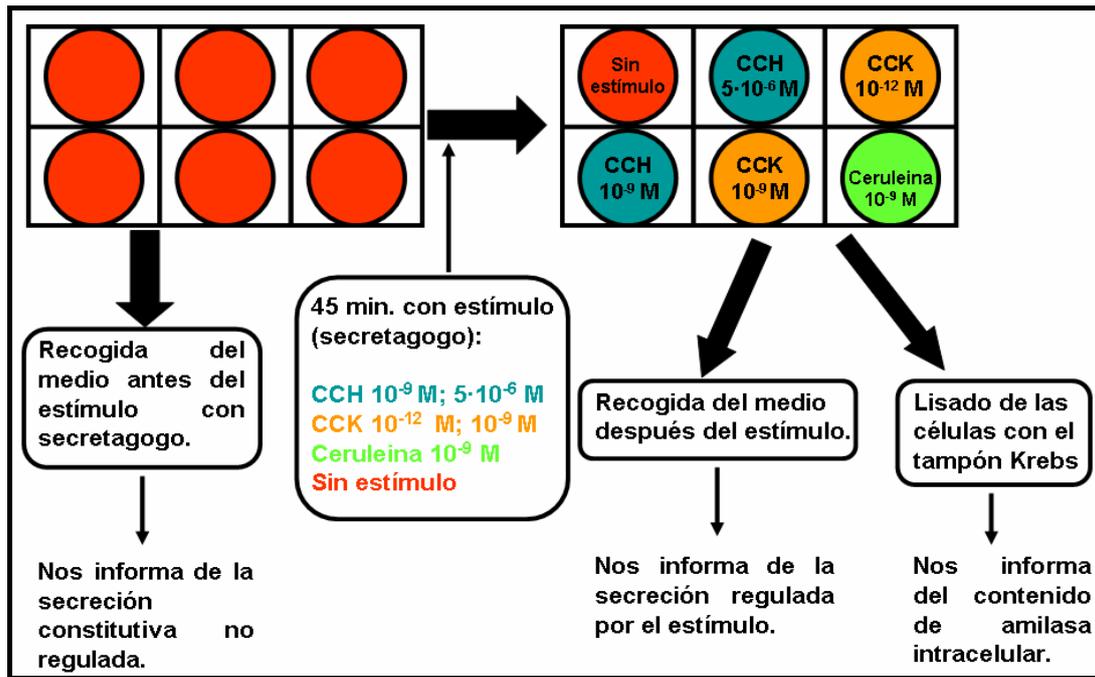


Figura 2.10: Esquema del protocolo y de las muestras analizadas para la detección de amilasa.

Secretagogo	Casa comercial	Referencia
CCK	Sigma	C2175
CCH	Sigma	C4382-1G
Ceruleína	Sigma	C9026

Tabla 2.32: Secretagogos utilizados.

## 14. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Para realizar el análisis de las células por microscopía electrónica se utilizó el siguiente protocolo:

- Fijar las células con glutaraldehído al 2% durante 30 min.
- Lavar 3 veces las células con PBS1X.
- Post-fijar las células con Tetraóxido de Osmio al 2% durante 30 min. a TA y oscuridad.
- Lavar las células 3 veces con H<sub>2</sub>O.
- Deshidratar las muestras con etanol y hidroxipropilo de metacrilato (HPMA).
- Incluir las células en resina Epon 812 y reincluir las para hacer secciones.

- Para secciones de semifinos, se realiza una tinción de azul de toluidina y para las secciones de finos se realiza una tinción de acetato de uranilo y citrato.

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

**RESULTADOS**

- 1. Optimización de las condiciones de cultivo**
2. Sobreexpresión de factores de transcripción
3. Selección genética

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA



## **1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO**

La proporción de células ES que adoptan espontáneamente un fenotipo endodérmico durante la formación del EB es muy baja. Por ello y con el fin de aumentar la eficiencia de diferenciación de las células ES a células  $\beta$ , en los últimos años distintos grupos han desarrollado protocolos de diferenciación basados en el uso de factores de crecimiento y moléculas de señalización implicados en el desarrollo pancreático; pero poco se sabe sobre qué factores regulan la diferenciación y desarrollo exocrino.

### **1.1. ANÁLISIS DEL EFECTO DEL SOBRENADANTE PANCREÁTICO FETAL (SNP) EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS ES A CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS**

Las células ES responden a señales implicadas en el desarrollo pancreático, ya que su diferenciación en presencia de sobrenadantes pancreáticos obtenidos del cultivo de páncreas fetal (SNP) incrementa la expresión de diferentes marcadores endocrinos (4, 22, 23). Por ello, nuestro interés fue analizar si los SNP también inducían un incremento de la expresión de marcadores exocrinos. Así pues, aplicando el protocolo descrito en el apartado 8.1 de Materiales y Métodos (Figura 3.1A) analizamos por RT-PCR semicuantitativa y cuantitativa la expresión de distintos marcadores de diferenciación exocrina, así como la expresión de factores de transcripción implicados en el desarrollo exocrino. Estudiamos el efecto de los SNP de estadios comprendidos entre E12.5-E17.5 (Figura 3.1B-C), observando que en todos los casos tenía lugar un incremento de la expresión de transcritos de RNAm que codifican para marcadores endocrinos (Nkx6.1, insulina y glucagón) y marcadores exocrinos (amilasa, carboxipeptidasa A, quimiotripsinógeno, Mist-1 y p48), aunque la expresión de elastasa no se modulaba. Esto demuestra que los SNP contienen un cóctel de factores que inducen tanto la diferenciación endocrina como exocrina, por lo que tal y como era de esperar su efecto no es selectivo para un linaje pancreático específico.

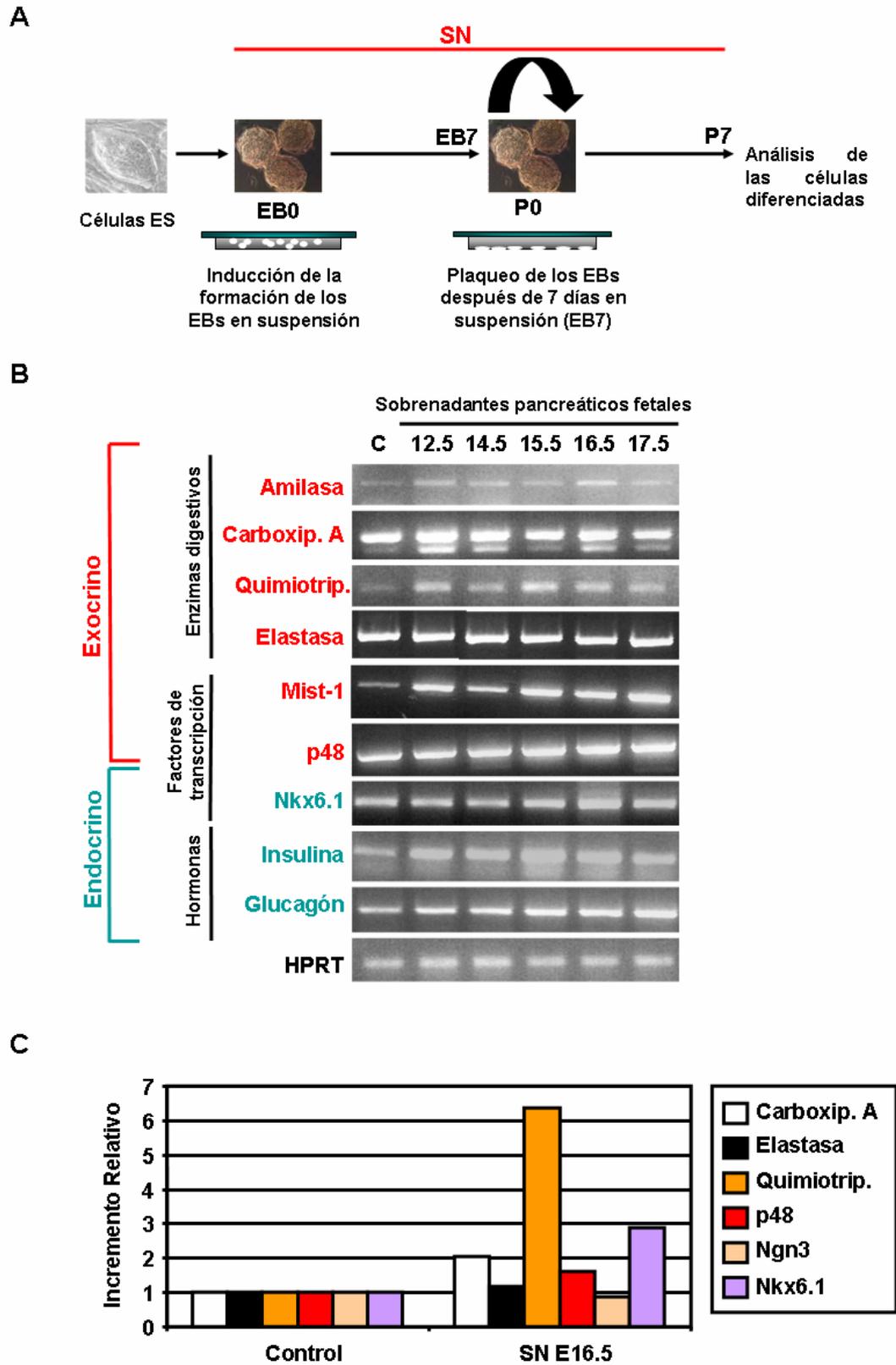
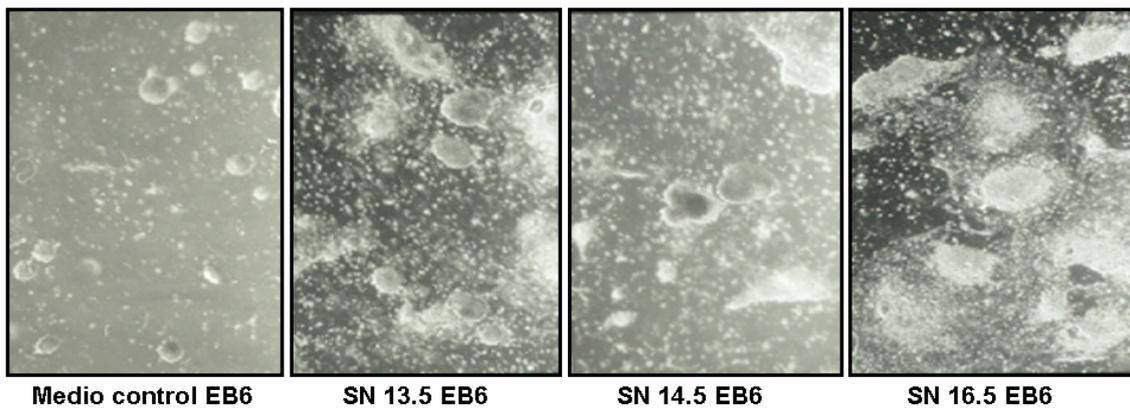


Figura 3.1: A) Protocolo de diferenciación de las células ES utilizando SNP (EB7P7). Análisis de la expresión de marcadores pancreáticos, en las células diferenciadas tratadas con SNP de estadios embrionarios comprendidos entre E12.5-E17.5 por B) RT-PCR semicuantitativa y por C) RT-PCR cuantitativa. La condición control (C) muestra la expresión de los distintos marcadores en células que no han sido tratadas con SNP. HPRT es el

marcador usado como gen *housekeeping*. Carboxip. A= carboxipeptidasa A; Quimiotrip.= quimiotripsinógeno.

También observamos que en general los EBs cultivados con SNP tenían un tamaño sensiblemente mayor que los obtenidos en la condición control; este efecto era claramente más pronunciado en el caso del estadio E16.5 (aproximadamente de tres veces según medidas milimétricas). Estos resultados demuestran que los SNP contienen asimismo factores mitogénicos, cuya concentración y/o composición varía según el estadio embrionario del cual se han obtenido el SN (Figura 3.2).



**Figura 3.2: Tamaño de los EBs tratados con SNP de distintos estadios embrionarios.** Se muestran imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fase de EBs después de 6 días en suspensión (EB6) tratados con SNP de los estadios E13.5, E14.5 y E16.5. Los EBs control no han sido tratados con SNP.

## **1.2. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS SOBRENADANTES OBTENIDOS DEL CULTIVO DE MESÉNQUIMA PANCREÁTICO DEL ESTADÍO EMBRIONARIO E12.5 EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS ES A CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS**

Debido a que se ha descrito que el mesénquima pancreático regula las proporciones relativas de tejido endocrino y exocrino y que en ausencia de éste, el epitelio pancreático se diferencia a los linajes endocrinos (15), estudiamos el efecto de los SN obtenidos del cultivo de mesénquima pancreático del estadio de E12.5 y por otro lado del epitelio pancreático del mismo estadio. La separación del mesénquima se realizó con páncreas embrionarios de este estadio porque es todavía realizable; más tarde éste queda embebido en el parénquima acinar. En nuestras condiciones, el mesénquima aislado prolifera *in vitro* al menos durante una semana y las células

derivadas presentan una morfología fibroblástica (Figura 3.3A). Usando el protocolo descrito en el apartado 8.1 de Materiales y Métodos (Figura 3.1A) analizamos por RT-PCR semicuantitativa, la expresión de distintos marcadores de diferenciación exocrina y endocrina, así como la expresión de factores de transcripción implicados en el desarrollo pancreático. El SN obtenido del cultivo de mesénquima pancreático inducía un incremento en la expresión tanto de marcadores exocrinos como endocrinos (Figura 3.3B). Este incremento no era significativamente mayor que el obtenido con los SNP, ni se producía tampoco de forma selectiva un incremento de la expresión de marcadores acinares (Figura 3.1B).

Se ha descrito en experimentos de co-cultivo de mesénquima y epitelio pancreáticos (11, 15) que para que el mesénquima induzca la diferenciación exocrina es necesario el contacto y/o la proximidad de ambos sugiriendo la implicación tanto de factores solubles como de moléculas asociadas a la membrana de una forma concentración dependiente. Estos datos podrían explicar en parte el hecho de que no observemos un incremento específico de la expresión de marcadores exocrinos al ser incubadas las células con el SN del mesénquima embrionario.

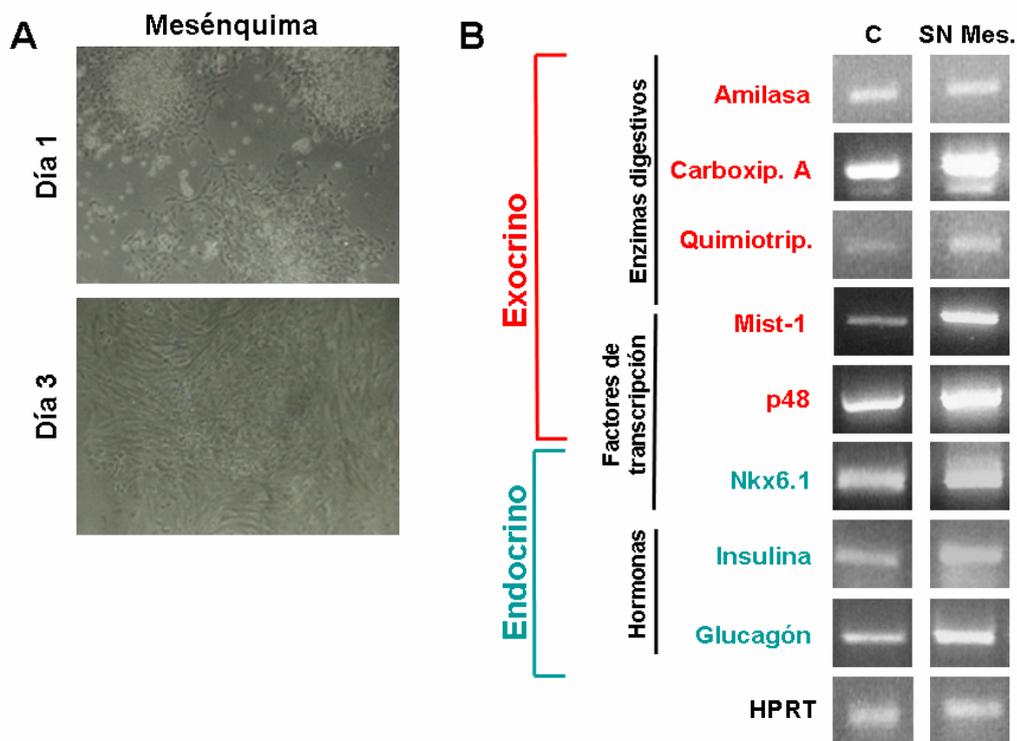


Figura 3.3: A) Imágenes de contraste de fase de los cultivos de mesénquima de páncreas embrionario de E12.5, después de 24 horas y 3 días de cultivo. B) Análisis de la expresión

**de marcadores pancreáticos en las células diferenciadas tratadas con SN de cultivos de mesénquima del estadio embrionario de E12.5 por RT-PCR semicuantitativa.** La condición control (C) muestra la expresión de los distintos marcadores en células que no han sido tratadas con SN. HPRT es el marcador usado como gen *housekeeping*. Carboxip. A= carboxipeptidasa A; Quimiotrip.= quimiotripsinógeno. Mes. = sobrenadante del cultivo de mesénquima pancreático del estadio embrionario E12.5. Epit. = sobrenadante del cultivo de epitelio pancreático del estadio embrionario E12.5. SN = sobrenadante.

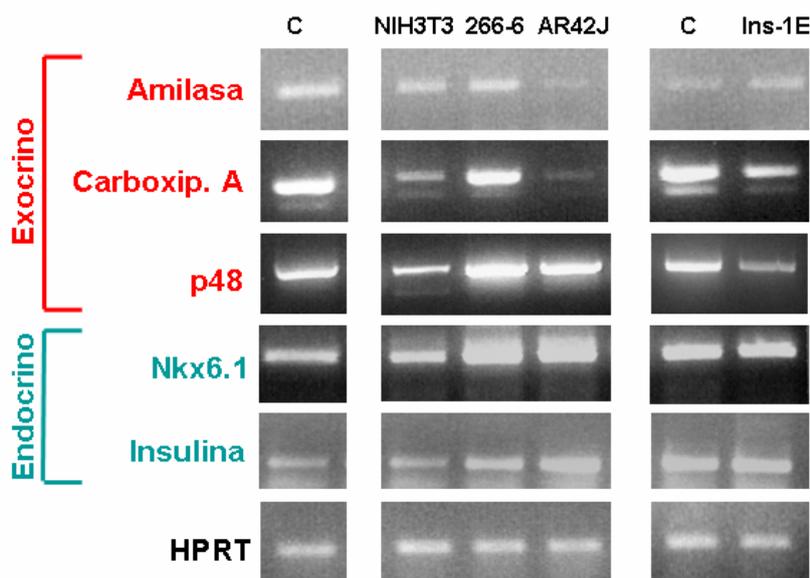
### **1.3. ANÁLISIS DEL EFECTO DEL SOBRENADANTE DEL CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES NIH3T3, 266-6, AR42J E INS-1E EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS ES A CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS**

Investigamos el efecto de los SN obtenidos del cultivo de una línea celular mesenquimal no pancreática (NIH3T3), de líneas celulares pancreáticas exocrinas (266-6 y AR42J) así como de una línea celular pancreática endocrina (INS-1E). Utilizando el protocolo descrito en el apartado 8.1 de Materiales y Métodos analizamos, por RT-PCR semicuantitativa, la expresión de distintos marcadores de diferenciación exocrina y endocrina, así como la expresión de factores de transcripción implicados en el desarrollo pancreático (Figura 3.4).

Trabajos pioneros en los años 60-70 demostraron en ensayos de recombinación de epitelio-mesénquima que éste último no requería ser de origen pancreático para inducir la diferenciación exocrina (6). Más recientemente, trabajos de Li et al., 2004 (11) han mostrado que la línea celular NIH3T3 también puede sustituirlo. Nuestros resultados demuestran que el SN obtenido a partir del cultivo de esta línea celular no produce este efecto sobre la diferenciación acinar. Asimismo, no se regula la expresión de marcadores endocrinos tales como Nkx6.1 e insulina. Tal como hemos comentado en el apartado anterior, una explicación plausible sería que con el SN no conseguimos la concentración adecuada de los factores responsables de dicha inducción. De hecho, en los trabajos publicados se describe un efecto represor del mesénquima sobre la diferenciación endocrina dependiente de la proximidad y/o concentración local de factores que tampoco observamos en nuestros ensayos. Otra posibilidad, es que el clon de células NIH3T3 con el que trabajamos no fuera el mismo que el utilizado en los experimentos de Li et al., 2004.

Por otro lado, al analizar el efecto de los SN de las líneas celulares acinares observamos que el SN de ambas líneas (266-6 y AR42J) inducía un incremento de la expresión de p48, Nkx6.1 e insulina, pero en cambio no se incrementaba la expresión de marcadores de citodiferenciación acinar como amilasa o carboxipeptidasa A. Incluso, en el caso del SN de AR42J se observaba una cierta represión en la expresión de enzimas digestivos (Figura 3.4). El incremento de la expresión de marcadores endocrinos con el uso del sobrenadante del cultivo de la línea celular AR42J podría explicarse en parte por el carácter anficrino de estas células y es posible que ocurra lo mismo en el caso de la línea celular 266-6.

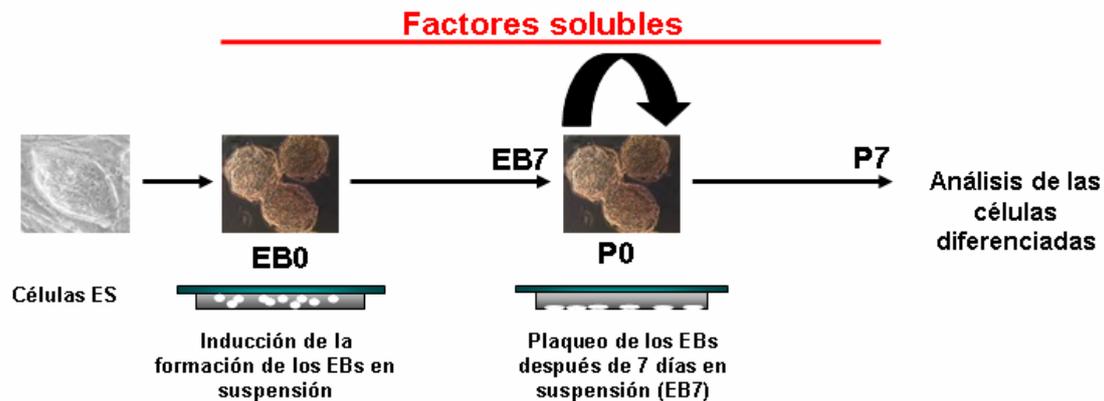
Por último, el SN de la línea celular endocrina INS-1E no regulaba la expresión de marcadores endocrinos (Nkx6.1 e insulina) y disminuía la expresión de marcadores exocrinos (p48 y carboxipeptidasa A) (Figura 3.4).



**Figura 3.4:** Análisis de la expresión de marcadores pancreáticos en las células diferenciadas tratadas con SN de cultivos de líneas celulares mesenquimales (NIH3T3), acinares (AR42J y 266-6) y endocrinas (INS-1E) por RT-PCR semicuantitativa. La condición control (C) muestra la expresión de los distintos marcadores en células que no han sido tratadas con SN. HPRT es el marcador usado como gen *housekeeping*. Carboxipep. A = carboxipeptidasa A.

#### 1.4. ANÁLISIS DEL EFECTO DE FACTORES SOLUBLES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO PANCREÁTICO SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS ES A CÉLULAS ACINARES

El siguiente paso fue investigar qué vías de señalización específicas implicadas en el desarrollo pancreático podrían regular la diferenciación de las células ES al linaje exocrino. Se ha demostrado extensivamente (ver apartado 2 de la Introducción) la importancia de la vía de señalización de Hedgehog, de distintos miembros de la familia del TGF $\beta$ , FGFs, EGFs y del RA sobre el desarrollo pancreático. Por ello, analizamos el efecto de factores solubles y drogas moduladoras de estas vías de señalización, tales como ciclopamina (compuesto químico que bloquea la vía de señalización de HH), Activina A y BMP4, FGF4, FGF6 y FGF7, HB-EGF y all-*trans* RA utilizando el protocolo descrito en el apartado 8.1 de Materiales y Métodos (Figura 3.5).



**Figura 5: Protocolo de diferenciación de las células ES (EB7P7) incubadas con factores solubles específicos para analizar su efecto sobre la diferenciación de las células ES a células acinares pancreáticas.**

La mayoría de estos resultados se presentan en el artículo *“Transforming growth factor (TGF) $\beta$ , fibroblast growth factor (FGF) and retinoid signalling pathways promote pancreatic exocrine gene expression in mouse embryonic stem cells”* adjunto a continuación.

A modo de resumen, demostramos según el análisis por RT-PCR que la represión de la vía de HH con ciclopamina o con Activina A (que tiene efectos redundantes con Activina B) estimulaba la expresión de Pdx-1, insulina y glucagón. Además Activina A inducía también un incremento de la expresión de marcadores

exocrinos como p48 y amilasa. La incubación de las células con *all-trans* RA (1 $\mu$ M) inducía un incremento de la expresión de marcadores exocrinos (elastasa y p48), mientras que la expresión de marcadores endocrinos no se modula (insulina y Pdx-1); y FGF7 inducía un incremento de la expresión tanto de marcadores endocrinos como exocrinos. Los factores solubles BMP4, FGF6 y FGF4 no modulaban la expresión ni de marcadores exocrinos ni endocrinos de manera significativa.

**TGF $\beta$ , FGF and retinoid signalling pathways promote pancreatic exocrine gene expression in mouse embryonic stem cells.**

Anouchka Skoudy<sup>\*,†</sup>, Meritxell Rovira<sup>\*</sup>, Pierre Savatier<sup>‡,§</sup>, Franz Martin<sup>||</sup>, Trinidad León-Quinto<sup>||</sup>, Bernat Soria<sup>||</sup> and Francisco X. Real<sup>\*,†</sup>.

<sup>\*</sup>Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, and <sup>†</sup>Universitat Pompeu Fabra, Dr Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain, <sup>‡</sup>Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, CNRS UM5161, INRA U1237, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46, Allée d' Italie, 69364 Lyon, France, <sup>§</sup>INSERM U371 "Cerveau et Vision", Institut Fédératif des Neurosciences de Lyon, 18 Avenue Doyen Lépine, 69500 Bron, France, and <sup>||</sup> Institute of Bioengineering and Department of Physiology, Miguel Hernández University, Campus de San Juan, 03550 Alicante, Spain.

**Corresponding authors:** Anouchka Skoudy and Francisco X. Real; e-mail [askoudy@imim.es](mailto:askoudy@imim.es); [preal@imim.es](mailto:preal@imim.es); address: IMIM, C/ Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona (Spain); phone: +34 93 2211009; fax: +34 93 2213237.

**Short title:** ES differentiation into exocrine pancreatic cells.

[Nota: publicado como:

Skoudy A, Rovira M, Savatier P, Martin F, Leon-Quinto T, Soria B, Real FX. [Transforming growth factor \(TGF\)beta, fibroblast growth factor \(FGF\) and retinoid signalling pathways promote pancreatic exocrine gene expression in mouse embryonic stem cells.](#)

**Biochemical Journal.** 2004 May 1;379(Pt 3):749-56.

<http://www.biochemj.org/bj/379/0749/bj3790749.htm>

**The final version of record is available at [www.biochemj.org](http://www.biochemj.org)**

## Synopsis

Extracellular signalling cues play a major role in the activation of differentiation programmes. Mouse embryonic stem (ES) cells are pluripotent and can differentiate into a wide variety of specialised cells. Recently, protocols designed to induce endocrine pancreatic differentiation *in vitro* have been designed but little information is currently available concerning the potential of ES cells to differentiate into acinar pancreatic cells. By using conditioned media of cultured foetal pancreatic rudiments, we demonstrate that ES cells can respond *in vitro* to signalling pathways involved in exocrine development and differentiation. In particular, modulation of the hedgehog, TGF $\beta$ , retinoid and FGF pathways in ES cell-derived embryoid bodies (EB) resulted in increased levels of transcripts encoding pancreatic transcription factors and cytodifferentiation markers, as demonstrated by RT-PCR. In EB undergoing spontaneous differentiation, expression of the majority of the acinar genes (i.e. amylase, carboxypeptidase A and elastase) was induced after the expression of endocrine genes, as occurs *in vivo* during development. These data indicate that ES cells can undergo exocrine pancreatic differentiation with a kinetic pattern of expression reminiscent of pancreas development *in vivo* and that ES cells can be coaxed to express an acinar phenotype by activation of signalling pathways known to play a role in pancreatic development and differentiation.

**Key words:** Embryonic stem cells/ acinar pancreas/ differentiation pathways/ transcription factors/ endocrine.

**Abbreviations used:** EB, embryoid body; ES, embryonic stem; FBS, fetal-bovine serum; FGF, fibroblast growth factor; HH, hedgehog; LIF, leukaemia inhibitory factor; RA, retinoic acid; TGF, transforming growth factor.

## Introduction

Mouse embryonic stem (ES) cells can be propagated indefinitely in the undifferentiated state when cultured in the presence of leukaemia inhibitory factor (LIF) and, upon aggregation, they retain the ability to differentiate into all cell types of ectodermal, mesodermal and endodermal lineages. Clustering of cells leads to the formation of three-dimensional structures, called embryoid bodies (EB), from which cells differentiate in a process that mimics gastrulation and early organogenesis [reviewed in 1-4]. The molecular mechanisms promoting the commitment of stem cells into a specific lineage remain largely unknown. Recently, ES cells adopting an endocrine pancreatic phenotype have been described on the basis of their functional properties [5-8]. However, many important questions remain to be answered including the detailed time-course of pancreatic marker expression during spontaneous differentiation, the precise proportion of ES cells undergoing pancreatic differentiation - a recent re-examination of published data led to the conclusion that as few as  $1/10^5$  cells are insulin-producing  $\beta$ -cells [9] - and the degree of functional maturity achieved. In any case, using currently available strategies, the ability of ES cells to differentiate along the various pancreatic lineages is dramatically low. Indeed, their potentiality to differentiate into exocrine cells has only been reported on the basis of amylase and carboxypeptidase transcript expression [10-11], suggesting that a very small number of cells is competent to adopt an acinar fate. This could result from two main limitations. The first one may rely on the appearance of a relatively small fraction of cells within the nascent embryoid bodies spontaneously adopting an endodermal fate, compared to much higher proportions of cells adopting neuroectodermal or mesodermal fates [2-3]. Secondly, it is well known that the specification of pancreatic endoderm *in vivo*, takes place in only a sub-set of gut endoderm cells which both receive an inductive signal from the notochord and aorta, and escape from an inhibitory signal originating from the cardiac mesoderm [reviewed in 12-14]. The occurrence of these processes within the developing embryoid bodies remains largely uncontrolled.

Advances in the knowledge of the factors involved in pancreatic development and differentiation are thought to be essential to develop strategies to activate the pancreatic differentiation program from ES cells [15]. Both endocrine and exocrine pancreas originate from a domain of the foregut endoderm [16, 17] which expresses at early developmental stages the transcription factor Pdx-1. In the mouse, targeted inactivation of this gene leads to an apancreatic phenotype [18, 19], demonstrating its major role in both exocrine and endocrine pancreatic development. Moreover, overexpression of a modified Pdx-1 carrying the VP16 activation domain in other endodermal territories, such as the liver, leads to ectopic pancreas formation [20]. Soluble factors such as activin  $\beta$ B and fibroblast growth factor-2 (FGF2), secreted by the chick notochord, repress expression of Sonic hedgehog (Shh) and Indian hedgehog (Ihh) - a prerequisite to pancreatic lineage specification - and trigger the

emergence of pancreatic precursors expressing Pdx-1 [21]. Most evidences suggest that the endocrine phenotype is activated by default in pancreatic precursors, whereas exocrine differentiation requires the participation of extracellular matrix and mesenchymal cells [reviewed in 12, 15, 22]. Indeed, there is strong evidence that signalling induced by soluble factors is of crucial importance for cell differentiation during pancreatic development. We have, therefore, analyzed whether growth factors and compounds that can affect biochemical routes important for pancreatic development can also impact on the differentiation of ES cells towards the pancreatic lineage, and more specifically into acinar cells. We show that signalling pathways involved in early pancreas development also regulate exocrine pancreatic gene expression in differentiating ES cells and that the observed temporal patterns of pancreatic gene expression are reminiscent of *in vivo* development. Therefore, these data may be useful for the development of new strategies directing ES cell differentiation towards the pancreatic exocrine lineage *in vitro*.

## Materials and methods

Cell culture and reagents. Undifferentiated ES cells (ENS cell line, [23]) were cultured at 37°C in a 7.5 % CO<sub>2</sub> atmosphere on mitomycin-treated mouse embryonic fibroblasts in Glasgow's Modified Eagle's Medium (GMEM, Gibco) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 0.1 mM β-mercaptoethanol, 1 mM sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids (Gibco), 2 mM glutamine, 1% penicillin-streptomycin, and 1000 U/ml LIF. CGR8, a feeder-independent ES cell line, was also used [24]. AR42J (rat) and 266-5 (mouse) cells display some exocrine-like features and were cultured in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% FBS, glutamine, sodium pyruvate, non-essential amino acids, and penicillin-streptomycin.

Recombinant human activin A was obtained through the National Hormone & Pituitary Program, (NIDDK and A. F. Parlow). Cyclopamine was a kind gift from W. Gaffield (U.S. Department of Agriculture, Albany, CA). All-trans retinoic acid and FGF7 were obtained from Sigma and R&D Systems, respectively.

The following rabbit antisera were used: anti-rat p48 cross-reactive with human p48 [25], anti-amylase (Sigma); anti-frog Pdx-1 cross-reactive with mouse Pdx-1 (kindly provided by C. Wright, Nashville, TN). Peroxidase, biotin or EnVision-labeled goat anti-rabbit Ig (Dako) were used as secondary antibodies.

In vitro differentiation of ES cells. ES cells were grown in suspension ( $5 \times 10^3$  cells/ml) in non-adherent Petri dishes to allow formation of embryoid bodies (EB). FBS concentration was reduced to 3% and LIF was withdrawn as indicated. In some experiments, EB formation was initiated in hanging drops ( $10^3$  cells in 25 μl). After 2 days, EB were

pooled and cultured for 2 to 5 days in Petri dishes. Then, EB were allowed to adhere to gelatin-coated cell culture dishes and further grown in ES cell medium supplemented with the indicated factors.

Generation of foetal pancreatic culture supernatants. Foetal pancreas was dissected from mouse embryos of various developmental stages. The pancreatic rudiments (n=8) were cultured in 5 ml of ES cell medium supplemented with 3% FBS for 7 days. Conditioned medium was then collected, filtered, and stored at -80°C. A pool of supernatants was used for each experiment after dilution (1:1) in ES cell medium.

Immunocytochemistry. Sections of frozen EB pools were fixed in 2-4% paraformaldehyde for 10 min and washed with PBS. For immunocytochemistry, sections were incubated for 10 min in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and levamisole (Sigma) to block endogenous peroxidase and alkaline phosphatase (AP) activities, followed by several washes in PBS. To improve the detection of nuclear antigens, sections were treated with 1% SDS in PBS for 5 min, washed in PBS, and incubated in the blocking solution of the Tyramide-Signal Amplification kit (NEN<sup>TM</sup>, Boston, MA). Primary antibodies were added for 16 h at 4 °C. After washing in PBS, sections were incubated with peroxidase-coupled anti-Ig for 1 h, then with biotin-tyramide for 5 min, as indicated by the manufacturer. Sections were extensively washed with 20% DMSO, incubated with phosphatase-conjugated streptavidin (2µg/ml) (Pierce, Rockford, IL) for 25 min, and further washed in PBS. Reactions were developed using Fast red as a chromogen. Alternatively, an EnVision based amplification method (Dako) was used and reactions were developed with DAB.

RT-PCR analysis. RNA was isolated from EB cells as described by Chomczynski and Sacchi [26] then treated with Dnase I to eliminate any contaminating DNA. From 0.5 to 1 µg of total RNA was reversed-transcribed and cDNAs were amplified using the Superscript one step RT-PCR kit (Gibco). Reactions (25 µl) containing mRNA-specific primers (50 pmoles each) were incubated at optimal annealing temperatures (as described below) and subjected to 35-40 cycles of amplification, except for β-actin cDNA which was amplified for 20 cycles. The PCR products were separated using 2% agarose gels and stained with ethidium bromide. Their identity was confirmed by restriction endonuclease mapping. RNA from mouse pancreas or from the mouse pancreatic cell line βTC3 were used as positive controls; PCR products generated in the absence of RNA template were used as negative control. The oligonucleotide pairs used for PCR and the size of the amplified products were as follows: Pax4 (60 °C) CAGCAGGACGGACTCAGCAG (S) and CAGGAAGGAGGGATTGGCAGT (AS) (870 bp); carboxypeptidase A (58 °C) GAAATCGCAGGCAGGCACAG (S) and TGGTGGTTAGGAGGCAGTTTG (AS) (653 bp); Pax6 (55 °C)

AGAAGATCGTAGAGCTAGCT (S) and TACTGGGCTATTTTGCTTACA (AS) (231 bp); pancreatic polypeptide (PP) (55 °C) CTGCCTCTCCCTGTTTCTCGT (S) and GGCCTGGTCAGTGTGTTGATG (AS) (179 bp); Nkx6.1 (55 °C) TCTTCTGGCCNGGGGTGATG (S) and CCTGCTTCTTCTTGCCGGTG (AS) (311 bp). Mist-1 (55°C) CTAAAGCTACGTGTCCTTG (S) and AGAAGAGCAGGCAGGC (AS) (760 pb). Other primers were as described: glucagon and insulin [27]; amylase, elastase, chymotrypsinogen, Pdx-1, and p48 [28]; HNF3 $\beta$  (specific for the endodermal isoform) and  $\beta$ -actin [29] and ngn3 [30]. All experiments were carried out in duplicate and the reproducibility of the observations was confirmed in two to three independent experiments. RNA expression was estimated based on the intensity of the bands of the PCR products as compared to the intensity of the band corresponding to  $\beta$ -actin. Semi-quantitative analysis of PCR products was performed using an Alpha Imager™ 2000 instrument (Alpha Innotech, San Leandro, CA) and the alpha ease™ analysis program (Alpha Innotech). Products obtained from mRNA were analyzed by densitometry and the ratios of pancreatic markers to  $\beta$ -actin were calculated.

## Results

Expression of an exocrine pancreatic phenotype in ES cells differentiated *in vitro*. EB were cultured in suspension for 4 to 21 days, and the expression of endocrine and exocrine differentiation markers was examined by semi-quantitative RT-PCR. Results from a representative experiment are shown in Fig.1. Low levels of glucagon and insulin mRNAs are detected as early as day 4. Higher levels are detected at day 11 and they increase markedly at day 21. PP transcripts are consistently detected in undifferentiated ES cells and in EB. In contrast, none of the exocrine differentiation markers studied (carboxypeptidase A, elastase and amylase) are detected at day 4. These mRNAs are first detected at day 11 and their levels remain constant at day 21. An exception was observed for transcripts encoding chymotrypsinogen that were occasionally barely detected at day 4. These results show that, both endocrine and exocrine markers are detected during ES cell differentiation. In addition, the expression of the majority of the exocrine differentiation markers appears to be activated later than that of endocrine markers.

### Expression of mRNA encoding transcription factors involved in pancreatic differentiation.

Expression kinetics of a panel of exocrine and endocrine transcription factors was analyzed. Several transcription factors expressed during pancreatic differentiation are known to play a dual role, first during early development and later, during the specification of pancreatic lineages and terminal differentiation. For instance, Pdx-1 is expressed in endocrine and exocrine progenitors [31]. Subsequently, Pdx-1 is involved in the activation of endocrine and

exocrine genes [32]. Similarly, p48 is required at early stages of development, as p48<sup>-/-</sup> mice lack a pancreas, and it is also required for the activation of the expression of acinar genes [28, 32, 33]. During EB formation, both Pdx-1 and p48 mRNAs are detected as early as day 4 (Fig. 2A, B). As shown in Fig 1, transcripts coding for acinar enzymes are not detected at this early stage suggesting that the p48 and Pdx-1 transcripts detected at day 4 reflect mostly, if not exclusively, progenitor cells. Both p48 and Pdx-1 mRNA levels increase at day 21 in parallel with acinar gene mRNAs. A similar kinetics of expression was observed for HNF3 $\beta$ , a transcription factor involved both in acinar and endocrine gene expression. In contrast, mRNA for Mist-1, a protein involved in the maintenance of acinar cell organization and identity [34], is first expressed at day 11, in parallel with transcripts coding for acinar enzymes, possibly reflecting the emergence of terminally differentiated acinar cells.

Ngn3, a bHLH factor, is critical for the development of all endocrine cells. It is expressed in endocrine progenitors and it is turned off during terminal differentiation [31, 35]. Pax4 is likely to be involved in the specification of the  $\beta$ - cell lineage. Its expression is also down-regulated during terminal differentiation [36]. Interestingly, in the developing EB, both ngn3 and Pax4 are strongly expressed at 4 days of differentiation and their levels decrease at the later time points, in accordance with the *in vivo* expression kinetics. In contrast, Nkx6.1 mRNA, whose expression is dependent on Pdx-1 expression in early differentiating  $\beta$ -cells [37] and Pax6, which is expressed in all endocrine cells throughout early pancreatic development [15, 37], are also detected at day 4 but their levels are up-regulated at later time points.

We next examined the expression of p48 and Pdx-1, two factors involved in the expression of acinar genes, and amylase in 21 day EB by immunocytochemistry (Fig. 2C). A very low proportion of cells express either proteins. p48 and Pdx-1 are mainly found in the nucleus. Cells immunoreactive for exocrine pancreatic markers are present as singlets or as doublets, though some clusters of reactive cells are also observed. No labelling is detected in undifferentiated ES cells (data not shown).

A comparison of the expression kinetics of pancreas-specific genes during *in vitro* differentiation of ES cells and during *in vivo* foetal development is given in Table I. It shows that pancreatic markers that are expressed at early stages of pancreatic development *in vivo* (E8.5-9.5) are already expressed in early differentiating EB (EB4) whereas pancreatic markers whose expression is switched on later (E10.5) are first detected at day 11 in EB, indicating a close temporal pattern of pancreatic gene expression between the two developmental models.

Activation of exocrine differentiation by co-culture with conditioned medium from pancreatic rudiments. The low proportion of ES cells which spontaneously adopt an endodermal phenotype during EB formation prompted us to assess the ability of ES cells, or their early

differentiated derivatives, to respond to signals involved in pancreatic development. A schematic representation of the general experimental protocol used for ES cell differentiation is shown in Fig. 3. Conditioned media were prepared by culturing pancreatic rudiments from E13.5, E15.5 and E16.5 mouse fetuses, in medium containing 3% FBS. These conditioned media were then applied to differentiating EB for 7 days and EB were further grown for one week in normal medium. A significant increase in the levels of Pdx-1 (2.5-fold) and amylase (4-fold) transcripts is consistently observed (Fig. 4A). Conditioned media prepared from E13.5, E15.5 and E16.5 fetuses appear equally efficient at promoting expression of the two markers. The effect of conditioned medium prepared from E15.5 rudiments on the expression of pancreatic markers is confirmed by an immunohistochemical analysis which shows a marked increase in the number of cell foci immunoreactive for Pdx-1 and amylase (Fig. 4B).

Activation of exocrine differentiation by alteration of specific signaling pathways. The next step was to investigate which signals could up-regulate exocrine pancreatic differentiation in this system.

Inhibition of Shh-dependent signalling in gut endoderm cells has been shown to be critical for the specification of the pancreatic epithelium [12, 21]. Therefore, we examined whether inhibition of Shh signalling during EB differentiation could promote pancreatic differentiation. EB were grown in suspension for 4 days, then allowed to attach to the culture dish in the presence of cyclopamine, an inhibitor of HH signalling, for 24 h. In the absence of cyclopamine, transcripts encoding Pdx-1, insulin, and glucagon are barely detectable (Fig. 5A). Cyclopamine induces a moderate increase in glucagon mRNA level whereas it induces a strong increase both in Pdx-1 and in insulin mRNA levels. However, no effect on the level of exocrine markers (p48 and amylase) is observed (data not shown).

Several members of the activin family have been shown to be expressed in developing pancreatic rudiments, where they regulate the early stages of pancreas development [21]. An increasing amount of data also supports a role of activin signaling in both endocrine and exocrine differentiation [38-40]. The effect of activin A on pancreatic gene expression in developing EB was therefore tested. EB were grown in suspension for 4 days, then allowed to attach to the culture dish for 24 h, and further grown in the presence of activin A for 48 h. Activin A up-regulates the expression both of exocrine (p48 and amylase) and of endocrine genes (Pdx-1, insulin, and glucagon). Importantly, maximal effect is observed at physiological concentrations of activin A (1 nM) (Fig. 5B).

Recently, it has been proposed that retinoids play a role in the specification of exocrine phenotypes during pancreatic development [41, 42]. To assess the effect of RA on exocrine differentiation of ES cells, EB were grown in suspension for 7 days in the presence of 1  $\mu$ M RA and then allowed to re-attach and grow in RA-free medium for 7 days. RA up-regulates expression of exocrine-specific (p48 and elastase) genes. In contrast, expression level of

insulin and Pdx-1 mRNA is not affected (Fig. 6A). FGF7 is also emerging as another growth factor that participates in pancreatic development [15]. Incubation of EB with 3 nM FGF7 results in increased levels of transcript pancreatic (Pdx-1) and exocrine differentiation markers (p48, amylase) (Fig. 6B).

