



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica
Facultat de Medicina**

**CÈL·LULES ESTRELLADES PANCREÀTIQUES: IMPLICACIÓ
EN EL PROCÉS DE TRANSDIFERENCIACIÓ CEL·LULAR
ENDOCRINA I CARACTERITZACIÓ DEL SEU SECRETOMA**

Tesi Doctoral presentada per

Maria Lucas Gil

per optar al títol de

Doctora en Biologia per la Universitat de Barcelona



Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Ramon Gomis i de la Dra. Eugènia Mato en el Laboratori de Diabetis i Obesitat de l'IDIBAPS

Dr. Ramon Gomis de Barbarà

Dra. Eugènia Mato Matute

Maria Lucas Gil

Programa de Doctorat "Biologia i Patologia Cel·lulars" del Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona
Bienni 2002-2004

Barcelona, Desembre 2007

Al meu pare, que li hagués
agradat ser-hi
A la meva mare i al Toti
Al Vila

AGRAÏMENTS

Ara que tanco aquesta etapa pre-doctoral m'agradaria agrair sincerament l'ajuda de totes aquelles persones que han fet possible la realització d'aquesta tesi. Si em descuido a algú, li dono les gràcies per endavant.

En primer lloc voldria agrair al Dr Gomis haver-me donat l'oportunitat de formar part del seu grup de recerca i haver-me animat a fer la tesi, tot i haver entrat al seu laboratori com a suport tècnic de la Fundació Sardà Farriol. En aquest sentit, també a la Dra Novials, que va ajudar-me a decidir pel camí de la recerca com a doctorand, i al Dr Conget, que va fer possible que la meua tesi tirés endavant. Finalment a la Dra Mato m'agradaria donar-li les gràcies per ser una font inesgotable d'idees en els moments més crítics del projecte, i per haver participat activament en la co-direcció d'aquesta tesi junt amb el Dr Gomis. A tots ells, moltes gràcies!

La gran quantitat d'hores que he passat en el laboratori de Diabetis i Obesitat de l'IDIBAPS han fet que certes persones es convertissin per mi com en una segona família, sobretot en els moments durs que he hagut de superar, però també en els bons. Quan dic la "família del laboratori" em refereixo, com no, a la Palau, el Jordi, la Marta A, i la Núria M. Havíem sigut com cinc mosqueters!! Suposo que tot el que hem viscut junts farà que ens seguim veient al llarg del temps, ja que les nostres tesis ens han donat anècdotes de sobres per les generacions posteriors....Des dels nostres primers anys de becaris, fins a la darrera aventura a Holanda per l'EASD!

Ja una mica més seniors, voldria fer un agraïment molt especial a la Sandra, la Marta J. i Sílvia C. Han sigut una mica les meves "mames" en el laboratori, m'han ensenyat moltes de les coses que havia d'aprendre de ciència, però també els hi volia agrair totes les coses que han fet per mi fora del lab. I quantes vegades els he hagut de sentir dir "pobre Vila....."?!?! Sandra, cuida molt la Maria petita i el Kike. Marta, sort en la teva etapa de mami. Casas, trobaré molt a faltar les nostres tardes de divendres de compres compulsives, i les confessions en els ferrocarrils.

A tots els post docs del laboratori que sempre han estat disposats a ajudar-me a resoldre dubtes i han seguit d'aprop tota l'evolució de la tesi; la Conxi, la Belén, la Perla, la Mamen i l'Albert. A la Sílvia B, per la paciència que ha tingut amb tots els meus dubtes de proteòmica, i per les tardes que vam passar a l'ordinador fins arribar a posar nom a tots els spots possibles del secretoma!! I molt especialment a la Rosa, la que sempre hi és, tant pels dubtes científics com per qualsevol altra cosa que puguis necessitar.

Voldria enviar molts ànims per acabar la tesi a la Laura i l'Ester, que ja els hi queda ben poc, i a la Míriam i la Gemma, que estan al principi.

A la Lúdia, l'Ainhoa, la Yaiza, i les noves incorporacions tècniques, perquè totes en algun moment m'heu ensenyat a millorar o escurçar algun protocol, per tots els gels d'agarosa compartits, els canvis de torn de la PCR i els buffers "comunitaris" de proteòmica.

Al tàndem del biobanc, per les jornades de compres femenines que ens queden pendents!!

I finalment als que ja han abandonat el lab per una o altra raó; el Nacho, la Sílvia Moreno, el Felip, la Melina, l'Aida, la Isabel Crespo, el Marc, la Imma i l'Helena. Tots ells han deixat el seu granet de sorra en aquesta tesi.

A les millors "secres", per haver-me facilitat sempre les gestions i els tràmits burocràtics de manera eficient; la Berta, l'Anna Bosch, i la Núria Morante.

Al meu Pare, per tot el que em va ensenyar, tot i que vam tenir poc temps; perquè estic molt orgullosa d'assemblar-me tant a ell, i perquè estic segura que des d'allà on estigui, encara pot cuidar-nos una miqueta....., sino, jo ho hagués arribat fins aquí!!

A la meua Mare, per tenir-ho tot sempre a punt (massa i tot), per negar-se a acceptar que ja som una mica grans i que hem de començar a volar sols (algun dia s'acabaran els tappers??), i per haver format una nova família amb l'Isidre i els "Gonzas". Després dels dies difícils que hem passat, sembla que ara en tornaran a venir de bons. Moltes gràcies a tots per l'esforç que hi estem posant.

Al Toti, àmpliament conegut com Maldy o Psy-Totix, per ser un model de germà poc convencional, i per ensenyar-me una manera de veure les coses gairebé sempre diferent a la meua.

Als meus tiets Josep M^a i Elvira, Ester i Albert, Ricard i Fina, i a l'àvia : perquè sabeu que les nostres circumstàncies familiars han fet que cadascun de vosaltres hagueu sigut un model de superació per mi davant el que ens ha tocat viure. En especial l'Ester, per la seves inescotables ganes de tirar sempre endavant; sort amb "El Far"! Un petonet pels petits de la família, Pol, el millor i únic fillol que tinc, l'Arnau, i el petit Bernat, que el nostre problemilla de cor fa que nosaltres siguem sempre una mica especials ;))

I finalment al Xuse i al Miquel, per haver crescut junts, gairebé més com a germans que com a cosins.

A tots els amics de Sabadell que han compartit amb mi moments de nervis i "desquiciament", com també de desconexió i relax en alguns dels espais coneguts com a Tripartit, Morrosko, o Teteria. Gràcies Ximpo, Massana, Segura, Angulo, Casa, Fri, i a les noves incorporacions com la Núria Riu. Al Camps i a l'Alexis, amb qui ja a la guarderia el Niu vam començar a fer els ciments de la nostra amistat, que espero que duri sempre. També molt especialment a la Bosky i l'Ame, que m'aguanten des dels 3 anys!! Qui ho havia de dir aquell 15 de setembre de 1982!! Bosky,gràcies per fer-me riure tant, i per escoltar-me sempre que ha fet falta. He acabat pensant que hauria de fer un "conjuro" per acabar la tesi.... A l'Ame voldria dir-li, fent servir unes paraules que li sonaran, "gràcies per ser sempre l'altre pes de la meua balança fins a portar-me a l'equilibri". Hem sigut un trio indestructible al llarg del temps! Aviam si ens fem aquell viatge que tenim pendent.....

A la Queralt, la meua inconformista preferida! Gràcies per les nostres converses metafísiques a Calella,i per estar sempre a punt per resoldre qualsevol emergència emocional.

El Rubi també té un espai molt especial en aquests agraïments; voldria donar-li les gràcies per la intensitat que han tingut tots els nostres cafès, tot i que breus, per poder veure'ns a través de tots els seus canvis de residència! Per molt lluny que te'n vagis, espero que sapiguem mantenir aquesta connexió invisible.

A les nenes de la UAB: la Maria T., l'Eva i la Cris. Tot i que hem seguit camins diferents, sempre trobem el moment de trobar-nos, recordar els anys de facultat i donar-nos ànims les unes a les altres per sobreviure en el difícil món del llicenciat en Biologia. També a la Paqui i Montse N., pels nostres dinars a la gespa de l'Autònoma i perquè els dies que vam compartir a Galícia aquest estiu pel casament de la Montse, em van servir per carregar piles per l'esprint final de la tesi.

També vinculats a la UAB però retrobats en llocs ben diversos, al Chema i a la Marta G. Al Chema, que és "la peste" i em va fer riure tant durant les meves pràctiques al Taulí, voldria demanar-li que segueixi sent sempre tan sincer amb mi, i que disfruti molt de ser el Dr Belloso després de tots els esforços que li ha costat....I a la Marta G., gràcies per seguir en contacte tot i el poc temps lliure que et deixa la feina; i aviam també si el 2008 també és l'any de la tesi!!

A la Maria Muñiz, que des d'aquella primera nit acabades d'aterrar a Nova York fins avui, hem sabut mantenir allò que ens va fer començar la nostra amistat. Gràcies per ser-hi sempre, en els bons i el mals moments, i per l'inoblidable concert del Bruce a 6^a fila!!

Del poblet de Sant Feliu del Racó m'enduc un especial record de tots els estius passats, i de la gent que hi he conegut; el Marc F., l' Edu "perru", el Manyo, i el Crespi. En especial, el Xavi F., per haver fet que la nostra història, amb tots els seus alts i baixos, hagi acabat amb una bona amistat que espero que mantinguem sempre. I també especialment al Joan V., per ensenyar-me a prendre'm les dificultats amb bon humor, i perquè la seva manera d'enfocar la vida des de la cadira de rodes fa que sempre el tingui present abans de deixar que m'afectin coses que segurament no són "tan" importants.

Finalment, un dels agraïments més grans d'aquesta tesi és pel Vila, aquell "rotllo d'estiu allargat".... A més del disseny de la portada, aquesta tesi també és una mica teva, per donar-me el suport i la confiança necessaris per arribar fins al final. Gràcies per fer fàcils les coses difícils, per haver creat un concepte de "parella" a la nostra mida, i per ensenyar-me que no es pot planificar sinó que cal viure el moment. Per haver sabut estar al meu costat en una de les etapes més difícils de la meua vida, i per ser com ets. Espero que siguis el company d'un llarg viatge!

<u>ÍNDEX</u>	xv-xviii
<u>ABREUJAMENTS</u>	ixx-xx
<u>I.- INTRODUCCIÓ</u>	1-42
1.- Cèl·lules troncal	3
2.- Conceptes de plasticitat, diferenciació i transdiferenciació cel·lular	6
3.- Nínxol cel·lular	7
4.- Marcadors cel·lulars	8
4.1.- Transportador de multidrogues (ABCG2)	9
4.2.- Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM)	11
4.3.- Nestina	13
4.4.- Thy 1.1	14
5.- Importància de les cèl·lules troncal en medicina regenerativa	15
5.1.- Regeneració pancreàtica: implicació en la diabetis	15
5.2.- Pàncreas	17
5.3.- Desenvolupament embrionari del pàncreas: generació dels diferents tipus cel·lulars	22
5.4.- Factors de transcripció implicats en la diferenciació endocrina	25
5.5.- Importància de les senyals extracel·lulars en el desenvolupament pancreàtic	28
5.6.- Cèl·lules progenitores en el pàncreas	31
5.7.- Processos de transdiferenciació de cèl·lules exocrines cap a cèl·lules productores d'insulina	33
6.- Cèl·lules estrellades pancreàtiques	34
6.1.- Origen embriològic	35
6.2.- Localització, activació i quiescència	35
6.3.- Implicació de les cèl·lules estrellades en diferents processos fisiopatològics	38
6.4.- Semblances i diferències amb les cèl·lules estrellades hepàtiques	41
6.5.- Cultius primaris descrits de cèl·lules estrellades pancreàtiques	42
<u>II.- HIPÒTESIS I OBJECTIUS</u>	43-46
<u>III.- MATERIAL I MÈTODES</u>	47-84
1.- Cultius cel·lulars	49
1.1.- Cultius primaris	49
Obtenció del cultiu primari ABGC2 (+)	49
Expansió i manteniment del cultiu	49
Obtenció del medi condicionat	50
Medis de diferenciació	50
Aïllament d'estructures	52
Recuperació d'estructures després del cultiu en Matrigel	52
Disgregació d'estructures	52
Citospin	53
1.2.- Línia cel·lular ARIP	53

2.- Assajos funcionals	53
2.1.- Extrusió del Mitoxantrone	53
Citometria de flux	53
Immunofluorescència	54
2.2.- Assajos de proliferació	54
Timidina tritiada	54
BrdU	56
2.3.- Assaig de viabilitat	57
MTT	57
2.4.- ELISAimmunoassaig de TGFβ1	57
2.5.- Extracció i quantificació de proteïna	58
2.6.- Secreció estàtica d'insulina	59
2.7.- Endocitosi de dextrà	59
3.- Estudis morfològics	60
3.1.- Microscopia electrònica	60
3.2.- Cariotip	61
Bandes G, contrastació DAPI	62
3.3.- Tinció amb ditizona	62
3.4.- Tinció amb Oil Red	62
3.5.- Autofluorescència de la vitamina A	63
4.- Immunofenotipatge	63
4.1.- Immunofluorescència directa i indirecta	63
4.2.- Contrastació nuclear amb Hoescht	64
4.3.- Citometria de flux	64
5.- Expressió gènica	65
5.1.- Extracció RNA total	65
Trizol	65
Columnes Qiagen	66
5.2.- RT-PCR	67
5.3.- Gels d'agarosa	69
5.4.- Gels d'acrilamida	69
5.5.- Densitometria amb <i>Quantity One</i>	70
5.6.- <i>Real Time</i> PCR	70
5.7.- Sobreinfecció amb adenovirus de Neurogenina 3	73
6.- Tècnica d' <i>immunopanning</i>	73
7.- Proteòmica	74
7.1.- Preparació de la mostra: <i>centricon</i> i <i>clean up</i>	74
7.2.- Quantificació de la mostra	75
7.3.- Gels 2 D	75
Hidratació dels gels IPG	75
Preparació de la mostra per la primera dimensió	76
Primera dimensió	76
Preparació de la mostra per la segona dimensió	77
Preparació de la segona dimensió (gel SDS-PAGE)	77
Segona dimensió	78
7.4.- Tinció de plata compatible amb MALDI-TOFF	78

7.5.- Identificació de <i>spots</i> diferencials	79
7.6.- Escisió dels <i>spots</i>	79
7.7.- Destinció de plata	80
7.8.- Digestió proteica	80
7.9.- Extracció de pèptids	81
7.10.- Purificació de pèptids amb Zip-Tip	81
7.11.- Plaqueig de mostres i anàlisi per MALDI-TOFF	82
7.12.- Identificació de les proteïnes per empremta peptídica	82
7.13.- Predicció de la secreció	83
7.14.- Predicció de les vies biològiques implicades	83
8.- Estadística	84
IV.- RESULTATS	85-144
<u>OBJECTIU I</u>	
A.- Obtenció i caracterització del cultiu primari ABCG2(+)	87
1.- Establiment del cultiu primari ABCG2 (+)	87
2.- Cariotip compatible amb una línia cel·lular establerta	87
3.- Demostració de la funcionalitat del transportador ABCG2	88
4.- Caracterització del cultiu primari ABCG2 (+)	90
4.1.- Canvis morfològics	90
4.2.- Disminució de la proliferació en els <i>clusters</i> cel·lulars	92
4.3.- Caracterització immunològica i gènica	92
4.3.1.- Marcadors de cèl·lules progenitores	92
4.3.2.- Altres marcadors cel·lulars	93
4.4.- Demostració de la capacitat d'endocitar dextrà	97
4.5.- Caracterització ultraestructural	98
B.- Demostració de la seva capacitat de transdiferenciació cap a un fenotip de cèl·lula productora d'insulina	104
5.- Expressió de marcadors endocrins	104
6.- Efectes del tractament del cultiu primari amb substàncies potenciadores de la diferenciació	104
7.- Expressió de receptors en el cultiu primari	105
8.- Efectes del tractament del cultiu primari amb <i>cocktail</i> de diferenciació	106
9.- Efectes de la sobreexpressió de Ngn3 en el cultiu primari en estadi 2	106
10.- Efectes del tractament del cultiu primari en estadi 2 amb Matrigel i exendin-4	107
10.1.- Canvis morfològics dels <i>clusters</i> en Matrigel	107
10.2.- Canvis d'expressió gènica i proteïca	108
10.3.- Colocalitzacions immunològiques de pèptid Cèl·lula	109
10.4.- Presència de grànuls de secreció	111
10.5.- Caracterització ultraestructural dels <i>clusters</i> diferenciats	111
10.6.- Secreció d'insulina al medi en resposta a glucosa	115

OBJECTIU II

A.- Estudi dels possibles efectes paracrins del medi de la població PaSC/ABCG2(+) aïllada sobre la població ductal pancreàtica	117
11.- Enriquiment del cultiu per la població que expressa PSA-NCAM mitjançant la tècnica d' <i>immunopanning</i>	117
12.- Caracterització de les fraccions després de l' <i>immunopanning</i>	118
13.- Efectes del medi condicionat de PaSC/ABCG2(+) sobre la línia cel·lular ductal ARIP	119
13.1.- Morfologia cel·lular	119
13.2.- Proliferació cel·lular	120
13.3.- Viabilitat cel·lular	120
13.4.- Comprovació de l'especificitat del medi	121
13.5.- Canvis en l'expressió de marcadors	122
13.5.1.- Marcadors propis	122
13.5.2.- Marcadors implicats en diferenciació endocrina	123
B.- Anàlisi del secretoma de la població PaSC/ABCG2(+) aïllada	126
14.- Caracterització del medi condicionat per gels 2D	126
15.- Anàlisi bioinformàtic dels resultats de proteòmica	134
15.1.- Detecció de TGFβ1 en el medi condicionat	139
16.- Efectes de TGFβ1 sobre la línia cel·lular ductal ARIP	139
16.1.- Expressió de receptors de TGFβ1	139
16.2.- Proliferació cel·lular	140
16.3.- Viabilitat cel·lular	141
16.4.- Expressió de PDX1	141
17.- Expressió de receptors de LIF i PEDF	143
V.- <u>DISCUSSIÓ</u>	145-170
VI.- <u>CONCLUSIONS</u>	171-174
VII.- <u>ANNEX</u>	175-186
VIII.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	187-212
IX.- <u>PUBLICACIONS ORIGINADES DURANT LA TESI</u>	213-215

ABREUJAMENTS

aa	Aminoàcid
ABCG2	<i>ATP Binding Cassette (ABC) subfamily G member 2</i>
APS	Persulfat d'amoni
ATP	Adenosina trifosfat
ASC	Cèl·lules troncs adults
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>
bHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i>
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
BSA	Albúmina bovina sèrica
cDNA	Àcid desoxiribonucleic de cadena simple
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonat
CK19	Citoqueratina 19
cm	Centímetre
cpm	Comptes per minut
CPP	Cultiu primari de pàncreas
Cy2	Cianina 2
Cy3	Cianina 3
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DM	<i>Diabetis mellitus</i>
DMEM	Medi Eagle Modificat de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfòxid
DTZ	Difeniltiocarbazona o ditizona
e	Dia embrionari
ECC	Cèl·lules troncs procedents de carcinoma
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGC	Cèl·lules troncs germinals
ELISA	<i>Enzyme - Linked Immunosorbent Assay</i>
ESC	Cèl·lules troncs embrionàries
FCS	<i>Foetal calf serum</i>
FGF	Factor de creixement fibroblàstic
FGFR	Receptor de factor de creixement fibroblàstic
g	Acceleració de la gravetat
GFAP	Proteïna àcida fibrilar glial
GLP1	<i>Glucagon-like polipeptide-1</i>
HBSS	<i>Hanks' balanced salts solution</i>
HGF	Factor de creixement de l'hepatòcit
HpSC	Cèl·lules hepàtiques estrellades
HSC	Cèl·lules troncs hematopoiètiques
IgG	Immunoglobulina G
IgM	Immunoglobulina M
IL	Interleucina
ITS	<i>Insulin Transferrin Selenium</i>
LIF	Factor inhibidor de leucèmia
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
ME	Matriu extracel·lular
mg	Mil·ligram
mL	Mil·lilitre
mm	Mil·límetre

mM	Mil·limolar
MMP	Metal·loproteïnasa de matriu
MRP	<i>Multidrug resistance protein</i>
MSC	Cèl·lules troncsals mesenquimals
MXR	<i>Mitoxantrone resistance</i>
NCAM	Molècula d'adhesió cel·lular neural
ng	nanogram
Ngn-3	Neurogenina-3
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
Nkx2.2	Factor de transcripció d'homeodomini Nkx2.2
Nkx6.1	Factor de transcripció d'homeodomini Nkx6.1
NSC	Cèl·lules mare neurals
O/N	Durant la nit
PaSC	Cèl·lules estrellades pancreàtiques
Pax-4	Factor de transcripció de motiu estructural paired-box 4
Pax-6	Factor de transcripció de motiu estructural paired-box 6
PBS	Tampó fosfat salí
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de creixement derivat de plaquetes
PDX1	Factor de transcripció homeobox pancreàtic duodenal-1
PEDF	<i>Pigment epithelium derived factor</i>
pg	Picogram
pI	Punt isoelèctric
PP	Polipèptid pancreàtic
PSA-NCAM	Àcid polisiàlic-Molècula d'adhesió cel·lular neural
PSC	Cèl·lules troncsals pancreàtiques
RNA _m	Àcid ribonucleic missatger
rpm	Revolucions per minut
RT-PCR	Transcripció reversa-Reacció en cadena de la polimerasa
SEM	Error estandard de la mitjana
SFM	<i>Serum free medium</i>
SSEA	<i>Stage-specific embryonic antigen</i>
SP	<i>Side Population</i>
SPARC	Proteïna àcida secretada rica en cisteïna
T/A	Temperatura ambient
TAE	Tris Acetat EDTA
TBE	Tris Borat EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine</i>
TFA	Àcid trifluoroacètic
TGFβ	Factor de creixement transformant β
TIMP	<i>Tissue inhibitor matrix metalloproteinase</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor Receptor</i>
Wnt	<i>Wingless type</i>
µg	Microgram
µM	Micromolar

I.- INTRODUCCIÓ

1.- CÈL·LULES TRONCALS

Es defineixen com a cèl·lules troncales, cèl·lules mare o *stem cells*, aquells tipus cel·lulars diferents de la resta de cèl·lules somàtiques de l'individu, que tenen l'habilitat **d'autoreplicar-se** i en determinades condicions, **diferenciar-se** per produir cèl·lules especialitzades que formaran els teixits i òrgans del cos.

L'autoreplicació permet que les cèl·lules troncales es divideixin per produir més cèl·lules troncales. Durant el desenvolupament primerenc, la divisió cel·lular és **simètrica** (cada cèl·lula que es divideix dona lloc a dues cèl·lules filles amb el mateix potencial); en canvi, a mesura que avança el desenvolupament la divisió cel·lular pot ser **assimètrica** (on una cèl·lula filla serà també troncal i l'altra serà més diferenciada).

Segons el seu potencial de diferenciació les cèl·lules troncales poden ser de diferents tipus (veure **figura 1**): les cèl·lules **totipotents** poden generar tots els tipus cel·lulars, incluint els teixits extraembrionaris. En mamífers, només els òvuls fecundats i els blastòmers primerencs són realment totipotents (Lovell-Badge, 2001). Les cèl·lules **pluripotents** serien les que cada una d'elles pot donar lloc a tots els tipus de cèl·lules que provenen de les tres capes germinals (mesoderm, endoderm i ectoderm), a partir de les quals es formen tots els tipus cel·lulars de l'embrió i l'adult, incluint la línia germinal (òvul i espermatozou). Les cèl·lules **multipotents** serien les que poden generar més d'un tipus cel·lular diferenciat d'un determinat llinatge (diferents tipus de cèl·lules que formen un teixit); i les cèl·lules **unipotents** són les que es diferencien només en un únic tipus cel·lular.

Segons el seu origen també hi ha diferents tipus de cèl·lules troncales:

Embriòniques:

- Pre-implantacionals (ESC): provenen d'un grup de cèl·lules anomenat "massa cel·lular interna", que forma part de l'embrió primerenc de 4-5 dies.
- Post-implantacionals (EGC): provenen de cèl·lules del primordi germinal dels embriions.
- Carcinoma embriònic (ECC): provenen de teratocarcinomes, és a dir tumors germinals, i es van aïllar per primera vegada en els teratocarcinomes testiculars humans (Donovan and Gearhart, 2001).

Adultes:

Les cèl·lules troncales adultes (ASC) han estat identificades fins al moment en diferents òrgans com el moll de l'os, la sang, la còrnia i la retina, el cervell, el múscul esquelètic, el fetge, la pell, el tub digestiu i el pàncreas. Normalment es consideren multipotents. Es creu que aquestes cèl·lules són les que generen els anomenats precursors o progenitors (Bunting and Hawley, 2003).

Les cèl·lules troncales adultes es poden agrupar segons l'origen de la capa germinal de la que provenen (veure **figura 2**):

- L'ectoderm donarà lloc a les cèl·lules troncales de l'epidermis i les cèl·lules troncales neurals (NSC).
- L'endoderm donarà lloc a les cèl·lules troncales pancreàtiques (PSC), hepàtiques (ovals), i de pulmó.
- Del mesoderm deriven dos tipus principals de cèl·lules troncales: les cèl·lules troncales mesenquimals (MSC), i les cèl·lules troncales hematopoietiques (HSC).

Introducció

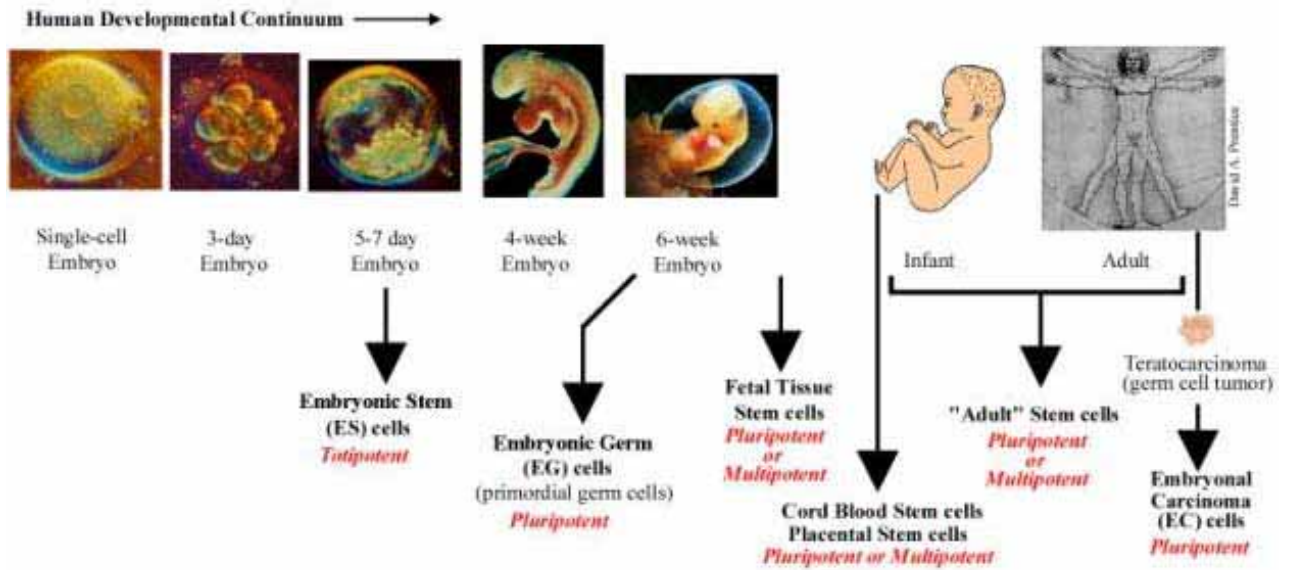


Figura 1.- Tipus de cèl·lules troncales segons el seu origen i el seu potencial de diferenciació. Extret de la pàgina web "robby.nstemp.com"

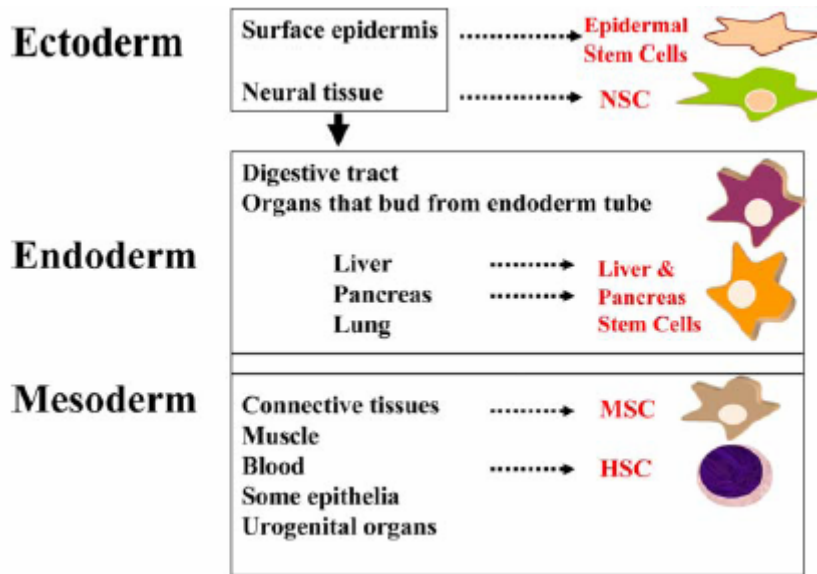


Figura 2.- Tipus de cèl·lules troncales adultes classificades segons la capa germinal de la qual provenen. HSC (cèl·lules troncales hematopoètiques), NSC (cèl·lules troncales neurals), MSC (cèl·lules troncales mesenquimals). Extret de (Bunting and Hawley, 2003).

Quan les cèl·lules troncales es divideixen donen lloc a cèl·lules **progenitores** o precursors: cèl·lules amb capacitat de diferenciar-se i convertir-se en tipus cel·lulars “madurs” amb formes característiques i funcions especialitzades. Les cèl·lules progenitores poden provenir de cèl·lules fetals o adults. Per diferenciar-les de les cèl·lules troncales ens fixarem en la següent característica: quan es divideix una cèl·lula troncal, almenys una de les dues noves cèl·lules té capacitat per autoreplicar-se i segueix essent una cèl·lula troncal; en canvi quan es divideix una cèl·lula progenitora obtenim més cèl·lules progenitores, o bé dues cèl·lules especialitzades sense capacitat d'autoreplicar-se (veure **figura 3A**). Una altra manera de diferenciar les cèl·lules progenitores de les troncales seria pel tipus de divisió cel·lular que poden tenir: les progenitores tenen divisions asimètriques mentre que les cèl·lules troncales poden tenir divisions simètriques i asimètriques (veure **figura 3B**).

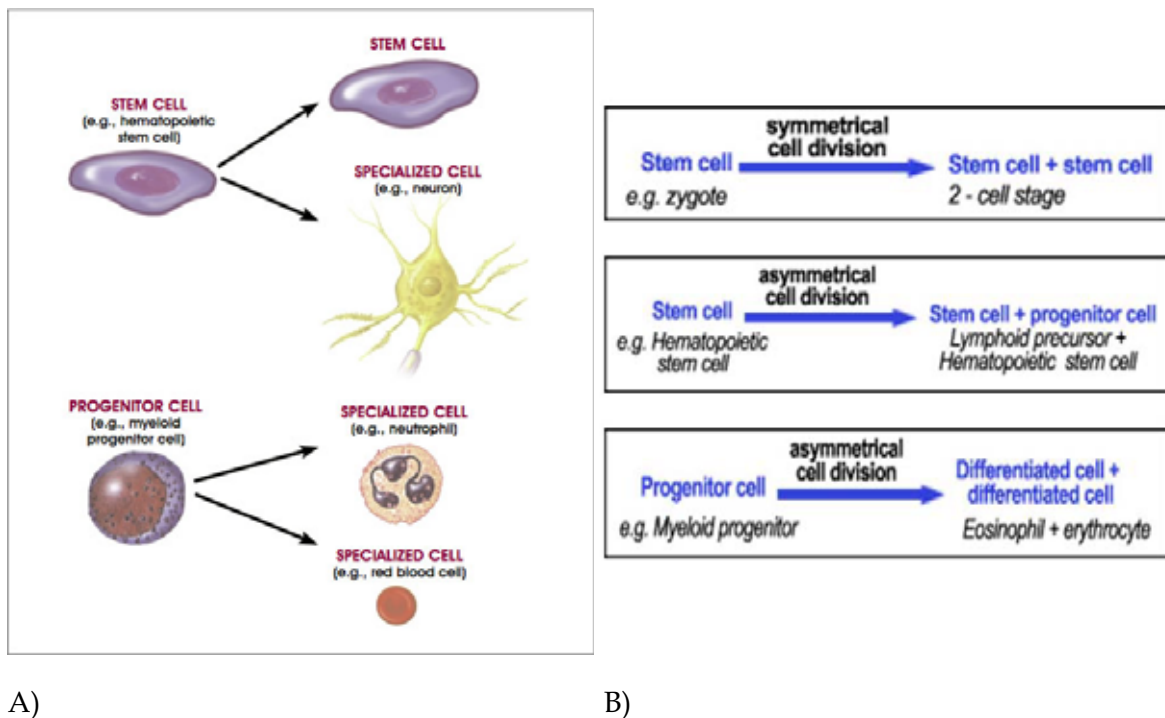


Figura 3.- A) Diferències en el tipus de descendència que caracteritzen les cèl·lules troncales i les cèl·lules progenitores. B) Tipus de divisions que diferencien les cèl·lules troncales de les progenitores. Extret de la pàgina web “The official **National Institute of Health** resource for stem cell research”.

2.- CONCEPTES DE PLASTICITAT, DIFERENCIACIÓ I TRANSDIFERENCIACIÓ

CEL·LULAR

Plasticitat: A nivell cel·lular, el terme plasticitat es refereix al canvi de fenotip d'una cèl·lula (Gasa, 2007). Si bé en un principi aquest terme s'utilitzava només en les cèl·lules neurals, en l'actualitat s'accepta que aplicat a les cèl·lules troncales adultes d'un determinat teixit, es refereix a la seva habilitat per generar tipus cel·lulars especialitzats d'un altre teixit. En aquest sentit, en teixits adults les cèl·lules troncales són un dels components essencials de l'homeostasi, ja que porten a terme processos de regeneració, de recanvi de cèl·lules senescentes o de restauració de la pèrdua de funcionalitat per malaltia o trauma.

Diferenciació: És el procés en que una cèl·lula no especialitzada es transforma en una de les cèl·lules especialitzades que formen el cos. Durant la diferenciació, certs gens s'activen i d'altres s'inactiven de manera finament regulada. Com a resultat obtenim una cèl·lula diferenciada capaç de formar estructures específiques i desenvolupar funcions determinades (Tosh and Slack, 2002).

Transdiferenciació: És el fenomen pel qual cèl·lules plenament diferenciades poden canviar el seu fenotip i es poden convertir d'un tipus cel·lular a un altre. Sovint s'utilitza com a sinònim de plasticitat quan es refereix a cèl·lules troncales adultes. Hi ha dos criteris a seguir per poder parlar de transdiferenciació: els dos estats diferenciats d'abans i després de la transdiferenciació han d'estar ben definits per una caracterització morfològica i molecular, i la relació de llinatge cel·lular entre els dos tipus cel·lulars ha d'estar ben establerta (Slack and Tosh, 2001). La transdiferenciació pot incloure els processos de desdiferenciació, proliferació i rediferenciació; o també pot ser directa, sense divisió cel·lular (Eguchi and Kodama, 1993). En el cas de la transdiferenciació directa, s'han descrit fenotips intermitjos entre els tipus cel·lulars que participen en el procés (Schmid and Alder, 1984), (Beresford, 1990), (Patapoutian et al., 1995).

3.- NÍNIXOL CEL·LULAR

Les cèl·lules troncales necessiten una regulació molt fina del seu potencial de proliferació i diferenciació. Es podria pensar que les cèl·lules troncales tenen un mecanisme intern per controlar el seu patró de divisions que genera cèl·lules filles diferenciades, però cada vegada sembla més clar que les senyals que regulen la correcta divisió de les cèl·lules troncales també provenen de les cèl·lules veïnes diferenciades. El microambient en el qual es troben les cèl·lules troncales que influencia les seves divisions i posterior diferenciació s'anomena **nínxol** (Lemischka and Moore, 2003).

Hi ha bàsicament dos mecanismes d'acció en els nínxols (veure **figura 4**):

- Mecanisme de **població**, on les dues cèl·lules filles continuen essent cèl·lules troncales, o bé les dues es diferencien.

- Mecanisme de **llinatge**, on només una cèl·lula filla queda adherida a la membrana basal mentre que l'altra pot alliberar-se i allunyar-se de l'estroma per diferenciar-se.

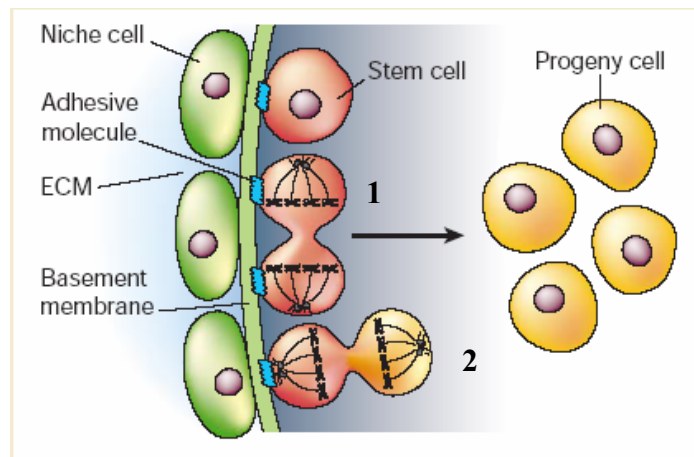


Figura 4.- Mecanismes d'acció en els nínxols: **(1) població** (en aquesta il·lustració les dues cèl·lules filles queden adherides al nínxol com a cèl·lules troncales), o bé **(2) llinatge** (només una cèl·lula filla queda adherida al nínxol, l'altra es desenganxa i es diferencia). Extret de (Spradling et al., 2001).

La comunicació entre el nínxol i les cèl·lules troncales no és només en una sola direcció. L'anàlisi transcripcional de les cèl·lules troncales revela que aquestes produeixen factors de creixement que influeixen les cèl·lules que formen el nínxol (Whetton and Graham, 1999). Durant el desenvolupament d'un organisme, les cèl·lules troncales participen junt amb les cèl·lules del nínxol per organitzar i crear el microambient necessari amb una certa especificitat segons el teixit, que es podrà mantenir en l'adult gràcies a aquesta comunicació simbiòtica. Això explica que els components del nínxol siguin diferents segons el teixit (Scheres, 2007), (Tsai et al., 2002). Així, els principals gens implicats en la creació de cada microambient seran diferents segons els tipus de cèl·lules troncales, però els mecanismes i principis bàsics de funcionament són els mateixos (Fuchs et al., 2004).

4.- MARCADORS CEL·LULARS

Embriòniques:

Malgrat hi ha algunes diferències a nivell d'espècie, la majoria de cèl·lules troncales embriòniques tenen marcadors comuns. Aquests marcadors cel·lulars no són exclusivament específics de cèl·lules troncales, però tenen una expressió molt restringida en altres tipus cel·lulars diferenciats (**veure taula 1**). Els marcadors de superfície propis de ESC indiferenciades serien SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4 (*Stage-specific embryonic antigens*); els factors de transcripció característics Sox2, Oct 4, genesis, i nanog; factors de creixement com GDF-3 (*growth differentiation factor-3*), o bé TDGF-1 (*teratocarcinoma derived growth factor-1*) (Rathjen and Rathjen, 2001); i la família de proteïnes de queratan sulfat TRA-1-60, TRA-1-81, i GCTM2 (Gokhale and Andrews, 2006). També presenten activitats elevades de fosfatasa alcalina i telomerasa (Pera et al., 2000).

Human	Mouse
SSEA1 ⁻	SSEA1 ⁺
SSEA4 ⁺	SSEA4 ⁻
SSEA3 ⁺	SSEA3 ⁻
TRA-1-60 ⁺	TRA-1-60 ⁻
GCTM2 ⁺	GCTM2 ⁻
MHC ⁺	MHC ⁻
Thy1 ⁺	Thy1 ⁻

Taula 1.- Comparació dels diferents marcadors de superfície entre cèl·lules mare embriòniques humanes i murines. Extret de (Gokhale and Andrews, 2006).

Adultes:

En el cas de les cèl·lules troncales adultes no existeixen marcadors cel·lulars específics per caracteritzar-les. Alguns dels marcadors proposats podrien ser compartits per diferents cèl·lules troncales adultes i d'altres ser més específics del teixit on estiguin localitzades.

Alguns exemples de marcadors de cèl·lules troncales adultes serien Thy 1.1, Sca-1 (*stem cell antigen-1*) i c-kit (receptor per *stem cell factor*) per les **HSC** (Weissman et al., 2001); nestina, NCAM i PGP 9.5 (*protein gene product 9.5*) en **NSC** (Bazan et al., 2004) i FGFR1 IIIb per les **PSC** (Cras-Meneur and Scharfmann, 2002). Alguns dels marcadors proposats per NSC serien també compartits amb les PSC (Zhang and Sarvetnick, 2003); així com també les NSC comparteixen marcadors amb les HSC (Ivanova et al., 2002) (veure **figura 5**). Altres possibles marcadors serien la tirosina hidroxilasa, l'adrenomodulina (Bonner-Weir and Sharma, 2002), i el transportador de multidrogues ABCG2 (Bunting, 2002). En el cas del pàncreas, no existeixen marcadors de cèl·lules troncales específics que permetin aïllar aquest tipus cel·lular en l'adult.



Figura 5.- Expressió de gens comuns entre diferents tipus de cèl·lules troncales adultes. HSC (cèl·lules troncales hematopoiètiques), NSC (cèl·lules troncales neurals). Modificació de l'esquema extret de (Bunting and Hawley, 2003).

Descripció detallada d'alguns dels marcadors proposats de cèl·lules troncales adultes:

4.1.- TRANSPORTADOR DE MULTIDROGUES (ABCG2)

Identificació :

Els transportadors *ATP-Binding Cassette* formen part d'una gran superfamília de gens, que donen com a producte unes proteïnes que transporten activament contra concentració de gradient gran varietat de compostos com sucres, aminoàcids, pèptids, sals, i xenobiòtics (Bates et al., 2001). L'expressió d'alguns d'aquests gens s'han relacionat amb la capacitat de resistència a multidrogues, per exemple ABCB1, ABCC1, ABCC2 i ABCG2 (Miyake et al., 1999). Concretament l'ABCG2 va ser aïllat a partir de línies cel·lulars tumorals de càncer de mama ja que aquests transportadors estaven relacionats amb la resistència al tractament antitumoral (Doyle et al., 1998). A més, també s'ha descrit que ABCG2 podria ser també utilitzat com a determinant molecular dels progenitors de diferents teixits (Bunting, 2002).

La nomenclatura de tots els gens que codifiquen per transportadors ABC es pot trobar a la **taula 2**, amb els noms amb que es coneixien aquests transportadors abans de la nomenclatura sistemàtica i els substrats que poden transportar.

Gene	Other names	Substrates
ABCB1	MDR1	Colchicine, doxorubicin, VP16, ^a Adriamycin, vinblastine, digoxin, saquinivir, paclitaxel
ABCC1	MRP1	Doxorubicin, daunorubicin, vincristine, VP16, colchicines, VP16, rhodamine
ABCC2	MRP2	Vinblastine, sulfinpyrazone
ABCC3		Methotrexate, VP16
ABCC4		Nucleoside monophosphates
ABCC5		Nucleoside monophosphates
ABCG2	MXR ABCG2	Mitoxantrone, topotecan, doxorubicin, daunorubicin, CPT-11, rhodamine

Taula 2.- Taula dels gens que codifiquen per transportadors ABC implicats en resistència a multidrogues i la relació amb els seus substrats. (MDR=*Multidrug resistance*, MRP=*Multidrug resistance protein*, MXR= *Mitoxantrone resistance*, BCRP =*Breast cancer resistance protein*) Modificació de la taula extreta de la pàgina web "Michael Dean NCBI Books".

Estructura i funcions:

La família de transportadors ABC pot tenir transportadors complets o mitjos transportadors. En el cas dels transportadors complets, la seva estructura es caracteritza per tenir dues meitats idèntiques separades per una regió flexible. Cada meitat de la molècula conté un domini intern d'unió a nucleòtids, requerit per la hidròlisi de l'ATP que portarà a la generació d'energia necessària per l'extrusió de substrats del citoplasma a l'espai extracel·lular. Aquesta regió s'anomena "ATP-binding cassette".

L'estructura de cada meitat consta de 6 dominis hidrofòbics integrals de membrana, que uneixen el transportador a la membrana plasmàtica. Cada meitat de la molècula necessita la seva complementària per formar el lloc d'unió a substància que permetrà l'activitat d'extrusió (Bunting, 2002).

L'ABCG2 seria un exemple de mig-transportador. En aquest cas no hi ha regió flexible d'unió, però la molècula necessita homodimeritzar a la membrana per poder exercir la seva funció de transportador (Krishnamurthy and Schuetz, 2006) (veure figura 6).

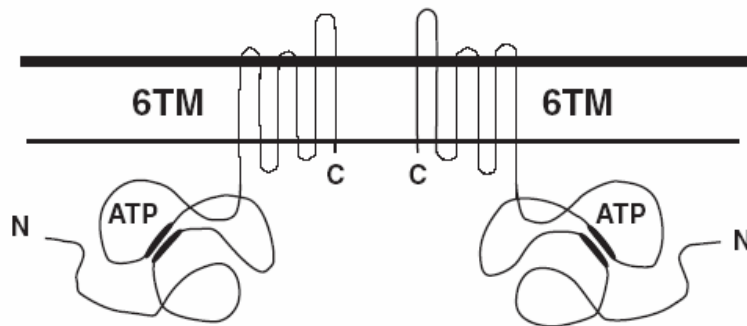


Figura 6.- Estructura del transportador ABCG2, amb els 6 dominis transmembrana (6TM) i la regió hidrolitzadora de l'ATP. Extret de (Bunting, 2002).

La capacitat d'extrusió de substàncies xenobiòtiques fluorescents com el mitoxantrone i l'existència d'inhibidors específics d'aquests transportadors, com Fumitremorgin C o verapamil (Ozvegy-Laczka et al., 2004) fa que s'hagin pogut desenvolupar assajos funcionals per citometria de flux per mesurar el nivell i la funcionalitat del transportador present (Robey et al., 2001), (Garcia-Escarp et al., 2004) (veure figura 7).

La funció fisiològica precisa d'aquests transportadors en cèl·lules troncales encara no s'ha descrit, però es creu que proporcionen protecció contra xenobiòtics, assegurant la supervivència de les cèl·lules troncales per mantenir la capacitat regenerativa del teixit (Leslie et al., 2005). A més, en cèl·lules troncales neurals també s'ha proposat la implicació d'ABCG2 en mantenir l'estat indiferenciat de les cèl·lules troncales (Islam et al., 2005).

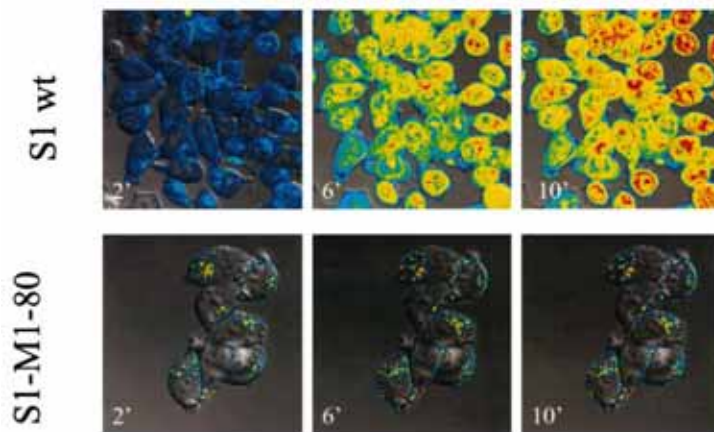


Figura 7.- Acumulació de mitoxantrone en dues línies cel·lulars, una parental (S1 wt) i una altra resistent gràcies a l'expressió del transportador ABCG2 (S1-M1-80). Podem observar que l'acumulació de mitoxantrone és gairebé inexistent en la línia que expressa el transportador. Extret de (Miyake et al., 1999).

Localització:

Els transportadors de membrana ABCG2 es localitzen principalment en teixits importants per l'absorció (placenta, intestí), metabolisme i eliminació de residus (fetge i ronyó); i també es troben a la barrera hemato-encefàlica (Leslie et al., 2005). S'han descrit variacions entre espècies, i tenen especificitat per diferents substrats.

Un estudi recent en humans ha localitzat aquest transportador en illots i en cèl·lules acinars del pàncreas per tinció immunohistoquímica (Fetsch et al., 2006). En rata es desconeix la seva localització subcel·lular en el pàncreas ja que no es disposa d'un anticòs específic. Tot i que un treball descriu la seva distribució a nivell de mRNA en diferents teixits, no inclou el pàncreas en el seu estudi (Tanaka et al., 2005).

També s'ha identificat el transportador ABCG2 en cèl·lules troncales hematopoietiques, concretament en la població SP (Side Population) (Zhou et al., 2001). Aquesta població va ser identificada i caracteritzada en el moll de l'òs de ratolí per la seva capacitat d'extruir el colorant vital Hoescht 33342, capacitat que quedava inhibida amb el tractament amb verapamil (Goodell et al., 1996). Finalment es va demostrar que el transportador ABCG2 era el responsable de l'extrusió de Hoescht 33342 en la població SP (Kim et al., 2002). En pàncreas humans s'ha identificat la població SP gràcies a la presència del transportador ABCG2 (Lechner et al., 2002); i també les cèl·lules hepàtiques ovals, definides com la població progenitora del fetge, presenten l'expressió del transportador ABCG2 (Shimano et al., 2003).

4.2.- NEURAL CELL ADHESION MOLECULE (NCAM)

Identificació:

La molècula NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule, o CD56) va ser descoberta al 1977, en cèl·lules neurals de retina de pollet. Es va identificar com una molècula de superfície amb un important paper en agregació de neurones (Thiery et al., 1977).

Estructura i funcions:

La proteïna NCAM està codificada per un sol gen, però l'*splicing* alternatiu dóna diferents isoformes: 180 kDa, 140 kDa i 120 kDa que contenen tres regions (extracel·lular, de membrana, i domini citoplasmàtic) (veure **figura 8**). També existeix una forma soluble de 115 kDa (Walmod et al., 2004).

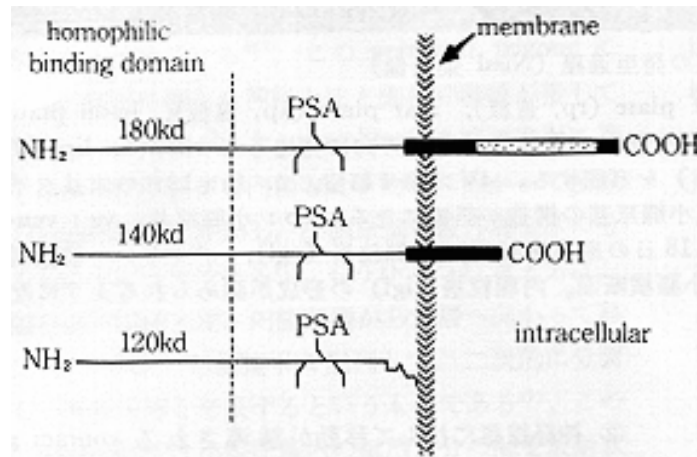


Figura 8.- Estructura de les isoformes de la molècula NCAM i punt d'unió de l'àcid polisiàlic (PSA).

Les molècules de NCAM formen interaccions homofíliques entre elles per crear unions entre les cèl·lules. La seva capacitat d'adhesió o repulsió depèn dels residus d'àcid siàlic que portin unides. L'àcid siàlic (PSA) que s'uneix a NCAM és un complex sacàrid derivat de la conjugació de mannososa i àcid pirúvic, i li dóna càrrega negativa a la molècula. Un major percentatge d'àcid siàlic estarà relacionat amb la reducció de la seva capacitat d'adhesió entre cèl·lules (Rutishauser et al., 1988) (veure **figura 9**).

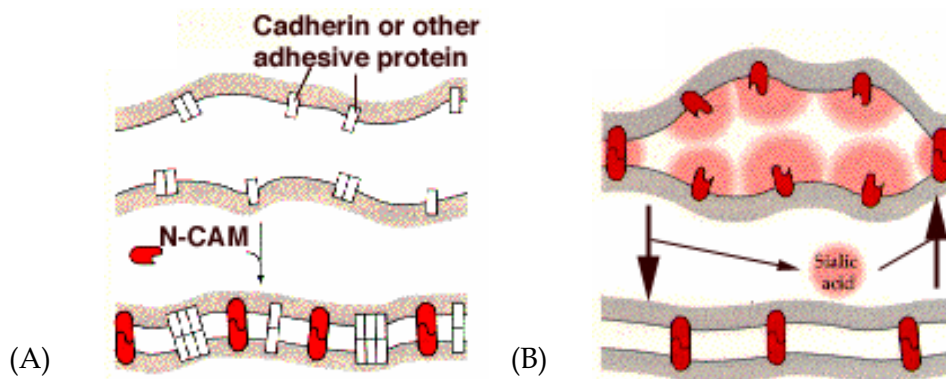


Figura 9.- Mecanismes propostats a través dels quals NCAM pot promoure o inhibir l'adhesió cel·lular. (A) L'expressió en superfícies adjacents de molècules NCAM amb poc percentatge de PSA permeten la formació d'unions entre molècules NCAM que mantindran unides les membranes. (B) Una alta proporció de PSA unit a NCAM farà que s'inhibeixin les unions cel·lula-cel·lula, que podran ser restablertes amb l'eliminació de PSA (Rutishauser et al., 1988).

NCAM també pot formar interaccions heterofíliques extracel·lulars amb factors de creixement com GDNF "*Glial derived neurotrophic factor*", receptors com FGFR "*Fibroblast Growth Factor Receptor*", i amb molècules de la matriu extracel·lular com proteoglicans. A més, també forma unions intracel·lulars amb espectrina (proteïna del citoesquelet), FAK "*Focal adhesion kinase*", i GAP-43, entre altres (Walmod et al., 2004).

Totes aquestes interaccions fan que aquesta molècula no només afecti l'adhesió cel·lular i la unió a substrats, sinó que pugui estar relacionada amb altres fenòmens biològics ja que és capaç d'induir i modular cascades de senyalització intracel·lulars. Algunes de les funcions de NCAM poden estar regulades per MMP (*matrix metalloproteinases*) (Hubschmann et al., 2005). Principalment, NCAM està implicat en processos de desenvolupament, diferenciació i plasticitat neuronal (Sunshine et al., 1987), per això s'ha proposat com a possible marcador de cèl·lules troncales neurals. S'han descrit cèl·lules que expressen PSA-NCAM i que poden ser precursors multipotents de cèl·lules gials (Marmur et al., 1998) , (Ben-Hur et al., 1998) o bé de neurones (Doetsch et al., 1997)

Localització:

Els estudis de desenvolupament embrionari de rata demostren que NCAM està expressat àmpliament, i té un paper clau en la divisió cel·lular, migració i diferenciació (Gaidar et al., 1998). En teixit adult, la seva expressió és més restringida, quedant localitzada en cèl·lules concretes de diferents òrgans. En humans es va descriure la presència de NCAM en fetge, concretament en cèl·lules estrellades hepàtiques (HpSC) (Nakatani et al., 1996). La seva expressió es va relacionar amb diferents estats de maduració d'aquestes cèl·lules, fet que es va confirmar en rosegadors, on es va descriure l'augment de l'expressió de NCAM durant la transformació *in vitro* de cèl·lules quiescents a miofibroblasts (Knittel et al., 1996). Tot i que un estudi de transcriptòmica comparativa apunta les semblances entre HpSC i les cèl·lules pancreàtiques estrellades (PaSC), de moment en les PaSC encara no s'ha descrit la presència de NCAM (Buchholz et al., 2005).

En el cas del pàncreas, es va detectar l'expressió de NCAM en cèl·lules endocrines de rata (Langley et al., 1989), i la seva funció es va relacionar amb la correcta segregació dels tipus cel·lulars de l'illot per formar la seva ultraestructura característica (Cirulli et al., 1994), i també amb el *turnover* dels grànuls secretors d'insulina (Esni et al., 1999). Més tard però, es va descriure en rates adultes l'expressió de NCAM en cèl·lules acinars del pàncreas exocrí (Filiz et al., 2002). En humans, NCAM ha estat identificat també en ductes (Eidelman et al., 1989), (Fujisawa et al., 2003).

Pel que fa a l'expressió PSA-NCAM en pàncreas hi ha una certa controvèrsia: mentre que uns autors defensen que els illots de rata (neonats, joves i adults) no expressen PSA-NCAM (Moller et al., 1992), altres treballs demostren que PSA-NCAM sí que s'expressa en illots, concretament en cèl·lula β , en condicions que estimulen la síntesi d'insulina (Kiss et al., 1994). Posteriorment es va determinar la presència de PSA-NCAM en cèl·lula β com a marcador de la seva activitat funcional: la subpoblació que expressa més PSA-NCAM té una major secreció d'insulina (Bernard-Kargar et al., 2001).

4.3.- NESTINA

La nestina és una proteïna de filament intermedi de classe VI (acrònim de *neuroepithelial stem cell protein*) que es va descriure en el desenvolupament del sistema nerviós central, i es va proposar com a marcador de cèl·lules progenitores neurals. Més

tard també es van identificar cèl·lules que expressaven nestina en progenitors d'altres teixits com múscul, i dents, i aquesta expressió es reduïa quan arribaven a l'estat diferenciat (Bazan et al., 2004).

En el pàncreas adult, cèl·lules positives per nestina es van descriure inicialment en els illots, en una subpoblació endocrina que es va proposar com a possibles cèl·lules troncales (Hunziker and Stein, 2000). Posteriorment, cèl·lules positives per nestina es van identificar tant en la fracció endocrina de pàncreas adult, com també en la fracció exocrina (cèl·lules acinars i ductals) (Street et al., 2004). En canvi, en el desenvolupament pancreàtic les cèl·lules positives per nestina contribueixen principalment a la formació del tipus cel·lular exocrí (Esni et al., 2004). També s'ha descrit que cèl·lules residents en illots i ductes pancreàtics humans i de rata positives per nestina però negatives per les quatre hormones de l'illot, tenien la capacitat de diferenciar-se *ex vivo* en cèl·lules endocrines i exocrines (Zulewski et al., 2001). Posteriorment però, no es va detectar nestina en l'epiteli ductal pancreàtic, on es creu que hi ha els possibles progenitors pancreàtics, sinó en cèl·lules mesenquimals de pàncreas de ratolí en desenvolupament (Selander and Edlund, 2002), fet que qüestiona la utilització d'aquest filament intermedi com a marcador de cèl·lules troncales pancreàtiques. A més, aquest marcador nestina també ha estat identificat en la població SP del pàncreas (Lechner et al., 2002), en cèl·lules pancreàtiques estrellades i en cèl·lules endotelials (Lardon et al., 2002). En aquest sentit, diversos estudis relacionen les cèl·lules que expressen nestina amb la capacitat de regeneració pancreàtica després d'una pancreatitis en humans (Zimmermann et al., 2002) i també en rates (Ishiwata et al., 2006).

Els treball de diferenciació on es generaven cèl·lules productores d'insulina a partir de ESC de ratolí positives per nestina, van establir la idea que les cèl·lules β i les neurones podien ser generades a partir de la mateixa població de cèl·lules precursors que expressaven nestina, ja que durant el desenvolupament embrionari aquests dos tipus cel·lulars comparteixen diverses característiques i marcadors d'expressió (Lumelsky et al., 2001). Posteriorment, diversos estudis s'han posicionat en contra del fet que es puguin derivar cèl·lules productores d'insulina *in vitro* a partir de precursors que expressin nestina (Kania et al., 2004), (Treutelaar et al., 2003), (Humphrey et al., 2003), (Piper et al., 2002), demostrant que la insulina secretada per aquestes cèl·lules nestina(+) era un artefacte (Hansson et al., 2004), i que el protocol proposat per Lumelsky podia haver generat a la vegada cèl·lules de tipus neuronal (Sipione et al., 2004), (Wiese et al., 2004).

Tot i la controvèrsia, podem dir que la nestina és un marcador acceptat de cèl·lules progenitores de diversos llinatges. A més, la seva expressió en desenvolupament i regeneració de teixits ha obert noves perspectives per identificar cèl·lules que podrien ser utilitzades per teràpia regenerativa (Wiese et al., 2004).

4.4.- THY 1

Thy 1 (CD90) és una glicoproteïna de membrana que s'expressa en diversos tipus cel·lulars com timòcits, neurones, cèl·lules endotelials i fibroblasts. S'han identificat dos al·lels que codifiquen per Thy 1.1 i per Thy 1.2, que difereixen en un aminoàcid i s'expressen diferencialment en soques de ratolí (Haeryfar and Hoskin, 2004).

La glicoproteïna Thy 1 té una funció bàsicament immunològica, on està implicada en l'activació de cèl·lules T; en canvi, les funcions no immunològiques inclouen la inhibició de la formació de neurites, la participació en senyalització

apoptòtica, l'adhesió i migració de leucòcits i cèl·lules de melanoma, i la proliferació i migració de fibroblasts (Rege and Hagoood, 2006). A nivell fisiològic aquestes funcions estan relacionades amb regeneració nerviosa, metàstasis, inflamació i fibrosis. Totes aquestes funcions indiquen que Thy 1 és un regulador important de les interaccions cèl·lula-cèl·lula i les interaccions cèl·lula-matriu.