## Discussion

Unlike the endocrine lineage, less is known about the genes and signalling pathways which control acinar pancreatic development and differentiation. This results largely from the availability of a very limited number of immortalized cell lines and the lack of relevant primary cell culture models. Hence, acinar cells undergo a ductal differentiation after 2 days in culture [43] which precludes propagation and genetic analyses of the original cell types. ES cells could provide an alternative system to develop cell culture models representing different stages of acinar differentiation. In this study, we show that (i) mouse ES cells can differentiate *in vitro* into cells expressing markers of the exocrine lineage, (ii) the expression kinetics of pancreatic regulatory genes follows a hierarchy that is reminiscent of pancreas development, and (iii) signalling pathways that have been shown to be important for pancreatic development can be exploited to bias ES cell differentiation towards the exocrine lineage *in vitro*.

Mouse ES cells differentiate into cells expressing markers of the exocrine lineage. Our data indicate that ES cells can adopt a pancreatic acinar phenotype when spontaneously induced to differentiate, although they do so with a very low efficiency, as previously reported for cells expressing markers of the  $\beta$ -cell lineage [9]. Interestingly, the differentiated cells expressing exocrine markers often appear as small clusters within developing EB, similarly to what has been described for insulin producing cells [44], suggesting that local signals produced within the EB are able to promote the exocrine differentiation program. It also suggests that cell density during EB aggregation may be crucial to elicit this process as other groups have barely detected an exocrine phenotype when cells were induced to differentiate at higher densities [45]. Alternatively, it could reflect the variability in the ability of ES cell lines to differentiate into the exocrine lineage under similar culture conditions.

The expression kinetics of pancreatic regulatory genes follows a hierarchy that is reminiscent of pancreas development. Pdx-1, Nkx6.1, and Pax4 are expressed concomitantly with the appearance of insulin and glucagon-positive cells during early development of the pancreas, whereas *ngn3* is transiently expressed before endocrine differentiation [15, 22, 37]. It is therefore tempting to speculate that transient expression of *ngn3* in the developing EB reflects the emergence of endocrine progenitors which later differentiate into more mature endocrine cell types. Taken together, these data suggest that the ES-derived pancreatic cells differentiate beyond the primary transition state as defined by Pictet and Rutter [46], which corresponds to

a phase during which a wave of proto-differentiated insulin cells develops. This stage is molecularly characterized by the expression of Pdx-1 and ngn3 whereas progression to the second transition is accompanied by the expression of Pax 6, Pax4, Nkx6.1 and Nkx2.2 [14], most of which are found to be spontaneously expressed in our cultures.

Another important result which emerges from our kinetic analysis is that exocrine differentiation is detected after the activation of endocrine markers in the developing EB. This, again, reflects the situation observed during development in which the emergence of endocrine markers precedes that of exocrine markers [47]. In addition, p48 *in vitro* is detected prior to acinar genes in developing EB, a finding that goes along with the fact that p48 is required during early steps of pancreatic endoderm differentiation [33]. In contrast, Mist-1 expression is only detected in late differentiating EB, concomitantly with amylase and carboxypeptidase, reflecting the involvement of Mist-1 in the terminal differentiation of acinar cells [34].

Taken together, these data support the notion that the major molecular pathways which are known to control differentiation of the pancreatic exocrine lineage in the developing mouse foetus may also be operative during the *in vitro* differentiation of mouse ES cells.

Therefore, ES cells are a good model to analyze the biological role of pancreatic regulatory genes at very early stages. This may help in the understanding and identification of new genes involved in the pancreatic acinar lineage commitment.

Signalling pathways that have been shown to be critical for pancreatic development *in vivo* can be used to bias ES cell differentiation towards the exocrine lineage *in vitro*. We hypothesized that the signals governing pancreatic development which spontaneously are induced within EB could be modulated by extrinsic factors to bias ES cell differentiation towards the exocrine lineage. Our data show that pancreatic rudiments release growth factors which promote the expression of Pdx-1 and amylase in differentiating EB. This increase in transcript levels is accompanied by an increase in the proportion of Pdx-1- and amylase-expressing cells, suggesting that conditioned media act by increasing the fraction of gut endoderm cells which commit to pancreatic fate, by promoting the growth of committed cells, or through both mechanisms.

Concerning the possible signalling routes involved in this effect, we have postulated that HH molecules in the developing EB [48] could repress pancreatic differentiation. We therefore used cyclopamine to inhibit HH signalling in differentiating cells. Cyclopamine, known to promote  $\beta$ -cell development and to induce pancreatic heterotopia in the chicks [49], induces an increase in the levels of Pdx-1, insulin, and glucagon transcripts in EB. However, cyclopamine does not seem to have any effect on the level of exocrine transcripts. This is

unexpected since inhibition of HH signalling in the pancreatic endoderm takes place prior to the endocrine/exocrine specification. However, as pancreatic development proceeds, HH signalling becomes necessary to regulate an appropriate pancreas size [50]. Moreover, the study of mice that loss Hhip and patched 1 (Ptc), two HH inhibitors, has revealed the requirement of a tight regulation of this pathway to elicit a correct pancreas morphogenesis, islet formation and endocrine proliferation [51]. In contrast, acinar differentiation remains unperturbed in these mutant embryos [51]. Therefore, it is possible that in our system, the inhibition of HH signalling with cyclopamine reflects this scenario.

Repression of Shh expression in the prospective pancreatic epithelium is mediated by FGF2 and activin B [21]. Our data show that physiological concentrations of activin A – which exerts effects redundant of those of activin B - stimulate Pdx-1, insulin, and glucagon expression similarly to cyclopamine. In addition, it activates exocrine gene expression in the developing EB. This activation could result from an indirect effect of the activin A promoting the differentiation of mesenchymal cells [52]. Activin A is well known as a potent inducer of mesoderm development and the mesenchyme is known to promote exocrine differentiation. This hypothesis is further supported by the observation that activin A induces a dramatic increase in transcripts encoding follistatin in EB [52]. In turn, follistatin is a potent inducer of exocrine differentiation of pancreatic precursors [53].

We have also investigated the role of retinoid signalling in pancreatic differentiation of ES cells. RA has been proposed to act as a posteriorising agent in embryonic endoderm in zebrafish [reviewed in 13]. In the chick, RA is sufficient to induce Pdx-1 expression in endoderm anterior to the pancreas [54]. A later role for RA has also been suggested based on *in vitro* experiments. Early embryonic pancreas cultured for 7 days with exogenous RA results in a predominant induction of acini formation with no obvious effect on the endocrine compartment [41]. In our system, incubation of the developing EB cells with all-trans RA leads to a specific increase in the level of exocrine gene expression whereas expression of endocrine markers remains unchanged, suggesting that in these conditions, RA is acting on EB cells already committed to the pancreatic fate. Unlike RA, FGF7 up-regulates expression of both acinar and endocrine genes in the developing EB, which may indicate that pancreatic progenitors are expanded. FGF7 has been shown to increase proliferation of isolated pancreas epithelium and to mimic the effects of the mesenchyme on acinar differentiation [55]. In addition, it has recently been demonstrated that after removal of FGF7 *in vitro*, most of the expanded progenitor cells differentiate into endocrine cells [56]. A combination of these processes could explain the increase of the expression of both amylase and insulin in our system.

A combination of strategies is needed to generate acinar cells from ES cells. We show that signalling pathways that regulate pancreatic development *in vivo* can be used to drive

pancreatic differentiation in ES cells. However, in these experiments, where single differentiating agents were used, the variations observed in pancreatic gene expression by RT-PCR were not accompanied by a significant increase in the proportion of pancreatic cells detected by immunostaining. This probably reflects the need to operate in more than one signalling pathway to achieve a significant increase in the efficiency of the cell culture methods, as it occurs when foetal pancreatic conditioned media are used (Fig. 4). But even when the hypothetical best combinations of pancreatic soluble factors are used, the number of pancreatic acinar cells is far to be good enough, which indicates that for detecting a very significant statistical number of cells, the efficiency should be increased by a factor of  $10^3$ - $10^4$ . It seems unlikely that with a single strategy of differentiation this could be satisfactorily achieved. Indeed, the ability of ES cells to differentiate into the endocrine lineage has been shown to be very limited, independently of the biotechnology used [8-9, 11, 45]. It is reasonable to conceive that the integration of different strategies in a single protocol may result in future in a better optimization of the culture methodologies. For instance, the knowledge obtained from our data may be useful to optimize the strategies based on pancreatic acinar cell specific genetic selection. Identification of molecules and their optimal combination that selectively engage an acinar cell specification program is underway.

## **Acknowledgements**

We thank the investigators mentioned in the text for providing reagents and Yolanda Tor, for technical assistance. A.S. was supported by CIRIT, Generalitat de Catalunya, and Instituto de Salud Carlos III. M.R. was recipient of a Graduate Fellowship from Ministerio de Ciencia y Tecnología. This work was supported by grants from Ministerio de Educación (PM97-0077; PM99-0142), Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2001-0432), CIRIT (2001SGR 00410), La Marató de TV-3, European Foundation for the Study of Diabetes, Cardion AG, AVENIR and Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC).

## References

- 1 Bradley, A. (1990) Embryonic stem cells: proliferation and differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**, 1013-1017
- 2 Fuchs, E., and Segre, J.A. (2000) Stem cells: a new lease on life. *Cell* **100**, 143-155
- 3 Rathjen, R. and Rathjen, P. D. (2001) Mouse ES cells: experimental exploitation of pluripotent differentiation potential. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 587-594
- 4 Eiges, R. and Benvenisty, N. (2002) A molecular view on pluripotent stem cells. *FEBS Lett.* **529**, 135-141
- 5 Soria, B., Roche, E., Berna, G., Leon-Quinto, T., Reig, J.A., and Martin, F. (2000) Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* **49**, 157-162
- 6 Soria, B., Skoudy, A. and Martin, F. (2001) From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia* **44**, 407-415
- 7 Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R. and McKay, R. (2001) Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* **292**, 1389-1394
- 8 Blyszczuk, P., Czyz, J., Kania, G., Wagner, M., Roll, U., St-Onge, L. and Wobus, A.M. (2003) Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 998-1003
- 9 Rajagopal, J., Anderson, W.J., Kume, S., Martinez, O.I. and Melton, D.A. (2003) Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science* **299**, 363

- 10 Hori, Y., Rulifson, I.C., Tsai, B.C., Heit, J.J., Cahoy, J.D. and Kim, S.K. (2002) Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 16105-16110
- 11 Moritoh, Y., Yamato, E., Yasui, Y., Miyazaki, S. and Miyazaki, J.I. (2003) Analysis of insulin-producing cells during in vitro differentiation from feeder-free embryonic stem cells. *Diabetes* **52**, 1163-1168
- 12 Kim, S.K., and Henrok, M. (2001) Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev.* **15**, 111-127
- 13 Kumar, M. and Melton, D. (2003) Pancreas specification: a budding question. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 401-407
- 14 Kim, S. K. and MacDonald, R. J. (2002) Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 540-547
- 15 Edlund, H. (2002) Pancreatic organogenesis - developmental mechanisms and implications for therapy. *Nature Rev.* **3**, 524-532
- 16 Slack, J.M.W. (1995) Developmental biology of the pancreas. *Development* **121**, 1569-1580
- 17 Percival, A.C., and Slack, J.M. (1999) Analysis of pancreatic development using a cell lineage label. *Exp. Cell Res.* **247**, 123-132
- 18 Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., and Edlund, H. (1994) Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* **371**, 606-609
- 19 Offield, M.F, Jetton, T.L., Labosky, P.A., Ray, M., Stein, R.W., Magnuson, M.A., Hogan, B.L., and Wright, C.V. (1996) PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* **122**, 983-995

- 20 Horb, M.E., Shen, C.H., Tosh, D. and Slack, N. M. (2003) Experimental conversion of liver to pancreas. *Curr. Biol.* **13**, 105-115
- 21 Hebrok, M., Kim, S.K., and Melton, D.A. (1998) Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev.* **12**,1705-1713
- 22 Johansson, K.A. and Grapin-Botton, A. (2002) Development and diseases of the pancreas. *Clin. Genet.* **62**, 14-23
- 23 Gauthier, K., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J.P., Legrand, C., Pain, B., Rousset, B., Weiss, R., Trouillas, J., and Samarut, J. (1999) Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *EMBO J.* **18**, 623-631
- 24 Smith, A.G. (1991) Culture and differentiation of embryonic stem cells. *J. Tiss. Cult. Meth.* **13**, 89-94
- 25 Adell, T., Gomez-Cuadrado, A., Skoudy, A., Pettengill, O.S, Longnecker, D.S, and Real, F.X. (2000) Role of the basic helix-loop-helix transcription factor p48 in the differentiation phenotype of exocrine pancreas cancer cells. *Cell Growth Differ.* **11**, 137-147
- 26 Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single-step method for RNA isolation using guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**, 156-159
- 27 Mashima, H., Ohnishi, H., Wakabayashi, K., Mine, T., Miyagawa, J., Hanafusa, T., Seno, M., Yamada, H., and Kojima, I. (1996) Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *J. Clin. Invest.* **97**, 1647-1654
- 28 Krapp, A., Knofler, M., Ledermann, B., Burki, K., Berney, C., Zoerkler, N., Hagenbuchle, O., and Wellauer, P.K. (1998) The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev.* **12**, 3752-3763

- 29 Levinson-Dushnik, M. and Benvenisty, N. (1997) Involvement of hepatocyte nuclear factor 3 in endoderm differentiation of embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3817-3822
- 30 Huang, H.P., Liu, M., El-Hodiri, H.M., Chu, K., Jamrich, M., and Tsai, M.J. (2000) Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3292-3330
- 31 Gu, G., Dubauskaite, J. and Melton, D.A. (2002) Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* **129**, 2447-2457
- 32 Rose, S.D., Swift, G.H., Peyton, M. J., Hammer, R. E., and MacDonald, R.J. (2001) The role of PTF1-p48 in pancreatic acinar gene expression. *J. Biol. Chem.* **276**, 44018-44026
- 33 Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M. and MacDonald, R.J. (2002) The role of the transcriptional regulator PTF1-p48 in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat. Genet.* **32**, 128-134
- 34 Pin, C. L., Rukstalis, J.M., Johnson, C. and Konieczny, S. F. (2001) The bHLH transcription factor Mist1 is required to maintain exocrine pancreas cell organization and acinar cell identity. *J. Cell Biol.* **155**, 519-530
- 35 Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., and Guillemot, F. (2000) Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 1607-1611
- 36 Smith, S.B., Ee, H.C., Connors, J.R., and German, M.S. (1999) Paired-homeodomain transcription factor PAX4 acts as a transcriptional repressor in early pancreatic development. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8272-8280
- 37 St-Onge, L., Wehr, R. and Gruss, P. (1999) Pancreas development and diabetes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 295-300

- 38 Yamaoka, T., Idehara, C., Yano, M., Matsushita, T., Yamada, T., Ii, S., Moritani, M., Hata, J., Sugino, H., Noji, S., and Itakura, M. (1998) Hypoplasia of pancreatic islets in transgenic mice expressing activin receptor mutants. *J. Clin. Invest.* **102**, 294-301
- 39 Shiozaki, S., Tajima, T., Zhang, Y.Q., Furukawa, M., Nakazato, Y., and Kojima, I. (1999) Impaired differentiation of endocrine and exocrine cells of the pancreas in transgenic mouse expressing the truncated type II activin receptor. *Biochim. Biophys. Acta* **1450**, 1-11
- 40 Kim, S.K., Hebrok, M., Li, E., Oh, S.P., Schrewe, H., Harmon, E. B., Lee, J. S., and Melton, D.A. (2000) Activin receptor patterning of foregut organogenesis. *Genes Dev.* **14**, 1866-1871
- 41 Kadison, A., Kim, J., Maldonado, T., Crisera, C., Prasadana, K., Manna, P., Preuett, B., Hembree, M., Longaker, M. and Gittes, G. (2001) Retinoid signaling directs secondary lineage selection in pancreatic organogenesis. *J. Pediatr. Surg.* **36**, 1150-1156
- 42 Kobayashi, H., Spilde, T. L., Bhatia, A. M., Buckingham, R. B., Hembree, M.J., Prasadana, K., Preuett, B. L., Imamura, M. and Gittes, G. K. (2002) Retinoid signaling controls mouse pancreatic exocrine lineage selection through epithelial-mesenchymal interactions. *Gastroenterology* **123**, 1331-1340
- 43 Vila, M.R., Lloreta, J., and Real, F.X. (1994) Normal human pancreas cultures display functional ductal characteristics. *Lab. Invest.* **71**, 423-431
- 44 Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, K. L. and Tzukerman, M. (2001) Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* **50**, 1691-1697
- 45 Kahan, B.W., Jacobson, L.M., Hullett, D.A., Ochoada, J.M., Oberley, T.D., Lang, K.M. and Odorico, J.S. (2003) Pancreatic precursors and differentiated islet cell types from murine embryonic stem cells. *Diabetes* **52**, 2016-2024
- 46 Pictet, R., and Rutter, W.J. (1972) Development of the embryonic endocrine pancreas. In "Handbook of Physiology. Volume 1."(D. Steiner and, Ed.) pp 25-66. William, Wildins, Baltimore

- 47 Gittes, G.K., and Rutter, W.J. (1992) Onset of cell-specific gene expression in the developing mouse pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1128-1132
- 48 Maye, P., Becker, S., Kasameyer, E., Byrd, N. and Grabel, L. (2000) Indian hedgehog signaling in extraembryonic endoderm and ectoderm differentiation in ES embryoid bodies. *Mech. Dev.* **94**, 117-132
- 49 Kim, S.K., and Melton, D.A. (1998) Pancreas development is promoted by cyclopamine, a hedgehog signaling inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13036-13041
- 50 Hebrok, M., Kim, S.K., St Jacques, B., McMahon, A.P. and Melton, D.A. (2000) Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development* **127**, 4905-4913
- 51 Kawahira, H., Ma, N.H., Tzanakakis, E.S., McMahon, A.P., Chuang, P.T. and Hebrok, M. (2003) Combined activities of hedgehog signaling inhibitors regulate pancreas development. *Development* **130**, 4871-4879
- 52 Wiles, M.V., and Johansson, B.M. (1999) Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. *Exp. Cell Res.* **247**, 241-248
- 53 Miralles, F., Czernichow, P., and Scharfmann, R. (1998) Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. *Development* **125**, 1017-1024
- 54 Kumar M., Jordan, N., Melton D. and Grapin-Botton, A. (2003) Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate. *Dev. Biol.* **259**, 109-122
- 55 Miralles, F., Czernichow, P., Ozaki, K., Itoh, N. and Scharfmann, R. (1999) Signaling through fibroblast growth factor receptor 2b plays a key role in the development of the exocrine pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**, 6267-6272

56 Elghazi, L., Cras-Meneur, C., Czernichow, P. and Scharfmann, R. Role for FGFR2IIIb-mediated signals in controlling pancreatic endocrine progenitor cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **99**, 3884-3889

Table I. Pancreatic marker expression in EB as compared to expression during mouse development.

Markers	EB (days)			Onset of expression in mouse embryos	Expression in adult pancreas	References
	4	11	21			
Pdx-1	+	+	+	8.5	acinar cells, $\beta$ -cells	14, 15, 22
Ngn3	+	+	+	9	-	14, 15, 22
Nkx6.1	+	+	+	9	$\beta$ -cells	15, 22
Pax-6	+	+	+	9	$\beta$ , $\alpha$ , $\delta$ , PP-cells	15, 22
Insulin	+	+	+	9	$\beta$ -cells	47
Glucagon	+	+	+	9	$\alpha$ -cells	47
PP	+	+	+	10	PP cells	47
Pax 4	+	-	-	10	-	15, 22
p48	+	+	+	9.5	acinar cells	33
Mist-1	-	+	+	10.5	acinar cells	34
Carboxypeptidase A	-	+	+	10.5	acinar cells	47
Elastase	-	+	+	12	acinar cells	47
Amylase	-	+	+	12	acinar cells	47
Chymotrypsinogen	-	+	+	?	acinar cells	

(+) corresponds to positive signals for RT-PCR reactions after 40 cycles whereas (-) corresponds to the absence of signal. Scoring was estimated based on blind assessment of the results of 3 independent experiments performed in duplicate.

## Figure legends

Figure 1. Kinetics of expression of exocrine and endocrine markers in EB. RNA isolated from EB at the indicated times was analysed by RT-PCR using gene-specific primers. Transcripts encoding digestive enzymes (carboxypeptidase, elastase, amylase, chymotrypsinogen) are expressed later than transcripts encoding endocrine hormones (insulin, glucagon, PP). Actin transcript amplification is shown as a control of RNA amount and integrity.

Figure 2. Time-course analysis of expression of genes involved in pancreatic development. Panel A: RNA isolated from undifferentiated ES cells and from EB at the indicated times was analysed by RT-PCR using gene-specific primers. Actin transcript amplification is shown as a control of RNA amount and integrity. Panel B: Histograms represent the relative level of expression of selected pancreatic markers quantified by densitometry. mRNA levels present at d4 were taken as reference and values were normalized to  $\beta$ -actin mRNA levels. Bars indicate the standard deviations of three independent experiments. Panel C: Immunocytochemical analysis of acinar gene expression in EB. Cryosections of pools of EB grown for 21 days were fixed and subjected to immunocytochemistry using antibodies specific for amylase, p48, and Pdx-1 and an enhanced tyramide technique. Insets show that Pdx-1 immunoreactivity is nuclear whereas amylase is found in the cytoplasm. Original magnification x 200.

Figure 3. Schematic representation of the general experimental protocol. Undifferentiated ES cells (1) were grown in suspension after LIF removal and induced to form embryoid bodies (EB) (2) in suspension. In some experiments, EB formation was performed in hanging drops. After culture in non-adhering conditions, EB were pooled and plated in gelatinated cell culture dishes (3), to allow EB-derived cells to grow (4). The symbol ( $\blackleftarrow$ ) indicates at which stage the differentiating agents have been added, depending on the experiment.

Figure 4. Expression of amylase and Pdx-1 in EB incubated with supernatants generated from embryonic pancreatic rudiments. ES cells were cultured in suspension in 3% FBS until day 7 with supernatants generated from pancreatic rudiments. Cells were transferred to culture dishes for 7 additional days in the absence of conditioned media. Panel A: RNA isolated from control or supernatant-treated EB was analyzed by RT-PCR using gene-specific primers. The developmental stage of the embryonic pancreas used for generating the supernatants is indicated. Actin transcript amplification is shown as a control of RNA amount and integrity. Histograms represent the relative level of expression of pancreatic markers quantified by

densitometry. mRNA levels present in control cells were taken as reference and values were normalized to  $\beta$ -actin mRNA levels. Bars indicate the standard deviations of two independent experiments performed in duplicate. Panel B: Immunocytochemical analysis using antibodies specific for amylase and Pdx-1 and an EnVision amplification technique on control cells derived from untreated EB and cells derived from EB incubated with E15.5 pancreatic supernatants. The AR42J and 266-5 pancreatic cells were used as positive controls.

Figure 5. Expression of pancreatic genes in EB incubated with cyclophamide or activin A. ES cells were grown in hanging drops in the absence of LIF, then cultured in suspension until day 4, and transferred to culture dishes. After adhesion, EB were incubated with cyclophamide (Panel A) or activin A (Panel B) for 24 h or 48h, respectively. RNA from control, cyclophamide- or activin A-treated EB was analyzed by RT-PCR using gene-specific primers. Actin transcript amplification is shown as a control of RNA amount and integrity. Histograms represent the relative level of expression of pancreatic markers quantified by densitometry. mRNA levels present in control cells were taken as reference and values were normalized to  $\beta$ -actin mRNA levels. Bars indicate the standard deviations of two independent experiments performed in duplicate.

Figure 6. Expression of pancreatic genes in EB incubated with retinoic acid or FGF7. ES cells were cultured in suspension until day 7 with 1  $\mu$ M RA (Panel A) or 3 nM FGF7 (Panel B) in 3% FBS, and transferred to culture dishes. Cells were then cultured for 7 additional days without treatment. RNA isolated from control, RA-, or FGF7-treated EB was analyzed by RT-PCR using gene-specific primers. Actin transcript amplification is shown as a control of RNA amount and integrity. Histograms represent the relative level of expression of pancreatic markers quantified by densitometry. mRNA levels present in control cells were taken as reference and values were normalized to  $\beta$ -actin mRNA levels. Bars indicate the standard deviations of two independent experiments performed in duplicate.

Figure 1

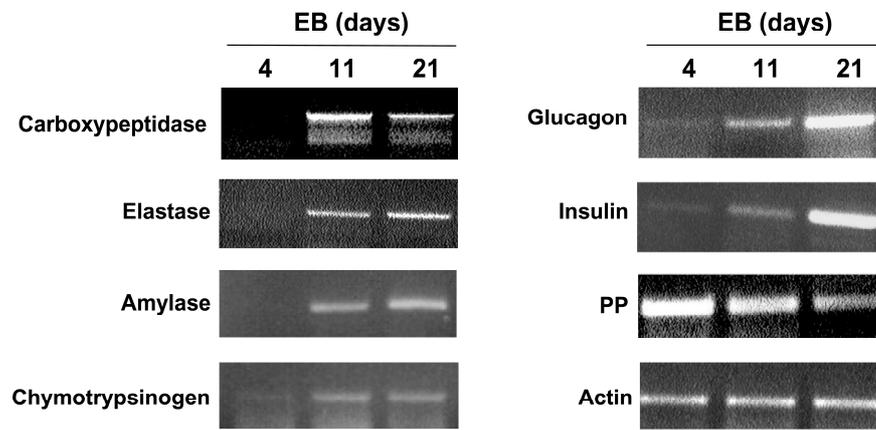


Figure 2

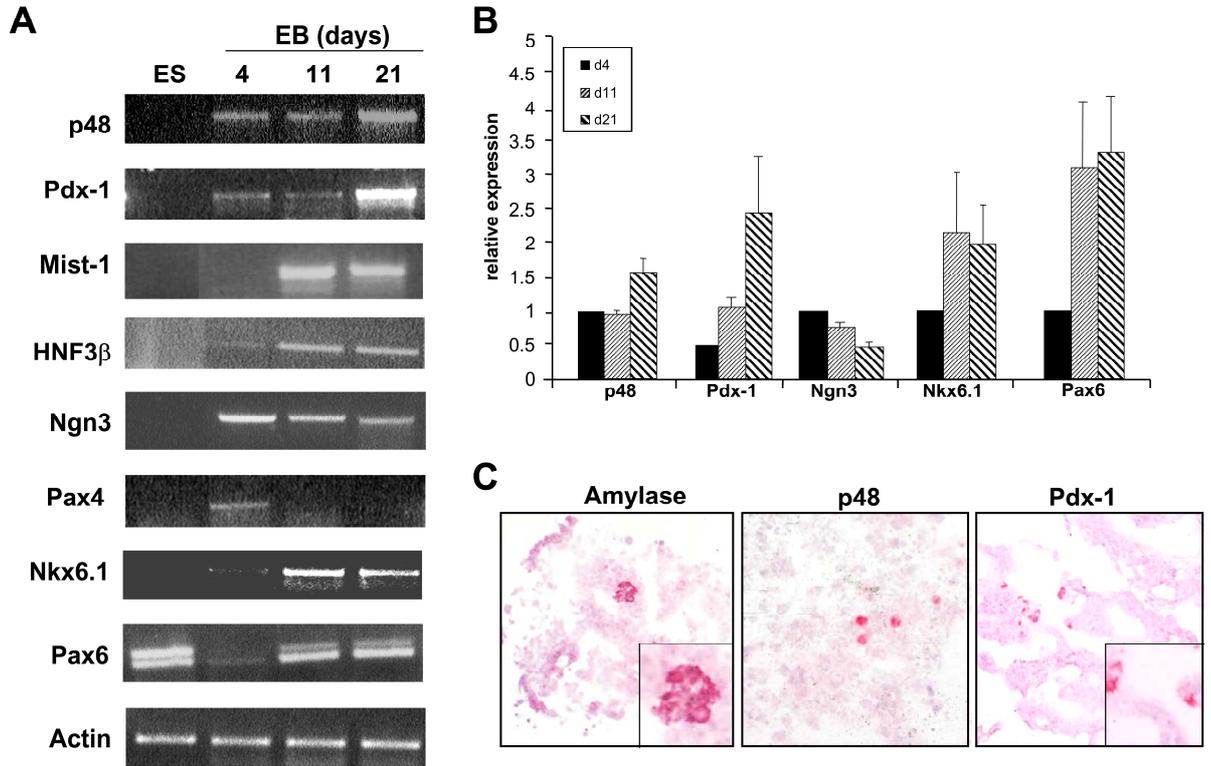


Figure 3

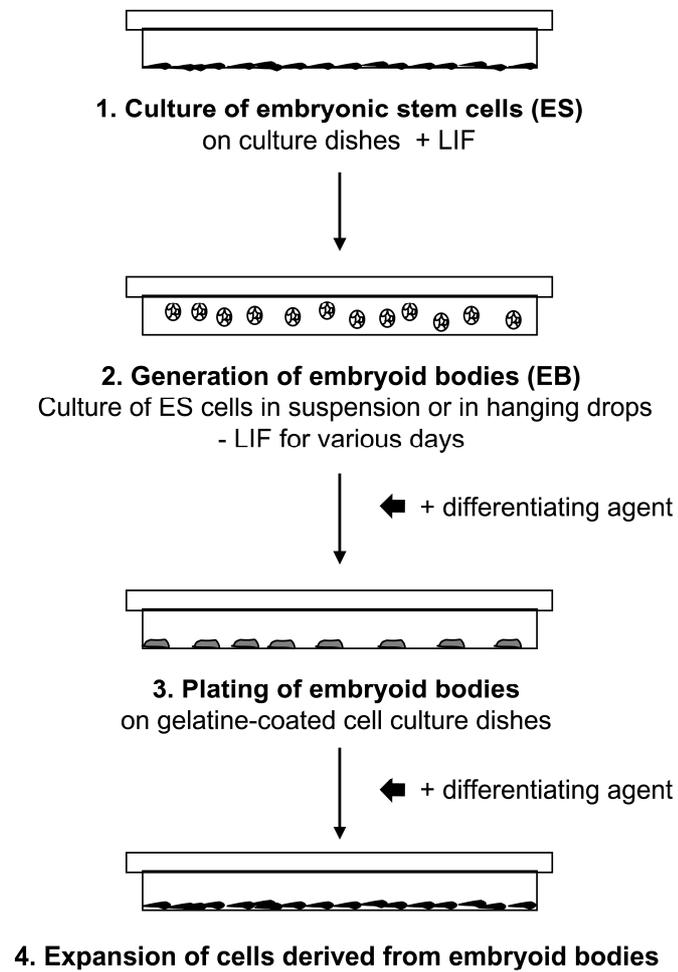


Figure 4

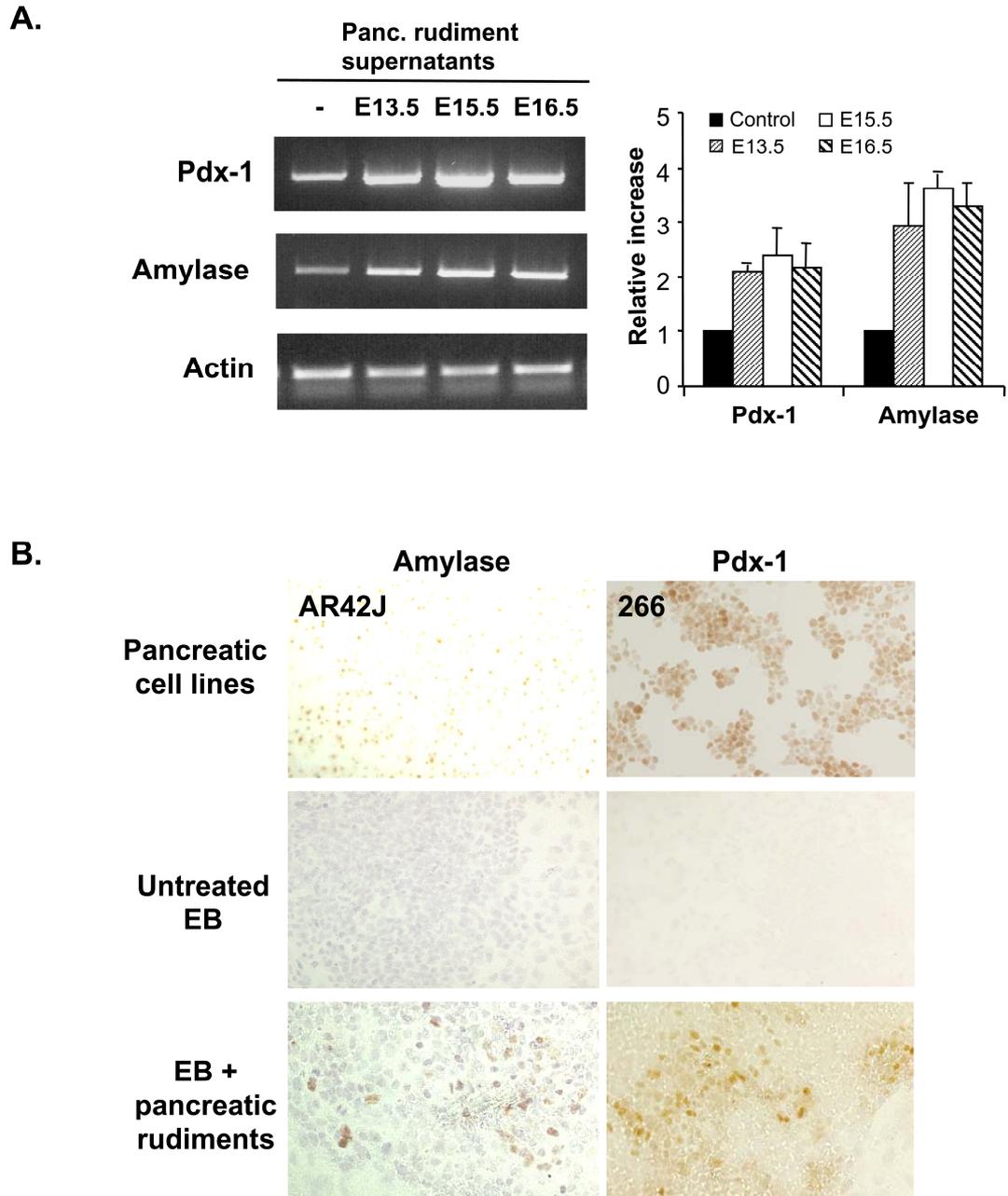
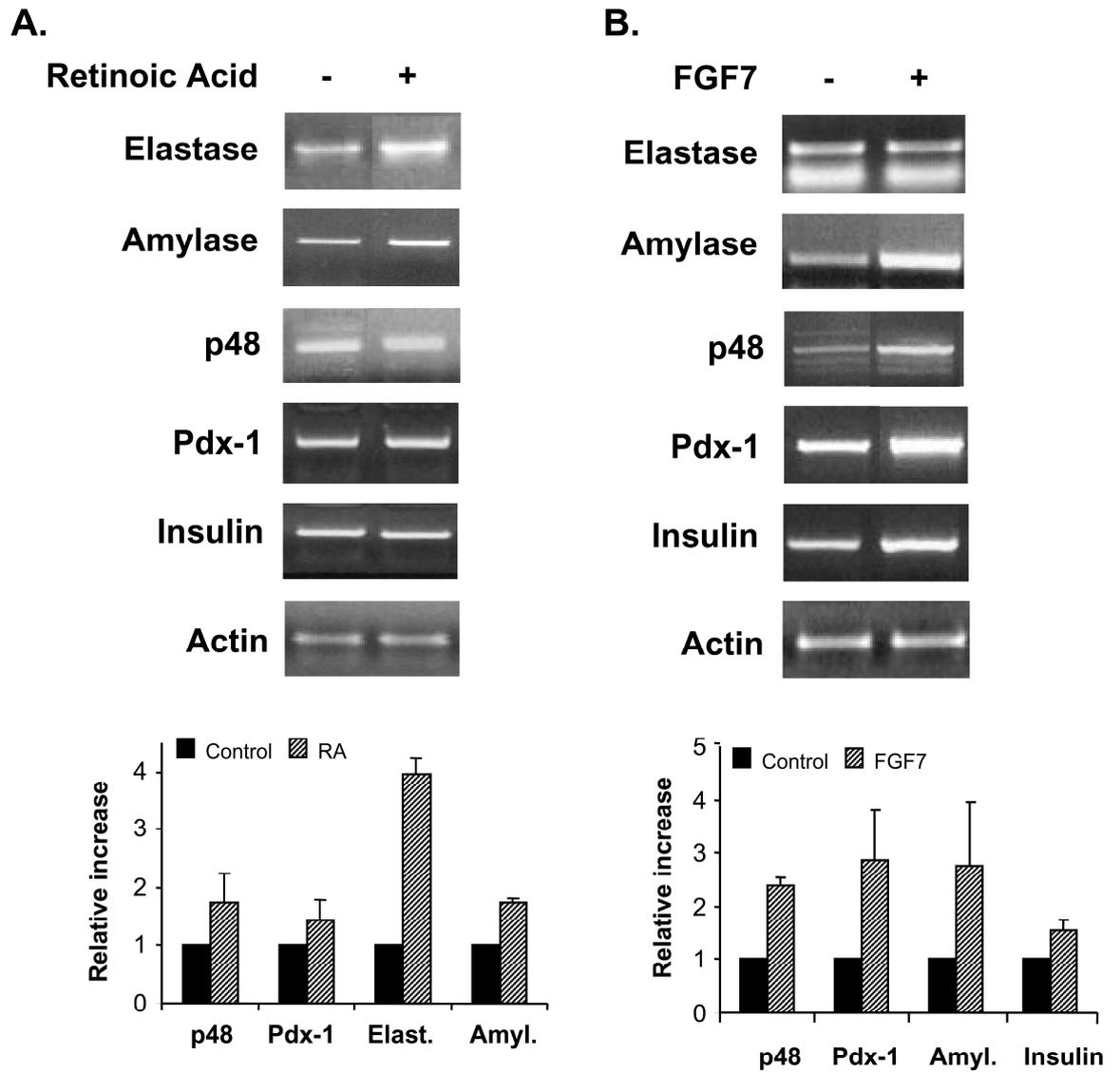




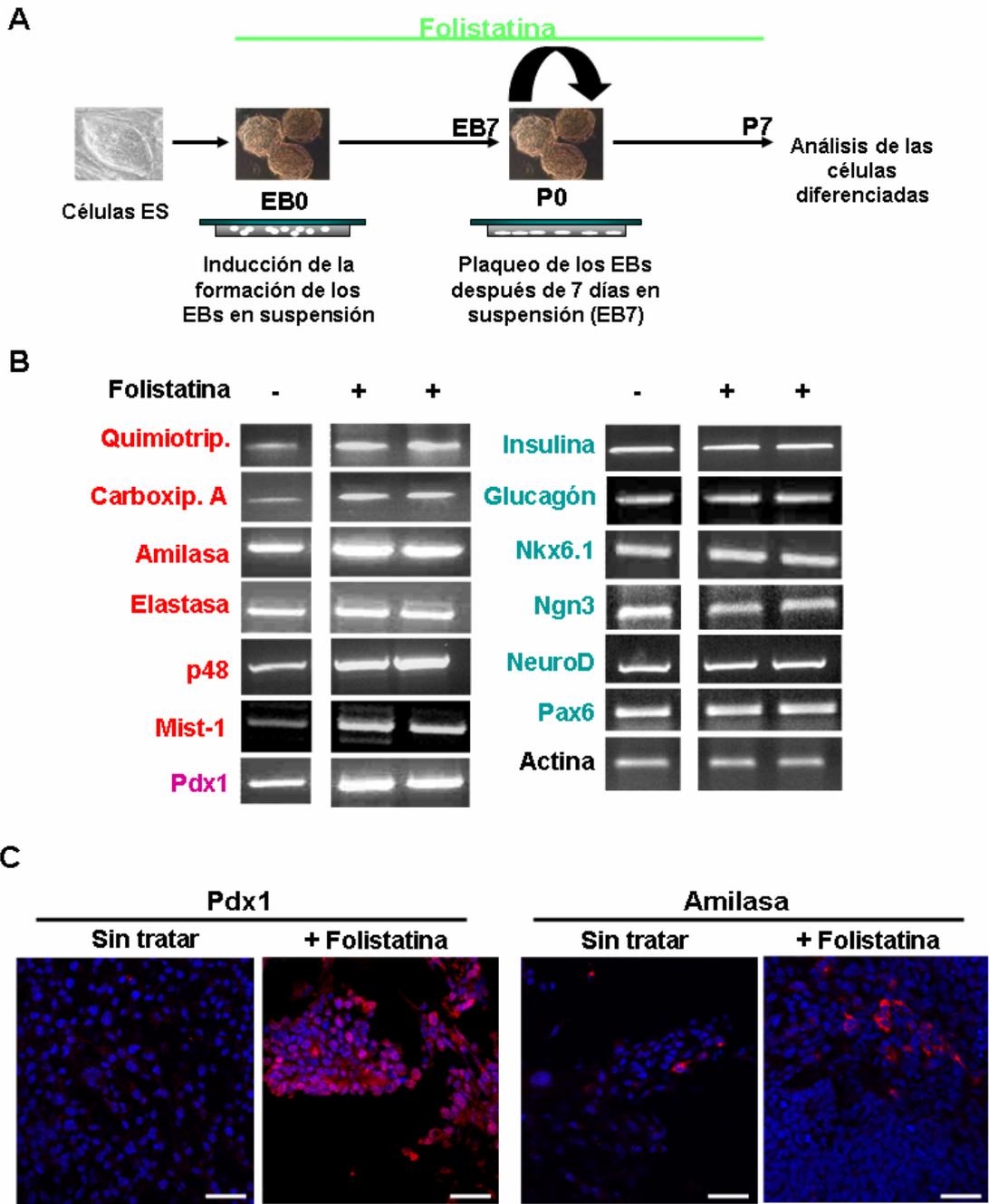
Figure 6



### **1.5. ANÁLISIS DEL EFECTO DE FOLISTATINA EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS ES A CÉLULAS ACINARES**

Nuestro interés se centró en la folistatina, puesto que es de las muy pocas moléculas descritas hasta la fecha que tienen un efecto selectivo sobre la diferenciación acinar. Esta proteína se expresa en el mesénquima pancreático a lo largo del desarrollo embrionario, y mimetiza su efecto induciendo la diferenciación exocrina y reprimiendo la endocrina (194).

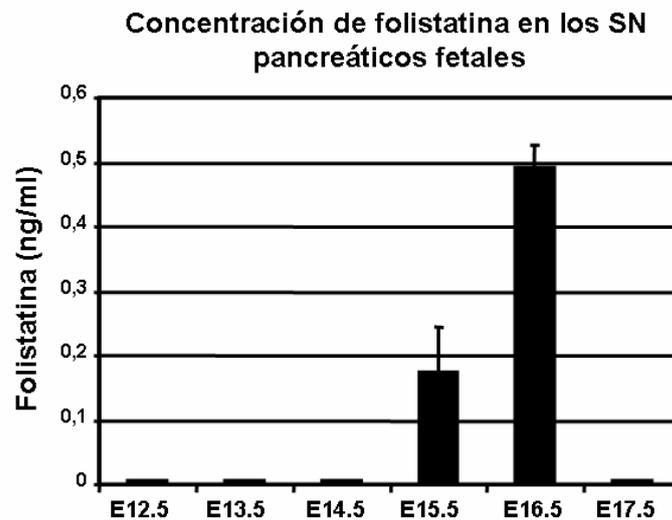
El tratamiento con folistatina (200 nM) de las células ES en diferenciación utilizando el protocolo descrito en la Figura 3.6A inducía un incremento en la expresión de marcadores exocrinos de manera selectiva (quimiotripsinógeno, carboxipeptidasa A, amilasa, p48 y Mist-1) ya que no se regulaba de manera significativa la expresión de marcadores endocrinos (insulina, glucagón, Ngn3, Nkx6.1, NeuroD y Pax6) como demuestran ensayos de RT-PCR semiquantitativa (Figura 3.6B). Mediante inmunofluorescencia, detectamos la presencia de agregados celulares que expresaban amilasa y Pdx1, detectándolos muy raramente en las células sin tratar (Figura 3.6C). Sin embargo, resultó muy difícil aportar datos cuantitativos ya que el número de estos foci era muy bajo. En conclusión, si bien habíamos identificado un factor selectivo para la diferenciación acinar en nuestro sistema, la eficiencia de diferenciación era mucho menor que la obtenida con los SNP tal como se podía preveer puesto que estos contienen múltiples factores solubles.



**Figura 3.6.** A) Protocolo de diferenciación de las células ES incubadas con folistatina (EB7P7). B) Análisis de la expresión de marcadores pancreáticos en las células tratadas con folistatina por RT-PCR semicuantitativa. Expresión de marcadores exocrinos y endocrinos en células sin tratar (-) y tratadas (+) con folistatina.  $\alpha$ -actina es el marcador usado como gen *housekeeping*. C) Inmunofluorescencia con anticuerpos anti-Pdx1 y anti-amilasa de las células tratadas con folistatina. Se observa el marcaje de amilasa y de Pdx1 en rojo y la tinción de núcleos con To-pro3 en azul en imágenes obtenidas por microscopía confocal. Barra = 50  $\mu$ M. Quimiotrip.= quimiotripsinógeno; Carboxip. A = carboxipeptidasa A.

Por este motivo, analizamos la presencia de folistatina en los SNP mediante la técnica de ELISA utilizando un anticuerpo anti-folistatina. Según los resultados de la Figura 3.7 demostrando que los SNP contenían folistatina, cuya concentración era

mayor en los SN del estadio E16.5. Aún así, ésta era mucho más baja (1.5 nM) que la que utilizábamos (200 nM) en los ensayos realizados con la folistatina recombinante comercial. Hipotetizamos que el suplemento del SNP con folistatina a la concentración de 200 nM podría conferirle mayor selectividad respecto a la diferenciación acinar. Sin embargo, nuestros resultados fueron negativos.