Es va descriure que Thy 1 s'expressava a la membrana de cèl·lules progenitores hematopoètiques indiferenciades, i que la seva expressió es perdia al llarg de la seva diferenciació (Miller and Lipton, 1983). Posteriorment es va relacionar amb el potencial de generació de les diferents cèl·lules de la sang, on els eritròcits eren els primers de perdre l'expressió de Thy 1 i els macròfags mantien la seva expressió fins gairebé el final de la seva diferenciació (Berman and Basch, 1985).

Recentment s'ha identificat una població progenitora aïllada de glàndules salivals que expressa Thy 1, i que en determinades condicions poden expressar albúmina i insulina (Matsumoto et al., 2007).

5.- IMPORTÀNCIA DE LES CÈL·LULES TRONCALS EN MEDICINA REGENERATIVA

El concepte de medicina regenerativa es basa en la utilització de les pròpies cèl·lules troncales i factors de creixement del cos per reparar els seus teixits danyats. Aquest nou repte de la medicina podria contribuir en el tractament, i fins i tot la curació de malalties com la diabetis, el Parkinson o les malalties cardiovasculars (Burke and Tosh, 2005). Els dos tipus de cèl·lules troncales (embriòniques i adultes) presenten avantatges i desavantatges a l'hora de plantejar la seva utilització en medicina regenerativa: les **ESC** són pluripotents i fàcils d'expandir però presenten objeccions ètiques, són difícils d'aïllar, tenen risc de rebuig en el trasplant, requeririen teràpia immunosupressora, i poden provocar teratocarcinomes. Pel que fa a les **ASC**, no presenten objeccions ètiques i són fàcils d'obtenir, poden ser uni-, bi-, multi-, o pluripotents, i segons el seu origen presenten diferents habilitats per ser expandides. Podrien trasplantar-se en el mateix individu del qual s'han aïllat, i això faria que no fos necessària la teràpia immunosupressora; en aquest sentit ja s'han començat a dur a terme aplicacions clíniques concretes. Tot i això, igual que en les ESC, no s'han identificat marcadors específics de les ASC (Strauer and Kornowski, 2003).

Per obtenir cèl·lules troncales adultes però, s'ha de tenir en compte que mentre hi ha teixits del cos que estan contínuament en renovació, com la sang, la pell, i el tracte digestiu i respiratori, la majoria de cèl·lules i teixits de l'adult tenen una taxa de renovació molt baixa en circumstàncies normals. Aquestes observacions es correlacionen amb l'existència i funció de cèl·lules troncales en teixits altament regeneratius, i l'absència de cèl·lules troncales funcionals en altres teixits (Wagers and Weissman, 2004).

5.1.- REGENERACIÓ PANCREÀTICA: IMPLICACIÓ EN LA DIABETIS

La diabetis *mellitus* (DM) és una de les malalties cròniques més comunes en els humans, que comporta severes complicacions secundàries relacionades amb el control metabòlic de la pròpia malaltia. En l'actualitat no existeix cura per la diabetis, que constitueix la quarta causa de mortalitat en els països desenvolupats i afecta

negativament la qualitat de vida dels individus que la pateixen. Aquesta malaltia, amb totes les seves formes, afecta actualment gairebé 200 milions de persones, i s'espera que aquest nombre arribi a 300 milions l'any 2025 segons prediccions de la Organització Mundial de Salut (OMS) i la Federació Internacional de la Diabetis (FID) (Zimmet et al., 2001).

Actualment s'identifiquen quatre tipus de diabetis: tipus 1, tipus 2, "altres tipus específics" entre els que trobem MODYs (Maturity-Onset Diabetes of the Young), i diabetis gestacional (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997). De totes elles, les més freqüents són la tipus 1 i la tipus 2.

Diabetis mellitus tipus 1 (DM1)

També se l'ha anomenat "diabetis dependent d'insulina" o bé "diabetis juvenil". És una malaltia que provoca la destrucció de cèl·lules β , i com a conseqüència es produeix un dèficit gairebé absolut d'insulina. El pàncreas és incapaç de mantenir l'homeostasi de la glucosa, ja que els teixits perifèrics (múscul, teixit adipós) i el fetge són incapaços de metabolitzar la glucosa. El fetge activa la via gluconeogènica i glucogenolítica, fet que fa agreujar la hiperglicèmia. Els pacients diabètics necessiten obtenir energia d'altres substrats i mobilitzen àcids grassos lliures del teixit adipós al fetge per obtenir energia de la seva posterior oxidació. La producció de cossos cetònics porta a una cetoacidosi que, en conjunt amb la hiperglicèmia, produeix patologies secundàries responsables de les alteracions oculars, cardiovasculars, circulatòries, renals i neurològiques presents en la diabetis. Un bon control de la glucèmia amb insulina exògena disminueix el risc d'aquestes complicacions (Zimmet et al., 2001).

Aquest tipus de diabetis es diagnostica normalment en la infància i l'adolescència. Quan està mediada pel sistema immunitari ens trobem davant una destrucció autoimmunitària de les cèl·lules β del pàncreas a través de les pròpies cèl·lules T autorreactives, i amb la presència d'alguns dels marcadors d'immunitat ICAs (Islet cell autoantibodies) (Bottazzo et al., 1974): la isoforma de l'àcid glutàmic descarboxilasa GAD65 (*glutamic acid decarboxilase*) (Baekkeskov et al., 1982), i les molècules de la família de proteïnes transmembrana tirosina fosfatasa IA-2 (Lan et al., 1996), i IA-2 β (Lu et al., 1996). A més, aquesta malaltia també està associada a diferents gens i al lloc del complex major d'histocompatibilitat (HLA) que poden predisposar a la malaltia o bé ser protectors (susceptibilitat genètica) (Cantor et al., 1995), (Huang et al., 1996), (Pociot and McDermott, 2002), (Bergholdt et al., 2007). Quan té causes idiopàtiques no hi ha evidències d'autoimmunitat ni associació a HLA, i en aquest cas acostuma a ser hereditària (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997).

Diabetis mellitus tipus 2 (DM2)

També se l'ha anomenat "diabetis no dependent d'insulina" o bé "diabetis de l'adult". La presenten individus amb resistència a la insulina a nivell de fetge i teixits perifèrics, acompanyada generalment per una certa deficiència d'insulina (Kahn, 1994). Tot i que no es coneixen les causes que provoquen aquest tipus de diabetis, la destrucció autoimmunitària no es dona en aquests pacients, la majoria d'ells obesos. Està sovint associada a una predisposició genètica (Barroso, 2005).

El tractament per aquesta hiperglicèmia acostuma a ser una dieta restringida, activitat física i hipoglucèmics orals, tot i que alguns pacients han d'acabar tractant-se amb insulina per sobreviure (Moller, 2001).

Tipus de teràpies pel tractament de la diabetis

L'administració d'insulina exògena pel tractament de la diabetis suposa la necessitat d'una monitorització de la glucèmia freqüent, injeccions continuades, possibilitat d'episodis d'hipoglicèmia i possibles complicacions a llarg termini d'origen macro i microvasculars.

El trasplantament d'illots realitzat amb la tècnica del protocol d'Edmonton (Shapiro et al., 2000) va permetre l'alotrasplant d'illots pancreàtics amb èxit, però amb inconvenients que encara no han estat solucionats com: i) el teixit del donant no està disponible fàcilment, i el seu nombre és limitat, ii) hi ha un baix rendiment en el procés d'extracció dels illots que fa que es necessitin de dos a tres donants per trasplant, iii) els receptors del trasplant necessitaran tota la vida una teràpia immunosupressora, iv) i només es beneficiarien una minoria de pacients, en concret aquells amb manifestacions diabètiques severes, on existeix un risc vital superior als efectes secundaris dels immunosupressors.

La generació d'una nova font de cèl·lules β manipulables genèticament, que permetés disposar de suficient material per atendre les necessitats dels pacients, podria suposar una nova estratègia per aconseguir restablir la massa β cel·lular perduda en la diabetis. En aquest punt, una de les possibles solucions per la diabetis seria la teràpia cel·lular amb cèl·lules troncales embrionàries o adultes diferenciades en un fenotip de cèl·lula β ; o bé aconseguir la transdiferenciació cap a cèl·lula β a partir de progenitors hepàtics o exocrins (veure **figura 10**).

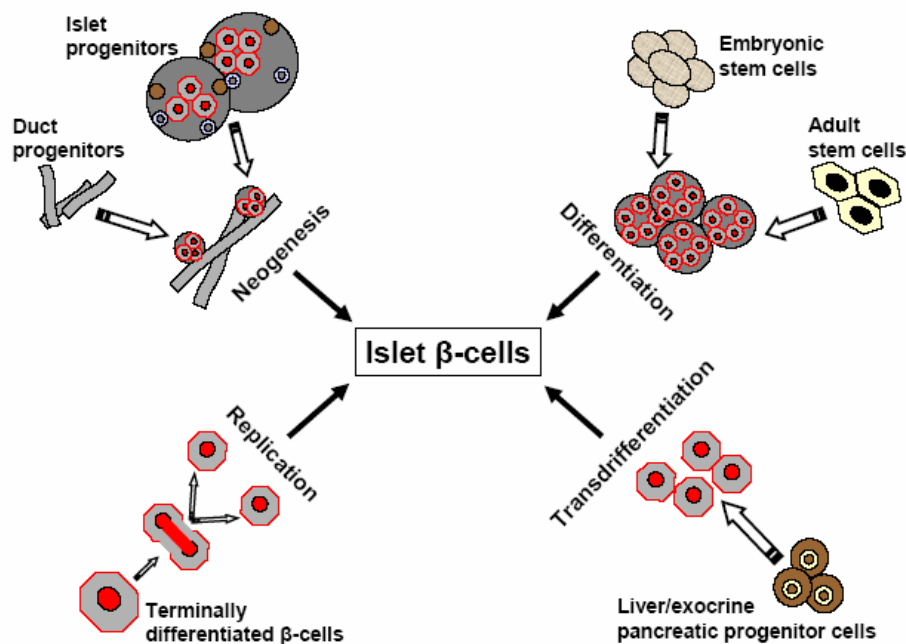


Figura 10.- Possibles mecanismes d'obtenció de cèl·lules β : replicació, neogènesi, diferenciació o transdiferenciació. Extret de (Banerjee et al., 2005)

5.2.- PÀNCREAS

Una bona aproximació per guiar la diferenciació fins aconseguir un fenotip endocrí és conèixer els mecanismes que governen la generació d'aquestes cèl·lules durant el desenvolupament pancreàtic. El procés de desenvolupament seria doncs una seqüència coordinada de canvis en els patrons d'expressió gènica mitjançant l'activació

Introducció

i repressió de factors de transcripció específics, que permeten la progressió dels precursors cap a una cèl·lula madura diferenciada. Per una correcta aplicació de la teràpia regenerativa, seria important conèixer els **factors de transcripció** implicats, així com els **factors solubles** que modulen la determinació dels precursors fins al llinatge específic de cèl·lula β .

El pàncreas de mamífers és una glàndula tant exocrina com endocrina, i les funcions de cada una de les parts estan molt relacionades. És un òrgan que té un paper central en la regulació de la nutrició i el balanç energètic ja que produeix alhora enzims digestius i senyals hormonals que regulen l'absorció, utilització i emmagatzematge dels nutrients digerits.

El teixit exocrí està organitzat en **acins** cel·lulars, que sintetitzen principalment hidrolases digestives, i **ductes**, que condueixen fins a l'intestí les secrecions acinars i a la vegada secreten bicarbonat (fluid que acompanya els enzims acinars). Aquest teixit constitueix aproximadament el 80-85% del total de la massa pancreàtica (Clark, 2004).

Les cèl·lules endocrines s'organitzen en agrupacions microscòpiques anomenades illots pancreàtics o de Langerhans, i constitueixen únicament del 2 al 5% de la massa pancreàtica total. L'estructura dels illots està formada per 4 tipus cel·lulars diferents: les cèl·lules β secretores d'insulina que formen el 60-80% de la massa de l'illot; les cèl·lules α que produeixen glucagó (25%); les cèl·lules δ que secreten somatostatina (2-8%) i finalment les cèl·lules que produeixen el polipèptid pancreàtic (PP), que són molt escasses (1-2%). Les cèl·lules de l'illot s'organitzen de manera diferent en funció de l'espècie. Concretament els illots de rosegador tenen una disposició característica, formada per un nucli de cèl·lules β envoltades per les cèl·lules α , δ i PP (Clark, 2004) (veure **figura 11 C**).

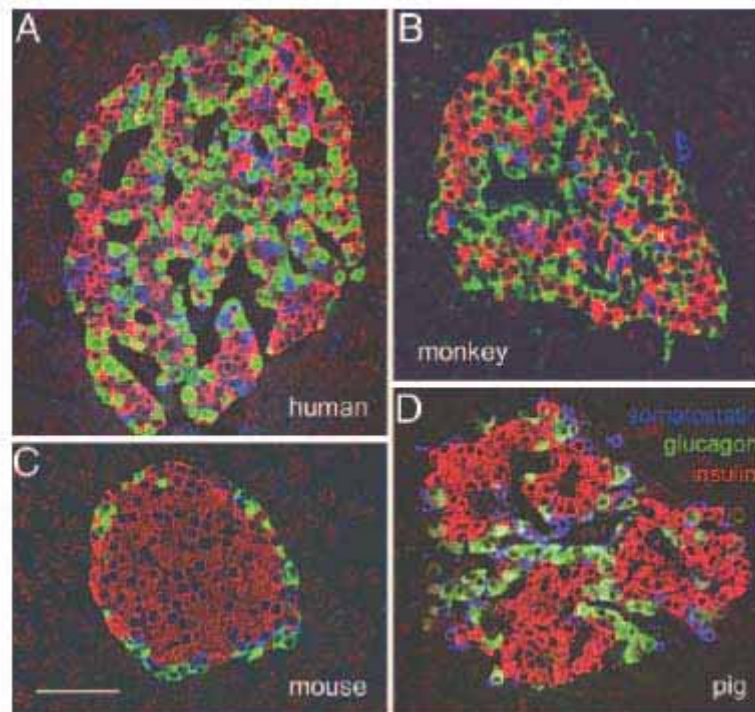


Figura 11.- Estructura i disposició dels diferents tipus cel·lulars en els illots humans (A), de primat (B) de ratolí (C) i de porc (D). Extret de (Cabrera et al., 2006).

Cèl·lula β

Les cèl·lules β són les responsables del manteniment dels nivells de glucosa del cos. La seva població és dinàmica i està sotmesa a canvis per mantenir la normoglicèmia. En l'illot adult, la massa de cèl·lules β està en constant renovació. En condicions normals, aquesta remodelació depèn de diferents mecanismes: replicació, neogènesi, canvis de volum i mort cel·lular (Bonner-Weir, 2000) (veure **figura 12**).

La **replicació** és el mecanisme pel qual es genera una nova cèl·lula β a partir d'una altra ja existent. La **neogènesi** és el mecanisme pel qual es genera una nova cèl·lula β a partir d'un precursor epitelial de manera similar a com passaria durant el desenvolupament. Els canvis de volum cel·lular suposen un augment de la mida de la cèl·lula, que es coneix com a **hipertrofia**, per tant la hipertrofia pot augmentar la massa de cèl·lules β però no el nombre. El procés contrari, l'**atròfia**, seria la pèrdua de volum cel·lular. Finalment, la **mort** cel·lular és un procés en el que podem diferenciar dos mecanismes: la necrosi i l'apoptosi.

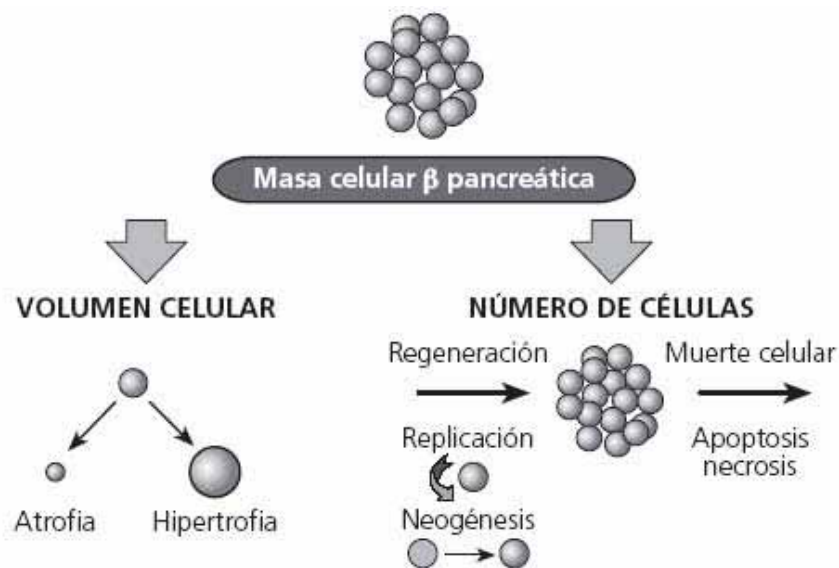


Figura 12.- Esquema de l'estat dinàmic de les cèl·lules β . La població de cèl·lules β té un *turnover* lent, on la renovació prové de la replicació de cèl·lules β pre-existents i de la neogènesi, i l'eliminació de cèl·lules és per apoptosi, tot i que també es pot produir la mort cel·lular per necrosi. La hipertrofia de cèl·lules individuals pot augmentar la massa de cèl·lules β però no el nombre. Extret de (Gasa, 2007).

La massa β cel·lular augmenta durant la vida pre i neonatal en humans i rosegadors, però la seva taxa de proliferació disminueix dràsticament amb l'edat (Bouwens and Rooman, 2005). Les cèl·lules β humanes tenen una proliferació molt més reduïda que les de rosegador, la seva taxa de replicació en cultiu s'ha estimat en un 0,1% en 48 hores (Tyrberg et al., 1996), mentre que en rata s'ha estimat en un 2-3% (Montana et al., 1994).

La producció de noves cèl·lules β per replicació s'ha estudiat en rosegadors mitjançant la tècnica de seguiment del llinatge cel·lular (*lineage tracing*), i els resultats apunten que la renovació de cèl·lules β es realitza per replicació de cèl·lules β preexistents i no pas a partir d'una població de cèl·lules troncales (Dor et al., 2004). Tot i això, aquest estudi no pot excloure definitivament la presència de poblacions troncales en el pàncreas.

Biosíntesi i secreció d'insulina

La insulina és la hormona sintetitzada, emmagatzemada i secretada per les cèl·lules β dels illots pancreàtics i la seva estructura molecular està altament conservada durant l'evolució (Bell et al., 1980). L'estructura de la insulina està formada per dues cadenes: la cadena A (21 aa) i la cadena B (30 aa). Les dues cadenes es mantenen unides per dos ponts disulfur, i també existeix un tercer pont disulfur intern, propi de la cadena A (veure **figura 13**). La seva síntesi inclou la formació de dues molècules precursors: la preproinsulina i la proinsulina (Poitout et al., 2004) (veure **figura 13**). La síntesi proteica comença al citosol però el pèptid senyal situa la preproinsulina al reticle endoplasmàtic rugós, on s'acaba la seva traducció, és degradada per proteases específiques i es transforma en proinsulina. La proinsulina sintetitzada s'acumula a l'aparell de Golgi, concretament a la xarxa *trans*-Golgi (TGN) en una zona recoberta de clatrina, que serà el lloc de biogènesi dels grànuls secretors (Molinete et al., 2001). Quan aquests grànuls s'alliberen del Golgi té lloc la maduració: la proinsulina és transformada a insulina, s'acidifica el grànul, es perd la clatrina i es formen els hexàmers amb el Zn (Halban, 1994). Els enzims proteolítics implicats són dues endopeptidases específiques (PC1/3 i PC2), i la carboxipeptidasa H, que trenquen un pèptid de connexió anomenat pèptid C i permeten l'alliberament de la insulina madura amb activitat biològica (Hutton, 1994). Els grànuls de secreció migren a la membrana plasmàtica i s'hi fusionen mitjançant les proteïnes SNAREs (Wollheim and Maechler, 2004). Tant la insulina com el pèptid C poden ser mesurats en sang, i tot i que la relació insulina/pèptid C és constant, aquest últim té una vida mitja més llarga que la insulina (Bell et al., 1980).

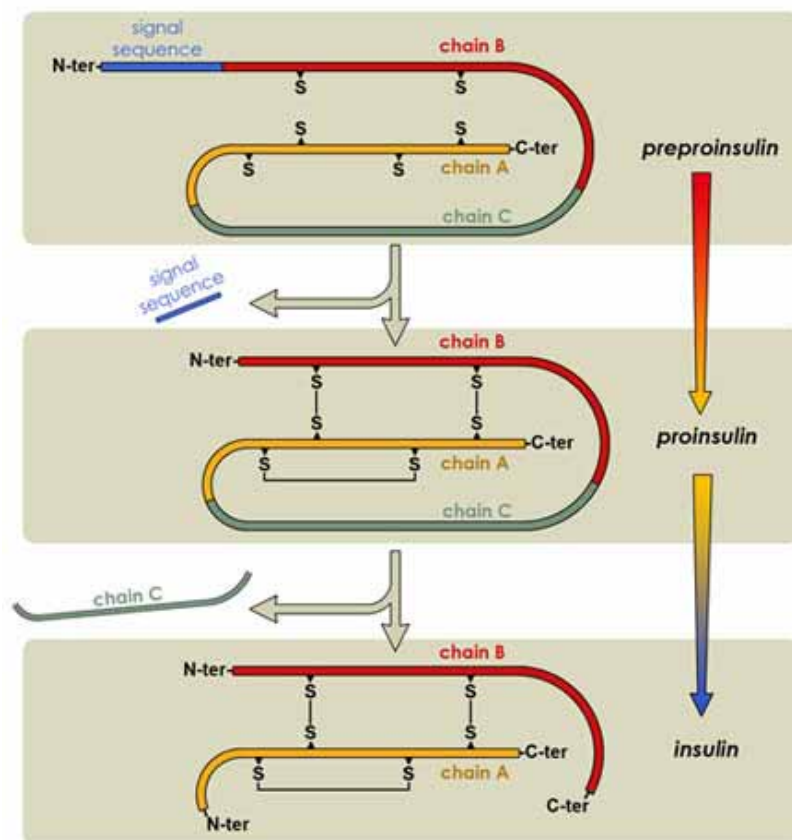


Figura 13.- Esquema del processament de la hormona insulina des de la seva biosíntesi fins a la seva secreció. Extret de la pàgina web "Beta Cell Biology Consortium".

La secreció de proteïnes pot seguir dos camins diferents: una via **regulada** en resposta a una senyal positiva, com és el cas de les hormones, o bé una via **constitutiva** que suposa el moviment ràpid de proteïnes del sistema de Golgi a la membrana citoplasmàtica per a ser alliberades immediatament, com són les proteïnes de la membrana o de la matriu extracel·lular (Brion et al., 1992). Mentre que la secreció constitutiva es produeix en totes les cèl·lules eucariotes, la via regulada per estímuls fisiològics només s'ha descrit en cèl·lules especialitzades neuroendocrines i exocrines, i requereix grànuls de secreció (Arvan et al., 1991) (veure **figura 14**). La cèl·lula β pot dur a terme qualsevol d'aquestes dues vies, tot i que en circumstàncies normals la proinsulina segueix gairebé exclusivament la via regulada.

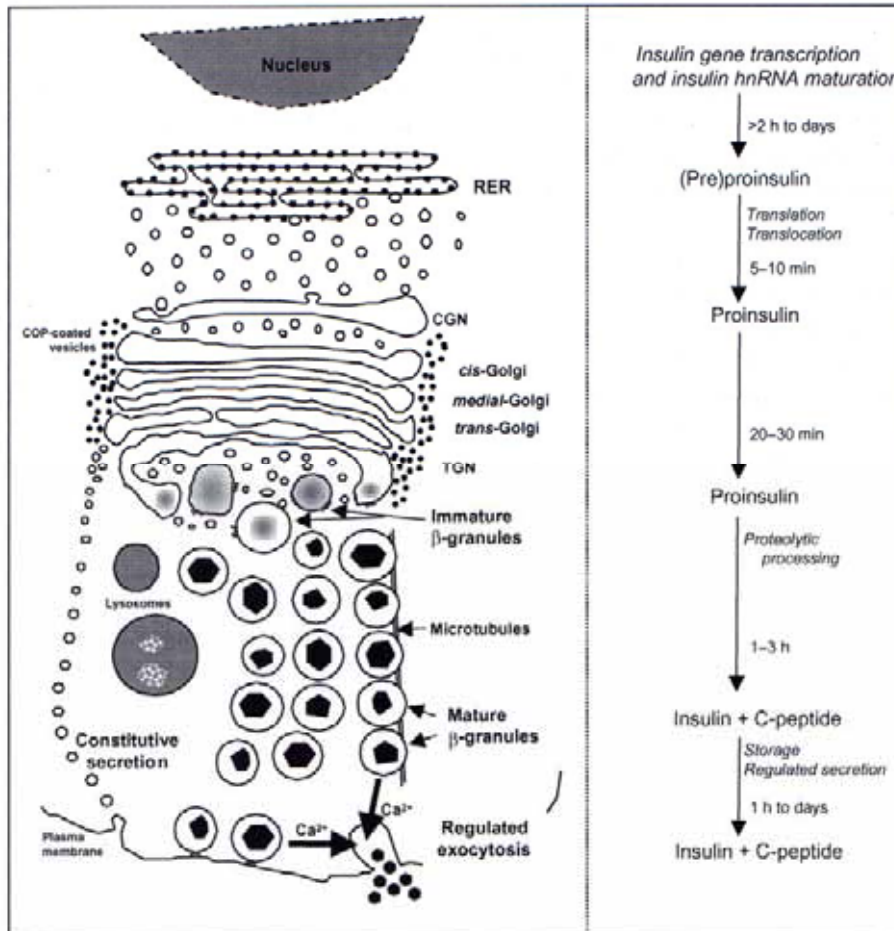


Figura 14.- Esquema de la secreció de la hormona insulina per les dues vies possibles: secreció constitutiva i exocitosi regulada per un estímulo. Extret de (Poitout et al., 2004).

El regulador més important de la síntesi de la insulina és la glucosa (Ashcroft et al., 1978), i també és l'estímul més important per la seva secreció. L'elevació dels nivells de glucosa en sang, i altres nutrients com aminoàcids i àcids grassos tenen un efecte sobre l'activitat secretora de la cèl·lula β . Les hormones i neurotransmissors actuen en la cèl·lula β modulant la resposta secretora i poden ser tant inhibidors com estimuladors.

En el cas de la glucosa, les senyals que estimulen la secreció d'insulina no són generades per una interacció lligand-receptor sinó que deriven de la seva metabolització intracel·lular (Malaisse et al., 1979). La glucosa entra dins la cèl·lula a

través del transportador de glucosa GLUT2, i un cop a dins entra a la via glucolítica a ser fosforilada per l'acció de l'enzim glucoquinasa, transformant-se en glucosa-6-fosfat. El metabolisme de la glucosa dins la cèl·lula β és el que genera la senyal per secretar la insulina a través de l'augment d'ATP intracel·lular, tancament de canals de potassi dependents d'ATP (Larsson et al., 1996), despolarització de membrana i entrada de calci a l'interior de la cèl·lula, que guiarà l'exocitosi (Bergsten et al., 1994) (veure **figura 15**). La secreció per exocitosi de la insulina presenta dues fases: una primera fase molt curta però intensa, on s'alliberen al voltant de 100 grànuls per segon, i una segona fase sostinguda en el temps en la que s'alliberen de 0,5 a 10 grànuls per segon (Rorsman et al., 2000). La primera fase és independent de l'ATP mentre que la segona fase requereix ATP, probablement per la mobilització dels grànuls de reserva.

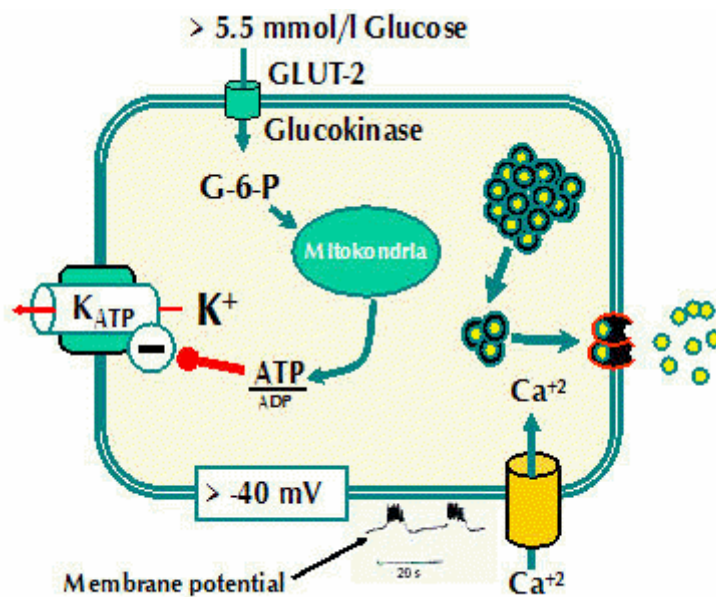


Figura 15.- Esquema de la secreció de la hormona insulina a partir de l'estimulació per glucosa (exocitosi regulada). Extret de la pàgina web "www.medbio.info"

5.3.- DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI DEL PÀNCREAS: GENERACIÓ DELS DIFERENTS TIPUS CEL·LULARS

El pàncreas es desenvolupa a partir de precursors de l'endoderm, i haurà de donar lloc als llinatges ductals, exocrins i acinars. Per controlar que el desenvolupament es realitzi de manera correcta, és necessària la regulació de l'expressió de diferents gens, controlats jeràrquicament per específiques xarxes de factors de transcripció (Jensen, 2004). El desenvolupament pancreàtic en rosegadors és força semblant al d'humans. No obstant, mentre que les cèl·lules β en humans són funcionals al final del primer trimestre de gestació, en rates no es fa efectiva la seva funcionalitat fins al final de la gestació, i concretament els illots continuen remodelant-se i madurant fins 3 setmanes després del naixement (Habener et al., 2005).

Es pot dividir el desenvolupament pancreàtic en tres transicions diferenciades (veure **figura 16**). En la **primera transició** del desenvolupament, la morfogènesi pancreàtica comença aproximadament en el dia e9 en resposta a senyals del mesoderm, quan es formen dues evaginacions, dorsal i ventral (Sander and German, 1997). Les

dues evaginacions formaran un epitelí ductal indiferenciat mitjançant morfogènesi, que donarà dos primordis pancreàtics el dia e12.5, que finalment es fusionen.

En la **segona transició** del desenvolupament, les cèl·lules endocrines disperses entre l'epitelí indiferenciat es ramifiquen i proliferen, i els acinis ja es poden distingir dels ductes. Les cèl·lules endocrines ja comencen a organitzar-se en *clusters* semblants a illots el dia e16. Es formen petits *clusters* cel·lulars, illots primitius que acabaran desenganxant-se dels ductes i quedaran en el mesènquima adjacent (Scharfmann, 2000). El següent pas és l'arribada de vascularització en aquests *clusters* cel·lulars de cèl·lules endocrines immadures (Reusens and Remacle, 2006) (veure **figura 17**).

La **tercera transició** del desenvolupament comença el dia e18 i continua fins la segona i tercera setmana després del naixement. En el dia e18.5, al final de la gestació, els illots arriben a adoptar la distribució característica de les cèl·lules β al centre de l'illot i les cèl·lules que no expressen insulina a la perifèria. Aquesta tercera etapa consisteix en la remodelació i maduració de les cèl·lules endocrines dels illots de Langerhans, fins a aconseguir la completa capacitat de ser sensible a la glucosa i de regular la secreció d'insulina (Habener et al., 2005).

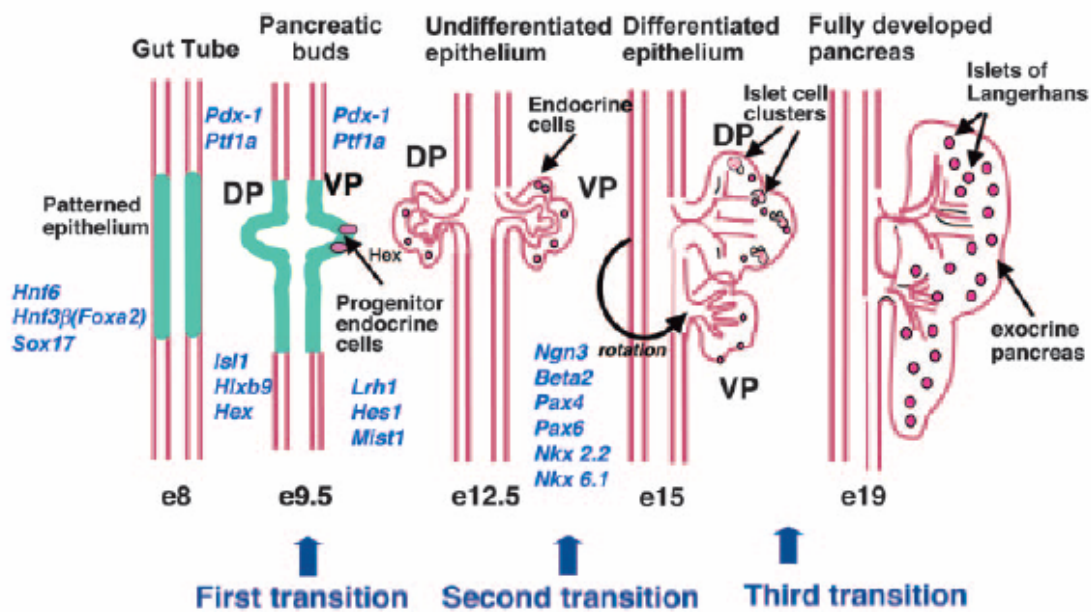


Figura 16.- Esquema de les transicions que tenen lloc durant el desenvolupament del pàncreas en rosegadors. DP= dorsal pancreas, VP= ventral pancreas. Extret de (Habener et al., 2005).

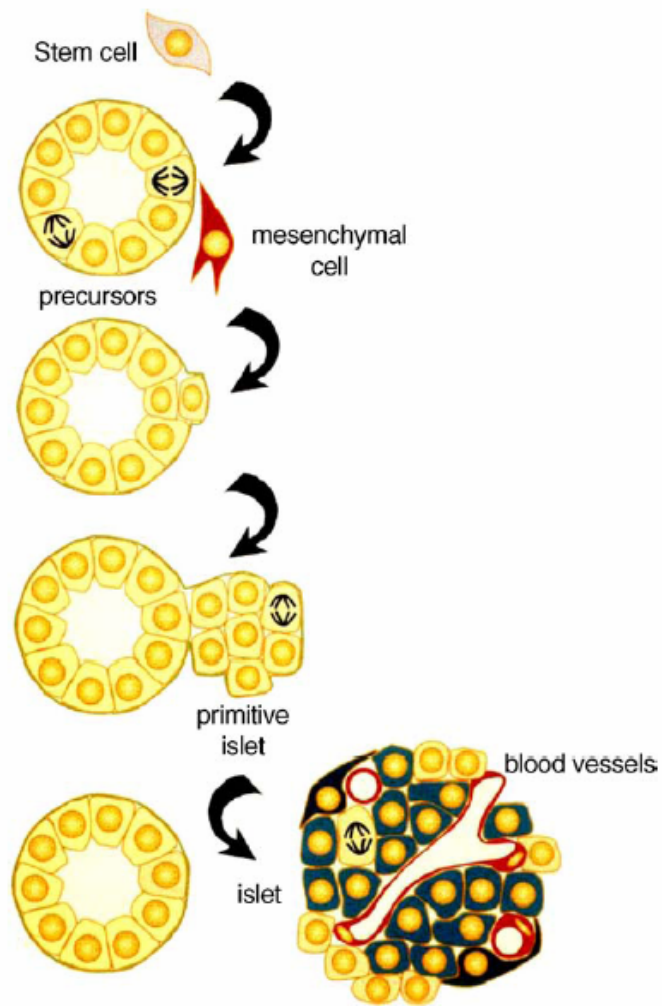


Figura 17.- Diferenciació de les cèl·lules de l'illot durant el desenvolupament embrionari amb l'ajuda de senyals del mesènquima, fins arribar a la vascularització i aconseguir la correcta disposició de tots els seus tipus cel·lulars. Extret de (Reusens and Remacle, 2006).

5.4.- FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ IMPLICATS EN LA DIFERENCIACIÓ ENDOCRINA

La identitat i funció de cada tipus cel·lular està definida per un programa genètic que, a la vegada, ve determinat per un únic grup de reguladors transcripcionals i una xarxa reguladora de gens específics. Per estudiar els factors de transcripció lligats al desenvolupament pancreàtic ha estat molt útil l'estratègia dels *knock-outs* en ratolí, que han permès l'observació de les conseqüències fenotípiques de les delecions d'aquests gens. Aquests estudis han proporcionat una cascada de factors de transcripció, alguns dels quals estan representats a la **figura 18**:

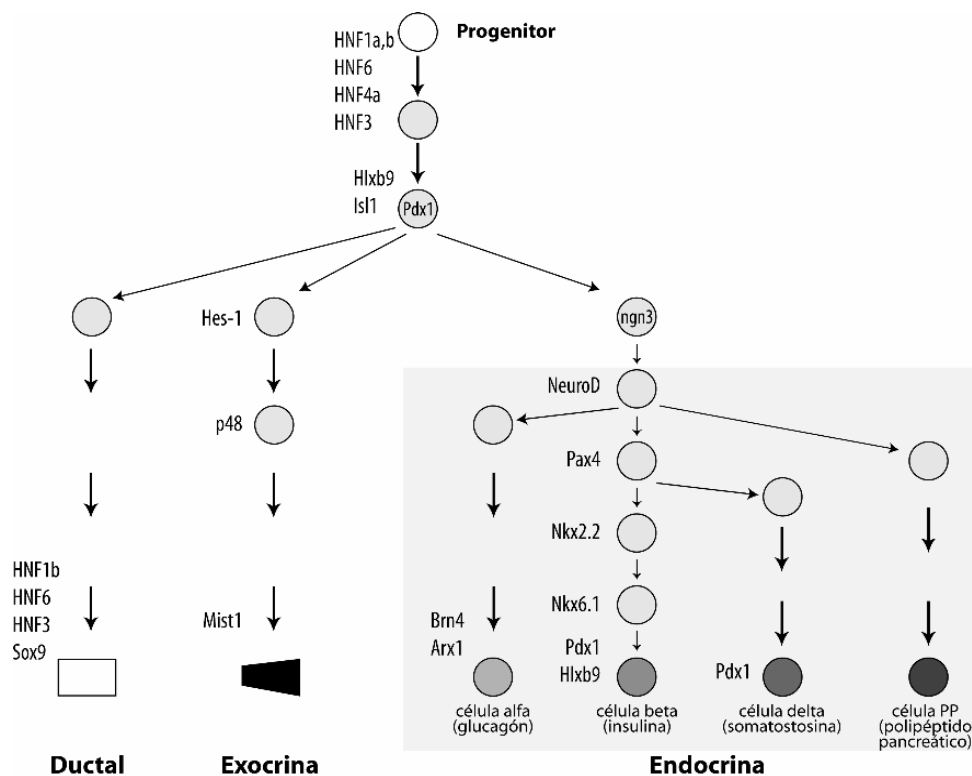


Figura 18.- Cascada de factors de transcripció implicats en el desenvolupament pancreàtic de ratolí. Modificació de la figura extreta de (Gasa, 2005)

A.- Factors implicats en desenvolupament primerenc del pàncreas:

PDX1 (*Pancreatic duodenal homeobox gene-1*): També s'anomena *Ipf1* o bé *Idx1*, i és un regulador clau en el desenvolupament pancreàtic i en la diferenciació de progenitors cap a fenotip β . Va ser inicialment identificat com un activador transcripcional dels gens de somatostatina i insulina, tot i que posteriorment s'ha demostrat que regula l'expressió d'altres gens específics de l'illot com amilina, glucoquinasa i *glut2* (Miller et al., 1994).

En el desenvolupament és el que s'anomena *master regulator*, és a dir que totes les cèl·lules pancreàtiques (endocrines, exocrines i ductals) deriven de progenitors que expressen Pdx1 (Gu et al., 2002). La seva expressió en l'espai i el temps participa en la determinació de l'endoderm cap a fenotip pancreàtic (Ahlgren et al., 1996). La seva expressió és àmplia en l'endoderm prepancreàtic abans de les evaginacions, i a partir del dia e13 queda restringit en alguns ductes i cèl·lules exocrines, mentre que la seva expressió és abundant en la majoria de cèl·lules β i en una subpoblació de cèl·lules δ de l'òrgan adult. En la cèl·lula β diferenciada s'ha descrit que actuaria com un regulador del gen de la insulina en resposta a glucosa, i la seva funció estaria regulada per fosforilació i translocació nuclear (Ahlgren et al., 1998). En els ratolins *knock out* per Pdx1 no es forma pàncreas, fet que determina la seva importància en el desenvolupament pancreàtic (Stoffers et al., 1997). A més, en ambients cel·lulars permissius, també pot induir propietats de cèl·lula β en cèl·lules de fetge (Ferber et al., 2000).

Hlxb9: És un activador transcripcional de la família bHLH que s'expressa en pàncreas embrionari en el dia e8 i dona lloc a la proteïna Hb9. S'expressa amb anterioritat a Pdx1 en l'evaginació dorsal (Li et al., 1999). Els ratolins *knock out* per aquest gen presenten agènesis pancreàtica dorsal (no formació de l'evaginació dorsal) (Harrison et al., 1999). En adults la seva expressió queda restringida a les cèl·lules β .

Isl1: S'expressa en el desenvolupament del pàncreas i del sistema nerviós central. En pàncreas adult s'expressa en totes les cèl·lules pancreàtiques que produeixen hormones, i s'ha vist implicat en l'expressió d'amilina, glucagó i somatostatina (Wang and Drucker, 1995). En cèl·lules β però la seva expressió és molt baixa, i no se li atribueix una funció important en la regulació de la insulina. El ratolí *knock out* per aquest factor presenta agènesis pancreàtica dorsal, semblant a la provocada en el *knock out* de Hlxb9 (Ahlgren et al., 1997).

B.- Factors implicats en la inducció de cèl·lules endocrines

Una vegada determinat que totes les cèl·lules del pàncreas adult provenen de progenitors que expressen Pdx1, són necessaris altres factors que regulin el pas d'aquests precursors comuns a cèl·lules endocrines, exocrines i ductals. Per la determinació endocrina la cascada proposada és la següent:

Inactivació Delta/Notch: És la responsable de moltes decisions binàries del destí cel·lular en la majoria d'organismes multicel·lulars. En el pàncreas, i de manera semblant a com succeeix en el desenvolupament neural, aquesta senyalització cel·lula-cèl·lula que rep el nom de "inhibició lateral" serà la responsable de l'especificació endocrina: les cèl·lules que han de diferenciar-se fins al llinatge endocrí utilitzen la senyalització Notch per forçar les cèl·lules veïnes a adoptar un fenotip no-endocrí (Jensen et al., 2000).

Neurogenina 3: És un factor de transcripció de tipus bHLH indispensable per la diferenciació dels llinatges cel·lular endocrins del pàncreas; el ratolí *knock out* per aquest factor mor de diabetis poc després del naixement per falta de cèl·lules pancreàtiques endocrines (Gradwohl et al., 2000). L'expressió de Ngn3 comença aproximadament el dia e9-9.5, té un punt màxim el dia 15.5 coincidint amb la generació de les cèl·lules endocrines, disminueix dràsticament en el naixement i és gairebé indetectable en pàncreas adult (Schwitzgebel et al., 2000). Les senyals positives tant

permissives com inductives poden iniciar l'expressió de Ngn3 en absència de la senyalització *notch*. S'han identificat llocs d'unió a HNF1 α , HNF3 β i HNF6 en el promotor de Ngn3 (Lee et al., 2001), i també s'ha descrit que Ngn3 regula en factor de transcripció IA1 de manera necessària per un correcte desenvolupament del pàncreas endocrí (Mellitzer et al., 2006).

A més de participar en el desenvolupament, també és un factor que pot activar el programa de diferenciació endocrina en determinats contextes. En el model de diferenciació proposat a la **figura 18**, Ngn3 seria un *master regulator* (Gradwohl et al., 2000), com Pdx1, però una vegada les cèl·lules deixen d'expressar Ngn3 es necessiten altres factors que continuïn el procés.

NeuroD1: És un factor de transcripció també de tipus bHLH que s'ha descrit com a diana directa de Ngn3. També se l'anomena BETA2 i és un regulador de la transcripció del gen de la insulina en cèl·lules β , i de la diferenciació de neurones (Chae et al., 2004).

En el desenvolupament pancreàtic s'expressa en el dia e9.5 i colocalitza amb l'expressió de glucagó, en el dia e14.5 s'expressa en les proximitats de l'epiteli ductal, i en el dia 17.5 la seva expressió queda restringida a illots. Els ratolins *knock out* per NeuroD1 generen tots els tipus cel·lulars de l'illot però moren perinatalment com a conseqüència d'una severa hiperglicèmia (hi ha una ràpida pèrdua de cèl·lules β per apoptosi entre 3 i 5 dies després del naixement) (Naya et al., 1997).

C.- Factors implicats en la determinació dels subtipus de cèl·lules endocrines

Després del marcatge cel·lular per Ngn3 que determina el llinatge endocrí, són necessaris els reguladors dels quatre possibles tipus de cèl·lules principals de l'illot pancreàtic.

Factors Pax: Pax-4 i Pax-6 són membres independents de la família de gens Pax. Ambdós s'expressen en el sistema nerviós central i en pàncreas, i Pax 6 s'expressa adicionalment en l'ull i el nas. Els models d'inactivació gènica han demostrat que els dos són imprescindibles per una correcta diferenciació endocrina (Sosa-Pineda et al., 1997). Pax-4 s'expressa transitòriament just després de Ngn3 en el desenvolupament embrionari, arribant a un pic d'expressió en el dia e15 i disminuint fins a ser indetectable ràpidament. L'expressió de Pax-6 comença en el dia e9 i durant el desenvolupament embrionari es correlaciona amb l'expressió de les quatre hormones pancreàtiques (Sander and German, 1997). La seva expressió es manté durant el desenvolupament embrionari i en el pàncreas adult.

Factors NK: Nkx2.2 i Nkx6.1 estan implicats en el desenvolupament del sistema nerviós central i del pàncreas. Els ratolins *knock outs* de cadascun dels dos gens presenten mort perinatal deguda a una severa diabetis (Sussel et al., 1998), (Sander et al., 2000). Nkx2.2 s'expressa inicialment en l'epiteli primitiu (just després de l'activació de Pdx1) i es manté fins el dia e13. En aquest moment, queda localitzat als progenitors Ngn3+ i finalment en l'adult la seva expressió perdura en les cèl·lules α , β i PP (Sussel et al., 1998). El patró d'expressió de Nkx6.1 en el desenvolupament pancreàtic és similar al de Nkx2.2, però en l'adult la seva expressió queda restringida a cèl·lula β .

5.5.- IMPORTÀNCIA DE LES SENYALS EXTRACEL·LULARS EN EL DESENVOLUPAMENT PANCREÀTIC

Durant el desenvolupament de cada òrgan és necessària una regulació molt acurada dels processos de proliferació, diferenciació, supervivència i apoptosi. Les senyals extracel·lulars autocrines i paracrines contribueixen a regular aquests processos. En el cas del pàncreas, la notocorda i el mesènquima que envolta l'epiteli pancreàtic secreten diversos factors que determinen l'especificació dorsal i ventral de les evaginacions pancreàtiques (Kim et al., 1997); i posteriorment també el mesènquima allibera les senyals necessàries per la migració, adhesió i formació d'illots pancreàtics (veure **figura 19**) (Kim and Hebrok, 2001). També les senyals del mesènquima poden fer augmentar el nombre de cèl·lules β al final del desenvolupament embrionari (Attali et al., 2007), i també controlen la diferenciació en el temps de cèl·lules β durant aquest procés (Duvillie et al., 2006). D'altra banda, també s'ha demostrat que són importants les senyals provinents dels vasos sanguinis de l'epiteli pancreàtic durant el desenvolupament embrionari (Lammert et al., 2001).

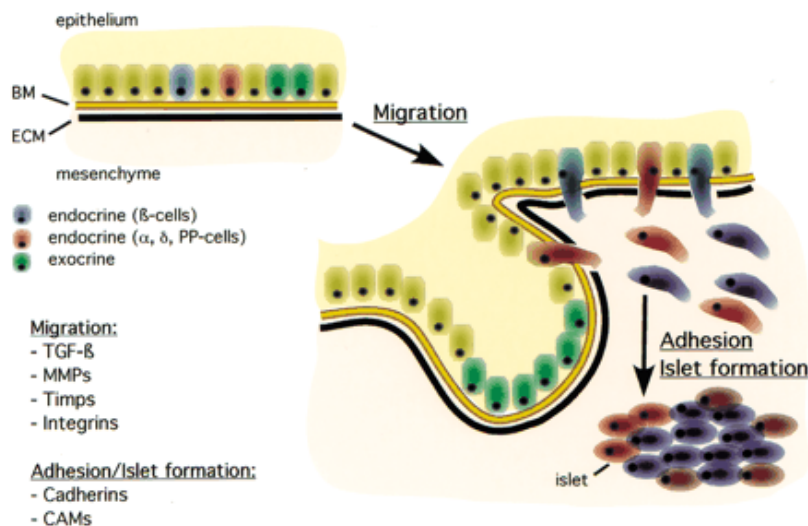


Figura 19.- Senyals del mesènquima que participen en la migració, adhesió i formació de l'illot. (BM= membrana basal, ECM= matriu extracel·lular). Extret de (Kim and Hebrok, 2001).

En resum, podem dividir els senyals extracel·lulars que actuen en el desenvolupament pancreàtic en tres grans grups (veure **figura 20**):

- 1.-Mediadors d'unions cèl·lula-cèl·lula
- 2.-Proteïnes insolubles de la matriu extracel·lular
- 3.-Factors solubles

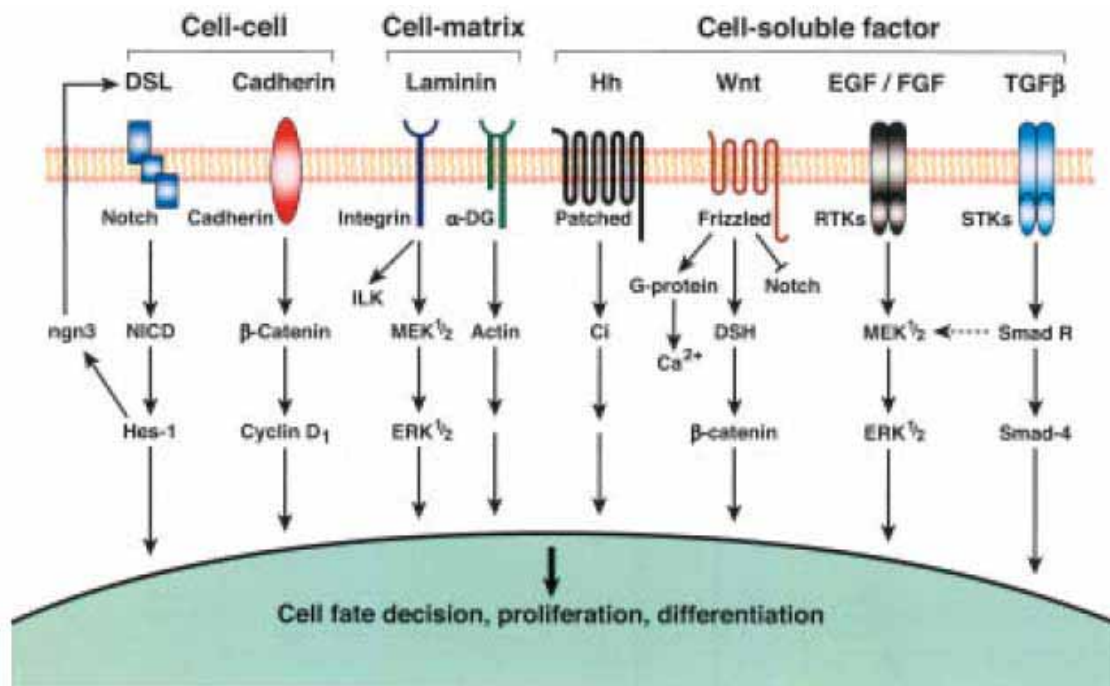


Figura 20.- Representació de les tres principals classes de factors extracel·lulars implicats en desenvolupament pancreàtic: interaccions cèl·lula-cèl·lula, interaccions cèl·lula-matriu, i interaccions cèl·lula-factor soluble. Les abreviacions utilitzades en la figura es troben en el text següent. Extret de (Jiang and Harrison, 2002).

La figura 20 ens mostra algunes de les principals substàncies que poden actuar a cada nivell, que detallarem a continuació:

1.-Mediadors d'unions cèl·lula-cèl·lula

En aquesta categoria tenim els receptors Notch (també descrits en l'apartat 5.4 d'aquesta tesi) i la família de les cadherines.

S'han identificat quatre isoformes dels receptors Notch, que són proteïnes transmembrana que reconeixen els lligands DSL (*Delta/Serrate/Lag2*) de les cèl·lules veïnes. S'ha demostrat que la seva cascada de senyalització via HES-1 controla el manteniment dels precursors pancreàtics i la seva diferenciació endocrina (Jensen et al., 2000).

Les cadherines contenen la superfamília de molècules d'adhesió cel·lular (CAMs). Formen unions homofíliques entre cèl·lules i poden actuar a través de la βcatenina activant gens implicats en proliferació com la ciclina D1. El bloqueig de la molècula CAM epitelial (Ep-CAM) induïx la diferenciació de cèl·lules insulina i glucagó positives en cèl·lules pancreàtiques de fetus humans (Cirulli et al., 1998).

2.-Proteïnes insolubles de la matriu extracel·lular

La matriu extracel·lular està formada per una xarxa de glicoproteïnes que inclouen laminines, fibronectina, col·lagens, proteoglicans i glicosaminoglicans. No és una estructura estàtica sinó que està en constant remodelació, i pot participar en unions entre cèl·lula i matriu per desencadenar cascades de senyalització (Kleinman et al., 2003). En el cas del pàncreas, entre els teixits epitelial i mesenquimal hi trobem una matriu extracel·lular especialitzada i densa anomenada làmina basal, formada

bàsicament per laminines, col·lagen i fibronectina. Hi ha estudis que demostren la importància de laminina-1 en el dia e13.5 per la diferenciació de cèl·lules pancreàtiques en cèl·lules positives per insulina (Jiang et al., 1999). Els principals receptors de laminines que els permetrien exercir els seus efectes sobre el desenvolupament pancreàtic serien les integrines, una família d'almenys 22 membres formada per glicoproteïnes heterodimèriques transmembrana; tot i que també poden unir-se a altres receptors no-integrines com el distroglican (α -DG).

Estudis en ratolí demostren les cèl·lules β no produeixen la seva pròpia matriu extracel·lular sinó que secreten el factor de creixement VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), i la seva matriu prové de les cèl·lules endotelials del voltant que expressen el seu receptor (VEGFR) (Zaret, 2006). Aquest model podria explicar les següents observacions: els illots pancreàtics expressen nivells elevats de VEGF, i la xarxa de capilars que mantenen els illots és 5 vegades més densa que la del teixit exocrí (Nikolova et al., 2006).

3.-Factors solubles

En el camp dels factors solubles podem destacar les molècules de senyalització *hedgehog*, les proteïnes Wnt (*Wingless type*) i diverses famílies de factors de creixement.

La família de proteïnes secretades *hedgehog* conté Shh (*Sonic hedgehog*), Ihh (*Indian hedgehog*) i *Desert hedgehog*. La seva senyalització inhibeix el trencament proteolític del factor de transcripció Ci. Tot i que no s'ha detectat expressió de Shh en el desenvolupament del pàncreas, en el ratolí *knock out* de Shh/-/ augmenta la massa de l'òrgan (Hebrok et al., 2000).

Les glicoproteïnes Wnt són secretades com a factors de creixement, però queden associades als glicosaminoglicans de la matriu extracel·lular i es mantenen unides a la superfície cel·lular. Una de les seves casacades de senyalització pot anar via receptors *Frizzled* i a través de les proteïnes DSH (*Disheveled*) fins arribar a la β catenina. S'han descrit aquests receptors en pàncreas humans (Heller et al., 2003) i la seva implicació en desenvolupament podria anar a través de la inactivació de la via Notch a partir de DSH.

La família de factors de creixement epidèrmics (EGF) conté almenys 10 membres, que inclouen el mateix EGF, *betacellulin* i també TGF- α . Els receptors que els uneixen són del tipus tirosina-quinases (RTK). S'ha descrit que EGF promou la proliferació de l'epiteli pancreàtic en rata que no ha estat en contacte amb el mesènquima (Cras-Meneur et al., 2001). També units a receptors del tipus tirosina-quinases tenim FGF (*fibroblast growth factors*). Concretament s'han identificat FGF1, FGF7 i FGF10 en desenvolupament pancreàtic, i aquests mateixos actuen en la diferenciació de la porció exocrina (Miralles et al., 1999). També s'ha descrit que el dominant negatiu específic per FGF7 provoca aplàsia del pàncreas (Celli et al., 1998). Finalment, un altre tipus de factors de creixement que actuen en el desenvolupament pancreàtic serien els membres de la superfamília de TGF β , que inclouen els TGF β , BMP i activines. El tipus de receptors que els uneixen són del tipus serina/treonina quinases (STK). S'ha descrit TGF β 1 i activin-A en pàncreas en desenvolupament, i el dominant negatiu del receptor II de TGF β augmenta la proliferació i provoca una diferenciació irregular de les cèl·lules acinars pancreàtiques (Bottinger et al., 1997).

A més d'actuar durant el desenvolupament, moltes d'aquests senyals extracel·lulars provinents tant de factors coneguts com de factors desconeguts tenen un paper també en la diferenciació pancreàtica *in vitro*. Un exemple de la importància d'aquestes senyals extracel·lulars serien els estudis realitzats amb medi condicionat

provinent de pàncreas de ratolí a dia embrionari 16.5, que indiquen que aquest seria el responsable de la diferenciació pancreàtica endocrina *in vitro* de ESC. Proposen que els factors solubles dels rudiments pancreàtics podrien estar modulant la diferenciació de les ESC fins a l'endoderm a través de factors inductors com Wnt, activina, FGF2, o FGF4, activant diverses vies de senyalització necessàries per establir la determinació pancreàtica (Vaca et al., 2006).

5.6.- CÈL·LULES PROGENITORES EN EL PÀNCREAS

La falta de marcadors específics de teixit per les cèl·lules troncales fa que sigui molt difícil aïllar aquest tipus cel·lular en els diferents òrgans. En el cas del pàncreas, a més de la importància de la replicació de cèl·lules β preexistents (Dor et al., 2004), s'han descrit diferents tipus de progenitors que podrien contribuir a la generació de noves cèl·lules β . En primer lloc, sembla força acceptat que els possibles progenitors d'illots pancreàtics es localitzarien en els **ductes**, basant-se en les evidències que en l'epiteli ductal és on s'originen els illots durant l'organogènesi pancreàtica (Sander and German, 1997), i en la identificació de cèl·lules β aïllades associades a ductes en pàncreas humans (Bouwens and Pipeleers, 1998).

També hi ha diverses evidències de l'existència de progenitors **intra-illot** com són les observacions fetes en illots de ratolí depleccionats de cèl·lules β , on aquestes cèl·lules poden regenerar-se i secretar insulina en resposta a glucosa (Banerjee and Bhonde, 2003). També s'ha descrit la presència de cèl·lules progenitores positives per *glut2*, i cèl·lules progenitores positives per *PDX1* i somatostatina en un model de regeneració pancreàtica en rosegador (Guz et al., 2001), després d'haver eliminat la possibilitat que la proliferació de cèl·lules positives per insulina hagués regenerat la massa β cel·lular en aquest model experimental. Una altra evidència indirecta de l'existència de progenitors intra-illot seria la presència de cèl·lules *Ngn3(+)* en ratolins tractats amb STZ (Kodama et al., 2005). Tot i que un estudi de *lineage tracing* ha demostrat que tant en el desenvolupament com en l'adult les cèl·lules *Ngn3+* són les progenitores de tots els tipus cel·lulars de l'illot, i que són diferents dels progenitors ductals (Gu et al., 2002); un altre estudi en l'adult descriu que la reactivació de la *Ngn3* no està implicada en la regeneració del pàncreas després d'una pancreatectomia del 50% (Lee et al., 2006).

La implicació de les cèl·lules positives per *nestina* en els progenitors pancreàtics s'ha descrit anteriorment en aquesta tesi (veure apartat 4.3).

També hi ha evidències de la identificació de **precursors multipotents** en el pàncreas adult de ratolins amb el potencial de generar tipus cel·lulars característics de les diferents capes germinals embrionàries, incluint tant el pàncreas endocrí com exocrí, i també neurones i cèl·lules gials (Seaberg et al., 2004). Aquests progenitors multipotents poden provenir tant de cèl·lules ductals com de cèl·lules de l'illot. Un altre treball proposa que les cèl·lules positives per **c-Met** aïllades per citometria de flux tant de pàncreas de ratolins en desenvolupament com adults, tenen la capacitat de diferenciar-se en cèl·lules endocrines i acinars. Aquestes cèl·lules *c-Met(+)* es troben principalment en els ductes, i amb menor proporció en acins (Suzuki et al., 2004).