**Figura 3.7: Análisis de la concentración distintos estadios embrionarios mediante ELISA.**

Debido a que observamos un incremento de la expresión de marcadores exocrinos con el SNP del estadio de E16.5 y además es el que contenía más folistatina, es el SNP que hemos utilizado para los experimentos siguientes.



INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

**RESULTADOS**

1. Optimización de las condiciones de cultivo
- 2. Sobreexpresión de factores de transcripción**
3. Selección genética

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA



## **2. SOBREEXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN EL DESARROLLO PANCREÁTICO MEDIANTE EL USO DE VECTORES VIRALES**

Las vías de señalización trasladan las señales extracelulares de la superficie celular al núcleo. Una molécula señalizadora que se encuentra en el exterior de la célula interactúa con un receptor ubicado en la superficie extracelular de la membrana celular, seguida por la interacción del receptor con componentes de la vía intracelular, iniciando una cascada de interacciones entre proteínas que expanden la señal en el interior de la célula hacia el núcleo, donde un grupo de proteínas, llamado factores de transcripción, juega un rol crucial en la activación de la expresión genética. Por ello, después de haber investigado qué vías de señalización específicas implicadas en el desarrollo pancreático podrían regular la diferenciación de las células ES al linaje exocrino, abordamos la sobreexpresión de factores transcripcionales claves para la diferenciación pancreática, con el interés de reproducir un programa de diferenciación acinar.

Distintos grupos ya habían trabajado en la sobreexpresión de factores de transcripción implicados en el desarrollo pancreático en células ES (25, 197), mejorando con ello los resultados obtenidos en la diferenciación a células productoras de insulina. En estos ensayos, se expresaba ectópicamente un único factor de transcripción. Sin embargo, debido a que es poco probable que un solo factor de transcripción recapitule un programa de diferenciación completo, se planteó la coexpresión de dos factores de transcripción, Pdx-1 y p48. Experimentos de trazamiento de linaje han demostrado que todos los linajes epiteliales pancreáticos derivan de un precursor que expresa tempranamente Pdx1 y p48 (93, 137). Posteriormente, Pdx1 se expresa en células beta y débilmente en las células acinares cooperando en la regulación de la expresión de los enzimas digestivos con p48, el cual se expresa exclusivamente en células acinares (171, 270). Además, se ha descrito que p48 tiene efectos antiproliferativos tanto en líneas celulares pancreáticas como no pancreáticas (239). Así pues, Pdx1 y p48 son factores de transcripción esenciales para el desarrollo y diferenciación pancreática exocrina.

Desde el punto de vista metodológico, los principales problemas para la sobreexpresión de factores de transcripción en células ES hasta ahora han sido, i) la dificultad de introducir el transgen de interés en las células ES con una eficiencia y expresión elevada, ii) el mantenimiento del estado indiferenciado y de la capacidad de autorreplicación de las células ES que expresan establemente un gen maestro y iii) el silenciamiento de la expresión del transgen al inducir la diferenciación. Para intentar solventar en parte algunas de estas limitaciones, se abordó esta estrategia mediante vectores virales.

Así, la transducción génica lentiviral permite la expresión estable del gen de interés con una elevada eficiencia en células ES. Por otra parte, se ha descrito una reducción en el silenciamiento de la expresión del transgen durante el cultivo de las células ES indiferenciadas y tras inducir su diferenciación (174, 230). Para evitar los problemas asociados a la expresión de un gen cuya función pueda en principio perturbar la biología de las células ES (autorenovación y pluripotencia) se decidió utilizar vectores adenovirales. En este caso, la expresión del transgen es transitoria puesto que los adenovirus recombinantes utilizados en el estudio eran no replicativos y no integrativos. Debido a esta propiedad es planteable reproducir de la mejor manera la cinética de expresión de genes que se regulan dinámicamente durante el desarrollo/diferenciación.

Finalmente una ventaja de los vectores virales, es que mediante infecciones múltiples se puede conseguir una expresión de varios genes a la vez de una manera relativamente sencilla al no requerirse de etapas de selección por resistencia a antibióticos como ocurre con los métodos clásicos de transfección plasmídica.

Por un lado, se generaron líneas celulares ES que expresaban Pdx-1 de manera constitutiva mediante la infección con lentivirus. Observamos que la expresión de Pdx1 no afectaba la capacidad autoreplicativa de las células ES indiferenciadas. Posteriormente, éstas fueron infectadas con vectores adenovirales no replicativos que expresaban p48 tras inducir la diferenciación ya que este factor tiene efectos antiproliferativos.

Los resultados de estos ensayos se presentan a continuación en el manuscrito sometido a publicación “*Viral mediated co-expression of Pdx1 and p48 regulates exocrine pancreatic differentiation in mouse ES cells*”.

En resumen, observamos que Pdx-1 incrementa la expresión de marcadores acinares de forma selectiva aunque no la de todos. La transducción de p48 en estas células incrementaba todavía más dicha expresión y regulaba incluso otros marcadores exocritos. No obstante, las células exocrinas generadas presentaban un fenotipo inmaduro.



## **Viral mediated co-expression of Pdx1 and p48 regulates exocrine pancreatic differentiation in mouse ES cells**

**Running title:** Differentiation of ES cells by Pdx1 and p48.

Meritxell Rovira<sup>1</sup>, Judit Jané-Valbuena<sup>1</sup>, Mélanie Marchand<sup>2,3</sup>, Pierre Savatier<sup>2,3</sup>,  
Francisco X. Real<sup>1,4</sup>, Anouchka Skoudy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cell and Molecular Biology Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM).

<sup>2</sup> INSERM, U371, Cerveau et vision, Department of Stem Cells and Cortical Development, 18 avenue Doyen Lépine, 69500 Bron, France.

<sup>3</sup> Université Claude Bernard Lyon I, IFR19 Institut Fédératif des Neurosciences, 69500 Bron, France.

<sup>4</sup> Pompeu Fabra University, Dr Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain.

**Corresponding Author:** Anouchka Skoudy; address: IMIM, C/ Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona (Spain); phone: +34 93 2211009; fax: +34 93 2213237; email: [askoudy@imim.es](mailto:askoudy@imim.es).

**Funding:** This work was supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2001-0432, GEN2001-4748-C05), and Instituto de Salud Carlos III (02/3053), Marató de TV3 de Catalunya, ARC (5986), INSERM AVENIR 2002 program and Région Rhône-Alpes (Emergence 02-018866-01).

## **ABSTRACT**

Embryonic stem cells (ES) can activate a pancreatic differentiation program in vitro, although with low efficiency. The aim was to improve such process by using viral mediated gene transduction. In this study, we have examined the suitability of using viral vectors to express key transcriptional factors involved in pancreatic development. ES cell lines that constitutively express Pdx1, a homeodomain protein involved in both exocrine and endocrine pancreatic development and differentiation, were established using a lentiviral vector. These cells were additionally infected with an adenovirus expressing p48, a bHLH factor that is also crucial for pancreatic development and acinar differentiation. Quantitative RT-PCR analysis demonstrated an increase in the expression of exocrine genes, including those coding for both digestive enzymes and transcription factors. Immunocytochemical staining also revealed an increase in the number of amylase-expressing cell clusters. However, other important genes involved in acinar cell maturation (i.e. Mist1) were not modulated under these conditions, suggesting that the cells display features of immature exocrine cells. Importantly, this effect was selective for the acinar lineage as the expression of a large set of endocrine markers remained unchanged. Therefore, combined expression of key genes involved in pancreatic development may be a promising approach to generate mature pancreatic exocrine cells.

**Abbreviations:** Ad, adenovirus; bHLH, basic helix-loop-helix; CM, conditioned medium; EB, embryoid bodies; ES, embryonic stem cells; LIF, leukaemia inhibitory factor; Lv, lentivirus.

**Key words:** Adenovirus/ Embryonic stem cells / lentivirus/ Pdx1/ p48/ pancreatic exocrine differentiation.

Pancreas development is a complex, regulated process involving the integration of signals originating from mesodermal tissues and resulting in the activation of expression of key transcription factors. Pdx1 is a homeodomain protein that is initially detected at E8.5 in the primitive gut that will subsequently give rise to the pancreas. Targeted inactivation of Pdx1 leads to pancreatic agenesis (1-2). When the expression of Pdx1 is abrogated after bud formation, acinar and islet cells fail to differentiate (3). Moreover, lineage-tracing experiments have demonstrated that all pancreatic epithelial cell types originate from progenitors that expressed Pdx1 at some point (4). In the adult, Pdx1 regulates the expression of both insulin and exocrine digestive enzymes (5-6). p48 (also known as PTF1a) is a basic helix-loop-helix (bHLH) protein initially described to be involved in the regulation of acinar gene expression (5, 7). Subsequently, p48 was found to be essential for the development of both pancreatic components as *Ptf1a* null mice lack a pancreas and single cells expressing pancreatic hormones can be detected in the spleen (8). Later, lineage-tracing studies have shown that p48 is expressed at very early stages in the embryonic pancreas and that all pancreatic epithelial cells originate from a p48-expressing progenitor. In the absence of p48, these progenitors assume an intestinal fate (9). Very recently, a combination of both Pdx1 and p48 activities has been shown to be sufficient to expand the pancreatic precursor cell population into more posterior portions of the endoderm in *Xenopus*, leading to the formation of a giant pancreas that carries both endocrine and exocrine cells. These experiments showed that the co-expression of these two factors is sufficient to convert nonpancreatic endodermal cells into pancreatic precursor cells (10). Therefore, both Pdx1 and p48 transcription factors are essential for pancreatic development/differentiation.

Murine embryonic stem (ES) cells, derived from the inner mass of blastocyst-stage embryos, are pluripotent and capable of differentiation into all somatic cell lineages in vitro and in vivo. Thus, when induced to form aggregates (embryoid bodies, EB), ES cells can acquire mesoderm and ectodermal-derived phenotypes. They can also differentiate into endodermal lineages although at low efficiency (11-13). As occurs during in vivo development, endodermal precursors within EB can specify into both pancreatic endocrine and exocrine lineages in a process that recapitulates many aspects of early embryonic pancreatic development (14-16). In addition, insulin-expressing cells have been isolated by genetic selection using a chimeric construct which allows the expression of the  $\beta$ geo fusion gene under the control of the human insulin or the Nkx6.1 gene promoters (17-18). Lumelsky et al. have developed a five step protocol based on the selection of nestin-expressing cells to generate

endocrine beta-like cells, although the origin of the insulin detected in those cells is unclear (19-23). Other studies have taken advantage of cell proliferation inhibitors and specific growth factors to coax ES cell differentiation into insulin-producing cells (24-25). We have previously shown that incubation of EB with conditioned medium (CM) obtained from the culture of fetal pancreatic rudiments leads to an increase in the expression of pancreatic markers (13). However, in this system even when using the best combinations of pancreatic growth factors identified, the efficiency was far from optimal. Overexpression of single transcription factors has also been explored as an alternative strategy. Thus, transfection of Pax4 cDNA and conditional expression of Pdx1 in ES cells promoted the differentiation of insulin-producing cells with beta cell features (26-27). It is reasonable to conceive that expression of multiple specific pancreatic transcription factors as well as the integration of other methods in a single process could help at improving previous approaches.

In this study, we have tested the hypothesis that overexpression of Pdx1 and p48 in differentiating ES cells would favor the acquisition of a pancreatic phenotype. We have taken advantage of the use of lentiviral and adenoviral vectors to efficiently transduce gene expression. In addition, we have used CM derived from the culture of fetal pancreatic rudiments to simultaneously provide differentiating cells with specific signals required for pancreatic development. Our data demonstrate that delivery of multiple transcription factors can be achieved successfully using such approach. We show that p48 directs selectively the expression of an acinar phenotype in cells expressing Pdx1, an effect that is enhanced under cell culture conditions that favor pancreatic differentiation.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Cell culture and in vitro differentiation.** Murine embryonic stem cells (CGR8) were routinely propagated as previously described (14). To induce differentiation, cells were allowed to aggregate in 150 mm bacterial dishes at a density of  $8.5 \times 10^4$  cells /ml in medium without LIF (Leukemia inhibitory factor). After 7 days, 50-100 EB were plated in gelatin-coated 6-well cell culture dishes. Medium was changed every other day till the end of the culture period (14-21 days). In some experiments, CM obtained from the culture of E16.5 fetal pancreas was added during cell aggregation and after infection with adenoviral vectors at a 1:1 dilution with normal medium (13).

**Viral generation and gene transduction.** *R4SA-EFS-eGFP-W* and *R4SA-EFS-Pdx1-W* were generated from *pSIV-gaMES4* (28) by replacing the fragment containing a *CMV-GFP* cassette with fragments containing *EFS-eGFP-W* (gift from Patrick Salmon) or murine Pdx1 cDNA. Method for producing SIV-based vectors in 293 cells have been fully described elsewhere (28). ES cells ( $1 \times 10^5$ ) were infected for 5 hours with 0.5 ml of supernatant, washed in PBS, and cultured for 48 hours. The infected population was subcloned in 96-well plates. Individual clones were amplified and analyzed for expression of Pdx1 by western blot.

Adenoviral vectors were obtained using the Ad-Easy system (30). EB were generated and plated on tissue culture dishes for 36 h as described above. After washing 3 times with PBS, EB were infected for 12 hours with recombinant adenoviruses at a MOI of 1:25 in serum-free medium. Virus was eliminated by washing; EB were further cultured in medium supplemented with FBS or with conditioned medium. Under these conditions, the viability of the cells was not compromised as scored by trypan blue dye exclusion in replicated wells.

Western blotting using extracts from transduced cells was performed as described elsewhere. (14, 31).

**RT-PCR analysis.** RNA was prepared using the GenElute mammalian total RNA kit (Sigma, St. Louis, MO) and treated with DNase I using the DNA-free kit (Ambion, Austin, TX). RNA (0.5  $\mu$ g) was reverse transcribed in one step according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Valencia, CA). PCR was performed for 30-35 cycles, except for  $\beta$ -actin and Hprt (25 cycles), using the previously described PCR conditions and primers (14) Primers used to detect additional transcripts include: nestin. (32), rat p48 (S: CTGTCTCGCCTACCCTTGCA and AS: GCCGGCCTGTGAGAGCTT), and syncollin (S: ATGTCCCTGCTGTGCCCACT and AS: TTGCAGTAGAGGGCAGAGAT. RT-PCR products were visualized by ethidium bromide staining after agarose gel electrophoresis. The intensity of the bands was semi-quantified after image analysis with Imagegauge software and normalized against the  $\beta$ -actin and HPRT internal controls.

Real time RT-PCR analysis for carboxypeptidase A, p48, Ngn3, Nkx6.1, insulin I and the control housekeeping gene Hprt was performed using ABI Prism 7900HT Sequence Detection System and the following predeveloped TaqMan assay reagents (Applied Biosystems): Mm00481616\_m1 for carboxypeptidase A, Mm00479622\_m1 for p48, Mm00437606\_s1 for ngn3, Mm00454962\_m1 for nkx6.1, Mm01259683\_g1 for insulin I and Mm00446968\_m1 for Hprt. The PCR reaction was

performed according to the manufacturer's protocol and the data were processed using SDS 2.1 software using Hprt mRNA levels as control to determine fold-regulation of exocrine enzyme transcripts (Applied Biosystems).

**Immunocytochemical analysis.** Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and permeabilized with 0.1% TX-100 and 0.1% saponin for 30 min. Endogenous peroxidase activity was blocked with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min. After incubation with 1% BSA for 30 min, primary rabbit antibodies raised against Pdx1, p48, and amylase (Sigma) were added for 1 hour. Cells were then washed with PBS and incubated with the Envision secondary reagent (Dako) for 30 min. The reactions were developed using DAB as a chromogen. Alternatively, immunofluorescence staining was conducted using the Tyramide Signal Amplification method (TSA<sup>TM</sup> Fluorescence Systems, Perkin Elmer) following manufacturer's instructions. Nuclear labeling was performed with ToPro-3 iodide (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). Immunofluorescence staining and GFP expression were visualized with a Leica TCS-SP2 confocal microscope. To detect the  $\beta$ -galactosidase activity in situ, cells were incubated with a solution containing 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM K ferricyanide, and 1 mg/ml X-Gal (Sigma) for 12 hours at 37 °C.

**Statistics.** Statistical differences were analyzed by the Student *t* test, and *p* values <0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

### Generation of mouse ES cell lines stably expressing Pdx1

To enforce Pdx1 expression in CGR8 cells, a lentiviral vector designated Lv Pdx1 was used. Four independent undifferentiated ES cell lines were established that constitutively expressed Pdx1 after infection, detected using western blotting (Figure 1A) and immunocytochemistry (Figure 1B). Three of the lines expressed similar levels of the transgene whereas one, designated ES4Pdx1, showed lower expression levels. Because it has been reported that high levels of expression of Pdx1 in ES cells can be toxic and acinar cells express lower levels of Pdx1 than beta cells, this line was chosen for further assays (27, 33) Nonetheless, no major differences between the different clones were observed in the results obtained in the in vitro differentiation experiments (not shown). Control cell lines were generated after infection with a lentiviral vector coding for GFP (Lv GFP) (Figure 1B).

Pdx1 overexpression did not affect cellular morphology or the proliferative ability of CGR8 cells (data not shown).

To confirm that Pdx1 expression was stable, immunocytochemical assays were used. As shown in Figure 1B, expression of both Pdx1 and the control GFP transgene was maintained in undifferentiated cells after culture of ES4Pdx1 or ESGFP lines for several passages in the presence of LIF (Figure 1B, a and c). EB from these two lines were generated by culturing ES cells in suspension for 7 days in the absence of LIF, then allowing the aggregates to adhere to gelatin-coated cell culture dishes for an additional 14 days (Figure 2). As shown in Figure 1B, b and d, expression of both Pdx1 and GFP in most cells was observed with heterogeneous expression levels. The expression of the transgenes appeared to not affect the cell growth of the differentiated cells.

### **Effect of co-culture with conditioned medium from pancreatic rudiments on Pdx1-expressing EB cells**

We have previously shown that mouse fetal pancreas CM increases the expression of exocrine genes upon ES cell differentiation (14). To investigate the additional effect of Pdx1 overexpression, ESGFP and ES4Pdx1 cells were differentiated as described above and incubated with CM obtained from the culture of E16.5 fetal pancreases. Pancreatic marker expression was assessed by semi-quantitative RT-PCR. Exogenous Pdx1 increased the expression of several exocrine mRNA transcripts encoding digestive enzymes such as chymotrypsinogen, amylase and elastase (Figures 3A and 3B). The effect was greater when fetal pancreatic CM was added: a significant increase in the percentage of cells immunoreactive for p48 and amylase (4.1-fold and 6.7-fold, respectively;  $p < 0.05$ ) was observed in cultures expressing exogenous Pdx1 and incubated with fetal pancreatic CM, as shown by immunofluorescence staining (Figure 4). Carboxypeptidase A and nestin (34-35) mRNAs were unchanged (Figure 3A). Importantly, transcripts for glucagon, insulin or endocrine transcription factors (i.e Pax6, Ngn3) appeared to be mainly down-regulated or remained unchanged (Nkx6.1) when Pdx1 was overexpressed (Figure 3A). Quantitative RT-PCR for selected exocrine and endocrine markers confirmed these findings, as shown in Figure 3C. In particular, we were unable to detect insulin I mRNA transcripts. Therefore, ectopic expression of Pdx1 enhances the effect of the pancreatic soluble factors on the expression of a large panel of pancreatic genes.

### **Kinetics of exogenous p48 expression using an adenoviral vector**

Expression of Pdx1 superimposed to the fetal pancreatic signals leads to a marked increase in p48 mRNA in differentiating cells (Figure 3A). To assess the added effect of p48 expression, differentiating ES4Pdx1 cells were infected with adenovirus expressing either LacZ (AdLacZ) cDNA, as a control, or p48 (Adp48) (Figure 5A). Adenoviral vectors were selected because they allow a more transient expression, thus avoiding a strong antiproliferative effect of p48 (35). ES4Pdx1 cells were cultured in suspension for 7 days and EB were infected with adenoviruses (Figure 2). Transgene expression levels and cell survival indicated that a multiplicity of infection (MOI) of 25 was most favorable: 70% cells were infected with >90% viability at day 2 (Figure 5B).

Expression of the transgenes was assessed using immunocytochemistry with anti-p48 antibodies and  $\beta$ -galactosidase assays 2-21 days after infection. Figure 5B shows a decrease of p48 and  $\beta$ -galactosidase activity at day 7. At day 21, p48 and LacZ activity were detectable in very few cells. To discriminate exogenous and endogenous p48 mRNA, RT-PCR was conducted using species-specific primers. High levels of rat p48 transcripts were detected 2 and 7 days after infection with Adp48, but not with AdLacZ, which decreased by day 14 (Figure 5C). This dynamic expression pattern is similar to that observed using immunocytochemical assays. In conclusion, transient ectopic expression of p48 is maintained in EB-derived ES4Pdx1 cells for 7 days, providing a time frame for activation of the p48-dependent differentiation program.

### **Effects of p48 expression on in vitro differentiation**

To investigate the effect of the simultaneous expression of Pdx1 and p48 in EB incubated with pancreatic CM, semi-quantitative RT-PCR was performed in ES4Pdx1 cells infected with adenovirus as described above. Exogenous p48 strongly up-regulated amylase and chymotrypsinogen mRNAs, as well as those of carboxypeptidase A (Figures 6A and 6B), a gene whose expression was not modulated in previous experimental conditions (Figure 3). Transcript levels of Mist1, a bHLH involved in the acquisition and maintenance of the mature exocrine phenotype (37), were unaffected. Similarly, p48 expression did not affect the levels of mRNAs coding for endocrine transcription factors (NeuroD, Nkx6.1, Isl1 and Pax6) nor for hormones.

Exocrine marker expression was also analyzed by quantitative RT-PCR (Figure 6C). Upon p48 gene transduction, carboxypeptidase A mRNA levels were increased by 16.7-fold. Exogenous

p48 up-regulated by 2.4-fold the expression of endogenous p48, suggesting a positive feedback mechanism favoring exocrine differentiation. The lack of regulation of mRNAs for endocrine markers was confirmed (Figure 6C). In experiments using ESGFP cells, p48 transduction resulted only in a slight increase in exocrine marker expression than in Pdx1-expressing cells as shown by quantitative RT-PCR (Figure 6D) and endogenous p48 expression was not activated (not shown).

Immunocytochemistry was used to analyze acinar marker expression in ESPdx1 cells. As shown in Figures 7A and 7B, the combination of exogenous p48 and pancreatic CM led to a marked increase in the percentage of amylase-expressing foci only in Pdx1-expressing cells cultured with CM (g h vs. a,b vs. e,f): p48 expression in the presence of CM led to a 3 fold increase in the percentage of foci with strong amylase staining (Figure 7B). These results demonstrate that transient expression of p48 in Pdx1-expressing cells, in the presence of CM, leads to a selective up-regulation of exocrine genes in differentiating ES cells.

## **DISCUSSION**

ES cells can differentiate into endodermal lineages, although at low efficiency. The aim of this work was to improve methods to direct exocrine pancreatic differentiation of ES cells using viral vectors containing the cDNA of transcription factors to develop in vitro differentiation-based strategies to ultimately overcome pancreatic insufficiency, such as in chronic pancreatitis. Our strategy relies on the simultaneous expression of two key transcriptional regulators in differentiating ES cells. Here, we combine the advantages of lentiviral vectors, to ensure constitutive expression of transgenes (38-39), and adenoviral vectors to allow transient gene expression (10). This strategy allows for the rapid assay of transcription factor combinations in ES cells and may facilitate to better reproduce the kinetics of expression of genes that are dynamically regulated during development and differentiation. We have integrated therein the addition of fetal pancreatic CM, containing the best combination of soluble factors known to promote pancreatic differentiation (14, 17, 41).

First, we used a lentivirus to establish ES cell lines that constitutively express Pdx1. Because all the pancreatic epithelial cell types originate from Pdx1-expressing progenitors, this strategy might be used for the generation of both exocrine and endocrine differentiated cells (4). Nuclear expression of Pdx1 was detected in undifferentiated cells as well as in their differentiated derivatives up to the 30th day of differentiation (Fig. 1C and data not shown). Although all ES cell lines were clonally

derived, Pdx1 expression in undifferentiated ES cells was heterogenous, reflecting a common observation in ES cells due to vector integration into an ectopic site. After spontaneous differentiation of ES cells, Pdx1 increases the expression of a large number of acinar enzymes. This effect is likely mediated - at least in part - by the PTF1 complex, as these changes parallel an increase in p48/PTF1a (Figure 3A), as occurs in vivo (42). However, the induction of acinar genes did not follow a single unique pattern: for example, carboxypeptidase A expression was not activated even when cells were cultured with fetal pancreatic CM. Several hypotheses can explain this result. First, the requirements for transcriptional activation may be slightly different at the promoters of the various exocrine-specific genes: the PTF1 complex is not sufficient to regulate the expression of acinar genes, requiring the cooperation of HNF3 $\beta$ / HNF3 $\gamma$  or the complex composed by Pdx1, Meis2b and Pbx1b (31, 43, 7). A comparison of the promoter/enhancer sequences of acinar genes shows both conservation and divergence (unpublished observations). Secondly, it is possible that lack of carboxypeptidase A induction reflects the ability of Pdx1 to commit cells to an immature stage of differentiation. Thirdly, carboxypeptidase A-expressing cells may be lost during culture. This is unlikely since positive cells are detected after infection with the Adp48 using similar cell culture conditions (Figure 6 and not shown).

There is cumulative evidence indicating that the expression of a single transcriptional activator is generally insufficient to activate a complete developmental process. Instead, a combinatorial network acts to determine cell identity and function. The main novelty of our study relies on the simultaneous introduction of two cDNAs encoding transcription factors in differentiating ES cells using vectors with distinct transduction properties, in conjunction with stimulation with soluble factors. We chose to express p48 in Pdx1-transduced ES cells as the former is expressed in pancreatic progenitors and is required for acinar differentiation (8-9). p48 is expressed at E9.5-E10.5 (8-9), after Pdx1 (2). Thus, ES4Pdx1 cells were infected with a p48 expressing adenovirus resulting in the selective expression of a large panel of acinar markers, but not endocrine markers (Figure 6). The up-regulation of some acinar genes (i.e. carboxypeptidase A) occurred only when p48 was overexpressed, possibly reflecting a dose-dependent effect. Interestingly, exogenous p48 up-regulated endogenous p48 expression, suggesting that the modulation in the levels of expression of digestive enzymes results from a bona fide activation of the acinar differentiation program.

When p48 was transduced into control ESGFP, the induction of exocrine genes was very inefficient (Figure 6D), demonstrating the cooperation of Pdx1 and p48. This effect likely relies on a

regulatory loop involving both factors as endogenous p48 expression was only activated in Pdx1-overexpressing cells.

Other important genes involved in acinar development were not induced (i.e. *Mist1*), suggesting that we have established immature exocrine cells. This tenet is further supported by the lack of regulation of *syncollin* mRNA, encoding a granule-associated protein required for exocytosis in exocrine cells (Figure 6) (44). We speculate that overexpression of additional key transcription factors may support a more differentiated phenotype.

Regarding the effects of Pdx1 on endocrine differentiation of ES cells, other groups have described either a modest effect or the expression of a set of genes involved in beta cell development (26-27). In our hands, ectopic Pdx1 tended to diminish the levels of several genes expressed in endocrine cells (Figure 3). Of importance, the differentiation protocol that we have used is not based on the selection of nestin-expressing cells as used in other studies (26-27). Indeed, regardless of the conditions assayed- use of fetal pancreatic CM (Figure 3), expression of Pdx1 (Figure 3) and co-expression of p48 (Figure 6) - we failed to observe changes in nestin mRNA. Thus, we propose that our experimental protocol favors exocrine precursor generation. Alternatively, our data may reflect a dose dependent effect of Pdx1: as shown in Figure 1A, ES4Pdx1 cells express lower Pdx1 levels than 266-6 cells. In vivo, Pdx1 levels are lower in acinar than in beta cells and targeted overexpression in exocrine pancreas leads to a severe exocrine dysmorphogenesis (33, 45). The low Pdx1 levels achieved in our system may favor the exocrine commitment of pancreatic precursors. It will be important to discern among these possibilities in order to improve methods that selectively lead to the development of exocrine vs. endocrine precursors. Finally, our data are very similar to those obtained in the *Xenopus* model. In this study, ectopic p48 allows the expression of exocrine markers in the Pdx1-expressing domains of the endoderm. In addition, co-expression of both factors in non-pancreatic domains leads only to exocrine pancreas formation whereas the endocrine pancreas does not develop (10).

In summary, we have developed methods to direct ES cells to acquire features of pancreatic acinar cells. The strategy has led to the discrimination of distinct stages of acinar differentiation that have not thus been reported. Our strategy efficiently allows to screen for the best nuclear regulator combinations to commit ES cells into the lineage of interest integrated with the use of soluble factors. Because adenoviral infection can be readily performed in mouse ES cells, the strategy is amenable to

mid-throuput assays. Our work should lead to the in vitro generation of functional acinar cells suitable for functional replacement assays.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank the investigators mentioned in the text for providing reagents, the “Gene Vector Production Network, Laboratory of gene therapy, Nantes (France) for producing adenoviral vectors and, both Y. Tor and P. Navarro for technical assistance. M.R. and J.J.-V. were recipient of a Graduate Fellowship from Ministerio de Educación y Ciencia and a Research Fellowship from Fundació Catalana de Trasplantament, respectively. A.S. was supported by Instituto de Salud Carlos III and M.M. by Association pour la Recherche contre le Cancer.

## **Duality of interest**

None declared.

## REFERENCES

- 1 Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, et al. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 1994;371:606-609.
- 2 Offield MF, Jetton L, Labosky PA, et al. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 1996;122:983-995.
- 3 Holland AM, Hale MA, Kagami H, et al. Experimental control of pancreatic development and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12236-12241.
- 4 Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 2002;129:2447-2457.
- 5 Liu Y, MacDonald RJ, Swift GH. DNA binding and transcriptional activation by a PDX1.PBX1b.MEIS2b trimer and cooperation with a pancreas-specific basic helix-loop-helix complex. *J Biol Chem* 2001;276:17985-17993.
- 6 Swift GH, Liu Y, Rose SD, et al. An endocrine-exocrine switch in the activity of the pancreatic homeodomain protein PDX1 through formation of a trimeric complex with PBX1b and MRG1 (MEIS2). *Mol Cell Biol* 1998;18:5109-5120.
- 7 Rose SD, Swift GH, Peyton MJ, et al. The role of PTF1-P48 in pancreatic acinar gene expression. *J Biol Chem* 2001;276:44018-44026.
- 8 Krapp A, Knofler M, Ledermann B, et al. The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev* 1998;12:3752-3763.
- 9 Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, et al. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* 2002;32:128-134.
10. Afelik S, Chen Y, Pieler T. Combined ectopic expression of Pdx1 and Ptf1a/p48 results in the stable conversion of posterior endoderm into endocrine and exocrine pancreatic tissue. *Genes Dev.* 2006;20 (11):1441-6.
- 11 Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 2000;100:143-155.
- 12 Eiges R, Benvenisty N. A molecular view on pluripotent stem cells. *FEBS Lett* 2002;529:135-141.
- 13 Rathjen J, Rathjen PD. Mouse ES cells: experimental exploitation of pluripotent differentiation potential. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11:587-594.
- 14 Skoudy A, Rovira M, Savatier P, et al. Transforming growth factor (TGF)beta, fibroblast growth factor (FGF) and retinoid signalling pathways promote pancreatic exocrine gene expression in mouse embryonic stem cells. *Biochem J* 2004; 379: 749-756.
- 15 Kahan BW, Jacobson LM, Hullett DA, et al. Pancreatic precursors and differentiated islet cell types from murine embryonic stem cells: an in vitro model to study islet differentiation. *Diabetes* 2003;52:2016-2024.

- 16 Assady S, Maor G, Amit M, et al. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001;50:1691-1697.
- 17 Soria B, Roche E, Berna G, et al. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000;49:157-162.
- 18 Leon-Quinto T, Jones J, Skoudy A, et al. In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Diabetologia* 2004;47:1442-1451.
- 19 Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, et al. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001; 292:1389-1394.
- 20 Rajagopal J, Anderson WJ, Kume S, et al. Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science* 2003;299:363.
- 21 Sipione S, Eshpeter A, Lyon JG, et al. Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells. *Diabetologia* 2004;47:499-508.
- 22 Hansson M, Tønning A, Frandsen U, et al. Artfactual insulin release from differentiated embryonic stem cells. *Diabetes* 2004;53:2603-2609.
- 23 Segev H, Fishman B, Ziskind A, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *STEM CELLS* 2004; 22:265-274.
- 24 Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, et al. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16105-16110.
- 25 Moritoh Y, Yamato E, Yasui Y, et al. Analysis of insulin-producing cells during in vitro differentiation from feeder-free embryonic stem cells. *Diabetes* 2003;52:1163-1168.
- 26 Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, et al. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:998-1003.
- 27 Miyazaki S, Yamato E, Miyazaki J. Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes* 2004;53:1030-1037.
- 28 Mangeot PE, Duperrier K, Negre D, et al. High levels of transduction of human dendritic cells with optimized SIV vectors. *Mol Ther* 2002;5: 283-290,
- 29 Mangeot PE, Negre D, Dubois B, et al. Development of minimal lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for gene transfer into human dendritic cells. *J Virol* 2000;74: 8307-8315.
- 30 He TC, Zhou S, da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2509-2514.
- 31 Adell T, Gomez-Cuadrado A, Skoudy A, et al. Role of the basic helix-loop-helix transcription factor p48 in the differentiation phenotype of exocrine pancreas cancer cells. *Cell Growth Differ* 2000;11:137-147.

- 32 Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, et al. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 2002;297:1559-1561.
- 33 Smart NG, Apelqvist AA, Gu X, et al. The homeodomain protein PDX1 is required at mid-pancreatic development for the formation of the exocrine pancreas. *Dev Biol* 2005;286:225-237.
- 34 Delacour A, Nepote V, Trumpp A, et al. Nestin expression in pancreatic exocrine cell lineages. *Mech Dev* 2004;121:3-14.
- 35 Esni F, Stoffers DA, Takeuchi T, et al. Origin of exocrine pancreatic cells from nestin-positive precursors in developing mouse pancreas. *Mech Dev* 2004;121:15-25.
- 36 Rodolosse A, Chalaux E, Adell T, et al. PTF-1a/p48 transcription factor couples cell proliferation to cell differentiation in the exocrine pancreas. *Gastroenterology* 2004;127:937-949.
- 37 Pin CL, Rukstalis JM, Johnson C, et al. The bHLH transcription factor Mist1 is required to maintain exocrine pancreas cell organization and acinar cell identity. *J Cell Biol* 2001; 155:519-530.
- 38 Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, et al. Transgenesis by lentiviral vectors: Lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Nat Acad Sci of U S A.* 2002;99:2140-2145.
- 39 Ma Y, Ramezani A, Lewis R, et al. High-level sustained transgene expression in human embryonic stem cells using lentiviral vectors. *STEM CELLS* 2003; 21: 111-117.
- 40 Lundstrom K. Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol.* 2003; 21: 117-122.
- 41 Brolen GK, Heins N, Edsbacke J, et al. Signals from the embryonic mouse pancreas induce differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing beta-cell-like cells. *Diabetes* 2005;54:2867-2874.
- 42 Petrucco S, Wellauer PK, Hagenbuehle O. The DNA-binding activity of transcription factor PTF1 parallels the synthesis of pancreas-specific mRNAs during mouse development. *Mol Cell Biol* 1990;10:254-264.
- 43 Cockell M, Stolarczyk D, Frutiger S, et al. Binding sites for hepatocyte nuclear factor 3 beta or 3 gamma and pancreas transcription factor 1 are required for efficient expression of the gene encoding pancreatic alpha-amylase. *Mol Cell Biol* 1995;15:1933-1941.
- 44 Wasle B, Turvey M, Larina O, et al. Syncollin is required for efficient zymogen granule exocytosis. *Biochem J* 2005; 385:721-727.
- 45 Heller RS, Stoffers DA, Bock T, et al. Improved glucose tolerance and acinar dysmorphogenesis by targeted expression of transcription factor PDX-1 to the exocrine pancreas. *Diabetes* 2001; 50:1553-1561.

## TITLES AND LEGENDS TO FIGURES

### **Figure 1. Generation of ES cell lines stably expressing Pdx1 or GFP using lentiviral vectors.**

Panel A: Undifferentiated ES cell lines were generated after infection with lentiviruses expressing mouse Pdx1 or GFP. Panel A: Cell extracts of the corresponding cell lines (1- 4) were subjected to western blot analysis using an anti-Pdx1 antibody. Membranes were reprobated with an anti- $\alpha$  tubulin antibody for protein quantity normalization. Positive control: mouse pancreatic 266-6 cell line. C, control CGR8 cells; ES, undifferentiated mouse ES cells. Panel B: Undifferentiated ES4Pdx1 cells, as well as their differentiated derivatives, were subjected to immunocytochemistry with an anti-Pdx1 antibody. GFP expression in ESGFP cells was analyzed by confocal microscopy. EB7+ P14 refers to the differentiation protocol used as indicated in Figure 2. Original magnification x 200. Scale bars = 25  $\mu$ m.

### **Figure 2. Schematic representation of the protocol used for in vitro differentiation of ES4Pdx1 cells.**

ES4Pdx1 cells were differentiated in suspension as EB for 7 days, seeded in gelatin-coated cell culture dishes and further grown for 14-21 days. Adenoviral infections were performed in recently adhered EB. In some experiments, CM generated from the culture of E16.5 fetal pancreatic rudiments was added, as indicated.

### **Figure 3. Effect of Pdx1 on gene expression of EB cultured with fetal pancreas CM.**

Panel A: Semi-quantitative RT-PCR analysis was performed with RNA obtained from differentiated ES4Pdx1 and ESGFP cells cultured with or without fetal pancreatic CM. Panel B: Histograms represent the relative level of expression of selected pancreatic markers in panel A quantified by densitometry. mRNA levels present in differentiated ESGFP cells incubated with CM were taken as reference and values were normalized to Hprt mRNA levels. Bars indicate the standard deviations of three independent experiments. \* $p < 0.05$  compared with control ESGFP+ CM. Panel C: Quantitative RT-PCR analysis for the expression of selected pancreatic markers using the RNA samples obtained in panel A. Histograms show the relative expression levels normalized to the loading control Hprt.

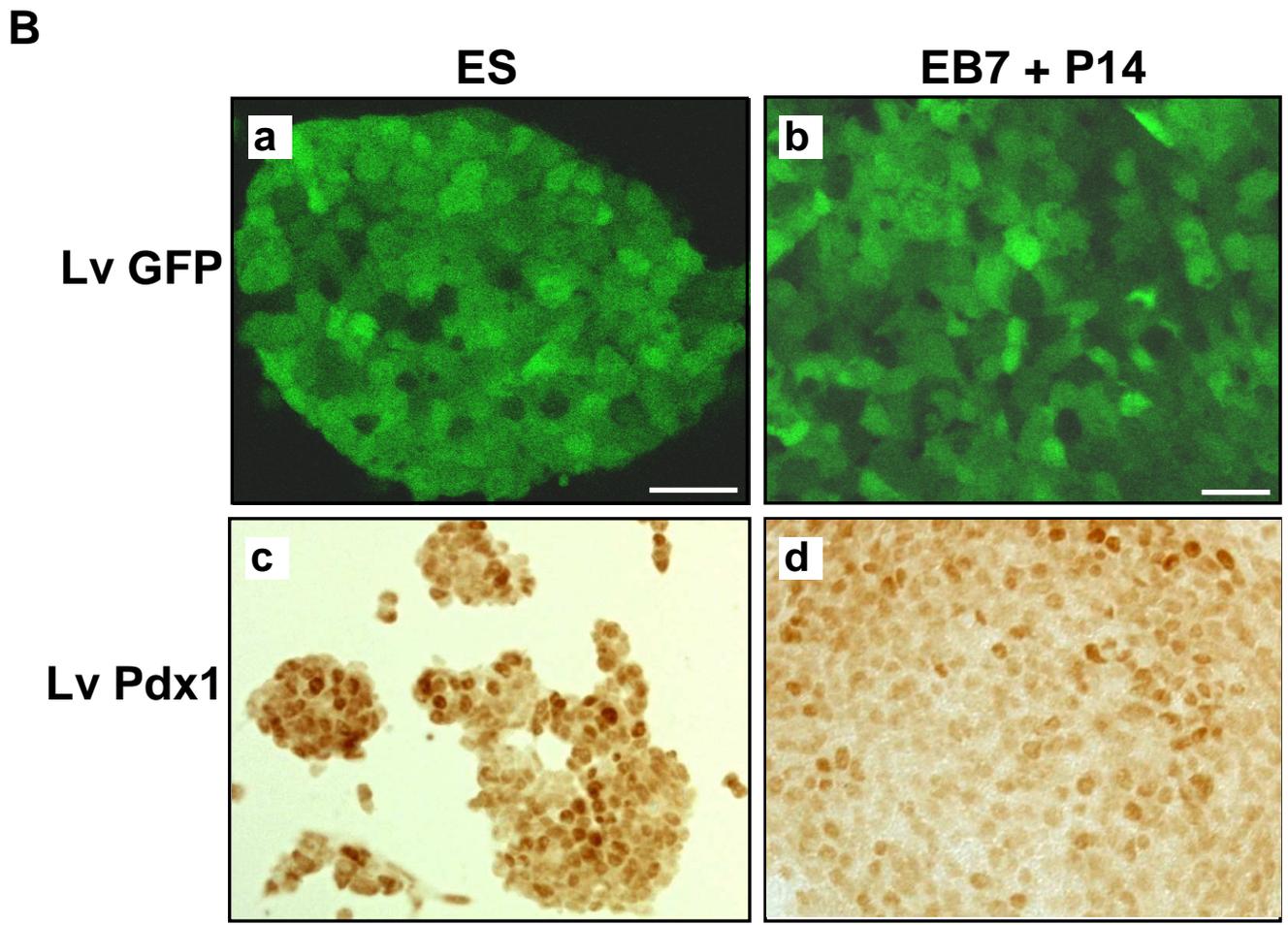
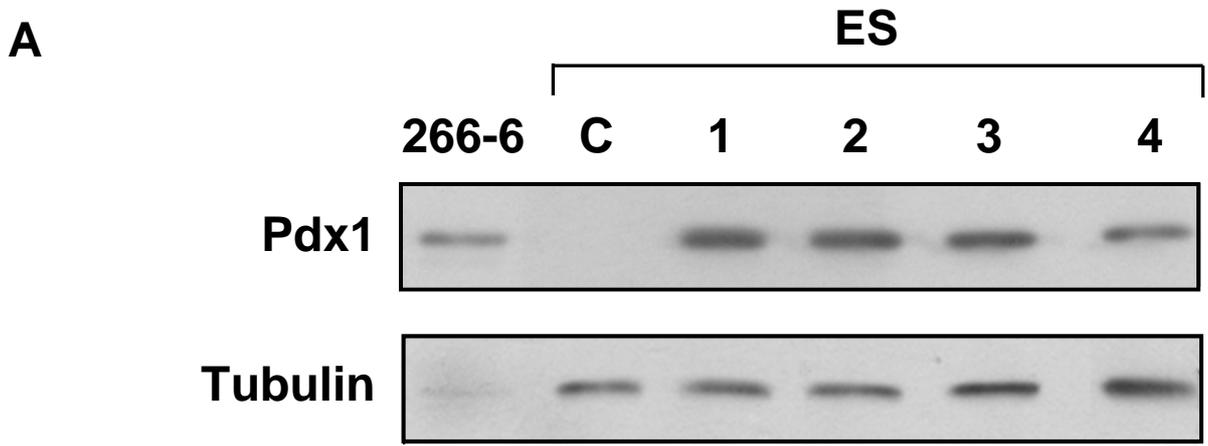
**Figure 4. Immunofluorescence analysis of differentiated ES4Pdx1 cells incubated with or without CM.** Staining was performed using specific antibodies for p48 (a, d), and amylase (c, f) (Red). Nuclei were labeled with ToPro-3 iodide (blue). (e, f) show the nuclei of the cells corresponding to panels a and d. Arrows in (a, b, d, e) show immunoreactive cells. p48 is expressed in the nucleus whereas amylase displays a cytoplasmic distribution. Scale bars = 25  $\mu$ m.

**Figure 5. Kinetics of transgene expression in differentiating ES4Pdx1 cells infected with rat p48- and LacZ-encoding adenoviruses.** Panel A: Western blot analysis of p48 expression. Positive control, 266-6 cells. Panel B: Differentiated ES4Pdx1 cells infected with Adp48 or AdLacZ were immunostained with an anti-p48 antibody or assayed for  $\beta$ -galactosidase activity, respectively, at the indicated times after infection. Original magnification x 200. Panel C: RT-PCR analysis of total RNA from samples obtained as in B using primers specific for rat p48 and  $\beta$ -actin. Pancreatic 266-6 and AR42J cells were used as control of mouse and rat specificity, respectively.

**Figure 6. Effect of p48 on gene expression of differentiating ES4Pdx1 cells.** Panel A: ES4Pdx1 cells cultured as in Figure 3 were infected with Adp48 or AdLacZ and total RNA subjected to semi-quantitative RT-PCR analysis for specific pancreatic markers. Panel B: Histograms represent the relative level of expression of selected pancreatic markers in panel A quantified by densitometry. mRNA levels present in AdLacZ-infected cells were taken as reference and values were normalized to  $\beta$ -actin mRNA levels. Bars indicate the standard deviations of three independent experiments. \* $p < 0.05$  compared with control AdLacZ. Panel C: Quantitative RT-PCR analysis for the expression of selected pancreatic markers using the RNA samples obtained in panel A. Histograms show the relative expression levels normalized to the loading control Hptr. Panel D: Quantitative RT-PCR was done as in panel C using the RNA of differentiated Adp48- infected ESGFP and ES4Pdx1 cells.