Hi ha treballs que identifiquen unes "**cèl·lules petites**" en pàncreas humans que podrien contribuir com a progenitors en el creixement de l'illot. Aquestes cèl·lules són positives per *PDX1*, sinaptofisina, insulina, glucagó, somatostatina, PP, i alfa-

fetoproteïna, però són negatives per CK19 i nestina. S'ha demostrat que aquestes cèl·lules tenen capacitat de secretar insulina en resposta a glucosa (Petropavlovskaja and Rosenberg, 2002).

A més de les cèl·lules progenitores residents en el pàncreas, també hi hauria la possibilitat que hi haguessin cèl·lules progenitores d'origen hematopoietic, i que poguessin ser transportades al pàncreas a través de la sang, on es diferenciarien en resposta a senyals activadores (veure **figura 21**). En concret, la població SP detectada recentment en el pàncreas humà podria ser l'encarregada de donar lloc a noves cèl·lules β (Lechner et al., 2002). Segons la hipòtesi proposada pel grup del Dr. Habener (Lechner and Habener, 2003b), les cèl·lules progenitores hematopoietiques circulants anirien als **ductes**, on rebrien senyals per generar nous illots (neogènesi de l'illot), o bé es localitzarien dins dels **illots**, on es convertirien en noves cèl·lules β (neogènesi de la cèl·lula β).

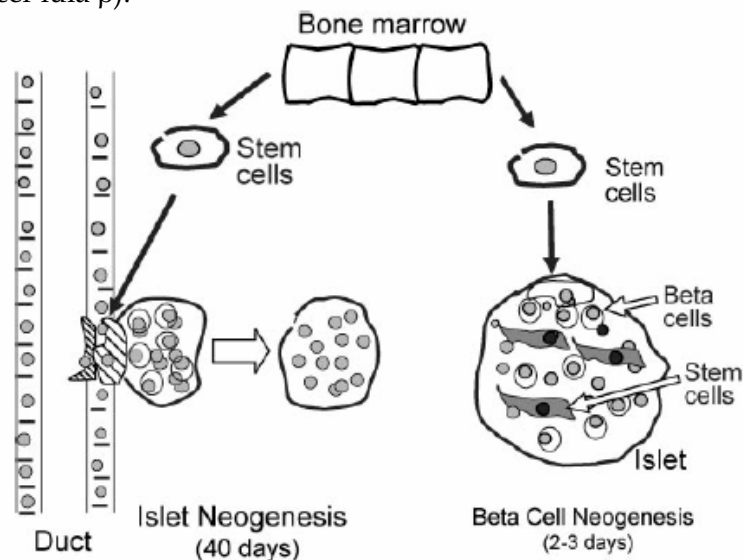


Figura 21.- Diagrama que il·lustra la hipòtesi que les cèl·lules troncales pancreàtiques s'originen, almenys en part, a partir de cèl·lules troncales circulants alliberades per la medul·la òssia (Lechner and Habener, 2003b).

Posteriorment es va proposar que cèl·lules no SP provinents de la medul·la òssia, un cop marcades i trasplantades en ratolins irradiats no diabètics podien produir cèl·lules β pancreàtiques funcionals sense evidències de fusió cel·lular (Janus et al., 2003). Altres autors també han arribat a produir cèl·lules positives per insulina *in vitro* a partir de cèl·lules obtingudes de la medul·la òssia, que trasplantades en ratolins diabètics tenen la capacitat de formar estructures semblants a illot i normalitzar la glicèmia (Oh et al., 2004), (Tang et al., 2004). No obstant, encara és motiu de debat ja que també hi ha estudis que no han pogut diferenciar *in vivo* cèl·lules positives per insulina a partir de cèl·lules de medul·la òssia (Choi et al., 2003), (Lechner et al., 2004), (Taneera et al., 2006). Un altre estudi va demostrar que les cèl·lules de la medul·la òssia injectades en ratolins pre-diabètics no es diferenciaven en cèl·lules productores d'insulina, sino que esdevenien cèl·lules vasculars endotelials (Hess et al., 2003). La millora de la glicèmia observada i l'augment de cèl·lules β en els ratolins tractats podria ser degut als factors solubles secretats per les cèl·lules endotelials, amb efectes sobre els progenitors residents en el pàncreas. Tant si és de manera directa com indirecta, sembla clara la implicació de les cèl·lules provinents de la medul·la òssia en la regeneració pancreàtica (Lechner and Habener, 2003a).

5.7.- PROCESSOS DE TRANSDIFERENCIACIÓ DE CÈL·LULES EXOCRINES CAP A CÈL·LULES PRODUCTORES D'INSULINA

Diversos autors han demostrat la capacitat de transdiferenciació de les cèl·lules **ductals** cap a cèl·lules β mitjançant diferents protocols experimentals en ratolí (Ramiya et al., 2000), (Li et al., 2003), rata (Leng and Lu, 2005) i en humans (Bonner-Weir et al., 2000), (Gao et al., 2003). Diversos estudis de regeneració pancreàtica suggereixen que les pròpies cèl·lules ductals proliferen en el focus de regeneració i posteriorment es desdiferencien per passar a ser una reserva de cèl·lules progenitores amb capacitat de produir noves cèl·lules acinars i de l'illot (Bonner-Weir and Sharma, 2002), (Bonner-Weir et al., 2004). S'ha demostrat que en humans les vies que fan servir les cèl·lules ductals per la seva transdiferenciació passen per un estadi on expressen Ngn3+ i posteriorment arriben a expressar insulina (Heremans et al., 2002); com també s'ha estudiat la regulació de la proliferació d'aquests ductes una vegada transdiferenciats (Rescan et al., 2005). Malgrat aquests estudis, és teòricament possible que la veritable font d'aquests noves cèl·lules β generades fossin en realitat cèl·lules endocrines contaminants adherides als ductes durant el procés de purificació. Per resoldre aquesta qüestió, caldria obtenir preparacions ductals pures i/o dur a terme experiments de seguiment de llinatge.

La capacitat de les cèl·lules no endocrines del pàncreas humà de transdiferenciar-se en cèl·lules endocrines també ha estat demostrada recentment (Hao et al., 2006). La població aïllada, anomenada **NEPECs** (*Non endocrine pancreatic epithelial cells*), es pot transdiferenciar a fenotip de cèl·lula productora d'insulina mitjançant els factors solubles provinents de pàncreas fetal. Aquest estudi no identifica clarament si són les cèl·lules acinars o ductals les que formen la població NEPEC. També s'ha aconseguit diferenciació endocrina a partir de cèl·lules de pàncreas humà epitelials a les quals s'ha induït la reexpressió del factor de transcripció PDX1 (D'Alessandro et al., 2007).

Pel que fa a les cèl·lules **exocrines**, s'ha descrit un model de diferenciació *in vitro* de cèl·lules exocrines de rata fins a cèl·lules productores d'insulina mitjançant el tractament amb dues substàncies diferenciadores: LIF i EGF (Baeyens et al., 2005). Aquesta transdiferenciació utilitza l'expressió transitòria de Ngn3 i HNF6 per arribar a la producció d'insulina (Baeyens et al., 2006). De manera semblant, la combinació de EGF juntament amb nicotinamida pot diferenciar cèl·lules exocrines marcades amb el promotor de l'amilasa cap a cèl·lules productores d'insulina (Minami et al., 2005). Els treballs *in vivo* però són contradictoris; mentre que hi ha evidències indirectes de la transdiferenciació de cèl·lules acinars a cèl·lules β en rates tractades amb dexametasona (Lardon et al., 2004), altres treballs de seguiment del llinatge cel·lular indiquen que les cèl·lules acinars no contribueixen a la formació de noves cèl·lules β en models de regeneració pancreàtica (Desai et al., 2007).

Un fet important és la descripció de fenòmens de **EMET** (Transició Epiteli-Mesènquima-Epiteli) durant la regeneració pancreàtica endocrina. Aquest procés permet que cèl·lules puguin desdiferenciar-se a un estat de "cèl·lula semblant a fibroblast" i posteriorment rediferenciar-se per formar les cèl·lules dels illots pancreàtics. Aquest fenomen s'ha descrit en cèl·lules pancreàtiques adultes en cultiu, concretament en l'epiteli ductal de rata (Bonner-Weir et al., 2004), en cèl·lules humanes procedents d'illots pancreàtics (Gershengorn et al., 2004) i en cultius de teixit

pancreàtic humà no endocrí (Hao et al., 2006). En l'estudi de Gershengorn defensen que les cèl·lules obtingudes d'illots humans adults a través del procés EMET, s'indueixen a diferenciar en cèl·lules productores d'insulina més fàcilment que les altres cèl·lules progenitores, i fins i tot que les cèl·lules que tenen capacitat de transdiferenciar-se (Gershengorn et al., 2005). Recentment s'ha identificat en cèl·lules progenitores endocrines del pàncreas en desenvolupament un factor de transcripció anomenat *Snail*, implicat en el fenomen EMET, que també podria tenir efectes en el procés d'expansió i diferenciació observat en els illots humans adults de l'estudi del Dr Gershengorn (Rukstalis and Habener, 2007). Si es pogués demostrar que aquesta transició EMET existeix *in vivo*, podria suposar la reconciliació de les dues hipòtesis sobre l'origen de les cèl·lules β en el pàncreas adult (neogènesis i replicació). Al contrari del que s'ha descrit en humans, hi ha estudis que utilitzant la metodologia de *lineage tracing* demostren que el fenomen EMET no és necessari per generar noves cèl·lules β productores d'insulina en ratolins (Morton et al., 2007), (Atouf et al., 2007).

6.- CÈL·LULES ESTRELLADES PANCREÀTIQUES

Les cèl·lules estrellades van ser descrites per primera vegada en el fetge per Karl von Kupffer, l'any 1876, mentre investigava la micro-anatomia del sistema nerviós hepàtic. Aquestes cèl·lules anomenades "sternzellen" (cèl·lules estrella) per la seva morfologia característica, van ser classificades dins el sistema reticle-endotelial fagocític. L'any 1951, Ito va descriure en fetges d'humans les mateixes cèl·lules que Kupffer i les va anomenar *Ito-cells* o *fat-storing cells*; i autors com Nakane i Wake van identificar també aquestes cèl·lules *Ito* en altres espècies com el ratolí. Finalment al 1971 es va unificar la nomenclatura i es va establir el terme de **cèl·lules estrellades**: les cèl·lules de Ito eren idèntiques a les cèl·lules estrellades de Wake però el terme *fat storing* no era apropiat ja que no acumulen greix sino vitamina A (Wake, 1971). L'any 1973 ja es van identificar cèl·lules estrellades al fetge gràcies a aquesta propietat, utilitzant la injecció de vitamina A tritiada en ratolins (Hirosawa and Yamada, 1973).

Posteriorment les cèl·lules estrellades s'han identificat en altres òrgans a més de fetge, entre ells el pàncreas, el ronyó i els pulmons (veure **taula 3**) (Geerts, 2001). Actualment es parla d'un "sistema cel·lular estrellat difús" en mamífers, i la semblança d'aquestes cèl·lules mesenquimals d'altres teixits amb les hepàtiques ens permetria extrapolar les dades funcionals obtingudes en fetge als seus equivalents extrahepàtics (Zhao and Burt, 2007).

Organ	Cell Type
Pancreas	Pancreatic stellate cell
Kidney	Interstitial tubular fibroblast
Digestive canal	Intestinal stellate cell
Lung	Contractile interstitial cell
Spleen	Reticular cell
Adrenal	Vitamin A-containing cell
Ductus deferens	Vitamin A-containing cell
Uterus	Vitamin A-containing cell

Taula 3.- Presència de cèl·lules estrellades en teixits extrahepàtics. Extreta de (Geerts, 2001).

Cèl·lules estrellades i pàncreas

En el pàncreas, les cèl·lules estrellades van ser identificades 100 anys després que en el fetge. L'any **1982** es va descriure l'acumulació de vitamina A en el pàncreas de ratolins alimentats amb dieta suplementada amb aquesta vitamina (Watari et al., 1982). En pàncreas normals i fibròtics d'humans i de rata es van descriure també aquestes cèl·lules amb capacitat d'acumular vitamina A l'any **1990** (Ikejiri, 1990). D'altra banda, al **1997** es van descriure en humans *myofibroblast-like cells* com a possibles productores de matriu extracel·lular en fibrosi pancreàtica (Saotome et al., 1997).

No va ser fins al **1998** quan dos articles independents van relacionar que els dos tipus cel·lulars descrits fins alleshores (cèl·lules acumuladores de vitamina A i cèl·lules *myofibroblast-like* productores de matriu) eren en realitat el mateix tipus cel·lular però en diferents estats d'activació (Bachem et al., 1998) (Apte et al., 1998).

6.1.- ORIGEN EMBRIOLÒGIC

L'origen embriològic d'aquestes cèl·lules no està ben establert. Basant-se en l'expressió de proteïnes del citoesquelet com la alfa-actina i desmina característics del múscul llis, i de filaments intermedis de classe III com la vimentina es postula que podrien tenir un origen **mesenquimal** (Geerts, 2004).

No obstant, les cèl·lules estrellades expressen també altres filaments i proteïnes d'origen neural com GFAP, NCAM, nestina, NGF (*Nerve growth factor*), receptors de NGF, i sinaptofisina. A més, la seva forma recorda a les dendrites dels astrocits. Aquestes evidències indicarien un possible origen **neuro-ectodèrmic** (Geerts, 2004).

Altres investigacions suggereixen un origen **hematopoiètic** per les cèl·lules estrellades, identificant la medul·la òssia com a font de precursors d'aquestes cèl·lules (Suskind and Muench, 2004), (Baba et al., 2004), (Ogawa et al., 2006).

6.2.- LOCALITZACIÓ, ACTIVACIÓ I QUIESCÈNCIA

Les cèl·lules pancreàtiques estrellades (PaSCs) són components del pàncreas exocrí i constitueixen aproximadament el 4% del total de cèl·lules pancreàtiques. Estan presents a l'espai periacinar i tenen allargaments citoplasmàtics que encerclen la base dels acinis. També es poden trobar a l'espai perivascular o en regions periductals del pàncreas (veure **figura 22**) (Omary et al., 2007).

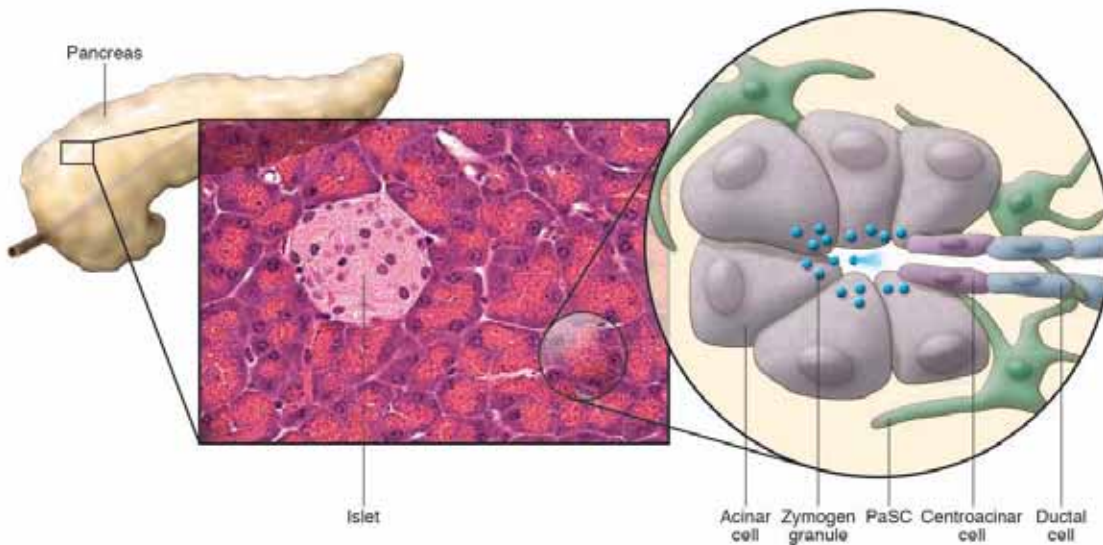


Figura 22.- Localització de les cèl·lules estrellades en el pàncreas. Extret de (Omary et al., 2007)

Les PaSC, com les cèl·lules estrellades hepàtiques (HpSC), es caracteritzen per tenir dos fenotips molt diferenciats: quiescent o actiu (veure **taula 4**). Aquest canvi de fenotip entre l'estat quiescent i actiu passa per un fenotip intermig (cèl·lula transicional) que presenta característiques d'ambdós.

Les característiques cel·lulars dels dos fenotips serien les següents:

Quiescent:

- Les cèl·lules acumulen vitamina A en vacuoles al seu citoplasma.
- Són positives per desmina, vimentina, nestina i GFAP.
- Tenen el nucli i el reticle endoplasmàtic rugós de tamany normal.
- Presenten una capacitat limitada de proliferar, migrar, i produir matriu extracel·lular (ME).

Actiu, amb fenotip "myofibroblast-like":

- Perden gairebé tota la vitamina A acumulada al seu citoplasma.
- Expressen el marcador alfa-actina.
- El nucli i el reticle endoplasmàtic rugós s'hipertrofien.
- Augmenten la seva taxa de proliferació i són capaces de migrar i produir matriu extracel·lular.
- A més, poden secretar múltiples factors solubles al medi (Jaster, 2004).

Gross phenotype	Ultrastructural	Functional
Quiescent	Compact shape Contact with basal membrane Retinoids: + + + + Myofilaments: - - - - Oval nucleus	Nonproliferative Collagen III > IV > I
Transitional cell	Cell spreading Retinoids: + + - - Myofilaments: + + - - Enlarged RER	Proliferative GFs receptors Expression of GF receptors Disruption of basal membrane Collagen I > IV > III
Myofibroblast-like	Spindle-shaped Smooth muscle cell-appearance Retinoids: - - - - Myofilaments: + + + + Indented nucleus	Highly proliferative GF autocrine loops Replacement of basal membrane with collagen I

Taula 4.- Descripció de les característiques de la transició de cèl·lula quiescent a activa “miofibroblast-like”, a nivell ultraestructural i funcional, en HpSC. Els resultats podrien ser extrapolables a les PaSC. GF=*Growth Factor*, RER=Reticle endoplasmàtic rugós. Extret de (Pinzani, 1995)

En condicions normals la cèl·lula estrellada està en quiescència, però davant una injúria del teixit la cèl·lula s’activa i adquireix un fenotip “miofibroblast-like”. *In vitro*, les PaSC es poden activar pel cultiu en plàstic durant 48 hores. Les vies de senyalització que estan directament o indirectament relacionades amb l’activació de les PaSC han estat investigades mitjançant estudis de *microarrays*, donant un total de 325 gens expressats diferencialment entre el fenotip actiu i el quiescent (Glass et al., 2006). Alguns dels mediadors d’activació i inactivació estan representats a la **figura 23**:

Mediadors d’activació: factors paracrins com IL1, IL6, IL8, i TNF α (Mews et al., 2002), factors de creixement com PDGF i TGF β 1 (Madro et al., 2004), angiotensina II, (Hama et al., 2004), etanol i espècies reactives d’oxigen.

Mediadors d’inactivació: no està gaire clara la inactivació de les PaSC però alguns estudis apunten que lligands de PPAR γ podrien inhibir l’acció profibrogènica de les PaSC (Masamune et al., 2002), així com també la suplementació amb vitamina A (McCarroll et al., 2006). Encara no està clar si després de la inactivació funcional, és a dir quan deixen de secretar ME, les PaSC poden tornar a l’estat quiescent o bé són eliminades per apoptosi.

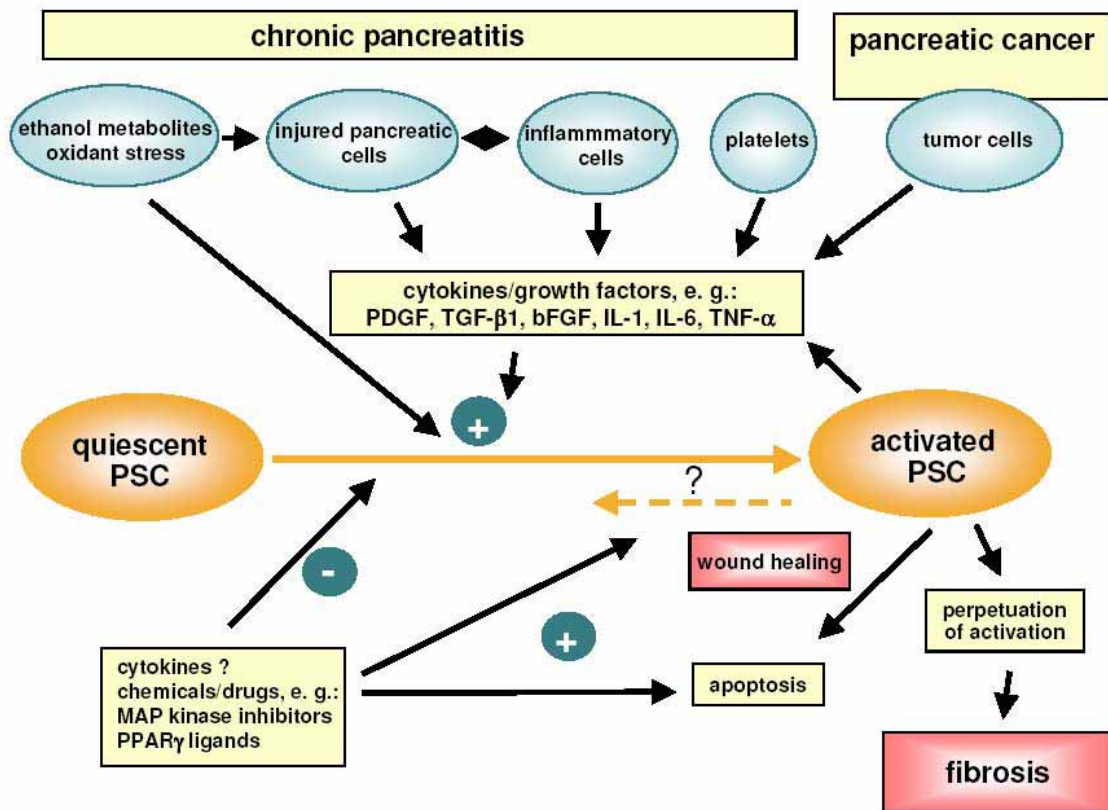


Figura 23.- Mecanismes d'activació de les PaSC en pancreatitis crònica i càncer de pàncreas. Extret de (Jaster, 2004).

6.3.- IMPLICACIÓ DE LES CÈL·LULES ESTRELLADES EN DIFERENTS PROCESSOS FISIOPATOLÒGICS

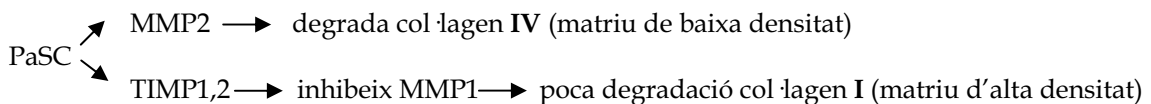
Els principals processos en que estan implicades les PaSC per les característiques que adopten durant el fenotip actiu estan representades a la **figura 24**.

Fibrogènesis

Les PaSCs tenen una participació clau en la patobiologia dels principals desordres del pàncreas exocrí: la pancreatitis crònica i el càncer de pàncreas (veure **figura 23**). En el cas de la pancreatitis, les cèl·lules estrellades s'activen i donen com a resultat una excessiva acumulació de proteïnes de matriu extracel·lular (ME) en el pàncreas, que tindrà importants conseqüències fisiopatològiques tant pel que fa a la funció com a l'estructura de l'òrgan. A més dels canvis quantitius on es veu afectada la producció i acumulació de ME, també es donen canvis qualitius en la composició de la ME.

En el pàncreas, la matriu extracel·lular està formada principalment per col·lagens tipus I, III, IV, V i VII; i per components no col·lagen com glicoproteïnes i proteoglicans sulfats. En el procés de fibrogènesi, la producció de ME augmenta entre 3 i 5 vegades i es produeix un canvi en el tipus de ME que passa de tenir una matriu de baixa densitat formada principalment per col·lagens tipus IV, V i VII a una matriu d'alta densitat formada per col·lagens tipus I i III (Schneider et al., 2001). Aquest canvi qualitatiu es produeix gràcies al canvi en l'activitat de les metal·loproteïnases (MMP).

Durant el procés de fibrogènesi s'observa una disminució de la MMP1 (col·lagenasa tipus I) i un augment en la producció de MMP2, MMP3 i MMP9 (responsables de la degradació de matriu de baixa densitat). Les cèl·lules estrellades són la font principal de MMP2, i l'acumulació de ME d'alta densitat actua com a estímul per la producció de més MMP2 per part de les cèl·lules estrellades (retroalimentació positiva). Alhora, les cèl·lules estrellades augmenten l'expressió d'inhibidors de metal·loproteïnases (TIMP1 i TIMP2), que inhibeixen l'activitat de les metal·loproteïnases intersticials, afavorint així el canvi qualitatiu de la ME (Phillips et al., 2003).



S'ha demostrat la implicació de les PaSC en la pancreatitis crònica, malaltia caracteritzada per una insuficiència progressiva del pàncreas exocrí i endocrí, resultat generalment de l'abús crònic d'alcohol i també d'alteracions genètiques, desordres autoimmunes i malalties obstructives del tracte biliar (Pezzilli, 2007). TGFβ1 està considerada la principal citocina fibrogènica. En animals transgènics que sobreproduïen la forma activa de TGFβ1 es va observar el desenvolupament de lesions fibròtiques en diversos teixits (Sanderson et al., 1995). Tot i que hi ha diverses fonts de secreció de TGFβ1, sembla ser que l'aportació per part de les cèl·lules estrellades és la més important en la fibrosi pancreàtica (Shek et al., 2002), (Ohnishi et al., 2004). D'altra banda, en el càncer de pàncreas les PaSC formen la desmoplàsia fibrosa al voltant del tumor, caracteritzada per una acumulació de teixit connectiu. Mitjançant estudis de medi condicionat de tumors pancreàtics s'ha demostrat que les cèl·lules del carcinoma poden estimular la proliferació les PaSC i participar d'aquesta manera a la producció excessiva de proteïnes de ME (Apte et al., 2004). La desmoplàsia afavoriria el creixement i supervivència del tumor, i en aquest context les MMP secretades per les PaSC podrien promoure la invasió tumoral i les metàstasis (Munshi and Stack, 2006).

Regeneració tissular

Segons un estudi realitzat en humans, l'augment significatiu de PaSC actives en zones regeneratives del pàncreas després d'una pancreatitis aguda comparades amb el teixit normal, suggereix la seva implicació en el procés de regeneració pancreàtica (Zimmermann et al., 2002). A més, la presència de nestina va ser detectada per primera vegada en aquest tipus cel·lular l'any 2002 (Lardon et al., 2002), i posteriorment es va relacionar la implicació de les cèl·lules estrellades positives per nestina en la regeneració tissular de pàncreas de rata en un model de pancreatitis induïda (Ishiwata et al., 2006).

Inflamació

El primer pas que es produeix després d'una lesió tissular és el reclutament de leucòcits amb la finalitat d'eliminar el teixit necròtic i neutralitzar l'agent que està causant la lesió. Un segon pas seria la proliferació i migració de les cèl·lules tipus miofibroblast que secreten proteïnes de ME, i posteriorment en una tercera etapa les proteïnes de ME serien eliminades i les cèl·lules parenquimals es regenerarien. Davant un dany tissular perllongat o crònic, les tres fases podrien succeir simultàniament i de manera descoordinada, donant com a resultat una inflamació crònica i una acumulació permanent de proteïnes de ME.

Introducció

Les molècules d'adhesió que participen en la inflamació són les responsables de la interacció entre les cèl·lules de la sang i les endotelials, entre leucòcits, i entre leucòcits i altres tipus cel·lulars (com per exemple les cèl·lules estrellades). Les principals famílies de molècules d'adhesió cel·lular (CAMs) són tres: la família de les selectines, la família de les integrines i la superfamília de les immunoglobulines. Les interaccions entre aquestes molècules està regulada pel tipus de quimocines secretades (proteïnes amb capacitat d'establir un gradient al voltant del focus inflamatori), i permetran el reclutament de leucòcits.

En fetge s'ha descrit que les cèl·lules estrellades modulen el procés inflamatori amb la producció de mediadors solubles (quimocines, factors de creixement hematopoietic, interleucines, etc.) i l'expressió a la seva superfície de molècules d'adhesió CAMs: I-CAM (CD54), V-CAM (CD106), N-CAM (CD56) (Knittel et al., 1999). La presència de la molècula de membrana CD38 induïx l'expressió d'aquestes molècules d'adhesió en HpSC actives (March et al., 2007). Tant I-CAM com V-CAM s'uneixen a membres de la família de les integrines, mentre que N-CAM es pot unir a altres cèl·lules que expressin N-CAM o heparan sulfat. També s'ha descrit que les cèl·lules hepàtiques estrellades secreten factors com el SCF (*stem cell factor*), que seria un possible mecanisme de reclutament de mastòcits en el procés de fibrosi hepàtica (Gaca et al., 1999; Marra, 1999) (veure **taula 5**)

Inflammatory effect	Regulatory cytokine or cell adhesion molecule
Leukocyte recruitment and activation	Chemokines, e.g. MCP-1; PAF; complement; osteopontin; IL-8
Leukocyte maturation and survival	MCSF, SCF
Leukocyte adhesion	ICAM-1, VCAM-1, NCAM, PAF
Mast cell recruitment and activation	SCF
Acute phase protein synthesis	IL-6
Inhibition of inflammation	IL-10, TGF- β

Abbreviations: ICAM-1; intercellular adhesion molecule 1; IL, interleukin; MCP-1, monocyte chemotactic protein 1; MCSF, macrophage colony-stimulating factor; NCAM, neural cell adhesion molecule; PAF, platelet-activating factor; SCF, stem cell factor; TGF- β , transforming growth factor β ; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1.

Taula 5.- Substàncies secretades per les HpSC amb implicacions en la resposta inflamatòria. Algunes d'aquestes substàncies, com TGF β i IL6, també s'han descrit en PaSC. Extret de "Expertreviews.org"

Tot i que no hi ha estudis exhaustius de les substàncies secretades per les PaSC amb una implicació en el procés d'inflamació, s'ha descrit que les cèl·lules estrellades s'activen per citoquines proinflamatòries (Apte et al., 1999).

Presentació d'antígens

De moment no es coneix la funció que podrien tenir les PaSC en els processos de presentació antigènica. S'ha descrit però que en el cas de les cèl·lules hepàtiques estrellades, quan estan actives, poden expressar molècules de presentació d'antígens (HLA I i HLA II), i tenen capacitat per internalitzar macromolècules i modular la proliferació dels limfòcits T (Vinas et al., 2003). En el cas del pàncreas, també s'ha descrit la seva capacitat fagocítica (Shimizu et al., 2005). Més recentment, s'ha proposat

que les HpSC poden actuar com a presentadores d'antígens en el fetge (Winau et al., 2007), però encara no s'han demostrat resultats semblants en aquest sentit en el pàncreas.

Implicacions descrites en la diabetis

En el cas de la DM encara hi ha pocs estudis que facin referència a possibles efectes de les PaSC en aquesta patologia concreta. Recentment s'han publicat dos treballs que fan referència a aquesta qüestió: el primer proposa que la hiperglicèmia i la hiperinsulinèmia tenen efectes aditius en l'activació de les PaSC, i seria una possible explicació a la fibrosi intra-illot específica detectada en pacients afectats per la DM2 (Hong et al., 2007). En el segon treball proposen que la glucosa alta activa les PaSC, contribuint així a la fibrosi exocrina que acompanya en molts casos a la DM1 (Nomiyama et al., 2007).

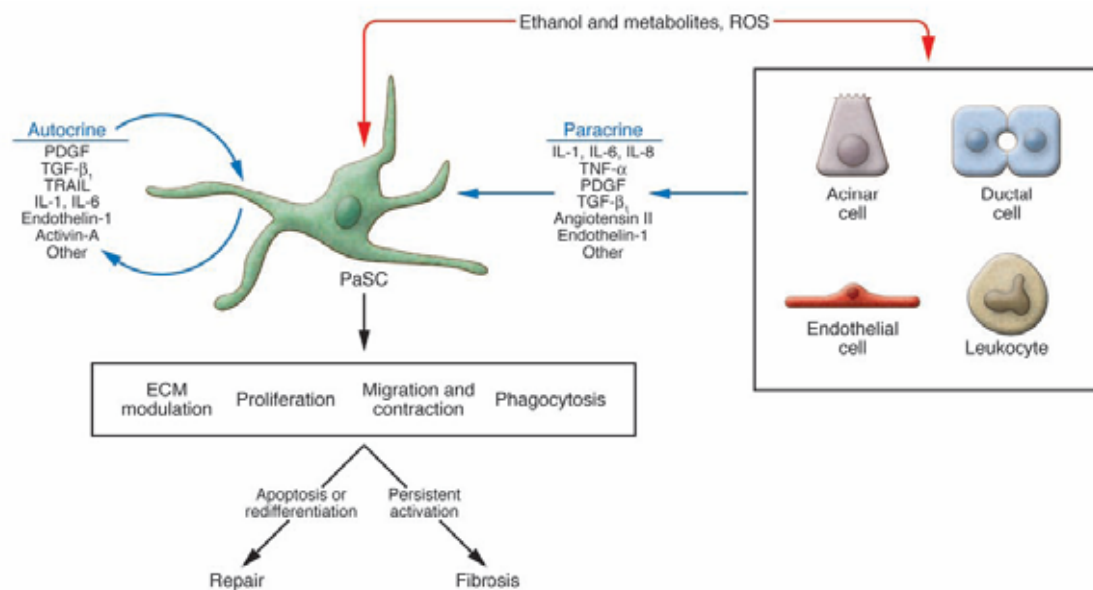


Figura 24.- Resum de les característiques que presenten les PaSC activades per etanol o espècies reactives d'oxigen (ROS), i dels principals processos en que poden estar implicades. Extret de (Omary et al., 2007).

6.4.- SEMBLANCES I DIFERÈNCIES AMB LES CÈL·LULES ESTRELLADES HEPÀTIQUES

A més de l'origen embriològic que sembla comú, hi ha estudis que indiquen que les cèl·lules estrellades pancreàtiques i hepàtiques presenten semblances a nivell transcripcional que els distingeixen clarament dels fibroblasts (Buchholz et al., 2005). D'altra banda però, també s'han identificat alguns gens que s'expressen diferencialment entre PaSC i HpSC, com per exemple alguns gens associats a la producció i remodelació de la matriu extracel·lular, elements del citoesquelet, i factors de transcripció.

Respecte a la localització les cèl·lules estrellades *in vivo* en aquests dos òrgans, se sap que és periacinar en el cas del pàncreas, i entre els hepatòcits i els sinusoids hepàtics en el cas del fetge. A la **figura 25** veiem la seva localització mitjançant tinció immunohistoquímica amb desmina (Apte et al., 1998).

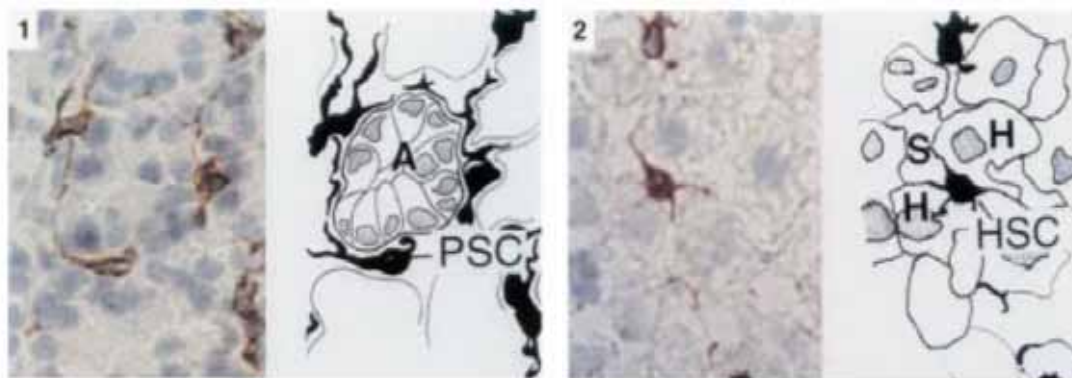


Figura 25.- Localització diferencial en pàncreas i fetge de les PaSC (1) i les HSC (2) respectivament, per tinció amb desmina. Extret de (Apte et al., 1998). (A=acini, H=hepatòcits, S=sinusoid hepàtic)

6.5.- CULTIUS PRIMARIS DESCRITS DE CÈL·LULES ESTRELLADES PANCREÀTIQUES

Des del seu descobriment l'any 1998 s'han intentat establir cultius cel·lulars primaris per poder caracteritzar aquest nou tipus cel·lular i estudiar les possibles funcions en que poden estar implicades. Un dels primers cultius primaris va ser establert a partir de teixit obtingut de rates amb pancreatitis induïda; i aquestes cèl·lules es van mantenir en cultiu durant 20 setmanes (Kruse et al., 2001). Una altra aproximació va ser immortalitzar cèl·lules pancreàtiques estrellades de rata mitjançant la transfecció mediada per retrovirus del gen antigen T SV40. El resultat va ser una línia anomenada **SAM-K**, que es va mantenir en cultiu durant dos anys i ha servit per estudiar els factors que activen i inactiven aquest tipus cel·lular (Satoh et al., 2002). També existeix una altra línia en rata per immortalització espontània que va anomenar **SIPS**, i va utilitzar-se per estudis de proliferació, de tel·lòmers i dels efectes de IL1 β (Masamune et al., 2003).

D'altra banda, una estratègia més acurada per estudiar els dos estats de diferenciació de les PaSC va ser la immortalització per antigen T SV40 però de cèl·lules a 7 i 14 dies de cultiu. La seva posterior caracterització va demostrar que les cèl·lules immortalitzades de 7 dies (**LTC-7**) tenien un fenotip poc activat, mentre que les cèl·lules de 14 dies (**LTC-14**) corresponien a PaSC totalment actives (Sparmann et al., 2004)

Finalment, en humans també s'ha pogut establir una línia immortalitzada de PaSC anomenada **RTL-PSC** (Jesnowski et al., 2005). S'ha demostrat que aquesta línia presenta els dos fenotips, actiu i quiescent, segons les substàncies que s'afegeixen al medi de cultiu, i es proposa com a model per estudiar la fibrosi pancreàtica.

II.- HIPÒTESIS I OBJECTIUS

Actualment, els fàrmacs utilitzats per al tractament de la diabetis *mellitus* no curen la malaltia sinó que la cronifiquen; i en la majoria dels casos, no poden evitar l'aparició de les complicacions secundàries associades a la mateixa. Això comporta la necessitat d'identificar noves alternatives terapèutiques gèniques i/o cel·lulars, com per exemple l'obtenció i posterior empelt de **cèl·lules productores d'insulina** a partir de cèl·lules pluripotents.

En el pàncreas, hi ha controvèrsia sobre l'origen i localització de les cèl·lules troncales degut a l'absència de marcadors troncales específics. No obstant, s'han descrit processos de **transdiferenciació** d'alguns tipus cel·lulars pancreàtics involucrats en la regeneració pancreàtica endocrina. Aquests processos de transdiferenciació depenen de senyals cel·lulars internes i de senyals externes (**factors solubles**) presents en el nínxol cel·lular pancreàtic.

En els últims anys, l'expressió del transportador de resistència a multidrogues **ABCG2** descrit en cèl·lules troncales hematopoiètiques amb fenotip *Side Population* (SP), s'ha proposat com un nou marcador de cèl·lules pluripotentials en teixits de llinatge no hematopoiètic.

El treball d'aquesta tesi es basa en la següent **hipòtesi**:

Desconeixem si a més de la població minoritària SP-ABCG2(+) descrita en el pàncreas, podrien haver-hi altres tipus cel·lulars pancreàtics que expressessin el transportador ABCG2. Aquestes cèl·lules podrien representar una població cel·lular troncal pancreàtica amb implicacions en el complex procés de transdiferenciació endocrina.

OBJECTIU GENERAL

L'objectiu general d'aquesta tesi és identificar poblacions cel·lulars ABCG2 (+) en el teixit pancreàtic, així com estudiar la seva plasticitat i els efectes del seu secretoma.

Els objectius concrets a investigar seran:

Objectiu I

- 1.- Obtenir cèl·lules ABCG2 (+) a partir de teixit pancreàtic de rata, i dur a terme la seva caracterització.
- 2.- Investigar la capacitat de transdiferenciació de les cèl·lules ABCG2 (+) cap a un fenotip de cèl·lula productora d'insulina.

Objectiu II

- 1.- Estudiar els possibles efectes paracrins del medi provinent de la població cel·lular aïllada ABCG2(+) sobre la població ductal pancreàtica.
- 2.- Analitzar el secretoma de la població cel·lular ABCG2 (+) aïllada.

III.- MATERIAL I MÈTODES

1.- CULTIUS CEL·LULARS

1.1.- CULTIUS PRIMARIS

OBTENCIÓ DEL CULTIU PRIMARI ABCG2 (+)

Model animal

Rata *Wistar* mascle lactant (una setmana)

Reactius

Solució salina de Hanks (HBSS)

Col·lagenasa P (Roche Diagnostics) 1 mg/mL en HBSS

BSA (Gibco BRL) 1 mg/mL en HBSS

Mitoxantrone 8 µM (SIGMA)

DMEM-F12 (25 mM de glucosa) + 10% FCS + 100 U/mL penicil·lina-estreptomicina

Equipament i material

Material quirúrgic autoclavat (tisores i pinces de dissecció)

Agulla de 14G

Bany a 37°C amb agitació mecànica

Centrífuga refrigerada

Campana d'esterilitat amb flux laminar

Protocol

- S'extreuen els pàncreas de 5 rates *Wistar* lactants en condicions netes, i es mantenen en solució freda de col·lagenasa (1 mg/mL) fins al moment de la digestió.
- Es digereixen amb col·lagenasa durant 20 minuts aproximadament a 37°C, amb agitació mecànica suau, fins obtenir una disgregació homogènia del teixit.
- La reacció enzimàtica s'atura afegint HBSS/BSA en fred.
- Es deixa sedimentar l'homogenat durant 5 minuts a 4°C.
- S'aspira el sobrenedant i es repeteix el pas anterior una vegada.
- Els pàncreas digerits es passen per una agulla de 14G per completar la disgregació i la mostra es transfereixen a un tub de 50 mL a través d'un colador per eliminar els fragments de teixit no digerits i els nòduls limfàtics.
- S'afegeix HBSS/BSA fred i es centrifuga a 4°C i 1000 rpm durant 5 minuts.
- Es decanta el sobrenedant, deixant el sediment sec.
- Es ressuspèn el sediment amb medi DMEM-F12 (25 mM de glucosa) amb 10% FCS i 100 U/mL de penicil·lina-estreptomicina suplementat amb Mitoxantrone 8 µM.

EXPANSIÓ I MANTENIMENT DEL CULTIU

Reactius

DMEM-F12 (25 mM de glucosa) + 10% FCS + 100 U/mL penicil·lina-estreptomicina + mitoxantrone (8µM)

DMEM-F12 (8 mM glucosa) + 10% FCS + 100 U/mL penicil·lina-estreptomicina

Tripsina/EDTA (GIBCO)

PBS

DMSO (SIGMA)

Equipament i material

Campana de flux laminar

Material i mètodes

Material estèril

Criotubs

Flascons

Centrífuga

Protocol

- El cultiu primari es manté amb medi suplementat amb Mitoxantrone 8 μM a l'incubador, amb canvis de medi cada 2 dies. Es realitzen observacions microscòpiques periòdiques fins a observar-se la formació de la monocapa, moment en que es retira el fàrmac. Aquest període de selecció va durar dues setmanes.
- Les cèl·lules seleccionades amb el Mitoxantrone passen a cultivar-se en medi DMEM-F12 (8 mM glucosa) amb 10% FCS i 100 U/mL de penicil·lina-estreptomicina, a 37°C, en una atmosfera humida contenint el 5% de diòxid de carboni i 95% d'oxigen.

Tripsinització cel·lular

Quan les cèl·lules es troben a un 80% de confluència cal tripsinitzar-les per expandir els cultius.

Protocol

- Es treu el medi de cultiu i es renten les cèl·lules amb PBS estèril.
- S'afegeix tripsina/EDTA i es manté el flascó a l'incubador, controlant les cèl·lules amb el microscopi.
- S'atura la reacció amb PBS i es centrifuga la mostra.
- Per valorar la viabilitat es fa una tinció amb blau tripà d'una alíquota.
- Es realitza el comptatge d'una alíquota cel·lular amb càmera de *Neubauer*.
- Una part dels cultius es criopreserva i la resta s'expandeix en diferents flascons.

Criopreservació

Es criopreserven les cèl·lules en alíquotes de 1×10^6 cèl·lules per criotub utilitzant com a medi FCS + 10% DMSO. Els criotubs s'envolten en cotó i es congelen a -80°C O/N. Posteriorment són emmagatzemades en un tanc de nitrogen líquid.

OBTENCIÓ DEL MEDI CONDICIONAT

Les cèl·lules del cultiu primari es mantenen en DMEM-F12 (8 mM glucosa) amb 10% FCS i 100 U/mL de penicil·lina-estreptomicina. El medi que ha estat en contacte amb les cèl·lules s'anomena **condicionat**. Es centrifuga a 2000 g durant 10 minuts per eliminar restes cel·lulars, i es traspassa a un tub nou. Pot ser utilitzat en fresc o emmagatzemat a -80°C . Pels estudis de proteòmica, es fan tres rentats de les cèl·lules amb PBS i posteriorment es mantenen sense FCS durant 24 hores i el medi recollit s'anomena **condicionat SFM**.

MEDIS DE DIFERENCIACIÓ

Medis suplementats:

Medi basal + Nicotinamida (10 mM) (SIGMA)

Medi basal + Dexametasona (10^{-7} M) (SIGMA)

Medi basal + Exendin 4 (0.1 nM) (Bachem)

Medi basal + Activin A (2 nM) (R&D Systems)

Cocktails de diferenciació:

Medi 1: DMEM (24 mM glucosa) suplementat amb 10 ng/mL HGF (R&D Systems), 0.5 pmol/L *betacellulin* (R&D Systems), 10 mM nicotinamida. *Cocktail* de substàncies basat en (Huang and Tang, 2003).

Medi 2: Les cèl·lules es cultiven sobre matriu extracel·lular Matrigel (Becton Dickinson), una preparació de membrana basal provinent de cèl·lules tumorals. La Matrigel deixa descongelar O/N en gel a la cambra freda, i l'endemà es col·loca dins els pous de la placa. Si cal, es prepara una dilució de la Matrigel amb el medi de cultiu basal sense FCS. Es deixa gelificar durant una hora a 37°C i les cèl·lules ja es poden plaquejar.

Basement Membrane Matrigel Component	Percent in BD Matrigel™ Matrix
Laminin	56%
Collagen IV	31%
Entactin	8%

Growth Factor	Range of GF Concentration in BD Matrigel Matrix	Average GF Concentration in BD Matrigel Matrix
EGF	0.5-1.3 ng/ml	0.7 ng/ml
bFGF	< 0.1-0.2 pg/ml	n.a.*
NGF	< 0.2 ng/ml	n.a.*
PDGF	5-48 pg/ml	12 pg/ml
IGF-1	11-24 ng/ml	16 ng/ml
TGF-β	1.7-4.7 ng/ml	2.3 ng/ml

n.a. not applicable*

Vam testar diferents suplementes del medi, i també es van fer variacions en la duració del cultiu:

M1: dilució Matrigel (1:3), medi DMEM/F12 (8mM glucosa) suplementat amb 15%FCS+ITS+nicotinamida (10mM)+FGF7 (10ng/mL), 21 dies de cultiu

M2: dilució Matrigel (1:10), medi DMEM/F12 (8mM glucosa) suplementat amb 3% FCS+ITS+nicotinamida (10mM)+FGF7 (10ng/mL), 21 dies de cultiu

M3: Matrigel no diluïda, medi DMEM/F12 (8mM glucosa) suplementat amb ITS però sense FCS, 28 dies de cultiu

M4: dilució Matrigel (1:3), medi DMEM/F12 (8mM glucosa) suplementat amb 15 % FCS+ITS+exendin-4 (0.1 nM), 21 dies de cultiu

AÏLLAMENT D'ESTRUCTURES

Equipament i material

Plaques de Petri

Microscopi òptic invertit

Campana de flux laminar

Pipeta automàtica

Protocol

- Es cultiven les cèl·lules en placa de Petri de 10 cm fins que formen estructures tridimensionals (*clusters* cel·lulars).
- L'aïllament es realitza utilitzant un microscopi invertit i pipeta automàtica, en condicions d'esterilitat dins la campana de flux.
- Els *clusters* cel·lulars són recollits en tubs *ependorf* i es mantenen amb medi de cultiu fins a la realització dels diferents estudis.

RECUPERACIÓ D'ESTRUCTURES DESPRÉS DEL CULTIU EN MATRIGEL

Reactius

Cell Recovery (Becton Dickinson)

PBS

Equipament i material

Plaques de 12 pous

Scrappers

Protocol

- Es fan 3 rentats PBS amb (1mL/pou).
- S'afegeix la solució *cell recovery* (500 µL/pou).
- Les cèl·lules són recollides amb *scraper* en un tub de 15 mL a 4°C.
- Es repeteix 2 vegades el rentat amb solució *cell recovery* (500 µL/pou) i el contingut es transfereix al mateix tub de 15 mL.
- La mostra es manté en gel durant aproximadament 1 hora, barrejant per inversió cada 5 minuts fins a la dissolució completa de la Matrigel.
- Les cèl·lules es recullen amb una centrifugació a 300 g durant 5 minuts a 4°C.
- Es fan dos rentats del sediment amb PBS a 4°C.
- Amb el sediment obtingut podem procedir a l'extracció de RNA, proteïnes, o bé a la disgregació del *cluster* i subcultius cel·lulars.

DISGREGACIÓ D'ESTRUCTURES

Reactius

Tripsina diluïda 1:3 amb HBSS

Equipament i material

Incubador de cultius

Protocol

- Els *clusters* cel·lulars es digereixen amb tripsina-EDTA diluïda amb HBSS (1:3) a 37°C durant aproximadament 5 minuts, amb agitació manual.
- S'incuben 3 minuts en gel.
- Es recull el sobrenedant i es manté amb medi de cultiu.
- Es repeteix el procés anterior fins que el *cluster* està totalment disgregat.
- Si cal, es procedeix a la disgregació mecànica de les estructures que queden.

- Es realitza una centrifugació de l'homogenat i es descarta el sobrenedant.
- Es valora la viabilitat de les cèl·lules aïllades amb blau tripà. Es fa un recompte cel·lular per la seva posterior utilització en les diferents determinacions (RNA, proteïnes, immunocitoquímica).

CITOSPIN

Reactius

Tripsina

PBS

Equipament i material

Porta-objectes

Col·lector de la mostra

Citocentrífuga

Protocol

- Es tripsinitzen els cultius cel·lulars i es fa el comptatge.
- Es dipositen $5 \cdot 10^5$ cèl·lules en el col·lector de la mostra.
- Es centrifuguen a 800 rpm 8 minuts en una citocentrífuga.
- Es fixa a l'aire durant 5 min
- La post-fixació es fa amb metanol fred durant 5 minuts.
- Es pot procedir a la tinció immunocitoquímica.

1.2.- LÍNIA CEL·LULAR ARIP

La línia cel·lular utilitzada en aquesta tesi s'anomena **ARIP**, i ha estat obtinguda de l'ATCC "*American Type Culture Collection*" (codi CRL-1674). Provenen de cultius primaris de tumors exocrins de rata. Tenen un aspecte poc refringent, creixen en monocapa, secreten poca quantitat d'enzims exocrins i no produeixen tumors en ratolins atímics.

Tots els experiments d'aquest treball amb les cèl·lules ARIP han estat realitzats entre els passatges 25 i 35.

Medi de cultiu de la línia ARIP: DMEM 4.5 g/L glucosa, glutamina, NEA (non-essential aminoacids), 100 U/ml penicil·lina-estreptomicina i 10% FCS.

El manteniment i criopreservació dels cultius es fa seguint el mateix protocol que pel cultiu primari.

2.- ASSAJOS FUNCIONALS

2.1.- EXTRUSIÓ DEL MITOXANTRONE

CITOMETRIA DE FLUX

Reactius

Mitoxantrone 8 μ M

Verapamil 50 μ M (SIGMA)

Iodur de propidi 1 μ g/mL (SIGMA)

Tripsina/EDTA

Equipament i material

Citòmetre de flux (Becton Dickinson)

Protocol

- Es plaquegen $1 \cdot 10^5$ cèl·lules/pou en una placa de 12 pous.
- El substrat fluorescent (Mitoxantrone $8 \mu\text{M}$) s'afegeix a les 24 hores de cultiu, durant 1 hora a 37°C , en presència o absència de l'inhibidor dels transportadors de multidrogues (verapamil) en pous separats, a una concentració final de $50 \mu\text{M}$.
- Es renten les cèl·lules amb PBS i es ressuspenen en medi de cultiu sense substrat fluorescent, però mantenint l'inhibidor per avaluar els seus efectes en la retenció del substrat.
- Les cèl·lules mortes s'exclueixen amb tinció simultània de iodur de propidi ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$).
- Les cèl·lules es tripsinitzen amb tripsina/EDTA, i es renten dues vegades amb PBS.
- Es procedeix als anàlisis citomètrics.

El protocol es basa en (Garcia-Escarp et al., 2004).

IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Reactius

Mitoxantrone $8 \mu\text{M}$

Verapamil $50 \mu\text{M}$ (SIGMA)

Equipament i material

Cubreobjectes rodons

Placa 24 pous

Microscopi Leica TCS NT

Protocol

- Es plaquegen $3 \cdot 10^5$ cèl·lules/pou en plaques de 24 pous amb un cubreobjectes rodó a dins.
- Es tracten les cèl·lules a les 24 hores de cultiu en presència o absència de l'inhibidor del transportador (verapamil), a una concentració final de $50 \mu\text{M}$, durant 1 hora a 37°C .
- S'afegeix el substrat fluorescent (Mitoxantrone $8 \mu\text{M}$) al medi de cultiu i es recull la mostra en els temps indicats: 2 minuts, 5 minuts i 10 minuts.
- Després de l'incubació es renten les cèl·lules amb PBS i es procedeix a l'observació per microscopia de fluorescència.

El protocol es basa en (Miyake et al., 1999).

2.2.- ASSAJOS DE PROLIFERACIÓ

TIMIDINA TRITIADA

Reactius

Hidroxiurea 12.5 mM

Timidina tritiada $10 \mu\text{Ci}/\text{mL}$

Líquid de centelleig

Aigua bidestil·lada

Tricloroacètic al 5%

Glass microfibre filters (Whatman)

Equipament i material

Scrappers

Centrífuga refrigerada

Sampling Manifold (Millipore)

Comptador de centelleig

Protocol per cèl·lules en monocapa

- Es plaquegen cèl·lules en plaques de 6 pous, amb una densitat de $1 \cdot 10^6$ cèl·lules/pou en DMEM-F12 (11.1 mM glucosa).
- Quan arriben a la confluència del 80% les cèl·lules es sincronitzen durant 24 hores amb hidroxiquina 12.5 mM.
- Es renten les cèl·lules amb PBS 5 vegades.
- Es cultiven en DMEM-F12 (11.1 mM glucosa) durant 3 hores.
- S'afegeix timidina tritiada (^3H -timidina 10 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) durant una hora adicional.
- Es fa un rentat amb PBS.
- S'afegeixen 100 μL de PBS, i es recullen les cèl·lules mitjançant un *scraper*.
- Es divideix la mostra en dos tubs *ependorf* separats (amb una part de la mostra extreurem i quantificarem la proteïna i amb l'altra mesurarem la proliferació cel·lular).
- Es fa una centrifugació de 5 minuts a 1500 rpm i el sediment es ressuspèn en 150 μL d'aigua bidestil·lada. També es pot congelar el sediment sec a -80°C .
- Soniquem la mostra 5 vegades durant 10 segons a 10 watts de potència.
- Dividim la mostra en triplicats de 50 $\mu\text{L}/\text{tub}$.
- Afegim 500 $\mu\text{L}/\text{tub}$ de tricloracètic fred al 5%.
- Es filtra la mostra a través d'una bomba de buit. El diàmetre és de 25 mm, i les cèl·lules queden retingudes en el filtre.
- Es renten els filtres 3 vegades amb aigua destil·lada, es recull el rentat i es diposita en un vial amb 10 mL de líquid de centelleig.
- Per determinar la proliferació, es compten els nivells de ^3H retingut en el filtre amb un comptador de radiació β , com indicador directe de la ^3H -Timidina incorporada. Obtindrem el resultat en cpm/vial.

Protocol per clusters cel·lulars

- Els *clusters* cel·lulars ($n=50$) s'aïllen i es cultiven O/N en plaques de petri no adherents en DMEM-F12 (11.1 mM glucosa).
- S'afegeix hidroxiquina 12.5 mM durant 24 hores.
- Es recullen els *clusters* cel·lulars amb una pipeta i es passen a un tub eppendorff.
- S'afegeixen 500 μL de PBS, es centrifuguen a 800 rpm durant 5 minuts, i es decanta el sobrenedant.
- Es repeteix el pas anterior (rentat) 4 vegades.
- Es dipositen els *clusters* cel·lulars en una placa de petri no adherent i es cultiven amb DMEM-F12 (11.1 mM glucosa) durant 3 hores.
- S'afegeix timidina tritiada (^3H -timidina 10 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) durant una hora adicional.

Material i mètodes

- Es passen els *clusters* cel·lulars a un tub *ependorf* amb PBS en 1%FCS i es compten.
- Es renten amb PBS i es preparen dues al·iquotes amb un nombre determinat de *clusters* (amb una part de la mostra extraurem i quantificarem la proteïna i amb l'altra mesurarem la proliferació cel·lular). Es poden congelar a -80°C .
- Ressuspenem la mostra amb 150 μL d'aigua bidestil·lada.
- Soniquem la mostra 5 vegades durant 10 segons a 10 watts de potència.
- Dividim la mostra en triplicats de 50 μL .
- Afegim 500 μL de tricloracètic fred al 5%.
- El contingut de cada tub *ependorf* es filtra a través d'una bomba de buit, fent passar la mostra a través d'un filtre de 25 mm de diàmetre de forma que les cèl·lules quedin retingudes en el filtre.
- Es renten els filtres 3 vegades amb aigua destil·lada, que es recull i es diposita en un vial amb 10 mL de líquid de centelleig
- Per determinar la proliferació, es compten els nivells de ^3H retingut en el filtre amb un comptador de radiació β , com indicador directe de la ^3H -Timidina incorporada. Obtindrem el resultat en cpm/vial.

BrdU

Reactius

Kit Cell Proliferation ELISA BrdU colorimetric (Roche)

IgG (SIGMA)

TGF β 1 humà recombinant (R&D Systems)

Pan TGF β (R&D Systems)

Medi **control** (propi de la línia ARIP: DMEM 4.5 g/L glucosa, NEA *non-essential aminoacids*, 100 U/ml penicil·lina-estreptomicina i 10% FCS)

Medi **basal** (propi del cultiu primari sense estar condicionat: DMEM-F12, 8 mM glucosa, amb 10% FCS i 100 U/mL de penicil·lina-estreptomicina)

Medi **condicionat** (provinent del cultiu primari: DMEM-F12, 8 mM glucosa, amb 10% FCS i 100 U/mL de penicil·lina-estreptomicina)

Equipament i material

Espectrofotòmetre

Protocol

- Es plaquegen les cèl·lules en una placa de 96 pous a una densitat de 50.000 cel·lules/pou, i es deixen a l'incubador 24 hores.
- Quan els cultius estan a una confluència del 80%, s'incuben les cèl·lules O/N en DMEM sense FCS per sincronitzar el seu cicle cel·lular.
- Afegim els medis que volem testar: **control** (propi de la línia ARIP), **basal** (propi del cultiu primari sense estar condicionat) i **condicionat** (provinent del cultiu primari) amb el 15% de FCS durant 24 hores, i durant les últimes 4 hores en presència de 10 μM BrdU. En algunes condicions, s'afegeix TGF β 1 recombinant 10 ng/mL, Pan-TGF β 20 μg /mL, o bé IgG 20 μg /mL.
- Les cèl·lules es fixen i desnaturalitzen seguint les instruccions del fabricant (30 minuts a T/A).
- S'incuben amb l'anticòs anti-BrdU conjugat amb HRP durant 90 minuts.
- Es fan 3 rentats amb PBS.
- Les cèl·lules s'incuben amb el substat de HRP durant un mínim de 5 minuts.

- La reacció s'atura afegint 25 µL de H₂SO₄ 1 M.
- Lectura espectrofotomètrica a una absorbància de 450 nm.

2.3.- ASSAIG DE VIABILITAT

MTT

Reactius

MTT (solució *stock* 5mg/mL en aigua)

Isopropanol + 0.04 N HCl

IgG (SIGMA)

TGFβ1 humà recombinant (R&D Systems)

Pan TGFβ (R&D Systems)

Medi **control** (propi de la línia ARIP: DMEM 4.5 g/L glucosa, NEA *non-essential aminoacids*, 100 U/ml penicil·lina-estreptomina i 10% FCS)

Medi **basal** (propi del cultiu primari sense estar condicionat: DMEM-F12, 8 mM glucosa, amb 10% FCS i 100 U/mL de penicil·lina-estreptomina)

Medi **condicionat** (provinent del cultiu primari: DMEM-F12, 8 mM glucosa, amb 10% FCS i 100 U/mL de penicil·lina-estreptomina)

Equipament i material

Espectrofotòmetre

Protocol

- Es plaquegen cèl·lules en una placa de 96 pous a una densitat de 50.000 cèl·lules/pou, i es deixen a l'incubador 24 hores.
- Quan els cultius estan a una confluència del 80%, s'incuben les cèl·lules O/N en DMEM sense FCS per sincronitzar el seu cicle cel·lular.
- Les cèl·lules es tornen a cultivar amb els medis que volem testar (control i condicionat) ja amb el 15% de FCS durant 24 hores, i durant les últimes 2 hores en presència de 0.5mg/mL de MTT (115 µL/pou). En algunes condicions, s'afegeix TGFβ1 recombinant 10 ng/mL, Pan-TGFβ 20 µg/mL, o bé IgG 20 µg/mL.
- Afegim 115 µL d'isopropanol+0.04 N HCl i pipetegem per dissoldre els cristalls que es formen.
- Llegim la placa a 575 nm i 650 nm. El percentatge de viabilitat serà:
(OD 575-OD 650) tractades
(OD 575-OD 650) control

2.4.- ELISA IMMUNOASSAIG DE TGFβ1

Reactius

TGFβ1 humà recombinant (R&D Systems)

Anticòs de captura: Anti-TGFβ1,β2,β3 monoclonal (R&D Systems)

Anticòs de detecció: Anti-TGFβ1 biotinitat (R&D Systems)

Solució de bloqueig: PBS amb 5% Tween-20 i 5% sacarosa

Tampó de rentat: PBS pH 7.4 amb 0.05% Tween-20

Tampó de dilució: TBS pH 7.3 amb 0.05% Tween-20 i 1.4% de Diluent DuoSet diluent Concentrate (R&D Systems)

Streptavidina HRP

Solució substrat: barreja 1:1 de Color Reagent A (H₂O₂) i Color Reagent B (Tetramethylbenzidine)

Solució stop: H₂SO₄ 1 M

Equipament i material

Placa d'ELISA

Cambrà humida

Espectrofotòmetre

Protocol

- Es dilueix l'anticòs de captura a 2 µg/mL en PBS i es transfereixen 100 µL/pou en una placa d'ELISA.
- Es posa la placa en una cambrà humida i es deixa incubar O/N a T/A.
- S'aspira en contingut de cada pou i es fan 3 rentats amb 400 µL/pou del tampó de rentat. Després de l'últim rentat cal assegurar-se bé que el pou queda ben sec, invertint la placa sobre paper absorbent.
- S'afegeixen 300 µL de solució de bloqueig a cada pou, i s'incuba a T/A almenys una hora.
- Es repeteixen els rentats amb 400 µL/pou de tampó.
- S'afegeixen 100 µL de la mostra a cada pou, i la recta estàndard de TGFβ1 diluïda amb el tampó de dilució.
- Es barreja per agitació horitzontal durant un minut i s'incuba la placa durant 2 hores a T/A.
- Es repeteixen els rentats amb 400 µL/pou de tampó.
- S'afegeixen 100µL/pou de l'anticòs de detecció diluïts a 400 ng/mL en tampó de dilució i s'incuba la placa 2 hores a T/A.
- Es repeteixen els rentats amb 400 µL/pou de tampó.
- S'afegeixen 100 µL d'estreptavidina HRP i s'incuba la placa 20 minuts a temperatura ambient.
- Es repeteixen els rentats amb 400 µL/pou de tampó.
- S'afegeixen 100 µL/pou de solució substrat i s'incuba la placa 20-30 minuts a T/A. És important protegir la placa de la llum en aquest pas.
- S'afegeixen 50 µL de la solució *stop* a cada pou, i es barreja per agitació horitzontal durant un minut.
- La reacció colorimètrica té lloc entre els següents 5-30 minuts.
- Es llegeix la placa amb l'espectrofotòmetre a 450 nm.

2.5.- EXTRACCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNA

Reactius

Tampó de llisi: Tris 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, Tritó 1%, fosfat de sodi 10 mM, fluorur sòdic 10 mM, ortovanadat sòdic 100 mM, cocktail d'inhibidors de proteases 10x (SIGMA)

Nitrogen líquid

Kit de quantificació de proteïnes DC (BioRad) basat en el mètode de *Lowry*

Equipament i material

Placa de 96 pous

Bany de 37°C

Centrífuga refrigerada

Espectrofotòmetre

Protocol per cèl·lules en monocapa i clusters

- Es ressuspèn el sediment sec amb 100 µL de tampó de lisi.
- Es fan 3 cicles de nitrogen líquid a 37°C.
- Es deixa la mostra durant 30 minuts a 4°C.
- Es fa una centrifugació durant 20 minuts a 14000 rpm a 4°C.
- Recuperem el sobrenedant i es quantifica la proteïna obtinguda mitjançant el protocol DC de BioRad:
 - 20 µL de mostra per pou en una placa de 96 pous.
 - 10 µL del reactiu A' (dilució 1:50 dels reactius S:A).
 - 80 µL del reactiu B.
- Es deixa la placa protegida de la llum durant 15 minuts i es procedeix a la lectura de la placa a 750 nm.

2.6.- SECRECIÓ ESTÀTICA D'INSULINA

Reactius

Tampó Krebs Ringer: 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.1 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃ i 0.1% BSA

Glucosa

Solució àcid-alcohol (HCl 10mM 0,15%, etanol 75%)

Tripsina/EDTA o bé *Cell Recovery* (Becton Dickinson)

Equipament i material

Kit ELISA insulina (Mercodia)

Incubador de cultius

Sonicador

Protocol

- Les cèl·lules es plaquegen en plaques de 12 pous amb una densitat de $1 \cdot 10^6$ cèl·lules/pou o bé 100 *clusters* cel·lulars.
- Es pre-incuba el cultiu una hora a 37°C en tampó Krebs-Ringer.
- S'incuba 60 minuts a 37°C amb el mateix tampó suplementat amb glucosa a diferents concentracions: basal 2mM i alta 20mM.
- Es recull el tampó Krebs Ringer després de l'estimulació, es centrifuga a 700 g durant 5 minuts i es guarda el sobrenedant a -80°C fins que es realitza l'ELISA d'insulina.
- Es tripsinitzen les cèl·lules dels pous o bé s'extreuen els *clusters* de la Matrigel amb la solució *Cell Recovery*
- Es fa un rentat amb PBS i es centrifuguen a 700 g durant 5 minuts.
- Es ressuspèn el *sediment* amb 200 µL de solució àcid-alcohol diluïda i es deixa O/N a 4°C.
- Es sonica 10 segons a 10 watts, es centrifuga 15 minuts a 3500 rpm i es guarda el sobrenedant a -80°C.

2.7.- ENDOCITOSI DE DEXTRÀ

És un experiment de *pulse-chase*: el *pulse* és el temps que incubes les cèl·lules amb dextrà, i el *chase* és el temps que deixen les cèl·lules sense dextrà per tal que s'internalitzi.

Material i mètodes

Reactius

Dextrà de 70000 Da marcat amb FITC, 10 mg/mL (Molecular Probes)

HBSS

Medi de cultiu sense FCS i amb 0,5% de BSA

Paraformaldehyd 3,7%

Equipament i material

Cubreobjectes rodons

Placa de 24 pous

Cambra humida i fosca

Microscopi Leica TCS NT

Protocol

- Es plaquegen $3 \cdot 10^5$ cèl·lules/pou en plaques de 24 pous amb un cubreobjectes rodó a dins.
- A les 24 hores de cultiu (a confluència aproximada del 80%) es fan dos rentats amb HBSS a 37°C.
- Es procedeix a fer el *pulse*: es tracten les cèl·lules durant 10 minuts i a 37°C amb medi de cultiu sense FCS i amb 0,5% de BSA i 10 mg/mL de dextrà.
- Es fan dos rentats amb HBSS a 37°C.
- Es procedeix a fer el *chase*: incubació a 37°C amb medi de cultiu sense FCS i amb 0,5% de BSA durant temps diferents (5-10-45 minuts).
- Es fan dos rentats amb HBSS a 4°C.
- Es fixen les cèl·lules amb paraformaldehyd al 3,7% durant 10 minuts.
- Es fa un rentat amb HBSS i es monta la preparació per poder observar-la al microscopi de fluorescència.

En paral·lel es realitza un control negatiu de la tècnica on tots els passos es realitzen a 4°C.

3.- ESTUDIS MORFOLÒGICS

3.1.- MICROSCOPIA ELECTRÒNICA

Reactius

Fixador *Karnovsky*: 2.5 % glutaraldehyd i 2 % paraformaldehyd en 0.1 M de tampó fosfat a pH 7.3

1% tetraòxid d'osmi

0.8% ferrocianat de potassi

Acetona (30%, 50%, 70%, 95%, 100%)

Resina Spurr

Citrat de plom

Acetat d'uranil

Equipament i material

Gradeta de coure

Leica Ultracut UCT

Microscopi JEM 010 equipat amb una càmera digital Gatan/MegaScan model 792

Protocol

- *Clusters* cel·lulars o cèl·lules en monocapa tripsinitzades es pre-fixen en fixador de *Karnovsky*.

- Després es fixen en 1% tetraòxid d'osmi i 0.8% ferrocianat de potassi durant una hora.
- Es fan 3 rentats amb aigua bidestil·lada freda.
- Es deshidraten les mostres amb concentracions creixents d'acetona (30%, 50%, 70%, 95%, 100%) i finalment es fan tres canvis amb acetona 100%.
- S'inclouen dins la resina Spurr i polimeritzen a 60°C.
- Els blocs es tallen amb un ganivet de diamant amb una Leica Ultracut, i els talls semifins es posen sobre una reixeta de coure.
- Es tenyeixen les reixetes amb acetat d'uranil i citrat de plom.
- Observació en un microscopi JEM 010 equipat amb una càmera digital Gatan/MegaScan model 792.

3.2.- CARIOTIP

El protocol emprat per a obtenir els cromosomes metafàsics es basa en la inhibició de la formació del fus acromàtic quan la cèl·lula entra en divisió, la lisi de les membranes per xoc hipotònic i la seva fixació.

Reactius

KaryoMax **Colcemid** líquid. (GIBCO) 10µg/mL

Solució hipotònica: KCl 75 mM

Solució fixadora: metanol:acètic (3:1)

Protocol

- Es parteix d'un cultiu al 70-80% de confluència.
- S'afegeixen 40 µL de Colcemid per ml de cultiu (0,04 µg/mL de concentració final).
- S'incuba des de 20 minuts (per cèl·lules que divideixen molt ràpid) fins o/n (per cèl·lules de divisió lenta) a 37°C.
- Es recull el sobrenedant en un tub cònic de 12-15 mL i es centrifuga a 370 g.
- A la placa s'hi afegeixen 2 mL de solució hipotònica prèviament escalfada a 37°C i s'incuba 25 minuts a 37°C (per tal de produir un xoc hipotònic i trencar les membranes).
- Una vegada centrifugat el tub, es treu el sobrenedant, s'hi afegeixen 2mL de solució hipotònica i s'incuba també a 37°C durant 25 minuts.
- Al cap dels 25 minuts, es rasquen les cèl·lules de la placa (amb *scraper*) i juntament amb el sobrenedant, es transfereix la mostra al tub cònic corresponent que també s'estava incubant a 37°C.
- S'afegeixen 2 mL de solució fixadora i s'inverteix el tub un parell de vegades per tal de parar la reacció hipotònica.
- Es centrifuga el tub 8 minuts a 190 g.
- Es decanta el sobrenedant, el sediment es desenganxa amb petits copets fins que queda homogeni i s'afegeixen gota a gota (per tal d'evitar la formació d'agregats) 10 mL en solució fixadora.
- Es deixa a temperatura ambient durant 20-30 minuts i es centrifuga a 190 g 8 minuts.
- Es decanta el sobrenedant i s'afegeixen 4 mL de solució fixadora freda.
- Es centrifuga 8 minuts a 190 g.

Material i mètodes

- Els dos darrers passos es repeteixen una altra vegada fins que el sediment queda ben blanc.
- Es guarden els tubs a 4°C durant almenys 24 hores abans de fer les extensions (si cal fer-les el mateix dia, es pot posar el tub a -20°C durant dues hores).
- Els sediments de cèl·lules fixades es poden guardar en solució fixadora a -20°C per un període de temps gairebé indefinit.
- Si cal fer un enviament de les cèl·lules fixades, es pot fer a temperatura ambient en el mateix vial.

NOTA: Els temps de Colcemid i de solució hipotònica, són molt crítics.

BANDES G, CONTRATINCIÓ DAPI

Les bandes G són les regions cromosòmiques que repliquen tard en la fase S, que són riques en seqüències A+T i que contenen pocs gens actius. Una forma d'obtenir bandes G és mitjançant una contratinció amb DAPI (4'-6-Diamidino-2-fenilindol), que forma complexos fluorescents amb el DNA de doble cadena i té una especial afinitat pels complexos A+T.

Reactius

Solució DAPI: 150 ng/ml

Medi de muntatge "Vectashield"

Protocol

Es prepara una solució de Vectashield que contingui una concentració final de 150 ng/ml de DAPI. Es posen unes gotes damunt dels portaobjectes, que s'escampen per tota la superfície en posar-hi un cubreobjectes al damunt, i s'analitzen 20 metafases. L'estudi del cariotip es va fer amb la col·laboració de la Dra Marga Nadal, de l'IDIBELL.

3.3.- TINCIÓ AMB DITIZONA

Reactius

Ditizona (SIGMA) 2.5 mg en 2.5 mL de DMSO i 25 mL de HBSS

DMSO

HBSS

Equipament i material

Xeringa i filtre de 45 µm

Recipient protegit de la llum

Lupa binocular

Protocol

- Es prepara la solució de ditizona, i es filtra a través d'uns filtres de 45 µm de diàmetre. Cal mantenir la solució tapada de la llum.
- Els *clusters* cel·lulars es tenyeixen amb la solució de ditizona filtrada durant 1-2 minuts.
- S'observa la positivitat amb una tonalitat vermella.

3.4.- TINCIÓ AMB OIL RED

La tinció d'*Oil Red* tenyeix les vesícules intracitoplasmàtiques de vitamina A presents en les cèl·lules estrellades, concretament tenyeix els àcids grassos que s'esterifiquen amb el retinol.

Reactius

Oil Red

Alcohol isopropílic 60%

Paraformaldehid 4 %

Medi de muntatge aquós Mowiol

Equipament i material

Microscopi òptic convencional Leica

Protocol:

- Es prepara una solució *stock* de 0.5 grams Oil Red en 100 mL d'alcohol isopropílic 99%. Per obtenir la solució de treball barregem 60 mL de la solució *stock* i 40 mL d'aigua destil·lada. Cal deixar reposar la solució entre 10-15 minuts i filtrar.
- Es fixen les cèl·lules amb solució de paraformaldehid al 4% en PBS durant 10 minuts a 4°C.
- Es renten les cèl·lules 2 vegades amb PBS, i seguidament fem 2 rentats amb alcohol isopropílic al 60%.
- Es tenyeix amb solució Oil Red durant aproximadament 90 minuts.
- Es diferencia amb alcohol isopropílic al 60%.
- Es monta amb medi aquós Mowiol.
- La observació es fa amb un microscopi òptic.

3.5.- AUTOFLUORESCÈNCIA DE LA VITAMINA A

Els cultius observats sota llum ultraviolada de 328 nm, presenten una fluorescència característica en blau i verd, indicant la presència de vitamina A en el seu citoplasma (Apte et al., 1998).

4.- IMMUNOFENOTIPATGE:

4.1.- IMMUNOFLUORESCÈNCIA DIRECTA I INDIRECTA

Reactius

Paraformaldehid 4%

Solució de permeabilització: 0.05% Tween-20 en PBS

(en la tinció dels *clusters* la permeabilització es fa amb saponina a 0.1% en PBS, i es manté 0.05% de saponina en els rentats)

Solució de bloqueig: 1% BSA en PBS

Medi de muntatge aquós Mowiol

Equipament i material

Chamber slides (Labtek)

Cubre-objectes

Cambra humida

Microscopi de fluorescència Leica DMR

Protocol

- Les cèl·lules es cultiven en *chamber slide* fins a una confluència aproximada del 80%.
- Es fan 3 rentats amb PBS.
- Es fixa la mostra amb paraformaldehid 4% durant 15 minuts.
- Es fan 3 rentats amb PBS.

Material i mètodes

- En cas que l'antigen que volguem marcar sigui intracel·lular, es posa la preparació amb solució de permeabilització (0.05% Tween-20, o bé 0.05% saponina, en PBS) durant 15 minuts a T/A.
- Es fan 3 rentats amb PBS.
- Es posa la preparació amb solució de bloqueig (1% BSA en PBS) entre 15 i 60 minuts a T/A.
- S'incuben les preparacions dins una cambra humida O/N a 4°C amb els anticossos primaris corresponents diluïts amb solució de bloqueig (veure taula ANNEX).
- Es fan 3 rentats amb PBS.
- S'incuben les preparacions durant una hora a temperatura ambient amb els anticossos secundaris corresponents diluïts amb solució de bloqueig (veure taula ANNEX). Aquest pas només es realitza en els casos que l'anticòs primari no està marcat amb fluorocrom.
- Es fan 3 rentats amb PBS.
- Es monta la preparació amb un medi de muntatge aquós (Mowiol). Es deixen assecar mitja hora en absència de llum. Les preparacions es poden guardar a 4°C durant setmanes (en funció de l'anticòs).
- Les imatges són observades i analitzades en el microscopi de fluorescència utilitzant el filtre amb la longitud d'ona corresponent.

4.2.- CONTRASTACIÓ NUCLEAR AMB HOESCHT

Reactius

Hoescht (SIGMA) 1 mg/mL

PBS

Equipament i material

Microscopi de fluorescència Leica DMR

Protocol

- Es prepara una solució *stock* de 5 mg de Hoescht en 5 mL d'aigua. Per preparar la dilució de treball diluïm la solució *stock* en PBS (1:1000). Cal barrejar bé i guardar protegit de la llum.
- Es tenyeix la mostra amb solució de Hoescht durant 15 minuts a T/A.
- Es fan 3 rentats amb PBS.
- Es monta la preparació amb Mowiol.
- Les imatges són observades i analitzades en el microscopi de fluorescència.

4.3.- CITOMETRIA DE FLUX

Reactius

Paraformaldehid 2%

Solució de permeabilització: 0.2% Tween-20 en PBS

Solució de bloqueig: 1% BSA en PBS

Equipament i material

Citòmetre de flux (Becton Dickinson)

Programa *Cell Request*

Protocol

- Es tripsinitzen les cèl·lules en cultiu i es fa el comptatge cel·lular.
- Es separen $1 \cdot 10^6$ cèl·lules en un volum final de 875 μ L de PBS.

- Es fixen les cèl·lules amb 125 µL de paraformaldehid 2% durant 1 hora a 4°C.
- Es fan 2 rentats amb PBS.
- En cas de tincions citoplasmàtiques, es ressuspèn la mostra en 1 mL de solució de permeabilització i es deixa 15 minuts a 37°C.
- Es fan 2 rentats amb PBS.
- Es posa la mostra amb solució de bloqueig (1% BSA en PBS) durant almenys 15 minuts a 4°C.
- S'incuben les mostres amb l'anticòs primari O/N a 4°C diluït amb solució de bloqueig (veure taula ANNEX).
- Es fan 3 rentats amb PBS.
- S'incuben les mostres amb l'anticòs secundari durant una hora a 4°C diluït amb solució de bloqueig (veure taula ANNEX). Aquest pas només es realitza en els casos que l'anticòs primari no està marcat amb fluorocrom.
- Es fan 3 rentats amb PBS.
- S'analitzen les mostres amb el citòmetre de flux i posteriorment amb el programa Cell Request

5.- EXPRESSIÓ GÈNICA:

5.1.- EXTRACCIÓ RNA TOTAL

TRIZOL

Reactius:

Trizol (Invitrogen)

Cloroform

Isopropanol

Etanol 75%

Aigua RNase free

Equipament i material

Vòrtex

Xeringa de 29G

Scrappers

Espectrofotòmetre

Protocol:

Aquest mètode es basa en la utilització del reactiu Trizol Reagent seguint les instruccions del fabricant i adequant el protocol als nostres cultius cel·lulars.

- Es fa un rentat de les cèl·lules amb PBS a 4°C.
- Es posen 500 µL de Trizol/pou i es recullen les cèl·lules amb l'ajuda d'un *scraper*.
- S'agita vigorosament amb un *vòrtex* durant 30 segons a cada mostra.
- Es fan passar les mostres per una xeringa de 29G 5 vegades.
- S'incuben les mostres 5 minuts a T/A.
- S'afegeixen 100 µL de cloroform a cada mostra i s'agita manualment durant 15 segons.
- S'incuben les mostres 2-3 minuts a T/A.
- Es centrifuguen les mostres a 12000 g durant 30 minuts a 4°C.

Material i mètodes

- Es recull la fase superior del gradient en un tub *ependorf*.
- S'afegeixen 250 μL d'isopropanol i s'incuben 10 minuts a T/A.
- Es centrifuguen 10 minuts a 12000 g durant 15 minuts a 4°C.
- Es descarta el sobrenedant i es renta el sediment amb 500 μL d'etanol 75%.
- Es fa un vòrtex i es centrifuga a 7500 g durant 5 minuts a 4°C.
- Es descarta el sobrenedant i es deixa assecar el sediment a l'aire.
- Es ressuspenden en un volum adequat d'aigua RNAsa *free*.
- Es quantifica la concentració de la mostra en un espectrofotòmetre. També es valora la puresa (el ratio d'absorvència 260/280, entre 1.8-2).

Nota: El material utilitzat ha de ser RNAsa-*free*

COLUMNES Qiagen

Reactius:

Kit d'extracció de RNA (RNasy Mini Kit, Qiagen)

Etanol 75%

Aigua RNase *free*

Equipament i material

Scrappers

Xeringa de 29G

Centrífuga

Espectrofotòmetre

Protocol:

- Els *clusters* aïllats de la Matrigel (veure apartat "*Cell recovery*"), es centrifuguen 10 minuts a 1000 rpm i ressuspendem el sediment amb 350 μL del tampó RTL (suplementat amb β mercaptoetanol).
- Es fan passar les mostres per una xeringa de 29G 5 vegades.
- S'afegeixen 350 μL d'etanol de 70% al llisat cel·lular i es barreja.
- S'afegeixen els 700 μL del llisat a la columna *Rneasy mini*, i es centrifuga 15 segons a 10000 rpm.
- Es descarta el filtrat i s'afegeixen 700 μL del tampó RW1 a la columna. Es centrifuga la columna 15 segons a 10000 rpm.
- Es descarta el filtrat i s'afegeixen a la columna 500 μL del tampó RPE/etanol. Es centrifuga 2 minuts a 10000 rpm.
- Es centrifuga durant un minut més a 14000 rpm.
- Per eluir l'RNA de la columna s'afegeixen 33 μL d'aigua destil·lada i es centrifuga 1 minut a 10000 rpm.
- Es quantifica la concentració de la mostra en un espectrofotòmetre. També es valora la puresa (el ratio d'absorvència 260/280, entre 1.8-2).

5.2.- RT-PCR

Obtenció del cDNA mitjançant la transcripció inversa de l'RNA total prèviament aïllat.

Tractament amb DNAsa previ:**Reactius**

DNAsa I (Invitrogen)

Buffer DNAsa I

EDTA 25 mM (inhibidor de la reacció)

Equipament i materials

Bloc tèrmic

Protocol:

- Tractarem 1 o bé 2 µg de RNA total en cada reacció:

<u>Reactius</u>	<u>Volum</u>
X µg de RNA	n µL
buffer DNAsa I	1 µL
DNAsa I	1 µL
Aigua estèril	q.s.p 10 µL

- La mescla es deixa a T/A durant 15 minuts.
- La reacció s'atura amb 1 µL d'inhibidor i mantenint la mostra durant 5 minuts a 65°C.
- Les mostres es guardem a 4°C fins a procedir a la reacció de RT.

Retrotranscripció:**Reactius**

dNTP mix

Random *primers* d(N₆)5'PO₄ (Pharmacia)

Aigua estèril

Buffer 5x

DTT

RNase Out (Invitrogen)

M-MLV-RT (Invitrogen)

Equipament i materials

Termociclador (G-storm)

Protocol

- Utilitzem 1 o bé 2 µg de RNA total tractat amb DNAsa per fer la reacció de retro-transcripció:

<u>Reactius</u>	<u>Volum</u>
X ng RNA tractat	n µL
dNTP mix 10 mM	1 µL
Random <i>primers</i> 1mM	1 µL
Aigua estèril	q.s.p 12 µL

- S'escalfa durant 5 minuts a 65°C. Després es col·loquen les mostres ràpidament a 4°C.

Material i mètodes

- S'afegeix a cada tub els següents reactius:

<u>Reactius</u>	<u>Volum</u>
Buffer 5x	4 µL
DTT 0.1 M	2 µL
RNAse Out 40unitats	1 µL

- S'escalfa durant 10 minuts a 25°C i 2 minuts a 37°C.
- S'afegeix 1 µL de l'enzim M-MLV-RT a tots els tubs, excepte en el control negatiu (-RT).
- S'escalfa 50 minuts a 37°C, i s'inactiva la reacció escalfant a 70°C durant 15 minuts. El cDNA ja queda preparat per poder-se amplificar en la PCR.
Nota: El volum final obtingut és de 20 µL

Amplificació per PCR

Reactius i materials

cDNA (50 ng/µL)
Buffer Taq 10x
dNTP mix 10 mM
MgCl₂ 50 mM
Primer forward 10 µM
Primer reverse 10 µM
Aigua estèril
Taq polimerasa (GeneCraft)
Equipament i material
Termociclador

Protocol:

- Posarem 100 ng de cDNA a la reacció:

<u>Reactius</u>	<u>Volum</u>
cDNA (50 ng/µL)	2 µL
Buffer Taq 10x	2.5 µL
dNTP mix 10 mM	1 µL
MgCl ₂ 50 mM	2 µL
<i>Primer forward</i> 10 µM	2 µL
<i>Primer reverse</i> 10 µM	2 µL
Taq polimerasa	0,25 µL
Aigua estèril	q.s.p 25 µL

Les condicions d'amplificació van ser d'entre 30 i 38 cicles:

1 minut a 95 °C
1 minut a la temperatura d'*annealing* òptima per cada *primer* (veure taula annex)
1 minut a 72°C

L'amplificació inclou 1 minut a 95°C al principi i 5 minuts a 72°C al final.

La mostra és analitzada amb gels d'agarosa o d'acrilamida i tinció amb bromur d'etidi.

La taula dels *primers* utilitzats es troba a l'ANNEX.

5.3.- GELS D'AGAROSA

Reactius

Agarosa

Tampó TAE 1x (Per preparar 1 litre de TAE 50x: 242 grams de Tris base, 57.1 mL àcid acètic glacial, 37.2 grams de Na₂EDTA ·2H₂O i enrasar fins a 1 litre amb aigua. Per preparar 1 litre de TAE 1x: 200 mL TAE 50x i 800 mL d'aigua)

Bromur d'etidi 1 mg/mL (Sigma)

Tampó de càrrega 6x

Marcador de pes molecular

Equipament i materials:

Microones

Cubeta, pinta i font d'electroforesi

Transil·luminador

Protocol:

Per preparar un gel del 1 %:

- Es pesa 1 gram d'agarosa i s'afegeix a un *erlenmeyer* amb 100 mL de TAE 1x.
- S'escalfa al microones sense que arribi a temperatura d'ebullició. La barreja ha de quedar totalment transparent.
- Es deixa refredar uns minuts sota la campana.
- S'afegeix 1.5 µL de bromur d'etidi (1mg/mL) i es barreja.
- S'aboca dins una cubeta prèviament muntada amb la pinta i esperarem fins a la solidificació total del gel.
- Es carrega 15 µL/pou de mostra barrejada amb 3 µL de tampó de càrrega.
- Es procedeix a l'electroforesi amb unes condicions de voltatge constants de 80 V, aproximadament 30 minuts.
- Es visualitzen les bandes amb el transil·luminador.

Nota: El percentatge d'agarosa depèn del tamany de la banda amplificada.

5.4.- GELS D'ACRILAMIDA

Reactius

Acrilamida 40% (BioRad)

Tampó TBE 5x (Per preparar 1 litre de TBE 10x: 108 grams de Tris base, 55 grams d'àcid bòric, 40 mL EDTA 0.5M pH 8 i enrasar fins a 1 litre amb aigua. Per preparar 1 litre de TBE 1x: 100 mL TBE 10x i 900 mL d'aigua)

Persulfat d'amoni (APS) 10%

TEMED

Aigua

Cubeta, vidres i separadors Miniprotean

Solució de revelat de les bandes: 5 µL de bromur d'etidi (1 mg/mL) en 50 mL d'aigua destil·lada.

Tampó de càrrega 6x

Equipament i materials:

Pipeta Hamilton

Material i mètodes

Tampó d'electroforesi: TBE 0.5x

Font d'electroforesi

Transil·luminador

Protocol:

Per preparar 10 mL d'un gel del 12 %:

- Es barregen en un *erlenmeyer* 3 mL acrilamida, 2 mL TBE 5x, 5 mL d'aigua, 42 μ L d'APS 10% i 5.7 μ L deTEMED.
- S'aboca la barreja en un gel vertical amb separadors de 5 mm, i es posa la pinta amb els pous necessaris.
- Esperem fins a la solidificació del gel.
- Es treu la pinta i es col·loca dins la font amb tampó d'electroforesi.
- Es carrega amb la pipeta Hamilton 15 μ L de mostra barrejada amb 3 μ L de tampó de càrrega/pou.
- Es procedeix a l'electroforesi a condicions de voltatge constants de 160 V.
- Es fa la tinció del gel amb la solució de bromur d'etidi (1mg/mL).
- Es visualitzen les bandes amb el transil·luminador.

5.5.- DENSITOMETRIA AMB QUANTITY ONE

Equipament i material

Programa Quantity One (BioRad)

Protocol

- Obrim amb el programa Quantity One les fotos dels gels d'agarosa escanejats en format ".tiff"
- Es seleccionen les bandes de cada gen que volem quantificar, i el programa ens donarà la seva densitat.
- Es seleccionen les bandes corresponents a les mostres anteriors però amb el gen endogen (en el nostre cas TBP) i el programa ens donarà la seva densitat.

Es calcula un ratio entre les densitats del gen que volem quantificar i el gen endogen. Agafarem com a valor arbitrari "1" les cèl·lules que no han estat tractades.

5.6.- REAL TIME PCR

Bases de la quantificació

La principal característica de la PCR quantitativa és que la mesura es realitza a temps real, mitjançant la quantitat de fluorescència que s'ha generat, enlloc de fer-ho a temps final a partir del producte de PCR acumulat.

L'amplificació es representa segons la senyal de fluorescència emesa (R_n) i el nombre de cicles de la PCR. En els cicles inicials on hi ha molt poc canvi de la senyal de fluorescència és on es defineix la línia basal (*baseline*). En tota amplificació es fixa una línia llindar (threshold) lleugerament per sobre de la línia basal. El paràmetre cicle llindar (C_T) es defineix com el cicle de la PCR on es troba la intersecció entre la corba de fluorescència de la mostra i la línia llindar. L' ΔR_n correspon a la quantitat màxima de fluorescència emesa per la mostra al final dels cicles.

La quantificació de la mostra problema es realitza comparant el C_T obtingut de la mostra en una corba patró on es coneix la quantitat de DNA corresponent als diferents C_T .

Detecció per SYBR Green

La tecnologia SYBR Green (Applied Biosystems), es basa en la incorporació al DNA de doble cadena d'un fluorocrom que es troba inactiu en la seva forma lliure, i que comença a emetre fluorescència en el moment que s'uneix al DNA. Així doncs, aquest fluorocrom emet fluorescència de forma proporcional al nombre d'amplicons generats en la reacció, i aquests són proporcionals al nombre de còpies del gen que hi havia a l'inici en la mostra.

Pel procés d'amplificació es va fer servir el kit comercial Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), que combina el fluorocrom SYBR Green 1 Dye, la polimerasa AmpliTaq Gold DNA Polymerase, un *mix* de dNTPs amb dUTP i un tampó optimitzat per fer la reacció.

Disseny de primers

Els *primers* es dissenyen mitjançant el programa Primer Express Software v2.0 (Applied Biosystems) a partir de la seqüència del mRNA obtinguda de la base de dades NCBI. Cal seguir uns criteris determinats de tamany (la llargada del fragment a amplificar ha de ser de 50-150 parells de bases), i a ser possible entre dos exons.

Condicions universals

Tots els assajos quantitius es realitzen amb el mateix cicle de temperatures. Això permet que no sigui necessari cap optimització del cicle i que es puguin analitzar diferents gens a la mateixa placa.

50°C - 2 min

95°C - 10min

40 cicles de:

95°C - 15seg

60°C - 1min

A més del cicle, també s'utilitza com a condició universal la mescla de reactius comuns (*master mix*) subministrada per la casa comercial. D'aquesta manera augmenta la reproductibilitat, ja que es redueixen errors de pipeteig.

Corba patró

Per poder quantificar el nostre sistema experimental cal tenir una referència coneguda, i per aquest motiu és necessari construir una recta patró. Les quantificacions que s'han realitzat han estat **relatives**, o sigui que s'expressen en relació a una base. Les rectes patró s'han fet mitjançant dilucions seriades d'una mostra de cDNA d'alta concentració positiva pel gen a estudiar. En els experiments d'aquesta tesi s'ha utilitzat cDNA obtingut de cèl·lules ARIP per la corba patró de CK19. Per la corba patró de PDX1 s'ha utilitzat cDNA obtingut de cèl·lules INS1 (línia cel·lular comercial procedent d'insulinoma de rata).

Control endogen

Per normalitzar les quantificacions del gen d'interès cal mesurar a la mateixa mostra un gen endogen, l'expressió del qual no varia a les diferents condicions que ha estat exposat. En aquest treball s'ha utilitzat TBP (TATA Binding Protein). Com en el cas anterior, per quantificar el gen endogen es construeix una recta patró, en aquest cas també dilucions seriades d'una mostra de cDNA d'alta concentració de la línia cel·lular ARIP.

Material i mètodes

Replicats

Cal fer diferents mesures de la mateixa mostra per comprova la reproductibilitat de la reacció. En el nostre cas totes les mostres problema han estat valorades en triplicat.

Validació de la linealitat de la PCR i l'eficiència dels primers.

La validació consisteix en comprovar que la diferència d'amplificació entre les diferents quantitats de cDNA és constant, i per tant la relació de C_T es lineal en cada primer.

Reactius

Primers específics 10 μ M

SYBR Green Master Mix (2x)

Aigua bidestil·lada

Equipament i material

ABI PRISM 7900 Sequence Detection System

Plaques de 96 pous i tapes

Centrifugadora amb adaptador de plaques de 96 pous

Protocol

- Es fan dilucions de cDNA per comprendre valors entre 1 i $1/10^5$ en aigua bidestil·lada.
- Es prepara la mescla de la reacció en un tub *eppendorf*, afegint tots els reactius a excepció del cDNA:

SYBR Green	10 μ L
Mix primers	0.3 μ L
Aigua bidestil·lada	6.7 μ L
- S'afegeixen 3 μ L de les dilucions del cDNA als 17 μ L de la mescla anterior a cada pou.
- Es tapa la placa i es centrifuga.
- S'introdueix la placa en el lector ABI PRISM 7900 perquè tingui lloc la reacció de PCR.

Un cop acabada la reacció de PCR cal representar els resultats com C_T enfront del logaritme de la concentració de cDNA, i es determina el rang de linearitat de les mostres. La mesura del pendent ens indica l'eficiència de la reacció, que hauria de ser -3.33 per tenir una eficiència del 100%.

Quantificació de les mostres

Aquest procés és idèntic al descrit per a la validació de la linealitat. Afegirem les mostres problema que volem quantificar al tub de reacció, que han d'estar dins el rang de linealitat determinat prèviament amb la corba patró.

A cada placa d'amplificació ha d'haver-hi: corba patró (STD, *standard*), mostra problema (UNK, *unknown*) i control on posem aigua enlloc de cDNA (NTC, *no template control*).

Interpretació dels resultats i càlculs (software SDS 2.1 Applied Biosystems)

Un cop finalitzada la reacció, l'aparell calcula automàticament la recta patró i a partir d'aquesta recta podem saber la concentració de cada mostra. Els càlculs a seguir són els següents:

- Es calcula la concentració mitjana i la desviació estàndar dels diferents replicats per una mateixa condició. Tant pel gen problema com per l'endogen.
- Es normalitzen els valors, fent el quocient entre la concentració del gen problema/concentració de l'endogen.
- El valor normalitzat es refereix a un valor base, el qual se li assigna el 100%. En aquest estudi el valor de referència sempre ha estat el de les cèl·lules ARIP cultivades amb medi control.

La taula dels *primers* utilitzats es troba a l'ANNEX.

5.7.- SOBREINFECCIÓ AMB ADENOVIRUS DE NEUROGENINA-3

Reactius

Construcció d'Adenovirus Ngn3, concentració $1 \cdot 10^8$ pfu/ μ L

Construcció d'Adenovirus β gal (control), concentració $2,3 \cdot 10^8$ pfu/ μ L

Equipament i materials:

Plaques de petri de 60 cm per cultius en suspensió

Sala de cultius preparada per treballar amb virus, amb campana de flux, incubador i centrífuga propis.

Protocol:

- S'aïllen els *clusters* cel·lulars cultivats en Matrigel.
- Es dipositen en plaques de petri de 60 cm, (100 estructures/placa). Es deixen en cultiu a l'incubador amb el medi DMEM/F12.
- S'infecten les 100 estructures de cada placa al cap de 24 hores amb la quantitat adequada d'adenovirus de Ngn3 i β gal a una multiplicitat d'infecció (MOI) de 50, prenent com a referència 400 cèl·lules per estructura.
- La infecció es realitza durant 3 hores, en agitació.
- Passat aquest temps es tornen a posar en cultiu amb medi DMEM/F12 durant 48 hores.
- Les estructures es recullen i es procedeix a l'extracció de RNA.

Construccions d'adenovirus cedides per la Dra. R. Gasa, del laboratori de diabetis experimental de l'IDIBAPS.

6.- TÈCNICA D'IMMUNOPANNING

Consisteix en una tècnica per enriquir el cultiu en la població que expressa un determinat marcador de superfície. El protocol es basa en (Ben-Hur et al., 1998), amb modificacions per adequar-les als nostres cultius cel·lulars.

Reactius

Tris HCl 50 mM pH 9.5

IgM (SIGMA)

PSA-NCAM (USBiological)

Solució del bloqueig: BSA 0.2% en PBS

Tripsina/EDTA

Equipament i material

Incubador de cultius

Protocol

- S'incuben plaques de Petri de 60 cm O/N a 4°C amb 2 mL de IgM diluït 1:128 en Tris HCl 50 mM pH 9.5, treballant en condicions d'esterilitat.
- Es fan 2 rentats amb PBS a T/A.
- S'incuba la placa amb 2 mL de l'anticòs PSA-NCAM estèril diluït 1:250 en solució de bloqueig i es deixa a T/A una hora.
- Es treu l'anticòs primari i s'afegeix a la placa $1 \cdot 10^6$ cèl·lules en solució de bloqueig.
- Es deixa la placa durant 30 minuts a l'incubador de cèl·lules.
- Passat aquest temps es recull el sobrenedant, que contindrà la **fracció negativa** que no expressa l'antigen.
- Es fa un rentat suau amb PBS.
- Es tripsinitzen les cèl·lules que han quedat enganxades, que seran la **fracció positiva** per PSA-NCAM.
- Les dues fraccions es planten per separat en plaques de 6 pous per expandir-les, i una vegada arriben a un 80% de confluència es valoren els resultats per citometria i immunocitoquímica.

7.- PROTEÒMICA

7.1.- PREPARACIÓ DE LA MOSTRA: CENTRICON I CLEAN-UP

Reactius

Tampó 2-D (urea 7M, tiourea 2M i CHAPS 2% p/v)

Kit 2 D clean up (Amersham)

Equipament i material

Centricon YM-10 (Millipore)

Centrífuga

Vórtex

Tires per mesurar el pH

Protocol:

- El medi condicionat recollit de les PSC es descongela O/N a 4°C.
- Es pipetegen els 8 mL dins la columna de Centricon i es centrifuga a 4°C durant 45 minuts.
- La mostra queda concentrada en aproximadament 200 μ L, i es procedeix a fer el *clean up*.
- S'afegeixen 300 μ L de precipitant, s'agita mitjançant *vórtex* i s'incuba a 4°C 15 minuts.
- S'afegeixen 300 μ L de co-precipitant i es barreja.
- Es centrifuga 5 minuts a 4 °C i 12000 g.
- Es descarta el sobrenedant, i es torna a centrifugar un minut. Es deixa el sediment ben sec.
- S'afegeixen 40 μ L de co-precipitant, amb molt de compte, i es deixa a 4°C 5 minuts.
- Es centrifuga 5 minuts a 4°C i 12000 g i es descarta el sobrenedant.
- S'afegeixen 50 μ L d'aigua milliQ i s'agita enèrgicament mitjançant *vórtex*.

- S'afegeix 1 mL de tampó de rentat (prèviament refredat a -20°C durant 30 minuts) i 5 μL de tampó de rentat aditiu. S'agita enèrgicament mitjançant *vórtex* per dispersar el sediment.
- S'incuba durant 30 minuts a -20°C , i s'agita enèrgicament mitjançant *vórtex* cada 10 minuts.
- Es centrifuga 5 minuts a 4°C i 12000 g i es descarta el sobrenedant.
- Es deixa assecar el sediment sota campana, durant aproximadament 30 minuts.
- Es ressuspèn el sediment en 60 μL de tampó 2-D, i ajustem el pH a 8.5.

7.2.- QUANTIFICACIÓ DE LA MOSTRA

Reactius

Kit quantificació de proteïnes RCDC (BioRad) basat en el mètode de *Lowry*

Equipament i material

Centrifuga

Vórtex

Espectrofotòmetre

Protocol:

- Es preparen dilucions de la mostra en un volum final de 12.5 μL .
- S'afegeixen 62.5 μL del reactiu RCDC I a cada mostra, s'agita mitjançant *vórtex* i es deixa un minut a T/A.
- S'afegeixen 62.5 μL del reactiu RCDC II, s'agita mitjançant *vórtex* i es centrifuga a 14000 rpm durant 5 minuts a 4°C .
- Es descarta el sobrenedant de cada mostra.
- Cal repetir els passos anteriors (des del reactiu RCDC I fins a descartar el sobrenedant).
- S'afegeixen 63.5 μL del reactiu A' a cada mostra (el reactiu A' és una dilució 1:50 del reactius S i A), i s'agita mitjançant *vórtex*.
- Es plaquegen en placa de 96 pous 25 μL de cada mostra.
- S'afegeixen 200 μL del reactiu B i es remena cada pou amb una punta.
- Es deixa 15 minuts a T/A i es llegeix a l'espectrofotòmetre a una absorvància de 750 nm.

7.3.- GELS 2D

HIDRATACIÓ DELS GELS IPG (immobilized pH gradient)

Reactius

Tampó 2D

DTT 65 mM

Tampó IPG (pH 3-10) 0.5% v/v

Blau de bromofenol

Oli mineral (BioRad)

Equipament i material

Gels IPG de 17 cm pH 3-10 (BioRad)

Safata amb carrils individuals per gels IPG

Protocol:

- Es prepara la solució d'hidratació amb 350 µL de tampó 2-D afegint 3.5 mg de DTT, 1.75 µL de tampó IPG i un polsim de blau de bromofenol.
- Es col·loca el tampó al costat esquerre del carril de la safata.
- Es treu el gel IPG de -20°C, es deixa atemperar momentàniament i se li treu el plàstic protector.
- Es col·loca la primera dimensió en contacte amb la solució d'hidratació, cap avall, i es cobreix amb oli mineral.
- Es deixa O/N a T/A.

PREPARACIÓ DE LA MOSTRA PER LA PRIMERA DIMENSIÓ

Reactius

Tampó 2D

DTT 65 mM

Tampó IPG (pH 3-10) 1%

Blau de bromofenol

Equipament i material

Vórtex

Protocol

- Es prepara el tampó de càrrega amb 500 µL de tampó 2-D afegint 5 mg de DTT, 5 µL de tampó IPG i un polsim de blau de bromofenol.
- Agafem 90 µg de la mostra i ajustem fins a 60 µL amb tampó de càrrega.
- Incubem 15 minuts en gel, i agitem enèrgicament mitjançant *vórtex* cada 5 minuts.
- Incubem 15 minuts a T/A, i agitem enèrgicament mitjançant *vórtex* cada 5 minuts.
- Fem una centrifugació 1 minut a 14000 rpm.
- Es traspasa el sobrenedant a un altre tub *ependorf*, i es guarda en gel fins al moment de carregar-lo a la primera dimensió.

PRIMERA DIMENSIÓ

Enfoc isoelèctric: separació de les proteïnes segons el seu punt isoelèctric (pI)

Reactius

Oli mineral

Mostra preparada en l'apartat anterior

Equipament i material

Gels IPG de 17 cm pH 3-10 hidratats

Paper Whatmann

Safata amb electrodes, i carrils individuals per gels IPG

Font d'electroforesi (Protean IEF cell BioRad)

Protocol:

- Es netegen els gels amb aigua destil·lada i s'eixuguen amb dos papers Whatmann prèviament saturats també amb aigua destil·lada.
- Es col·loquen els gels hidratats O/N dins la safata dels electrodes. En aquest cas la primera dimensió va cap amunt.
- Posem dos papers Whatmann saturats d'aigua a la part superior i inferior del gel.

- Posem els electrodes en contacte amb els papers Whatmann.
- Es col·loquen els pous sobre cada gel, i es carrega la mostra (60 µL).
- Es cobreix el pou i tot el gel amb oli mineral i es posa a córrer O/N, fixant la resistència a 90 µA/gel com a màxim, i fins a arribar a un voltatge de 62 KV/hora.
- Els gels poden ser guardats a -80°C durant una setmana com a màxim, o es procedeix a la segona dimensió.

PREPARACIÓ DE LA MOSTRA PER LA SEGONA DIMENSIÓ

Reactius

Solució *stock* B i C (urea 6M, SDS 2% (p/v), Tris-HCl 375 mM pH8.8, glicerol 20% (v/v))

Solució B de treball (solució *stock* afegint DTT 130 mM)

Solució C de treball (solució *stock* afegint iodoacetamida 135 mM)

Blau de bromofenol

Gels IPG que han corregut la primera dimensió O/N

Equipament i material

Safata amb carrils individuals per gels IPG

Protocol

- Es prepara la solució B (8 mL de la solució *stock* amb 0.16 grams de DTT) i s'incuba el gel durant 15 minuts dins una safata amb carrils individuals per gels IPG.
- Es prepara la solució C (8 mL de la solució *stock* amb 0.2 grams de iodoacetamida i un polsim de blau de bromofenol) i s'incuba el gel durant 15 minuts amb una safata amb carrils individuals per gels IPG.
- La mostra ja està llesta per córrer la segona dimensió.

PREPARACIÓ DE LA SEGONA DIMENSIÓ (GEL SDS-PAGE)

Separació de les proteïnes segons el seu pes molecular.

Reactius

Acrilamida 30%

Tris-HCl 3M, pH 8.8

Na₂S₂O₃ 1M

SDS 10%

APS 10%

TEMED

Equipament i material

Vidres (18x20 cm) i separadors de 1mm pel muntatge de gels verticals (Protean II xi, BioRad)

Protocol:

Per preparar 45 mL d'un gel del 10 %:

<u>Reactius</u>	<u>Volum</u>
Acrilamida 30%	15 mL
Tris-HCl 3M	5.62 mL
Na ₂ S ₂ O ₃ 1M	225 µL
SDS 10%	450 µL
APS 10%	261 µL
TEMED	26 µL
Aigua estèril	q.s.p 45 mL

S'aboca la barreja en un gel vertical amb separadors de 1 mm, deixant aproximadament 0.5 cm lliures a la part de superior. Esperem fins a la solidificació.

SEGONA DIMENSIÓ

Reactius

Agarosa de baix punt de fusió

Tampó d'electroforesi (Tris-HCl 25 mM pH a 8.8, glicina 250 mM, SDS 0.1% (p/v))

Equipament i material

Gel IPG equilibrat, en solució C

Gel SDS-PAGE

Font d'electroforesi amb sistema de refrigeració

Protocol:

- Es desfan al microones 0.25 grams d'agarosa en 50 mL de tampó d'electroforesi.
- L'agarosa desfeta s'afegeix al gel 2-D fins a la part superior dels vidres.
- Sense deixar solidificar, es diposita el gel IPG dins l'agarosa i es fa baixar fins que entri en contacte amb el gel d'acrilamida. Ha de quedar totalment horitzontal.
- Es posa a córrer a 200 V durant 30 minuts i a 270 V durant 4 hores. Cal mantenir el sistema de refrigeració.

7.4.- TINCIÓ DE PLATA COMPATIBLE AMB MALDI-TOFF

Reactius

Fixador 1: 40% etanol, 10% àcid acètic, 50% aigua milliQ

Fixador 2: 5% etanol, 5% àcid acètic, 90% aigua milliQ

Solució de tiosulfat: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.2 g/L en aigua milliQ

Tinció de plata: AgNO_3 2g/L en aigua milliQ

Solució de revelat: Na_2CO_3 30 g/L, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.001%, formaldehid 14 % (v/v)

Solució de *stop*: 1% d'àcid acètic, 99% aigua milliQ

Equipament i material

Safates amb capacitat per un gel

Agitador orbital

Protocol:

- Es posen els gels a incubar amb el fixador 1 durant 20 minuts, i es retira.
- Es posen els gels a incubar amb el fixador 2 durant 10 minuts, i es retira.
- Es renten els gels durant 10 minuts amb aigua milliQ.
- Es posen els gels amb la solució de tiosulfat durant un minut, es retira i seguidament es fan dos rentats d'un minut cada un amb aigua milliQ.
- Es deixen els gels durant 30 minuts amb la tinció de plata, i es retira.
- Es fan dos rentats d'un minut cada un amb aigua milliQ.
- Es posen els gels amb la solució de revelat fins que es comencin a veure els *spots*.
- Quan volem aturar la reacció, es retira la solució de revelat i es posen els gels amb solució *stop* durant 20 minuts.

- Finalment es fa un rentat amb aigua milliQ, i les imatges dels gels es digitalitzen a una resolució de 200 ppm mitjançant un escaner. Els documents es guarden en format “.tiff” compatible amb el software d’anàlisi d’imatges de 2D.

Tot el procés es fa dins unes safates grans i les incubacions es fan amb un agitador orbital mecànic.

Aquesta tinció és compatible amb l’anàlisi per MALDI-TOFF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight).

Protocol basat en (Shevchenko et al., 1996)

7.5.- IDENTIFICACIÓ DELS SPOTS DIFERENCIALS

Programa: Melanie III (BioRad)

L’anàlisi de les imatges de 2D ha estat realitzat mitjançant el programa Melanie III.

Protocol

- S’importen les imatges en format “.tiff” dels gels a analitzar.
- Es detecten automàticament els *spots* (isoformes de les proteïnes de punt isoelèctric i massa determinades) i es quantifiquen mitjançant un algoritme Laplaciana.
- Es comproven manualment els *spots*.
- S’anoten punts de referència (*landmarks*) localitzats en la mateixa posició en tots els gels.
- Es calibren els gels per massa molecular i pI. Aquestes dades s’obtenen a partir d’estandards interns (BioRad) que s’han carregat conjuntament en una de les mostres.
- Superposició automàtica (*matching*) de tots els gels amb un gel de referència (*master gel*). En el nostre cas es va utilitzar el medi condicionat amb FCS.
- Es comprova manualment que la superposició és correcta.
- Es procedeix a la detecció dels *spots* expressats diferencialment en els medis condicionats respecte al blanc (medi no condicionat).

7.6.- ESCISIÓ DELS SPOTS

Equipament i material

Gels tenyits amb la tinció de plata

Cutter

Puntes grogues

Protocol:

- Es posen els gels sobre la pociata, mantenint-los sempre hidratats.
- Amb la plantilla que hem obtingut del programa Melanie, escollim els *spots* que cal retallar i rotulem un tub *eppendorf* per cada un.
- Si l’*spot* és molt gran, el retallem amb un *cutter* i el traspassem dins el tub *eppendorf* amb l’ajuda d’una punta groga
- Si l’*spot* és més petit, tallem la part distal de la punta groga de manera que li quedi un diàmetre semblant al *spot* que volem tallar. Es posa sobre el gel i es fa pressió fins que ens emportem l’*spot* amb la punta.

Material i mètodes

- Es carreguen 100 μL d'aigua bidestil·lada i s'allibera el tros escindit del gel i l'aigua dins del tub *ependorf*.
- Es retallen els triplicats de cada spot dels diferents gels, ajuntant la mostra dins del tub *ependorf*.
- Es treu l'aigua de la mostra i es guarda a -20°C fins que es processa.

També cal tallar un control positiu (albúmina) i un control negatiu (un tros de gel blanc)

7.7.- DESTINCIÓ DE PLATA

Reactius

Acetonitril 100%

Solució de destinció: dilució 1:1 de ferricianidat de potassi 30 mM i tiosulfat sòdic 100 mM

Bicarbonat d'amoni 0.05 M pH 7.8

Equipament i material

Campana de flux laminar

Centrífuga

Vórtex

Protocol

- Es fa un rentat amb 100 μL d'aigua milliQ a cada mostra, s'agita enèrgicament mitjançant *vórtex*, i es fa un *spin* de centrífuga. Es descarta l'aigua.
- Es fa un rentat amb 100 μL d'acetonitril a cada mostra, s'agita enèrgicament mitjançant *vórtex*, i es fa un *spin* de centrífuga. Es descarta l'acetonitril.
- Es repeteix el pas anterior 2 vegades, fins que el gel quedi ben deshidratat.
- Es deixen assecar les mostres sota la campana durant 5-10 minuts.
- S'afegeixen 100 μL de la solució de destinció. S'agita enèrgicament mitjançant *vórtex* i cal esperar a que la plata s'oxidi, i per tant perdi el color.
- Es treu la solució amb pipeta i es renta tres vegades amb aigua milliQ.
- S'incuben les mostres a 4°C durant 20 minuts amb amoni bicarbonat.
- Es treu l'amoni bicarbonat amb pipeta i es renta tres vegades amb acetonitril.
- Es deixa assecar sota campana uns 10 minuts.

Tot el procés es fa sota campana de flux laminar i a 4°C .

Protocol basat en (Gharahdaghi et al., 1999)

7.8.- DIGESTIÓ PROTEICA

Reactius

Tripsina bovina (Promega): solució *stock* de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Bicarbonat d'amoni (100 mM i 50 mM)

Equipament i material

Campana de flux laminar

Incubador de 37°C

Protocol

- Es prepara la solució de treball de la tripsina (0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) barrejant la solució *stock* amb amoni bicarbonat 100 mM (1:1).

- S'afegeixen 10 µL per mostra de la solució de treball de la tripsina (enzim que talla residus específics d'arginina i lisina).
- Es deixa la mostra en gel durant 20 minuts.
- S'afegeixen entre 10 i 20 µL d'amoni bicarbonat 50 mM a cada mostra fins que els trossos de gel s'hagin rehidratat i recuperin el seu volum inicial.
- S'incuba O/N a l'estufa de 37°C.

Protocol basat en (Barcelo-Batllori et al., 2002)

7.9.- EXTRACCIÓ DE PÈPTIDS

Reactius

TFA 5%

Solució d'extracció (acetonitril 60%, TFA 0.1%)

Equipament i material

Centrífuga

Sonicador

Bany de 37 °C amb agitació

Speed-vaccum

Protocol

- Es fa un *spin* de centrífuga a les mostres que han estat O/N dins a 37°C.
- S'afegeixen 10 µL de TFA 5% per aturar la digestió, i es soniquen durant 10 minuts dins un bany d'aigua.
- Es centrifuguen les mostres i es recull el sobrenedant per traspasar-lo a un tub *eppendorf* nou, que es guarda sota campana.
- S'afegeixen 10 µL de la solució d'extracció a la mostra que conté el gel, i s'incuba al bany de 37°C amb agitació durant 20 minuts.
- Es fa un *spin* de centrífuga, es treu el sobrenedant i s'ajunta amb l'anterior extracte guardat sota campana.
- Es repeteixen els passos anteriors (afegir solució d'extracció, bany amb agitació, i centrifugació) i s'ajunta el sobrenedant amb l'anterior extracte.
- Al final s'afegeixen 10 µL d'acetonitril 100% a la mostra que conté el gel per acabar d'extreure els pèptids més hidrofòbics, i s'incuba al bany de 37°C amb agitació durant 20 minuts.
- Es fa un *spin* de centrífuga, es treu el sobrenedant i s'ajunta amb l'anterior extracte guardat sota campana.
- Finalment obtenim uns 40 µL amb l'extracte de proteïnes, i cal reduir el volum a la meitat posant les mostres dins un *speed-vaccum* durant 20 minuts sense escalfor. Les mostres ja estaran llestes per passar per la columna Zip Tip.

7.10.- PURIFICACIÓ DE PÈPTIDS AMB ZIP-TIP

Reactius

Tampó d'elució (acetonitril 50%, TFA 0.1%)

TFA 0.1%

Acetonitril 100%

Equipament i material

Columnes Zip Tip (Millipore) que conté la resina C18 per concentrar la mostra i eliminar sals

Protocol

Material i mètodes

- Es carrega el Zip Tip amb 10 µL d'acetonitril 100%, esperem que s'hidrati i els descartem.
- Repetim el pas anterior 2 vegades.
- Es carrega el Zip Tip amb 10 µL de TFA 0.1%, esperem que s'equilibri i els descartem.
- Repetim el pas anterior 2 vegades.
- Es carrega la mostra pipetejant amunt i avall en el mateix tub *ependorf* 10 vegades per tal que els pèptids quedin retinguts a la columna.
- Es carrega el Zip Tip amb 10 µL de TFA 0.1% per netejar la columna i eliminar sals. Els descartem.
- Repetim el pas anterior 2 vegades.
- S'elueix 2-3 vegades amb 3 µL de tampó d'elució.
- En aquest pas es poden congelar a -20°C o bé plaquejar per Maldi-Toff.

És molt important que el Zip Tip no quedi mai sec.

7.11.- PLAQUEIG DE MOSTRES I ANÀLISIS PER MALDI-TOFF

Reactius

Tampó de matriu (acetonitril 50%, TFA 0.1%)

Matriu (àcid α -ciano-4-hidroxibenzoic)

Estandards 4 pmol/µL (Brucker)

Equipament i material

Placa de teflon de 96 pous per Maldi-Toff

Lupa binocular

Estufa de 37 °C

Analitzador de Maldi-toff Voyager DE Prespective (Applied Biosystems)

Protocol

- Es pesen 4 mg de matriu recristal·litzada en un tub *ependorf* i afegir 500 µL del tampó de matriu.
- Es fa *vórtex* fins que es dissolgui, es centrifuga 1 minut a 14000 rpm i es passa el sobrenedant a un tub *ependorf* nou sense tocar el fons del tub.
- Es dilueixen els estandards amb la matriu que acabem de preparar (1:48).
- Es plaquegen 0.5 µL dels estandards a cada pou de la primera filera de la placa.
- Es plaquegen 0.5 µL de la mostra a cada pou de la segona filera de la placa, i seguidament es pipetegen 0.5 µL de matriu sobre cada mostra.
- Quan haguem carregat totes les mostres amb el seu estandar corresponent, deixem assecar la placa a l'estufa de 37°C. Comprovem que hi ha una bona cristallització de les mostres amb la lupa.
- Les mostres s'analitzen segons el protocol descrit per (Barcelo-Batllori et al., 2005) amb la col·laboració del Dr J.M Estanyol (Servei de Proteòmica de la UB) i es calibren amb els estandards externs.

7.12.- IDENTIFICACIÓ DE LES PROTEÏNES PER EMPREMTA PEPTÍDICA

Programes:

Data explorer versió 4.2 (Applied Biosystems)

Aldente (versió 24/05/2006, 11/09/06 Expasy)

<http://www.expasy.org/tools/aldente/>

Mascott

<http://www.matrixscience.com>

Protocol

- Els espectres de cada mostra es recalibren amb els pics (massa dels pèptids) d'autodigestió de la tripsina. Tant la calibració com l'exportació dels pics de la nostra mostra s'efectuen amb el programa Data explorer versió 4.2.
- La llista de pics s'exporta a un document Excel i es seleccionen els 250 pics més intensos per l'empremta peptídica.
- Els pics derivats de la tripsina, queratines i matriu es treuen de la llista quan són els pèptids més intensos de l'espectre.
- Les proteïnes s'identifiquen per empremta peptídica utilitzant el programa Aldente, que conté les bases de dades Swiss-Prot i TrEMBL. Les identificacions es fan seguint els següents criteris: restricció a la taxonomia mamífers, amb una tolerància d'error de massa de 50 ppm, un marge d'error per la tripsina d'un sol tall, iodoacetamida com a modificació de cisteïna, i oxidació de metionina com a modificació variable. Les proteïnes es consideren indentificades quan tenen un *score* positiu ($P < 1.e-6$), una massa molecular i pI semblant a la obtinguda del gel 2D, la següent proteïna no homòloga té un *score* almenys de dos ordres de magnitud més baixos que el primer i quan els pèptids més abundants de l'espectre es poden assignar a la proteïna identificada. Quan l'*score* més alt identifica la mateixa proteïna de diferents espècies i la distància entre *scores* només és d'un ordre de magnitud, es selecciona la taxonomia *Rattus Norvegicus* perquè es correspon amb l'origen de la mostra. Si no apareix *Rattus Norvegicus*, escollim l'espècie identificada amb l'*score* més alt.
- Fem una reconfirmació dels resultat obtinguts amb el programa Mascott.