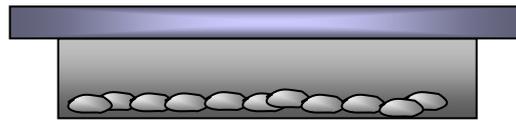
**Figure 7. Immunofluorescence analysis of differentiated ES4Pdx1 cells infected with rat p48 and LacZ expressing adenoviruses.** Panel A. ES4Pdx1 cells incubated with (f, h) or without (b, d) CM were infected with AdLacZ (b, f) or Adp48 (d, h) and subjected to immunofluorescence analysis with an anti-amylase antibody. The corresponding phase-contrast microphotographs are shown in adjacent panels. Scale bars = 25  $\mu$ m. Panel B. Histograms of data from one experiment representative

of two performed indicating the percentage of immunoreactive cell foci, as well as their intensity, in the different cell culture conditions, as shown in A. + refers to the level of intensity of the immunostaining. Percentage of immunoreactive cells (foci + and foci ++) increase in comparison to control AdLacZ (\* $p < 0.05$ ). Percentage of ++ foci increase in comparison to Adp48 (\*\* $p < 0.05$ ). Both experiments yielded similar results.



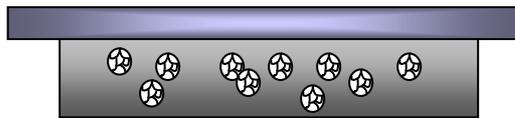
**Figure 1**

**1. Culture of undifferentiated ES4 Pdx1 cells**



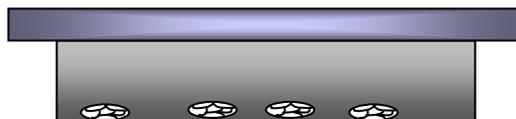
+ LIF      ↓      2-3 days

**2. Aggregation of ES4Pdx1 cells in suspension: generation of EB**



- LIF  
± CM      ↓      7 days

**3. Plating of EB on gelatin coated cell culture dishes**



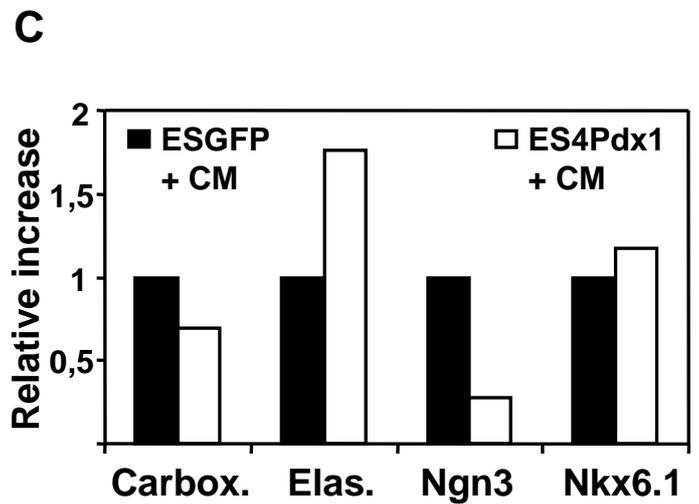
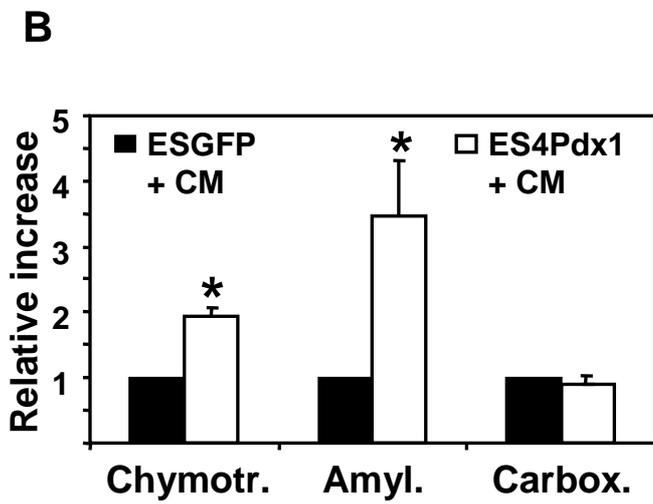
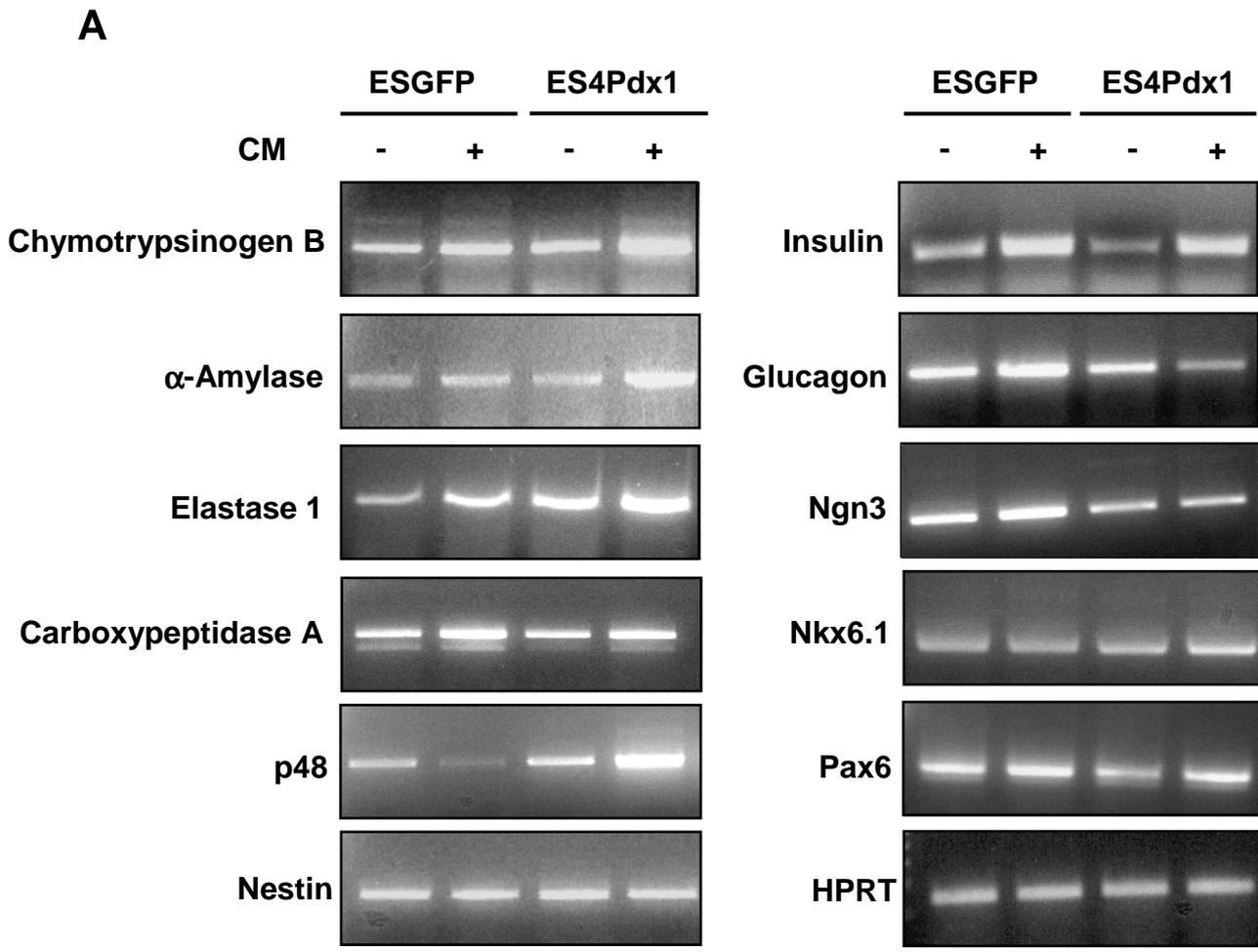
**4. Infection with recombinant adenovirus**

← Ad p48  
← Ad LacZ  
← ± CM

↓ 14 days

**Analysis**

**Figure 2**



**Figure 3**

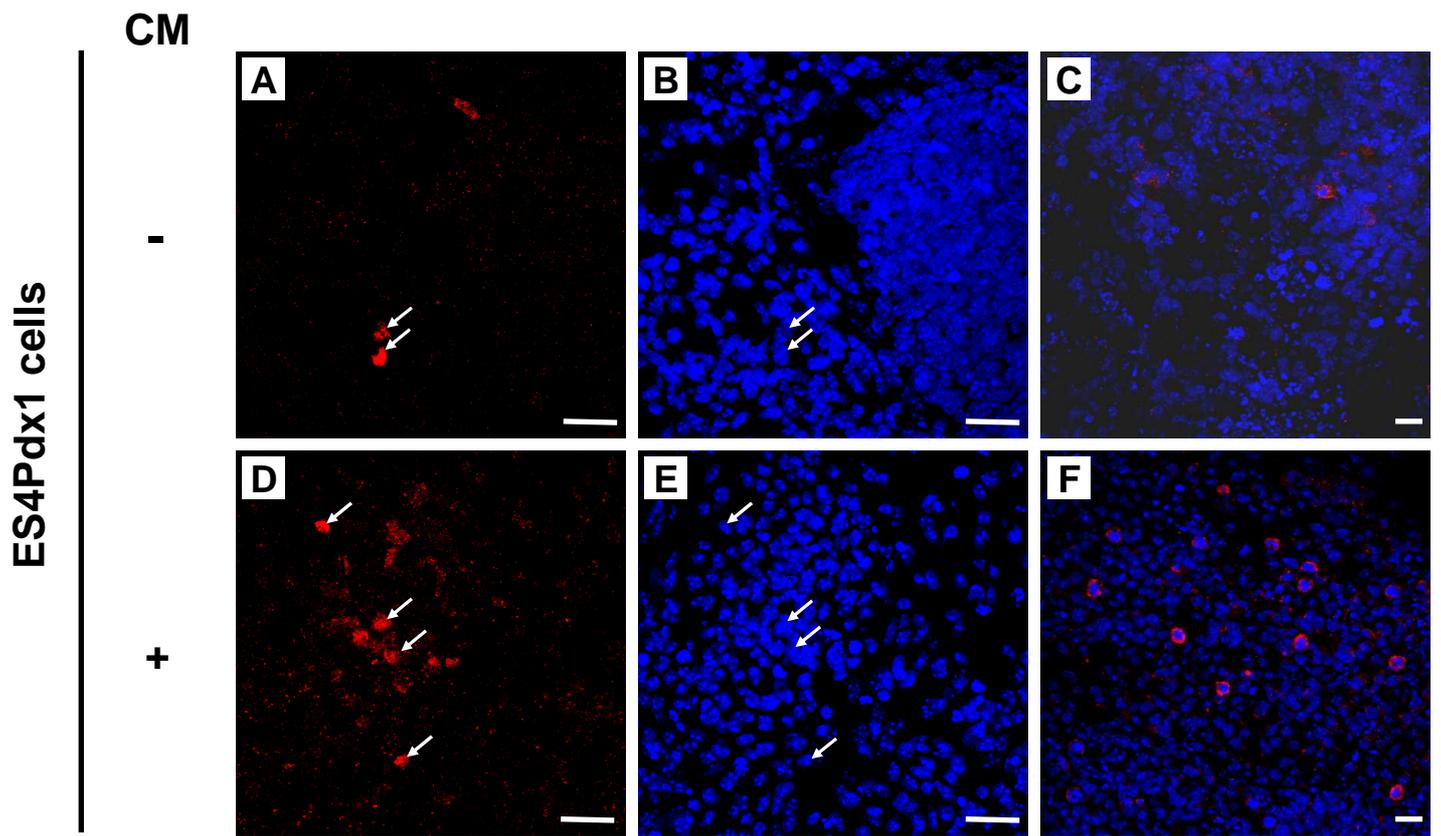
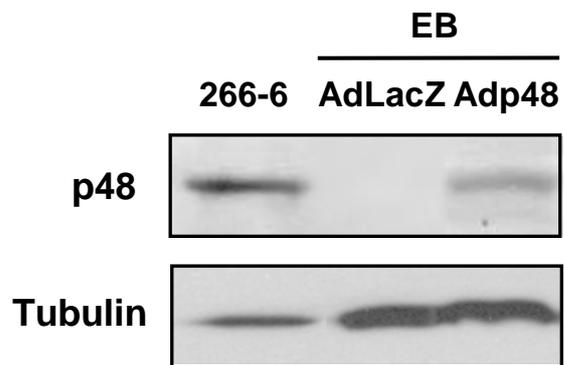
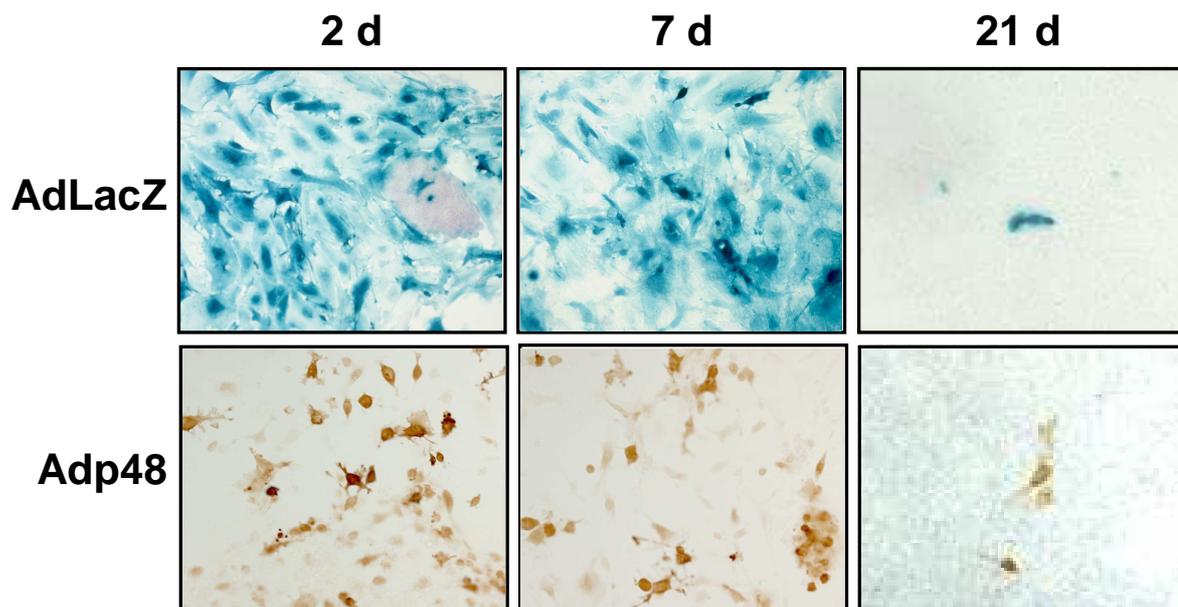
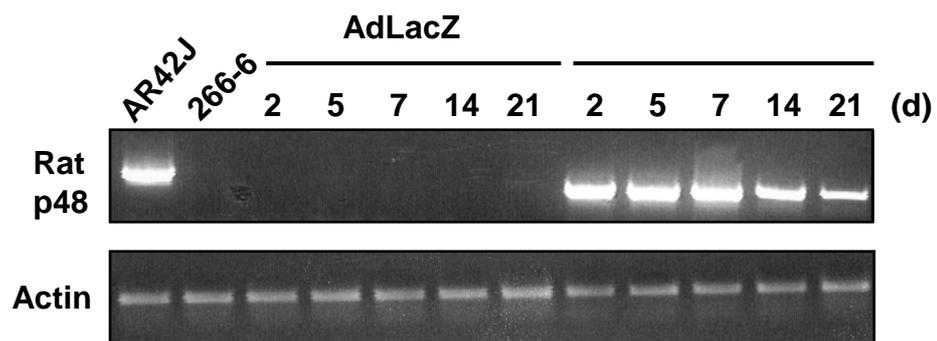
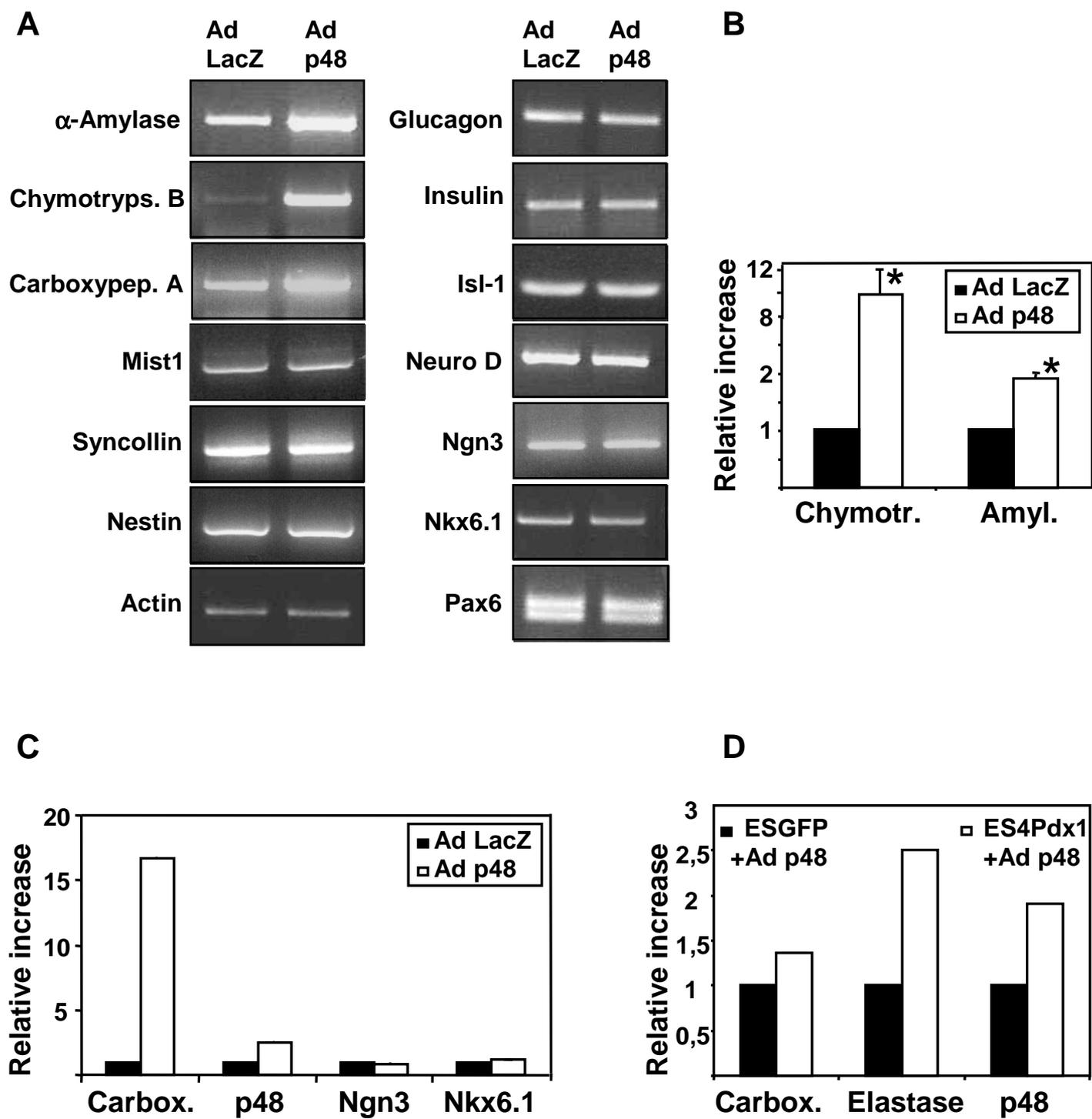


Figure 4

**A****B****C****Figure 5**



**Figure 6**

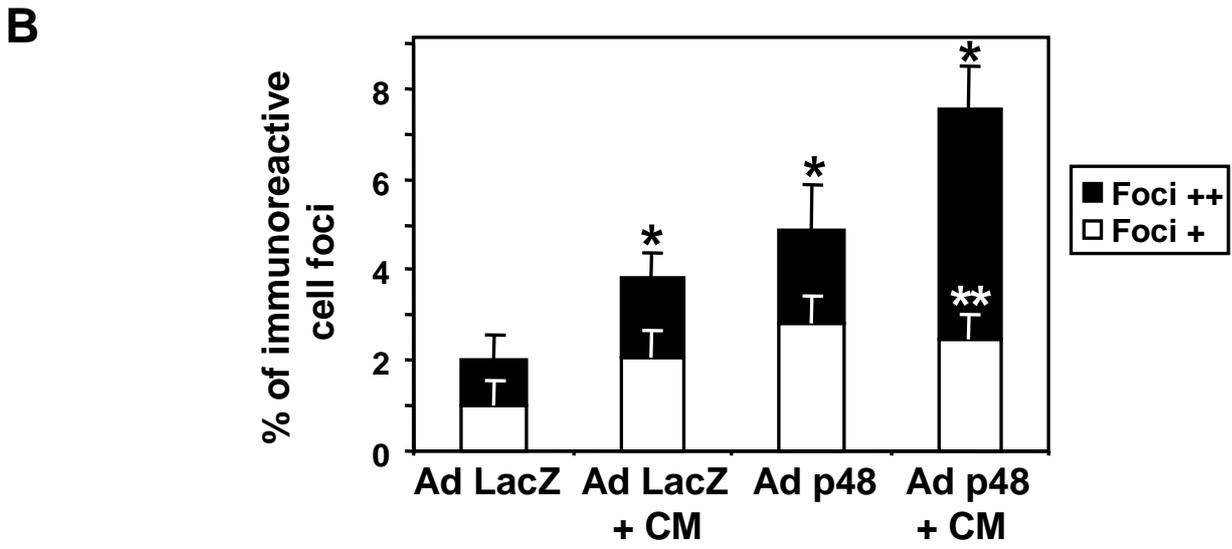
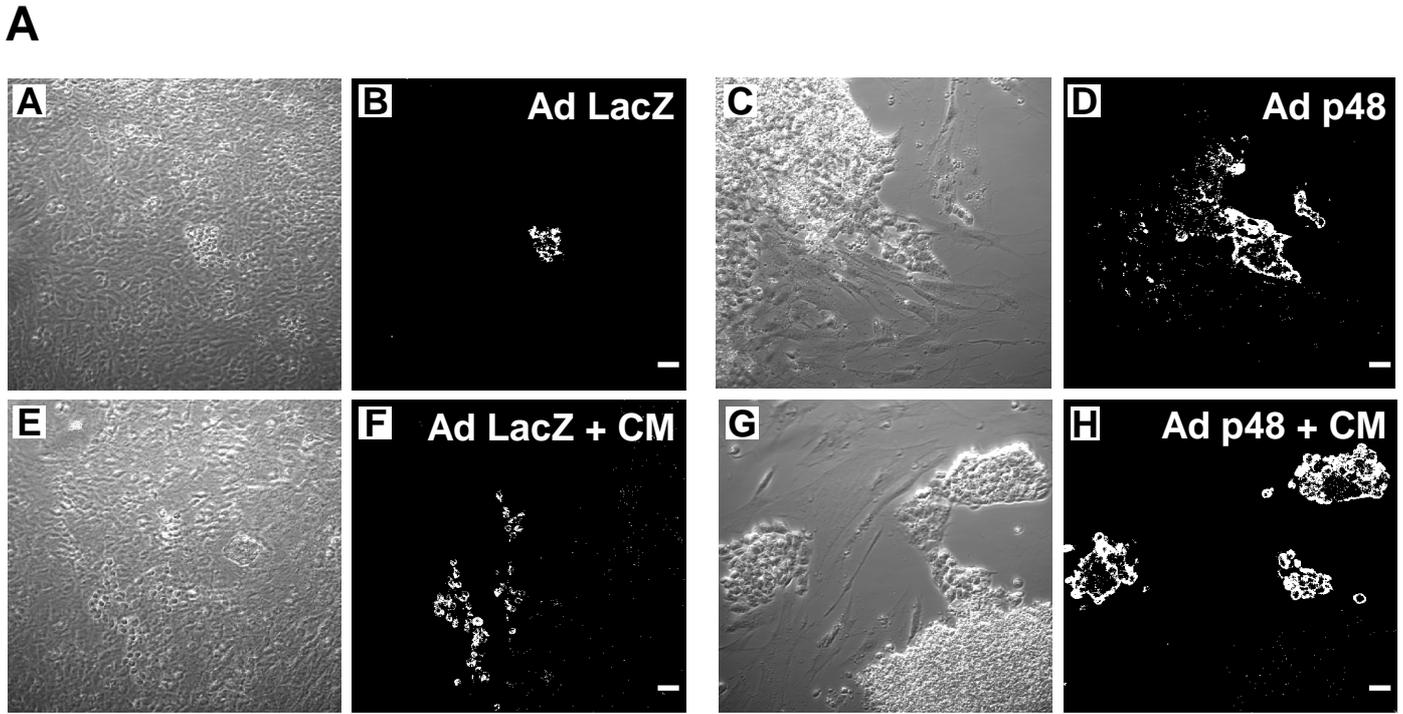


Figure 7



INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

**RESULTADOS**

1. Optimización de las condiciones de cultivo
2. Sobreexpresión de factores de transcripción
- 3. Selección genética**

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA



### **3. SELECCIÓN GENÉTICA DE LAS CÉLULAS ES COMPROMETIDAS AL LINAJE ACINAR**

Uno de los problemas principales de los protocolos de diferenciación de células ES es que en la mayoría de los casos los cultivos obtenidos son heterogéneos en cuanto contienen distintas poblaciones celulares. Con este fin se generó una línea celular ES *reporter* que mediante selección genética nos permitía purificar y enriquecer las células ES diferenciadas comprometidas al linaje acinar.

#### **3.1. ESTABLECIMIENTO DE UNA LINEA DE CÉLULAS ES REPORTER: pELAS**

##### **3.1.1. GENERACIÓN DEL PLÁSMIDO DE SELECCIÓN: pELAS**

Se generó para ello un plásmido de selección (ver apartado 3.1 de Materiales y Métodos) (Figura 3.8) que nos permitía aislar las células que habían activado un programa de diferenciación acinar por la expresión del promotor del gen de la elastasa, que es un promotor específico acinar

El plásmido pELAS (Figura 3.8) consta de una caja en la cual la expresión del gen de resistencia a puomicina y del gen *reporter* LacZ en un RNAm bicistrónico viene regulada por el promotor de elastasa, que es un gen específico acinar. Este promotor ha sido muy bien caracterizado tanto *in vivo* como *in vitro* (2, 147, 270, 271), conociéndose así la existencia de un *región* (- 500 + 8), que confiere especificidad de expresión en las células acinares. Por tanto, únicamente las células que han activado un programa de diferenciación acinar serán viables y seleccionadas. Por otro lado, el plásmido contiene una caja en la que un promotor de expresión constitutiva, PGK, regula la expresión del gen de resistencia a higromicina. Este promotor se expresa en las células ES indiferenciadas y por lo tanto permite seleccionar aquellas células que han integrado el plásmido en su genoma de forma estable.



Figura 3.8: Esquema del plásmido de selección genética, pELAS

### 3.1.2. ENSAYO DE LA FUNCIONALIDAD DEL PLÁSMIDO pELAS EN LÍNEAS CELULARES EN CULTIVO

Para ensayar la funcionalidad y especificidad del plásmido pELAS, se transfectaron distintas líneas celulares pancreáticas exocrinas (266-6 y AR42J) y no pancreáticas (293 y NIH3T3), de forma transitoria (266-6, AR42J, 293 y NIH3T3) y estable (266-6, 293). En las transfecciones transitorias, sólo obtuvimos células positivas para el gen *reporter* en las líneas pancreáticas acinares. Generamos también clones estables para el plásmido pELAS en la línea 266-6 que expresaba el gen *reporter*, como se puede observar en la Figura 9 por la tinción *in situ* de la actividad  $\beta$ -galactosidasa con X-gal. Observamos que los distintos clones estables de 266-6 presentaban una expresión heterogénea del gen *reporter*, que podría ser debida a que el lugar de integración del plásmido en el genoma de la célula ocurre al azar (Figura 3.9).

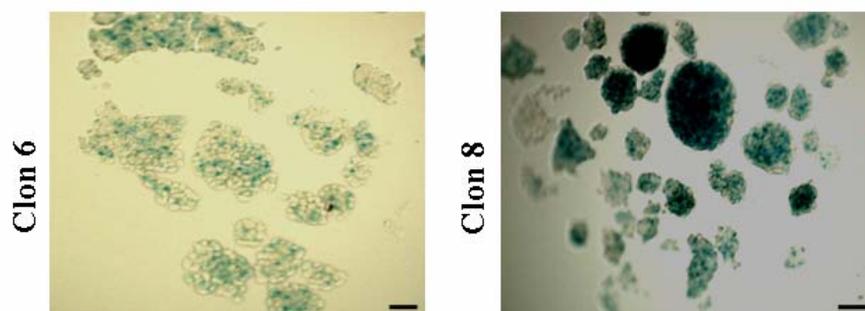


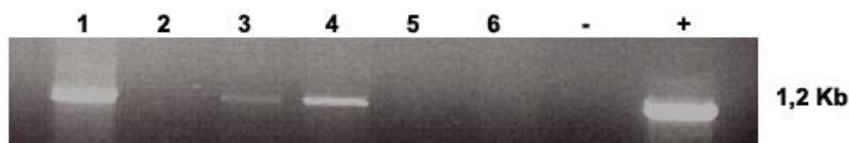
Figura 3.9: Imagen de contraste de fase de la actividad  $\beta$ -galactosidasa *in situ* de dos clones de células 266-6 transfectados de manera estable con el plásmido pELAS. Actividad  $\beta$ -galactosidasa *in situ* mediante tinción con X-gal. Barra = 50  $\mu$ m.

### 3.1.3. TRANSFECCIÓN DEL PLÁSMIDO pELAS EN CÉLULAS ES

Una vez testada la funcionalidad del plásmido pELAS, lo transfectamos en las células ES indiferenciadas mediante electroporación. Obtuvimos 175 clones estables resistentes a higromicina.

### • Análisis por PCR de DNA genómico de los clones celulares aislados

Debido a que el plásmido pELAS es de 12 Kb queríamos discriminar qué clones habían integrado la región promotora del gen de la elastasa y el gen de resistencia a puromicina. Por ello, diseñamos un oligonucleótido compatible con la secuencia del promotor de elastasa en su parte 5' y un oligonucleótido compatible con la parte 3' del gen de resistencia a puromicina para cribarlos mediante PCR utilizando DNA genómico (ver apartado 3.4.2 de Materiales y Métodos), esperando observar una banda de 1200 pb. Se analizaron 75 clones de los 175 obtenidos y 15 de ellos fueron positivos para la PCR (Figura 3.10).



**Figura 3.10: PCR de DNA genómico de algunos de los clones celulares resistentes a higromicina.** Utilizando oligonucleótidos para amplificar la región del promotor de elastasa y el gen de resistencia a puromicina, se observa la banda de 1,2 kb en los clones 1, 3 y 4, y los clones 2, 5 y 6 son negativos. El control negativo (-) es DNA genómico de células CGR8 parentales y el control positivo (+) es el DNA del plásmido de selección, pELAS.

### • Establecimiento de las condiciones de cultivo para la selección genética

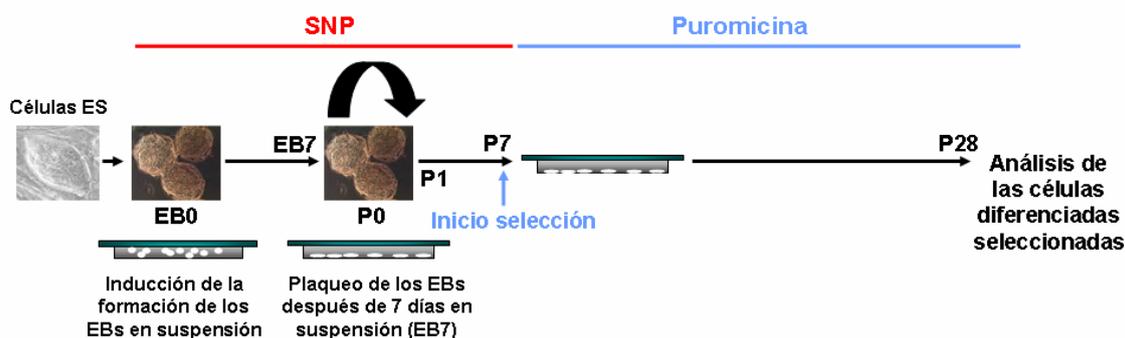
Como punto de partida, para analizar la concentración de puromicina adecuada para aislar células con fenotipo acinar a partir de nuestros clones de células ES, se realizaron pruebas preliminares en los clones de células 266-6 transfectadas establemente con el plásmido pELAS y en las células 266-6 parentales. A partir de concentraciones de antibiótico comprendidas entre 0,4-2  $\mu\text{g/ml}$ , se determinó como óptima la concentración de trabajo de 1,2  $\mu\text{g/ml}$ , puesto que después de 5 días la totalidad de las células 266-6 parentales habían muerto y los clones de células 266-6 estables para pELAS se mantenían perfectamente en cultivo.

En el caso de los clones de células ES, se analizaron las concentraciones de puromicina comprendidas entre 0,4 y 1,5  $\mu\text{g/ml}$ , usando como control las células ES parentales. En este caso la concentración de trabajo óptima fue de 0,8  $\mu\text{g/ml}$ . Añadiendo el antibiótico según el protocolo descrito en el apartado 6.3 de Materiales y Métodos, se

obtenía un 100% de mortalidad de las células ES parentales 4 días después. En cambio en los clones de células ES en diferenciación previamente cribados por PCR de DNA genómico, según se describe en el apartado anterior, se observaba la emergencia de colonias.

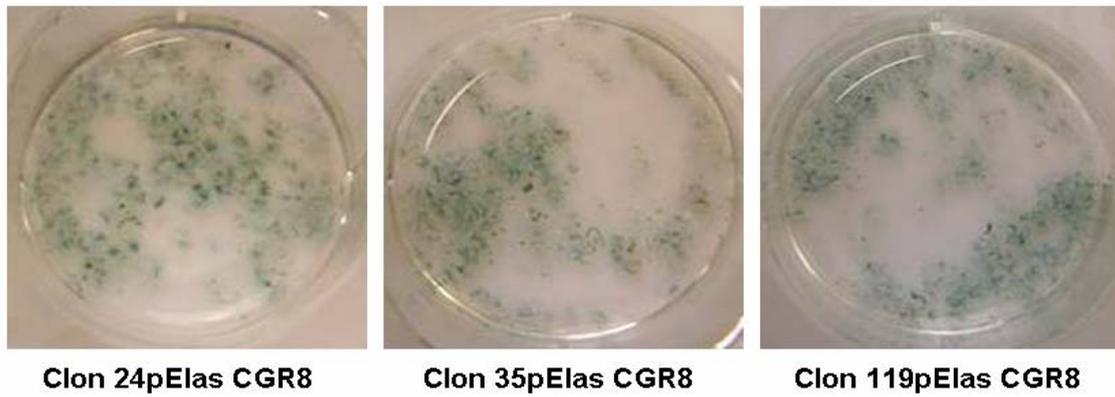
• **Análisis de la expresión del gen *reporter* (LacZ) en los clones de células ES que han integrado el plásmido pELAS**

Debido a que la integración del plásmido pELAS en el genoma de la célula ES tiene lugar al azar, podría integrarse en sitios del genoma transcripcionalmente muy activos pudiendo dar lugar a la expresión artefactual de los genes de la caja de selección en función del clon. Por ello, analizamos la expresión del gen *reporter* en 7 de los clones que habían sido positivos por PCR de DNA genómico, utilizando el protocolo de selección e incubando las células con SNP (Figura 3.11).



**Figura 3.11: Protocolo de selección de las células ES comprometidas al linaje acinar utilizando SN pancreático fetal (SNP).**

Al final del protocolo de selección determinamos la actividad  $\beta$ -galactosidasa *in situ* mediante tinción X-gal. Observamos que todos los clones regulaban la expresión del gen *reporter*, siendo ésta más intensa en los clones 24pElas, 35pElas y 119pElas que fueron los clones que usamos en los ensayos experimentales de esta memoria (Figura 3.12). En estas condiciones experimentales aproximadamente un 60 % de las células presentaban actividad  $\beta$ -galactosidasa según la observación macroscópica.

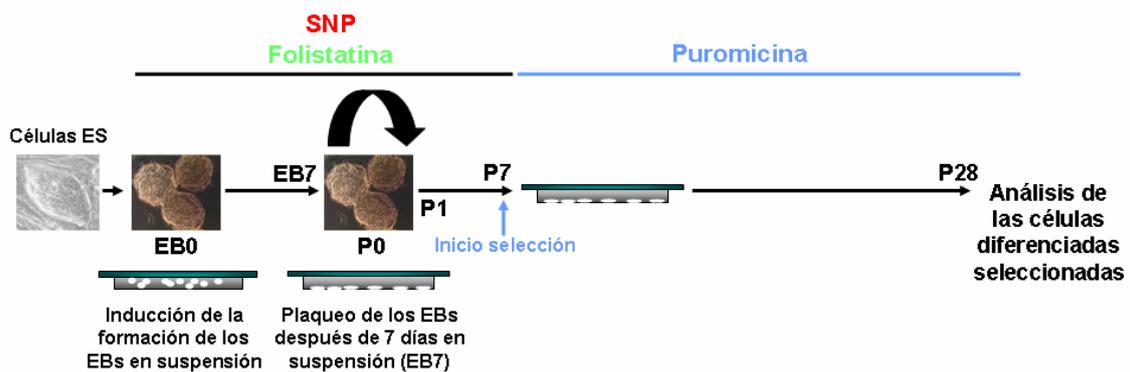


**Figura 3.12: Determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa *in situ* mediante tinción X-gal en tres de los clones ES de selección.** Imagen macroscópica de las placas en las que se han seleccionado células diferenciadas a partir de los tres clones de selección (24pElas, 35pElas y 119pElas).

### 3.2. ESTABLECIMIENTO DEL PROTOCOLO DE SELECCIÓN GENÉTICA DE LAS CÉLULAS COMPROMETIDAS AL LINAJE ACINAR

#### 3.2.1. PROTOCOLO DE SELECCIÓN UTILIZANDO SNP O FOLISTATINA

Analizamos por RT-PCR semicuantitativa las células diferenciadas incubadas con folistatina y con SNP utilizando el protocolo de selección (ver apartado 6.3 de Materiales y Métodos) con los clones 24pElas, 35pElas y 119pElas (Figura 3.13).

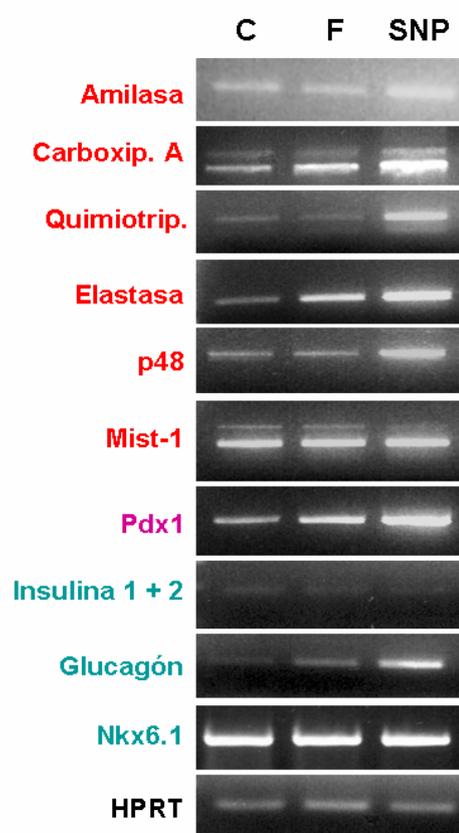


**Figura 3.13: Protocolo de selección de las células ES diferenciadas comprometidas al linaje acinar utilizando SN pancreático fetal (SNP) o folistatina.**

Así, demostramos que folistatina inducía un incremento en la expresión de sólo algunos de los marcadores exocrinos (carboxipeptidasa A, elastasa y Pdx1) mientras que el SNP era capaz de inducir un incremento en la expresión de marcadores que folistatina no regulaba (amilasa, quimiotripsinógeno y p48) (Figura 3.14). Además, en

general, el incremento en muchos de los marcadores exocrinos (carboxipeptidasa A, elastasa y Pdx1) era mayor. Por otro lado, la expresión de Mist-1 no variaba en ninguna de las condiciones de diferenciación.

La expresión de marcadores endocrinos era muy baja en todos los casos en comparación a la de los marcadores exocrinos puesto que se detectaron con un número de ciclos de PCR mucho mayor. Sin embargo, tanto folistatina como SNP incrementaban la expresión de glucagón (Figura 3.14).



**Figura 3.14: Análisis de la expresión de marcadores pancreáticos en las células diferenciadas seleccionadas tratadas con SNP o folistatina por RT-PCR semicuantitativa.** HPRT es el marcador usado como gen *housekeeping*. C = control (células sin tratar); F = folistatina (células tratadas con folistatina); SNP = sobrenadante pancreático fetal (células tratadas con sobrenadante pancreático fetal). Las RT-PCR semicuantitativas muestran la expresión de los marcadores en el clon de células ES 119pElas que es representativa de los resultados obtenidos con los demás clones.

Así que, a pesar de que folistatina tenía un efecto selectivo en el incremento de la expresión de marcadores exocrinos en los protocolos EB7P7 como se ha descrito en el apartado 1.2 de Resultados, este efecto se perdía en parte durante el protocolo de selección (Figura 3.14). Esto podría ser debido a que durante la diferenciación EB7P7,

folistatina no incrementaba la expresión de elastasa, resultando en la pérdida durante la selección de las poblaciones celulares acinares inducidas.

Así pues, a pesar de que el efecto del SNP no es selectivo para el linaje exocrino éste sigue siendo más elevado que el efecto observado con folistatina utilizando el protocolo de selección y por ello decidimos trabajar únicamente con el SN pancreático en los siguientes experimentos de selección genética.

### **3.2.2. PROTOCOLO DE SELECCIÓN UTILIZANDO SNP E INFECCIÓN CON ADENOVIRUS: INFECCIÓN SIMPLE VERSUS CO-INFECCIÓN**

Para incrementar la eficiencia del sistema se integró en el protocolo de selección la sobreexpresión de factores de transcripción claves en el desarrollo de las células acinares mediante adenovirus recombinantes. Debido al poco conocimiento que se tiene sobre estos factores se analizó el efecto de p48 y Mist-1, cuya función ha sido más bien caracterizada. p48 es un factor de transcripción de tipo bHLH que, como se ha descrito en la Introducción, se expresa en los precursores pancreáticos (20, 137) y más tarde, en el desarrollo restringe su expresión al linaje acinar siendo muy importante también para la regulación de la expresión de los enzimas digestivos. Mist-1 es un factor de transcripción de tipo bHLH que se expresa en las células acinares en diferenciación, cuya expresión regula la polaridad celular, la funcionalidad, y el mantenimiento de la identidad de las células acinares (72, 128, 173, 231, 247, 306)

Abordamos la sobreexpresión de estos factores con adenovirus (Ad) por distintos motivos. En primer lugar, queríamos sobreexpresar de manera transitoria p48 ya que este factor de transcripción presenta una actividad antiproliferativa independiente de su actividad transcripcional, tanto en células pancreáticas como no pancreáticas (239). En segundo lugar, se pretendía investigar si la expresión de genes claves para el desarrollo/diferenciación pancreática de forma transitoria es capaz de activar el programa de diferenciación endógeno.

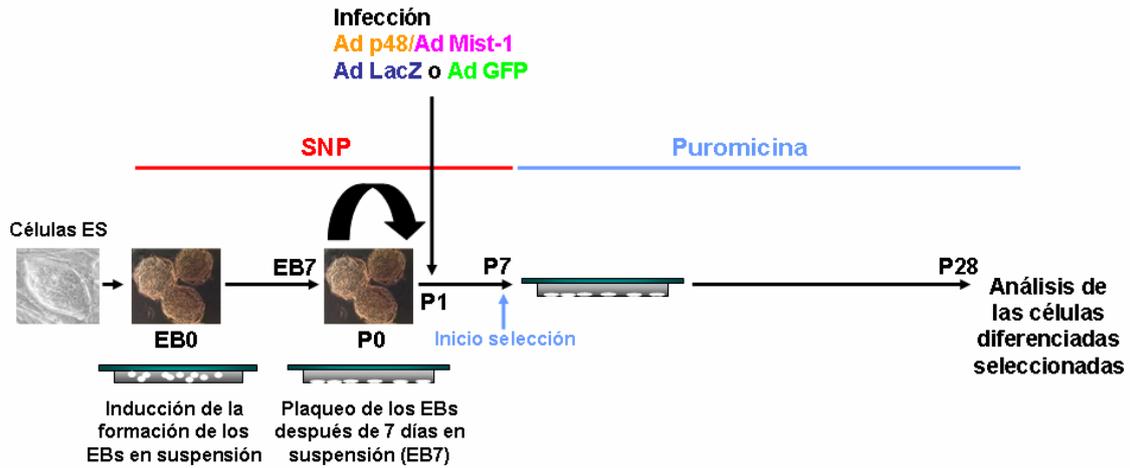
- **Eficiencia de infección de las células ES en diferenciación con adenovirus recombinantes: infección simple.**

Nuestro interés era sobreexpresar los factores transcripcionales en células en diferenciación con tal de forzar la adquisición de un fenotipo acinar previa selección genética y así, enriquecer específicamente la población celular que ha activado un programa de diferenciación acinar. También se pretendía incrementar a la vez el grado de diferenciación de éstas.