7.13.- PREDICCIÓ DE LA SECRECIÓ

PRESENCIA DE PÈPTID SENYAL

Programa:

SignalP V3 (servidor del Center for Biological Sequence Analysis, de la Universitat de Dinamarca)

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

Protocol:

- La seqüència d'aminoàcids en format FASTA de les proteïnes identificades s'analitza mitjançant el programa SignalP V3.
- S'obté una predicció de la presència i localització del pèptid senyal a la part N-terminal (els primers 70 residus).

SECRECIÓ PER VIES NO CLÀSSIQUES

Programa:

SecretomeP V3 (servidor del Center for Biological Sequence Analysis, de la Universitat de Dinamarca)

<http://www.cbs.dtu.dk/services/secretomeP/>

Protocol:

- La seqüència d'aminoàcids en format FASTA de les proteïnes identificades s'analitza mitjançant el programa SecretomeP V3.

- S'obté una predicció de la possible secreció de la proteïna per vies no clàssiques quan l'*score* de *neural network* (obtingut mitjançant algoritmes matemàtics) calculat pel programa és superior a 0,5.

7.14.- PREDICCIÓ DE LES VIES BIOLÒGIQUES IMPLICADES

Programa:

Ingenuity Pathways (IPA)

<http://www.ingenuity.com>

Protocol

La llista de les proteïnes identificades en el secretoma de les cèl·lules en format Uniprot s'analitza mitjançant el programa *Ingenuity Pathways Analysis*. Aquest és un sistema que transforma la llista de proteïnes en un conjunt de xarxes (*networks*) basant-se en la informació emmagatzemada a la seva base de dades (*IPKB, Ingenuity Pathways Knowledge Base*) sobre interaccions entre gens, proteïnes i altres molècules biològiques.

- S'introdueixen com a "proteïnes focus" les que provenen dels nostres resultats de proteòmica per tal d'identificar i explorar possibles xarxes biològiques en les que puguin estar implicades, amb el màxim d'interaccions possibles entre elles.
- Quan l'espècie de la proteïna identificada no era *Rattus Norvegicus*, la seva homòloga corresponent en rata es va obtenir de la base de dades Swiss-Prot i es va introduir al servidor.
- El programa completa les xarxes biològiques amb "proteïnes no-focus" que no provenen de la llista del nostre anàlisi però formen interaccions entre elles.
- Les xarxes es representen en gràficament mitjançant *nodes* (proteïnes) i *edges* (la relació biològica entre els nodes). Les xarxes molt interconectades representen una funció biològica significativa. També es calcula un *score* per saber la probabilitat que les proteïnes focus estiguin presents a la xarxa per atzar.

8.- ESTADÍSTICA

Tots els resultats s'expressen com la mitjana de diferents experiments independents \pm SEM (de l'anglès Standard Error of the Mean). Per l'anàlisi estadístic s'ha realitzat un estudi paramètric amb el test "t de Student", considerant que les mostres no estan aparellades, segueixen una distribució de dues cues i tenen variàncies diferents. S'ha considerat que les mostres són estadísticament significatives quan presenten un valor p inferior a 0,05. Per aplicar el test "t de Student" a les mostres s'ha utilitzat el programa Excel (Microsoft).

IV.- RESULTATS

OBJECTIU I

A.- Obtenció i caracterització del cultiu primari ABCG2(+)

1.- Establiment del cultiu primari ABCG2 (+)

Una vegada extrets els pàncreas de les rates lactants i acabada la digestió enzimàtica vam obtenir una mostra disgregada i homogenada seguint el protocol descrit en el material i mètodes. Aquest material cel·lular va ser sembrat en flascons de cultiu sota la pressió selectiva del fàrmac mitoxantrone a 8 μ M. El mitoxantrone és un agent antitumoral que és substrat específic del transportador de membrana ABCG2, per tant serà una droga tòxica per les cèl·lules que no expressen aquest transportador de membrana.

Durant les dues primeres setmanes de selecció, es va poder observar un primer període on s'apreciaven signes evidents d'apoptosi en la gran majoria de les cèl·lules (fig. 1 A, B). Passat el temps de selecció, les cèl·lules que van sobreviure al fàrmac es van expandir formant una monocapa homogènia on s'observava un sol fenotip cel·lular, d'aspecte fibroblastoid.

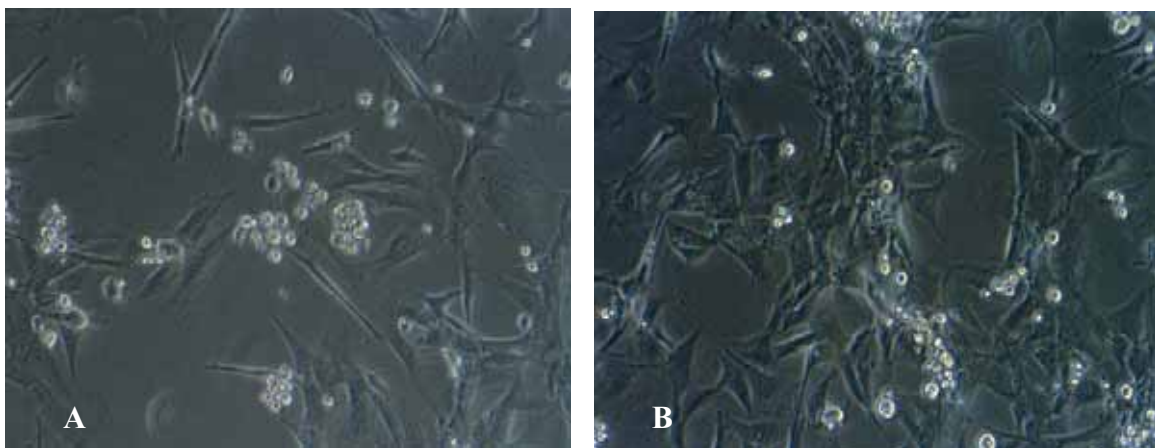


FIGURA 1: (A, B) Morfologia del cultiu primari durant la selecció amb el mitoxantrone. S'observen cèl·lules en creixement, que formen una monocapa d'aspecte fibroblastoid. Magnificació 20X.

2.- Cariotip compatible amb una línia cel·lular establerta

Encara que no es coneix amb precisió el mecanisme d'acció molecular del mitoxantrone, està descrit que actua a través de la inhibició de la topoisomerasa II i tindria com a efecte la interrupció de la síntesi i reparació del DNA. Per tant, es va realitzar un estudi del cariotip per avaluar si la utilització del fàrmac en els nostres cultius estava produint danys cromosòmics que poguessin invalidar els estudis posteriors.

Una primera aproximació va ser mantenir la pressió selectiva del Mitoxantrone de manera contínua en els cultius. Els resultats del cariotipatge de les cèl·lules mentre estaven tractades amb mitoxantrone presentaven múltiples aberracions cromosòmiques: triploidia en un 86.8% i tetraploidies en un 13.2%, a més d'observar-se una excessiva fragilitat cromosòmica.

Resultats

Davant d'aquests resultats, es va decidir establir la durada del tractament amb mitoxantrone en 14 dies (veure material i mètodes). Es va procedir a retirar el fàrmac després de la selecció de les cèl·lules durant 14 dies, quan s'observa el creixement del cultiu en forma de monocapa amb les cèl·lules que han sobreviscut a la selecció, i es procedeix a realitzar un segon cariotip. Els resultats d'aquest van ser: nombre modal de cromosomes ($n=42$) en un 86% de les cèl·lules, un 19.4% de poliploidia en els cromosomes 1 i 3 i un 9% de fragilitat cromosòmica (veure **figura 2**). El resultat obtingut en aquest segon anàlisi reflectia una millora substancial en el cariotip de les cèl·lules en cultiu que ens permetia poder continuar el nostre estudi.

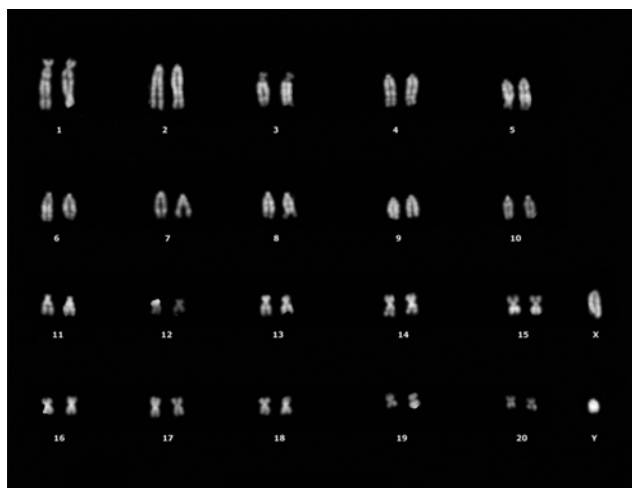


FIGURA 2.- Cariotip del cultiu primari ABCG2+ després de la selecció amb mitoxantrone durant 14 dies. S'observa un resultat compatible amb el cariotip d'una línia cel·lular establerta.

3.- Demostració de la funcionalitat del transportador ABCG2

Per comprovar que la nostra selecció cel·lular utilitzant el mitoxantrone havia estat eficient, es va realitzar un primer anàlisi d'expressió gènica mitjançant RT-PCR amb extractes d'RNA totals obtinguts en diferents passatges del nostre cultiu primari de pàncreas (CPP) (Passatges 2, 6, i 10). Els resultats van demostrar l'expressió d'ABCG2 en tots els passatges analitzats, i n'observem un gel representatiu a la **figura 3 A**.

Amb aquesta primera evidència que la nostra selecció havia estat correcta, es van realitzar assajos funcionals d'extrusió del mitoxantrone a través del transportador. El fet que el mitoxantrone és un substrat fluorescent ens permet la seva detecció de manera directa en les cèl·lules tractades.

Els resultats citomètrics mostren una única població cel·lular segons els paràmetres de tamany i composició citoplasmàtica (**fig. 3 B**). Els assajos funcionals de la població cel·lular mostren que el transportador ABCG2 té la capacitat d'extruir el fàrmac de l'interior de la cèl·lula (**fig. 3 C**), i per tant es pot considerar funcional. Quan les cèl·lules en presència de mitoxantrone eren tractades amb un inhibidor del transportador ABCG2, aquesta capacitat d'extrusió es perdia i el fàrmac era acumulat en el citoplasma cel·lular (**fig. 3 C M2**), quedant reflectit en un augment de la fluorescència de les cèl·lules tractades amb l'inhibidor respecte a les cèl·lules que estan mantingudes únicament amb mitoxantrone (**fig. 3C, M1**). La població control sense

mitoxantrone (control d'autofluorescència) es representa a la **figura 3C M0**. A més del mitoxantrone, també es van complementar els assajos d'extrusió amb altres substàncies que poden ser transportades a través d'ABCG2 com Rho123, doxorubicina i danorrubicina. Els resultats de la citometria van confirmar la funcionalitat del transportador en el cultiu primari, que manté la capacitat d'extruir aquestes substàncies.

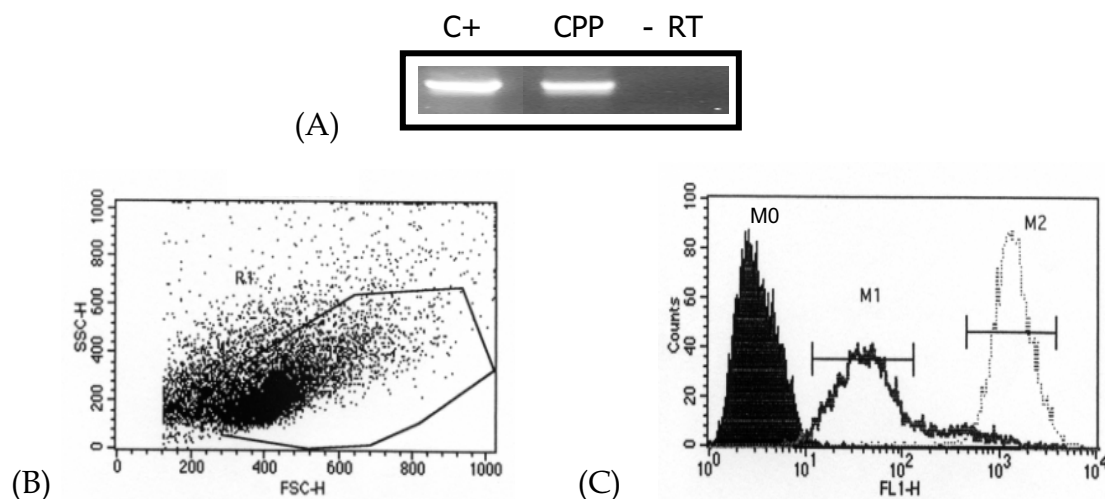


FIGURA 3: (A) Expressió d'ABCG2 en el cultiu primari establert després de la selecció amb el Mitoxantrone (Passatge 2). En el primer carril tenim el control positiu (línia cel·lular ARIP), en el segon carril tenim el cultiu primari de pàncreas (CPP) i en el tercer carril hi ha el control negatiu de la PCR (-RT). (B) Histograma representatiu (*dot plot*) del cultiu primari on observem una única població. FSC-H *forward scatter* (tamany cel·lular), SSC-H *side scatter*, (granulositat citoplasmàtica). (C) Assajos funcionals de l'extrusió de mitoxantrone del cultiu primari. Observem autofluorescència del cultiu (M0), cultiu primari tractat amb mitoxantrone (fracció M1), i cultiu primari tractat amb mitoxantrone més l'inhibidor del transportador (fracció M2). Els experiments es van dur a terme per triplicat en n=3 experiments independents, i la figura il·lustra un histograma representatiu.

Els resultats de la funcionalitat del transportador obtinguts per citometria, també van ser confirmats per microscopia de fluorescència. A la **figura 4** s'observa la comparació dels cultius control tractats només amb mitoxantrone (**fig. 4 a,b**) amb els cultius que han estat tractats amb mitoxantrone i l'inhibidor del transportador (verapamil) (**fig. 4 c,d**). Les observacions es van dur a terme durant diferents períodes de temps (2 i 10 minuts). Veiem que als 2 minuts hi ha poca fluorescència en el citoplasma de les cèl·lules en les dues condicions estudiades (**fig. 4 a,c**), però que als 10 minuts (**fig. 4 b,d**) aquesta fluorescència citoplasmàtica presenta un increment només en les cèl·lules tractades amb l'inhibidor (**fig. 4 d**), és a dir en aquelles cèl·lules que no poden extruir el mitoxantrone. Aquesta fluorescència es va observar de manera homogènia en el 100% de les cèl·lules en cultiu analitzades.

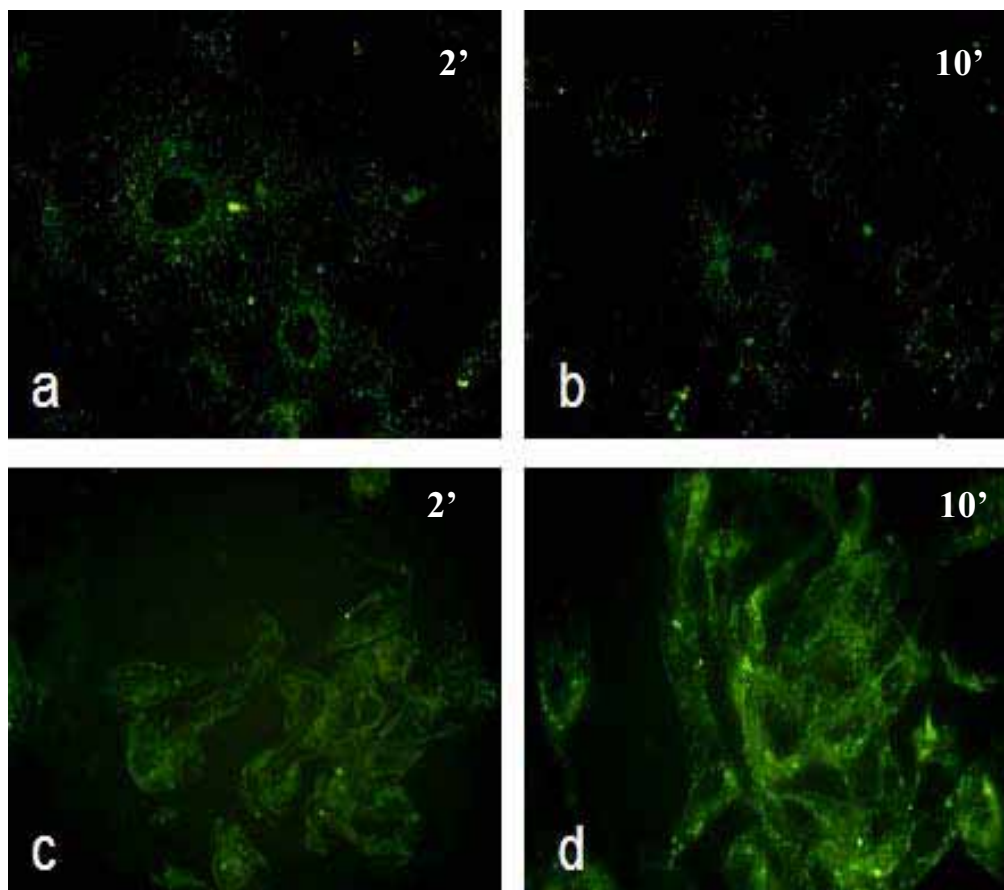


FIGURA 4: Figura representativa de l'anàlisi de l'extrusió de mitoxantrone del cultiu primari. (a,b) Corresponen al cultiu primari en presència únicament del fàrmac. (c,d) Corresponen al cultiu primari en presència del fàrmac més l'inhibidor del transportador (verapamil). Els temps de tractament són 2 minuts (a,c) i 10 minuts (b,d). Magnificació 40X.

4.- Caracterització del cultiu primari ABCG2(+)

4.1.- Canvis morfològics

Durant l'expansió del cultiu sense mitoxantrone es van poder observar canvis fenotípics en les cèl·lules (veure esquema de formació del cultiu primari, **fig 5 A**). Aquests canvis queden reflectits en l'observació de la morfologia de les cèl·lules durant l'evolució del cultiu primari: des de les cèl·lules en monocapa amb aspecte fibroblastoid, que anomenarem **estadi 1** (**fig. 5 B a**) fins a la formació espontània d'estructures tridimensionals (*clusters*) que anomenarem **estadi 2** (**fig. 5 B b,c,d,e**). Les mesures dels *clusters* cel·lulars donen un diàmetre mitjà de $29,75\mu\text{m}\pm 11.4$.

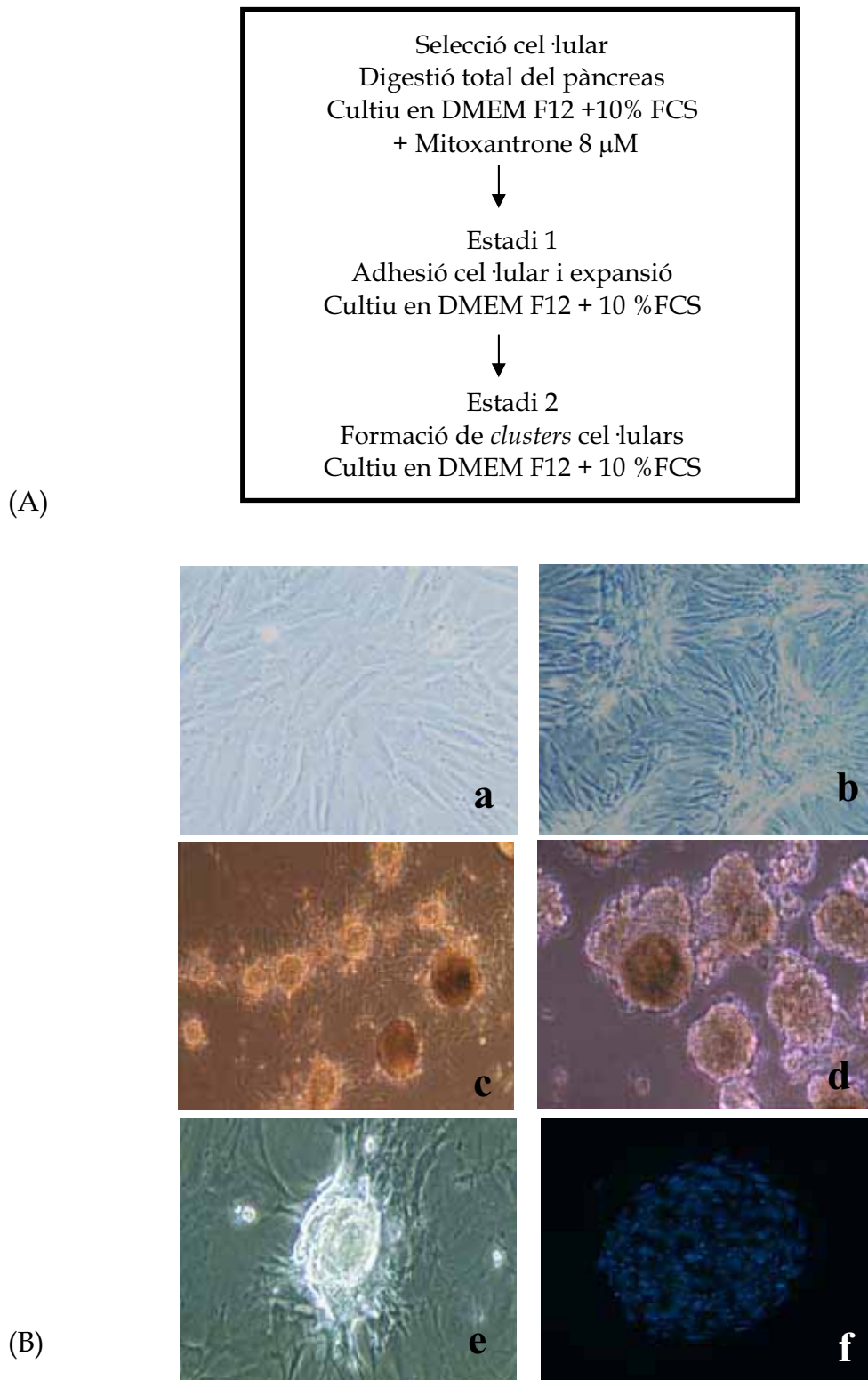


FIGURA 5: (A) Esquema de l'establiment del cultiu primari. (B) Observació morfològica dels canvis en el cultiu primari ABCG2 (+) sense el fàrmac de selecció (mitoxantrone), on s'observen les fases de formació de les estructures tridimensionals: (a) cèl·lules en monocapa o estadi 1, (b) primeres formacions dels *clusters* cel·lulars, (c) formació dels *clusters* o estadi 2, (d) detalls d'alguns dels *clusters* en suspensió, (e) detall d'un *cluster* cel·lular. (f) Tinció amb Hoescht on s'observen els nuclis cel·lulars. Magnificació 20X (a-d), 40X (e), 63X (f).

4.2.- Disminució de la proliferació en els *clusters* cel·lulars

Observant aquests dos fenotips en el cultiu primari, es van fer assajos per valorar si hi havia diferències en la proliferació cel·lular entre *clusters* (estadi 2) i la monocapa de cèl·lules (estadi 1). Els resultats obtinguts mitjançant la mesura de la incorporació de timidina tritiada van demostrar que l'estadi 2 proliferava 2,4 vegades menys que l'estadi 1 (**fig. 6**).

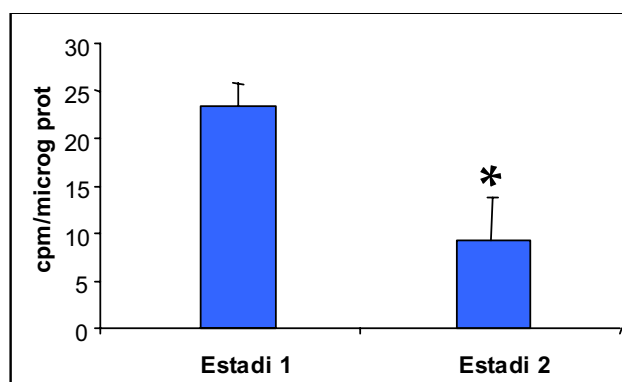


FIGURA 6: Histograma representatiu de la incorporació de timidina tritiada en el cultiu cel·lular: estadi 1 (cèl·lules en monocapa) i en l'estadi 2 (*clusters* cel·lulars). Els resultats mostren la mitjana de tres experiments independents (n=3). Les barres d'error representen l'error estandard de la mitjana (SEM). *p<0,05

4.3.-Caracterització immunològica i gènica

4.3.1.- Marcadors de cèl·lules progenitores

En els últims anys, l'expressió del transportador ABCG2 s'ha associat a la pluripotencialitat cel·lular, per tant una primera immunocaracterització del cultiu ens va portar a analitzar marcadors de cèl·lules progenitores de diferents llinatges cel·lulars: thy 1.1, nestina, FGFR1-IIIb, i NCAM. Observem que les cèl·lules dels nostres cultius presenten immunopositivitat en tots els marcadors estudiats (thy1.1, nestina i NCAM) (**fig. 7 A**). Aquests marcadors, i també FGFR1(IIIb), es van confirmar per RT-PCR tant en l'estadi 1 com en l'estadi 2 del cultiu (**figura 7 B**).

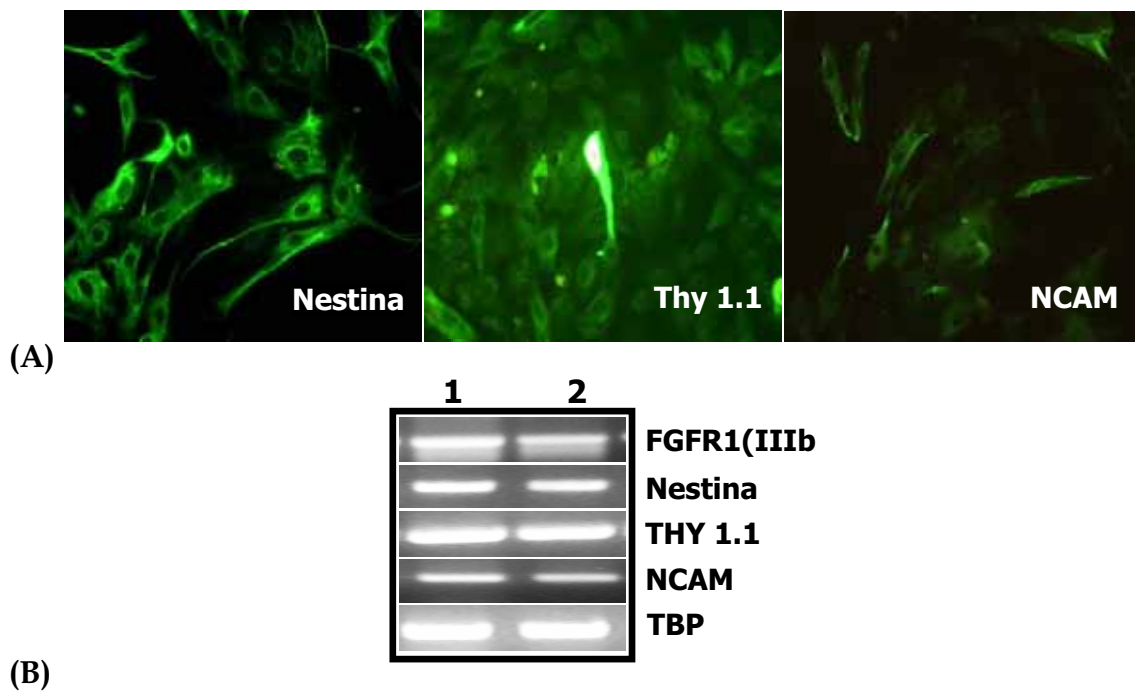


FIGURA 7: (A) Immunocitoquímica dels cultius primaris en estadi 1 dels marcadors nestina, thy1.1 i NCAM. Magnificació 20X. (B) Gel representatiu de la RT-PCR dels marcadors FGFR1 (IIIb), nestina, thy1.1 i NCAM, de les mostres en estadi 1 (carril 1) i en estadi 2 (carril 2) utilitzant TBP com a control endogen (n=3).

En el cas dels marcadors troncal thy 1.1 i nestina, es va procedir a quantificar la seva expressió per citometria de flux en els dos fenotips del cultiu (estadi 1 i estadi 2). Els resultats van demostrar una disminució dels dos marcadors troncal en les cèl·lules en estadi 2 comparades amb l'estadi 1: nestina $85.6\% \pm 7.3$ en estadi 1 vs. $29.5\% \pm 4.9$ en el estadi 2; thy1.1 $91\% \pm 3.4$ en estadi 1 vs. $12.9\% \pm 6.5$ en estadi 2.

4.3.2.- Altres marcadors cel·lulars

Per tal d'investigar el llinatge cel·lular del cultiu primari es va utilitzar diferents marcadors que permeten analitzar diferents estirps cel·lulars: origen mesenquimal (vimentina), muscular (desmina i alfa-actina), neural (GFAP), neuroendocrí (cromogranina A). Els resultats obtinguts tan d'immunofluorescència com d'expressió gènica en estadi 1 i estadi 2 van ser positius per tots els marcadors analitzats (**fig. 8 A, B i C**). Tot i que les tècniques emprades no són quantitatives, s'observava una disminució en el nombre de cèl·lules positives per alfa-actina i GFAP en l'estadi 2 respecte a l'estadi 1.

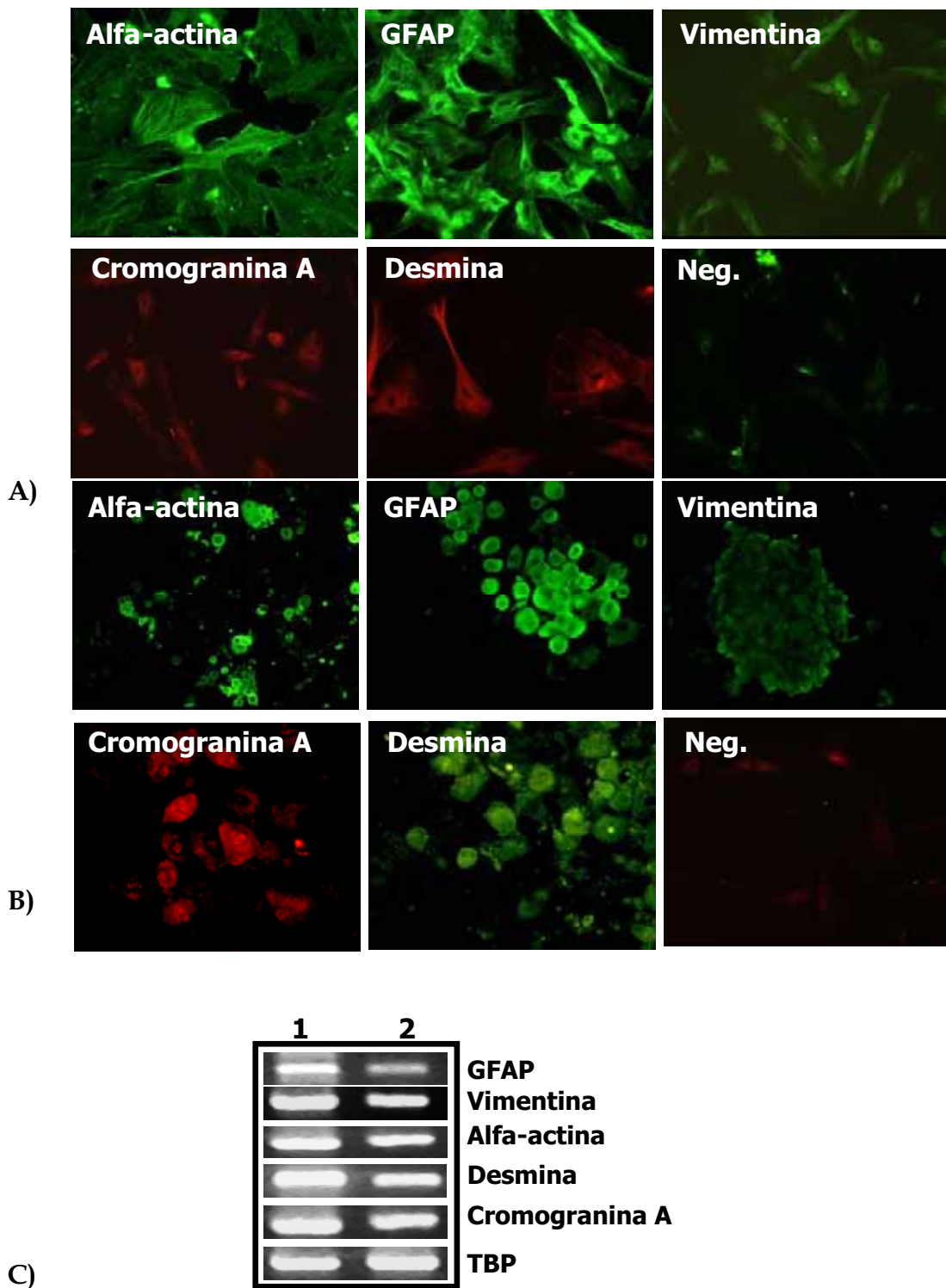


FIGURA 8: (A) Tinció immunocitoquímica de les cèl·lules en estadi 1 dels marcadors alfa-actina, GFAP, vimentina, cromogranina A i desmina. Magnificació 20X. (B) Immunocitoquímica de les cèl·lules en estadi 2 dels mateixos marcadors. Les figures inclouen un control negatiu de l'anticòs secundari. Magnificació 20X. (C) Gel representatiu de la RT-PCR dels marcadors GFAP, vimentina, alfa-actina, desmina i cromogranina A de les mostres en estadi 1 (carril 1) i en estadi 2 (carril 2) utilitzant TBP com a control endogen (n=3).

També van observar-se fenòmens d'auto-fluorescència, que van ser més evidents en l'estadi 2 de cultiu primari comparats amb l'estadi 1 (**fig. 9 A, B**).

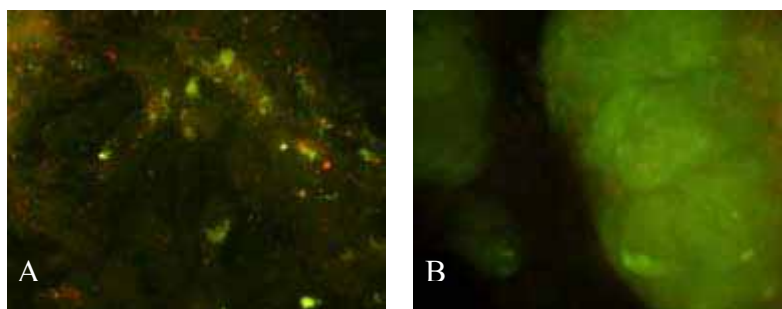


FIGURA 9: Observació d'autofluorescència del cultiu primari en l'estadi 1 (A) i en l'estadi 2 (B). Magnificació 63X.

L'anàlisi de tots els resultats obtinguts fins ara indicaven que, si bé estava descrita la presència de la població SP en el pàncreas adult, el nostre procediment havia seleccionat un tipus cel·lular anomenat "**cèl·lules pancreàtiques estrellades**". A partir d'ara ens referirem al cultiu seleccionat com **PaSC/ABCG2+**. Per acabar de confirmar la caracterització es va dur a terme la tinció d'Oil Red, que marca material liposoluble acumulat en el citoplasma cel·lular, i en el nostre cas indica la presència de vitamina A característica d'aquest tipus cel·lular. Els resultats observats després de la tinció indiquen que a les cèl·lules en monocapa hi ha poca presència de dipòsits de vitamina A (**fig. 10 A, B**), en canvi en els *clusters* cel·lulars s'aprecia un augment significatiu de la tinció (**fig. 10 C**).

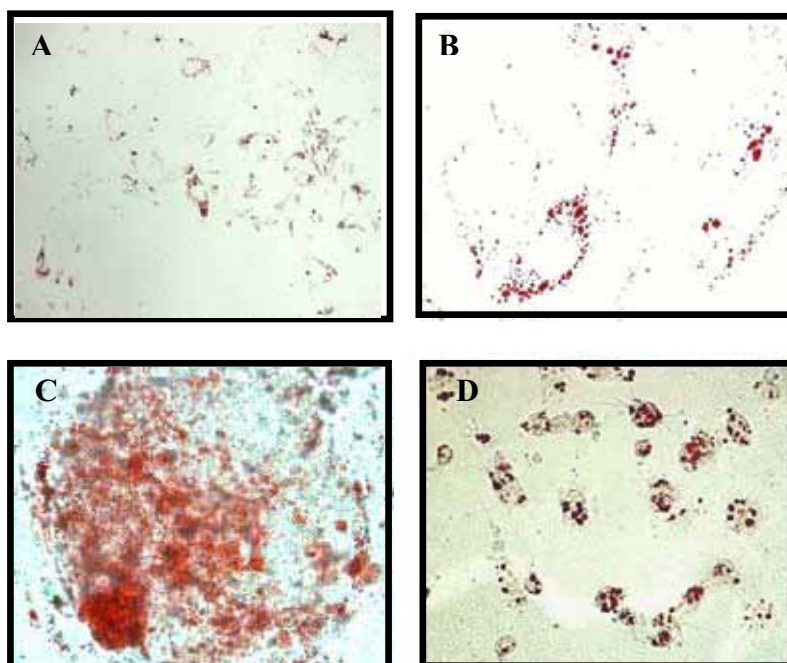


FIGURA 10: Tinció d'Oil Red en les cèl·lules PaSC/ABCG2+: estadi 1 (A), detall cel·lular de l'estadi 1 (B), i estadi 2 (C). Control positiu de la tinció utilitzant cultius primaris de cèl·lules hepàtiques estrellades cedits pel Dr Pablo Engel (D). Magnificació 20X (A), 40X (B), 63X (C), 40X (D).

Resultats

Una altra característica de les cèl·lules estrellades és el paper en la remodelació de la matriu extracel·lular, amb la síntesi de fibres de col·lagen. La detecció mitjançant RT-PCR dels marcadors més importants implicats en aquesta remodelació seria una evidència més del tipus cel·lular aïllat. En la **figura 11** s'observa tant en l'estadi 1 com en l'estadi 2 l'expressió de col·lagen I, metal·loproteïnes (MMP2), i inhibidors de les metal·loproteïnes (TIMP1).

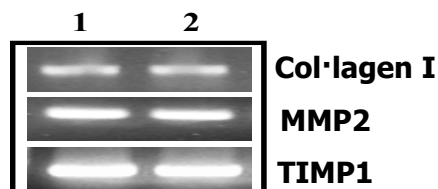


FIGURA 11: Gel representatiu de l'expressió de marcadors col·lagen I, MMP2 i TIMP1 en el cultiu primari, tant en cèl·lules en estadi 1 (carril 1) com en estadi 2 (carril 2), n=3.

El CD38 és un marcador expressat en molts tipus cel·lulars, que recentment ha estat detectat a la membrana plasmàtica de cèl·lules hepàtiques estrellades en cultiu primari. L'anàlisi citomètric representat a la **figura 12** mostra una positivitat per CD38 en les cèl·lules del nostre cultiu primari PaSC/ABCG2+ en estadi 1 d'un 17%.

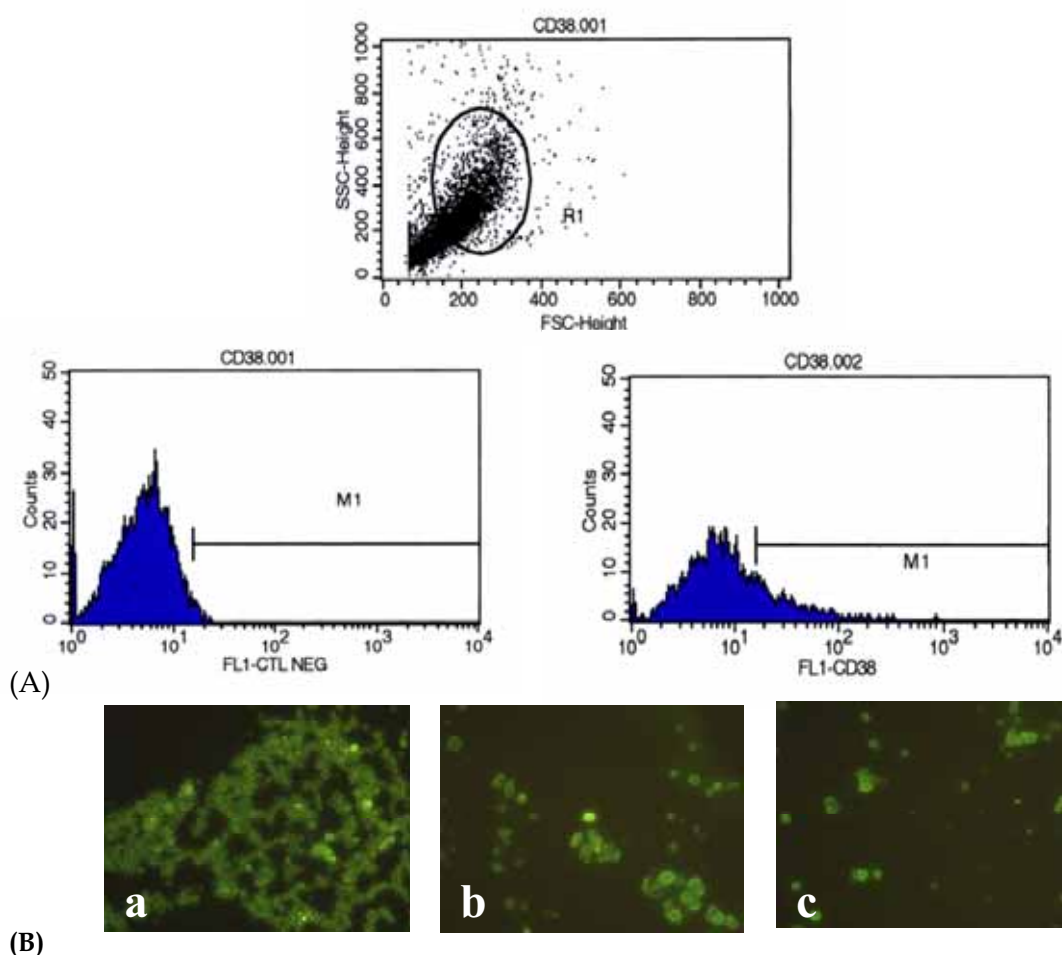


FIGURA 12: (A) Histograma (dot plot) on es representa la tinció per CD38 del cultiu primari en estadi 1. FSC-H *forward scatter* (tamany cel·lular), SSC-H *side scatter*, (granulositat citoplasmàtica). Establim la fluorescència amb el control negatiu (només anticòs secundari) i

detectem el marcatge en el 17% de la nostra població. (B) Detall de les cèl·lules en suspensió tenyides per CD38 un cop analitzades per citometria (a, b, c). Magnificació 40X.

Altres marcadors descrits en la caracterització de cèl·lules hepàtiques estrellades són molècules d'adhesió de la superfamília de les immunoglobulines (NCAM, VCAM i ICAM). En els nostres cultius, a més de la presència de NCAM (veure figura 7) es va detectar VCAM (CD106), (fig. 13 a).

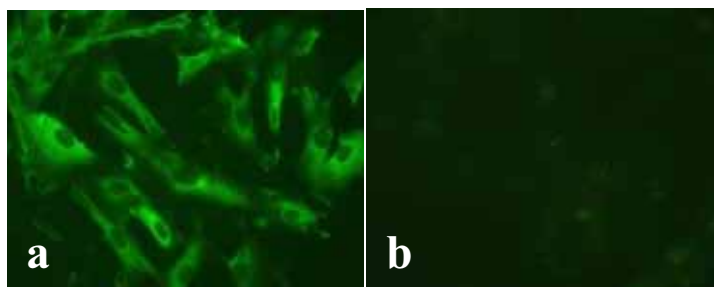


FIGURA 13: Tinció immunocitoquímica de les molècules d'adhesió VCAM (CD106) (a), i control negatiu de la tinció (només anticòs secundari) (b) en el cultiu primari. Magnificació 20X (a-b).

Detectada la presència de FGFR1(IIIb) (veure figura 7) vam investigar l'expressió dels seus lligands per RT-PCR com FGF1, FGF7, FGF8 i FGF10 (fig 14 B), així com d'altres FGFR implicats en la proliferació de cèl·lules progenitores (fig 14 A). Els resultats obtinguts van ser positius per tots els marcadors analitzats.

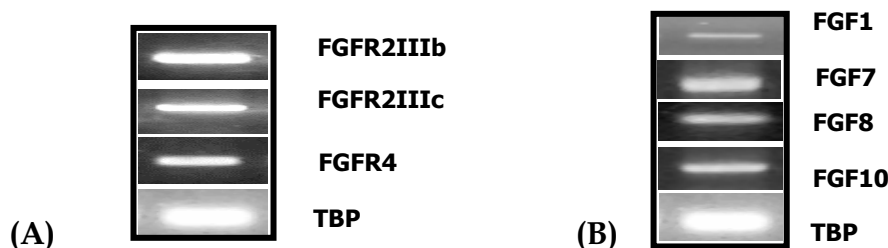


FIGURA 14: Gel representatiu de l'expressió de receptors en el cultiu primari en estadi 1 de *fibroblast growth factors* (FGFR) (A) i dels seus lligands (B) (n=3).

4.4.- Demostració de la capacitat d'endocitar dextrà

S'ha demostrat recentment que les cèl·lules estrellades tant hepàtiques com pancreàtiques tenen capacitat d'internalitzar molècules. Per avaluar aquesta capacitat en els nostres cultius PaSC/ABCG2+ es van fer assajos d'internalització de molècules de dextrà d'alt pes molecular (70Kda) per demostrar la capacitat d'endocitosi a través de receptor específic (el dextrà s'uneix al receptor de mannosina). En els resultats obtinguts podem observar com el dextrà marcat amb FITC és incorporat a l'interior de les cèl·lules (fig. 15 A a,b,c). El control negatiu correspon a cèl·lules on el procés s'ha realitzat a 4°C, temperatura que impedeix la internalització d'aquesta molècula de dextrà (fig. 15 A, a',b',c').

D'altra banda també es va localitzar la presència de lisosomes tardans mitjançant el marcatge amb la molècula LAMP2 (fig. 15 B, a, b).

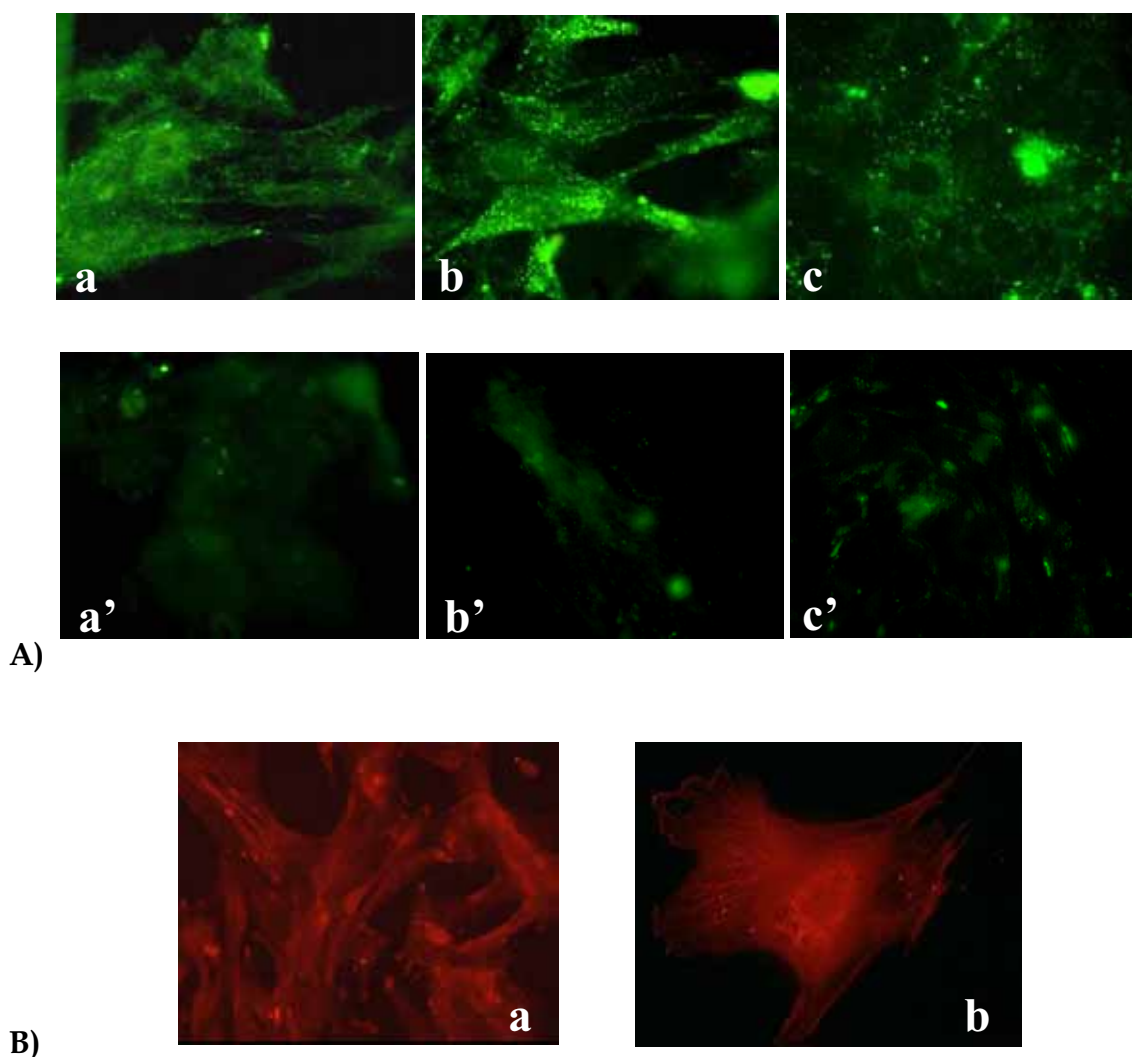


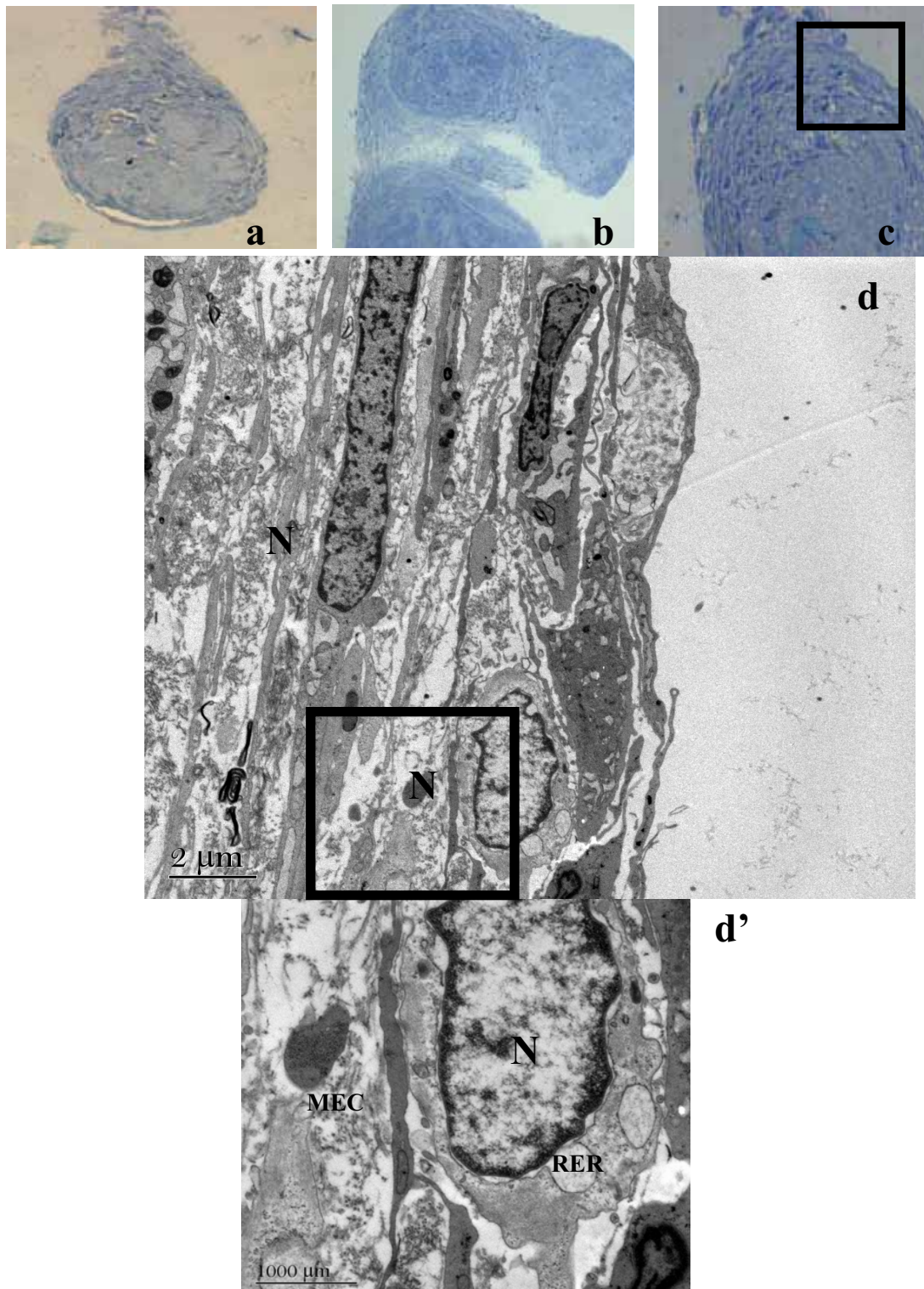
FIGURA 15: (A) Endocitosis del dextrà per part de les cèl·lules del cultiu primari a diferents temps: 15 minuts (a), 30 minuts (b) i 45 minuts (c). Cèl·lules on el procés s'ha realitzat a 4°C a diferents temps: 15 minuts (a'), 30 minuts (b') i 45 minuts (c'). Magnificació 20X (a-c, a'-c'). (B) Tinció immunocitoquímica de LAMP2 del cultiu primari (a) i detall cel·lular (b). Magnificació 20X (a), 63X (b).

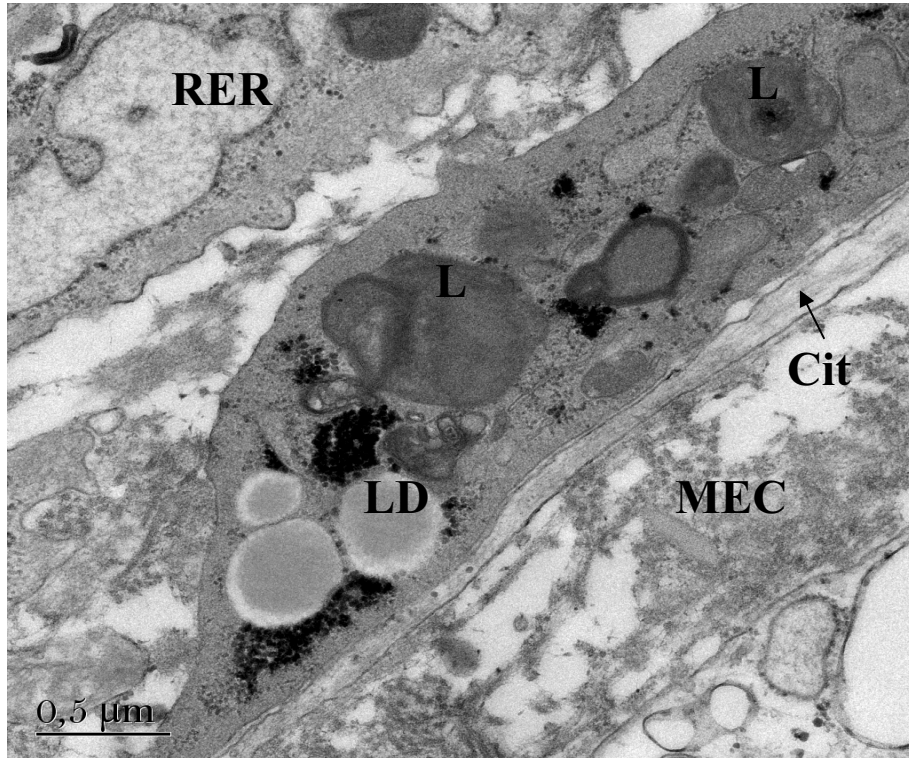
4.5.- Caracterització ultraestructural

Una darrera aproximació va ser centrar-nos en l'estudi ultraestructural del cultiu primari en estadi 2 utilitzant microscopia electrònica de transmissió. En la **figura 16 (a,b,c)** veiem els talls semifins on s'observa la disposició de les cèl·lules que formen el *cluster*. S'observa una major concentració cel·lular a la perifèria de l'estructura (**fig. 16 a, c**), amb connexions cel·lulars entre les diferents estructures que apareixen en el cultiu (**fig. 16 b**).

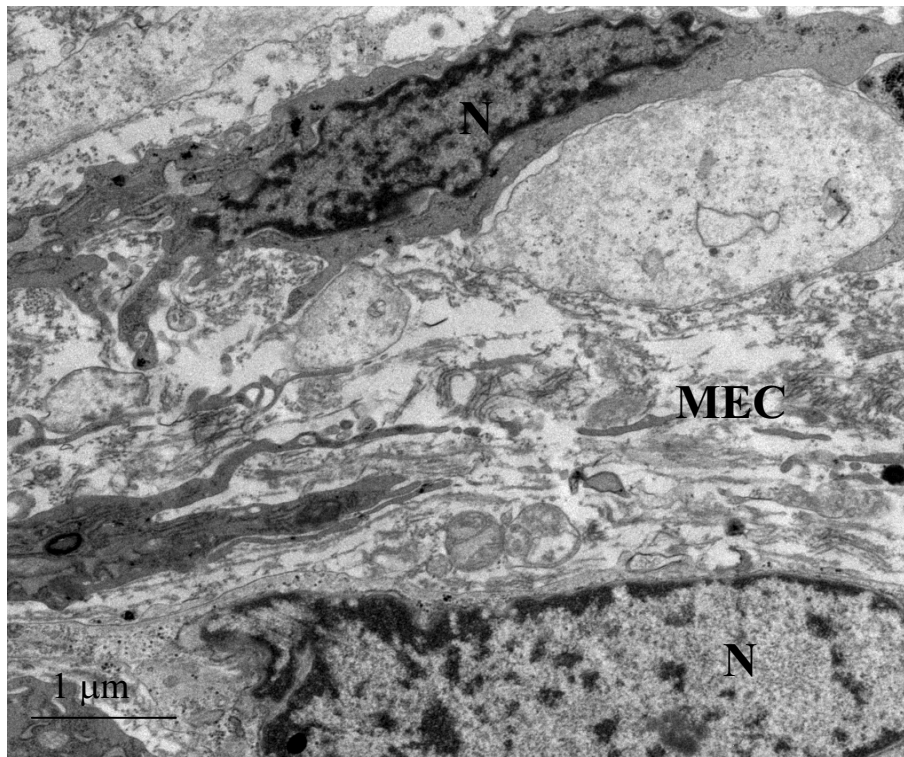
De l'observació ultraestructural de l'àrea assenyalada a la **figura 16 c** podem destacar diferents electrodensitats tant citoplasmàtiques com nuclears entre les cèl·lules analitzades (**fig. 16 d, f**). Aquesta diferent electrodensitat podria estar indicant diferències en l'estat d'activació de les cèl·lules estrellades. Totes les cèl·lules observades presenten un reticle endoplasmàtic rugós molt desenvolupat amb signes evidents d'hipertrofia (**fig. 16 d', g, e, i**), també veiem abundants lisosomes (**fig. 16 e, i**),

i algunes gotes lipídiques al citoplasma compatibles amb els dipòsits de vitamina A (**fig. 16 e**). L'aparell de Golgi també està molt desenvolupat (**fig. 16 g, g'**), i hi ha pocs mitocondris. Les cèl·lules presenten un aspecte fibroblastoid, amb interdigitacions de la membrana plasmàtica (**fig. 16 f**, cèl·lula superior). A l'espai extracel·lular s'observen abundants fibres, compatibles amb fibres de col·lagen, que veiem tant en tall longitudinal (**fig. 16 i**) com en tall transversal (**fig. 16 g**). Les observacions del centre de l'estructura ens mostren menys cel·lularitat que a la perifèria, el tamany cel·lular és més petit i també presenten interdigitacions de la membrana plasmàtica (**fig. 16 h**). La matriu extracel·lular és més densa a l'interior de l'estructura, i no s'hi observen fibres.

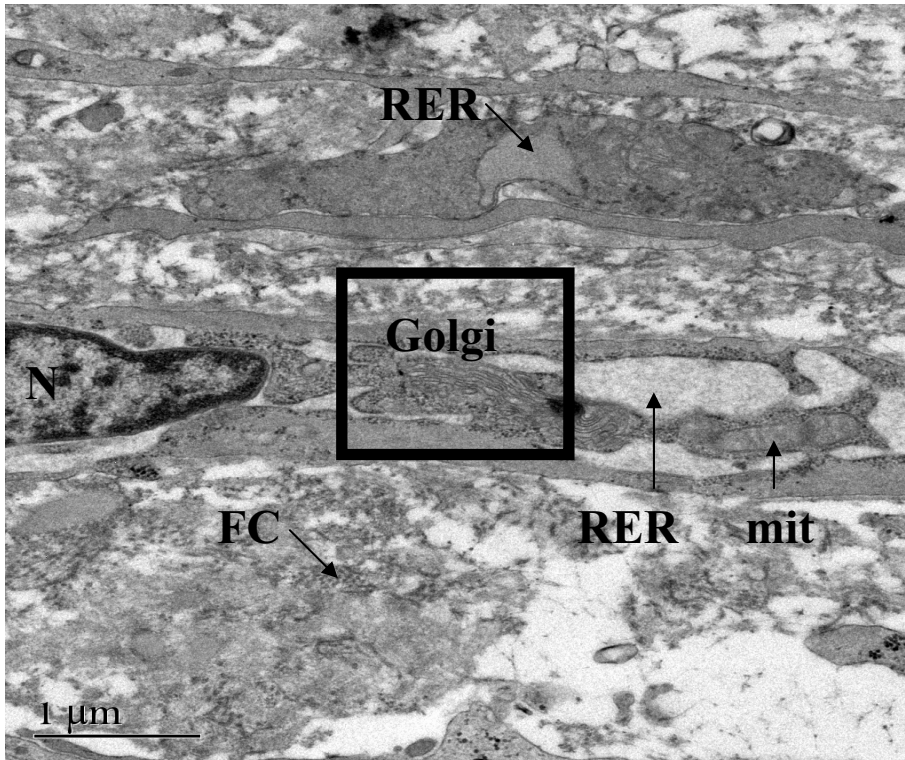




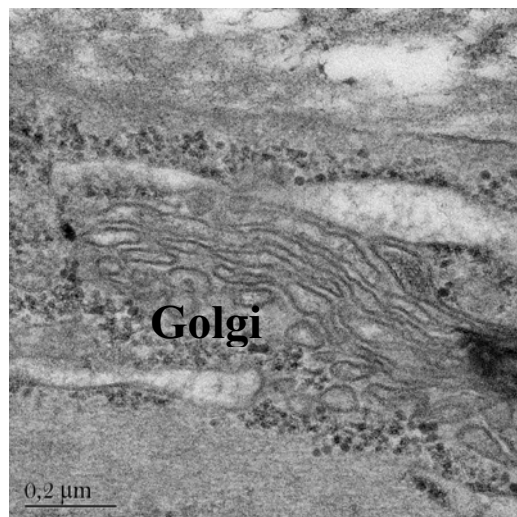
e



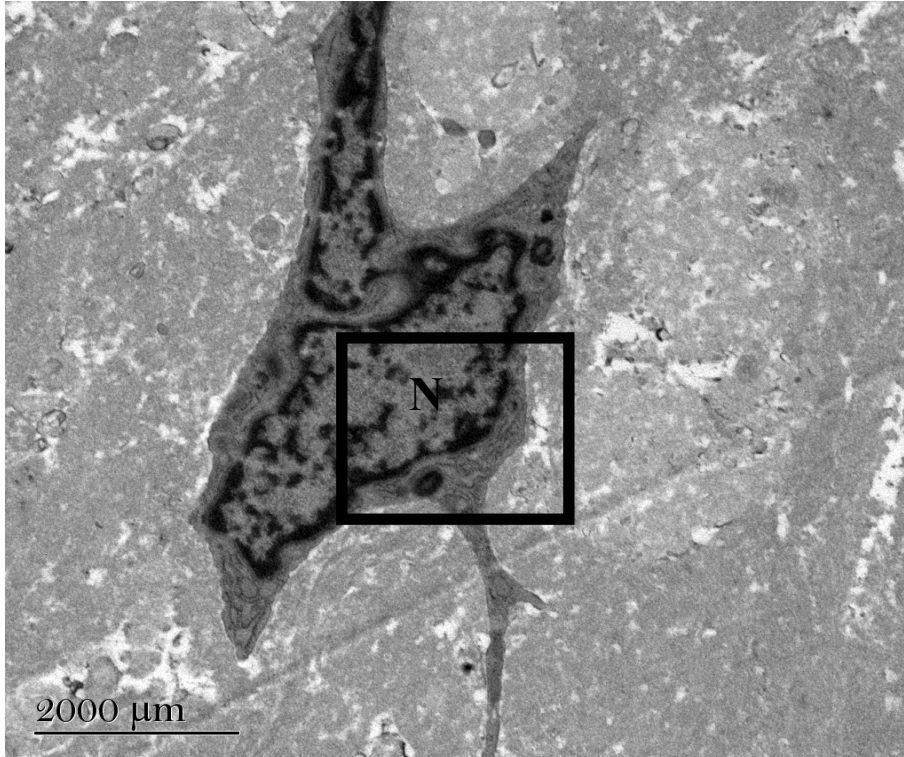
f



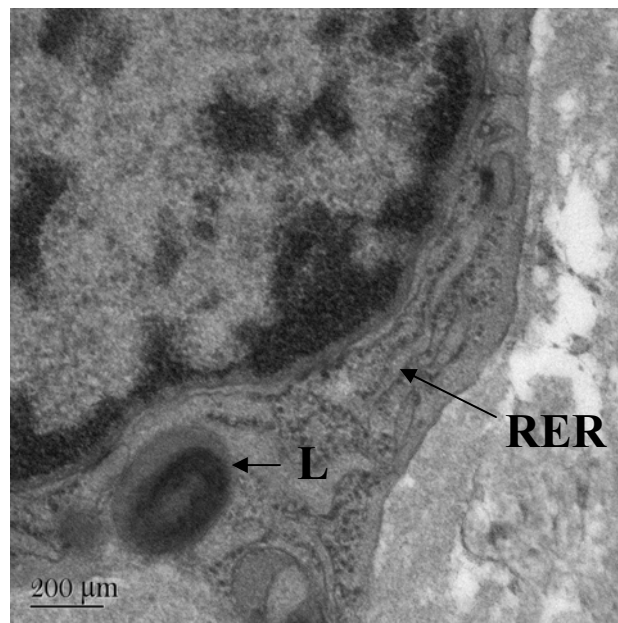
gg



gg,



h



h'

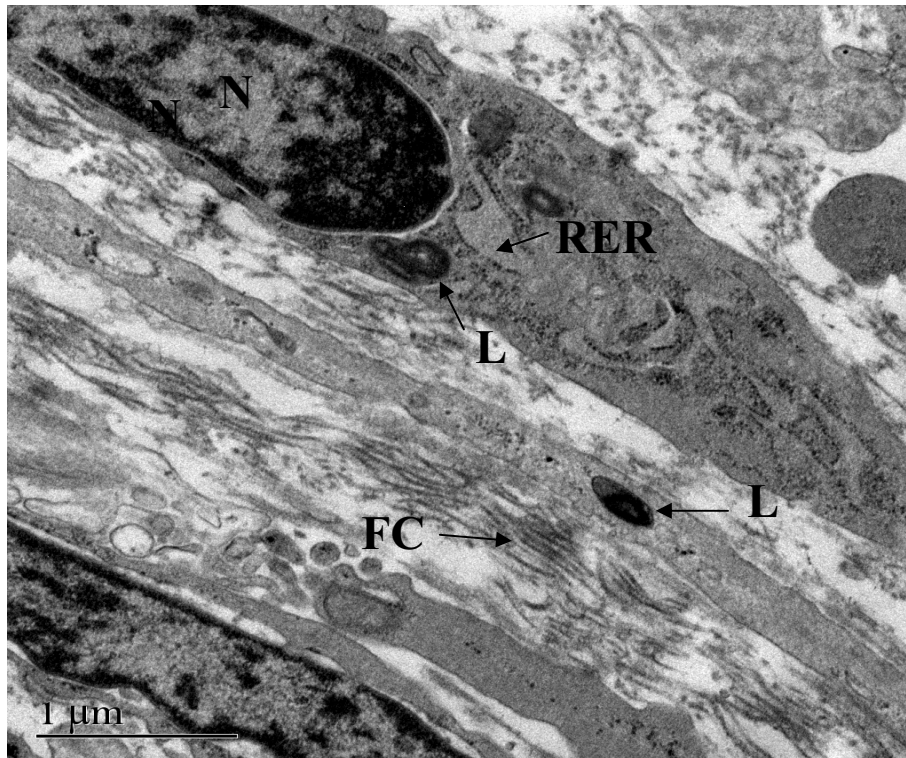


FIGURA 16: (a,b,c) Talls semifins previs a la microscopia electrònica. (d,e,f,g,h,i) Imatges de microscopia electrònica de transmissió del cultiu primari en estadi 2, (d',g'h') detalls d'imatges de microscopia electrònica de transmissió del cultiu primari en estadi 2. Reticle endoplasmàtic rugós (RER) gotes lipídiques (LD), lisosomes (L), fibres de col·lagen (FC), MEC (matriu extracel·lular), mit (mitochondri), cit (citoesquelet), N (nucli). Magnificació 20X (a,b), 40X (c)

B.- Demostració de la seva capacitat de transdiferenciació cap a un fenotip de cèl·lula productora d'insulina

5.- Expressió de marcadors endocrins

Una vegada caracteritzat el cultiu primari, i per poder continuar amb l'objectiu I, vam avaluar si les cèl·lules del cultiu PaSC/ABCG2+ podien expressar factors de transcripció implicats en la diferenciació endocrina, i vam escollir PDX1 per la seva rellevància en aquest procés. En les primeres fases d'expansió del cultiu vam detectar per immunofluorescència el factor de transcripció PDX1 al nucli de les cèl·lules (**fig. 17 A, a**), que es correlacionava amb una dèbil expressió d'insulina en el mateix passatge (**fig. 17 B, carril a**). Al llarg de l'expansió del cultiu, es va poder observar la negativització de l'expressió d'insulina (**fig. 17 B, carril b**), i la translocació del factor de transcripció PDX1 del nucli al citoplasma cel·lular (**fig. 17, A,b**).

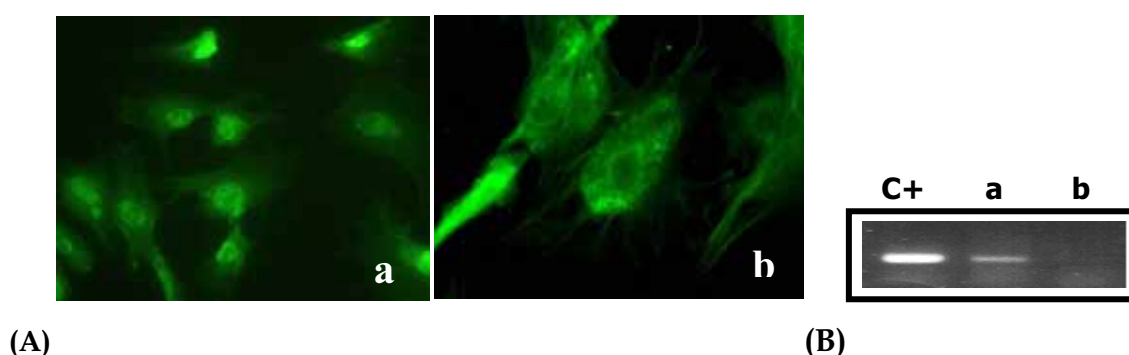


FIGURA 17: (A) Tinció immunocitoquímica de PDX1 (verd). (a) Fases primerenques d'expansió del cultiu, i (b) en fases posteriors. Magnificació 20X (a), 40X (b). (B) Gel representatiu de la RT-PCR de la feble expressió d'insulina en els cultius primaris. En el carril (a) s'observa la banda corresponent a la insulina en passatges primerenques del cultiu i en el carril (b) no observem expressió d'insulina en passatges posteriors del cultiu (n=3). Com a control + hem utilitzat la línia cel·lular MIN6.

6.- Efectes del tractament del cultiu primari amb substàncies potenciadores de la diferenciació:

Els resultats descrits en el punt anterior ens estaven indicant la capacitat potencial de poder transdiferenciar aquest tipus cel·lular en un fenotip endocrí. Per potenciar aquest procés vam utilitzar estratègies inductores de la diferenciació mitjançant el tractament dels cultius PaSC/ABCG2+ amb diferents substàncies diferenciadores utilitzades en altres models cel·lulars descrits a la literatura (**figura 18**). El medi basal DMEMF12 (8 mM glucosa) amb 10% FCS (**fig. 18,1**) va ser suplementat amb nicotinamida a 10 mM (és una forma de la vitamina B12, **fig. 18,2**), dexametasona a 10^{-7} M (és un glucocorticoid, **fig. 18,3**), exendin-4 a 0.1 nM (és un anàleg de GLP1, **fig. 18,4**), o activin A a 2 nM (és un anàleg de TGF β , **fig. 18,5**).

D'una banda es van tornar a analitzar els marcadors de cèl·lules pluripotencials (nestina, thy1.1) i de l'altra el marcador PDX1 (factor de transcripció clau en la diferenciació endocrina). Els resultats observats es representen a la **figura 18**, i malgrat que els resultats són qualitatius, podem suggerir que:

Els diferents tractaments no van modificar l'expressió del marcador thy1.1 (carrils 2-5).

El tractament amb dexametasona (carril 3) va provocar una lleugera disminució de nestina respecte als nivells basals (carril 1), però en cap cas es va negativitzar.

Els tractaments amb exendin-4 i activin-A (carrils 4 i 5) van provocar un increment de l'expressió de PDX1 respecte als nivells basals (carril 1) i a la resta de tractaments (carrils 2,3).

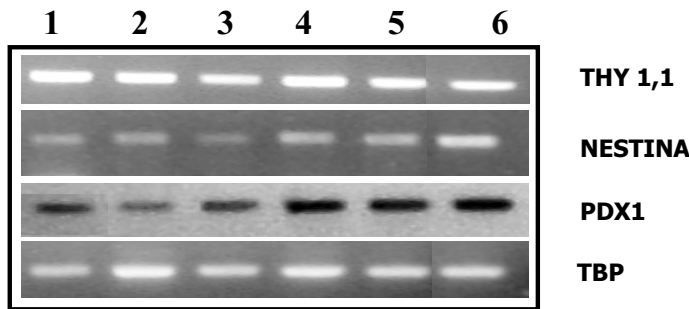


FIGURA 18: Gel representatiu de l'expressió de nestina, thy1.1, pdx1, insulina i TBP en els diferents tractaments del cultiu primari en estadi 1: 1.- Medi basal, 2.- Medi basal + Nicotinamida (10 mM), 3.- Medi basal + Dexametasona (10^{-7} M), 4.- Medi basal + Exendin-4 (0.1 nM), 5.- Medi basal + Activin A (2 nM), 6.- C+ cèl·lules MIN6 (n=3).

7.- Expressió de receptors en el cultiu primari

Veient els efectes tant de l'exendin-4 com de l'activin A en l'increment en l'expressió de PDX1 vam testar l'expressió dels receptors de GLP1 i de TGF β que poguessin explicar els canvis en l'expressió gènica observada en el cultiu. Els resultats obtinguts van ser positius en els dos estadis del cultiu PaSC/ABCG2+ (**fig. 19**).

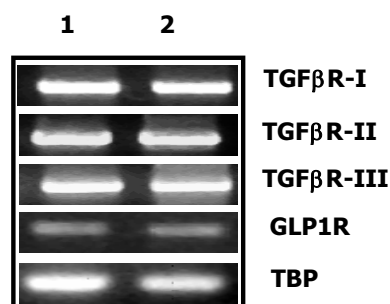


FIGURA 19: Gel representatiu de l'expressió dels receptors de TGF β (I,II i III) i GLP1 en estadi 1 (carril 1) i en estadi 2 (carril 2), (n=3).

8.- Efectes del tractament del cultiu primari amb *cocktail* de diferenciació

Tot i la utilització de les substàncies diferenciadores no vam poder aconseguir que els nostres cultius PaSC/ABCG2+ expressessin altres gens endocrins a més de PDX1. Això ens va fer plantejar la possibilitat de provar altres medis de cultiu en els quals s'utilitza una mescla de substàncies capaç d'induir insulina descrita en altres models cel·lulars (Huang and Tang, 2003).

Els resultats obtinguts amb el *cocktail* de diferenciació descrit a material i mètodes no va provocar canvis expressió a nivell dels marcadors que ja expressen les cèl·lules de manera basal, com són NCAM, nestina o Thy1.1, ni tampoc modifiquen l'expressió de PDX1. Aquest medi però és capaç d'induir l'expressió del gen de Ngn3, factor de transcripció primerenc, implicat en la diferenciació endocrina pancreàtica (**fig 20, carril b**).

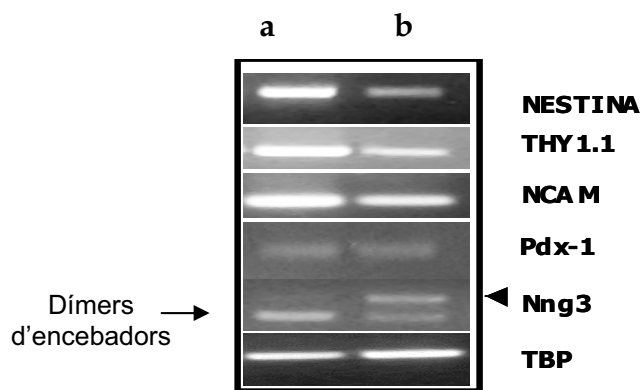


FIGURA 20: Gel representatiu de l'expressió de marcadors del cultiu primari en medi basal (a) o bé amb medi basal suplementat amb el *cocktail* de diferenciació (b) (n=3).

9.- Efectes de la sobreexpressió de Ngn3 en el cultiu primari en estadi 2.

Amb els resultats anteriors, ens vam plantejar investigar si, a més de Ngn3, hi havia altres gens implicats en la diferenciació endocrina que poguessim induir *in vitro* en el nostre model. Per fer-ho, vam sobreexpressar Ngn3 mitjançant infecció amb adenovirus que contenen el constructe de Ngn3, i utilitzant el constructe de β -gal com a control de la infecció (**fig. 21 A**).

Els resultats obtinguts mostren que la sobreexpressió de Ngn3 és capaç d'induir en els nostres cultius l'expressió del factor de transcripció NeuroD1 i incrementar l'expressió de Pax4, Pax6 i Pdx1 comparant amb els cultius control. En canvi, no modifica l'expressió de nestina ni ABCG2, que pràcticament és negativa (**fig. 21 B**).

El fet que la infecció sigui transitòria no ens va permetre detectar la presència de marcadors tardans o de cèl·lula madura com insulina, glucagó, somatostatina, o amilina (IAPP).

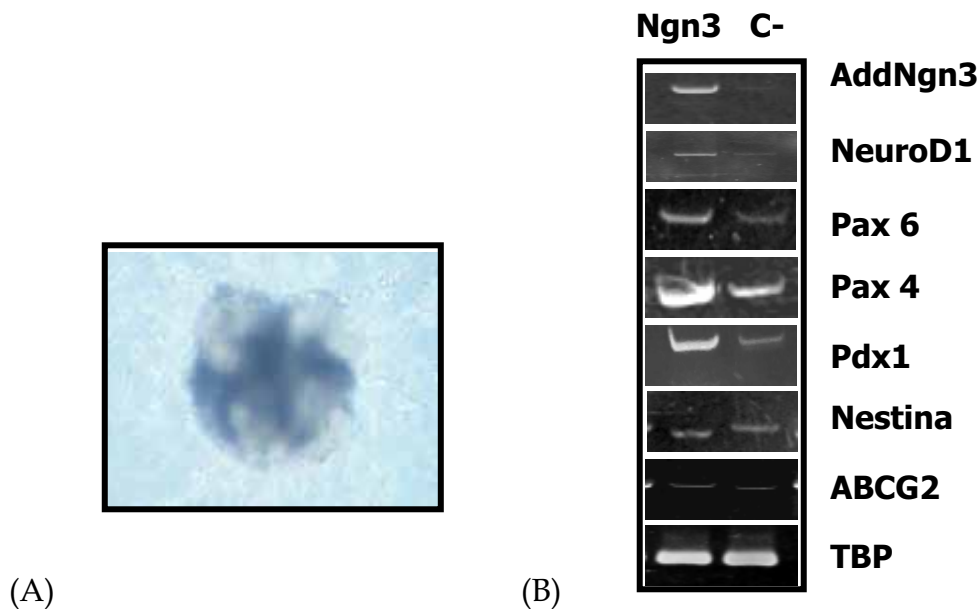


FIGURA 21: (A) Estructura infectada amb el constructe β -Gal. (B) Gel representatiu de l'expressió de marcadors del cultiu primari en estadi 2 després de la infecció amb adenovirus de Ngn3 i β -Gal (Control -): NeuroD1, Pax 4, Pax6, Pdx1, nestina, ABCG2, utilitzant com a endogen TBP (n=3).

10.- Efectes del tractament del cultiu primari en l'estadi 2 amb Matrigel i exendin-4.

La importància del nínxol cel·lular en la diferenciació és un fet clarament demostrat. La utilització de Matrigel com a matriu extracel·lular en diferents models de diferenciació i transdiferenciació cel·lulars provoca canvis tant a nivell morfològic com d'expressió gènica i proteica.

En el nostre cas s'ha treballat amb diferents temps de cultiu i concentracions de Matrigel suplementada amb altres substàncies fins a trobar les condicions òptimes de diferenciació, com es descriu a material i mètodes.

10.1.- Canvis morfològics dels *clusters* en Matrigel

El cultiu en Matrigel provoca canvis en els cultius que es manifesten en l'observació de contactes entre *clusters* a través d'estructures allargades, semblants a petits conductes (fig. 22 A, B, C).

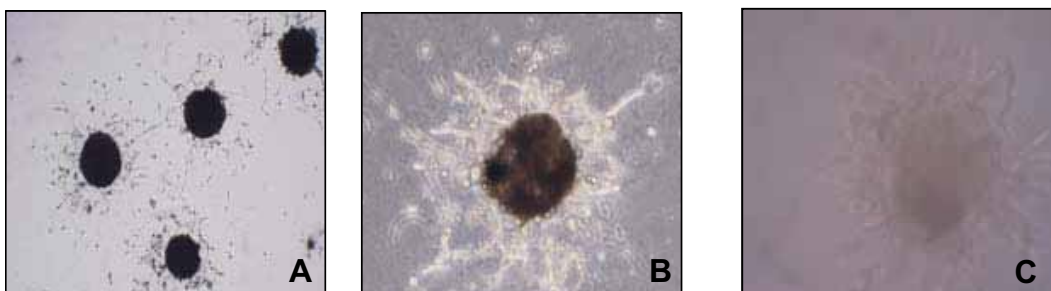


FIGURA 22: (A, B, C) Observació dels clusters cel·lulars cultivats en Matrigel durant 3 setmanes. Magnificació 20X (A), 40X (B), 63X (C).

10.2.- Canvis d'expressió gènica i proteïca

El tractament durant 3 setmanes amb els medis M1 i M2 (**fig. 23**), que inclou Matrigel a diferents concentracions i diferents suplementes, manté els nivells d'expressió de PDX1 i Ngn3, però no observem cap inducció de l'expressió dels altres marcadors estudiats (IAPP, insulina, glucagó, somatostatina, i amilasa).

En canvi, en el tractament amb medi M3 observem un increment de l'expressió de Ngn3, amb la inducció per primera vegada de IAPP i de glucagó. La resta de marcadors són negatius (PDX1, insulina, somatostatina i amilasa) (**fig. 23**).

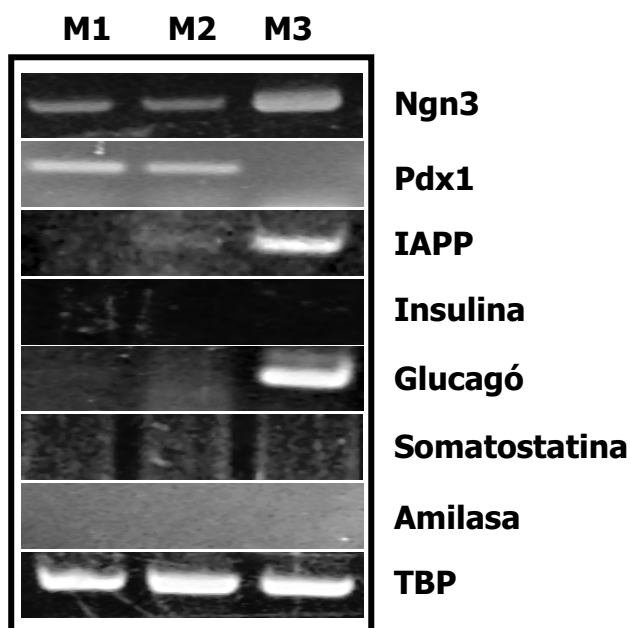


FIGURA 23: Gel representatiu de l'expressió de marcadors del cultiu primari després del cultiu en Matrigel (M1-M2-M3) (n=3).

D'altra banda, el tractament durant 3 setmanes amb M4, que inclou Matrigel suplementada amb exendin-4, va fer que les cèl·lules del cultiu primari expressessin per primera vegada gens pancreàtics endocrins com PC1/3, PC2, GLUT2, i insulina (a més de IAPP i glucagó detectats en M3). No es va detectar somatostatina, com tampoc gens exocrins (p48 i amilasa). Va ser interessant l'observació de l'expressió del marcador ductal CK19, no detectat fins ara (**fig. 24 A**).

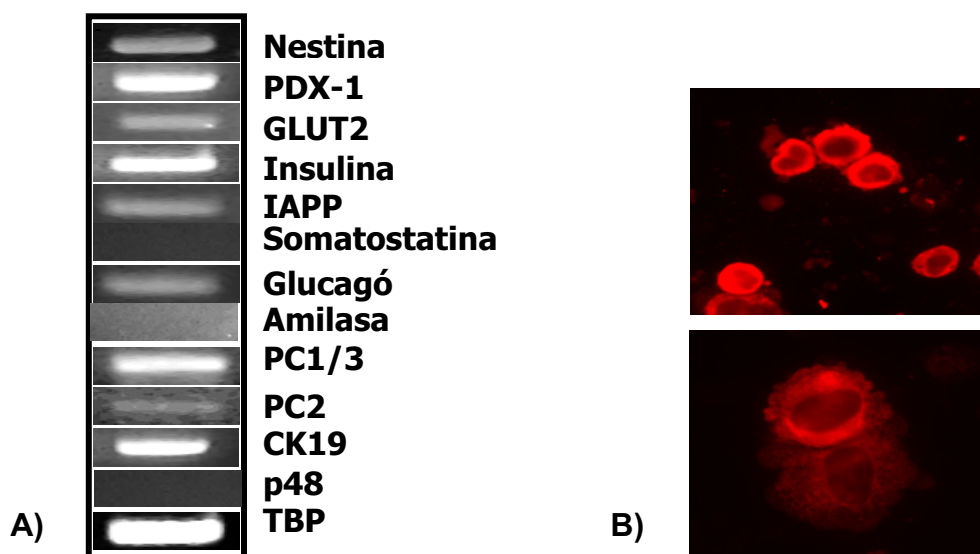


FIGURA 24: (A) Gel representatiu de l'expressió de marcadors del cultiu primari després del cultiu en Matrigel (M4) (n=3). (B) Tinció immunocitoquímica de pèptid C en el cultiu primari en estadi 2 després de la diferenciació amb el cultiu en Matrigel M4. Magnificació 20x (Ba) i 40x (Bb).

Davant l'aparició per primera vegada del *transcrit* d'insulina en el nostre cultiu primari, vam voler assegurar-nos que realment procedia del processament endogen de la hormona i no pas de la seva captació del medi. Per tant, la tinció per pèptid C (**figura 24 B**) ens va confirmar la presència d'insulina processada pel nostre cultiu. També vam realitzar l'anàlisi citomètric tant de l'expressió de pèptid C, que va ser de $31.21\% \pm 5.2$, com de PDX-1, que va ser $39.54\% \pm 2.1$.

10.3.-Colocalitzacions immunològiques de pèptid C

En el procés de caracterització del fenotip obtingut, els perfils d'expressió gènica han d'anar acompanyats d'estudis d'expressió proteica. La immunocitoquímica ens permet la localització intracel·lular de la proteïna, a més de poder co-localitzar diferents marcadors en una mateixa cèl·lula. Veient els resultats anteriors, vam intentar co-localitzar mitjançant microscopia confocal el pèptid C (**fig. 25 a**) i la insulina (**fig. 25 b**), observant que les cèl·lules que expressen insulina, alhora co-expressen també el pèptid C (**fig. 25 c**).

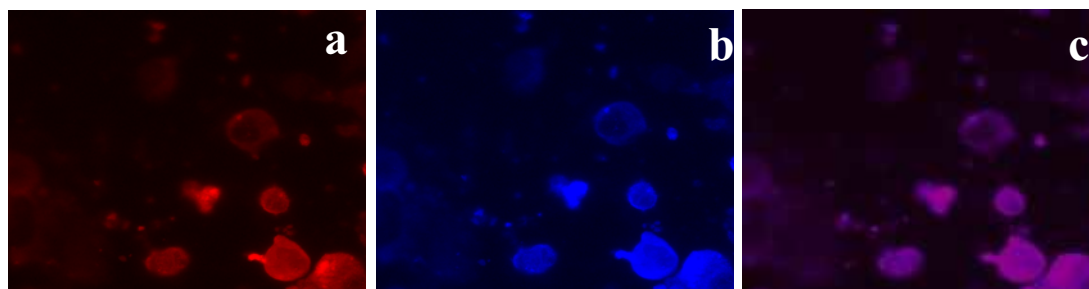


FIGURA 25: Tinció immunocitoquímica de pèptid C (a, vermell), insulina (b, blau) i la seva co-localització (c, lila) en les cèl·lules que han estat cultivades en Matrigel. Magnificació 20x.

Resultats

Els resultats obtinguts de les tincions immunocitoquímiques de les cèl·lules provinents del cultiu en Matrigel (M4) van demostrar que els marcadors vimentina, alfa-actina, nestina i GFAP no es van veure modificats (si bé aquests dos últims marcadors mostren un marcatge més dèbil). En la doble tinció amb pèptid C, observem que només hi ha una bona co-localització del pèptid C amb la vimentina (**figura 26**).

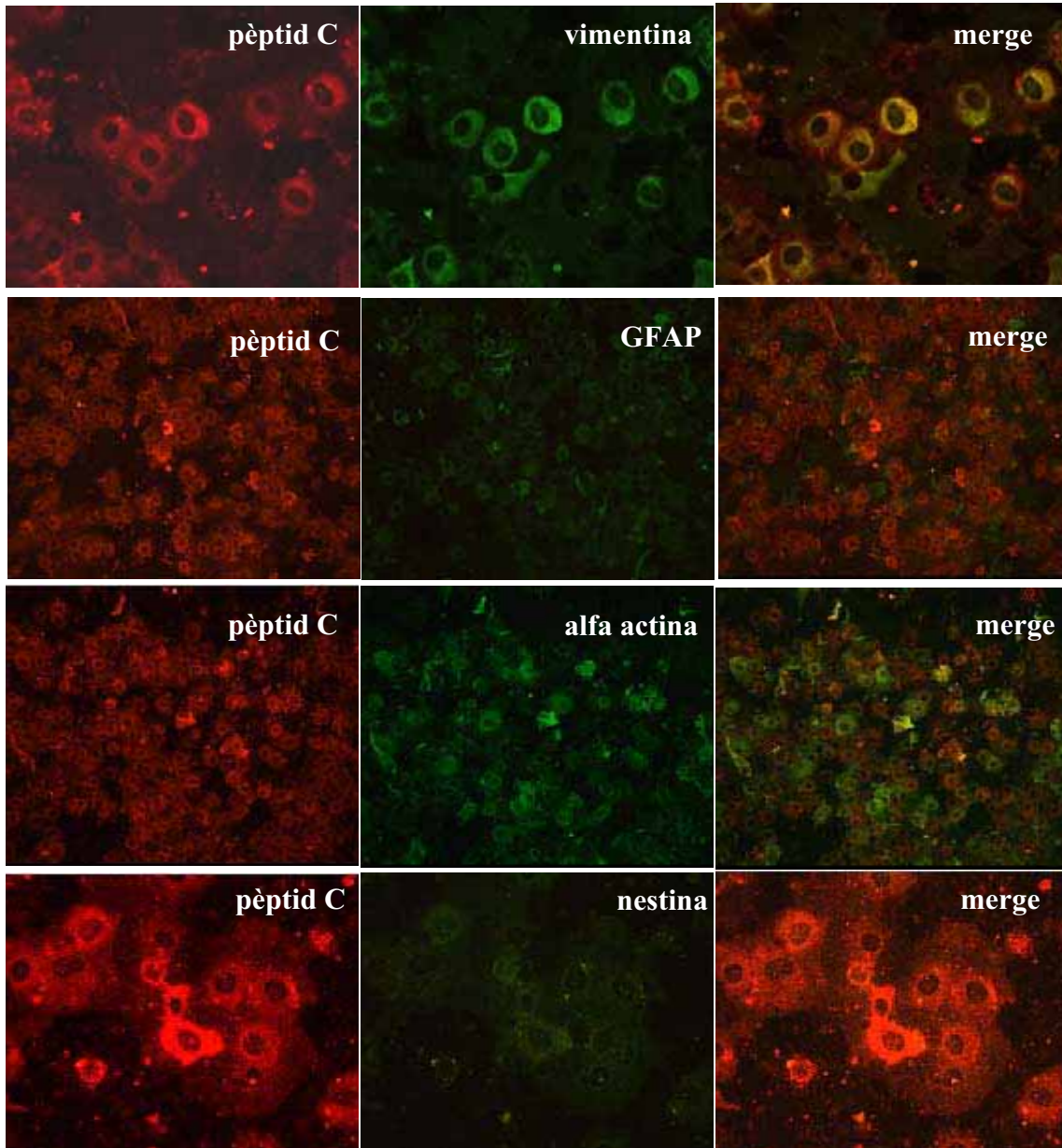


FIGURA 26: Tincions immunocitoquímiques de les cèl·lules que han estat cultivades en Matrigel. Pèptid C, vimentina, i co-localització (merge); pèptid C, GFAP, i co-localització (merge); pèptid C, alfa-actina, i co-localització (merge); pèptid C, nestina, i co-localització (merge). Magnificació 20x.

10.4.- Presència de grànuls de secreció

Després de valorar els resultats anteriors, els *clusters* obtinguts del cultiu en Matrigel amb M4 van ser tenyits amb ditizona (agent quelant que marca el zinc), observant en la **figura 27** positivitat en alguns dels *clusters* aïllats (aproximadament el 25%). Aquest fet ens indica la presència de grànuls de secreció madurs en el nostre cultiu PaSC/ABCG2+.

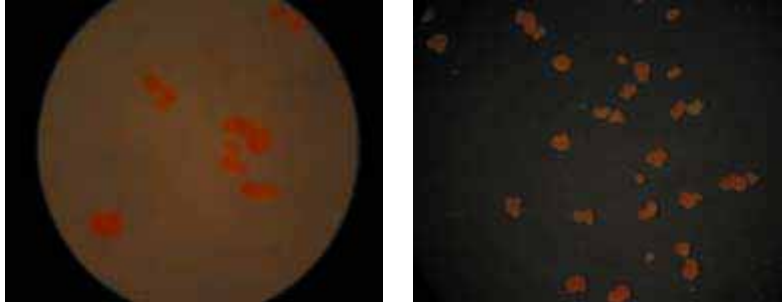
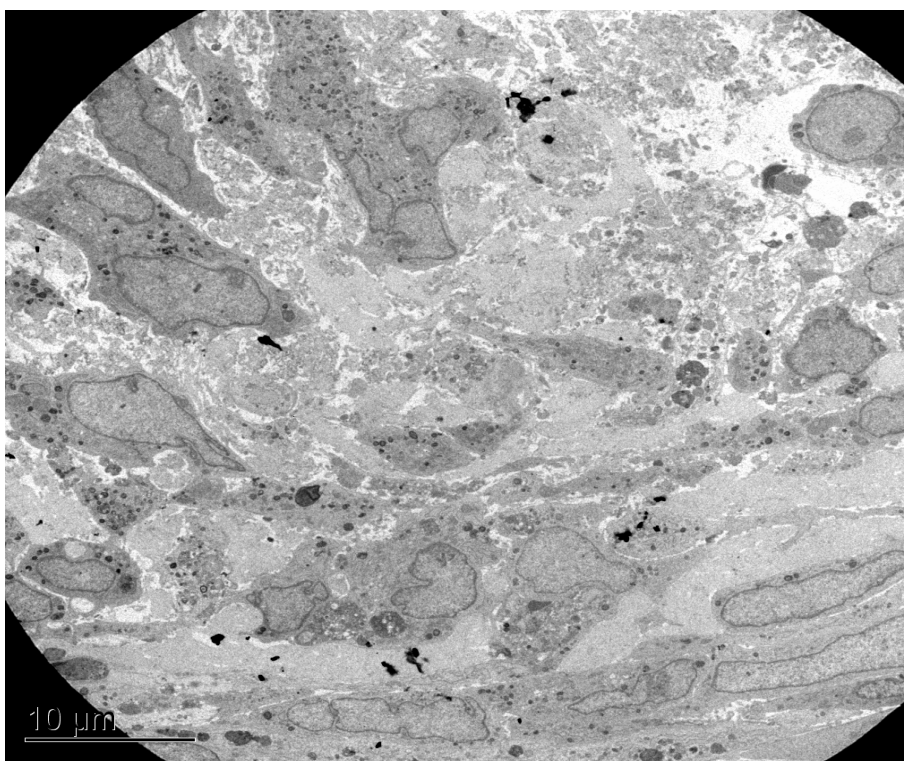


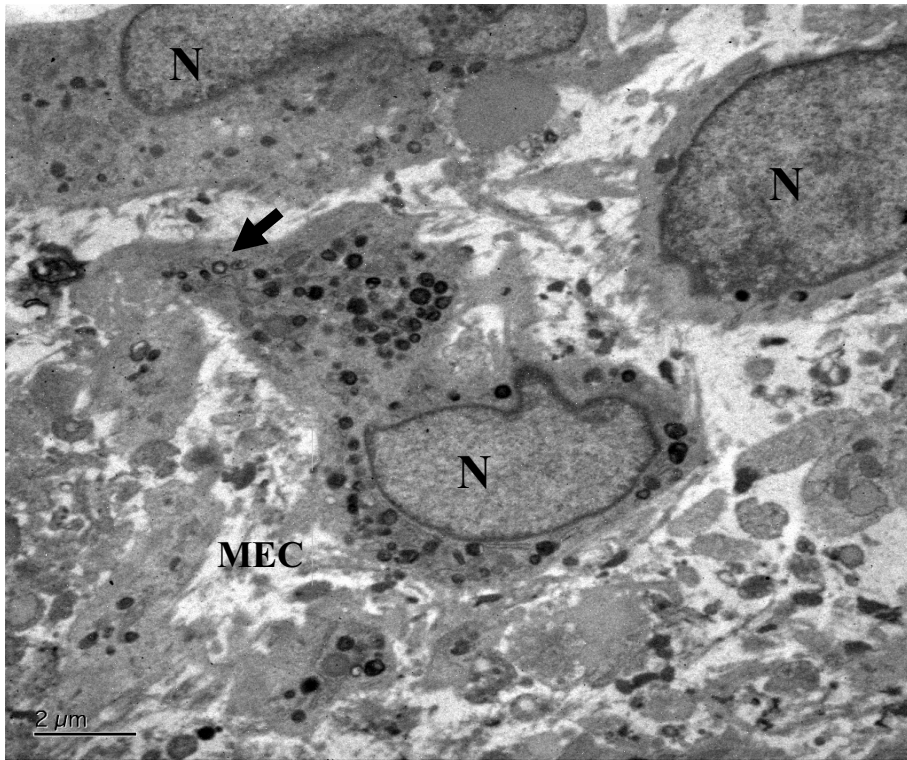
FIGURA 27: Tinció amb ditizona de les cèl·lules que han estat cultivades en Matrigel M4. S'observen *clusters* de color vermell, indicant una reacció positiva amb el colorant. Magnificació 20x.

10.5.- Caracterització ultraestructural dels *clusters* diferenciats.

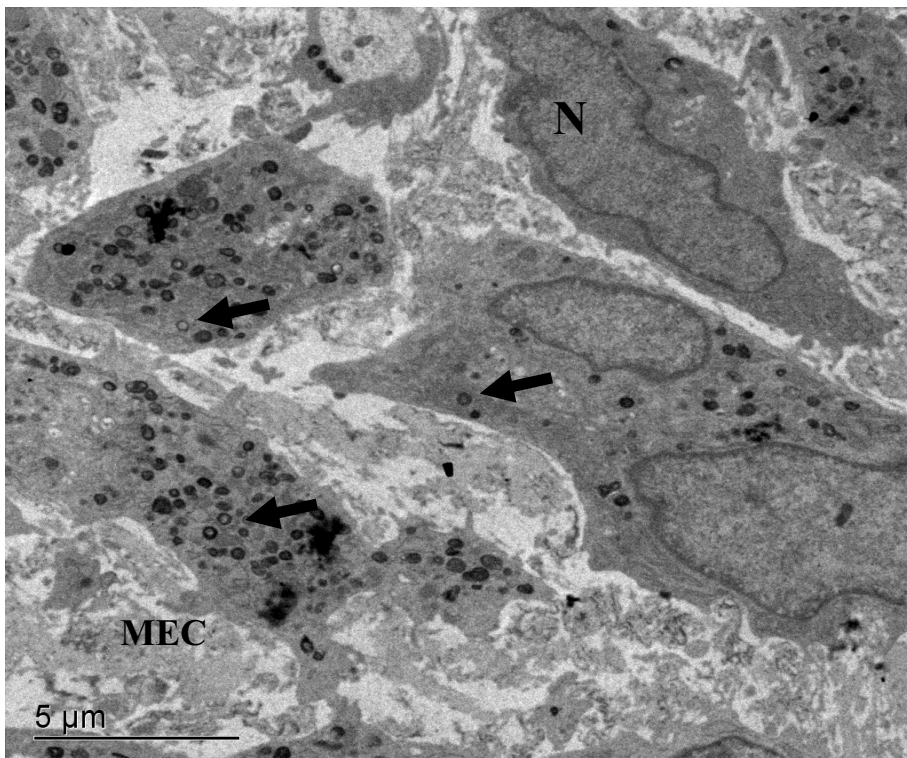
Estudis ultraestructurals per microscopia electrònica de transmissió en els *clusters* cel·lulars tractats amb Matrigel (M4) van evidenciar canvis respecte a l'estudi anterior (veure apartat 4.5 de resultats), que queden reflectits en la **figura 28**: s'observa un augment de la cel·lularitat en els *clusters* tractats, amb cèl·lules amb un tamany més homogeni i de forma més arrodonida, amb nuclis arrodonits, en posició central, amb la membrana nuclear dentada i amb la cromatina homogeniament electrodensa (**fig. 28 b, e**). En el citoplasma s'observa un reticle endoplasmàtic rugós desenvolupat una disminució significativa en la hipertròfia (**fig. 28 f**). Es detecta la presència de grànuls electrodensos, alguns dels quals presenten una morfologia compatible amb els grànuls d'insulina en diferents graus de maduració (fletxes gruixudes en **fig. 28 b, c, d, e**). S'observa menys matriu extracel·lular respecte als *clusters* no tractats, i en aquesta matriu no s'hi distingeixen fibres (**fig 28 c, d**).



a



b



c

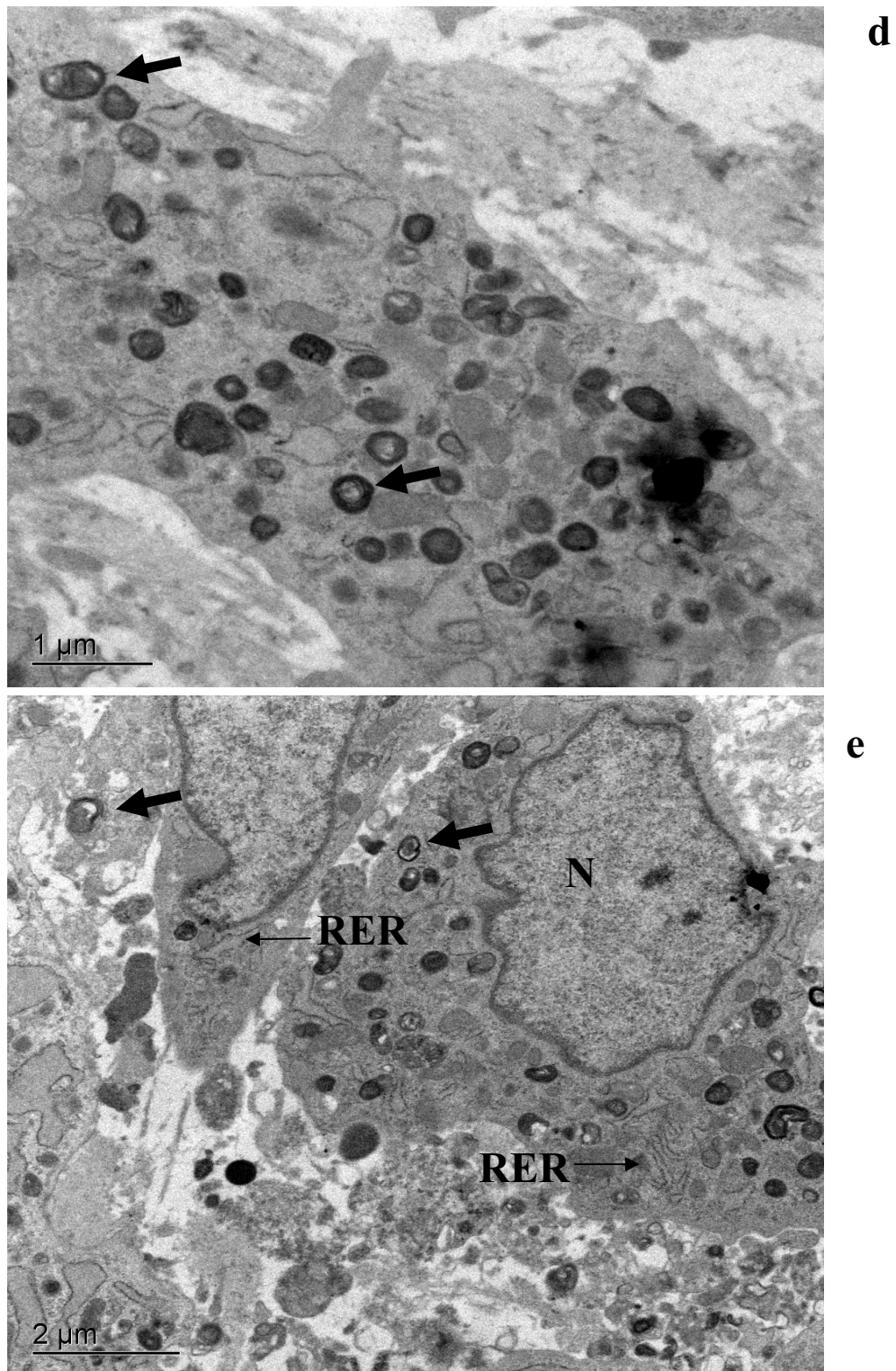


FIGURA 28: (a, b, c, d, e) Electromicrografies del cultiu primari en fase de *cluster* cultivat en Matrigel. Nucli (N), Reticle Endoplasmàtic Rugós (RER), matriu extracel·lular (MEC). Els grànuls compatibles amb grànuls d'insulina estan assenyalats amb una fletxa gruixuda ➡

10.6.- Secreció d'insulina al medi en resposta a glucosa

La secreció d'insulina de les cèl·lules tractades amb Matrigel M4 va ser analitzada mitjançant una incubació estàtica a dues concentracions de glucosa: 2,8 mM (baixa) i 20 mM (alta). Els resultats van ser normalitzats per un nombre total de 100 *clusters*, i es va obtenir una secreció d'insulina de 911.8 ± 31.7 pg/100 *clusters* cel·lulars en glucosa alta vs. 635 ± 13.4 pg/100 *clusters* cel·lulars en glucosa baixa (veure **fig. 29 B**). Aquesta diferència va ser estadísticament significativa (* $p < 0,05$). Les cèl·lules van respondre a una estimulació alta de glucosa secretant un 44% més que en l'estimulació de glucosa baixa. Cal dir que la secreció d'insulina del cultiu obtinguda durant les primeres fases d'expansió (medi basal, sense diferenciar) estava per sota el límit de detecció de l'ELISA en els dos tractaments de glucosa testats (**fig. 29 A**), com també va ser indetectable la secreció de les cèl·lules en estadi 1.

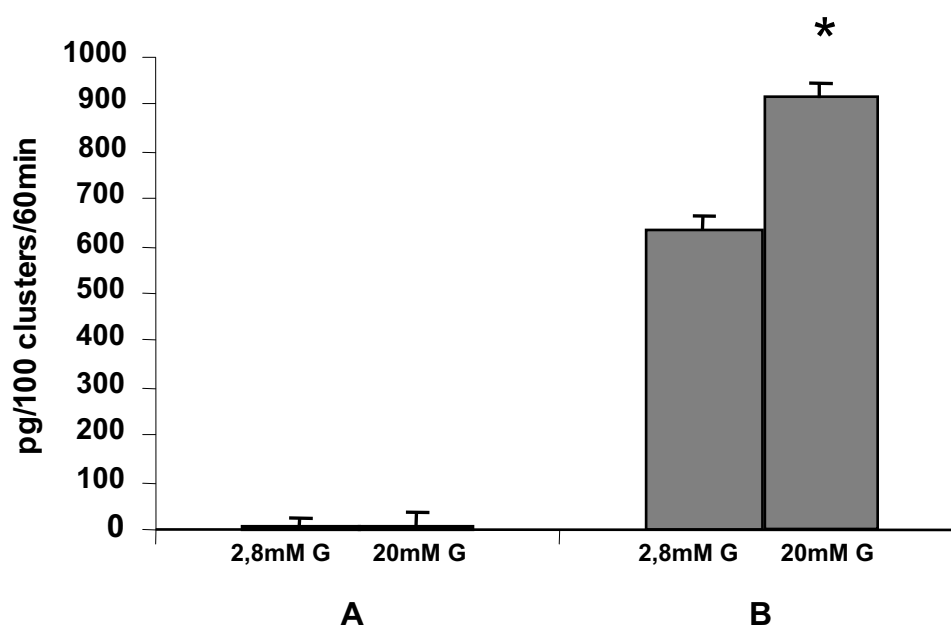


FIGURA 29: Secreció d'insulina del cultiu primari en estadi 2. (A) Cèl·lules tractades amb medi basal i estimulades a dues concentracions de glucosa (G). (B) cèl·lules diferenciades amb Matrigel i estimulades a dues concentracions de glucosa (G). Els resultats mostren la mitjana de tres experiments independents ($n=3$). Les barres d'error representen l'error estandard de la mitjana (SEM). (* $p < 0.05$).

OBJECTIU II

A.- Estudi dels possibles efectes paracrins del medi de la població PaSC/ABCG2(+) aïllada sobre la població ductal pancreàtica

11.- Enriquiment del cultiu per la població que expressa PSA-NCAM mitjançant la tècnica d'*immunopanning*

Per assolir el segon objectiu de la tesi (caracterització del secretoma i estudi de possibles efectes del medi condicionat) necessitavem uniformitzar la població cel·lular aïllada. Per fer-ho vam plantejar-nos buscar un marcador de superfície en aquesta població i augmentar el seu percentatge de positivitat en el cultiu primari, seleccionant només aquelles cèl·lules que l'expressen.

La molècula utilitzada per realitzar l'enriquiment del cultiu va ser el marcador NCAM, expressat pel nostre cultiu primari tal com s'observa a la **figura 7**. Aquesta molècula està present a les cèl·lules hepàtiques estrellades i augmenta la seva expressió durant l'activació d'aquestes. La seva forma composta amb àcid siàlic (PSA-NCAM) està carregada negativament i es troba a la membrana plasmàtica de les cèl·lules, requisit per dur a terme la selecció de la població sense produir dany cel·lular i poder mantenir posteriorment les cèl·lules en cultiu. Per poder utilitzar aquest marcador, una primera aproximació va ser quantificar aquesta molècula en el nostre cultiu cel·lular. L'estudi immunocitoquímic per citometria de flux del cultiu primari va demostrar positivitat en el 36% de la població pel marcador PSA-NCAM, fet que ens va permetre fer un enriquiment del percentatge de la població que expressa aquest marcador mitjançant la tècnica d'*immunopanning*.

El primer assaig d'*immunopanning* del cultiu va seleccionar una fracció positiva amb 57% de cèl·lules positives per PSA-NCAM (**fig. 30 a**). Aquesta fracció cel·lular va ser utilitzada per un segon enriquiment. La fracció que no va quedar adherida a la placa de PSA-NCAM (fracció negativa, **fig. 30 b**), només contenia un 6% de cèl·lules positives per PSA-NCAM. Aquesta fracció va ser expandida en cultiu i caracteritzada per immunocitoquímica però no va ser utilitzada per posteriors experiments.

Per augmentar el percentatge d'enriquiment, es va realitzar un segon assaig d'*immunopanning* només amb la fracció positiva de l'assaig anterior, i el marcatge obtingut va ser d'un 80% de cèl·lules positives en la fracció positiva per PSA-NCAM (**fig 30 c,d**), que representa un augment de més del 20%. La fracció negativa que no va quedar adherida a la placa de PSA-NCAM va resultar indetectable, i no va poder ser expandida en cultiu.

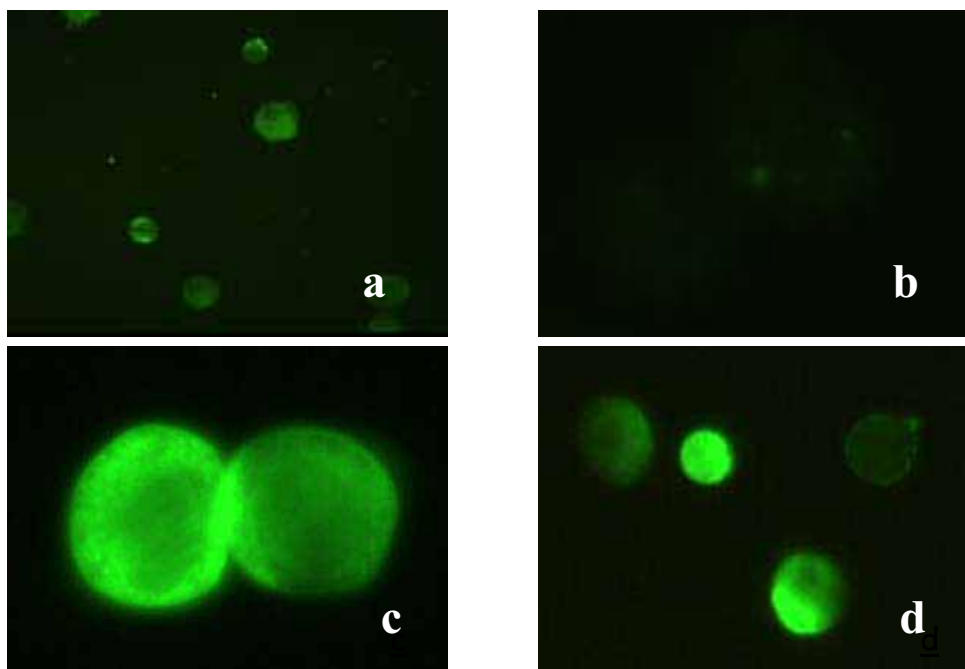


FIGURA 30: Observació de la tinció per PSA-NCAM després de l'assaig d'*immunopanning*. (a) Fracció positiva per PSA-NCAM del *panning* 1, (b) Fracció negativa per PSA-NCAM del *panning* 1, (c i d) Fracció positiva per PSA-NCAM del *panning* 2. Magnificació 20X (a, b, d), 63X (c)

12.- Caracterització de les fraccions després de l'*immunopanning*

Per recomprovar el fenotip de les cèl·lules obtingudes en els assajos d'*immunopanning*, es van utilitzar diferents marcadors. La caracterització immunocitoquímica va donar els següents resultats (**taula 1**):

	Fracció +	Fracció -
PANNING 1		
Desmina	++	+
Vimentina	++	+
Cromogranina A	+	+/-
GFAP	+	+/-
Thy 1.1	+	+
PSA-NCAM	+	-

	Fracció +
PANNING 2	
Desmina	+
Vimentina	+
Cromogranina A	+
GFAP	+
Thy 1.1	+
PSA-NCAM	++

TAULA 1: Quadre comparatiu on observem les tincions de diferents marcadors després dels assajos d'*immunopanning*. (+) positivitat, (++) positivitat alta, (+/-) positivitat dèbil.

Amb la fracció positiva del segon *immunopanning* es va recollir el medi condicionat per als estudis de proliferació, proteòmica, i canvis d'expressió gènica de l'objectiu 2.

13.- Efectes del medi condicionat de PaSC/ABCG2+ sobre la línia cel·lular ductal ARIP

La localització *in vivo* de les cèl·lules pancreàtiques estrellades és periàcinar i periductal. També s'ha descrit en diversos treballs que les cèl·lules estrellades tenen la capacitat de secretar substàncies amb implicacions en diversos processos biològics, tot i tenir com a funció principal la remodelació de la matriu extracel·lular. Aquests dos fets ens van portar a investigar possibles efectes paracrins de les nostres cèl·lules PaSC/ABCG2+ sobre les cèl·lules ductals pancreàtiques.

El model experimental utilitzat per testar els possibles efectes del secretoma de les PaSC va ser la línia cel·lular ARIP (ductal) descrita a l'apartat de material i mètodes.

13.1.- Morfologia cel·lular

La primera aproximació realitzada per avaluar possibles efectes del medi condicionat procedent del cultiu PaSC/ABCG2+ va ser la observació morfològica de la línia ARIP després del tractament amb medi condicionat durant diferents temps. Els resultats van demostrar que no hi havia canvis fenotípics evidents durant 24, 48 i 72 hores de tractament amb el medi condicionat, respecte a les cèl·lules tractades amb medi control (medi propi de la línia ARIP) i medi basal (medi propi de les PaSC no condicionat). Tampoc es van observar canvis en tractaments més llargs (de fins a 7 dies). El que sí es podia observar era una disminució en el creixement de les cèl·lules tractades amb medi condicionat, que mai no assolien la mateixa confluència que les condicions control (partint del mateix nombre de cèl·lules a cada condició) (**fig. 31 a, b, c**)

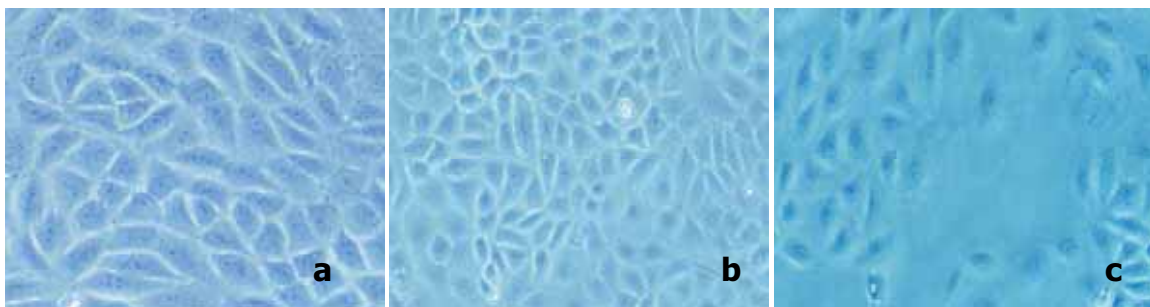


FIGURA 31: Observació de les cèl·lules ARIP tractades amb diferents medis: (a) **Control** (medi propi de la línia ARIP), (b) **basal** (medi de les cèl·lules estrellades sense ser condicionat), (c) medi **condicionat** provinent de PaSC/ABCG2+. (a, b, c) corresponen a 72 hores de tractament, Magnificació 40X.