La transducción génica se realizó un día después de plaquear los EBs (EB7P1), y se analizó el rango de MOI óptima que nos permitiera obtener una elevada eficiencia de infección sin efectos tóxicos. Se analizaron rangos comprendidos entre 20-100 MOI, observándose que hasta una MOI de 75 se obtenía una eficiencia de infección muy parecida mientras que la viabilidad celular empezaba a comprometerse a partir de una MOI de 100. Trabajamos finalmente con una MOI de 20 para cada uno de los adenovirus con tal de realizar co-infecciones con una eficiencia elevada y sin observar efectos tóxicos. La eficiencia de infección fue de un 70% para el Adp48 (Rovira et al., 2006) y de un 50-60% para el AdMist-1.

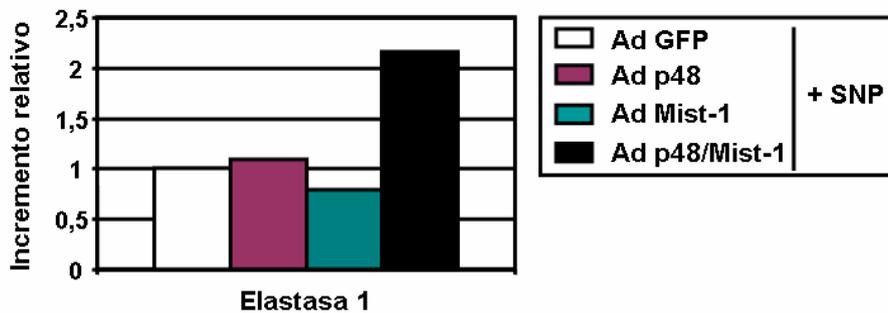
- **Efecto de la infección simple versus la co-infección**

Lo primero que quisimos analizar fue el efecto de la transducción simple a EB7P1 de p48 o de Mist-1 o bien el efecto de la co-expresión de ambos simultáneamente, en condiciones en las que los cultivos estaban suplementados con SNP (Figura 3.15). Como adenovirus control de infección se usó el adenovirus que expresa GFP.



**Figura 3.15: Protocolo de selección de las células ES utilizando SNP e infección simple o co-infección con adenovirus que expresaban p48 o Mist-1.** Los adenovirus que expresaban GFP o LacZ son adenovirus control de infección.

Por RT-PCR cuantitativa analizamos la expresión de elastasa I en las células seleccionadas obtenidas, ya que el promotor del gen que codifica para este enzima es el que usamos para seleccionar las células. Observamos que la transducción de un único factor de transcripción no incrementaba la expresión de elastasa I, pero sí cuando se sobreexpresaban p48 y Mist-1 al mismo tiempo (Figura 3.16). Estos resultados sugieren que incubando las células con SNP y co-infectándolas con adenovirus que expresan los dos factores de transcripción durante el protocolo de selección p48 y Mist-1 actúan, i) sobre una población que expresa elastasa, expandiéndola, ii) induciendo la diferenciación al linaje acinar de una población precursora, o iii) incrementando la expresión del mRNA de elastasa I en una población comprometida ya al linaje acinar.



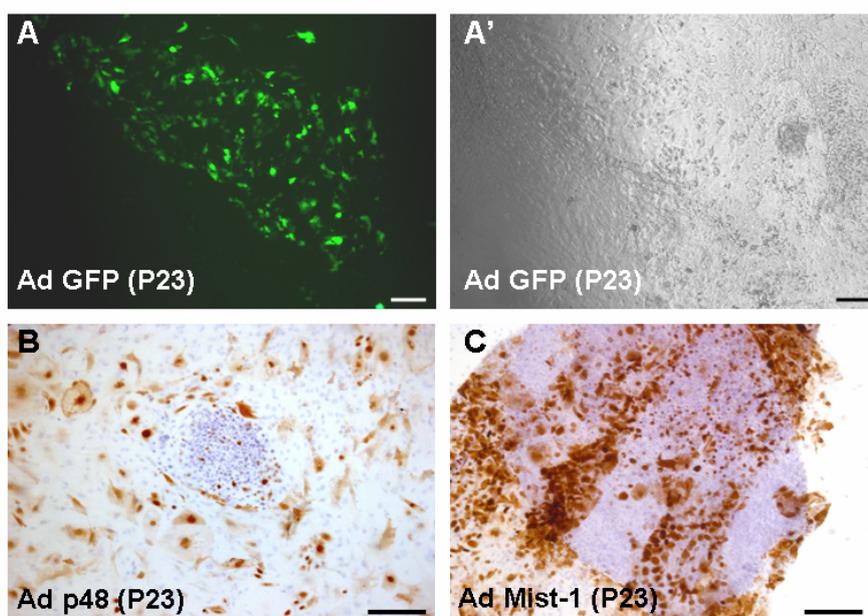
**Figura 3.16: Análisis de la expresión de elastasa I por RT-PCR cuantitativa en las células diferenciadas seleccionadas con puromicina: infección simple versus co-infección.** Expresión de transcritos de RNAm de elastasa I en las células diferenciadas seleccionadas tratadas con SNP e infectadas con Ad GFP, Ad p48, Ad Mist-1 o simultáneamente con Ad p48 y Ad Mist-1. SNP = sobrenadante pancreático fetal.

### 3.2.3. PROTOCOLO DE SELECCIÓN UTILIZANDO SNP Y CO-INFECCIÓN CON p48 Y Mist-1: INFECCIÓN ÚNICA VERSUS MÚLTIPLE

Una vez observado que la co-infección incrementaba, al menos, la expresión de elastasa, y sabiendo que los genes transducidos mediante infección adenoviral se expresan transitoriamente, se analizó si la co-infección múltiple, es decir, infectar las células, al menos, dos veces en el tiempo (EB7P1 y EB7P21) durante el protocolo de selección genética, incrementaba el grado de diferenciación de las células que ya han activado el programa de diferenciación acinar. Como en los apartados anteriores, el medio de cultivo también se suplementó con SNP (ver apartado 6.3 de Materiales y Métodos) (Figura 3.18).

- **Eficiencia de infección de las células ES en diferenciación con adenovirus recombinantes: co-infección múltiple**

La eficiencia de infección que obtenemos a EB7P21 es de aproximadamente un 40% (Figura 3.17) a diferencia del 50-70% que se obtiene a EB7P1. En estos experimentos no se incrementó la MOI para mejorar esta eficiencia ya que las células en selección presentaban mayor sensibilidad a la infección adenoviral.

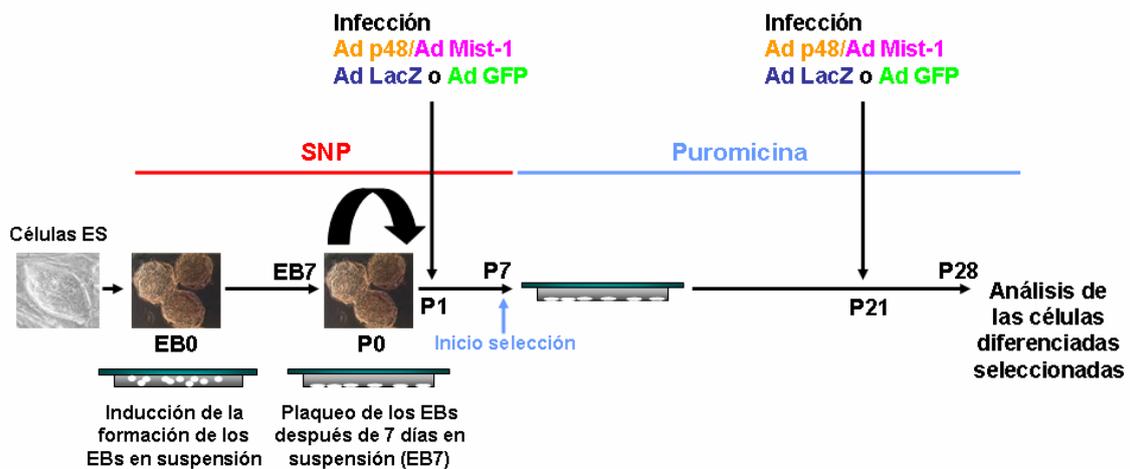


**Figura 17: Análisis de la eficiencia de la infección adenoviral a EB7P21.** A) Expresión de GFP en las células infectadas con el Ad GFP dos días después (P23) de la infección a EB7P21. Imagen de microscopía confocal. A') Imagen de contraste de fase de las células de la imagen A.

**B)** Inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo anti-p48, de las células infectadas con Ad p48 y Ad Mist-1 dos días después (P23) de la infección a EB7P21. **C)** Inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo anti-Mist-1 de las células infectadas con Ad p48 y Ad Mist-1 dos días después (P23) de la infección a EB7P21. Barra = 50µm.

**• Análisis de la expresión de marcadores pancreáticos por RT-PCR semicuantitativa**

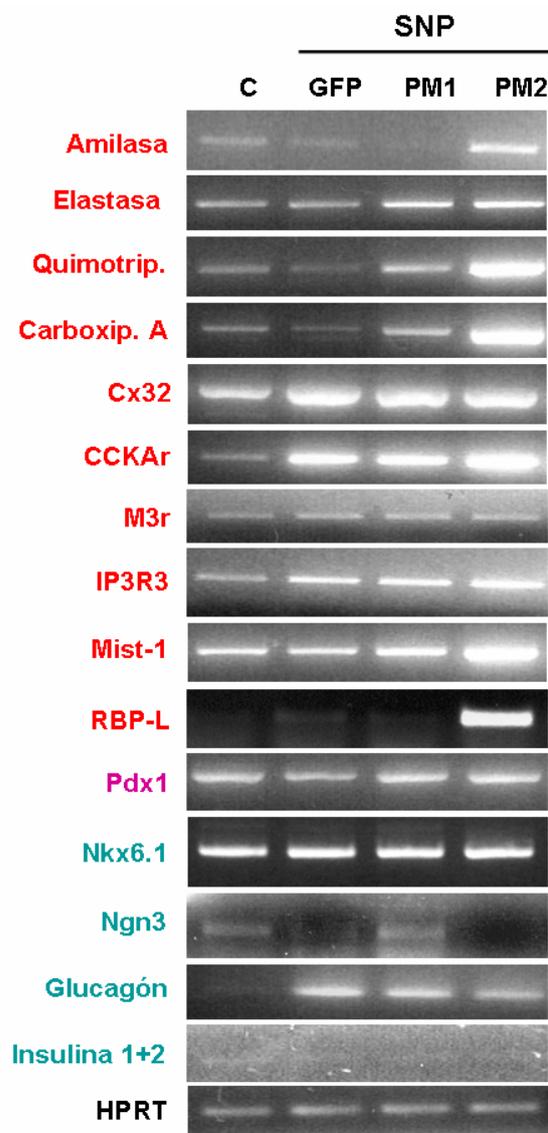
El análisis por RT-PCR semicuantitativa, nos permitió detectar el efecto de la infección adenoviral sobre la viabilidad celular a EB7P21 descrito anteriormente, puesto que en las condiciones experimentales en las que se utilizaba el AdGFP control no se observaba el efecto inductor promovido por el SNP sobre la expresión de genes pancreáticos. (Figura 3.14). Este es el caso para los marcadores carboxipeptidasa A, quimiotripsinógeno, elastasa, p48, Pdx1 y glucagón (Figura 3.19). Otra posibilidad es que tenga lugar una pérdida del fenotipo diferenciado.



**Figura 3.18: Protocolo de selección de las células ES comprometidas al linaje acinar utilizado sobrenadante pancreático fetal (SNP) y co-infección única (PM1) o múltiple (PM2) mediante adenovirus que expresan p48 y Mist-1. Los adenovirus que expresan GFP o LacZ son adenovirus control de infección.**

Por otro lado, observamos que la transducción única de p48 y Mist-1 a EB7P1 (PM1) inducía un incremento de la expresión de marcadores exocrinos como elastasa, quimiotripsinógeno y carboxipeptidasa A. En cambio, no se regulaba la expresión de marcadores de la ruta secretora CCKAr, M3r e IP3R3 o de marcadores como Cx32, un componente de las uniones de comunicación, cuya expresión desaparece en el ratón deficiente de Mist1 (247). De hecho, la expresión de estos marcadores ya se incrementaba al incubar las células con SNP (AdGFP). Asimismo, tampoco se

modulaba la expresión del factor de transcripción RBP-L, miembro del complejo transcripcional PTF1 que regula la expresión de los enzimas digestivos (20) ni la expresión de marcadores endocrinos (Figura 3.19).



**Figura 3.19: Análisis de la expresión de marcadores pancreáticos en las células seleccionadas por RT-PCR semicuantitativa.** Expresión de marcadores exocrinos y endocrinos en las células seleccionadas sin tratar (control = C, condición 1) o tratadas con SNP y además infectadas con Ad GFP (GFP, condición 2) o Ad p48 y Mist-1 simultáneamente una única vez (PM1) a EB7P1 (infección única) o dos veces (PM2, condición 3) a EB7P1 y EB7P21 (infección múltiple). HPRT es el marcador usado como *gen housekeeping*. SN = sobrenadante pancreático fetal; Quimiotrip. = quimiotripsinógeno; Carboxip. A = carboxipeptidasa A.

Por último, el análisis de la infección múltiple, es decir infectar las células con los adenovirus que expresan p48 y Mist-1 a EB7P1 y a EB7P21 (PM2) nos inducía un incremento, mucho mayor que la infección única, de la expresión de enzimas digestivos

como amilasa, carboxipeptidasa A y quimiotripsinógeno. Este incremento correlaciona con un aumento notable en los niveles de RBP-L. El incremento de la expresión de Mist-1 es seguramente debida a la propia infección con Mist-1 a EB7P21, al no poder discriminar la forma exógena de la endógena. Por otro lado, la infección múltiple incrementaba la expresión de marcadores cuya expresión no se regulaba con la infección única, como amilasa, CCKAr e IP3R3. Respecto a los marcadores endocrinos la infección múltiple parecía disminuir la expresión de glucagón y Ngn3, mientras que la expresión de insulina era prácticamente siempre indetectable (Figura 3.19). Estos datos demuestran que nuestros cultivos estaban específicamente enriquecidos de células que según la expresión de marcadores de diferenciación comparten características fenotípicas con las células acinares.

Podemos concluir que la co-transducción de genes claves para el desarrollo y diferenciación acinar de forma múltiple conduce a un incremento de la expresión de marcadores exocrinos en una magnitud mayor que la co-transducción única, sugiriendo que el mantenimiento de la expresión de estos genes a lo largo del protocolo de selección nos permite obtener células con un fenotipo acinar más diferenciado. Así pues, nos centramos en la caracterización de las células diferenciadas a partir del clon de células ES reporter 119pElas obtenidas con el protocolo de selección genética utilizando las condiciones experimentales de incubación con SNP y co-infección múltiple con los adenovirus que expresan p48 y Mist-1 (PM2).

En el resto de la memoria, a efectos de simplificación, para nombrar las diferentes condiciones analizadas del protocolo de selección utilizaremos los términos **condición 1 (C)** para hacer referencia a la condición control en las que las células se han diferenciado espontáneamente; **condición 2 (SN GFP/ SN LACZ)** para hacer referencia a la condición en que las células se han incubado con el SNP e infectado con el adenovirus control de infección que expresa GFP o LacZ; y **condición 3 (SN PM2)** para hacer referencia a la condición en que las células se han incubado con el SNP e infectado con los adenovirus que expresan p48 y Mist-1 dos veces durante el protocolo (EB7P1 y EB7P21).

### 3.3. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LAS CÉLULAS ES DIFERENCIADAS

Debido a que habíamos demostrado que el gen *reporter* se expresaba más en la condición 3, se analizó en cuáles de las condiciones experimentales se seleccionaba un mayor número de células. Para cuantificarlo, se realizaron contajes celulares a partir de células obtenidas en las etapas EB7P7 (pre-seleccionadas) y EB7P28 (seleccionadas) (Figura 3.20A). Se determinó que tras selección, en las condiciones 2 y 3 en las que se había incubado las células con SNP, se obtenía el doble aproximadamente de células respecto a la condición 1. Este resultado se puede explicar en parte, debido al efecto mitogénico de los SNP que se observa ya durante la pre-selección (Figura 3.2).

Sin embargo, cuando se analizó la capacidad proliferativa de las células en estas etapas mediante incorporación de BrDu (Figura 3.20B), se observó que precisamente en las condiciones 2 y 3 las células tenían una capacidad proliferativa menor respecto a la condición 1. Además, este efecto era más pronunciado en la condición 3, probablemente debido en parte al efecto antiproliferativo de p48.

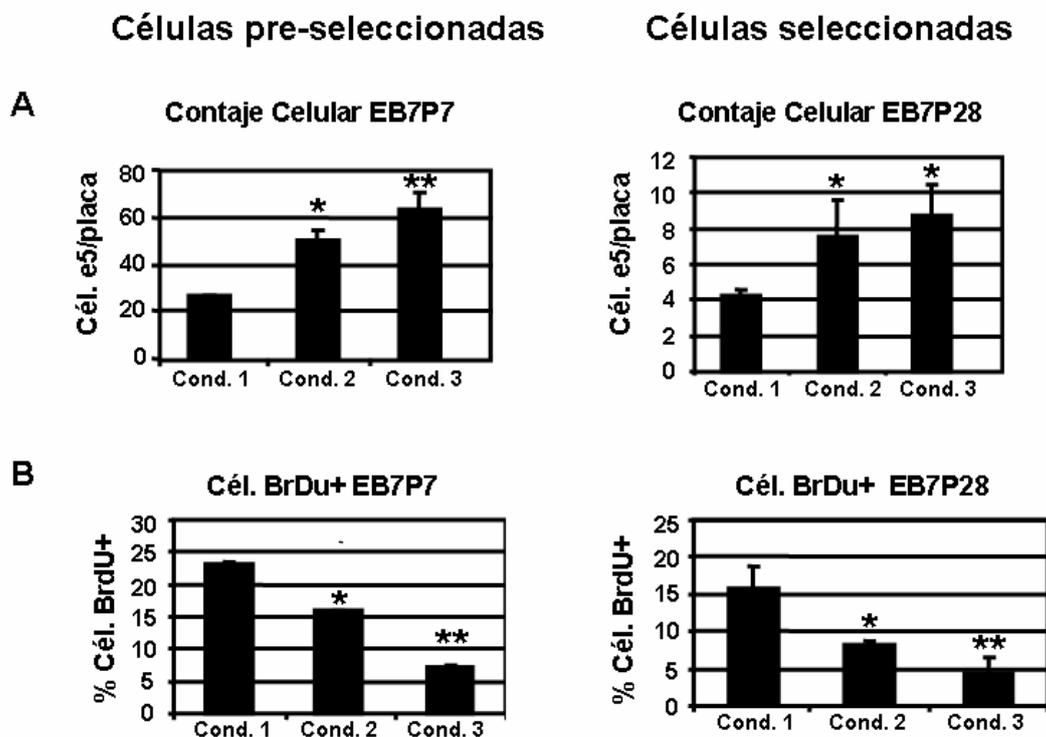


Figura 3.20: Análisis de la capacidad proliferativa de las células ES diferenciadas pre-selección (EB7P7) y tras la selección (EB7P28). A) Contaje de las células a EB7P7 y EB7P28.

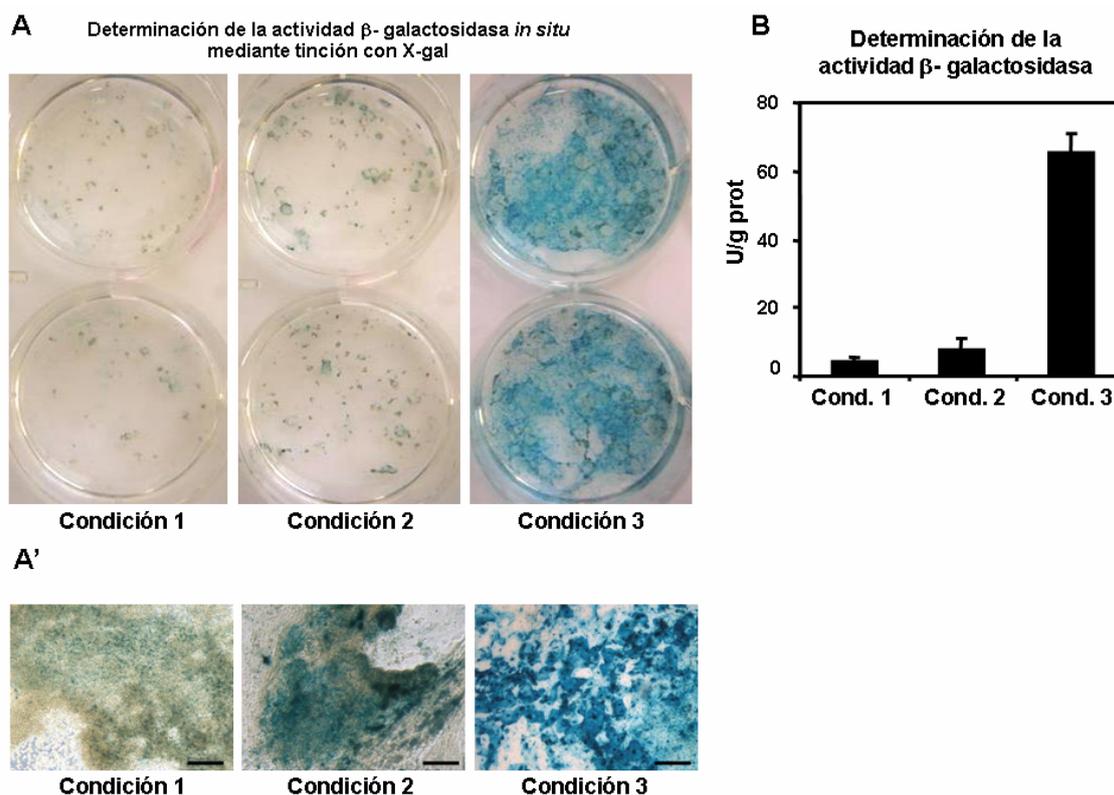
**B)** Incorporación de BrDu. Condición 1 = control (C). Condición 2 = SN + Ad GFP (SN GFP). Condición 3 = SN + Ad p48/Ad Mist-1 (SN PM2). \* =  $p < 0,05$ . \*\* =  $p < 0,01$ .

En general, existe una relación inversamente proporcional entre proliferación celular y diferenciación, de manera que las células más diferenciadas tienen una capacidad proliferativa menor. Por ese motivo, caracterizamos con más detalle el patrón de expresión de marcadores pancreáticos.

### **3.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CÉLULAS DIFERENCIADAS OBTENIDAS CON EL PROTOCOLO DE SELECCIÓN UTILIZANDO SNP Y CO-INFECCIÓN MÚLTIPLE**

#### **3.4.1. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA EN LAS CÉLULAS SELECCIONADAS**

Analizamos la eficiencia de selección mediante la determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa tanto *in situ* mediante tinción X-gal (Figura 3.21A-A') como bioquímicamente a partir de lisados celulares (Figura 3.21B). Observamos una activación de beta-galactosidasa proporcional al grado de expresión de los marcadores acinares descritos en la Figura 3.19. Así, en la condición 1, se detectó un marcaje principalmente débil en un 60% de las células mientras que en la condición 2, se observaron células marcadas más intensamente. Finalmente, en la condición 3 se detectó la actividad del gen *reporter* en todas las células y esta actividad incrementaba notablemente en todas ellas. De hecho, se determinó un incremento de hasta 60 veces o más (ya que nos encontrábamos en condiciones saturantes al medir la actividad  $\beta$ -galactosidasa con ONPG) en los niveles de esta actividad.

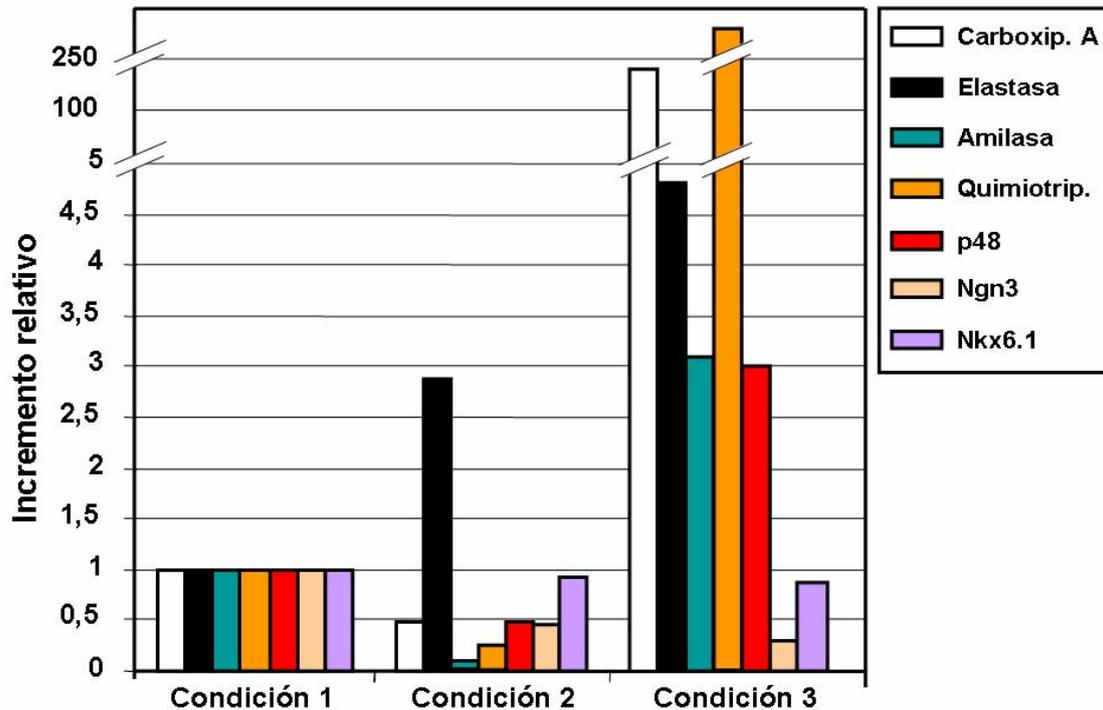


**Figura 3.21: Análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las células seleccionadas *in situ* (X-gal) o bioquímicamente en los lisados celulares (ONPG).** A) Imágenes macroscópicas de la tinción de la actividad  $\beta$ -galactosidasa *in situ* en las células diferenciadas seleccionadas en las condiciones 1, 2 y 3. A') Imágenes microscópicas de contraste de fase (objetivo 10X) de la tinción de la actividad  $\beta$ -galactosidasa con X-gal en las células diferenciadas seleccionadas en las condiciones 1, 2 y 3. B) Gráfica de las medidas de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en los lisados celulares expresadas en unidades por gramo de proteína (U/g proteína). Cond. = Condición. Barra = 100 $\mu$ M.. Condición 1 = control (C). Condición 2 = SN + Ad GFP (SN GFP). Condición 3 = SN + Ad p48/Ad Mist-1 (SN PM2).

### 3.4.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES PANCREÁTICOS POR RT-PCR CUANTITATIVA

El análisis por RT-PCR cuantitativa (Figura 3.22) mostró que en la condición 3 tenía lugar el mayor incremento en la expresión de enzimas digestivas tales como amilasa, elastasa, carboxipeptidasa A y quimiotripsinógeno, que en algunos casos era de hasta 100 veces más) y también del factor de transcripción p48. Es importante destacar que el p48 amplificado por RT-PCR cuantitativa era el endógeno de ratón y no el transgen exógeno que expresa el adenovirus recombinante. Por otro lado, se observó una disminución en los niveles del RNAm del factor de transcripción Ngn3 y no se modulaban los niveles Nkx6.1. La expresión de insulina I fue indetectable.

También observamos que en las células de la condición 2 tenía lugar un incremento en la expresión de elastasa pero la expresión de otros marcadores exocrinos disminuía (carboxipeptidasa A, p48, amilasa y quimiotripsinógeno). Estos resultados confirman, en parte, los obtenidos en la Figura 3.19.



**Figura 3.22: Análisis de la expresión de marcadores pancreáticos por RT-PCR cuantitativa de las células diferenciadas seleccionadas.** RT-PCR cuantitativa de marcadores exocrinos: carboxipeptidasa A, elastasa, amilasa, quimiotripsinógeno y p48; y marcadores endocrinos Ngn3 y Nkx6.1 de las células diferenciadas seleccionadas en la condición 1, 2 y 3. Carboxip. A= carboxipeptidasa A; Quimiotrip. = quimiotripsinógeno; SN = sobrenadante pancreático fetal. Condición 1 = control (C). Condición 2 = SN + Ad GFP (SN GFP). Condición 3 = SN + Ad p48/Ad Mist-1 (SN PM2).

### 3.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN MEDIANTE INMUNOFUORESCENCIA

#### 3.5.1. Expresión de E-cadherina y $\beta$ -catenina.

Las células acinares son células epiteliales que forman uniones de adhesión entre ellas. Por ello, se analizó la expresión de E-cadherina, marcador epitelial y  $\beta$ -catenina, uno de los componentes de los uniones de adhesión mediante inmunofluorescencia. Observamos que prácticamente la totalidad de las células seleccionadas expresaban E-cadherina, indicándonos que las células seleccionadas eran de origen epitelial. Tanto E-

cadherina como  $\beta$ -catenina se localizaban en la membrana celular en las zonas de contacto célula-célula (Figura 3.23).

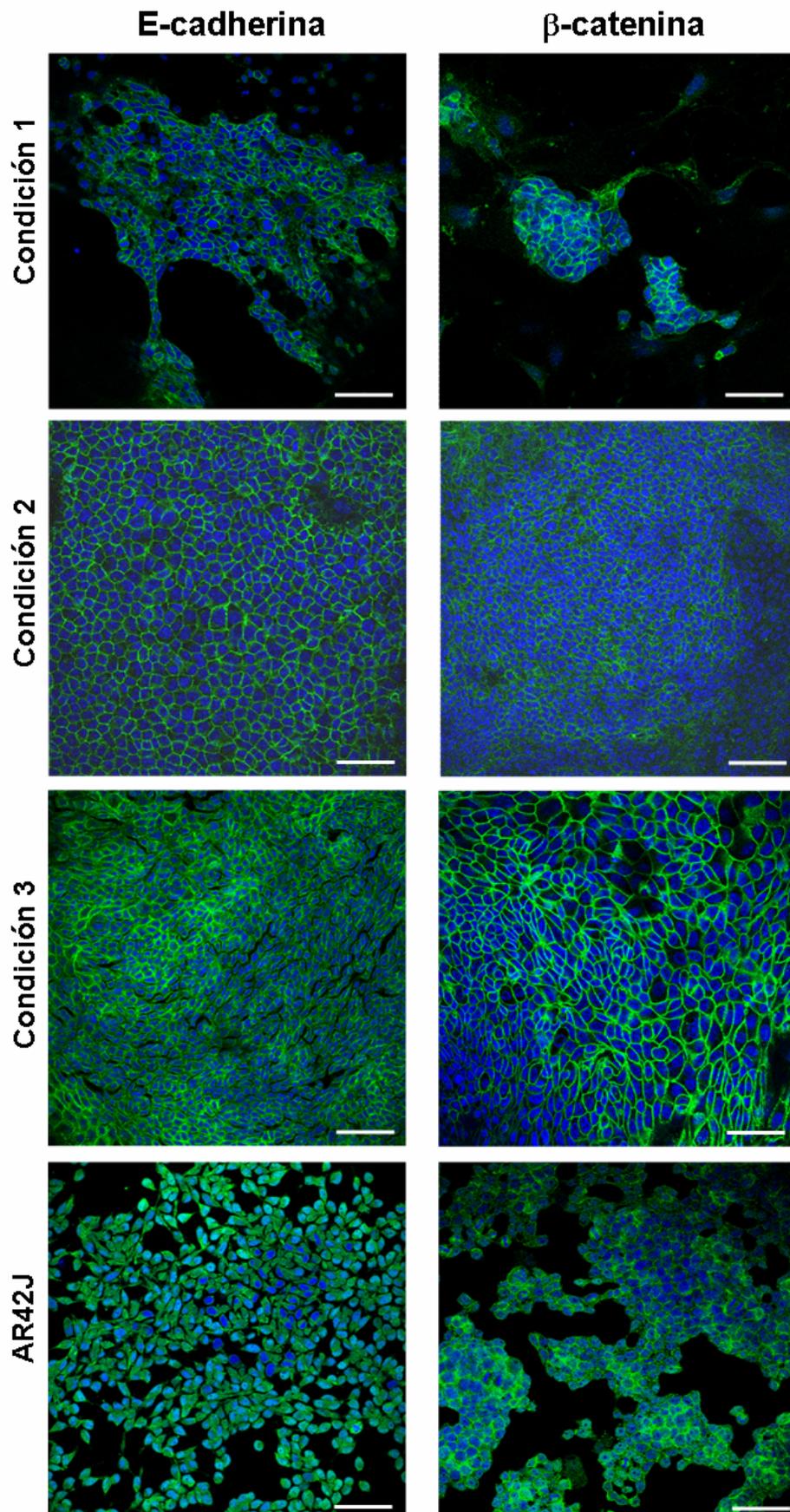


Figura 3.23: Imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias de las células diferenciadas seleccionadas realizadas con anticuerpos anti-E-cadherina y anti- $\beta$ -catenina.

Los marcajes se realizaron con células obtenidas en las condiciones 1, 2 y 3. Expresión de E-cadherina y  $\beta$ -catenina (verde) y tinción de núcleos con To-pro3 (azul). Barras = 50  $\mu$ m. Condición 1 = control (C). Condición 2 = SN + Ad GFP (SN GFP). Condición 3 = SN + Ad p48/Ad Mist-1 (SN PM2).

### 3.5.2. Expresión de enzimas digestivos

Una vez confirmado el fenotipo epitelial, se analizó la expresión de enzimas digestivos mediante inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos específicos contra amilasa y carboxipeptidasa A. Observamos que en las tres condiciones había células positivas para ambos enzimas digestivos, pero la proporción de células positivas aumentaba en la condición 2 y era todavía mayor en la condición 3, aproximadamente del 70%, siendo esta última condición la que presentaba mayor proporción de células marcadas así como con una mayor intensidad del marcaje (Figura 3.24).

Para ambos enzimas digestivos se observaba un patrón de expresión tanto citoplasmático como nuclear en las células de la condición 1. Esta localización nuclear no se observa nunca en el páncreas, aunque se ha descrito que en el ratón deficiente para Mist-1 se localiza amilasa en el núcleo de las células acinares en secciones de páncreas del estadio de E16.5, patrón de expresión que no se observa en animales salvajes (128). En estos ratones no se ha analizado el patrón de expresión de carboxipeptidasa A, pero al tratarse también de un enzima digestivo es posible que el patrón de expresión sea el mismo que el observado con amilasa. Tanto en las células de la condición 2 como 3 la localización de carboxipeptidasa A y amilasa era citoplasmática.

Así pues estos resultados demuestran que con el protocolo de selección utilizando SNP y co-infección múltiple (condición 3) el número de células que expresan enzimas digestivos es mayor así como la intensidad del marcaje, y además la localización de estos es la misma que se detecta en las líneas celulares acinares en cultivo, demostrando que las células diferenciadas seleccionadas presentan un fenotipo más diferenciado que las células de la condición 1 y 2.

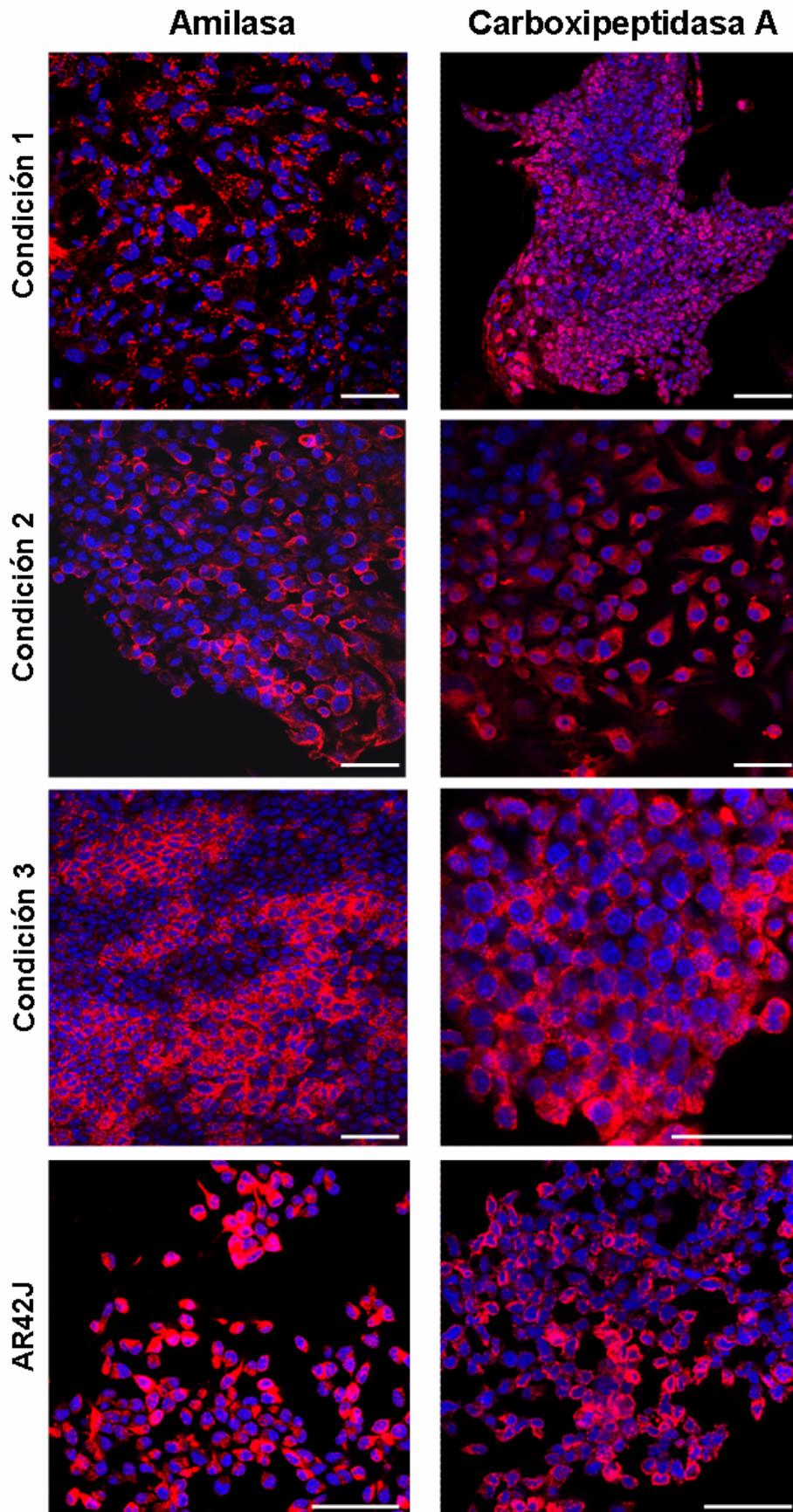


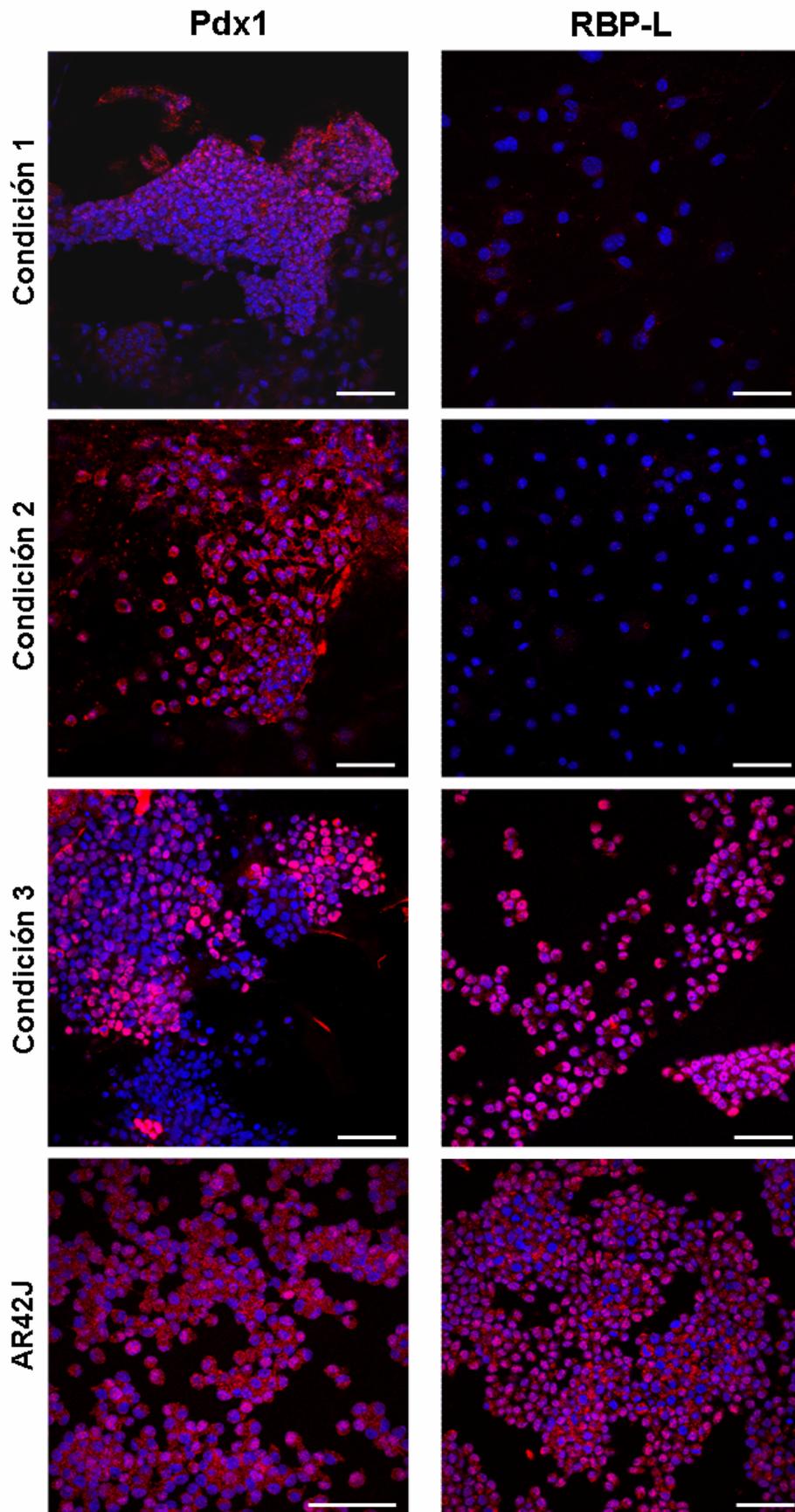
Figura 3.24: Imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias de las células diferenciadas seleccionadas realizadas con anticuerpos anti-amilasa y anti-

**carboxipeptidasa A.** Los marcajes se realizaron con células obtenidas en las condiciones 1, 2 y 3. Expresión de amilasa y carboxipeptidasa A (rojo) y tinción de núcleos con To-pro3 (azul). Como control de expresión se usó la línea celular acinar AR42J. Barras = 50  $\mu$ m. Condición 1 = control (C). Condición 2 = SN + Ad GFP (SN GFP). Condición 3 = SN + Ad p48/Ad Mist-1 (SN PM2).

### **3.5.3. Expresión de factores de transcripción pancreáticos.**

Con tal de analizar la expresión de factores de transcripción implicados en la diferenciación acinar se realizaron inmunofluorescencias para detectar la expresión de Pdx1 y RBP-L. Observamos que el patrón de expresión de Pdx1 era tanto citoplasmático como nuclear en todas las condiciones, pero la intensidad del marcaje aumentaba en las condiciones 2 y 3. Además en la condición 3, la proporción de células que presentaba un patrón de expresión nuclear, como el que se observa en la línea celular acinar 266-6 aumentaba si bien no en todas las células. Prácticamente no se detectaron células RBP-L positivas en las condiciones 1 y 2. En cambio en la condición 3 se observaban grupos de células que expresaban RBP-L nuclearmente (Figura 3.25).

En resumen, hemos demostrado que en las células de la condición 2 hay un incremento de la expresión Pdx1 con un patrón tanto nuclear como citoplasmático, pero éstas no expresan RBP-L. Por otro lado, las células de la condición 3 expresan tanto RBP-L como Pdx1 con un patrón de expresión mayoritariamente nuclear.



**Figura 3.25: Expresión de Pdx1 y RBP-L por inmunofluorescencia.** Los marcajes se realizaron con células obtenidas en las condiciones 1, 2 y 3. Expresión de Pdx1 y RBP-L (rojo)

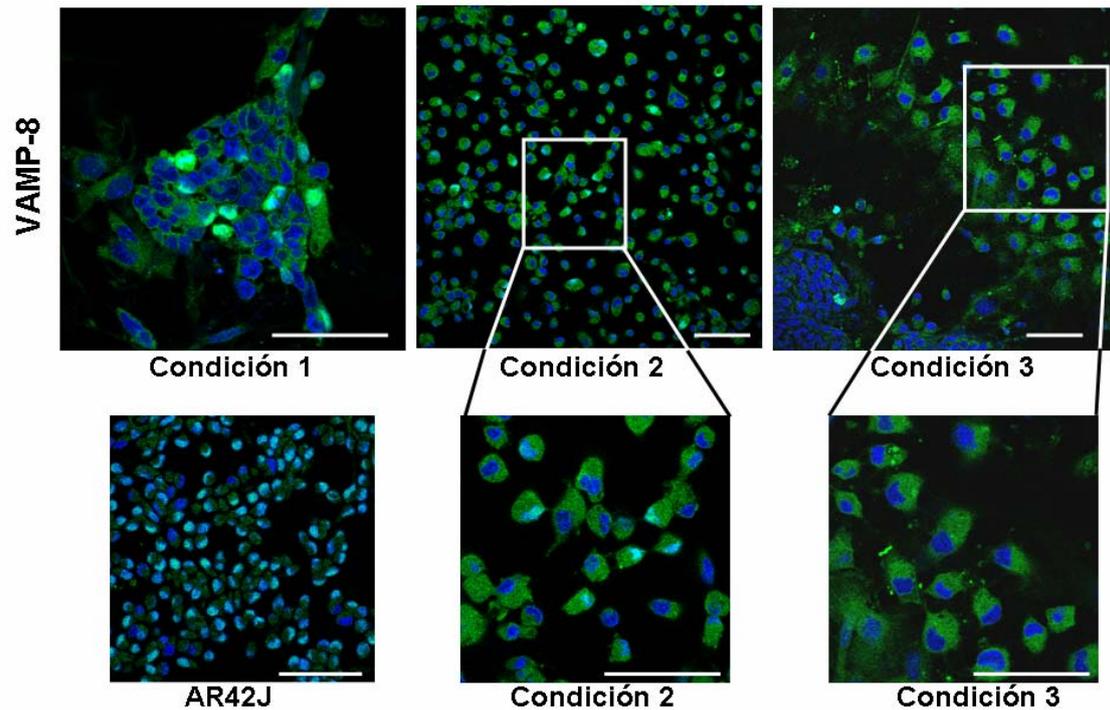
y tinción de núcleos con To-pro3 (azul). Como control de expresión se usó la línea celular acinar AR42J. Barras = 50  $\mu$ m. Condición 1 = control (C). Condición 2 = SN + Ad GFP (SN GFP). Condición 3 = SN + Ad p48/Ad Mist-1 (SN PM2).

### **3.5.4. Expresión de proteínas implicadas en la ruta secretora de los enzimas digestivos.**

La función de las células acinares pancreáticas es la síntesis y secreción de enzimas digestivos. Éstos son sintetizados en el retículo endoplasmático y posteriormente son transportados al aparato de Golgi. Desde el TGN se segregan vacuolas condensadas que madurarán a gránulos de cimógeno. Estos se localizarán finalmente en el polo apical de la célula donde se almacenarán hasta la secreción de los enzimas digestivos.

Con el fin de analizar si las células seleccionadas expresaban proteínas de la ruta secretora, analizamos la expresión de VAMP-8, una proteína v-SNARE altamente enriquecida en la membrana de los gránulos de cimógeno. En los ratones deficientes para esta proteína la secreción de los gránulos de cimógeno queda totalmente abolida. En el páncreas, VAMP-8 se distribuye en la parte apical de la célula acinar, donde se localizan los gránulos de cimógeno (ZG). En cambio, el patrón de expresión en la línea celular acinar AR42J, que no presenta ZG, es tanto nuclear como citoplasmática (Figura 26). En todas las condiciones, detectamos células que expresaban VAMP-8. En las condiciones 1 y 2 se detectaba principalmente en el citoplasma celular, y la expresión era nuclear aproximadamente en un 25-30% de las células. En la condición 3, el patrón de expresión nuclear era prácticamente nulo. Este patrón de expresión también se podría observar en las células de la condición 2, aunque en menor proporción (Figura 3.26).

VAMP-8 forma un complejo SNARE con una proteína t-SNARE localizada en la membrana plasmática de la célula acinar, la syntaxina-4 (ver apartado 1.4.1 de la Introducción). En todas las condiciones experimentales, prácticamente la totalidad de las células expresaban syntaxina-4. En la condición 1, el patrón de distribución era difuso por todo el citoplasma y raramente membranal. En cambio, en las condiciones 2 y 3 se observaba un marcaje intenso que se localizaba en la membrana plasmática (Figura 3.27).



**Figura 3.26: Imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias de las células diferenciadas seleccionadas realizadas con un anticuerpo anti-VAMP-8.** Los marcajes se realizaron con células obtenidas en las condiciones 1, 2 y 3. Expresión de VAMP-8 (verde) y tinción de núcleos con To-pro3 (azul). Los cuadrados blancos marcan las regiones ampliadas. Barras = 50  $\mu$ m. Condición 1 = control (C). Condición 2 = SN + Ad GFP (SN GFP). Condición 3 = SN + Ad p48/Ad Mist-1 (SN PM2).

La isoforma A del receptor de colecistoquinina (CCKAr), que es una hormona que induce la secreción de los gránulos de cimógeno (ver apartado 1.4.2 de la Introducción), se expresa en el páncreas en la membrana basolateral de las células acinares. Observamos que en la condición 1, había muy pocas células que expresaban CCKAr, y en la mayoría de las células el patrón de expresión era citoplasmático. En cambio, se observaba una elevada proporción de células que expresaban CCKAr en las condiciones 2 y 3, siendo la expresión mayoritariamente citoplasmática y en algunos casos membranar en la condición 2. En cambio, en la condición 3 el marcaje era más intenso y su localización, en general, era más membranar (Figura 3.27).

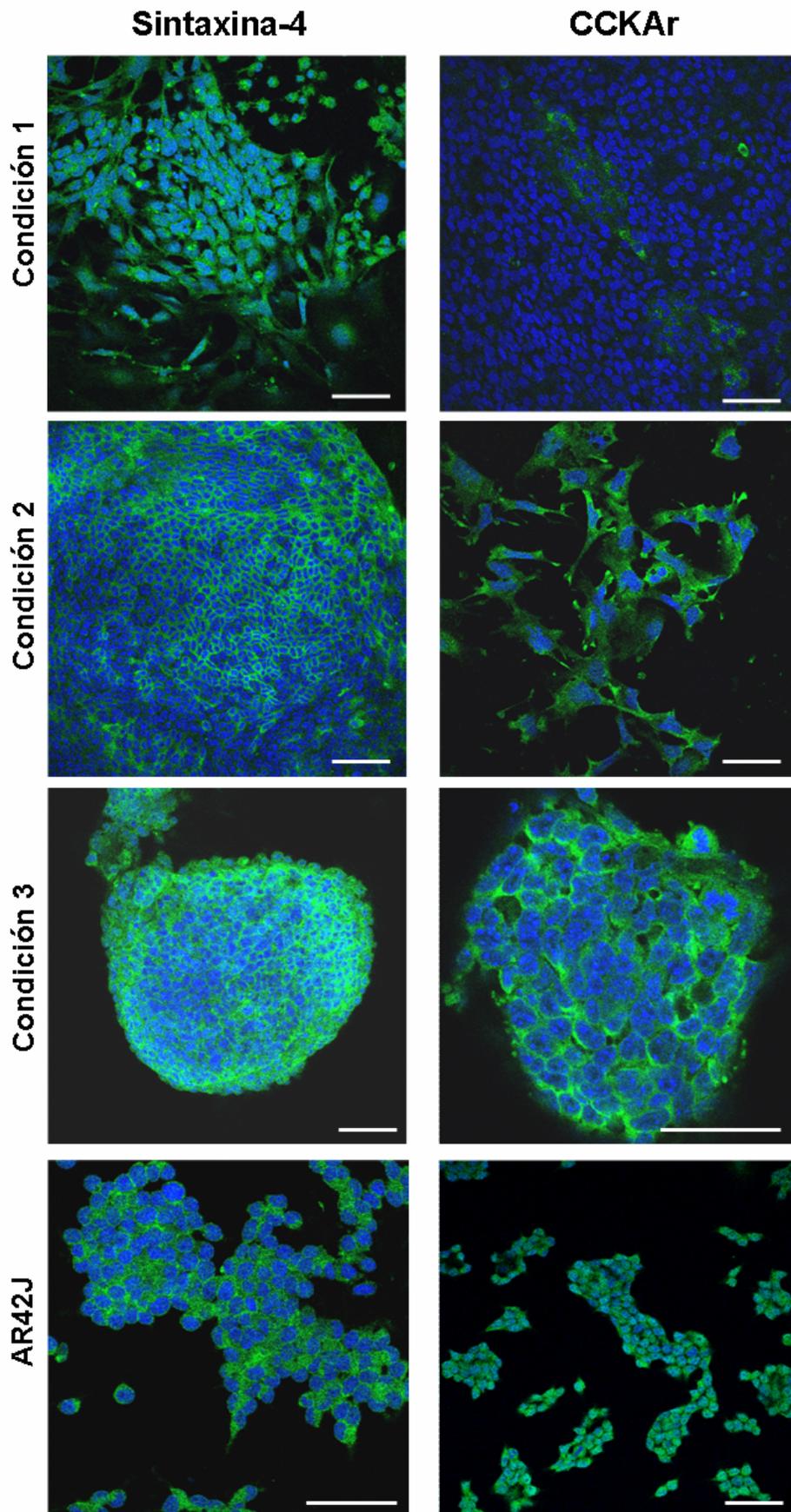
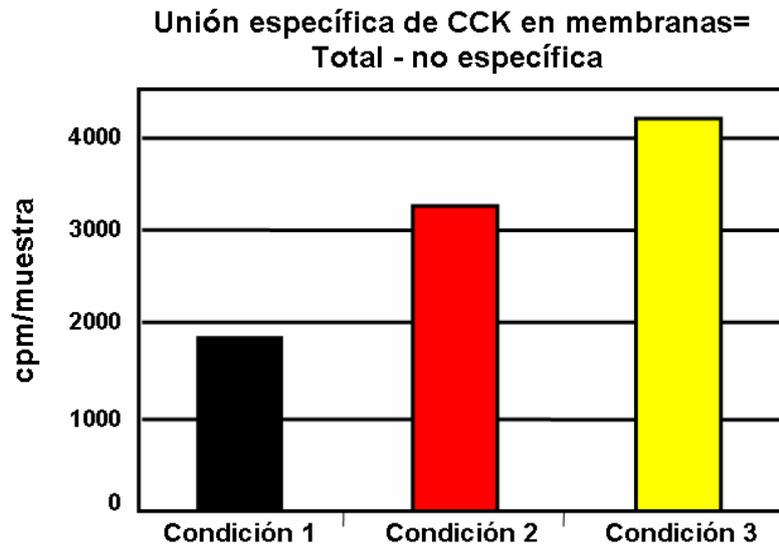


Figura 3.27: Imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias de las células diferenciadas seleccionadas realizadas con anticuerpos anti-sintaxina-4 y anti-CCKAr. Los

marcajes se realizaron con células obtenidas en las condiciones 1, 2 y 3. Expresión de syntaxina-4 y CCKAr (verde) y tinción de núcleos con To-pro3 (azul). Como control de expresión se usó la línea celular acinar AR42J. Barras = 50  $\mu$ m. Condición 1 = control (C). Condición 2 = SN + Ad GFP (SN GFP). Condición 3 = SN + Ad p48/Ad Mist-1 (SN PM2).

Para asegurarnos de la especificidad del marcaje obtenido con el anticuerpo anti-CCKAr y en colaboración con el grupo de la Dra. Marlène Dufresne (INSERM, Toulouse, Francia) se realizaron experimentos de unión de CCKA radioactiva en preparaciones crudas de membranas obtenidas a partir de las células diferenciadas seleccionadas. Se comprobó la unión específica de CCK a estas preparaciones, y que esta unión era 1,5 y 2 veces mayor en las condiciones 2 y 3, respectivamente, en comparación con la condición 1 (Figura 3.28).



**Figura 3.28: Ensayo de unión de CCK.** Especificidad de unión de CCKA radioactiva a las preparaciones de membranas crudas de las células diferenciadas seleccionadas en las condiciones 1, 2 y 3. Condición 1 = control (C). Condición 2 = SN + Ad GFP (SN GFP). Condición 3 = SN + Ad p48/Ad Mist-1 (SN PM2).

### **3.6. CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS DIFERENCIADAS OBTENIDAS CON EL PROTOCOLO DE SELECCIÓN UTILIZANDO SNP Y CO-INFECCIÓN MÚLTIPLE**

Sabiendo que las células diferenciadas seleccionadas genéticamente expresaban CCKAr y éste, al menos en parte, se localizaba en la membrana plasmática, y también

según ensayos de RT-PCR las células expresaban componentes de la vía de transducción de señales de la ruta secretora, como IP3R3 y M3r (Figura 3.19), estudiamos la capacidad funcional de las células seleccionadas obtenidas de responder a secretagogos.

### **3.6.1. MEDIDAS DE CALCIO INTRACELULAR EN RESPUESTA A SECRETAGOGOS**

El calcio intracelular libre se considera una de las primeras moléculas señalizadoras en las células acinares pancreáticas, ya que es la señal inicial que dirige la secreción de los enzimas digestivos.

Como ya se ha descrito en la Introducción (apartado 1.4.2), el proceso de secreción de los enzimas digestivos por las células acinares está controlado fisiológicamente por hormonas y neurotransmisores (secretagogos). Para que tenga lugar la exocitosis de los gránulos los secretagogos pueden inducir la secreción de manera dependiente de calcio o dependiente de AMPc (apartado 1.4.3. de la Introducción). Tanto CCH (carbacol, agonista muscarínico sintético), CCK (colecistoquinina) como ceruleína (un análogo de CCK) al unirse a su receptor inducen un incremento de la concentración de calcio intracelular teniendo lugar una exocitosis de los gránulos de cimógeno dependiente de calcio.

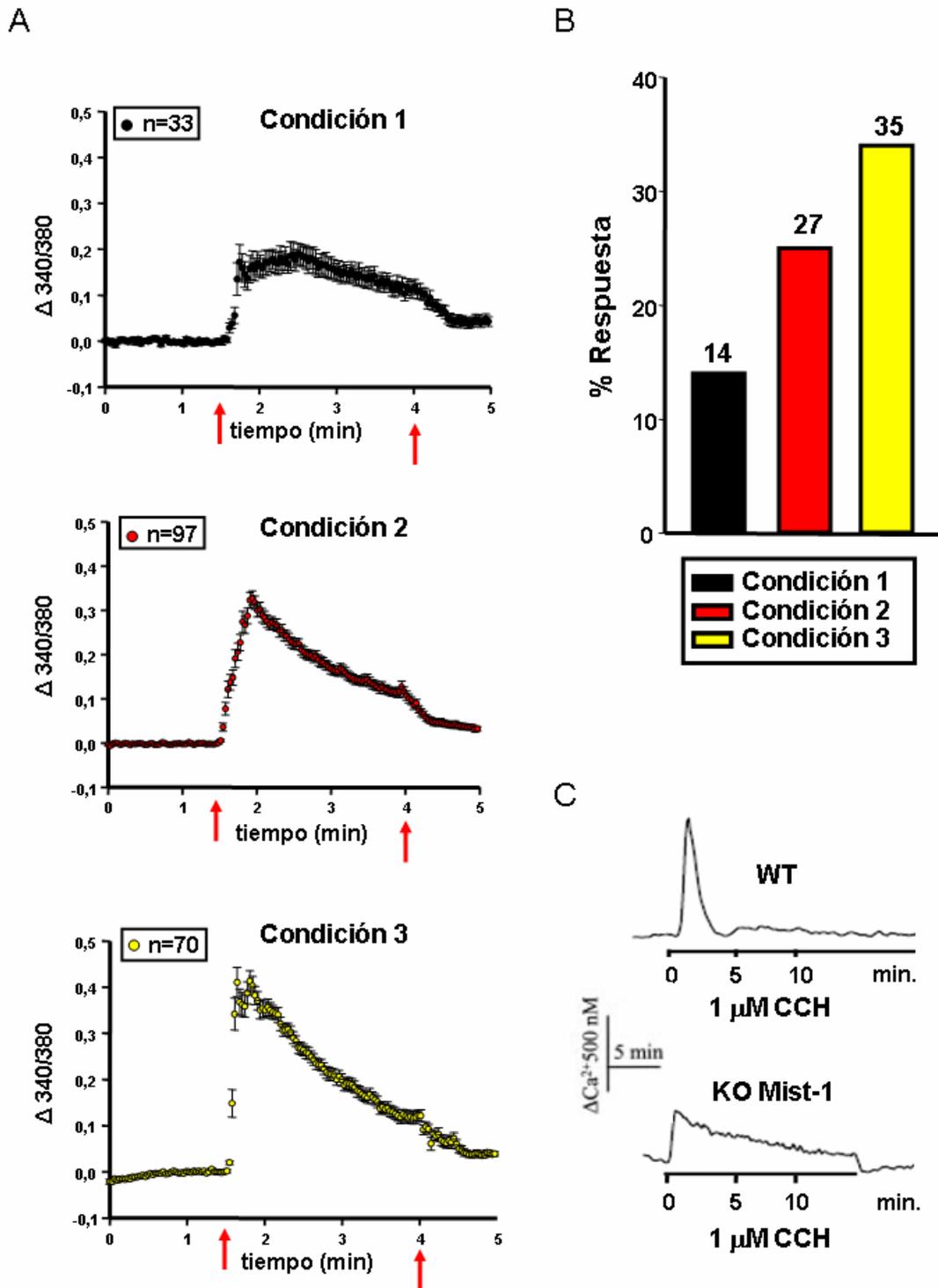
En respuesta a CCH, CCK o un análogo sintético de éste, ceruleína, se pueden observar dos tipos de respuestas de incremento de calcio intracelular en las células acinares, un incremento de la concentración de calcio intracelular que se recupera rápidamente (respuesta transitoria) a concentraciones máximas del secretagogo o un incremento oscilatorio que se repite a lo largo del tiempo en presencia del estímulo (respuesta oscilatoria) a concentraciones casi fisiológicas del secretagogo.

En colaboración con el grupo del Dr. Miguel Valverde en la Universidad Pompeu Fabra de Barcelona, realizamos las medidas de calcio intracelular en respuesta a CCH ( $5 \cdot 10^{-6}$  M) y CCK ( $10^{-12}$  M,  $10^{-9}$  M y  $10^{-6}$  M); los rangos de dosis utilizadas de los distintos secretagogos corresponden tanto a concentraciones suprafisiológicas (CCK  $10^{-9}$  M y  $10^{-6}$  M) como fisiológicas (CCK  $10^{-12}$  M). En las tres condiciones, al tratar las

células con (CCH) se observó respuesta al secretagogo. En la condición 1, la respuesta a CCH era muy débil e inmadura (Figura 3.29A), siendo similar a la respuesta que se observa en los acinos del ratón deficiente para Mist-1 (Figura 3.29 C), donde el incremento de la concentración de calcio intracelular es mínimo y la recuperación de éste es muy lenta. Por otro lado, la respuesta a CCH de las células de la condición 2, era una respuesta mucho más eficiente, ya que el incremento de la concentración de calcio intracelular era aproximadamente dos veces mayor al observado en la condición 1 y la recuperación de éste era rápida (Figura 3.29 A). La respuesta obtenida con las células de la condición 3 fue la más madura, en cuanto se observó i) un incremento de la concentración del calcio intracelular superior al obtenido en la condición 2, ii) así como una rápida recuperación de los niveles basales de calcio intracelular. Así pues la curva de calcio en respuesta a CCH de las células de la condición 3 era prácticamente igual a la que se obtiene en acinos pancreáticos aislados, teniendo en cuenta la diferencia en las escalas de tiempo representadas en las Figuras 3.29 A y C.

Se analizó también el tanto por ciento de células que respondían al secretagogo y observamos que no sólo el tipo de respuesta obtenida era mejor en las células de la condición 3, sino que el número de células que respondían era mayor (Figura 3.29 B). Aún así, incluso en la mejor condición se observa una clara heterogeneidad en la población celular puesto que solo un 35% de células presentan esta respuesta.

Por otra parte, a pesar de la detección por distintos métodos de la expresión de CCAr no se observó respuesta a CCK en ninguna de las condiciones independientemente de las concentraciones utilizadas.



**Figura 3.29: Medidas de calcio intracelular en respuesta a secretagogos.** A) Medidas de las concentraciones de calcio intracelular en respuesta a un estímulo (CCH) en las células diferenciadas seleccionadas de las condiciones 1, 2 y 3 en respuesta a CCH (5 μM). Las flechas rojas indican el momento en que se añade el secretagogo y el momento en que se retira. B) Gráfica que indica el tanto por ciento de células que responden a CCH (5 μM) en cada condición. C) Imagen del patrón de respuesta a CCH 1 μM en acinos aislados de un ratón salvaje (WT) y del ratón deficiente para Mist-1 (Imagen extraída de *Luo X. et al., 2005*). Condición 1 = control (C). Condición 2 = SN + Ad GFP (SN GFP). Condición 3 = SN + Ad p48/Ad Mist-1 (SN PM2).

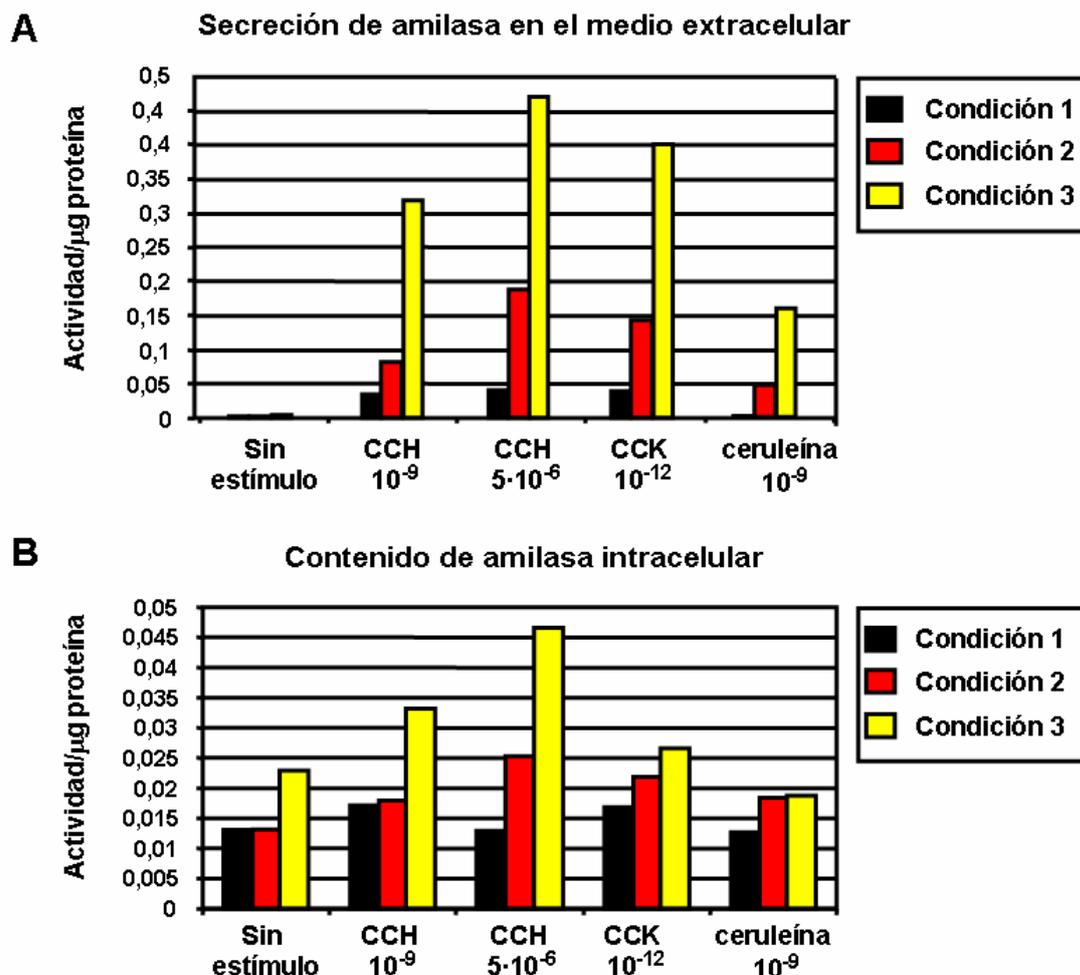
### 3.6.2. SECRECIÓN DE AMILASA EN RESPUESTA A SECRETAGOGOS

La vía principal por la que los enzimas son secretados es la ruta secretora regulada que se induce en respuesta a secretagogos. Por ello analizamos si las células diferenciadas seleccionadas secretaban amilasa en respuesta a secretagogos.

Para realizar este análisis usamos un kit comercial que nos permitía detectar la actividad enzimática de amilasa. Se analizó el efecto de tres secretagogos a concentraciones fisiológicas (CCK  $10^{-12}$  M, CCH  $10^{-9}$  M) y supra fisiológicas (CCH  $5 \cdot 10^{-6}$  M y ceruleína  $10^{-9}$  M).

Se estimularon las células con los secretagogos y después de 45 minutos se analizó la actividad de la amilasa que se encontraba en el medio extracelular, conservando un grupo de células control que no fueron estimuladas y que nos indicarían la posible secreción constitutiva. Posteriormente, también se analizó la actividad de la amilasa del lisado celular después del estímulo, y en este caso el grupo control, sin estimular, nos indicaría la actividad de la amilasa total basal de las células.

Sorprendentemente, detectamos que la actividad amilasa del medio extracelular inducida por secretagogos era aproximadamente unas 40 veces superior a la actividad amilasa intracelular de las células sin estimular, si bien se detectó una actividad amilasa mayor en la condición 3. Estos resultados sugerían que se producía una síntesis *de novo* de enzimas inducida por los secretagogos, tal como se ha descrito (232) y que probablemente se secretaban de manera constitutiva. Este hecho también podría explicar una mayor presencia de amilasa intracelular en las células estimuladas, respecto a las células sin estimular (Figura 3.30).

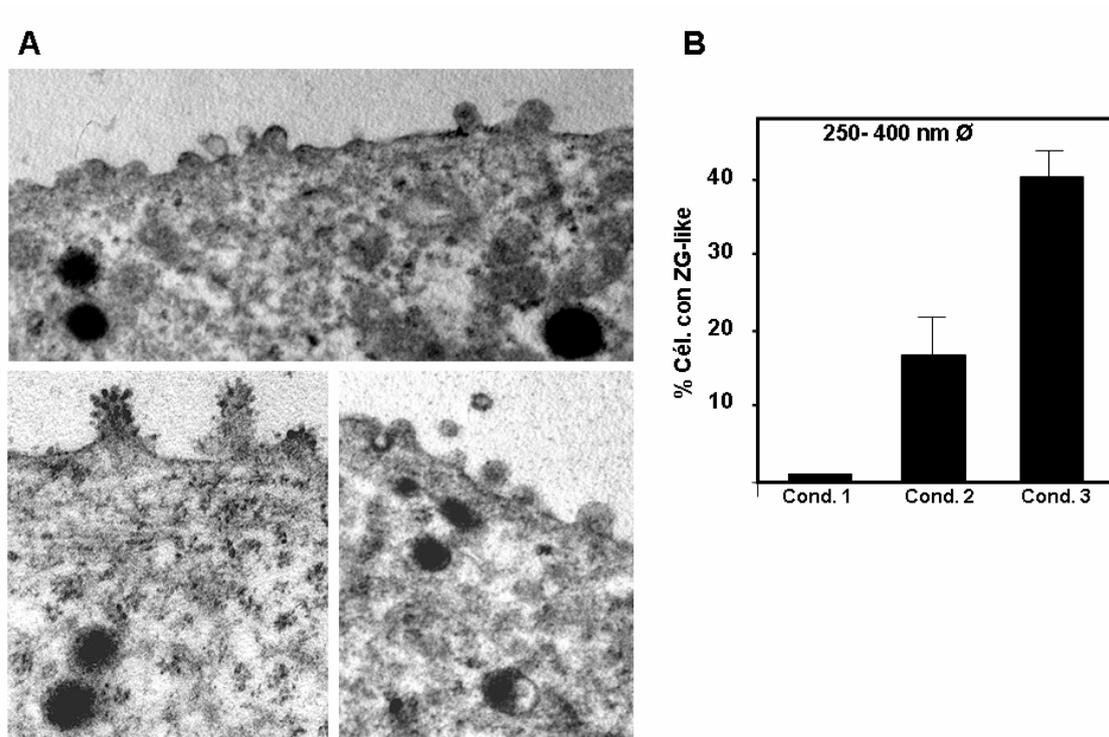


**Figura 3.30: Representación gráfica de las medidas de la actividad de la amilasa en el medio extra e intracelulares de las células seleccionadas estimuladas con secretagogos. A)** Medidas de la actividad amilasa en el medio extracelular en las células diferenciadas seleccionadas que han sido tratadas con los secretagogos a las concentraciones indicadas. Además se analiza un grupo control sin estimular. **B)** Medidas de la actividad amilasa en el lisado celular (intracelular) de las células diferenciadas seleccionadas en las condiciones 1, 2 y 3 que han sido tratadas con los secretagogos a las concentraciones indicadas. Además se analiza un grupo control sin estimular. Las medidas obtenidas se expresan en actividad del enzima por µg de proteína total. Condición 1 = control (C). Condición 2 = SN + Ad GFP (SN GFP). Condición 3 = SN + Ad p48/Ad Mist-1 (SN PM2).

### 3.7. CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LAS CÉLULAS DIFERENCIADAS SELECCIONADAS

Para determinar si el defecto en la secreción regulada estaba asociado a una falta de gránulos de cimógeno en las células diferenciadas seleccionadas se analizó por microscopía electrónica las características ultraestructurales de las células obtenidas.

Observamos que únicamente en las condiciones 2 y 3 las células presentaban vesículas electrodensas que se encontraban, en general, en la parte apical de la célula. Sin embargo, en una células acinar de páncreas adulto los gránulos de cimógeno, presentan un diámetro que oscila entre 400 y 1000 nm mientras que las vesículas que se observaban tenían un diámetro de entre 250-400 nm (Figura 3.31). Asimismo, el número de estas vesículas por célula era muy bajo comparado con el número de ZG por célula acinar del páncreas. Los resultados sugieren que estas vesículas electrodensas podrían ser gránulos de cimógeno inmaduros (*ZG-like*). Además, el porcentaje de células que presentaban estas vesículas era mayor en la condición 3 respecto a la condición 2, y no se detectaron prácticamente en la condición 1 (Figura 3.31).



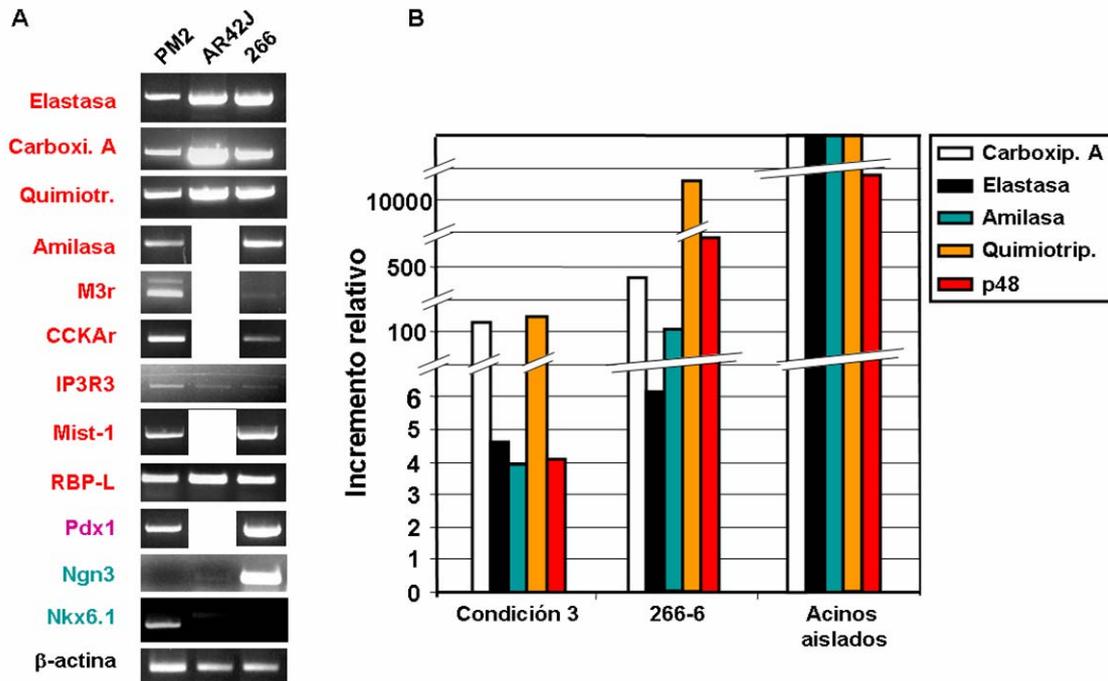
**Figura 3.31: Imágenes de microscopía electrónica de las células diferenciadas seleccionadas. A)** Imágenes de vesículas electrodensas (posibles gránulos de cimógeno-like (*ZG-like*) de 250-400 nm de diámetro) que se encuentran en las células de las condiciones 2 y 3. **B)** Gráfica que indica el tanto por ciento de células que presentan *ZG-like* en las células de las condiciones 2 y 3. Cond. = Condición. Condición 1 = control (C). Condición 2 = SN + Ad GFP (SN GFP). Condición 3 = SN + Ad p48/Ad Mist-1 (SN PM2).

### **3.8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS DIGESTIVOS: CÉLULAS SELECCIONADAS VERSUS LÍNEAS ACINARES EN CULTIVO Y ACINOS PANCREÁTICOS AISLADOS**

Con el interés de comparar el patrón de expresión génica de las células seleccionadas obtenidas con él de las líneas celulares acinares en cultivo, así como con el de acinos pancreáticos murinos purificados, analizamos la expresión, por RT-PCR semicuantitativa y cuantitativa, de enzimas digestivos, factores de transcripción y moléculas implicadas en la ruta secretora.

Observamos que, aún haber logrado incrementar la expresión de los enzimas digestivos (carboxipeptidasa A, elastasa, amilasa y quimiotripsinógeno) en la condición 3 en un orden de, respectivamente, 120, 4.8, 4 y 130 veces más en comparación a la condición 1, la expresión era todavía mucho menor que la que se observa en las líneas celulares acinares en cultivo (266-6 y AR42J), así como la de acinos purificados. En general, estas diferencias cualitativas de expresión se reproducían para el resto de marcadores exocritos, excepto para la expresión de receptores de secretagogos que se expresaban a niveles más altos en las células obtenidas en la condición 3 respecto a las líneas celulares (Figura 3.32).

En resumen, los resultados demuestran que las células diferenciadas seleccionadas en la condición 3 comparten características con las células acinares a nivel de expresión de marcadores acinares y por su respuesta funcional a secretagogos, pero todavía no han recapitulado el programa de diferenciación completo.



**Figura 3.32:** Análisis de la expresión de marcadores exocrinos por RT-PCR **A)** semicuantitativa y **B)** cuantitativa de las células diferenciadas seleccionadas tratadas con SN y co-infectadas con Ad p48/Mist-1 (PM2) y de líneas acinares en cultivo y acinos aislados. Condición 3 = SN + Ad p48/Ad Mist-1 (SN PM2).



INTRODUCCIÓN  
OBJETIVOS  
MATERIALES Y MÉTODOS  
RESULTADOS  
**DISCUSIÓN**  
CONCLUSIONES  
BIBLIOGRAFÍA



En el momento de iniciar esta tesis, la diferenciación de las células ES a linajes celulares derivados del endodermo había sido muy poco estudiada y básicamente se basaba en inducir la diferenciación espontánea mediante la formación de cuerpos embrioides. En estas condiciones, como hemos demostrado (261) la diferenciación a células pancreáticas es muy poco eficiente, hecho que ha sido ampliamente corroborado por otros grupos (262). Por ese motivo, el objetivo de nuestro trabajo se centró en el incremento de esta eficiencia mediante el desarrollo de varias estrategias que podemos describir en tres objetivos i) la optimización de las condiciones de cultivo, ii) la sobreexpresión de factores de transcripción implicados en el desarrollo pancreático mediante el uso de vectores virales y iii) la selección genética de las células comprometidas al linaje acinar. Se pretendía integrar el conocimiento obtenido en estos apartados para desarrollar un protocolo que optimizara la generación de células acinares.

## **1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO**

Se sabe que la densidad celular utilizada para la formación de cuerpos embrioides es crítica para regular tanto el tipo como la eficiencia de diferenciación al linaje celular de interés a partir de células ES. Sin embargo, este aspecto no se ha abordado en general de forma específica en la literatura con respecto a la diferenciación pancreática. Así, en la mayoría de los protocolos experimentales para diferenciar células endocrinas se utilizan densidades comprendidas entre  $10^5$  cél./ml y  $1,5 \cdot 10^6$  cél./ml (162, 262, 282). Si bien no hemos realizado experimentos extensos respecto a este punto, sí que hemos analizado mediante RT-PCR la expresión de marcadores exocrinos específicos induciendo la formación de EBs a distintas densidades celulares comprendidas entre  $10^3$ - $10^7$  cél./ml (datos no mostrados). Nuestros resultados demuestran que la expresión de estos marcadores es más elevada en experimentos de diferenciación EB7P7 a la densidad celular de  $10^4$  cél./ml. Estos datos están bastante en concordancia con los resultados obtenidos por el grupo de *Odorico et al, 2003*, que en protocolos de diferenciación EB7P14 realizados a densidades superiores (aproximadamente  $4 \cdot 10^5$  cél./ml) prácticamente no observan expresión de marcadores exocrinos por RT-PCR.

Por otra parte, los resultados de diferenciación de los EB en suspensión (261) muestran que la cinética de expresión de marcadores de diferenciación y de reguladores claves del desarrollo pancreático exocrino y endocrino siguen un patrón de expresión similar al que ocurre durante el desarrollo pancreático *in vivo*, tal como se ha demostrado también en otros trabajos (133). Por tanto, nuestra hipótesis de trabajo se basó en el planteamiento de que, de una manera racional, se podría dirigir el programa de diferenciación acinar, regulando rutas de señalización implicadas durante el desarrollo. Este tipo de planteamiento se había validado en otros estudios como por ejemplo en la diferenciación neural (290) y muy recientemente, otros grupos han demostrado que se puede aplicar para desarrollar células pancreáticas *in vitro* (50).

### **1.2. LAS CÉLULAS ES RESPONDEN *IN VITRO* A SEÑALES IMPLICADAS EN EL DESARROLLO PANCREÁTICO**

#### **• Efecto del SNP**

En los últimos años, varios grupos han demostrado la validez de esta hipótesis respecto a la capacidad de las células de responder a señales liberadas por el páncreas embrionario. Así, se ha demostrado un incremento en la expresión de marcadores endocrinos por RT-PCR así como en el número de células que los expresan (33, 162, 262, 282). En nuestras condiciones, hemos podido reproducir el efecto observado respecto a la diferenciación endocrina y hemos demostrado también su efecto sobre la expresión de genes acinares (Figura 3.1). El medio condicionado utilizado en estos experimentos se obtuvo del cultivo de páncreas fetal a E16.5 en el que el componente exocrino predomina sobre el componente endocrino. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en el incremento de la expresión de genes acinares respecto a los endocrinos. Por otra parte, observamos que los SNP no solo contenían factores solubles implicados en la diferenciación pancreática, sino también factores mitogénicos, como hemos podido observar por el aumento de la talla de los EBs durante la etapa de suspensión (Figura 3.2). Por tanto, los SNP podrían combinar varios efectos; por un lado, inducir la diferenciación de precursores endodérmicos o pancreáticos a células acinares y por otro, expandir la población de células que han activado un programa de diferenciación acinar.

---

• **Efecto del SN de mesénquima pancreático y de las líneas celulares NIH3T3, AR42J y 266-6**

Nuestros resultados demuestran que el SNP contienen un cóctel de factores que inducen tanto la diferenciación endocrina como exocrina, por lo que tal y como era de esperar, su efecto no es selectivo para un linaje pancreático específico.

Por ese motivo, analizamos el efecto del SN del cultivo de mesénquima pancreático ya que se ha descrito que éste promueve la diferenciación exocrina y reprime la endocrina (194). Ya en los años 60-70 (87) y 90 (87) se propuso que el efecto del mesénquima era mediado por factores solubles.

La diferenciación de las células en presencia de estos SN no mejoró los resultados obtenidos respecto a la selectividad ni tampoco en el incremento de la expresión de los distintos marcadores (Figura 3.3).

Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que el efecto inductor del mesénquima sobre el epitelio pancreático, requiere también cierta proximidad o el contacto entre los dos componentes (167, 194) que se pierde al utilizar el medio condicionado. Asimismo, se ha descrito que la línea celular NIH3T3 de origen mesenquimal puede reproducir el efecto pro-exocrino del mesénquima en ensayos de recombinación con epitelio embrionario pancreático (167), efecto que tampoco observamos con el SN de esta línea celular (Figura 3.4). Ambos resultados podrían ser debidos pues a que la composición de los factores solubles no es exactamente la misma así como sus concentraciones y/o a la falta de señalización mediada por contacto celular. Respecto, a este último punto cabe recalcar que una de las señales que se ha propuesto que media la diferenciación pancreática exocrina inducida por el mesénquima es la laminina-1, según se ha demostrado mediante ensayos en la que su expresión o actividad se inhiben mediante morfolidos (167) o anticuerpos bloqueantes (42), respectivamente. Finalmente, también es posible que el SN de la línea celular NIH3T3 se obtuviera a partir de un clon diferente al utilizado en los trabajos de *Li et al. 2004*.

Por último, nos interesó analizar el efecto del SN del cultivo de líneas acinares pancreáticas (AR42J y 266-6) hipotetizando que éstas podrían liberar al medio factores

que indujeran específicamente la diferenciación acinar. Nuestros resultados muestran que estos SN tienen, contrariamente a lo esperado, un efecto sobre la expresión de marcadores endocrinos (Figura 3.4), incrementándola, resultado que podría explicarse como consecuencia, al menos en el caso de las células AR42J, por su carácter anficrino (48, 242-244).

### **1.3. LA FOLISTATINA INCREMENTA DE FORMA SELECTIVA LA EXPRESIÓN DE GENES ACINARES VERSUS LOS ENDOCRINOS EN LAS CÉLULAS ES.**

El conocimiento sobre el desarrollo embrionario ha permitido en estos últimos años diseñar protocolos de diferenciación de células ES a células  $\beta$ , basados en el uso de factores de crecimiento y moléculas de señalización implicadas en el desarrollo pancreático *in vivo*. Se conocen muy pocos factores implicados en el desarrollo/diferenciación exocrina. Folistatina, un inhibidor de distintos miembros de la familia de TGF $\beta$ , se expresa en el mesénquima pancreático a lo largo del desarrollo embrionario según (284), y se ha descrito como un potente inductor de la diferenciación exocrina (194), pudiendo mimetizar los efectos pro-exocrinos del mesénquima pancreático *in vitro* cuando se incuba con explantes de epitelio pancreático de rata. Así, también es capaz de reprimir la diferenciación endocrina (194).

El tratamiento de las células ES con folistatina a 200 nM induce un incremento selectivo en la expresión de marcadores exocrinos y en la abundancia de células que expresan amilasa (Figura 3.6), tal como se ha descrito en el páncreas embrionario (194). En nuestro caso, sin embargo no hemos observado una disminución en la expresión de marcadores endocrinos.

Sin embargo, se ha propuesto que folistatina podría unirse a BMP7 y a activina, que se producen en el epitelio pancreático, e inhibir el efecto inductivo de activina en el desarrollo endocrino o del BMP7 (194). En otros modelos como el músculo, se ha propuesto que folistatina se une a BMP-7 y BMP-2 con baja afinidad. De esta forma, estos factores se presentan a células miogénicas a concentraciones que permiten la estimulación del crecimiento del músculo en el embrión (6). Más recientemente,

también se ha propuesto que folistatina podría interactuar con miostatina y prevenir así su efecto inhibitor sobre el desarrollo muscular (7).

En nuestras condiciones, la folistatina podría pues inducir específicamente la diferenciación exocrina o regular la proliferación de precursores exocrinos. Determinamos también que la concentración de folistatina presente en el SNP era aproximadamente de 1.5 nM. Al diluir estos SN en medio de cultivo al 3% FCS en una relación de 1:1, la concentración final incluso sería más baja. Por este motivo, hipotetizamos que al suplementar el SNP con folistatina comercial hasta 200 nM podríamos conseguir una diferenciación más selectiva hacia el linaje exocrino, conservando el notable incremento de expresión de los marcadores exocrinos inducido por el SNP. Este no fue el caso (resultados no mostrados), hecho que se podría explicar en parte porque el SN estudiado era del estadio E16.5 y por tanto, la composición de factores solubles distinta a la que se puede encontrar *in vivo* en el estadio E12-13. De hecho, si bien algunos autores describen la expresión de folistatina a lo largo del desarrollo por RT-PCR (284), otros grupos usando las mismas técnicas han demostrado una expresión que se modula en el tiempo. Así, se observa un pico de expresión entre E10-E12.5 y reaparece de nuevo a E18.5 en islotes (175).

Otra vía que sería interesante analizar en nuestro sistema es la regulada por los glucocorticoides. Así, se ha descrito que el tratamiento *in vitro* de rudimentos pancreáticos de rata del estadio de E15.5 con dexametasona, un glucocorticoide sintético, induce una disminución de las células que expresan insulina e incrementa el doble el número de células acinares, indicando que los glucocorticoides favorecen la diferenciación acinar (86). Además ya se había descrito que los glucocorticoides inducían un incremento de la expresión de amilasa en la línea celular acinar AR42J (118, 172) y en los últimos años se ha demostrado que también incrementa la expresión de proteínas de la ruta de los gránulos de cimógeno (t-SNARE y v-SNARE) en esta misma línea celular (81). Los resultados descritos sugieren que la incubación de las células ES con glucocorticoides podría inducir la diferenciación acinar y/o inducir un fenotipo más diferenciado al modular proteínas implicadas en la ruta secretora. Datos preliminares muestran que la incubación de las células con dexametasona induce un incremento en la expresión de amilasa, elastasa, quimiotripsinógeno y Mist-1.

En el futuro, la identificación de nuevos factores que selectivamente dirijan la diferenciación acinar podría abordarse mediante el análisis proteómico de los SNP.