13.2.- Proliferació cel·lular

Aquestes observacions preliminars respecte a la confluència dels cultius tractats amb medi condicionat ens va portar a quantificar la proliferació cel·lular mitjançant l'assaig de BrdU (anàleg de timidina), que mesura la incorporació d'aquest nucleòtid en la fase S del cicle cel·lular i ens indica les cèl·lules que estan proliferant. Per avaluar l'especificitat del nostre medi vam realitzar un primer estudi per valorar si el fet de cultivar la línia ARIP amb un medi de cultiu amb una composició una mica diferent del que li és propi (medi basal, veure material i mètodes) estava afectant la seva proliferació. Els resultats van ser que els nivells de proliferació de cèl·lules tractades amb medi basal (medi de PaSC sense estar condicionat) es mantienien al 91,5% respecte als nivells control (medi propi ARIP). Aquesta disminució de la proliferació respecte al control no va ser estadísticament significativa (**fig. 32 A**). Amb aquesta comprovació, vam passar a utilitzar a partir d'aquest moment el medi basal com a proliferació de referència. Els estudis de proliferació mitjançant BrdU d'aquesta línia tractada durant 24 hores amb medi condicionat provinent de PaSC va donar com a resultat una disminució significativa de la proliferació (* $p < 0.05$) del 40,3% comparada amb la proliferació de les cèl·lules ARIP tractades amb medi basal (**fig. 32 B**)

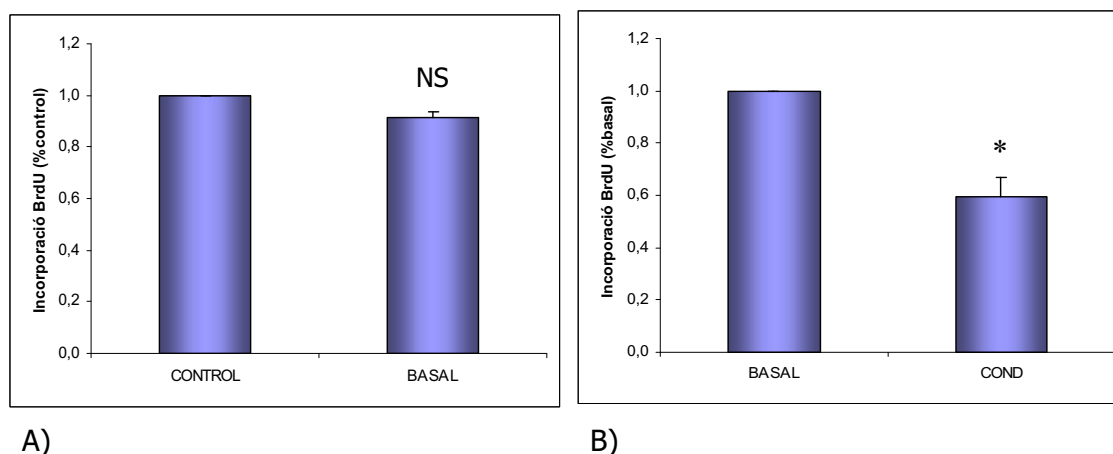


FIGURA 32: (A) Anàlisi de la proliferació cel·lular de la línia ARIP tractada durant 24 hores amb diferents medis: **control** (medi propi de la línia ARIP), i **basal** (medi de les cèl·lules estrellades sense ser condicionat). Els resultats s'expressen en percentatge de BrdU incorporat respecte a la proliferació amb el medi control. S'han realitzat 3 experiments independents (NS, no significatiu estadísticament). Les barres d'error representen l'error estandard de la mitjana (SEM) (B) Anàlisi de la proliferació cel·lular de la línia ARIP tractada durant 24 hores amb diferents medis: **basal** (medi de les cèl·lules estrellades sense ser condicionat), **COND** (medi condicionat provinent de PaSC/ABCG2+). Els resultats s'expressen en percentatge de BrdU incorporat respecte a la proliferació amb el medi basal. S'han realitzat 4 experiments independents (* $p < 0.05$). Les barres d'error representen l'error estandard de la mitjana (SEM)

13.3.- Viabilitat cel·lular

Per assegurar que la disminució de la proliferació no era deguda a una pèrdua de viabilitat de les cèl·lules, vam realitzar estudis per mesurar la reducció de la sal de tetrazolium (MTT) per part dels enzims mitocondrials de la cadena respiratòria, que seria un indicador de la viabilitat cel·lular (veure material i mètodes). Com en els estudis de proliferació de la figura anterior, vam valorar si el cultiu amb medi basal afectava la viabilitat de les cèl·lules respecte al medi control, i els resultats van indicar que la viabilitat no es veia afectada (**fig. 33 A**). Passant a utilitzar el medi basal com a

viabilitat de referència, els resultats demostren que la utilització del medi condicionat durant 24 hores no modifica la viabilitat de les cèl·lules ARIP (**fig. 33 B**).

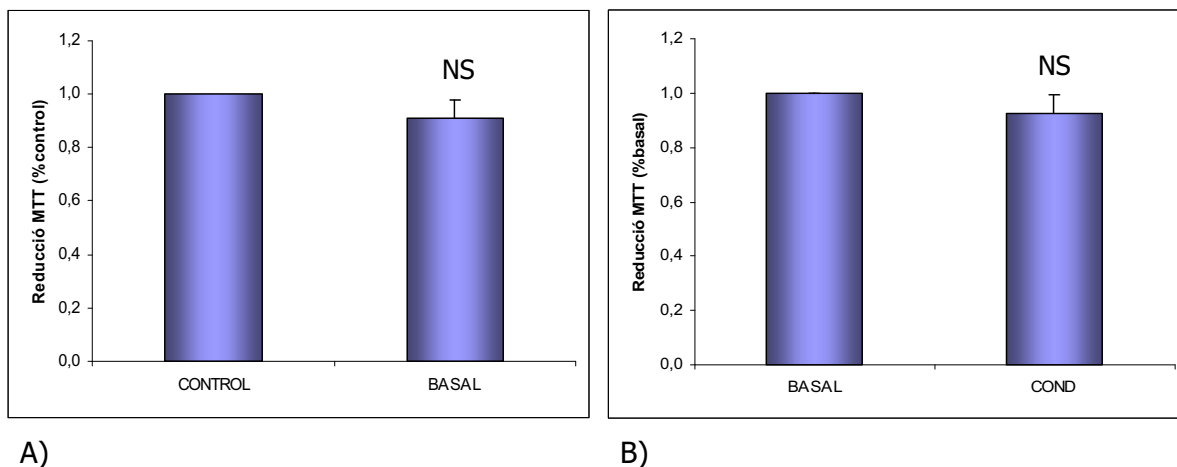


FIGURA 33: (A) Anàlisi de la viabilitat cel·lular de la línia ARIP tractada amb diferents medis: **control** (medi propi de la línia ARIP), i **basal** (medi de les cèl·lules estrellades sense ser condicionat). Els resultats s'expressen en percentatge de MTT reduït respecte al medi control. S'han realitzat 3 experiments independents (NS, no significatiu estadísticament). Les barres d'error representen l'error estandard de la mitjana (SEM) (B) Anàlisi de la viabilitat cel·lular de la línia ARIP tractada durant 24 hores amb diferents medis: **basal** (medi de les cèl·lules estrellades sense ser condicionat), **COND** (medi condicionat provinent de PaSC/ABCG2+). Els resultats s'expressen en percentatge de MTT reduït respecte al medi basal. S'han realitzat 3 experiments independents (NS, no significatiu). Les barres d'error representen l'error estandard de la mitjana (SEM)

13.4.- Comprovació de l'especificitat del medi

Per assegurar que els efectes observats en l'apartat anterior (disminució de la proliferació sense afectar la viabilitat) eren específics del medi condicionat utilitzat, i no un efecte causat per la pèrdua de nutrients del medi (recordem que el medi condicionat s'obté després de 24 hores de cultiu amb cèl·lules estrellades) o bé de la secreció de factors solubles tòxics procedents del metabolisme cel·lular, es van tractar les cèl·lules ARIP amb medis condicionats provinents d'altres línies cel·lulars: ductals mPAC, i endocrines α TC (cedides per la Dra Rosa Gasa).

La valoració de la proliferació i la viabilitat de les cèl·lules ARIP tractades durant 24 hores amb aquests dos medis condicionats va donar com a resultat que no hi havia disminució significativa de la proliferació (**fig. 34 A**), i la viabilitat tampoc es va veure afectada (**fig. 34 B**).

Resultats

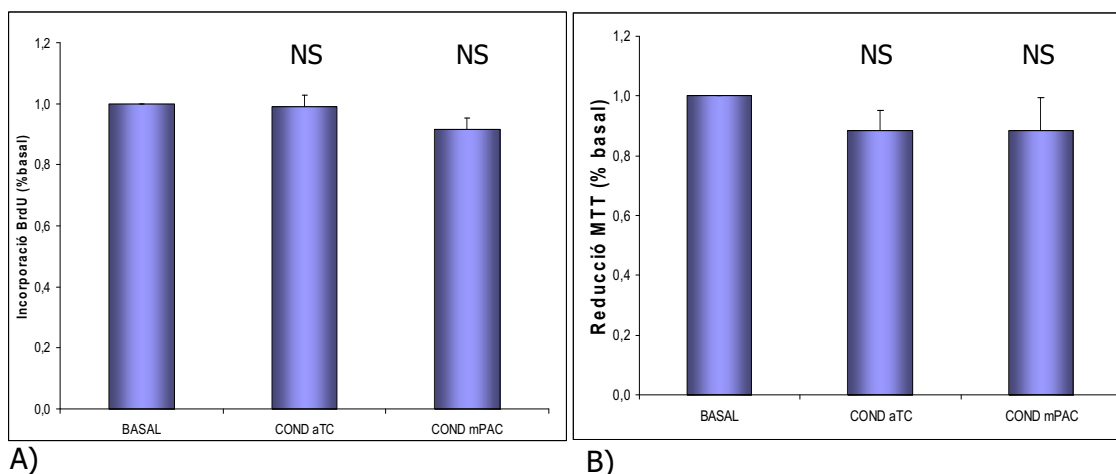


FIGURA 34: (A) Anàlisi de la proliferació de la línia ARIP tractada durant 24 hores amb medi basal, i amb medis condicionats provinents de les línies α TC i mPAC. Els resultats s'expressen en percentatge de BrdU incorporat respecte a la proliferació amb el medi basal. S'han realitzat 3 experiments independents (NS, no significatiu estadísticament). Les barres d'error representen l'error estandard de la mitjana (SEM). (B) Anàlisi de la viabilitat de la línia ARIP tractada amb medi basal, i amb medis condicionats provinents de les línies α TC i mPAC. Els resultats s'expressen en percentatge de MTT reduït respecte al medi basal. S'han realitzat 3 experiments independents (NS, no significatiu). Les barres d'error representen l'error estandard de la mitjana (SEM)

13.5.- Canvis en l'expressió de marcadors

En tot sistema biològic és un fet conegut l'existència d'un balanç entre la proliferació i la diferenciació cel·lular. Basant-nos en aquesta premisa, i amb l'evidència que el medi condicionat ens afectava la proliferació, vam voler avaluar si també podíem estar induint transdiferenciació en aquesta línia cel·lular.

13.5.1.- Marcadors propis

Després d'analitzar els efectes del medi condicionat en proliferació i viabilitat de la línia ARIP, i d'haver comprovat l'especificitat del medi, vam avaluar un marcador endogen de la línia ARIP, el filament intermedi CK19, abans i després del tractament amb medi condicionat. Per intentar detectar canvis en l'expressió gènica i proteica el temps de tractament va ser de 72 hores. Els resultats observats indiquen que el tractament de 72 hores amb medi condicionat provoca una disminució del marcatge de la CK19 respecte als cultius tractats amb medi basal (fig. 35).

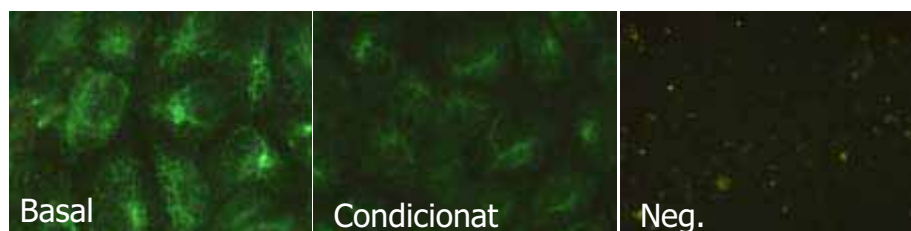


FIGURA 35: Observació de les cèl·lules ARIP tractades amb diferents medis durant 72 hores: Basal (medi de les cèl·lules estrellades sense ser condicionat) i Condicionat. En verd es manifesta el marcatge de la CK19. Com a control negatiu, tenim una imatge sense anticòs primari, per descartar unions inespecífiques.

Aquests canvis d'expressió proteica van ser confirmats amb canvis d'expressió gènica mitjançant RT-PCR i posteriorment van ser quantificats per PCR a temps real (fig. 36 A i B). La semi-quantificació per RT-PCR normalitzant pel gen endogen TBP (TATA-Binding Protein) ens va donar com a resultat una disminució significativa ($56,7\% \pm 0,07$) de la CK19 en cèl·lules ARIP tractades amb medi condicionat respecte al medi basal (fig. 36 A). En la quantificació a temps real, els resultats obtinguts van ser una disminució també significativa de la CK19 amb el tractament amb medi condicionat ($52,13\% \pm 0,05$) (* $p < 0,05$) (fig. 36 B).

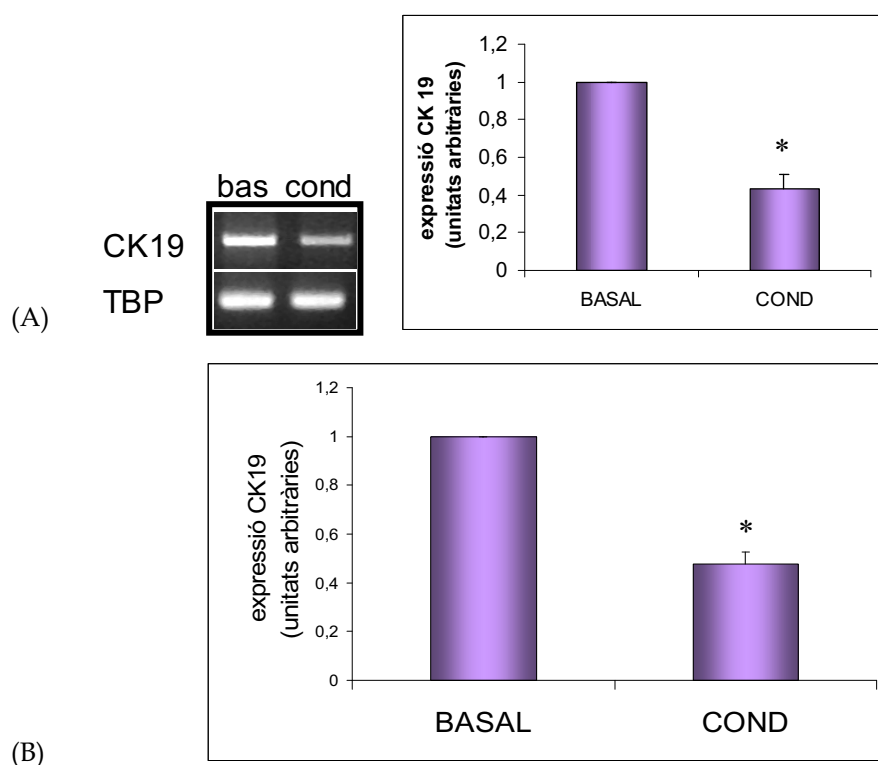


FIGURA 36: (A) Gel representatiu de la RT-PCR de cèl·lules ARIP tractades amb medi basal (bas) i condicionat (cond) durant 72 hores. Expressió dels gens CK19 i TBP. Valoració del marcador CK19 per densitometria òptica. L'expressió és en unitats arbitràries, està normalitzada per TBP i s'expressa en relació a l'expressió de CK19 en cèl·lules tractades amb medi basal. S'han realitzat 3 experiments independents (* $p < 0,05$). Les barres d'error representen l'error estandard de la mitjana (SEM). (B) RT-PCR a temps real de cèl·lules ARIP tractades amb medi basal, i condicionat durant 72 hores. L'expressió és en unitats arbitràries, està normalitzada per TBP i s'expressa en relació a l'expressió de CK19 en cèl·lules tractades amb medi basal. S'han realitzat 6 experiments independents (* $p < 0,05$). Les barres d'error representen l'error estandard de la mitjana (SEM)

13.5.2.- Marcadors implicats en diferenciació endocrina

Amb aquest primer indici de la inducció de canvis en la línia ARIP després del tractament amb medi condicionat vam procedir a avaluar si podem estar induint canvis en l'expressió de gens implicats en la diferenciació endocrina, i es va fer una primera aproximació amb el factor de transcripció PDX1. Si bé la immunocaracterització de la línia ARIP va detectar una feble expressió basal d'aquest factor de transcripció (fig. 37 A), el tractament durant 72 hores amb medi condicionat

Resultats

va ser capaç d'induir un augment en l'expressió del factor de transcripció PDX1 (**fig. 37 A**). Mitjançant la contratinció nuclear amb Hoescht, vam descriure la seva localització nuclear (**fig. 37 B merge**).

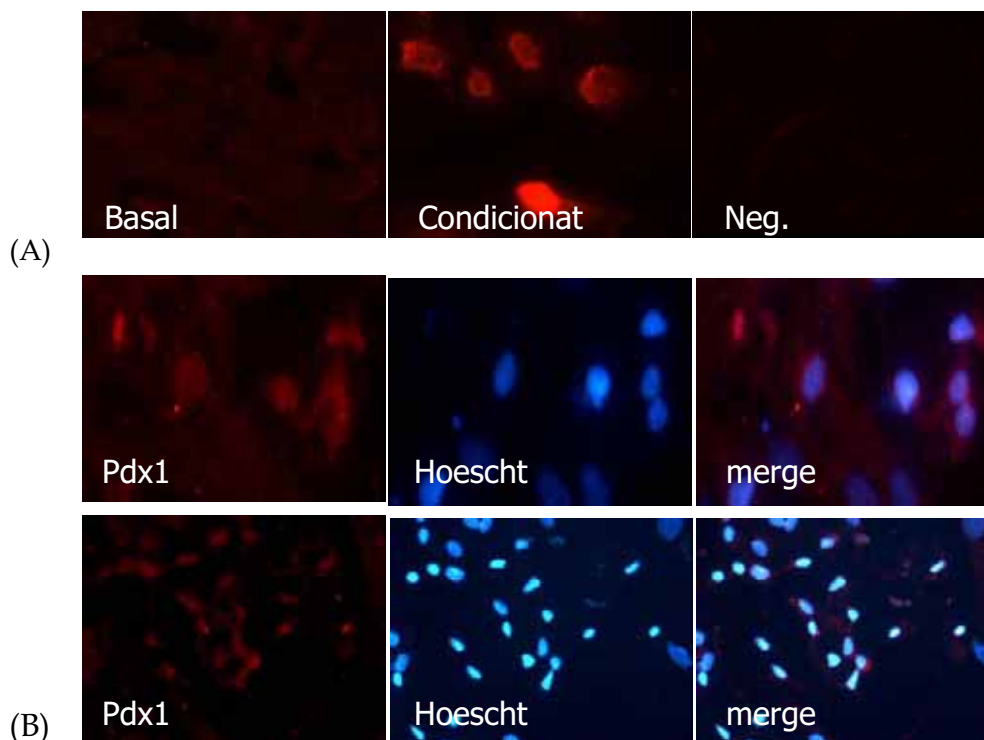


FIGURA 37: (A) Observació de les cèl·lules ARIP tractades amb diferents medis durant 72 hores: Basal (medi de les cèl·lules estrellades sense ser condicionat), i condicionat. En vermell es manifesta el marcatge de PDX1. Com a control, tenim una imatge sense anticòs primari, per descartar unions inespecífiques. (B) Contratinció nuclear amb Hoescht de les cèl·lules ARIP tractades amb medi condicionat durant 72 hores. Marcatge de PDX1, marcatge de Hoescht, i colocalització (merge).

A nivell transcripcional es van reconfirmar aquest increment obtingut a nivell proteic. Tot i que en condicions basals el cultiu ja presentava una dèbil expressió de PDX1, el tractament amb medi condicionat sempre augmentava aquesta expressió (**fig. 38 A**). Mitjançant semi-quantificació densitomètrica vam valorar un augment significatiu de 2.47 ± 0.42 vegades de PDX1 respecte al tractament amb medi basal. En la quantificació a temps real, però, l'augment detectat va ser de 5.38 ± 0.72 vegades ($*p < 0.05$).

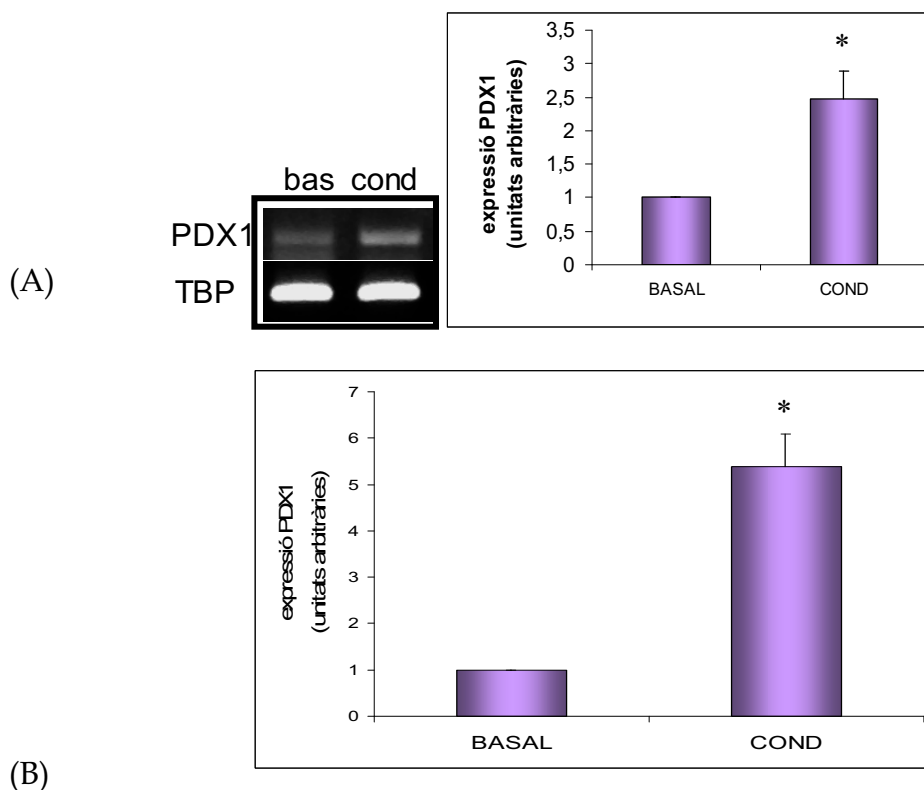


FIGURA 38: (A) Gel representatiu de la RT-PCR de cèl·lules ARIP tractades amb medi basal (bas) i condicionat (cond) durant 72 hores. Expressió dels gens Pdx1 i TBP. Valoració del marcador Pdx1 per densitometria òptica. L'expressió és en unitats arbitràries, està normalitzada per TBP i s'expressa en relació a l'expressió de Pdx1 en cèl·lules tractades amb medi basal. S'han realitzat 3 experiments independents (* $p < 0.05$). Les barres d'error representen l'error estandard de la mitjana (SEM) (B) RT-PCR a temps real de cèl·lules ARIP tractades amb medi basal, i condicionat durant 72 hores. L'expressió és en unitats arbitràries, està normalitzada per TBP i s'expressa en relació a l'expressió de Pdx1 en cèl·lules tractades amb medi basal. S'han realitzat 6 experiments independents (* $p < 0.05$). Les barres d'error representen l'error estandard de la mitjana (SEM)

Amb els canvis detectats en l'expressió de Pdx1 vam procedir a valorar també altres factors de transcripció implicats en la via de diferenciació endocrina com Pax6, Ngn3, i Nkx2.2. Tots aquests marcadors es van detectar a nivell basal (en cèl·lules ARIP tractades amb medi basal) i no vam observar modificacions de la seva expressió després del tractament amb medi condicionat.

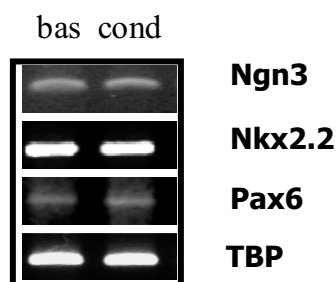


FIGURA 39: Gel representatiu de la RT-PCR de cèl·lules ARIP tractades amb medi basal (bas), i condicionat (cond) durant 72 hores. Valoració dels marcadors: Pax6, Ngn3, Nkx2.2

B.- Anàlisi del secretoma de la població PaSC/ABCG2(+) aïllada

14.- Caracterització del medi condicionat per gels 2D

Els efectes del medi condicionat sobre la línia ARIP van conduir-nos a analitzar el secretoma del nostre cultiu primari de cèl·lules estrellades, per intentar identificar factors que ens permetessin explicar-nos els efectes observats en les cèl·lules ARIP tractades. Per tal de caracteritzar les proteïnes secretades pel nostre cultiu vam realitzar estudis de proteòmica. En una primera aproximació, vam comparar mitjançant gels 2D el medi condicionat de les cèl·lules estrellades, que conté el 10% de FCS (**fig. 40 A**)(veure material i mètodes) i el medi no condicionat (blanc, medi basal) (**fig. 40 B**).

L'estratègia que ens permet identificar les proteïnes que han estat secretades per les cèl·lules consisteix en comparar el medi condicionat amb **FCS** i el medi **blanc** (**fig 40 A, B**), i seleccionar les proteïnes que apareixen en el medi condicionat i no en el blanc. Les proteïnes comunes seran les que procedeixen del FCS. En la comparació observem que la majoria de proteïnes són comunes, i que l'albumina i altres proteïnes provinents del FCS són les més abundants.

Davant d'aquest fet, decidim provar de cultivar les cèl·lules sense FCS (anomenat medi **SFM**, **fig. 40 C**) i procedir a l'anàlisi de proteòmica, però abans hem d'assegurar-nos que el fet de cultivar les cèl·lules sense FCS no afecta la seva capacitat secretora.

Per tant, es va comparar el medi amb **FCS** i el medi sense FCS (**SFM**) (**fig 40 A, C**): comprovem que tenen un patró de secreció semblant, és a dir que la deprivació de serum no modifica la seva capacitat de secreció de proteïnes ni el patró obtingut en el gel, sinó que aconseguim augmentar la concentració d'aquelles proteïnes menys abundants, que havien quedat emmascarades per les proteïnes majoritàries del FCS.

Finalment doncs, per identificar les proteïnes secretades pel nostre cultiu primari, el que fem és comparar el medi condicionat **SFM** amb el medi **blanc** (Fig 40 B, C). Seleccionant les proteïnes que apareixen en el medi condicionat SFM i no en el blanc ens permet identificar les proteïnes que han estat secretades per les cèl·lules.

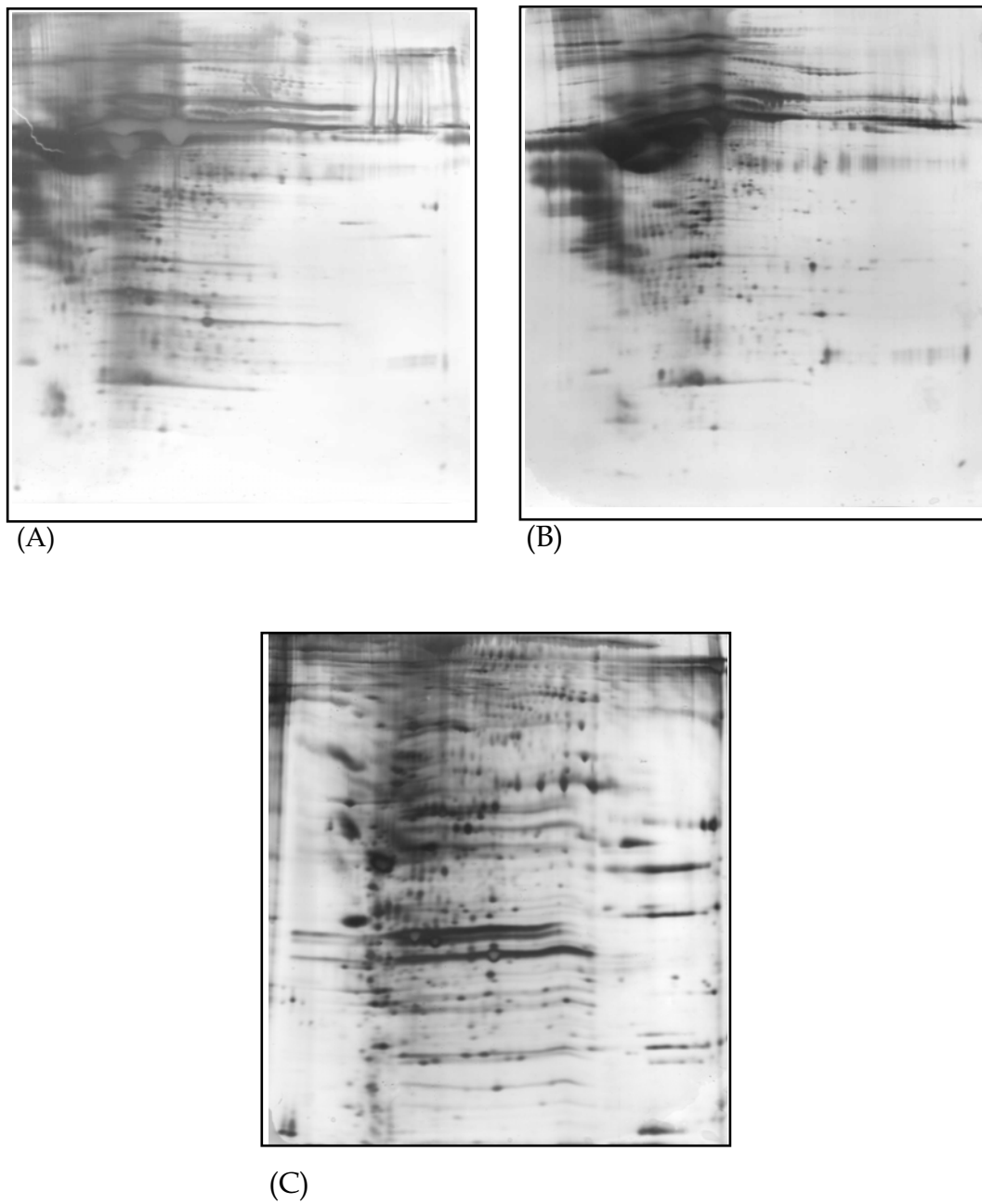
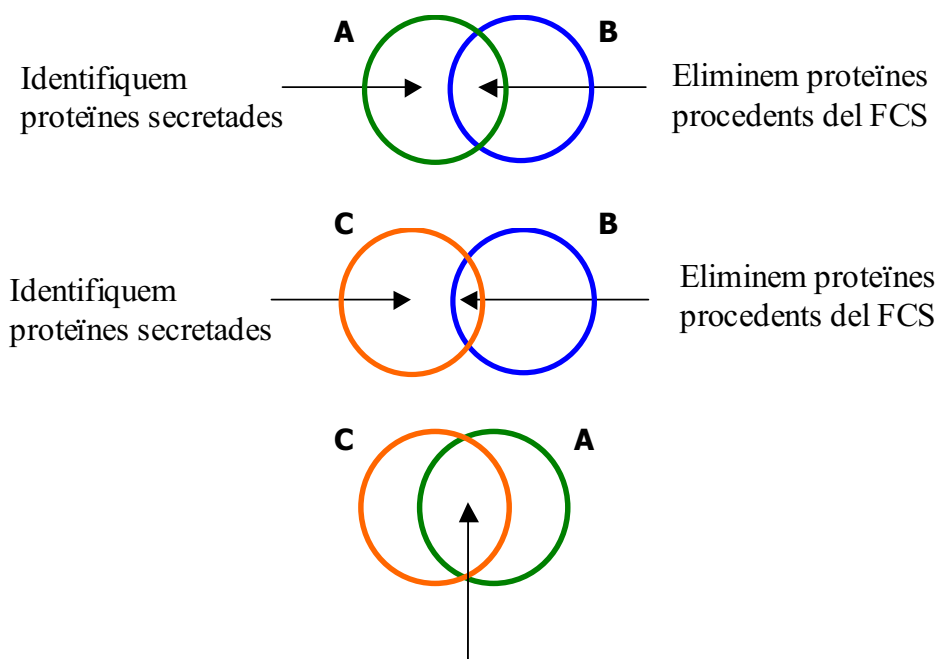


FIGURA 40: Gels 2D representatius de les dues condicions experimentals testades (A, FCS; C, SFM), i la comparació amb el medi no condicionat (B).

Realitzades les comprovacions de la capacitat secretora de les cèl·lules estrellades deprivades de FCS, procedirem a retallar tots els spots que apareixen en els medis condicionats i no en el blanc, que seran els *spots* secretats per les cèl·lules (**fig. 41**).



SPOTS QUE RETALLEM:

Confirmem que el FCS no afecta el patró de proteïnes secretades
 Augmentem la concentració de proteïnes secretades

FIGURA 41: Esquema del disseny experimental utilitzat. (A) Color verd: Medi amb FCS i condicionat (24 hores amb cèl·lules estrellades), (B) Color blau: Medi amb FCS no condicionat, (C) Color taronja: Medi SFM i condicionat (24 hores amb cèl·lules estrellades)

L'anàlisi dels gels mitjançant el programa de 2D Melanie ens va portar a identificar 112 *spots* diferencials que apareixien en els gels SFM i no en el blanc, per tant seran específics dels nostres cultius. Es van retallar tots els *spots* diferencials i es va procedir al seu processament per tal d'obtenir l'empremta peptídica que ens permetés identificar-los a partir de les bases de dades. L'espectre de masses obtingut es representa habitualment com un histograma on l'eix d'abcises X correspon a les unitats de massa (valors m/z) i l'eix d'ordenades Y correspon a la intensitat (el nombre d'ions d'una relació m/z que arriben al detector). Cada pic de l'espectre correspon a un pèptid amb una determinada relació entre la seva massa i la seva càrrega. Els pèptids de major intensitat haurien de ser adjudicats a la proteïna identificada (veure material i mètodes per criteris d'identificació) (**fig. 42**).

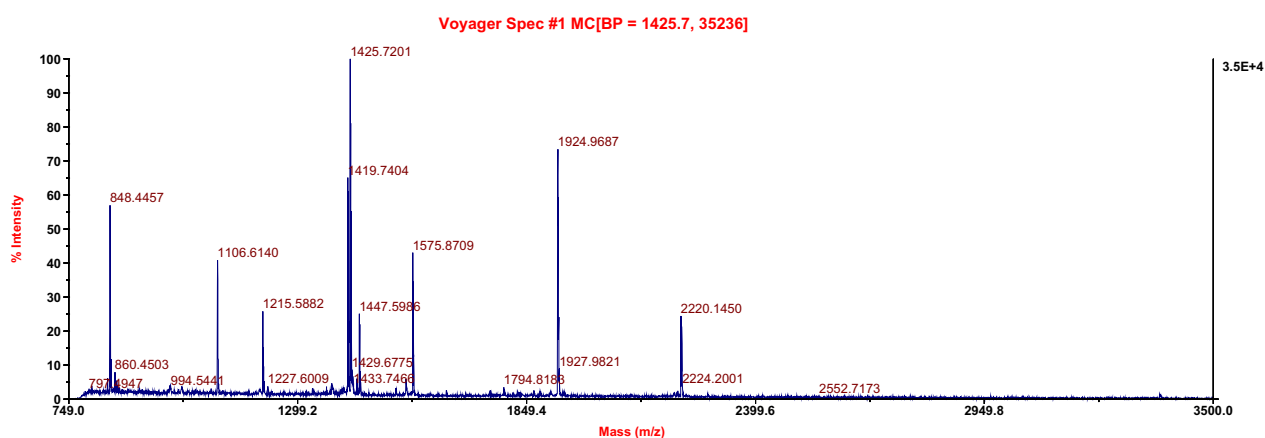


FIGURA 42: Representació d'un espectre de masses obtingut per MALDI-TOFF corresponent a la proteïna SPARC procedent dels gels de medi condicionat de PaSC/ABCG2+ .

Després d'obtenir l'espectre de masses es va fer servir el programa Aldente (Expasy) que compara la massa dels pèptids identificats amb les bases de dades SwissProt i Trembl. Les cerques es van realitzar amb un marge d'error de la massa de 0.05 Da, 50 ppm, un marge d'error per la tripsina d'un sol tall, i iodoacetamida com a modificació per la cisteïna. Les proteïnes es consideraven identificades només quan tenien un *score* positiu de $P < 1.e-6$ i una distància significativa respecte a la següent proteïna proposada pel programa. Utilitzant aquest procediment vam aconseguir identificar amb seguretat 76 *spots* dels 112 processats (els resultats de la identificació de cada proteïna per empremta peptídica es troben a l'ANNEX). Alguns *spots* no van poder ésser identificats per diferents motius: o bé tenien un bon espectre de masses però no la proteïna no va ser identificada en el banc de dades; o bé tenien pocs pèptids i l'espectre obtingut era de baixa qualitat. Els 76 *spots* identificats van donar un total de 61 proteïnes, ja que alguns *spots* diferents corresponien a fragments d'una mateixa proteïna o bé a modificacions post-traduccional d'aquesta (fig. 43).

pH 3

pH 8

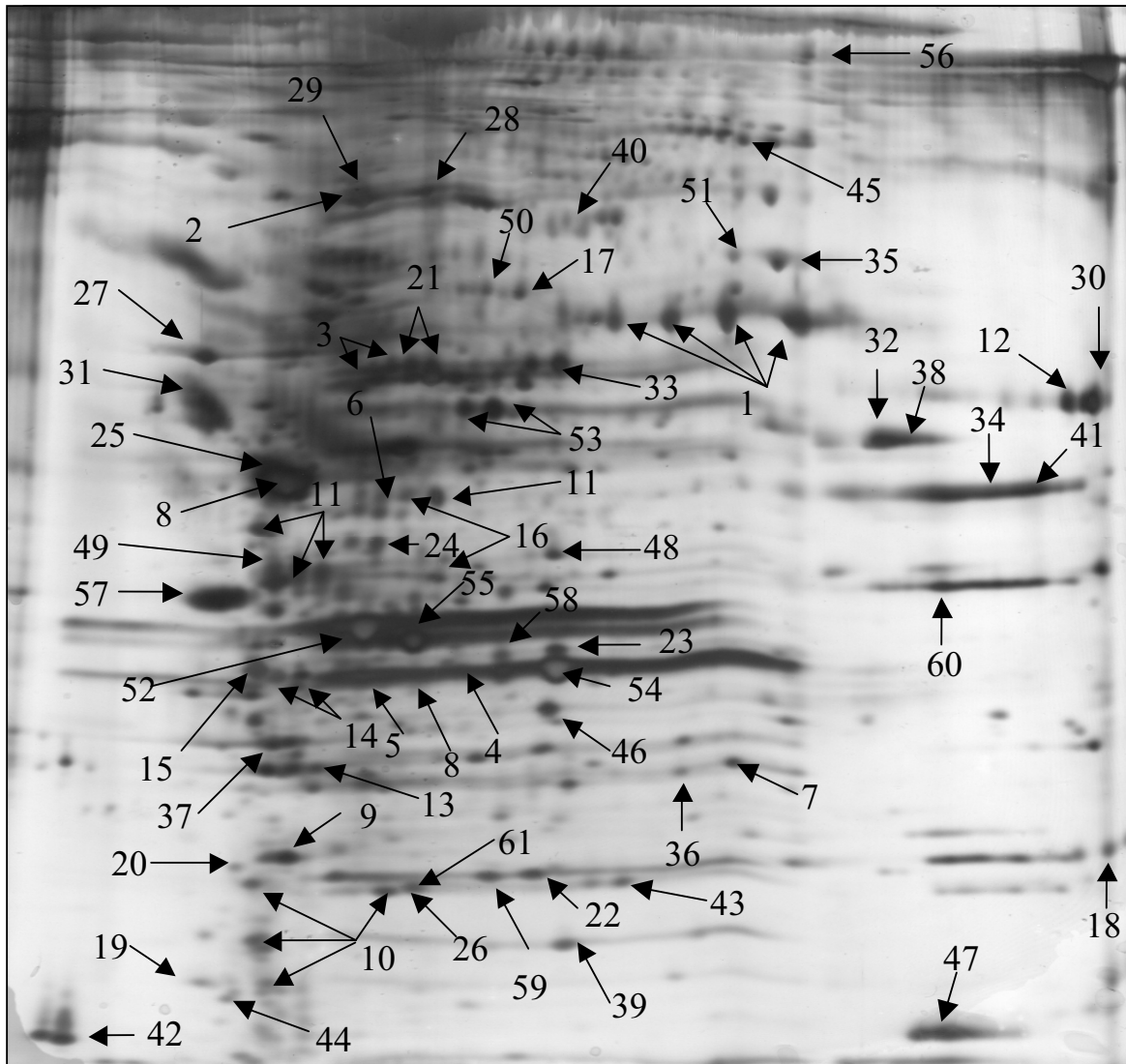


FIGURA 43: Distribució de les 61 proteïnes identificades en un gel representatiu del medi condicionat de PaSC/ABCG2+, en un percentatge d'acrilamida del 12% (tamany de 200 a 18 Kda), i un rang de pH de 3 a 8. S'identifiquen 76 spots.

Aquestes 61 proteïnes identificades es van agrupar en funció de la seva activitat biològica (veure **taula 2**), obtenint-se 10 famílies diferents. L'abundància de cada família respecte al total està indicada en percentatge entre parèntesi:

- Proteïnes estructurals i de citoesquelet (19,67%)
- Proteïnes de matriu extracel·lular i relacionades (13,11%)
- Proteïnes de creixement cel·lular, desenvolupament i diferenciació (11,48%)
- Proteïnes de proteolisi i relacionades (11,48%)
- Proteïnes de resposta immune (9,84%)
- Proteïnes de metabolisme (9,84%)
- Proteïnes de transport (8,20%)
- Xaperones (8,20%)
- GTPases i relacionades (4,92%)
- Proteïnes relacionades amb el retinol (3,28%)

			Secreció	num spots
Proteïnes de proteolisi i relacionades				
1	<u>Q08628</u>	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	1	4
2	<u>P33436</u>	72 kDa type IV collagenase (MMP2)	1	1
3	<u>Q80ZA3</u>	Alpha-2 antiplasmin	1	2
4	<u>Q8R5H1-4</u>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15-Isoform 4 *	2	1
5	<u>Q8C1T2</u>	Adult male kidney cDNA, proteasome regulatory particle *	3	1
6	<u>Q6IN22</u>	Cathepsin B	1	1
7	<u>Q6PW16</u>	ATPase 3 (Fragment) proteasome *	2	1
Proteïnes estructurals i de citoesquelet				
8	<u>Q866S9</u>	Glial fibrillary acidic protein (Fragment) *	2	2
9	<u>Q4R7K6</u>	Testis cDNA, similar to human desmin *	2	1
10	<u>P31000</u>	Vimentin	2	4
11	<u>Q60527</u>	Tropomyosin-1	3	4
12	<u>Q63607</u>	Tropomyosin 3 alpha	2	1
13	<u>Q8K0Z5</u>	Tropomyosin 3, gamma	3	1
14	<u>Q63610</u>	Tropomyosin 3 isoform 6	3	2
15	<u>P09495</u>	Tropomyosin-4 alpha chain	3	1
16	<u>P48679</u>	Lamin-A	3	2
17	<u>P21619</u>	Lamin-B2 *	3	1
18	<u>P31232</u>	Transgelin	2	1
19	<u>Q64119</u>	Myosin light chain	3	1
Proteïnes de creixement cel·lular, desenvolupament i diferenciació				
20	<u>Q6S9D9</u>	Neuromodulin = Growth-associated protein 43 *	3	1
21	<u>P97298</u>	Pigment epithelium-derived factor=serpin f1 *	1	2
22	<u>Q9H1J7</u>	Protein Wnt-5b *	1	1
23	<u>Q8IVY4</u>	DIXDC1 protein (Fragment) *	3	1
24	<u>Q38PG1</u>	AHNAK 1 (Fragment)=Desmoyokin	3	1
25	<u>Q6GSZ4</u>	SPARC, osteonectin	1	1
26	<u>P17777</u>	Leukemia inhibitory factor	1	1
Xaperones				
27	<u>P18418</u>	Calreticulin	1	1
28	<u>Q4FZY7</u>	70 kDa heat shock protein 8=HSPA8	3	1
29	<u>P06761</u>	78 kDa glucose-regulated protein=HSPA5	1	1
30	<u>P19324</u>	47 kDa heat shock protein=SerpinH1	1	1
31	<u>O35783</u>	Calumenin	1	1

Resultats

			Secreció	num spots
Metabolisme				
32	<u>P16617</u>	Phosphoglycerate kinase 1	3	1
33	<u>Q5EB49</u>	Enolase 1, alpha	2	1
34	<u>P05065</u>	Fructose-bisphosphate aldolase A	3	1
35	<u>P11980-2</u>	Isoform M2 of Pyruvate kinase	3	1
36	<u>P47727</u>	Carbonyl reductase [NADPH] 1	2	1
37	<u>Q3UH20</u>	Adult male brain undefined cell line cDNA, similar to GTPasa *	3	1
Proteïnes de transport				
38	<u>Q9R0D6</u>	Transcobalamin-2	1	1
39	<u>Q6P7T1</u>	Ferritin light chain 1	3	1
40	<u>Q60770</u>	Syntaxin-binding protein 3 *	3	1
41	<u>Q56A28</u>	Synaptotagmin 5	1	1
42	<u>Q9Y587</u>	AP-4 complex subunit sigma-1 *	3	1
GTPases i proteïnes relacionades				
43	<u>Q91V41</u>	RAB-14, Ras-related protein *	3	1
44	<u>Q504L6</u>	RAB-15, member RAS oncogene family	1	1
45	<u>Q92974</u>	Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor = ARHGEF2 *	3	1
Proteïnes de resposta immune				
46	<u>Q9MXM3</u>	MHC class I antigen *	1	1
47	<u>P61626</u>	Lysozyme C *	1	1
48	<u>Q8IX95</u>	Cutaneous T-cell lymphoma-associated antigen *	2	1
49	<u>Q5W9V9</u>	Recombination-activating gene 1 (Fragment) *	2	1
50	<u>Q6RUG5</u>	Islet cell autoantigen 1-like protein	3	1
51	<u>Q3TDQ5</u>	APG16 autophagy 16-like *	3	1
Proteïnes de matriu extracel·lular i relacionades				
52	<u>Q60785</u>	Procollagen I alpha-1 (Fragment) *	1	1
53	<u>Q99LL6</u>	Collagen I alpha 1 protein (Fragment) *	1	2
54	<u>Q91VL4</u>	Collagen I alpha 2 protein (Fragment) *	1	1
55	<u>Q8BJU6</u>	Procollagen III, alpha 1 *	1	1
56	<u>P13941</u>	Collagen III alpha-1 chain	1	1
57	<u>Q70603</u>	Collagen V alpha 1 (Fragment)	1	1
58	<u>Q59GI7</u>	Glypican 1 variant (Fragment) *	1	1
59	<u>Q05793</u>	Perlecan*	1	1
Proteïnes relacionades amb el retinol				
60	<u>Q9BTZ2</u>	Dehydrogenase/reductase SDR family member=DHRS4 *	3	1
61	<u>P06911</u>	Epididymal retinoic acid-binding protein = ERABP	1	1
TOTAL SPOTS				76

TAULA 2: Llista de les 61 proteïnes identificades, amb el número d'accés obtingut de la base de dades SwissProt. (*) indica que la proteïna identificada amb l'*score* més alt no correspon a l'espècie *Rattus Norvegicus*. La classificació de les vies de secreció és la següent: (1) secreció via clàssica, (2) secreció via no clàssica, (3) no secretades. També s'indica el nombre de spots que s'han identificat associats a una mateixa proteïna

Amb les 61 proteïnes identificades es va procedir a valorar la presència de pèptid senyal amb el software SignalP V3. Els resultats d'aquest anàlisi van donar una predicció del pèptid senyal en 26 proteïnes (**taula 2**, columna secreció, número 1) i les vam considerar com a secretades per la via clàssica (depenent de Reticle Endoplasmàtic/Golgi). A més, el software SecretomeP V3 ens permet predir mitjançant algorismes si la proteïna a estudiar pot ser secretada per vies no clàssiques. El criteri de selecció és obtenir un *score* de *neural network* en aquest *software* superior a 0,5. Les proteïnes classificades en aquesta via van ser 11 (**taula 2**, columna secreció, número 2).

El resum dels resultats del secretoma queden reflectits en els percentatges següents:

68% d'indentificació (76spots/112spots)

76 spots corresponen a 61 proteïnes

61% de proteïnes secretades (37 proteïnes / 61 proteïnes)

70% secretades via clàssica (26 proteïnes / 37 proteïnes)

30% secretades via no clàssica (11 proteïnes / 37 proteïnes)

Les agrupacions per famílies de les proteïnes solubles (secretades per qualsevol de les dues vies) estan representades a la **figura 44**. Seran doncs algunes d'aquestes proteïnes solubles les que podran exercir els efectes del medi condicionat de les PaSC/ABCG2+ observats en els apartats anteriors.

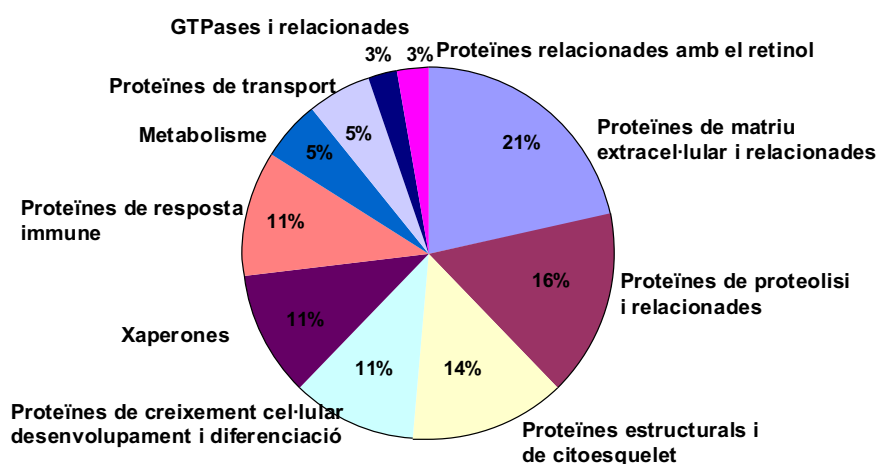


FIGURA 44: Representació gràfica de la classificació en famílies de les proteïnes solubles identificades i del percentatge de cadascuna respecte al total.

Les proteïnes que mitjançant empremta peptídica no van donar un resultat clar van ser confirmades per RT-PCR (no tenien un P-valor prou alt, o la distància entre la següent proteïna identificada no era suficient). Adicionalment, també es van comprovar les que si havien estat clarament identificades però que tenien un interès especial dins el context del nostre estudi, i d'altres escollides aleatòriament. Podem destacar la identificació per primera vegada que les cèl·lules estellades pancreàtiques secreten PEDF, Wnt5b i LIF (**fig. 45**).

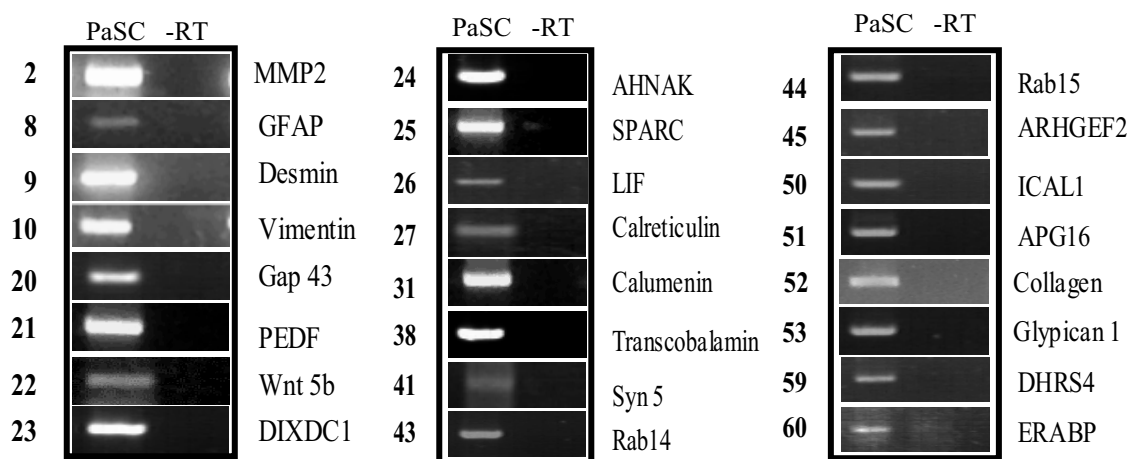


FIGURA 45: Gels representatiu de la RT-PCR per a la confirmació de resultats dels gels 2D. Cultiu primari de cèl·lules pancreàtiques estrellades PaSC/ABCG2+, control negatiu de la PCR (-RT).

15.- Anàlisi bioinformàtic dels resultats de proteòmica

Els resultats de la proteòmica van indentificar 61 proteïnes, amb localitzacions subcel·lulars diferents i implicacions en diverses funcions. Vam procedir a analitzar aquestes proteïnes mitjançant el programa Ingenuity Pathways, un sistema que transforma una llista de proteïnes en un conjunt de xarxes segons les bases de dades que es mantenen en l'Ingenuity Pathways Knowledge Base (IPKB). Aquesta base de dades conté informació de les interaccions entre gens, proteïnes i altres molècules biològiques. Les xarxes estan dissenyades per ajudar-nos a entendre com estan relacionades biològicament les proteïnes que hem identificat, seleccionant els que presenten més interaccions entre elles i per tant indicant la seva possible participació en el mateix procés molecular.

Les xarxes es representen mitjançant nodes (proteïnes) i interaccions entre elles (relació biològica entre els nodes). El programa ens marca la funció dels nodes mitjançant una visualització gràfica (veure llegenda a l'ANNEX). Per la interpretació de les xarxes cal saber que les proteïnes que estan en negreta són les "focus proteins" que provenen de la identificació del 2D, i les que no estan en negreta són les "non focus proteins" que necessita el programa per completar la xarxa. En relació a les línies que marquen les interaccions entre unes i altres, la línia contínua descriu una interacció directa, i la línia discontinua descriu una interacció indirecta entre nodes. Les xarxes amb proteïnes focus molt interconnectades indicarien la seva participació en una funció biològica significativa. A més, cada xarxa té un *score*, que quan és major de 19 indica que les xarxes i els nodes que els formen no han estat seleccionats al atzar. Les abreviacions de totes les proteïnes de les xarxes estan a l'ANNEX.

El programa ens va proposar tres xarxes (**fig. 46, 47 i 48**) amb possibles vies biològiques que relacionen diverses molècules entre si.

Xarxa 1 (score 27).- Relaciona els nodes extracel·lulars com col·lagen V amb els intracel·lulars com tropomiosines, xaperones, enolasa, GTPases, proteïnes del proteasoma, i fosfoglicerat kinasa. Aquesta xarxa conté 15 proteïnes “focus”, i identifica TGF β 1 com a node central “non focus”. Les principals funcions d’aquesta xarxa proposades pel programa serien organització i ensamblatge cel·lular (veure taula ANNEX).

Xarxa 2 (score 27).- Identifica wnt5b, PEDF (serpinF1), SPARC, MMP2, col·lagens, PCOLCE (peptidasa del col·lagen), transcobalamin2, i serpinH1 a la fracció extracel·lular de la xarxa. A la membrana plasmàtica localitza gap43 i a la part intracel·lular tenim xaperones, GTPases, vimentina i al nucli lamina A. Aquesta xarxa conté 15 proteïnes focus, i podem destacar que la majoria d’aquestes es localitzen a l’espai extracel·lular. Les principals funcions d’aquesta xarxa proposades pel programa estarien implicades en desenvolupament de teixits (veure taula ANNEX).

Xarxa 3 (score 22).- Com a única proteïna focus extracel·lular tenim LIF. A la membrana plasmàtica identifica la proteïna de transport STXBP3, i en les interaccions intracel·lulars hi ha GFAP, *ferritin light chain*, *myosin light chain*, catepsin B, piruvat quinasa, transgelin, carbonil reductasa, i aldolasa. De localització nuclear tenim RAG1, calreticulín i AHNAK. Aquesta xarxa conté 13 proteïnes “focus”, i les principals funcions en que estarien implicades serien interaccions i senyalització cèl·lula-cèl·lula, i desenvolupament (veure taula ANNEX).

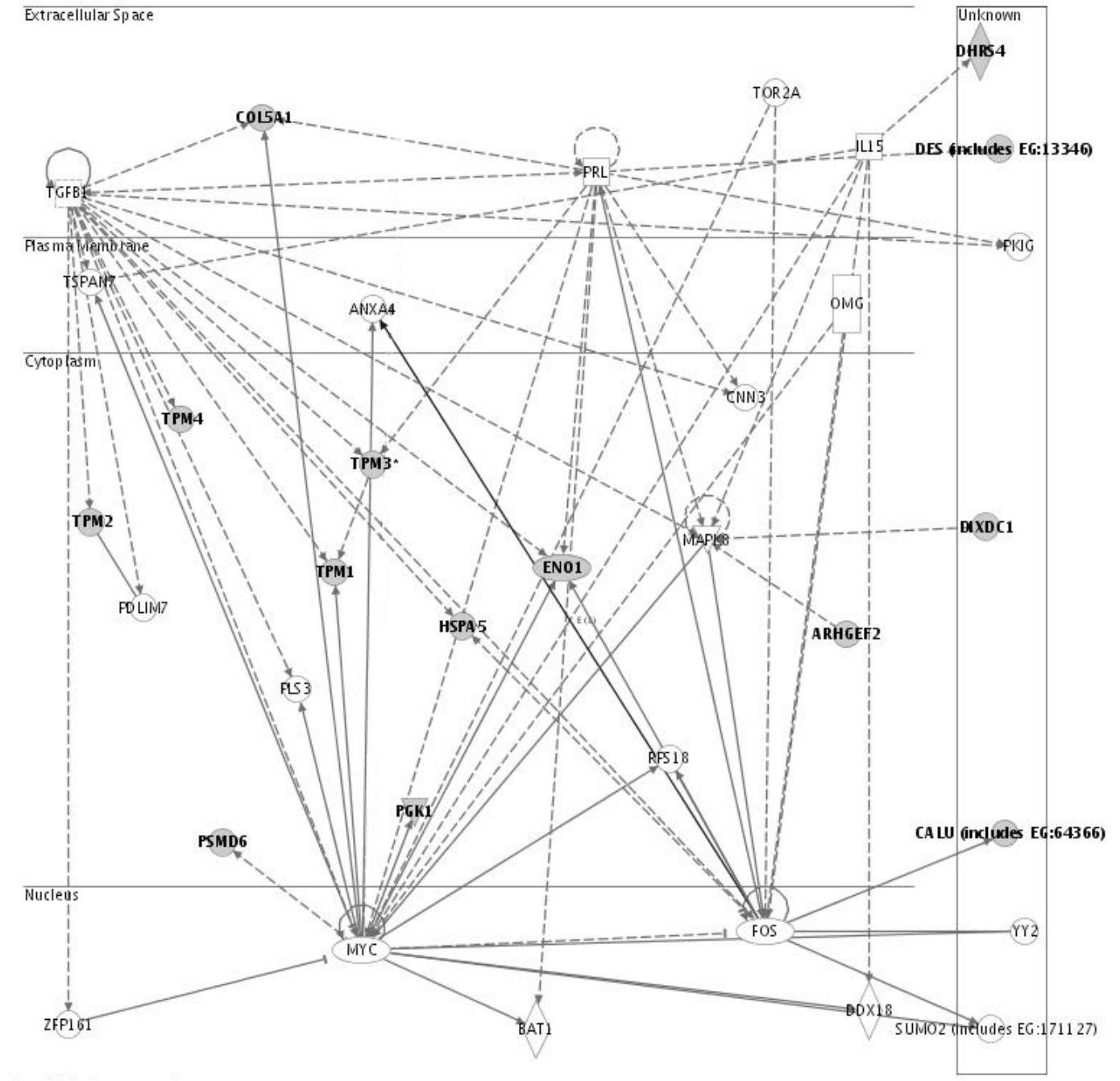


FIGURA 46: Xarxa 1 procedent del programa Ingenuity Pathways. La interpretació de les abreviatures de les proteïnes presents en aquest diagrama es troben a l'ANNEX.

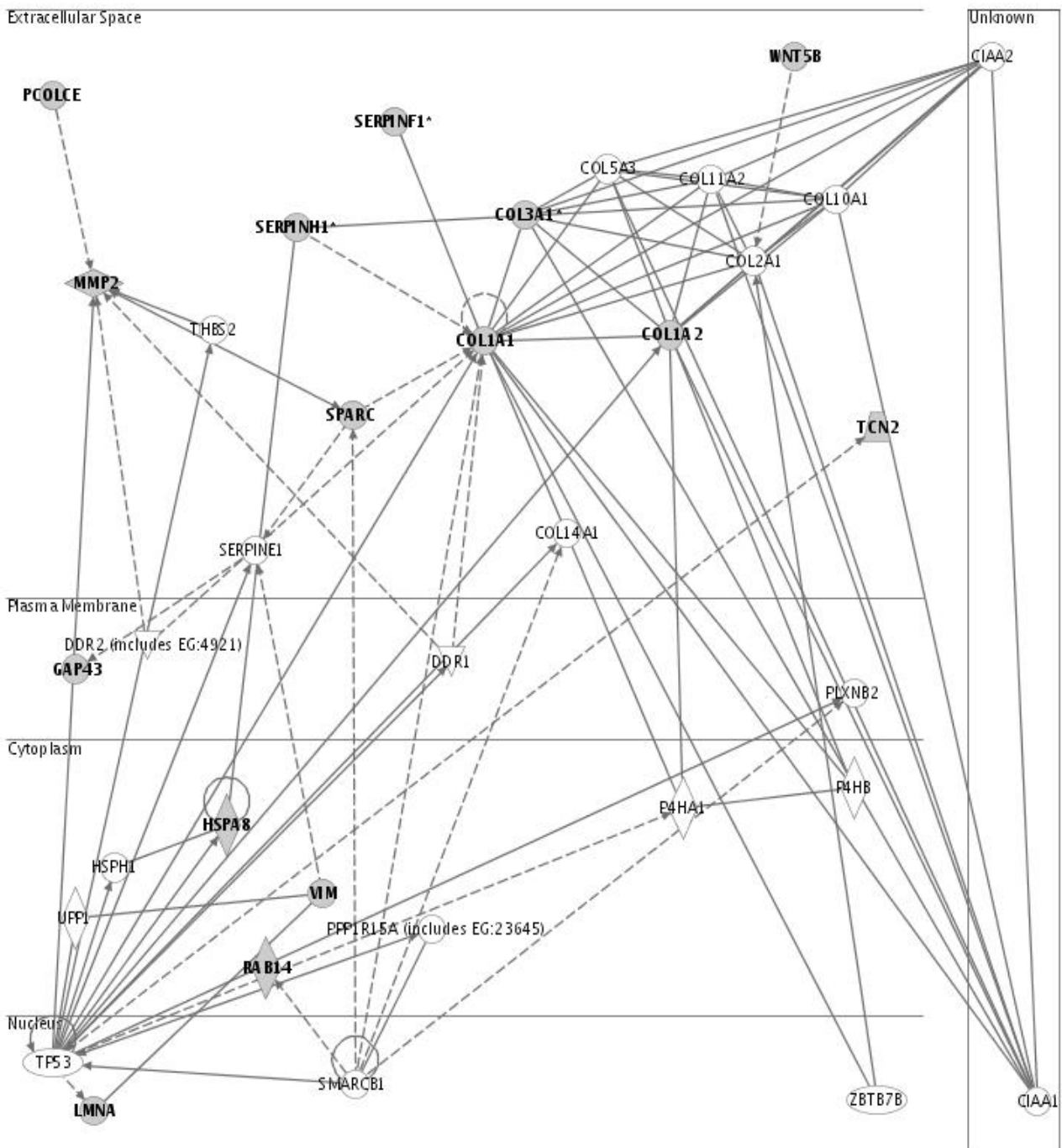


FIGURA 47: Xarxa 2 procedent del programa Ingenuity Pathways. La interpretació de les abreviatures de les proteïnes presents en aquest diagrama es troben a l'ANNEX.