## **2. SOBREEXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN EL DESARROLLO PANCREÁTICO MEDIANTE EL USO DE VECTORES VIRALES**

Las vías de señalización trasladan las señales extracelulares de la superficie celular al núcleo mediante una cascada de interacciones entre proteínas que expanden la señal en el interior de la célula hacia el núcleo, donde un grupo de proteínas, llamado factores de transcripción, juega un rol crucial en la activación de la expresión genética. Por ello, después de haber investigado qué vías de señalización específicas implicadas en el desarrollo pancreático podrían regular la diferenciación de las células ES al linaje exocrino, abordamos la sobreexpresión de factores transcripcionales claves para la diferenciación pancreática, con el interés de reproducir un programa de diferenciación acinar.

Ya se había descrito que la sobreexpresión en células ES de un factor de transcripción implicado en el desarrollo pancreático (25, 197) mejoraba la eficiencia de diferenciación de las células ES a células productoras de insulina. Pero hay evidencias que indican que la sobreexpresión de un único factor de transcripción no es suficiente para activar un programa de diferenciación completo, en cambio la combinatoria de varios de ellos permite determinar la identidad y funcionalidad celular. Por esto, nuestra estrategia se basaba en la sobreexpresión de dos factores de transcripción (p48 y Pdx1) mediante el uso de vectores virales (lentivirus y adenovirus) intentando reproducir la cinética de expresión de genes de la misma manera que tiene lugar durante la diferenciación pancreática acinar. Además integramos en esta estrategia el uso del SN pancreático fetal del estadio de E16.5 para promover la diferenciación pancreática de las células ES.

En resumen, nuestros resultados demuestran que con la sobreexpresión de Pdx1 y p48 en células ES se induce la diferenciación de estas al linaje acinar, aunque las células obtenidas son inmaduras.

Desde el punto de vista metodológico, los principales problemas para la sobreexpresión de factores de transcripción en células ES hasta ahora han sido, i) la dificultad de introducir el transgen de interés en las células ES con una eficiencia y expresión elevada, ii) el mantenimiento del estado indiferenciado y de la capacidad de autorreplicación de las células ES que expresan establemente un gen maestro y iii) el silenciamiento de la expresión del transgen al inducir la diferenciación.

Para intentar solventar en parte algunas de estas limitaciones, se abordó esta estrategia mediante vectores virales.

### **2.1. VECTORES ADENOVIRALES**

Los vectores adenovirales recombinantes utilizados en el estudio no son ni replicativos ni integrativos, permitiendo una expresión transitoria del transgen de interés. Las propiedades de estos vectores virales nos podrían permitir reproducir una cinética de expresión de los factores transcripcionales que mimetizara la del desarrollo embrionario pancreático. Con este fin sobreexpresamos mediante infección adenoviral p48, un factor transcripcional importante para la diferenciación acinar que empiezan a expresarse durante el desarrollo embrionario a E9.5. Además, no nos interesaba expresar p48 de manera estable debido a sus efectos antiproliferativos (239).

### **2.2. VECTORES LENTIVIRALES**

Los vectores lentivirales permiten la expresión estable del transgen ya que este se integra en el genoma de la célula. Uno de los principales problemas de la sobreexpresión de genes maestros en células ES, es la posibilidad de alterar a biología de la célula ES en cuanto a su pluripotencialidad y a su capacidad de autorenovación. En nuestras manos, la sobreexpresión de Pdx1, un factor transcripción esencial para el desarrollo y diferenciación pancreática exocrina y endocrina, no alteraba la biología de las células ES. Otros de los problemas de la sobreexpresión de genes de interés en las células ES es el silenciamiento del transgen al inducir la diferenciación o a debida a la expansión de las células en cultivo.

### **2.3. MEJORA DE LA ESTRATEGIA DE SOBREEXPRESIÓN DE FACTORES TRANSCRIPCIONALES**

Nuestros resultados indican que la co-expresión de p48 y Pdx1 nos permite diferenciar células que todavía no han recapitulado el programa de diferenciación acinar completo. Por ello creemos que la sobreexpresión de factores transcripcionales implicados en la diferenciación terminal de las células acinares podría ayudarnos a obtener células con un fenotipo más diferenciado.

Un abordaje posible sería el uso de vectores lentivirales que nos permitan la expresión condicional y/o inducible de combinaciones dobles o triples de factores de transcripción reguladores de la diferenciación acinar como Pdx1, p48 y Mist-1 que podrían permitirnos obtener células acinares diferenciadas con un fenotipo más maduro. Con esta estrategia se pretende 1) activar la expresión de los transgenes al iniciar la diferenciación, evitando así el posible silenciamiento del transgen al inducir la diferenciación; 2) evitar la expresión artefactual del transgen por su integración al azar en el genoma de las células ES; y 3) expresar niveles menos elevados de los transgenes que no tengan efectos tóxicos (197) o antiproliferativo (239).

Por último también se podría abordar la sobreexpresión de RBP-L mediante adenovirus en las células diferenciadas con el fin de forzar la maduración de la diferenciación de las células, ya que RBP-L se ha descrito como un factor de transcripción acinar que juega un papel importante en la regulación de una elevada expresión de los enzimas digestivos (20).

### **3. SELECCIÓN GENÉTICA DE LAS CÉLULAS ES COMPROMETIDAS AL LINAJE ACINAR**

Las células diferenciadas obtenidas a partir de células ES inducidas espontáneamente son heterogéneas, conteniendo células de distintos linajes. Por ello, y con el fin de purificar y enriquecer las células diferenciadas comprometidas al linaje acinar abordamos una estrategia de selección genética.

Nuestro interés fue abordar la selección genética de las células comprometidas al linaje acinar integrando en ella, no solo el uso del SN pancreático fetal sino también la sobreexpresión de factores transcripcionales implicados en el desarrollo y diferenciación del linaje acinar (p48 y Mist-1). De este modo, queríamos aportar a las células un cóctel de factores solubles implicados en el desarrollo pancreático, para activar las vías de señalización necesarias para la diferenciación pancreática (con el uso del SN) y a su vez sobreexpresar factores de transcripción claves para la diferenciación acinar (p48 y Mist-1), con el fin de modelizar al máximo la cinética de expresión génica que acontece durante el desarrollo embrionario y finalmente seleccionar genéticamente las células diferenciadas.

Una de las principales limitaciones de abordar una estrategia de selección genética del linaje acinar pancreático es el desconocimiento de los factores de transcripción reguladores de la diferenciación de este linaje. Abordamos por ello la selección usando el promotor de elastasa ya que ha sido muy bien caracterizado tanto *in vivo* como *in vitro* (2, 147, 270, 271), y así se conoce la presencia del *enhancer* (-500 + 8), con el cual hemos trabajado, que se ha descrito como la región más selectiva del promotor para el linaje acinar pancreático aunque su expresión es débil (271). Pero este enzima digestivo se empieza a expresar aproximadamente en el estadio de E12.5 y por ello probablemente estemos seleccionando células en distintos estadios de diferenciación. Así que para mejorar la estrategia de selección genética se requeriría el uso del promotor de un gen específico acinar cuya expresión fuera más temprana, de manera que se pudiera seleccionar una población precursora más homogénea. Un posible candidato sería el factor de transcripción Mist-1 que se expresa en el páncreas a partir de E10.5, pero este factor no es específico pancreático, sino que se expresa en la mayoría de células serosas.

Otra posible alternativa sería el uso de dos promotores para realizar la selección genética, un promotor de expresión temprana que nos permitiera seleccionar una población precursora pancreática y otro de expresión linaje específica que nos permitiera seleccionar aquellas células de la población precursora que se han comprometido al linaje acinar. Un promotor candidato para seleccionar la población precursora podría ser el de p48 que se expresa durante el desarrollo embrionario en los precursores pancreáticos a partir de E9.5, la expresión del cual decae posteriormente y

vuelve a detectarse en los progenitores acinares. Los promotores linaje específicos podrían ser el promotor de elastasa o de Mist-1.

Antes de iniciar la selección genética de las células inducimos la diferenciación de éstas con el uso de SN pancreático fetal y folistatina para intentar incrementar la población de células comprometidas al linaje acinar. Observamos que al final del protocolo de selección genética las células diferenciadas obtenidas expresaban niveles más elevados de enzimas digestivos y factores de transcripción específicos exocrinos respecto a las células que no habían sido incubadas ni con SN pancreático fetal ni con folistatina (Figura 14), indicándonos que su uso mejoraba la eficiencia de nuestro protocolo de selección. Por otro lado, y aunque habíamos descrito que folistatina inducía de manera selectiva un incremento específico de la expresión de marcadores exocrinos su efecto era menor usando el protocolo de selección genética, e incluso dejaban de modularse la expresión de genes que previamente habíamos visto modulados con el uso de folistatina. Distintas hipótesis podrían explicar este resultado 1) que folistatina, a pesar de incrementar la expresión de la mayoría de marcadores exocrinos, no incrementaba la de la elastasa (Figura 6), y debido a que la selección genética de las células comprometidas al linaje acinar se hace en base a la expresión de su promotor es posible que perdimos la población celular inducida por folistatina durante la selección, 2) o que folistatina no tuviera un efecto inductor de la diferenciación acinar, sino que inhibiera la diferenciación de los otros linajes pancreáticos y que por defecto las células se diferenciaron al linaje acinar.

Una vez establecido el protocolo de selección genética con el uso de SN pancreáticos fetales abordamos la sobreexpresión genética de p48 y Mist-1 mediante adenovirus recombinantes. El uso de estos vectores virales nos permitía la expresión transitoria de p48 y Mist-1. Nos interesamos en la expresión transitoria y no estable de estos factores de transcripción hipotetizando que ésta sería suficiente para activar la expresión endógena de los mismos, así como la de un programa de diferenciación acinar. Además, nos interesaba expresar transitoriamente p48 debido a sus efectos antiproliferativos (239). No nos interesamos en la sobreexpresión de Pdx1 ya que las células seleccionadas ya expresaban Pdx1 (Figura 14) y como se ha descrito, elevados niveles de expresión de Pdx1 en células ES pueden ser tóxicos, además de que en las

células acinares sus niveles de expresión son mucho menores que los detectados en células  $\beta$  (99, 197).

Cuando p48 o Mist-1 se transducen a las células ES en diferenciación independientemente no se incrementa la expresión de la elastasa, cuya expresión nos interesaba regular para seleccionar genéticamente las células comprometidas al linaje acinar. Por ello pensamos que quizás fuera necesaria la transducción de ambos factores de transcripción para incrementar la expresión de este enzima digestivo. Así, observamos que la co-transducción de ambos factores incrementaba la expresión de elastasa en las células diferenciadas seleccionadas. Distintas hipótesis podrían explicar este resultado 1) que ambos factores de transcripción actúan sobre una población que expresa elastasa, expandiéndola; 2) que ambos factores de transcripción actúan induciendo la diferenciación al linaje acinar de una población precursora; o 3) incrementando la expresión del mRNA de elastasa I en una población comprometida ya al linaje acinar (Figura 16). Además cabe destacar que el uso del SN pancreático fetal es necesario para observar la inducción de la expresión de elastasa con la co-infección, ya que si no se incuban las células con éste no se observa el incremento de la expresión de elastasa al co-infectar las células con p48 y Mist-1 (resultados no mostrados). Esto podría explicarse también de diversas maneras 1) que p48 y Mist-1 actúen sobre una población pancreática inducida por el SN pancreático fetal; 2) que sea necesario algún factor soluble del SN que active alguna vía de señalización necesaria para observar el efecto de p48 y Mist-1.

Cuando p48 y Mist-1 se co-transducen en las células ES en diferenciación se incrementa la expresión de algunos enzimas digestivos, pero no se consigue incrementar la expresión de receptores de la ruta secretora de los enzimas digestivos, así como la del factor de transcripción RBP-L, cuya función es muy importante en la regulación de la expresión de los enzimas digestivos, de lo que ya se había incrementado con el uso del SN pancreático (Figura 18). Estos resultados podrían indicar que sería necesaria una expresión sostenida de p48 y Mist-1 durante todo el protocolo de selección genética o bien, como ya se ha descrito para Pdx1 *in vivo* (99, 197), que el efecto de estos factores en la diferenciación acinar sea dosis dependiente. Además con el interés de modelizar al máximo la cinética de expresión de estos factores de transcripción durante el desarrollo embrionario, abordamos la co-infección múltiple, ya que p48 se expresa durante el

desarrollo embrionario en los precursores pancreáticos a partir de E9.5, la expresión del cual decae posteriormente y vuelve a detectarse en los progenitores acinares. La expresión de Mist-1 se detecta a partir de E10.5 en células acinares en diferenciación y se expresa a lo largo de todo el desarrollo embrionario y en el adulto específicamente en el linaje acinar.

Sabiendo que, al menos con el adenovirus que expresa p48 o LacZ, la expresión del transgén empieza a decaer 14 días post-infección y es prácticamente nula 21 días post-infección, abordamos la segunda infección en este momento.

Así, la co-transducción múltiple de p48 y Mist-1 incrementaba la expresión de todos los enzimas digestivos analizados, así como de los receptores de la ruta secretora de éstos e incluso la de RBP-L (Figura 18 y 20). Distintas hipótesis podrían explicar el incremento de la expresión de los enzimas digestivos. Por un lado que la expresión sostenida o la dosis conseguida de p48 y Mist-1 sea necesaria para el incremento de la expresión de estos enzimas o bien que al incrementar la expresión de RBP-L este regule la expresión de los enzimas digestivos incrementándola, como ya se ha descrito en la literatura (20).

Se ha descrito extensamente que existe una relación inversamente proporcional entre proliferación celular y diferenciación, de manera que las células una vez diferenciadas disminuyen su capacidad proliferativa o incluso dejan de proliferar. Por ello, nos interesamos en analizar la capacidad proliferativa, hipotetizando que cuando más diferenciadas estuvieran las células seleccionadas su capacidad proliferativa disminuiría, hecho que fue corroborado con los resultados obtenidos. Observamos que el uso del SN pancreático fetal había un 48% menos de células en proliferación, disminución que incrementaba en un 66% cuando realizábamos la co-infección múltiple de las células con p48 y Mist-1 (condición 3). Esto sugería que el SN pancreático fetal además de tener un efecto proliferativo, como ya hemos descrito, en la fase de suspensión de los EBs nos permitía seleccionar células más diferenciadas. Cabe destacar que para observar la disminución de la proliferación observada con la sobreexpresión de p48 y Mist-1 era necesario el uso del SN pancreático, indicando la posibilidad de un efecto sinérgico, ya que si se realizaba la co-infección múltiple de p48 y Mist-1 pero no se incubaban las células con SN pancreático fetal la disminución de la proliferación no

se observaba (resultados no mostrados). Estos resultados podrían explicarse de diversas maneras, 1) que p48 y Mist-1 actúen sobre una población pancreática inducida por el SN pancreático fetal o 2) que sea necesario algún factor soluble del SN que active alguna vía de señalización necesaria para observar el efecto de p48 y Mist-1. Por otro lado, la disminución de la proliferación en la condición 3 podría explicarse no solo por la inducción de un fenotipo más diferenciado, sino también por los efectos antiproliferativos descritos de p48.

El análisis de la expresión de marcadores de diferenciación en las células seleccionadas obtenidas en la condición 3 nos indican, en primer lugar, por la expresión de E-Cadherina (Figura 23), que prácticamente el 100% de las células seleccionadas son de fenotipo epitelial y además al expresar también  $\beta$ -catenina y ambas proteínas localizarse correctamente en la membrana celular probablemente las células formen correctas uniones de adhesión. En segundo lugar, expresan los marcadores de diferenciación más característicos de las células acinares, los enzimas digestivos (amilasa, elastasa, carboxipeptidasa A y quimiotripsinógeno), como se observa por RT-PCR semicuantitativa y cuantitativa (Figura 18 y 21) y por inmunofluorescencia se observa que el 70% de las células de la condición 3 expresan amilasa y carboxipeptidasa A (Figura 24). En tercer lugar, que expresan factores de transcripción implicados en la diferenciación acinar como *pdx1*, p48 y Mist1 (Figura 18 y 21) en un 40, 50 y 70% de las células respectivamente (Figura 25). Estos resultados demuestran que las células diferenciadas seleccionadas comparten características fenotípicas con células acinares según la expresión de marcadores de diferenciación.

En la literatura se asume que la expresión de los distintos enzimas digestivos sintetizados y producidos en las células acinares (amilasa, elastasa, carboxipeptidasa A...) se regula de la misma manera, pero en nuestro estudio todo parece indicar que la regulación de la expresión de los distintos enzimas digestivos no es la misma, ya que no observamos un incremento de la expresión de los distintos enzimas simultáneamente ni bajo las mismas condiciones (Figuras 1B-C, 6B-C, 14 y 18). Nuestros resultados sugieren que la expresión de carboxipeptidasa A y quimiotripsinógeno podrían regularse por los mismos mecanismos, pero tanto elastasa como amilasa regularían su expresión por mecanismos independientes. Todo indica también que la distinta regulación de la expresión de estos enzimas tampoco depende del grupo enzimático en que se clasifican

según el sustrato que catalizan (enzimas amilolíticos, lipolíticos, proteolíticos y nucleolíticos) ya que por ejemplo quimiotripsinógeno y elastasa son enzimas proteolíticos la regulación de la expresión de los cuales no parece ser la misma en nuestros protocolos.

La función de las células acinares pancreáticas es la síntesis y secreción de enzimas digestivos. Éstos son sintetizados en el retículo endoplasmático y posteriormente son transportados al aparato de Golgi y finalmente son segregados en vacuolas condensadas que darán lugar a los gránulos de zimógeno que se localizarán en el polo apical de la célula. El análisis de la expresión, en las células seleccionadas, de proteínas implicadas en la ruta secretora demuestran que más del 70% de las células expresan VAMP-8, sinatxina 4 y CCKAr. VAMP-8, es una proteína v-SNARE que se localiza en la membrana de los gránulos de zimógeno, y se une a una proteína t-SNARE localizada en la membrana plasmática de la célula acinar, syntaxina-4 (288). La expresión de ambas proteínas SNARE parece localizarse correctamente en las células seleccionadas de la condición 3, observándose en las otras condiciones una subpoblación celular con un patrón de expresión nuclear para VAMP-8. Este patrón nuclear también lo hemos observado en la línea celular acinar en cultivo AR42J, de la cual se ha descrito extensamente que es una línea celular con un fenotipo acinar no totalmente diferenciado (48, 242-244) y que no presentan secreción regulada sino constitutiva por la ausencia de gránulos de zimógeno (89). Estos datos sugiere que la sobreexpresión de p48 y Mist-1 induce un fenotipo más diferenciado y con ello la correcta localización de las proteínas de la ruta secretora, esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que únicamente en las células de la condición 3 se observa una expresión de CCKAr membranar en un polo de la célula, que pudiera ser la zona basolateral, lugar donde se localiza la expresión de este receptor en las células acinares (Figura 27). Además los ensayos de unión de CCKA radioactiva en las células diferenciadas seleccionadas nos indican unión específica de CCK a su receptor, confirmando otra vez más que las células seleccionadas expresan CCK y que esta, al menos en parte, se localiza en la membrana plasmática en mayor proporción en las células de la condición 3 (Figura 28).

El calcio intracelular libre se considera la primera molécula señalizadora que dirige la secreción de los enzimas digestivos en las células acinares. Los resultados

obtenidos de las mediadas de calcio intracelular en respuesta a secretagogos en las células diferenciadas seleccionadas, nos muestran respuestas de distinta madurez, así como la secreción de amilasa en respuesta a secretagogos sugieren que en las tres condiciones analizadas obtenemos células en distintos estadios de diferenciación acinar (Figura 29 y 39). El análisis de secreción de amilasa en respuesta a distintos secretagogos nos indica que las células presentan muy poca amilasa intracelular, y que la amilasa detectada en el medio extracelular podría tratarse de amilasa de neo-síntesis. Se sabe que los secretagogos no solo inducen la secreción de los enzimas digestivos, sino que también inducen síntesis *de novo* (232, 293), así que todo sugiere que al tratarse de células acinares inmaduras y al solo observar vesículas condensadas ZG-like por microscopia electrónica, pero no ZG maduros en las células, lo que estamos observando es la secreción constitutiva de amilasa de neo síntesis en respuesta a secretagogos.

Para la correcta formación de los ZG se necesitan elevadas cantidades de enzimas digestivos, así pues, la falta de ZG en nuestras células podría sugerir que la cantidad de enzimas digestivos, aunque incrementada en las células diferenciadas seleccionadas con la condición 3, no es suficiente para la formación de ZG maduros si la comparamos con las líneas acinares en cultivo o los acinos aislados. Así que todo parece indicar que sería necesario incrementar más el contenido de enzimas digestivos por célula, pero seguramente esto no sería suficiente, ya que las líneas celulares acinares en cultivo presentan una expresión mayor de enzimas digestivos pero tampoco los almacenan en ZG. Se ha descrito extensamente la importancia en la secreción de los gránulos de zimógeno de los receptores de proteínas cargo, que están asociadas a la membrana luminal del aparato de Golgi y son importantes para la selección de las proteínas desde el TGN (trans-golgi network) hasta la formación de los gránulos. Entre ellas se ha descrito la importancia de pro-muclina (53, 54), que se procesa en el TGN a muclina y que une las proteínas que formarán los gránulos a pH ácido. Su sobreexpresión en la línea celular acinar de rata, AR42J, que no presenta secreción regulada y carece de gránulos, es suficiente para inducir la formación de éstos y la secreción regulada en respuesta a un estímulo (55). Además se ha descrito que a pH medio ácido pro-muclina se une a amilasa, pro-lipasa, pro-carboxipeptidasa A, pro-elastasa II y quimiotripsinógeno B. Así que un posible abordaje para conseguir diferenciar células acinares maduras a partir de células ES sería sobreexpresar pro-

muclina en las células seleccionadas diferenciadas con el fin de conseguir la correcta formación de ZG maduros, además de usar las matrices extracelulares en el protocolo de selección con el fin de incrementar la expresión de los enzimas digestivos en las células seleccionadas para que el contenido de estos por célula sea suficiente para que puedan ser almacenados en los ZG.

Por último destacar que las células diferenciadas seleccionadas que presentaban un fenotipo más diferenciado acinar-like siempre se encontraban en agregados celulares. Trabajos recientes demuestran como el uso de componentes de matriz extracelular así como polímero biodegradables mejora la eficiencia de diferenciación de las células ES a células endoteliales de la epidemis, queratinocitos, condorcitos y osteoblastos. Por ello y después de haber analizado el efecto de distintos componentes de matriz extracelular en nuestros cultivos demostrando un efecto en la diferenciación acinar, aunque limitados, los resultados sugieren que el uso de biomateriales sería útil para forzar la diferenciación acinar terminal o bien para el mantenimiento de las células con fenotipo acinar diferenciado. Así pues pensamos que el aislamiento de los agregados celulares que presentan las células con un fenotipo acinar más diferenciado y la introducción de éstos en scaffolds de polimeros biodegradables, podría permitir a las células organizarse en una estructura tridimensional, como ocurre en los acinos, permitiendo un correcto contacto célula-célula y forzar la diferenciación acinar terminal y/o bien el mantenimiento del fenotipo acinar diferenciado.

En resumen, al final del protocolo de selección hemos conseguido purificar y enriquecer los cultivos de células diferenciadas que comparten características fenotípicas con células acinares inmaduras (*acinar-like*) según la expresión de marcadores de diferenciación y la respuesta funcional a secretagogos. Además, en cada condición experimental obtenemos células en distinto estadios de diferenciación acinar.

Se sabe que en la PC el tejido acinar es substituido por complejos ductales y las células acinares en cultivo sufren también una transdiferenciación acinar-ductal, además hay muy pocas líneas celulares en cultivo con fenotipo acinar. Por ello, los estudios centrados en los mecanismos moleculares implicados en la diferenciación de las células acinares en condiciones normales o patológicas han estado limitados por la falta de buenos modelos *in vitro*. Por ello, el uso de células madre para obtener células acinares

pancreáticas podría ser útil para usar estas células como modelos celulares *in vitro* de diferenciación acinar que nos permitan identificar 1) que vías de señalización modulan la diferenciación acinar; 2) nuevos genes reguladores específicos de la diferenciación acinar; 3) que factores o vías de señalización son necesarios para el mantenimiento del fenotipo acinar diferenciado. Además la posibilidad de obtener célula *acinar-like* en distintos estadios de diferenciación puede permitir estudiar las vías de señalización y los genes reguladores requeridos en cada uno de los estadios de diferenciación acinar que todavía no se conocen.

Datos recientes parecen indicar que la especificación inicial de las células ES a células del endodermo definitivo es crítica para una eficiente producción de células productoras de insulina (50, 298). Nosotros hemos descrito que el uso de una estrategia múltiple nos permite diferenciar células *acinar-like* a partir de células ES, y los resultados recientes de la eficiente producción de células productoras de insulina sugieren que para incrementar la eficiencia de nuestro protocolo un posible abordaje sería inducir la diferenciación previa de las células a células del endodermo definitivo.



INTRODUCCIÓN  
OBJETIVOS  
MATERIALES Y MÉTODOS  
RESULTADOS  
DISCUSIÓN  
**CONCLUSIONES**  
BIBLIOGRAFÍA



**1.** Los SNP contienen un cóctel de factores que inducen tanto la diferenciación endocrina como exocrina de las células ES.

**2.** El SN del cultivo del mesénquima pancreático y de las líneas celulares NIH3T3, 266-6 y AR42J no tienen un efecto selectivo sobre la expresión de marcadores exocrinos en las células ES.

**3.** Folistatina induce un incremento selectivo de la expresión de marcadores exocrinos en las células ES.

**4.** La sobreexpresión de factores de transcripción en las células ES activa programas de diferenciación específicos de linaje. En particular, la transducción de Pdx1 activa la expresión de un fenotipo acinar, pero no es suficiente para inducir un incremento en la expresión de todos los marcadores exocrinos. La co-expresión de p48, permite la diferenciación selectiva de las células ES al linaje acinar, aunque las células exocrinas generadas presentan un fenotipo inmaduro.

**5.** El desarrollo de un protocolo de selección genética de las células ES comprometidas al linaje acinar incubadas con SNP y co-infectadas con adenovirus que expresan p48 y Mist-1 dos veces durante el protocolo de selección (condición 3) nos ha permitido, purificar y enriquecer células diferenciadas que comparten características fenotípicas con células acinares inmaduras según la expresión de marcadores de diferenciación y la respuesta funcional a secretagogos. Concretamente hemos conseguido:

**5.1.** Incrementar la expresión en las células diferenciadas seleccionadas de enzimas digestivos (amilasa, elastasa, carboxipeptidasa A y quimiotripsinógeno), de factores de transcripción específicos acinares (Pdx1, p48 y RBP-L), de proteínas de la ruta secretora de los enzimas digestivos (VAMP-8 y sinatxina-4) y del receptor de CCK (CCKAr); y por otro lado disminuir la expresión de marcadores endocrinos (ngn3, glucagón e insulina).

**5.2.** Disminuir la proliferación de las células seleccionadas, indicando que éstas presentan un fenotipo más diferenciado.

**5.3.** Seleccionar células que responden a CCH incrementando el calcio intracelular con un patrón de respuesta similar al que se observa en los acinos pancreáticos aislados a las mismas dosis de secretagogo.

**5.4.** Seleccionar células que responden a los secretagogos, CCH, CCK y ceruleína secretando amilasa al medio extracelular, aunque no se trata de una secreción regulada.

**5.5.** Seleccionar células que presentan vacuolas electrodensas en la parte apical que podrían tratarse de gránulos de zimógeno inmaduros (ZG-like).

INTRODUCCIÓN  
OBJETIVOS  
MATERIALES Y MÉTODOS  
RESULTADOS  
DISCUSIÓN  
CONCLUSIONES  
**BIBLIOGRAFÍA**



1. **Abe, K., H. Niwa, K. Iwase, M. Takiguchi, M. Mori, S. I. Abe, K. Abe, and K. I. Yamamura.** 1996. Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. *Exp Cell Res* **229**:27-34.
2. **Adell, T., A. Gomez-Cuadrado, A. Skoudy, O. S. Pettengill, D. S. Longnecker, and F. X. Real.** 2000. Role of the basic helix-loop-helix transcription factor p48 in the differentiation phenotype of exocrine pancreas cancer cells. *Cell Growth Differ* **11**:137-47.
3. **Ahlgren, U., J. Jonsson, and H. Edlund.** 1996. The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development* **122**:1409-16.
4. **Ahlgren, U., S. L. Pfaff, T. M. Jessell, T. Edlund, and H. Edlund.** 1997. Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* **385**:257-60.
5. **Ali, N. N., A. J. Edgar, A. Samadikuchaksaraei, C. M. Timson, H. M. Romanska, J. M. Polak, and A. E. Bishop.** 2002. Derivation of type II alveolar epithelial cells from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng* **8**:541-50.
6. **Amthor, H., B. Christ, F. Rashid-Doubell, C. F. Kemp, E. Lang, and K. Patel.** 2002. Follistatin regulates bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) activity to stimulate embryonic muscle growth. *Dev Biol* **243**:115-27.
7. **Amthor, H., G. Nicholas, I. McKinnell, C. F. Kemp, M. Sharma, R. Kambadur, and K. Patel.** 2004. Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. *Dev Biol* **270**:19-30.
8. **Antonin, W., M. Wagner, D. Riedel, N. Brose, and R. Jahn.** 2002. Loss of the zymogen granule protein syncollin affects pancreatic protein synthesis and transport but not secretion. *Mol Cell Biol* **22**:1545-54.
9. **Apelqvist, A., U. Ahlgren, and H. Edlund.** 1997. Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr Biol* **7**:801-4.
10. **Apelqvist, A., H. Li, L. Sommer, P. Beatus, D. J. Anderson, T. Honjo, M. Hrabe de Angelis, U. Lendahl, and H. Edlund.** 1999. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* **400**:877-81.
11. **Arias, A. E., and M. Bendayan.** 1993. Differentiation of pancreatic acinar cells into duct-like cells in vitro. *Lab Invest* **69**:518-30.
12. **Artner, I., J. Le Lay, Y. Hang, L. Elghazi, J. C. Schisler, E. Henderson, B. Sosa-Pineda, and R. Stein.** 2006. MafB: an activator of the glucagon gene expressed in developing islet alpha- and beta-cells. *Diabetes* **55**:297-304.
13. **Assady, S., G. Maor, M. Amit, J. Itskovitz-Eldor, K. L. Skorecki, and M. Tzukerman.** 2001. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* **50**:1691-7.

14. **Avilion, A. A., S. K. Nicolis, L. H. Pevny, L. Perez, N. Vivian, and R. Lovell-Badge.** 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* **17**:126-40.
15. **Baeyens, L., S. De Breuck, J. Lardon, J. K. Mfopou, I. Rومان, and L. Bouwens.** 2005. In vitro generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells. *Diabetologia* **48**:49-57.
16. **Bai, L., G. Meredith, and B. E. Tuch.** 2005. Glucagon-like peptide-1 enhances production of insulin in insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells. *J Endocrinol* **186**:343-52.
17. **Bain, G., D. Kitchens, M. Yao, J. E. Huettner, and D. I. Gottlieb.** 1995. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* **168**:342-57.
18. **Bansal, P., and A. Sonnenberg.** 1995. Pancreatitis is a risk factor for pancreatic cancer. *Gastroenterology* **109**:247-51.
19. **Bardeesy, N., and R. A. DePinho.** 2002. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* **2**:897-909.
20. **Beres, T. M., T. Masui, G. H. Swift, L. Shi, R. M. Henke, and R. J. MacDonald.** 2006. PTF1 is an organ-specific and Notch-independent basic helix-loop-helix complex containing the mammalian Suppressor of Hairless (RBP-J) or its paralogue, RBP-L. *Mol Cell Biol* **26**:117-30.
21. **Bhushan, A., N. Itoh, S. Kato, J. P. Thiery, P. Czernichow, S. Bellusci, and R. Scharfmann.** 2001. Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development* **128**:5109-17.
22. **Bieberich, E.** 2005. Replacement of insulin by LongR3-IGF-1 allows for the differentiation of ES cells into neuroprogenitors and insulin-secreting cells. *Anal Biochem* **346**:185-7.
23. **Bielby, R. C., A. R. Boccaccini, J. M. Polak, and L. D. Buttery.** 2004. In vitro differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells. *Tissue Eng* **10**:1518-25.
24. **Blyszczuk, P., C. Asbrand, A. Rozzo, G. Kania, L. St-Onge, M. Rupnik, and A. M. Wobus.** 2004. Embryonic stem cells differentiate into insulin-producing cells without selection of nestin-expressing cells. *Int J Dev Biol* **48**:1095-104.
25. **Blyszczuk, P., J. Czyz, G. Kania, M. Wagner, U. Roll, L. St-Onge, and A. M. Wobus.** 2003. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:998-1003.
26. **Bockman, D. E.** 1995. Toward understanding pancreatic disease: from architecture to cell signaling. *Pancreas* **11**:324-9.

27. **Bort, R., J. P. Martinez-Barbera, R. S. Beddington, and K. S. Zaret.** 2004. Hex homeobox gene-dependent tissue positioning is required for organogenesis of the ventral pancreas. *Development* **131**:797-806.
28. **Bosco, D., P. Meda, P. A. Halban, and D. G. Rouiller.** 2000. Importance of cell-matrix interactions in rat islet beta-cell secretion in vitro: role of alpha6beta1 integrin. *Diabetes* **49**:233-43.
29. **Bottinger, E. P., J. L. Jakubczak, I. S. Roberts, M. Mumy, P. Hemmati, K. Bagnall, G. Merlino, and L. M. Wakefield.** 1997. Expression of a dominant-negative mutant TGF-beta type II receptor in transgenic mice reveals essential roles for TGF-beta in regulation of growth and differentiation in the exocrine pancreas. *Embo J* **16**:2621-33.
30. **Boulatnikov, I., and R. C. De Lisle.** 2004. Binding of the Golgi sorting receptor muclin to pancreatic zymogens through sulfated O-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* **279**:40918-26.
31. **Boyer, L. A., K. Plath, J. Zeitlinger, T. Brambrink, L. A. Medeiros, T. I. Lee, S. S. Levine, M. Wernig, A. Tajonar, M. K. Ray, G. W. Bell, A. P. Otte, M. Vidal, D. K. Gifford, R. A. Young, and R. Jaenisch.** 2006. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* **441**:349-53.
32. **Brazelton, T. R., F. M. Rossi, G. I. Keshet, and H. M. Blau.** 2000. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* **290**:1775-9.
33. **Brolen, G. K., N. Heins, J. Edsbacke, and H. Semb.** 2005. Signals from the embryonic mouse pancreas induce differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing beta-cell-like cells. *Diabetes* **54**:2867-74.
34. **Brustle, O., K. N. Jones, R. D. Learish, K. Karram, K. Choudhary, O. D. Wiestler, I. D. Duncan, and R. D. McKay.** 1999. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* **285**:754-6.
35. **Brustle, O., A. C. Spiro, K. Karram, K. Choudhary, S. Okabe, and R. D. McKay.** 1997. In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:14809-14.
36. **Buttery, L. D., S. Bourne, J. D. Xynos, H. Wood, F. J. Hughes, S. P. Hughes, V. Episkopou, and J. M. Polak.** 2001. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng* **7**:89-99.
37. **Cavaleri, F., and H. R. Scholer.** 2003. Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell* **113**:551-2.
38. **Celli, G., W. J. LaRochelle, S. Mackem, R. Sharp, and G. Merlino.** 1998. Soluble dominant-negative receptor uncovers essential roles for fibroblast growth factors in multi-organ induction and patterning. *Embo J* **17**:1642-55.

39. **Cerdan, C., A. Rouleau, and M. Bhatia.** 2004. VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells. *Blood* **103**:2504-12.
40. **Cleaver, O., and D. A. Melton.** 2003. Endothelial signaling during development. *Nat Med* **9**:661-8.
41. **Cras-Meneur, C., L. Elghazi, P. Czernichow, and R. Scharfmann.** 2001. Epidermal growth factor increases undifferentiated pancreatic embryonic cells in vitro: a balance between proliferation and differentiation. *Diabetes* **50**:1571-9.
42. **Crisera, C. A., A. S. Kadison, G. D. Breslow, T. S. Maldonado, M. T. Longaker, and G. K. Gittes.** 2000. Expression and role of laminin-1 in mouse pancreatic organogenesis. *Diabetes* **49**:936-44.
43. **Chakrabarti, S. K., J. C. James, and R. G. Mirmira.** 2002. Quantitative assessment of gene targeting in vitro and in vivo by the pancreatic transcription factor, Pdx1. Importance of chromatin structure in directing promoter binding. *J Biol Chem* **277**:13286-93.
44. **Chambers, I., D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie, and A. Smith.** 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**:643-55.
45. **Chang, C. F., M. W. Lee, P. Y. Kuo, Y. J. Wang, Y. H. Tu, and S. C. Hung.** 2006. Three-dimensional collagen fiber remodeling by mesenchymal stem cells requires the integrin-matrix interaction. *J Biomed Mater Res A*.
46. **Chen, X., C. Li, T. Izumi, S. A. Ernst, P. C. Andrews, and J. A. Williams.** 2004. Rab27b localizes to zymogen granules and regulates pancreatic acinar exocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* **323**:1157-62.
47. **Chen, Y., F. C. Pan, N. Brandes, S. Afelik, M. Solter, and T. Pieler.** 2004. Retinoic acid signaling is essential for pancreas development and promotes endocrine at the expense of exocrine cell differentiation in *Xenopus*. *Dev Biol* **271**:144-60.
48. **Christophe, J.** 1994. Pancreatic tumoral cell line AR42J: an amphicine model. *Am J Physiol* **266**:G963-71.
49. **D'Amour, K. A., A. D. Agulnick, S. Eliazer, O. G. Kelly, E. Kroon, and E. E. Baetge.** 2005. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* **23**:1534-41.
50. **D'Amour, K. A., A. G. Bang, S. Eliazer, O. G. Kelly, A. D. Agulnick, N. G. Smart, M. A. Moorman, E. Kroon, M. K. Carpenter, and E. E. Baetge.** 2006. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*.
51. **Dahl, U., A. Sjodin, and H. Semb.** 1996. Cadherins regulate aggregation of pancreatic beta-cells in vivo. *Development* **122**:2895-902.

52. **Dani, C., A. G. Smith, S. Dessolin, P. Leroy, L. Staccini, P. Villageois, C. Darimont, and G. Ailhaud.** 1997. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* **110 ( Pt 11):**1279-85.
53. **De Lisle, R. C.** 1994. Characterization of the major sulfated protein of mouse pancreatic acinar cells: a high molecular weight peripheral membrane glycoprotein of zymogen granules. *J Cell Biochem* **56:**385-96.
54. **De Lisle, R. C.** 2002. Role of sulfated O-linked glycoproteins in zymogen granule formation. *J Cell Sci* **115:**2941-52.
55. **De Lisle, R. C., O. Norkina, E. Roach, and D. Ziemer.** 2005. Expression of pro-Muclin in pancreatic AR42J cells induces functional regulated secretory granules. *Am J Physiol Cell Physiol* **289:**C1169-78.
56. **Delacour, A., V. Nepote, A. Trumpp, and P. L. Herrera.** 2004. Nestin expression in pancreatic exocrine cell lineages. *Mech Dev* **121:**3-14.
57. **Dessimoz, J., C. Bonnard, J. Huelsken, and A. Grapin-Botton.** 2005. Pancreas-specific deletion of beta-catenin reveals Wnt-dependent and Wnt-independent functions during development. *Curr Biol* **15:**1677-83.
58. **Deutsch, G., J. Jung, M. Zheng, J. Lora, and K. S. Zaret.** 2001. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* **128:**871-81.
59. **Dichmann, D. S., C. P. Miller, J. Jensen, R. Scott Heller, and P. Serup.** 2003. Expression and misexpression of members of the FGF and TGFbeta families of growth factors in the developing mouse pancreas. *Dev Dyn* **226:**663-74.
60. **Doetschman, T. C., H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt, and R. Kemler.** 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* **87:**27-45.
61. **Donovan, P. J., and M. P. de Miguel.** 2003. Turning germ cells into stem cells. *Curr Opin Genet Dev* **13:**463-71.
62. **Donovan, P. J., and J. Gearhart.** 2001. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* **414:**92-7.
63. **Dor, Y., J. Brown, O. I. Martinez, and D. A. Melton.** 2004. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* **429:**41-6.
64. **Dutta, S., M. Gannon, B. Peers, C. Wright, S. Bonner-Weir, and M. Montminy.** 2001. PDX:PBX complexes are required for normal proliferation of pancreatic cells during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98:**1065-70.
65. **Edlund, H.** 2002. Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* **3:**524-32.

66. **Elghazi, L., C. Cras-Meneur, P. Czernichow, and R. Scharfmann.** 2002. Role for FGFR2IIIb-mediated signals in controlling pancreatic endocrine progenitor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:3884-9.
67. **Erhardt, S., I. H. Su, R. Schneider, S. Barton, A. J. Bannister, L. Perez-Burgos, T. Jenuwein, T. Kouzarides, A. Tarakhovsky, and M. A. Surani.** 2003. Consequences of the depletion of zygotic and embryonic enhancer of zeste 2 during preimplantation mouse development. *Development* **130**:4235-48.
68. **Esni, F., B. R. Johansson, G. L. Radice, and H. Semb.** 2001. Dorsal pancreas agenesis in N-cadherin- deficient mice. *Dev Biol* **238**:202-12.
69. **Esni, F., D. A. Stoffers, T. Takeuchi, and S. D. Leach.** 2004. Origin of exocrine pancreatic cells from nestin-positive precursors in developing mouse pancreas. *Mech Dev* **121**:15-25.
70. **Esni, F., I. B. Taljedal, A. K. Perl, H. Cremer, G. Christofori, and H. Semb.** 1999. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) is required for cell type segregation and normal ultrastructure in pancreatic islets. *J Cell Biol* **144**:325-37.
71. **Evans, M. J., and M. H. Kaufman.** 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**:154-6.
72. **Fazio, E. N., M. Everest, R. Colman, R. Wang, and C. L. Pin.** 2005. Altered Glut-2 accumulation and beta-cell function in mice lacking the exocrine-specific transcription factor, *Mist1*. *J Endocrinol* **187**:407-18.
73. **Fell, P. E., and C. Grobstein.** 1968. The influence of extra-epithelial factors on the growth of embryonic mouse pancreatic epithelium. *Exp Cell Res* **53**:301-4.
74. **Finch, B. W., and B. Ephrussi.** 1967. Retention of multiple developmental potentialities by cells of a mouse testicular teratocarcinoma during prolonged culture in vitro and their extinction upon hybridization with cells of permanent lines *Proc Natl Acad Sci U S A* **57**:615-621.
75. **Finley, M. F., N. Kulkarni, and J. E. Huettner.** 1996. Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells. *J Neurosci* **16**:1056-65.
76. **Fodor, W. L.** 2003. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol* **1**:102.
77. **Fraichard, A., O. Chassande, G. Bilbaut, C. Dehay, P. Savatier, and J. Samarut.** 1995. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci* **108 ( Pt 10)**:3181-8.
78. **Fuchs, E., T. Tumber, and G. Guasch.** 2004. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* **116**:769-78.

79. **Futatsugi, A., T. Nakamura, M. K. Yamada, E. Ebisui, K. Nakamura, K. Uchida, T. Kitaguchi, H. Takahashi-Iwanaga, T. Noda, J. Aruga, and K. Mikoshiba.** 2005. IP3 receptor types 2 and 3 mediate exocrine secretion underlying energy metabolism. *Science* **309**:2232-4.
80. **Gaisano, H. Y., M. Ghai, P. N. Malkus, L. Sheu, A. Bouquillon, M. K. Bennett, and W. S. Trimble.** 1996. Distinct cellular locations of the syntaxin family of proteins in rat pancreatic acinar cells. *Mol Biol Cell* **7**:2019-27.
81. **Gaisano, H. Y., X. Huang, L. Sheu, M. Ghai, C. B. Newgard, K. Y. Trinh, and W. S. Trimble.** 1999. Snare protein expression and adenoviral transfection of ampicrine AR42J. *Biochem Biophys Res Commun* **260**:781-4.
82. **Gaisano, H. Y., M. P. Lutz, J. Leser, L. Sheu, G. Lynch, L. Tang, Y. Tamori, W. S. Trimble, and A. M. Salapatek.** 2001. Supramaximal cholecystokinin displaces Munc18c from the pancreatic acinar basal surface, redirecting apical exocytosis to the basal membrane. *J Clin Invest* **108**:1597-611.
83. **Gaisano, H. Y., L. Sheu, J. K. Foskett, and W. S. Trimble.** 1994. Tetanus toxin light chain cleaves a vesicle-associated membrane protein (VAMP) isoform 2 in rat pancreatic zymogen granules and inhibits enzyme secretion. *J Biol Chem* **269**:17062-6.
84. **Gaisano, H. Y., L. Sheu, P. P. Wong, A. Klip, and W. S. Trimble.** 1997. SNAP-23 is located in the basolateral plasma membrane of rat pancreatic acinar cells. *FEBS Lett* **414**:298-302.
85. **Geijsen, N., M. Horoschak, K. Kim, J. Gribnau, K. Eggan, and G. Q. Daley.** 2004. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* **427**:148-54.
86. **Gesina, E., F. Tronche, P. Herrera, B. Duchene, W. Tales, P. Czernichow, and B. Breant.** 2004. Dissecting the role of glucocorticoids on pancreas development. *Diabetes* **53**:2322-9.
87. **Gittes, G. K., P. E. Galante, D. Hanahan, W. J. Rutter, and H. T. Debase.** 1996. Lineage-specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors. *Development* **122**:439-47.
88. **Glasgow, S. M., R. M. Henke, R. J. Macdonald, C. V. Wright, and J. E. Johnson.** 2005. Ptf1a determines GABAergic over glutamatergic neuronal cell fate in the spinal cord dorsal horn. *Development* **132**:5461-9.
89. **Gorr, S. U., and Y. R. Moore.** 1999. Sorting of a constitutive secretory protein to the regulated secretory pathway of exocrine cells. *Biochem Biophys Res Commun* **257**:545-8.
90. **Gradwohl, G., A. Dierich, M. LeMeur, and F. Guillemot.** 2000. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:1607-11.

91. **Grapin-Botton, A., A. R. Majithia, and D. A. Melton.** 2001. Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. *Genes Dev* **15**:444-54.
92. **Grendell JH, E. T.** 1998. *Anatomy, histology, embryology and developmental anomalies of the pancreas.*, 6. <sup>a</sup> ed. ed, Filadelfía.
93. **Gu, G., J. Dubauskaite, and D. A. Melton.** 2002. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* **129**:2447-57.
94. **Gu, G., J. M. Wells, D. Dombkowski, F. Pfeffer, B. Aronow, and D. A. Melton.** 2004. Global expression analysis of gene regulatory pathways during endocrine pancreatic development. *Development* **131**:165-79.
95. **Guz, Y., M. R. Montminy, R. Stein, J. Leonard, L. W. Gamer, C. V. Wright, and G. Teitelman.** 1995. Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* **121**:11-8.
96. **Habener JF, S. D.** 1998. A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Proc Assoc Am Physicians* **110**:12-2.
97. **Habener, J. F., and D. A. Stoffers.** 1998. A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Proc Assoc Am Physicians* **110**:12-21.
98. **Hald, J., J. P. Hjorth, M. S. German, O. D. Madsen, P. Serup, and J. Jensen.** 2003. Activated Notch1 prevents differentiation of pancreatic acinar cells and attenuate endocrine development. *Dev Biol* **260**:426-37.
99. **Hale, M. A., H. Kagami, L. Shi, A. M. Holland, H. P. Elsasser, R. E. Hammer, and R. J. MacDonald.** 2005. The homeodomain protein PDX1 is required at mid-pancreatic development for the formation of the exocrine pancreas. *Dev Biol* **286**:225-37.
100. **Hamazaki, T., Y. Iiboshi, M. Oka, P. J. Papst, A. M. Meacham, L. I. Zon, and N. Terada.** 2001. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett* **497**:15-9.
101. **Hamazaki, T., and N. Terada.** 2003. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes. *Methods Enzymol* **365**:277-87.
102. **Hanna, L. A., R. K. Foreman, I. A. Tarasenko, D. S. Kessler, and P. A. Labosky.** 2002. Requirement for Foxd3 in maintaining pluripotent cells of the early mouse embryo. *Genes Dev* **16**:2650-61.
103. **Hansen, N. J., W. Antonin, and J. M. Edwardson.** 1999. Identification of SNAREs involved in regulated exocytosis in the pancreatic acinar cell. *J Biol Chem* **274**:22871-6.

104. **Harrison, K. A., J. Thaler, S. L. Pfaff, H. Gu, and J. H. Kehrl.** 1999. Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in Hlxb9-deficient mice. *Nat Genet* **23**:71-5.
105. **Hart, A., S. Papadopoulou, and H. Edlund.** 2003. Fgf10 maintains notch activation, stimulates proliferation, and blocks differentiation of pancreatic epithelial cells. *Dev Dyn* **228**:185-93.
106. **Hart, A. W., N. Baeza, A. Apelqvist, and H. Edlund.** 2000. Attenuation of FGF signalling in mouse beta-cells leads to diabetes. *Nature* **408**:864-8.
107. **He, T. C., S. Zhou, L. T. da Costa, J. Yu, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein.** 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:2509-14.
108. **Hebrok, M., S. K. Kim, and D. A. Melton.** 1998. Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev* **12**:1705-13.
109. **Hebrok, M., S. K. Kim, B. St Jacques, A. P. McMahon, and D. A. Melton.** 2000. Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development* **127**:4905-13.
110. **Heiser, P. W., J. Lau, M. M. Taketo, P. L. Herrera, and M. Hebrok.** 2006. Stabilization of beta-catenin impacts pancreas growth. *Development* **133**:2023-32.
111. **Herrera, P. L.** 2000. Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* **127**:2317-22.
112. **Hill, C. S.** 2001. TGF-beta signalling pathways in early *Xenopus* development. *Curr Opin Genet Dev* **11**:533-40.
113. **Hooper, M., K. Hardy, A. Handyside, S. Hunter, and M. Monk.** 1987. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* **326**:292-5.
114. **Horb, M. E., C. N. Shen, D. Tosh, and J. M. Slack.** 2003. Experimental conversion of liver to pancreas. *Curr Biol* **13**:105-15.
115. **Hori, Y., I. C. Rulifson, B. C. Tsai, J. J. Heit, J. D. Cahoy, and S. K. Kim.** 2002. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:16105-10.
116. **Hoshino, M., S. Nakamura, K. Mori, T. Kawauchi, M. Terao, Y. V. Nishimura, A. Fukuda, T. Fuse, N. Matsuo, M. Sone, M. Watanabe, H. Bito, T. Terashima, C. V. Wright, Y. Kawaguchi, K. Nakao, and Y. Nabeshima.** 2005. Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron* **47**:201-13.

117. **Hua, H., Y. Q. Zhang, S. Dabernat, M. Kritzik, D. Dietz, L. Sterling, and N. Sarvetnick.** 2006. BMP4 regulates pancreatic progenitor cell expansion through Id2. *J Biol Chem* **281**:13574-80.
118. **Huang, X., L. Sheu, Y. Kang, Y. Eto, I. Kojima, and H. Y. Gaisano.** 2002. Effects of selective endocrine or exocrine induction of AR42J on SNARE and Munc18 protein expression. *Pancreas* **25**:e56-63.
119. **Huang, X., L. Sheu, Y. Tamori, W. S. Trimble, and H. Y. Gaisano.** 2001. Cholecystokinin-regulated exocytosis in rat pancreatic acinar cells is inhibited by a C-terminus truncated mutant of SNAP-23. *Pancreas* **23**:125-33.
120. **Hubner, K., G. Fuhrmann, L. K. Christenson, J. Kehler, R. Reinbold, R. De La Fuente, J. Wood, J. F. Strauss, 3rd, M. Boiani, and H. R. Scholer.** 2003. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* **300**:1251-6.
121. **Hunziker, E., and M. Stein.** 2000. Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun* **271**:116-9.
122. **Jackson, K. A., T. Mi, and M. A. Goodell.** 1999. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:14482-6.
123. **Jena, B. P., F. D. Gumkowski, E. M. Konieczko, G. F. von Mollard, R. Jahn, and J. D. Jamieson.** 1994. Redistribution of a rab3-like GTP-binding protein from secretory granules to the Golgi complex in pancreatic acinar cells during regulated exocytosis. *J Cell Biol* **124**:43-53.
124. **Jensen, J., E. E. Pedersen, P. Galante, J. Hald, R. S. Heller, M. Ishibashi, R. Kageyama, F. Guillemot, P. Serup, and O. D. Madsen.** 2000. Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet* **24**:36-44.
125. **Jensen, R.** 1994. *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3rd ed ed, New York: Raven Press.
126. **Ji, B., Y. Bi, D. Simeone, R. M. Mortensen, and C. D. Logsdon.** 2001. Human pancreatic acinar cells lack functional responses to cholecystokinin and gastrin. *Gastroenterology* **121**:1380-90.
127. **Jiang, F. X., G. Naselli, and L. C. Harrison.** 2002. Distinct distribution of laminin and its integrin receptors in the pancreas. *J Histochem Cytochem* **50**:1625-32.
128. **Johnson, C. L., A. S. Kowalik, N. Rajakumar, and C. L. Pin.** 2004. Mist1 is necessary for the establishment of granule organization in serous exocrine cells of the gastrointestinal tract. *Mech Dev* **121**:261-72.
129. **Jones, E. A., D. Tosh, D. I. Wilson, S. Lindsay, and L. M. Forrester.** 2002. Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp Cell Res* **272**:15-22.

130. **Jonsson, J., L. Carlsson, T. Edlund, and H. Edlund.** 1994. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* **371**:606-9.
131. **Jorgensen, H. F., S. Giadrossi, M. Casanova, M. Endoh, H. Koseki, N. Brockdorff, and A. G. Fisher.** 2006. Stem cells primed for action: polycomb repressive complexes restrain the expression of lineage-specific regulators in embryonic stem cells. *Cell Cycle* **5**:1411-4.
132. **Kadison, A., J. Kim, T. Maldonado, C. Crisera, K. Prasad, P. Manna, B. Preuett, M. Hembree, M. Longaker, and G. Gittes.** 2001. Retinoid signaling directs secondary lineage selection in pancreatic organogenesis. *J Pediatr Surg* **36**:1150-6.
133. **Kahan, B. W., L. M. Jacobson, D. A. Hullett, J. M. Ochoada, T. D. Oberley, K. M. Lang, and J. S. Odorico.** 2003. Pancreatic precursors and differentiated islet cell types from murine embryonic stem cells: an in vitro model to study islet differentiation. *Diabetes* **52**:2016-24.
134. **Kanai-Azuma, M., Y. Kanai, J. M. Gad, Y. Tajima, C. Taya, M. Kurohmaru, Y. Sanai, H. Yonekawa, K. Yazaki, P. P. Tam, and Y. Hayashi.** 2002. Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development* **129**:2367-79.
135. **Kato, S., and K. Sekine.** 1999. FGF-FGFR signaling in vertebrate organogenesis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **45**:631-8.
136. **Kaufman, D. S., E. T. Hanson, R. L. Lewis, R. Auerbach, and J. A. Thomson.** 2001. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:10716-21.
137. **Kawaguchi, Y., B. Cooper, M. Gannon, M. Ray, R. J. MacDonald, and C. V. Wright.** 2002. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* **32**:128-34.
138. **Kawasaki, H., K. Mizuseki, S. Nishikawa, S. Kaneko, Y. Kuwana, S. Nakanishi, S. I. Nishikawa, and Y. Sasai.** 2000. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* **28**:31-40.
139. **Kim, S. K., M. Hebrok, E. Li, S. P. Oh, H. Schrewe, E. B. Harmon, J. S. Lee, and D. A. Melton.** 2000. Activin receptor patterning of foregut organogenesis. *Genes Dev* **14**:1866-71.
140. **Kim, S. K., M. Hebrok, and D. A. Melton.** 1997. Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development. *Development* **124**:4243-52.
141. **Kim, S. K., and R. J. MacDonald.** 2002. Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **12**:540-7.
142. **Kim, S. K., and D. A. Melton.** 1998. Pancreas development is promoted by cyclopamine, a hedgehog signaling inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13036-41.

143. **Kim, S. K., L. Selleri, J. S. Lee, A. Y. Zhang, X. Gu, Y. Jacobs, and M. L. Cleary.** 2002. Pbx1 inactivation disrupts pancreas development and in Ipf1-deficient mice promotes diabetes mellitus. *Nat Genet* **30**:430-5.
144. **Klug, M. G., M. H. Soonpaa, G. Y. Koh, and L. J. Field.** 1996. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* **98**:216-24.
145. **Kramer, J., G. Hargus, and J. Rohwedel.** 2006. Derivation and characterization of chondrocytes from embryonic stem cells in vitro. *Methods Mol Biol* **330**:171-90.
146. **Krapp, A., M. Knofler, S. Frutiger, G. J. Hughes, O. Hagenbuchle, and P. K. Wellauer.** 1996. The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein. *Embo J* **15**:4317-29.
147. **Kruse, F., S. D. Rose, G. H. Swift, R. E. Hammer, and R. J. MacDonald.** 1993. An endocrine-specific element is an integral component of an exocrine-specific pancreatic enhancer. *Genes Dev* **7**:774-86.
148. **Ku, H. T., N. Zhang, A. Kubo, R. O'Connor, M. Mao, G. Keller, and J. S. Bromberg.** 2004. Committing embryonic stem cells to early endocrine pancreas in vitro. *Stem Cells* **22**:1205-17.
149. **Kubo, A., K. Shinozaki, J. M. Shannon, V. Kouskoff, M. Kennedy, S. Woo, H. J. Fehling, and G. Keller.** 2004. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development* **131**:1651-62.
150. **Kumar, M., N. Jordan, D. Melton, and A. Grapin-Botton.** 2003. Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate. *Dev Biol* **259**:109-22.
151. **Kwon, Y. D., S. K. Oh, H. S. Kim, S. Y. Ku, S. H. Kim, Y. M. Choi, and S. Y. Moon.** 2005. Cellular manipulation of human embryonic stem cells by TAT-PDX1 protein transduction. *Mol Ther* **12**:28-32.
152. **Kyba, M., R. C. Perlingeiro, and G. Q. Daley.** 2002. HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell* **109**:29-37.
153. **Lammert, E., O. Cleaver, and D. Melton.** 2001. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* **294**:564-7.
154. **Lardon, J., N. Huyens, I. Rooman, and L. Bouwens.** 2004. Exocrine cell transdifferentiation in dexamethasone-treated rat pancreas. *Virchows Arch* **444**:61-5.
155. **Lavon, N., O. Yanuka, and N. Benvenisty.** 2006. The effect of overexpression of Pdx1 and Foxa2 on the differentiation of human embryonic stem cells into pancreatic cells. *Stem Cells* **24**:1923-30.

156. **Le Bras, S., F. Miralles, A. Basmaciogullari, P. Czernichow, and R. Scharfmann.** 1998. Fibroblast growth factor 2 promotes pancreatic epithelial cell proliferation via functional fibroblast growth factor receptors during embryonic life. *Diabetes* **47**:1236-42.
157. **Leahy, A., J. W. Xiong, F. Kuhnert, and H. Stuhlmann.** 1999. Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J Exp Zool* **284**:67-81.
158. **Lee, J. C., S. B. Smith, H. Watada, J. Lin, D. Scheel, J. Wang, R. G. Mirmira, and M. S. German.** 2001. Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes* **50**:928-36.
159. **Lee, M., S. Chung, D. Y. Uhm, and M. K. Park.** 2005. Regulation of zymogen granule exocytosis by Ca<sup>2+</sup>, cAMP, and PKC in pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun* **334**:1241-7.
160. **Lee, S. H., N. Lumelsky, L. Studer, J. M. Auerbach, and R. D. McKay.** 2000. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **18**:675-9.
161. **Lee, T. I., R. G. Jenner, L. A. Boyer, M. G. Guenther, S. S. Levine, R. M. Kumar, B. Chevalier, S. E. Johnstone, M. F. Cole, K. Isono, H. Koseki, T. Fuchikami, K. Abe, H. L. Murray, J. P. Zucker, B. Yuan, G. W. Bell, E. Herbolsheimer, N. M. Hannett, K. Sun, D. T. Odom, A. P. Otte, T. L. Volkert, D. P. Bartel, D. A. Melton, D. K. Gifford, R. Jaenisch, and R. A. Young.** 2006. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* **125**:301-13.
162. **Leon-Quinto, T., J. Jones, A. Skoudy, M. Burcin, and B. Soria.** 2004. In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Diabetologia* **47**:1442-51.
163. **Levenberg, S., J. S. Golub, M. Amit, J. Itskovitz-Eldor, and R. Langer.** 2002. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:4391-6.
164. **Li, H., S. Arber, T. M. Jessell, and H. Edlund.** 1999. Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9. *Nat Genet* **23**:67-70.
165. **Li, M., L. Pevny, R. Lovell-Badge, and A. Smith.** 1998. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr Biol* **8**:971-4.
166. **Li, P., K. Y. Lee, T. M. Chang, and W. Y. Chey.** 1990. Mechanism of acid-induced release of secretin in rats. Presence of a secretin-releasing peptide. *J Clin Invest* **86**:1474-9.
167. **Li, Z., P. Manna, H. Kobayashi, T. Spilde, A. Bhatia, B. Preuett, K. Prasad, M. Hembree, and G. K. Gittes.** 2004. Multifaceted pancreatic mesenchymal control of epithelial lineage selection. *Dev Biol* **269**:252-63.

168. **Lin, R. Y., A. Kubo, G. M. Keller, and T. F. Davies.** 2003. Committing embryonic stem cells to differentiate into thyrocyte-like cells in vitro. *Endocrinology* **144**:2644-9.
169. **Liu, H., J. Lin, and K. Roy.** 2006. Effect of 3D scaffold and dynamic culture condition on the global gene expression profile of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials* **27**:5978-89.
170. **Liu, H., and K. Roy.** 2005. Biomimetic three-dimensional cultures significantly increase hematopoietic differentiation efficacy of embryonic stem cells. *Tissue Eng* **11**:319-30.
171. **Liu, Y., R. J. MacDonald, and G. H. Swift.** 2001. DNA binding and transcriptional activation by a PDX1.PBX1b.MEIS2b trimer and cooperation with a pancreas-specific basic helix-loop-helix complex. *J Biol Chem* **276**:17985-93.
172. **Logsdon, C. D., J. Moessner, J. A. Williams, and I. D. Goldfine.** 1985. Glucocorticoids increase amylase mRNA levels, secretory organelles, and secretion in pancreatic acinar AR42J cells. *J Cell Biol* **100**:1200-8.
173. **Luo, X., D. M. Shin, X. Wang, S. F. Konieczny, and S. Muallem.** 2005. Aberrant localization of intracellular organelles, Ca<sup>2+</sup> signaling, and exocytosis in Mist1 null mice. *J Biol Chem* **280**:12668-75.
174. **Ma, Y., A. Ramezani, R. Lewis, R. G. Hawley, and J. A. Thomson.** 2003. High-level sustained transgene expression in human embryonic stem cells using lentiviral vectors. *Stem Cells* **21**:111-7.
175. **Maldonado, T. S., A. S. Kadison, C. A. Crisera, J. B. Grau, S. L. Alkasab, M. T. Longaker, and G. K. Gittes.** 2000. Ontogeny of activin B and follistatin in developing embryonic mouse pancreas: implications for lineage selection. *J Gastrointest Surg* **4**:269-75.
176. **Maltsev, V. A., J. Rohwedel, J. Hescheler, and A. M. Wobus.** 1993. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* **44**:41-50.
177. **Mangeot, P. E., D. Negre, B. Dubois, A. J. Winter, P. Leissner, M. Mehtali, D. Kaiserlian, F. L. Cosset, and J. L. Darlix.** 2000. Development of minimal lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for gene transfer into human dendritic cells. *J Virol* **74**:8307-15.
178. **Martin, G. R.** 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:7634-8.
179. **Martin, M., J. Gallego-Llamas, V. Ribes, M. Kedinger, K. Niederreither, P. Chambon, P. Dolle, and G. Gradwohl.** 2005. Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient Raldh2 mutant mice. *Dev Biol* **284**:399-411.

180. **Mashima, H., H. Ohnishi, K. Wakabayashi, T. Mine, J. Miyagawa, T. Hanafusa, M. Seno, H. Yamada, and I. Kojima.** 1996. Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *J Clin Invest* **97**:1647-54.
181. **Matsuda, T., T. Nakamura, K. Nakao, T. Arai, M. Katsuki, T. Heike, and T. Yokota.** 1999. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo J* **18**:4261-9.
182. **Matsuoka, T. A., I. Artner, E. Henderson, A. Means, M. Sander, and R. Stein.** 2004. The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:2930-3.
183. **Matsushita, K., Y. Okabayashi, M. Koide, H. Hasegawa, M. Otsuki, and M. Kasuga.** 1994. Potentiating effect of insulin on exocrine secretory function in isolated rat pancreatic acini. *Gastroenterology* **106**:200-6.
184. **McDonald, J. W., X. Z. Liu, Y. Qu, S. Liu, S. K. Mickey, D. Turetsky, D. I. Gottlieb, and D. W. Choi.** 1999. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* **5**:1410-2.
185. **Means, A. L., I. M. Meszoely, K. Suzuki, Y. Miyamoto, A. K. Rustgi, R. J. Coffey, Jr., C. V. Wright, D. A. Stoffers, and S. D. Leach.** 2005. Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates. *Development* **132**:3767-76.
186. **Mellitzer, G., S. Bonne, R. F. Luco, M. Van De Castele, N. Lenne-Samuel, P. Collombat, A. Mansouri, J. Lee, M. Lan, D. Pipeleers, F. C. Nielsen, J. Ferrer, G. Gradwohl, and H. Heimberg.** 2006. IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas. *Embo J* **25**:1344-52.
187. **Mfopou, J. K., E. Willems, L. Leyns, and L. Bouwens.** 2005. Expression of regulatory genes for pancreas development during murine embryonic stem cell differentiation. *Int J Dev Biol* **49**:915-22.
188. **Micallef, S. J., M. E. Janes, K. Knezevic, R. P. Davis, A. G. Elefanty, and E. G. Stanley.** 2005. Retinoic acid induces Pdx1-positive endoderm in differentiating mouse embryonic stem cells. *Diabetes* **54**:301-5.
189. **Miettinen, P. J., M. Huotari, T. Koivisto, J. Ustinov, J. Palgi, S. Rasilainen, E. Lehtonen, J. Keski-Oja, and T. Otonkoski.** 2000. Impaired migration and delayed differentiation of pancreatic islet cells in mice lacking EGF-receptors. *Development* **127**:2617-27.
190. **Miller, C. P., R. E. McGehee, Jr., and J. F. Habener.** 1994. IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *Embo J* **13**:1145-56.
191. **Miner, J. H., C. Li, and B. L. Patton.** 2004. Laminins alpha2 and alpha4 in pancreatic acinar basement membranes are required for basal receptor localization. *J Histochem Cytochem* **52**:153-6.

192. **Mintz, B., and K. Illmensee.** 1975. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**:3585-9.
193. **Miralles, F., T. Battelino, P. Czernichow, and R. Scharfmann.** 1998. TGF-beta plays a key role in morphogenesis of the pancreatic islets of Langerhans by controlling the activity of the matrix metalloproteinase MMP-2. *J Cell Biol* **143**:827-36.
194. **Miralles, F., P. Czernichow, and R. Scharfmann.** 1998. Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. *Development* **125**:1017-24.
195. **Miralles, F., P. Serup, F. Cluzaud, A. Vandewalle, P. Czernichow, and R. Scharfmann.** 1999. Characterization of beta cells developed in vitro from rat embryonic pancreatic epithelium. *Dev Dyn* **214**:116-26.
196. **Mitsui, K., Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda, and S. Yamanaka.** 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**:631-42.
197. **Miyazaki, S., E. Yamato, and J. Miyazaki.** 2004. Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes* **53**:1030-7.
198. **Moritoh, Y., E. Yamato, Y. Yasui, S. Miyazaki, and J. Miyazaki.** 2003. Analysis of insulin-producing cells during in vitro differentiation from feeder-free embryonic stem cells. *Diabetes* **52**:1163-8.
199. **Moriya, N., S. Komazaki, S. Takahashi, C. Yokota, and M. Asashima.** 2000. In vitro pancreas formation from *Xenopus* ectoderm treated with activin and retinoic acid. *Dev Growth Differ* **42**:593-602.
200. **Mummery, C., D. Ward-van Oostwaard, P. Doevendans, R. Spijker, S. van den Brink, R. Hassink, M. van der Heyden, T. Opthof, M. Pera, A. B. de la Riviere, R. Passier, and L. Tertoolen.** 2003. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* **107**:2733-40.
201. **Murtaugh, L. C., A. C. Law, Y. Dor, and D. A. Melton.** 2005. Beta-catenin is essential for pancreatic acinar but not islet development. *Development* **132**:4663-74.
202. **Murtaugh, L. C., B. Z. Stanger, K. M. Kwan, and D. A. Melton.** 2003. Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:14920-5.
203. **Mutoh, H., B. P. Fung, F. J. Naya, M. J. Tsai, J. Nishitani, and A. B. Leiter.** 1997. The basic helix-loop-helix transcription factor BETA2/NeuroD is expressed in mammalian enteroendocrine cells and activates secretin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:3560-4.

204. **Nakano, T., H. Kodama, and T. Honjo.** 1996. In vitro development of primitive and definitive erythrocytes from different precursors. *Science* **272**:722-4.
205. **Naya, F. J., H. P. Huang, Y. Qiu, H. Mutoh, F. J. DeMayo, A. B. Leiter, and M. J. Tsai.** 1997. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* **11**:2323-34.
206. **Negre, D., P. E. Mangeot, G. Duisit, S. Blanchard, P. O. Vidalain, P. Leissner, A. J. Winter, C. Roubourdin-Combe, M. Mehtali, P. Moullier, J. L. Darlix, and F. L. Cosset.** 2000. Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells. *Gene Ther* **7**:1613-23.
207. **Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastassiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Scholer, and A. Smith.** 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**:379-91.
208. **Nikolova, G., N. Jabs, I. Konstantinova, A. Domogatskaya, K. Tryggvason, L. Sorokin, R. Fassler, G. Gu, H. P. Gerber, N. Ferrara, D. A. Melton, and E. Lammert.** 2006. The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and Beta cell proliferation. *Dev Cell* **10**:397-405.
209. **Nishikawa, S. I., S. Nishikawa, M. Hirashima, N. Matsuyoshi, and H. Kodama.** 1998. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* **125**:1747-57.
210. **Niwa, H., T. Burdon, I. Chambers, and A. Smith.** 1998. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* **12**:2048-60.
211. **Norgaard, G. A., J. N. Jensen, and J. Jensen.** 2003. FGF10 signaling maintains the pancreatic progenitor cell state revealing a novel role of Notch in organ development. *Dev Biol* **264**:323-38.
212. **O'Carroll, D., S. Erhardt, M. Pagani, S. C. Barton, M. A. Surani, and T. Jenuwein.** 2001. The polycomb-group gene Ezh2 is required for early mouse development. *Mol Cell Biol* **21**:4330-6.
213. **Offield, M. F., T. L. Jetton, P. A. Labosky, M. Ray, R. W. Stein, M. A. Magnuson, B. L. Hogan, and C. V. Wright.** 1996. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* **122**:983-95.
214. **Ogata, T., K. Y. Park, M. Seno, and I. Kojima.** 2004. Reversal of streptozotocin-induced hyperglycemia by transplantation of pseudoislets consisting of beta cells derived from ductal cells. *Endocr J* **51**:381-6.

215. **Ohlsson, H., K. Karlsson, and T. Edlund.** 1993. IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *Embo J* **12**:4251-9.
216. **Ohnishi, H., S. A. Ernst, N. Wys, M. McNiven, and J. A. Williams.** 1996. Rab3D localizes to zymogen granules in rat pancreatic acini and other exocrine glands. *Am J Physiol* **271**:G531-8.
217. **Ohnishi, H., T. Mine, H. Shibata, N. Ueda, T. Tsuchida, and T. Fujita.** 1999. Involvement of Rab4 in regulated exocytosis of rat pancreatic acini. *Gastroenterology* **116**:943-52.
218. **Ohnishi, H., N. Ohgushi, S. Tanaka, H. Mogami, R. Nobusawa, H. Mashima, M. Furukawa, T. Mine, O. Shimada, H. Ishikawa, and et al.** 1995. Conversion of amylase-secreting rat pancreatic AR42J cells to neuronlike cells by activin A. *J Clin Invest* **95**:2304-14.
219. **Ohnishi, H., L. C. Samuelson, D. I. Yule, S. A. Ernst, and J. A. Williams.** 1997. Overexpression of Rab3D enhances regulated amylase secretion from pancreatic acini of transgenic mice. *J Clin Invest* **100**:3044-52.
220. **Ohuchi, H., Y. Hori, M. Yamasaki, H. Harada, K. Sekine, S. Kato, and N. Itoh.** 2000. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem Biophys Res Commun* **277**:643-9.
221. **Okabe, S., K. Forsberg-Nilsson, A. C. Spiro, M. Segal, and R. D. McKay.** 1996. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev* **59**:89-102.
222. **Olbrot, M., J. Rud, L. G. Moss, and A. Sharma.** 2002. Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:6737-42.
223. **Orlic, D., J. Kajstura, S. Chimenti, I. Jakoniuk, S. M. Anderson, B. Li, J. Pickel, R. McKay, B. Nadal-Ginard, D. M. Bodine, A. Leri, and P. Anversa.** 2001. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**:701-5.
224. **Otonkoski, T., G. M. Beattie, M. I. Mally, C. Ricordi, and A. Hayek.** 1993. Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells. *J Clin Invest* **92**:1459-66.
225. **Owyang C, W., JA.** 1999. *Gastroenterology*, 3.<sup>a</sup> ed. ed, New York.
226. **Pandol, S.** 1998. *Gastrointestinal and liver disease*, 6.<sup>a</sup> ed. ed, Filadelfia.
227. **Papadopoulou, S., and H. Edlund.** 2005. Attenuated Wnt signaling perturbs pancreatic growth but not pancreatic function. *Diabetes* **54**:2844-51.
228. **Peers, B., J. Leonard, S. Sharma, G. Teitelman, and M. R. Montminy.** 1994. Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1. *Mol Endocrinol* **8**:1798-806.

229. **Pfaff, S. L., M. Mendelsohn, C. L. Stewart, T. Edlund, and T. M. Jessell.** 1996. Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* **84**:309-20.
230. **Pfeifer, A., M. Ikawa, Y. Dayn, and I. M. Verma.** 2002. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:2140-5.
231. **Pin, C. L., J. M. Rukstalis, C. Johnson, and S. F. Konieczny.** 2001. The bHLH transcription factor *Mist1* is required to maintain exocrine pancreas cell organization and acinar cell identity. *J Cell Biol* **155**:519-30.
232. **Pradel, P., A. Estival, C. Seva, C. Wicker-Planquart, A. Puigserver, N. Vaysse, and F. Clemente.** 1993. Caerulein and gastrin(2-17 ds) regulate differently synthesis of secretory enzymes, mRNA levels and cell proliferation in pancreatic acinar cells (AR4-2J). *Biochem J* **290** ( Pt 1):219-24.
233. **Rajagopal, J., W. J. Anderson, S. Kume, O. I. Martinez, and D. A. Melton.** 2003. Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science* **299**:363.
234. **Rambhatla, L., C. P. Chiu, P. Kundu, Y. Peng, and M. K. Carpenter.** 2003. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant* **12**:1-11.
235. **Ramiya, V. K., M. Maraist, K. E. Arfors, D. A. Schatz, A. B. Peck, and J. G. Cornelius.** 2000. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* **6**:278-82.
236. **Reubinoff, B. E., P. Itsykson, T. Turetsky, M. F. Pera, E. Reinhartz, A. Itzik, and T. Ben-Hur.** 2001. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **19**:1134-40.
237. **Riedel, D., W. Antonin, R. Fernandez-Chacon, G. Alvarez de Toledo, T. Jo, M. Geppert, J. A. Valentijn, K. Valentijn, J. D. Jamieson, T. C. Sudhof, and R. Jahn.** 2002. Rab3D is not required for exocrine exocytosis but for maintenance of normally sized secretory granules. *Mol Cell Biol* **22**:6487-97.
238. **Risau, W., H. Sariola, H. G. Zerwes, J. Sasse, P. Ekblom, R. Kemler, and T. Doetschman.** 1988. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* **102**:471-8.
239. **Rodolose, A., E. Chalaux, T. Adell, H. Hagege, A. Skoudy, and F. X. Real.** 2004. PTF1alpha/p48 transcription factor couples proliferation and differentiation in the exocrine pancreas [corrected]. *Gastroenterology* **127**:937-49.
240. **Rooman, I., and L. Bouwens.** 2004. Combined gastrin and epidermal growth factor treatment induces islet regeneration and restores normoglycaemia in C57Bl6/J mice treated with alloxan. *Diabetologia* **47**:259-65.

241. **Rooman, I., Y. Heremans, H. Heimberg, and L. Bouwens.** 2000. Modulation of rat pancreatic acinoductal transdifferentiation and expression of PDX-1 in vitro. *Diabetologia* **43**:907-14.
242. **Rosewicz, S., G. Ahnert-Hilger, H. Haller, E. O. Riecken, and B. Wiedenmann.** 1994. Rat pancreatic AR42J cells. Amphicrine cells as an in vitro model to study peptide hormone receptor regulation. *Ann N Y Acad Sci* **733**:407-15.
243. **Rosewicz, S., E. O. Riecken, and B. Wiedenmann.** 1992. The amphicrine pancreatic cell line AR42J: a model system for combined studies on exocrine and endocrine secretion. *Clin Investig* **70**:205-9.
244. **Rosewicz, S., D. Vogt, N. Harth, C. Grund, W. W. Franke, S. Ruppert, E. Schweitzer, E. O. Riecken, and B. Wiedenmann.** 1992. An amphicrine pancreatic cell line: AR42J cells combine exocrine and neuroendocrine properties. *Eur J Cell Biol* **59**:80-91.
245. **Rossi, J. M., N. R. Dunn, B. L. Hogan, and K. S. Zaret.** 2001. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* **15**:1998-2009.
246. **Rouiller, D. G., V. Cirulli, and P. A. Halban.** 1991. Uvomorulin mediates calcium-dependent aggregation of islet cells, whereas calcium-independent cell adhesion molecules distinguish between islet cell types. *Dev Biol* **148**:233-42.
247. **Rukstalis, J. M., A. Kowalik, L. Zhu, D. Lidington, C. L. Pin, and S. F. Konieczny.** 2003. Exocrine specific expression of Connexin32 is dependent on the basic helix-loop-helix transcription factor Mist1. *J Cell Sci* **116**:3315-25.
248. **Rutter, W. J., R. L. Pictet, J. D. Harding, J. M. Chirgwin, R. J. MacDonald, and A. E. Przybyla.** 1978. An analysis of pancreatic development: role of mesenchymal factor and other extracellular factors. *Symp Soc Dev Biol*:205-27.
249. **Sander, M., A. Neubuser, J. Kalamaras, H. C. Ee, G. R. Martin, and M. S. German.** 1997. Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev* **11**:1662-73.
250. **Sander, M., L. Sussel, J. Connors, D. Scheel, J. Kalamaras, F. Dela Cruz, V. Schwitzgebel, A. Hayes-Jordan, and M. German.** 2000. Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development* **127**:5533-40.
251. **Sato, N., L. Meijer, L. Skaltsounis, P. Greengard, and A. H. Brivanlou.** 2004. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* **10**:55-63.
252. **Seaberg, R. M., S. R. Smukler, T. J. Kieffer, G. Enikolopov, Z. Asghar, M. B. Wheeler, G. Korbitt, and D. van der Kooy.** 2004. Clonal identification of

- multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol* **22**:1115-24.
253. **Segev, H., B. Fishman, A. Ziskind, M. Shulman, and J. Itskovitz-Eldor.** 2004. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells* **22**:265-74.
254. **Sellick, G. S., K. T. Barker, I. Stolte-Dijkstra, C. Fleischmann, R. J. Coleman, C. Garrett, A. L. Gloyn, E. L. Edghill, A. T. Hattersley, P. K. Wellauer, G. Goodwin, and R. S. Houlston.** 2004. Mutations in PTF1A cause pancreatic and cerebellar agenesis. *Nat Genet* **36**:1301-5.
255. **Serup, P., J. Jensen, F. G. Andersen, M. C. Jorgensen, N. Blume, J. J. Holst, and O. D. Madsen.** 1996. Induction of insulin and islet amyloid polypeptide production in pancreatic islet glucagonoma cells by insulin promoter factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:9015-20.
256. **Shen, C. N., M. E. Horb, J. M. Slack, and D. Tosh.** 2003. Transdifferentiation of pancreas to liver. *Mech Dev* **120**:107-16.
257. **Shi, C. M., and T. M. Cheng.** 2004. Differentiation of dermis-derived multipotent cells into insulin-producing pancreatic cells in vitro. *World J Gastroenterol* **10**:2550-2.
258. **Shi, Y., L. Hou, F. Tang, W. Jiang, P. Wang, M. Ding, and H. Deng.** 2005. Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid. *Stem Cells* **23**:656-62.
259. **Shiraki, N., C. J. Lai, Y. Hishikari, and S. Kume.** 2005. TGF-beta signaling potentiates differentiation of embryonic stem cells to Pdx-1 expressing endodermal cells. *Genes Cells* **10**:503-16.
260. **Shiroy, A., M. Yoshikawa, H. Yokota, H. Fukui, S. Ishizaka, K. Tatsumi, and Y. Takahashi.** 2002. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone. *Stem Cells* **20**:284-92.
261. **Skoudy, A., M. Rovira, P. Savatier, F. Martin, T. Leon-Quinto, B. Soria, and F. X. Real.** 2004. Transforming growth factor (TGF)beta, fibroblast growth factor (FGF) and retinoid signalling pathways promote pancreatic exocrine gene expression in mouse embryonic stem cells. *Biochem J* **379**:749-56.
262. **Soria, B., E. Roche, G. Berna, T. Leon-Quinto, J. A. Reig, and F. Martin.** 2000. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* **49**:157-62.
263. **Sosa-Pineda, B., K. Chowdhury, M. Torres, G. Oliver, and P. Gruss.** 1997. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* **386**:399-402.

264. **Sphyris, N., C. D. Logsdon, and D. J. Harrison.** 2005. Improved retention of zymogen granules in cultured murine pancreatic acinar cells and induction of acinar-ductal transdifferentiation in vitro. *Pancreas* **30**:148-57.
265. **St-Onge, L., B. Sosa-Pineda, K. Chowdhury, A. Mansouri, and P. Gruss.** 1997. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* **387**:406-9.
266. **Stafford, D., R. J. White, M. D. Kinkel, A. Linville, T. F. Schilling, and V. E. Prince.** 2006. Retinoids signal directly to zebrafish endoderm to specify insulin-expressing beta-cells. *Development* **133**:949-56.
267. **Stoffers DA, T. M., Habener JF, .** 1997. Homeodomain protein IDX-1: a master regulator of pancreas development and insulin gene expression. *Trends Endocrinol Metab* **8**:145–151.
268. **Strubing, C., G. Ahnert-Hilger, J. Shan, B. Wiedenmann, J. Hescheler, and A. M. Wobus.** 1995. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech Dev* **53**:275-87.
269. **Sussel, L., J. Kalamaras, D. J. Hartigan-O'Connor, J. J. Meneses, R. A. Pedersen, J. L. Rubenstein, and M. S. German.** 1998. Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development* **125**:2213-21.
270. **Swift, G. H., Y. Liu, S. D. Rose, L. J. Bischof, S. Steelman, A. M. Buchberg, C. V. Wright, and R. J. MacDonald.** 1998. An endocrine-exocrine switch in the activity of the pancreatic homeodomain protein PDX1 through formation of a trimeric complex with PBX1b and MRG1 (MEIS2). *Mol Cell Biol* **18**:5109-20.
271. **Swift, G. H., S. D. Rose, and R. J. MacDonald.** 1994. An element of the elastase I enhancer is an overlapping bipartite binding site activated by a heteromeric factor. *J Biol Chem* **269**:12809-15.
272. **Szebenyi, G., and J. F. Fallon.** 1999. Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int Rev Cytol* **185**:45-106.
273. **Szutorisz, H., and N. Dillon.** 2005. The epigenetic basis for embryonic stem cell pluripotency. *Bioessays* **27**:1286-93.
274. **Tada, S., T. Era, C. Furusawa, H. Sakurai, S. Nishikawa, M. Kinoshita, K. Nakao, T. Chiba, and S. Nishikawa.** 2005. Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture. *Development* **132**:4363-74.
275. **Tang, F., K. Shang, X. Wang, and J. Gu.** 2002. Differentiation of embryonic stem cell to astrocytes visualized by green fluorescent protein. *Cell Mol Neurobiol* **22**:95-101.

276. **Terada, N., T. Hamazaki, M. Oka, M. Hoki, D. M. Mastalerz, Y. Nakano, E. M. Meyer, L. Morel, B. E. Petersen, and E. W. Scott.** 2002. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416**:542-5.
277. **Thompson, S., A. R. Clarke, A. M. Pow, M. L. Hooper, and D. W. Melton.** 1989. Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* **56**:313-21.
278. **Toyooka, Y., N. Tsunekawa, R. Akasu, and T. Noce.** 2003. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:11457-62.
279. **Tropepe, V., S. Hitoshi, C. Sirard, T. W. Mak, J. Rossant, and D. van der Kooy.** 2001. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron* **30**:65-78.
280. **Umezawa, K., A. Hiroki, M. Kawakami, H. Naka, I. Takei, T. Ogata, I. Kojima, T. Koyano, T. Kowithayakorn, H. S. Pang, and T. S. Kam.** 2003. Induction of insulin production in rat pancreatic acinar carcinoma cells by conophylline. *Biomed Pharmacother* **57**:341-50.
281. **Vaca, P., G. Berna, F. Martin, and B. Soria.** 2003. Nicotinamide induces both proliferation and differentiation of embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Transplant Proc* **35**:2021-3.
282. **Vaca, P., F. Martin, J. M. Vegara-Meseguer, J. M. Rovira, G. Berna, and B. Soria.** 2006. Induction of differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells by fetal soluble factors. *Stem Cells* **24**:258-65.
283. **van der Zee, E., I. Jansen, K. Hoeben, W. Beertsen, and V. Everts.** 1998. EGF and IL-1 alpha modulate the release of collagenase, gelatinase and TIMP-1 as well as the release of calcium by rabbit calvarial bone explants. *J Periodontal Res* **33**:65-72.
284. **van Eyll, J. M., C. E. Pierreux, F. P. Lemaigre, and G. G. Rousseau.** 2004. Shh-dependent differentiation of intestinal tissue from embryonic pancreas by activin A. *J Cell Sci* **117**:2077-86.
285. **Virtanen, I., D. Gullberg, J. Rissanen, E. Kivilaakso, T. Kiviluoto, L. A. Laitinen, V. P. Lehto, and P. Ekblom.** 2000. Laminin alpha1-chain shows a restricted distribution in epithelial basement membranes of fetal and adult human tissues. *Exp Cell Res* **257**:298-309.
286. **Wagers, A. J., and I. L. Weissman.** 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell* **116**:639-48.
287. **Wagner, A. C., M. Z. Strowski, and J. A. Williams.** 1994. Identification of Rab 5 but not Rab 3A in rat pancreatic zymogen granule membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **200**:542-8.

288. **Wang, C. C., C. P. Ng, L. Lu, V. Atlashkin, W. Zhang, L. F. Seet, and W. Hong.** 2004. A role of VAMP8/endobrevin in regulated exocytosis of pancreatic acinar cells. *Dev Cell* **7**:359-71.
289. **Wasle, B., M. Turvey, O. Larina, P. Thorn, J. Skepper, A. J. Morton, and J. M. Edwardson.** 2005. Syncollin is required for efficient zymogen granule exocytosis. *Biochem J* **385**:721-7.
290. **Wichterle, H., I. Lieberam, J. A. Porter, and T. M. Jessell.** 2002. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* **110**:385-97.
291. **Wiles, M. V., and G. Keller.** 1991. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* **111**:259-67.
292. **Wilson, J.** 1991. In the Principles of Internal Medicine., Twelve edition ed, vol. Section 1. McGraw-Hill.
293. **Williams, J. A.** 2001. Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystokinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells. *Annu Rev Physiol* **63**:77-97.
294. **Williams, R. L., D. J. Hilton, S. Pease, T. A. Willson, C. L. Stewart, D. P. Gearing, E. F. Wagner, D. Metcalf, N. A. Nicola, and N. M. Gough.** 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**:684-7.
295. **Witt, H., W. Luck, H. C. Hennies, M. Classen, A. Kage, U. Lass, O. Landt, and M. Becker.** 2000. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* **25**:213-6.
296. **Wobus, A. M., G. Wallukat, and J. Hescheler.** 1991. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca<sup>2+</sup> channel blockers. *Differentiation* **48**:173-82.
297. **Xu, C., S. Police, N. Rao, and M. K. Carpenter.** 2002. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* **91**:501-8.
298. **Xu, X., B. Kahan, A. Forgianni, P. Jing, L. Jacobson, V. Browning, N. Treff, and J. Odorico.** 2006. Endoderm and pancreatic islet lineage differentiation from human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* **8**:96-107.
299. **Yamada, S., H. Kojima, M. Fujimiya, T. Nakamura, A. Kashiwagi, and R. Kikkawa.** 2001. Differentiation of immature enterocytes into enteroendocrine cells by Pdx1 overexpression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**:G229-36.
300. **Yamashita, J., H. Itoh, M. Hirashima, M. Ogawa, S. Nishikawa, T. Yurugi, M. Naito, K. Nakao, and S. Nishikawa.** 2000. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* **408**:92-6.

- 
301. **Ye, F., B. Duvillie, and R. Scharfmann.** 2005. Fibroblast growth factors 7 and 10 are expressed in the human embryonic pancreatic mesenchyme and promote the proliferation of embryonic pancreatic epithelial cells. *Diabetologia* **48**:277-81.
  302. **Ying, Q. L., J. Nichols, I. Chambers, and A. Smith.** 2003. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**:281-92.
  303. **Yoshitomi, H., and K. S. Zaret.** 2004. Endothelial cell interactions initiate dorsal pancreas development by selectively inducing the transcription factor Ptf1a. *Development* **131**:807-17.
  304. **Yue, F., L. Cui, K. Johkura, N. Ogiwara, and K. Sasaki.** 2006. Glucagon-like peptide-1 differentiation of primate embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Tissue Eng* **12**:2105-16.
  305. **Zhang, S. C., M. Wernig, I. D. Duncan, O. Brustle, and J. A. Thomson.** 2001. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **19**:1129-33.
  306. **Zhu, L., T. Tran, J. M. Rukstalis, P. Sun, B. Damsz, and S. F. Konieczny.** 2004. Inhibition of Mist1 homodimer formation induces pancreatic acinar-to-ductal metaplasia. *Mol Cell Biol* **24**:2673-81.
  307. **Zulewski, H., E. J. Abraham, M. J. Gerlach, P. B. Daniel, W. Moritz, B. Muller, M. Vallejo, M. K. Thomas, and J. F. Habener.** 2001. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* **50**:521-33.