Resultats

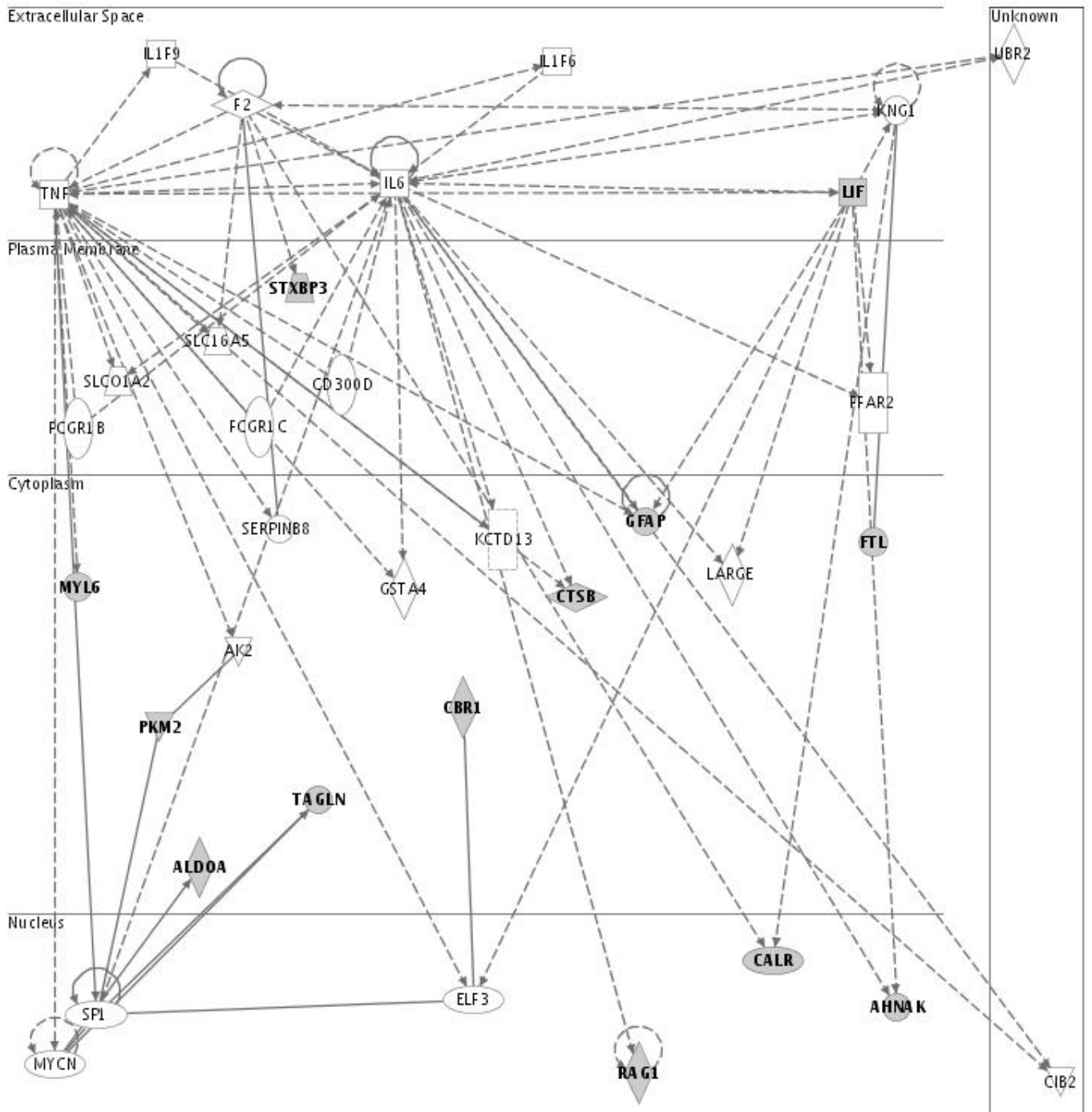


FIGURA 48: Xarxa 3 procedent del programa Ingenuity Pathways. La interpretació de les abreviatures de les proteïnes presents en aquest diagrama es troben a l'ANNEX.

15.1.- Detecció de TGFβ1 en el medi condicionat

En la primera xarxa obtinguda pel programa *Ingenuity Pathways* es proposa TGFβ1 com a node "non focus" central. Aquest factor no va poder ésser identificat per proteòmica perquè els gels utilitzats en el nostre anàlisi són del 12% i només poden detectar molècules majors de 20 kDa (la molècula de TGFβ1 té un tamany de 12 kDa). Per aquest motiu es va procedir a determinar si els cultius PaSC/ABCG2+ secretaven TGFβ1 al medi condicionat mitjançant ELISA immunoassaig, obtenint uns valors de $48,95 \pm 5,19$ pg/mL de TGFβ1, compatibles amb els descrits a la literatura (fig. 49)

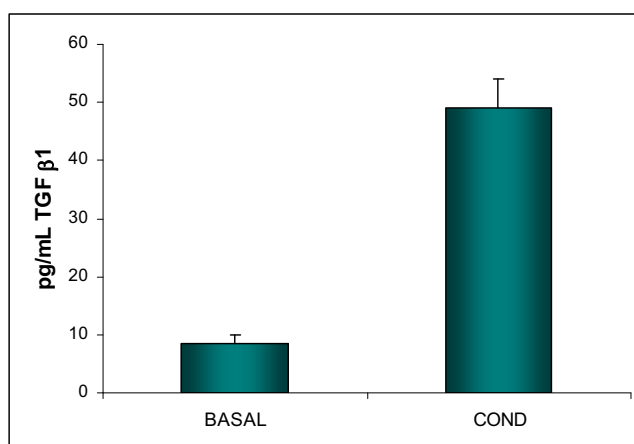


FIGURA 49: Detecció per ELISA del factor TGFβ1 secretat en el medi condicionat de les cèl·lules estrellades PaSC/ABCG2+ durant 24 hores. Resultat de la valoració de 10 medis condicionats independents.

16.- Efectes de TGFβ1 sobre la línia cel·lular ductal ARIP

16.1.- Expressió de receptors de TGFβ1

Una vegada detectat TGFβ1 en el medi condicionat, i per intentar demostrar la seva possible implicació en els efectes d'aquest medi sobre les cèl·lules ARIP, vam analitzar l'expressió dels receptors específics del lligand TGFβ1 en la línia ductal ARIP (fig. 50). Els resultats obtinguts confirmen l'expressió dels receptors en les cèl·lules cultivades amb medi basal i també en les cèl·lules tractades amb medi condicionat.

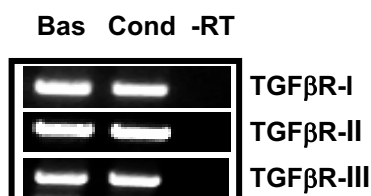


FIGURA 50: Gel representatiu de la RT-PCR dels receptors de TGFβ1 en la línia cel·lular ARIP cultivades amb medi basal (bas) o amb medi condicionat (cond). En el tercer carril (-RT) tenim el control negatiu de la PCR.

16.2.- Proliferació cel·lular

TGF β 1 és una molècula amb efectes antiproliferatius descrits en molts tipus de models experimentals. Per intentar identificar si aquesta molècula causava la inhibició de la proliferació vam procedir a bloquejar els receptors de TGF β 1 en les cèl·lules ARIP alhora que tractavem amb medi condicionat. Com a controls externs, es van testar els efectes de l'addició de TGF β 1 exogen al medi de cultiu basal, així com els efectes de bloquejar els seus receptors en el medi on havíem afegit TGF β 1 exogen. També vam incloure un segon control utilitzant una condició on es va afegir IgG, per assegurar que els efectes no fossin deguts a unions inespecífiques dels anticossos.

Els resultats obtinguts i presentats a la **figura 51** mostren una disminució de la proliferació significativa de 38,8% \pm 0,06 de les cèl·lules tractades amb medi condicionat, respecte al basal (comparables als obtinguts en la figura 32 B). El bloqueig de TGF β 1 del medi condicionat provoca una recuperació de la proliferació significativa, indicant que TGF β 1 és la molècula causant de l'efecte antiproliferatiu en les cèl·lules ARIP. En les condicions control, els resultats indiquen que l'addició de TGF β 1 exogen provoca una disminució de la proliferació respecte al basal similar a la del medi condicionat (38,2% \pm 0,04), i que el segrestament d'aquest TGF β 1 exogen recupera la proliferació de manera significativa. Hem comprovat que els efectes de l'addició de TGF β 1 són específics i no deguts a la presència d'anticossos, ja que quan afegim IgG al medi basal no veiem efectes sobre la proliferació.

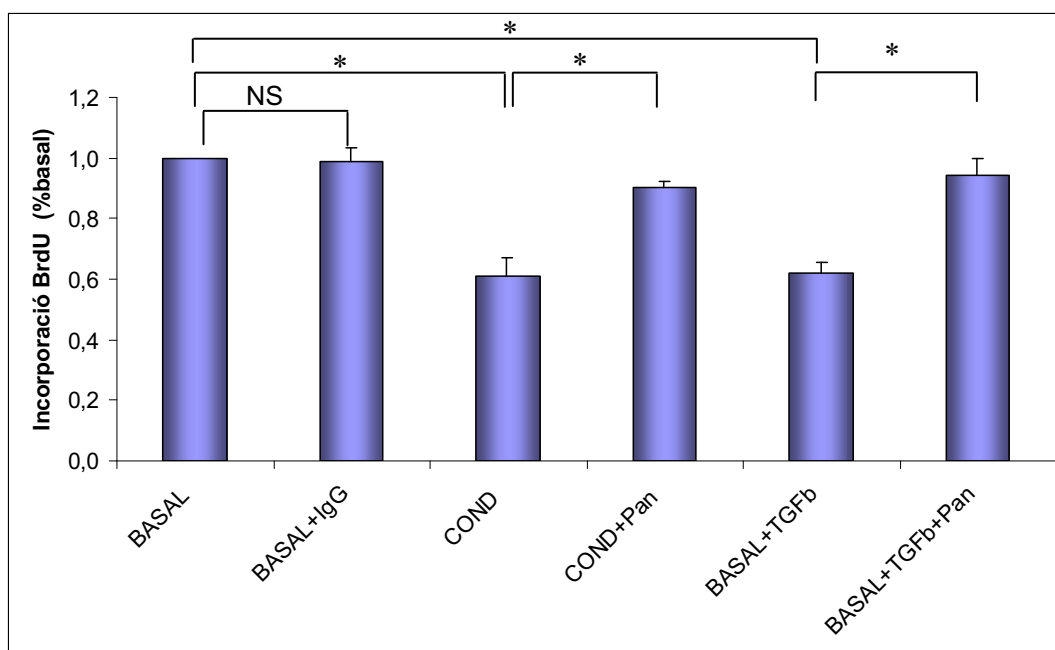


FIGURA 51: Anàlisi de la proliferació de la línia cel·lular ARIP després de 24 hores de tractament amb diverses condicions: medi basal, medi basal més IgG 20 μ g/mL, medi condicionat, medi condicionat més Pan TGF β 20 μ g/mL, medi basal més TGF β 1 10 ng/mL i medi basal més Pan TGF β 20 μ g/mL i TGF β 1 10 ng/mL. Els resultats s'expressen en percentatge de BrdU incorporat respecte a la proliferació amb el medi basal. S'han realitzat 3 experiments independents (NS, no significatiu; * p <0.05). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM)

16.3.- Viabilitat cel·lular

Com en els experiments anteriors (veure figura 33), i també per assegurar que la disminució de la proliferació no era deguda a una pèrdua de viabilitat de les cèl·lules, vam realitzar els estudis de reducció de MTT per mesurar la viabilitat. Els resultats obtinguts i presentats a la **figura 52** mostren que la viabilitat no es veu afectada en cap dels tractaments realitzats.

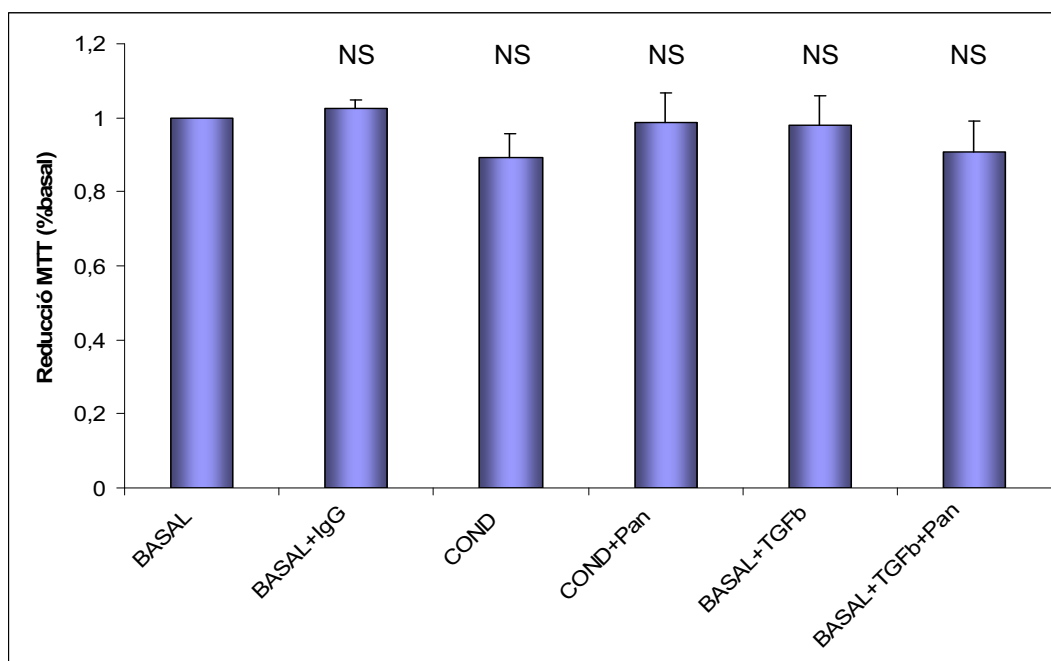


Figura 52: Anàlisi de la viabilitat cel·lular de la línia ARIP després de 24 hores de tractament amb diverses condicions: medi basal, medi basal més IgG 20 µg/mL, medi condicionat, medi condicionat més Pan TGFβ 20 µg/mL, medi basal més TGFβ1 10 ng/mL i medi basal més Pan TGFβ 20 µg/mL i TGFβ1 10 ng/mL. Els resultats s'expressen en percentatge de MTT reduït respecte al medi basal. S'han realitzat 3 experiments independents (NS, no significatiu). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM)

16.4.- Expressió de PDX1

La implicació de TGFβ en processos de transdiferenciació està descrita en diferents models cel·lulars. La confirmació de TGFβ1 com la molècula causant de la inhibició de la proliferació en la línia ARIP ens va fer pensar que potser també podria tenir efectes en la inducció de PDX1 observada en el nostre model.

Resultats

Vam quantificar l'expressió de PDX1 en la línia ARIP amb diferents tractaments. Com podem veure a la **figura 53**, l'addició de TGF β 1 exogen no té com a efecte un augment de PDX1 en les cèl·lules tractades, com passa amb el medi condicionat, i el segrestament d'aquest TGF β 1 exogen tampoc provoca canvis en l'expressió basal de PDX1. Quan segrestem TGF β 1 del medi condicionat s'observa una lleugera disminució de l'expressió d'aquest factor, sense arribar a nivells de significància estadística (NS). Per tant, podem concloure que el factor TGF β 1 no és el factor implicat en l'increment d'expressió de PDX1 observat en la línia ARIP, sinó que hi ha altres factors en el medi condicionat que estarien exercint aquest efecte de manera directa o indirecta.

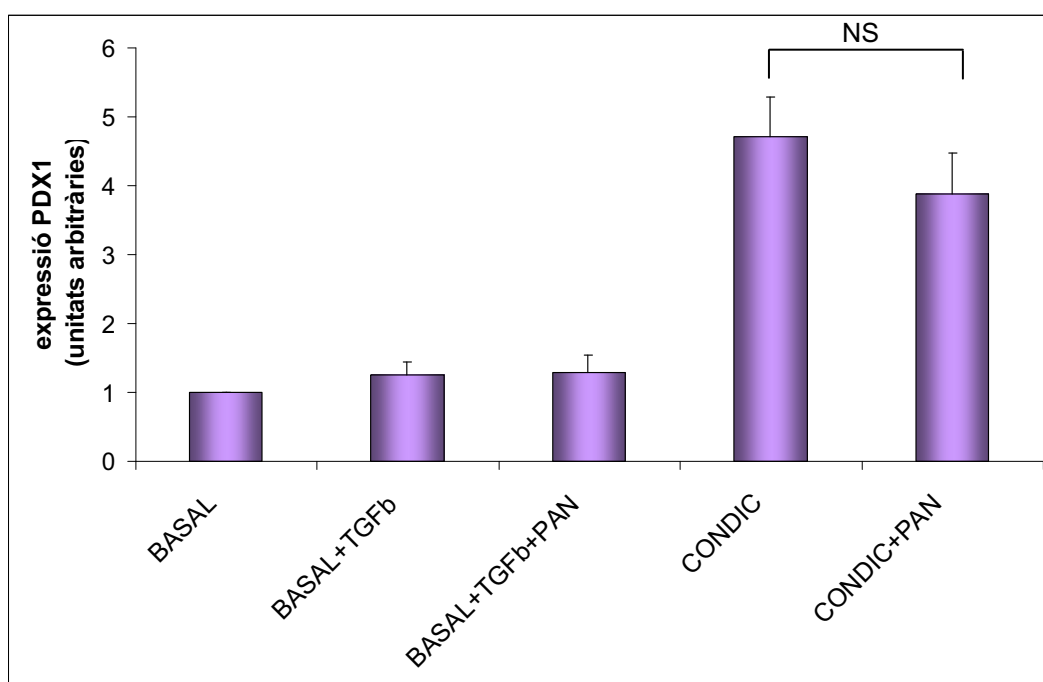


FIGURA 53: RT-PCR a temps real de cèl·lules ARIP tractades amb diferents medis durant 72 hores: medi basal, medi basal més TGF β 1 10 ng/mL, medi basal més Pan TGF β 20 μ g/mL i TGF β 1 10 ng/mL, medi condicionat, medi condicionat més Pan TGF β 20 μ g/mL. L'expressió és en unitats arbitràries, està normalitzada per TBP i s'expressa en relació a l'expressió de Pdx1 en cèl·lules tractades amb medi basal. S'han realitzat 6 experiments independents (NS, no significatiu). Les barres d'error representen l'error estandard de la mitjana (SEM).

17.- Expressió de receptors de LIF i PEDF

D'entre els factors solubles identificats en el secretoma de les PaSC/ABCG2+ amb implicació en processos de diferenciació cel·lular podríem destacar PEDF i LIF.

En l'objectiu 1 hem descrit la transdiferenciació del cultiu de cèl·lules estrellades cap a fenotip endocrí, i en l'objectiu 2 hem observat canvis en l'expressió gènica de la línia ductal ARIP tractada amb medi condicionat. Amb els resultats del secretoma, ens hem plantejat analitzar l'expressió dels receptors d'aquestes dues substàncies (PEDF i LIF) tan en el nostre cultiu primari ABCG2+, com en les cèl·lules ARIP, ja que ambdós factors podrien haver participat en els efectes observats en els dos objectius d'aquesta tesi. Com veiem a la **figura 54**, tant el cultiu primari com la línia cel·lular ARIP expressen les dues subunitats que formen el receptor de LIF (LIF-R, gp130) i també el receptor de PEDF (PEDF-R).

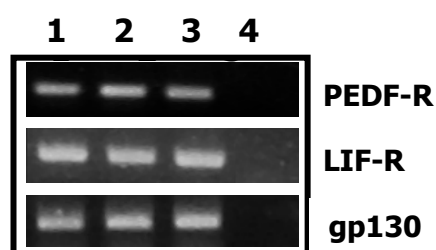


FIGURA 54: Gel representatiu de l'expressió de receptors de PEDF i de les dues subunitats del receptor de LIF en les cèl·lules ARIP, i en el nostre cultiu primari de cèl·lules estrellades PaSC/ABCG2+. (1) control positiu, (2) línia ARIP, (3) cultiu primari PaSC/ABCG2+ i (4) control negatiu de la PCR, -RT.

V.- DISCUSSIÓ

OBJECTIU I

Els tractaments utilitzats en l'actualitat per la diabetis són insatisfactoris ja que no curen la malaltia ni prevenen el desenvolupament de les complicacions associades a la mateixa (Shapiro et al., 2005). La instauració de teràpies de substitució cel·lular en aquesta malaltia requereix disposar d'una població homogènia i funcional del tipus cel·lular que ha de ser substituït, és a dir de cèl·lules productores d'insulina.

Tal com s'ha dit a la introducció, el trasplantament d'illots pancreàtics ha estat, sens dubte, una encoratjadora estratègia per a restaurar la massa de cèl·lula β funcional en els pacients diabètics i poder així aconseguir la normoglicèmia; no obstant presenta limitacions importants com el rebuig de empelt i el gran nombre de pàncreas necessaris per a l'obtenció d'un nombre òptim d'illots (almenys dos donants/pacient trasplantat). En paral·lel a la millora del protocol de trasplantament d'illots, les estratègies actuals d'obtenció de cèl·lules β es duen a terme a partir de cèl·lules troncales embrioniques o bé de cèl·lules progenitores obtingudes de teixit adult (Roche et al., 2005).

Per aconseguir el fenotip de cèl·lula β és necessari aprofundir en el coneixement dels mecanismes moleculars de la pròpia cèl·lula que s'intenta restablir. La viabilitat d'aquesta nova estratègia cel·lular depèn principalment de tres importants requisits: *identificació d'unes cèl·lules pluripotencials* o unes cèl·lules progenitores pancreàtiques que tinguin la capacitat d'autoreplicar-se i generar cèl·lules diferenciades, *identificació dels senyals proliferatius* que permetin expandir d'una manera específica aquests progenitors pancreàtics i la *identificació de senyals instructius* que indueixin la diferenciació d'aquestes cèl·lules pluripotencials o progenitores en cèl·lules β funcionals que secretin insulina correctament processada, d'una manera pulsàtil, i en resposta a concentracions fisiològiques de glucosa.

Actualment, l'existència i el llinatge de cèl·lules progenitores en el pàncreas és un motiu de debat. Alguns estudis indiquen que són les mateixes cèl·lules β les que poden contribuir a la formació de noves cèl·lules productores d'insulina (Dor et al., 2004); i altres estudis defensen que a més de les cèl·lules progenitores residents en el pàncreas, també hi hauria la possibilitat que hi haguessin cèl·lules progenitores d'origen hematopoètic circulants (Lechner and Habener, 2003). Els dos models proposats per l'origen de les cèl·lules troncales adultes en el pàncreas (òrgan específiques o circulants) no són mútuament excloents. Es pot especular que les cèl·lules troncales pluripotents de la medul·la òssia provenen de les cèl·lules pluripotents del blastocit que es mantenen per autorenovació, mentre que també podrien existir les cèl·lules progenitores multipotents específiques de teixit amb una capacitat de diferenciació més restringida. D'altra banda, també s'han proposat processos de transdiferenciació per generar noves cèl·lules β a partir de cèl·lules pancreàtiques ductals (Bonner-Weir et al., 2000; Bonner-Weir et al., 2004), acinars (Baeyens et al., 2005), i fins i tot de cèl·lules mesenquimals (Seeberger et al., 2006), (Gallo et al., 2007). Malgrat tot, encara no està clar quines són les senyals específiques que indueixen a la diferenciació, i quines són les senyals proliferatives per expandir el tipus de cèl·lula progenitora específica (Kim et al., 1997; Scharfmann, 2000).

Un punt important per la identificació de cèl·lules multipotencials és la necessitat de conèixer marcadors cel·lulars específics que permetin no només la seva identificació, sinó també el seu aïllament. En els últims anys, els sistemes de transportadors de multidrogués s'han proposat com a marcadors de cèl·lules troncales

(Zhou et al., 2001). Concretament, el subtipus ABCG2 identificat en la població SP, també s'ha descrit en pàncreas humà i en altres tipus de cèl·lules pluripotencials (Lechner et al., 2002), (Krishnamurthy and Schuetz, 2006). Tal com es comenta en la introducció d'aquesta tesi, els marcadors específics de cèl·lula progenitora pancreàtica encara no estan ben definits. En el nostre primer objectiu doncs, ens vam plantejar investigar si altres poblacions cel·lulars pancreàtiques a més de la SP expressaven el transportador ABCG2, i en cas afirmatiu, avaluar la seva possible plasticitat cel·lular dirigint la nostra investigació cap a l'obtenció d'un fenotip endocrí, i més concretament productor d'insulina.

En el nostre estudi, a través d'una selecció hem aïllat una població cel·lular ABCG2 (+) a partir de pàncreas de rata, que s'ha establert com un cultiu primari i s'ha pogut expandir mitjançant passatges com una línia cel·lular durant dos anys. El seu cariotip és compatible amb el de qualsevol altra línia cel·lular establerta, i la seva possibilitat d'expansió ens ha permès realitzar una completa caracterització cel·lular i funcional.

CARACTERITZACIÓ DE LA POBLACIÓ ABCG2(+) SELECCIONADA

Els resultats obtinguts mostren que el mètode de selecció a través del transportador és un mètode robust que ens permet aïllar una població cel·lular amb capacitat d'extrusió de fàrmacs com el mitoxantrone. La caracterització del nostre cultiu primari ABCG2 (+) ens indica que no correspon a cèl·lules amb fenotip SP sinó que presenta característiques de cèl·lules mesenquimals.

Durant la realització de la caracterització del cultiu comprovem que expressen marcadors de cèl·lules progenitores com NCAM, Thy 1.1, nestina, i el recentment proposat FGFR1 (IIIb) (Cras-Meneur and Scharfmann, 2002). A més d'aquests marcadors de cèl·lules progenitores també detectem la presència d'altres marcadors com GFAP (neural), alfa actina i desmina (muscular), i vimentina (mesenquimal). Finalment, l'autofluorescència observada durant les tincions, i la positivitat pel marcatge Oil Red que tenyeix el material liposoluble del citoplasma, juntament amb els marcadors col·lagen, MMP2, TIMP i CD38 (March et al., 2007) ens van fer arribar a la conclusió que el nostre cultiu primari corresponia a un determinat tipus cel·lular pancreàtic: les cèl·lules estrellades (PaSC). La descripció per primera vegada de marcadors propis de cèl·lula troncal en aquest tipus cel·lular com NCAM, Thy 1.1 i FGFR1(IIIb) és un fet important, ja que l'únic marcador d'aquestes característiques que s'havia descrit amb anterioritat en les PaSC era la nestina (Lardon et al., 2002).

Està descrit que les PaSC s'activen *in vitro* pel fet d'ésser cultivades en plàstic (Glass et al., 2006), per tant podíem esperar que un cop establert el cultiu primari ens trobéssim amb el fenotip actiu de les cèl·lules estrellades. Així doncs, el nostre cultiu confirma que en la fase de monocapa les cèl·lules proliferen més, no acumulen gaire vitamina A al seu citoplasma, expressen alfa-actina, i a més, tenen gran capacitat de síntesi de factors solubles (característiques compatibles amb el fenotip de cèl·lules estrellades actives).

Esponàniament, les cèl·lules van adoptar un fenotip en forma de petites agrupacions cel·lulars (*clusters*) que creixien per sobre la monocapa de cèl·lules independentment de la densitat cel·lular. La caracterització d'aquestes agrupacions va demostrar que estaven formades principalment per cèl·lules estrellades amb fenotip

quiescent: presenten una menor proliferació respecte a l'estat actiu, acumulen més quantitat de vitamina A al seu citoplasma, i no expressen alfa-actina. Els estudis ultraestructurals van confirmar les descripcions observades, facilitant l'associació del fenotip quiescent als *clusters* cel·lulars.

Hi ha estudis que descriuen el pas de fenotip actiu a fenotip quiescent en el fetge; proposen que les cèl·lules hepàtiques estrellades tenen la capacitat de mobilitzar el retinol directament a la sang (Andersen et al., 1992), i suggereixen que passa el mateix a la resta de cèl·lules estrellades extra-hepàtiques. En el nostre estudi, no sabem ben bé com es realitza la mobilització del retinol en els canvis d'estat d'activació del cultiu, però les propietats diferenciatives d'aquesta substància podrien haver contribuït al procés de transdiferenciació observat en els passatges primerencs del nostre cultiu (expressió de PDX1 i insulina, que posteriorment es negativitza) (Skoudy et al., 2004), (Kramer and Clem, 2003).

La pèrdua de retinol, la secreció de MMP2 i TGFβ1, i l'expressió de substàncies que promouen el reclutament de leucòcits com les molècules d'adhesió CAMs són algunes de les característiques descrites en les cèl·lules hepàtiques actives que hem detectat també en el nostre model de pàncreas (veure **figura 1**).

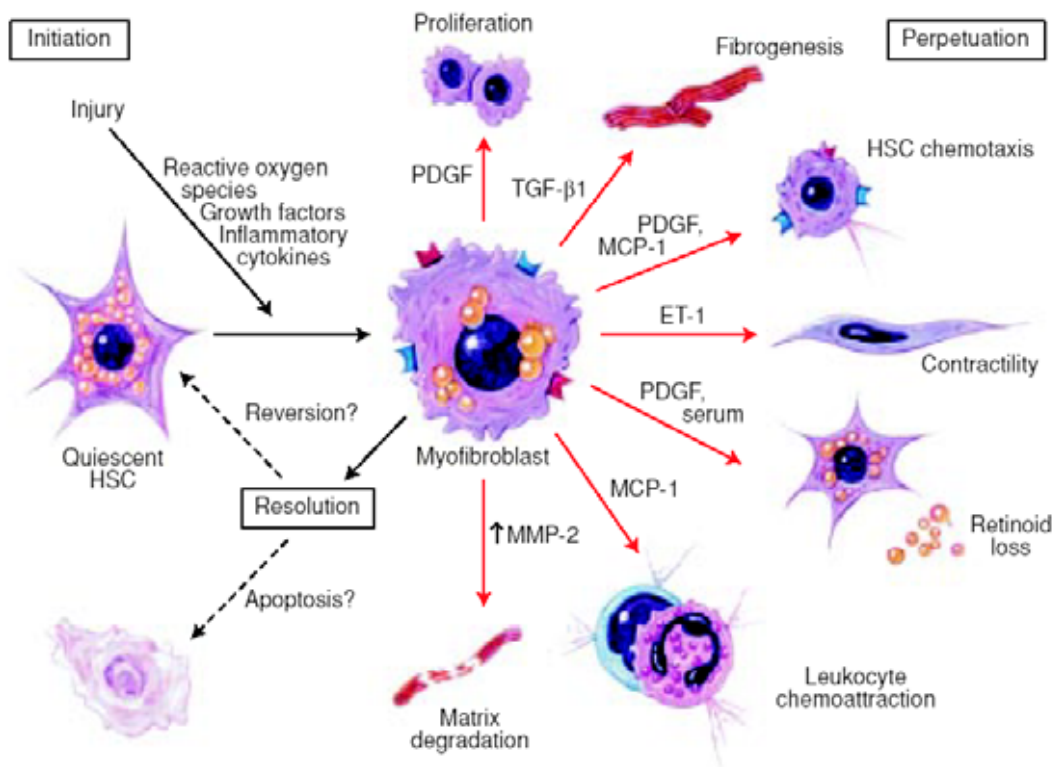


Figura 1.- Fenotip de les cèl·lules hepàtiques estrellades actives i l'associació a una possible funció per cada un dels seus factors solubles secretats. Els resultats d'aquesta figura podrien ser extrapolables a les PaSC. (MCP-1=Monocyte chemotactic protein-1, ET-1= Endothelin-1) Extret de (Friedman, 2000).

In vitro, la utilització d'una matriu extracel·lular Matrigel contribueix a la inactivació de les cèl·lules estrellades pancreàtiques (Jesnowski et al., 2005). En el nostre estudi també detectem una major proporció de cèl·lules que acumulen vitamina A (inactives) durant el cultiu dels *clusters* en Matrigel. Tot i que observem els dos estats d'activació de les PaSC/ABCG2+ en cultiu, no podem assegurar que totes les cèl·lules

de cada fase (monocapa o *cluster*) corresponguin a un estat o a un altre, però sí que podem dir que la majoria de cèl·lules de la monocapa presenten fenotip actiu, i la majoria de cèl·lules del *cluster* presenten fenotip quiescent.

Una característica poc estudiada en les PaSC és la presència de diferents FGF i dels seus receptors en aquest tipus cel·lular. Els FGF són una família que en vertebrats té més de 20 membres (Ornitz and Itoh, 2001) que conserven una gran homologia a nivell gènic i de seqüència d'aminoàcids. Són una família de factors de creixement que indueixen respostes pleiotròpiques, causant efectes tant a nivell de desenvolupament embrionari com en l'adult. En desenvolupament tenen un paper en la morfogènesis regulant la proliferació cel·lular, i la diferenciació i migració cel·lulars; i en l'adult, tenen funcions en el control del sistema nerviós, en reparació de teixits i en vascularització tumoral (Steiling and Werner, 2003). La seva acció està mediada per quatre receptors de membrana tirosina quinases (FGFR) que poden tenir diferents isoformes (b i c) per *splicing* alternatiu (Itoh and Ornitz, 2004). Les dues formes alternatives tenen diferent afinitat pels lligands (veure **taula 1**). A més, s'ha descrit que la isoforma FGFR2b s'expressa principalment en cèl·lules epitelials, i la isoforma FGFR2c s'expressa en cèl·lules mesenquimals (Orr-Urtreger et al., 1993). Pel que fa als lligands, també es considera que els FGF7 i 10 serien mesenquimals, mentre que els FGF2, 4, 6, 8, 9, i 17 es considera que s'expressen en l'epiteli. Aquesta expressió selectiva de FGFR i els seus lligands permet la comunicació bidireccional entre el mesènquima i l'epiteli en el desenvolupament de vertebrats (Goldfarb, 1996), (Hogan, 1999). El nostre estudi identifica les cèl·lules estrellades com a productores de FGF, fet que podria suggerir la participació d'aquestes cèl·lules en la comunicació epiteli-mesènquima.

FGFR isoform	Ligand specificity
FGFR1b	FGF1, -2, -3 and -10
FGFR1c	FGF1, -2, -4, -5 and -6
FGFR2b	FGF1, -3, -7, -10 and -22
FGFR2c	FGF1, -2, -4, -6, -9, -17 and -18
FGFR3b	FGF1 and -9
FGFR3c	FGF1, -2, -4, -8, -9, -17, -18 and -23
FGFR4	FGF1, -2, -4, -6, -8, -9, -16, -17, -18 and -19

Taula 1.- Especificitat dels lligands per cada isoforma dels receptors FGFR. Extret de (Eswarakumar et al., 2005).

Les funcions biològiques d'aquests factors de creixement s'han estudiat mitjançant ratolins *knock-out*. Concretament, dels FGF detectats en el nostre cultiu s'ha descrit que els ratolins *knock outs* de FGF1 i FGF7 són viables, mentre que els *knock outs* de FGF 8 i 10 moren durant el desenvolupament embrionari o perinatalment. Això ens indica que alguns membres d'aquesta família tenen funcions biològiques molt específiques mentre que la pèrdua de funció d'altres FGF pot ser compensada per membres relacionats sense afectar el fenotip. En el cas dels *knock outs* dels receptors també s'ha descrit redundància de funcions, ja que en FGFR 1b 2c i 4 els ratolins són viables, i en FGFR2b són letals (Eswarakumar et al., 2005).

En el desenvolupament pancreàtic s'ha detectat l'expressió de tots els receptors de FGF al llarg del temps, i els lligands expressats durant aquest període són FGF1, 7, 9, 10, 11, i 18 (Dichmann et al., 2003). També en pàncreas s'ha demostrat que la

senyalització a través de FGFR2b té un paper clau en el desenvolupament del pàncreas exocrí (Miralles et al., 1999), com també en el manteniment dels progenitors endocrins a través de FGF7 (Elghazi et al., 2002) i FGF10 (Norgaard et al., 2003), ambdós detectats en el nostre cultiu primari. Una altra funció detectada a través de FGFR2b és la implicació en el creixement i ramificació de l'epiteli ductal pancreàtic (Pulkkinen et al., 2003). En l'adult, s'ha demostrat l'expressió de FGFR1, FGFR2 i els seus lligands en cèl·lules β de pàncreas de ratolí, i l'atenuació de la senyalització a través de FGFR1, provoca defectes a la cèl·lula β característics de la diabetis tipus 2 (Hart et al., 2000). Estudis de la senyalització a través d'aquest receptor FGFR1 indiquen que està implicat en la relació entre la funció de la cèl·lula β i la matriu extracel·lular (Kilkenny and Rocheleau, 2007).

El fet que el nostre cultiu primari de cèl·lules estrellades expressi FGFR1-IIIb, FGFR2-IIIb, FGFR2-IIIc, FGFR4, i els seus lligands FGF1, FGF7, FGF8 i FGF10, ens fa pensar en un possible efecte autocrí d'aquestes substàncies secretades per les pròpies cèl·lules. D'altra banda, la presència en el nostre cultiu primari de la isoforma FGFR-1IIIb, que s'ha proposat com marcador de cèl·lules progenitores pancreàtiques (Cras-Meneur and Scharfmann, 2002), juntament amb ABCG2, nestina, Thy 1.1 i NCAM, suggereix que aquestes PaSC/ABCG2+ podrien tenir capacitat multipotencial.

DEMOSTRACIÓ DE LA SEVA CAPACITAT DE TRANSDIFERENCIACIÓ

Si prenem com a referència els treballs que s'han realitzat en fetge, sabem que recentment alguns estudis han suggerit per primera vegada la importància de les cèl·lules hepàtiques estrellades en el desenvolupament, com també la seva capacitat de diferenciar-se cap a dos tipus cel·lulars concrets: hepatòcits i cèl·lules endotelials (Kordes et al., 2007), (Kubota et al., 2007). D'altra banda, alguns autors apunten que les PaSC podrien tenir un paper com a cèl·lules progenitores sense donar referències de cap estudi experimental en el pàncreas (Fellous et al., 2007) (veure **figura 2**). Els nostres resultats serien doncs els primers en evidenciar la possibilitat d'obtenir cèl·lules productores d'insulina a partir de PaSC.

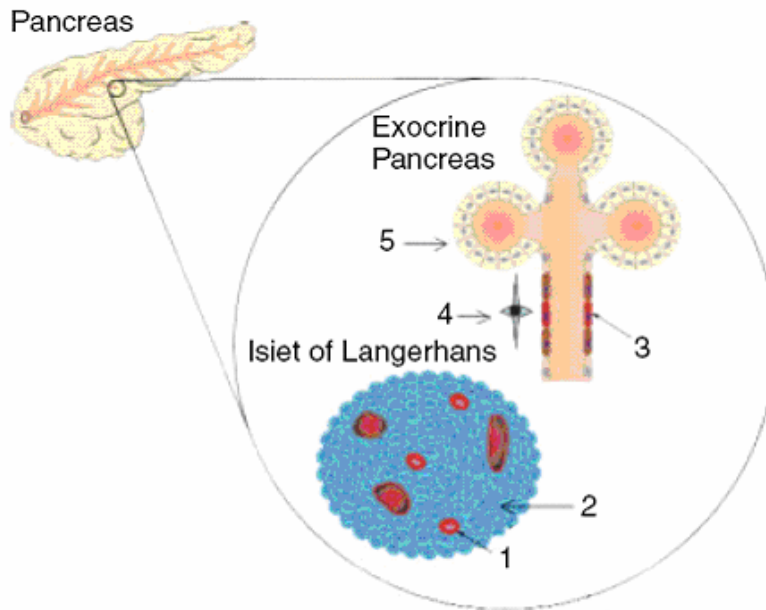


Figura 2.- Esquema de la possible localització en el pàncreas de les cèl·lules que participen en la regeneració de cèl·lules β : (1) progenitors intra-illot, (2) proliferació de cèl·lules β preexistents, (3) cèl·lules ductals, (4) cèl·lules estrellades pancreàtiques, (5) cèl·lules acinars (Fellous et al., 2007)

Hi ha estudis que apunten la importància del medi de cultiu i els suplementes proteics afegits en la maduració dels diferents tipus cel·lulars (Royer et al., 2006). A més dels efectes diferenciadors dels components del FCS (Leng and Lu, 2005), la glucosa elevada podria actuar com a mitogen durant l'expansió de les cèl·lules indiferenciades, i la reducció de la concentració al final de la diferenciació afavoriria la contingut d'insulina en alguns models de diferenciació (Roche et al., 2006). Els nostres resultats també suggereixen que és important definir la composició del medi de cultiu en els procediments experimentals de transdiferenciació. Si bé el cultiu primari PaSC/ABCG2⁺ presenta al principi una dèbil expressió de PDX1 nuclear (factor de transcripció implicat en la diferenciació pancreàtica), i una dèbil expressió d'insulina, posteriorment aquest factor de transcripció es transloca a citoplasma, i també es perd l'expressió d'insulina. Aquesta transdiferenciació espontània podria haver estat causada, almenys en part, per alguns components del FCS o bé pels propis factors solubles secretats per les PaSC/ABCG2⁺ amb efectes autocrins.

Com a regla general s'accepta que quan les cèl·lules són induïdes a proliferar *in vitro*, poden perdre el seu fenotip diferenciat; en canvi, quan redueixen la seva proliferació s'inicia el procés de diferenciació cel·lular (veure **figura 3**) (Soria, 2001). Aquest equilibri entre proliferació i diferenciació és a vegades difícil d'aconseguir *in vivo*, on coexisteixen ambdós processos, i alguns factors poden promoure tant un com l'altre. En el nostre cultiu de cèl·lules PaSC/ABCG2⁺, el fet que els nivells de proliferació fossin menors quan les cèl·lules formaven *clusters* cel·lulars comparats amb les cèl·lules en monocapa va ser un primer indicatiu que ens va fer pensar en la possibilitat d'induir transdiferenciació en aquest tipus cel·lular. Juntament amb aquesta evidència, el fet que la nostra població de PaSC/ABCG2⁺ comparteix marcadors cel·lulars amb cèl·lules troncales adultes (ABCG2, nestina, Thy1.1, i NCAM), i tenint en compte la importància del medi de cultiu, vam plantejar-nos completar el primer objectiu de la tesi investigant la seva possible capacitat de transdiferenciació cap a un fenotip endocrí, i més concretament cap a una cèl·lula productora d'insulina.

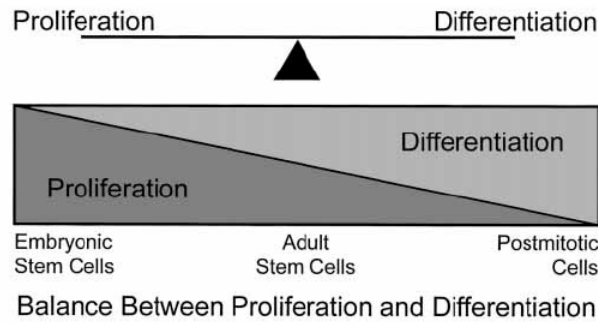


Figura 3.- Esquema del balanç entre els processos de proliferació i diferenciació cel·lular (Soria, 2001).

Per potenciar la transdiferenciació de les nostres PaSC/ABCG2+ ens vam basar en resultats previs d'altres investigadors i vam suplementar el medi de cultiu amb substàncies diferenciadores com la **nicotinamida**, utilitzada en protocols de diferenciació a partir de ESC per aconseguir cèl·lules productores d'insulina (Soria et al., 2000), (Vaca et al., 2003), (Leon-Quinto et al., 2004), o la **dexametasona**, utilitzada en la transdiferenciació pancreàtica de cèl·lules exocrines (Lardon et al., 2004). També vam emprar **activin A**, membre de la família de TGF β , que potencia l'obtenció del fenotip endocrí en diferents models de diferenciació, en alguns casos en combinació amb *betacellulin* (Mashima et al., 1996), (Zhang et al., 1999), (Demeterco et al., 2000); i en darrer lloc vam utilitzar **exendin-4**, anàleg de GLP-1 (*Glucagon-like polipeptide-1*). Hi ha estudis que demostren que tant GLP-1 com exendin-4 poden diferenciar cèl·lules productores d'insulina a partir de ESC o bé en models de regeneració pancreàtica (De Leon et al., 2003), (De Leon et al., 2006), (D'Amour et al., 2006), (Xu et al., 1999). A més, GLP-1 augmenta la producció d'insulina en cèl·lules ESC diferenciades (Bai et al., 2005), (Yue et al., 2006), i també fa que les cèl·lules ductals ARIP expressin gens endocrins (Liu et al., 2004). GLP-1 és una hormona peptídica secretada com a proglucagó per les cèl·lules L de l'ileó i el colon en resposta a la ingesta. És una incretina i presenta accions insulinoatròpiques ja que un cop processada, estimula les cèl·lules β del pàncreas a produir insulina, i regula negativament la síntesi de glucagó de les cèl·lules α . S'ha demostrat que la capacitat de GLP-1 d'augmentar la secreció d'insulina està associada a la producció i translocació nuclear de PDX1 (Kodama et al., 2005), (Koizumi et al., 2005), (Abraham et al., 2002). L'exendin-4 és un pèptid produït a les glàndules salivals del llangardaix *Gila Monster*, que presenta un 52% d'homologia amb GLP-1, i en cèl·lules de mamífers interacciona amb el receptor de GLP-1 per augmentar la síntesi d'insulina (Goke et al., 1993), (Chen and Drucker, 1997), (Greig et al., 1999).

De totes les substàncies descrites en els estudis de diferenciació utilitzant cèl·lules troncales embrioniques, adultes o línies cel·lulars, van ser l'**exendin-4** i també l'**activin A** les que van potenciar l'expressió de PDX1 en el nostre cultiu. Tot i demostrar l'expressió dels receptors per aquestes substàncies, el tractament amb aquestes exendin-4 o activin A no va ser suficient per arribar a obtenir cèl·lules amb fenotip β a partir de la nostra població PaSC/ABCG2+. Una altra aproximació mitjançant la utilització de substàncies conjuntament (*cocktail* de *betacellulin*, HGF i nicotinamida) (Huang and Tang, 2003) ens permet aconseguir una dèbil expressió de Ngn3, factor de transcripció clau en la determinació del fenotip endocrí durant el desenvolupament pancreàtic; i els resultats de la sobreexpressió de Ngn3 ens indiquen la plasticitat del nostre cultiu primari, ja que arribem a expressar altres factors de

transcripció importants en desenvolupament pancreàtic endocrí: Pax-4, Pax-6 i NeuroD1.

D'altra banda, la importància de les interaccions entre cèl·lula-cèl·lula, i de les unions entre cèl·lula-matriu extracel·lular són un fet àmpliament conegut (Streuli, 1999). La matriu extracel·lular no només dona suport estructural a les cèl·lules, adhesió i polaritat, sinó que també participa en processos de morfogènesi, diferenciació, migració, proliferació i prevenció d'apoptosi (Kleinman et al., 2003). En el pàncreas, els canvis cronològics en l'organització de la matriu extracel·lular durant el desenvolupament estan relacionats amb la morfogènesi epitelial, participant en les interaccions epiteli-mesènquima (Hisaoaka et al., 1993). També se sap que els components de la matriu extracel·lular poden diferenciar cèl·lules fetals cap a un fenotip endocrí, com per exemple la laminina 1 (Jiang et al., 1999), i les integrines (Cirulli et al., 2000). La matriu extracel·lular forma part del nínxol en que es troben les cèl·lules, i la importància del nínxol cel·lular en els processos de transdiferenciació ja ha estat descrita en altres models cel·lulars (Czyz and Wobus, 2001; Whetton and Graham, 1999). La matriu extracel·lular pot modular la diferenciació de diferents maneres: **a)** la remodelació de la matriu pot alterar la senyalització de les integrines i el seu *crossstalk* amb factors de creixement, **b)** la remodelació de la matriu pot contribuir a la unió de factors de creixement als seus receptors, **c)** durant la remodelació poden quedar al descobert llocs críptics que poden alterar la senyalització de les integrines, **d)** es poden alliberar fragments bioactius de la matriu, **e)** els enzims de remodelació de superfície poden alliberar factors de creixement (veure **figura 4**).

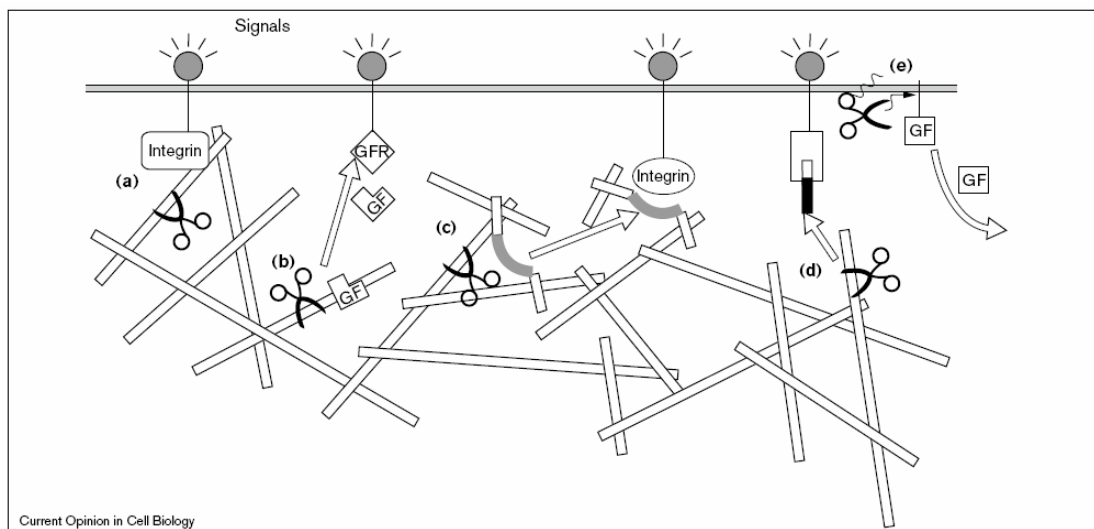


Figura 4.- Representació d'algunes de les vies mitjançant les quals la remodelació de la matriu extracel·lular pot afectar la diferenciació cel·lular. GF= Growth Factor. La figura de les tisores representa el tall de les MMP. Extret de (Streuli, 1999).

Podem suggerir que alguns d'aquests mecanismes podrien haver participat en la transdiferenciació de les nostres cèl·lules PaSC/ABCG2+ basant-nos en la detecció de MMP en el cultiu, molècules encarregades de remodelar la matriu extracel·lular. No obstant, de manera semblant a altres models descrits a la literatura, també observem que la utilització de Matrigel (matriu sintètica comercial) és imprescindible per afavorir

l'aparició de cèl·lules amb fenotip endocrí, i més concretament amb fenotip β . Està descrit que el cultiu en Matrigel combinat amb un tractament amb àcid retinoic augmenta la proporció de cèl·lules positives per insulina en embrió de pollet (Kramer and Clem, 2003); i estudis amb diferents tipus de matrius demostren la seva capacitat de diferenciar cèl·lules troncales embrioniques en cèl·lules diferenciades i estructures (glandulars i cartílags) similars a les del teixit del qual deriva la matriu (Philp et al., 2005). El nostre protocol experimental (cultiu en Matrigel M4 suplementat amb exendin-4) ens dóna les condicions òptimes per l'expressió de les convertases PC1/3 i PC2, el transportador glut2, i la hormona insulina, que serien característiques pròpies del fenotip de cèl·lula β obtingudes per primera vegada a partir de PaSC.

Malgrat la detecció de la insulina, alguns dels factors de transcripció implicats en el desenvolupament del pàncreas i utilitzats com a marcadors de desenvolupament de cèl·lula β també estan implicats en el desenvolupament del sistema nerviós, com nestina i PDX1 (Perez-Villamil et al., 1999), (Edenfeld et al., 2002). Així doncs, cèl·lules que podrien ser interpretades com cèl·lules β immadures, podrien ser compatibles també amb el fenotip de neurones en desenvolupament. La demostració de la síntesi d'insulina per part de les cèl·lules, les evidències de la seva maduració mitjançant la detecció de pèptid C, i la realització d'anàlisis funcionals de la seva alliberació en resposta a glucosa permeten confirmar el fenotip de cèl·lula β . És per aquestes raons que en el nostre model, tot i detectar l'expressió de les proconvertases i la insulina, vam voler descartar la possibilitat que la insulina hagués estat captada del medi tal com s'ha suggerit en alguns models de diferenciació (Hansson et al., 2004), (Rajagopal et al., 2003). Per comprovar que la insulina podia ser processada correctament dins les nostres cèl·lules, vam analitzar la presència del pèptid C. En una cèl·lula β madura, la proinsulina es talla enzimàticament gràcies a les proconvertases per convertir-se en insulina madura, produint quantitats equimolars d'insulina i pèptid C. A més, ambdues molècules es colocalitzen en els grànuls secretors (Molinete et al., 2000). En la tinció immunològica dels nostres *clusters* després del cultiu en Matrigel es va observar colocalització de pèptid C amb insulina, per tant els resultats indiquen que gran part de la insulina detectada és sintetitzada i processada per les cèl·lules del nostre cultiu.

En diversos models animals de regeneració pancreàtica s'ha descrit la coexpressió dels marcadors de diferents estips cel·lulars en una mateixa cèl·lula (acinars i ductals, o acinars i endocrins) (Gu et al., 1994), (Bertelli and Bendayan, 1997). L'existència d'aquestes cèl·lules que poden expressar marcadors de diferents tipus cel·lulars ens permetria explicar la presència de glucagó en el fenotip del nostre cultiu primari que s'està transdiferenciant, indicant possibles passos intermitjos en la diferenciació. D'altra banda, alguns autors observen diferenciació exocrina de ESC després de la utilització de substàncies diferenciadores (Skoudy et al., 2004). En canvi, en el nostre model no observem expressió de marcadors exocrins primerencs com p48, ni marcadors de cèl·lula exocrina madura com amilasa. Aquests resultats ens indiquen una certa especificitat del protocol utilitzat cap a cèl·lules de tipus endocrí i no exocrines. També l'expressió de CK19 detectada després de la transdiferenciació cel·lular és una observació interessant. Aquest filament intermedi present en cèl·lules d'origen epitelial com les ductals, podria representar la transició mesènquima-epiteli en el nostre model (MET). Aquesta transició, juntament amb la seva complementària (EMT) és un fenomen important en alguns processos de transdiferenciació descrits en illots humans (Gershengorn et al., 2004). Alguns autors però, posen en dubte l'existència d'aquest fenomen en illots ratolí (Atouf et al., 2007). Finalment, un altre fet

observat en el nostre model és que l'expressió de marcadors de cèl·lules estrellades no es negativitza després de la inducció de la transdiferenciació endocrina. El nostre cultiu després de la transdiferenciació segueix mantenint l'expressió de les proteïnes vimentina, desmina, alfa-actina i GFAP, però només la vimentina co-localitza amb el pèptid C.

Les observacions de microscopia electrònica de les cèl·lules diferenciades mostren una correlació amb els resultats d'expressió gènica obtinguts, ja que mostren la presència de grànuls electrodensos, alguns dels quals presenten una morfologia compatible amb els grànuls d'insulina en diferents estats de maduració. A més, la nostra caracterització de la transdiferenciació cap a cèl·lula productora d'insulina també inclou la positivitat en el marcatge per ditizona, tinció utilitzada per evidenciar els grànuls madurs en l'aïllament d'illots pancreàtics (Clark et al., 1994), (Conget et al., 1994). Aquesta tinció també s'ha utilitzat per identificar cèl·lules productores d'insulina a partir de la diferenciació de ESC, junt amb la quantificació de la secreció de la hormona (Shiroi et al., 2002).

Per últim, pel que fa a la funcionalitat d'aquestes PaSC/ABCG2+ diferenciades, detectem la secreció d'insulina al medi només en l'estadi diferenciat ja que les secrecions realitzades tant en fase de monocapa com en *cluster* indiferenciat sempre ens han donat resultats indetectables. Tot i que els nivells de secreció del nostre cultiu estan per sota del que secreten illots, observem que en resposta a l'estimulació per glucosa, els *clusters* secreten un 44% respecte a la condició no estimuladora. S'ha descrit en illots pancreàtics de rata una via secretora "semblant a la constitutiva" que es basa en la secreció a través de grànuls immadurs i es produeix a concentracions de glucosa no estimuladores (Kuliawat and Arvan, 1992). La possible secreció a través d'aquesta via en el nostre model podria haver fet que la secreció basal contingüés la insulina alliberada constitutivament, i per tant hauria disminuït les diferències respecte a la secreció estimulada per glucosa (Kuliawat and Arvan, 1994).

Com a resum d'aquest primer objectiu de la tesi podem dir que hem demostrat per primera vegada que cèl·lules pancreàtiques estrellades obtingudes de pàncreas de rata expressen NCAM, FGFR1-IIIb, Thy1.1 i el transportador ABCG2, i poden diferenciar-se cap a un fenotip endocrí amb capacitat de secretar insulina. Aquestes cèl·lules PaSC/ABCG2+ podrien constituir una nova font de cèl·lules extra-illot amb capacitat de produir insulina.

OBJECTIU II**ENRIQUIMENT DE LA POBLACIÓ DE PaSC OBTINGUDA**

Per assolir el segon objectiu de la tesi, i tenint en compte que era la primera vegada que s'obtenien cèl·lules pancreàtiques estrellades mitjançant selecció a través del transportador ABCG2, vam voler enriquir la població utilitzant el marcador NCAM, expressat en HpSC i també en PaSC (com hem demostrat en l'objectiu I). Aquest procés ens permet eliminar la possibilitat que hagués quedat qualsevol petita població de cèl·lules SP contaminants en el cultiu primari que ens pogués invalidar la interpretació dels resultats obtinguts.

Per realitzar la tècnica d'*immunopanning* és molt important obtenir un bon marcador de superfície, ja que és una tècnica basada en la unió antígen-anticòs que ens permet aïllar les cèl·lules que expressen un determinat marcador a la seva membrana. Vam escollir la forma siàlica de NCAM (PSA-NCAM), marcador expressat en cèl·lules hepàtiques estrellades i també en el nostre cultiu cel·lular, perquè reunia les característiques de ser una molècula de membrana i no estava descrita la seva expressió en la població SP. Amb aquesta tècnica vam aconseguir seleccionar positivament la població que expressava PSA-NCAM, des d'un 36% abans de realitzar la tècnica, fins a gairebé un 80% després dels dos processos de selecció. Amb la fracció enriquida de la població per PSA-NCAM passem a explorar el segon objectiu de la tesi, després d'haver recomprovat el fenotip de cèl·lules estrellades tant en les fraccions positives com en la negativa obtingudes durant el procés.

Tal com hem suggerit en el primer objectiu, les substàncies solubles de les PaSC tenen gran importància sobre elles mateixes, però també plantegen la possibilitat que tinguin efectes paracrins sobre les cèl·lules veïnes: acinars i ductals. Hi ha estudis previs de transdiferenciació del tipus cel·lular ductal cap a un fenotip endocrí. En humans es va descriure que era freqüent trobar cèl·lules β fora de l'illot associades als ductes (Bouwens and Pipeleers, 1998), i ductes humans cultivats *in vitro* en unes determinades condicions de diferenciació poden arribar a produir insulina (Bonner-Weir et al., 2000), (Yatoh et al., 2007). En línies cel·lulars de rata, el grup del Dr Perfetti ha diferenciat cèl·lules ARIP ductals cap a productores d'insulina amb tractaments amb GLP1 o bé HGF (Hui et al., 2001), (Anastasi et al., 2005). Aquests estudis fan que ens plantegem utilitzar el model de cèl·lules ARIP com a eina per valorar possibles efectes del medi condicionat de PaSC/ABCG2+.

Les cèl·lules hepàtiques estrellades són morfològicament i funcionalment similars a les PaSC. Els estudis sobre possibles funcions de les PaSC venen avalats per estudis realitzats prèviament en HpSC. La participació d'aquestes cèl·lules en la fibrosi hepàtica està ben descrita, i en pàncreas, es pot dir que les PaSC també desenvolupen principalment aquesta funció (Gutierrez-Ruiz et al., 2002). En el fetge, les cèl·lules estrellades actives influencien el creixement i proliferació d'altres tipus cel·lulars, sobretot els hepatòcits, a través de senyals paracrines (Gressner, 1998). El factor KGF (Keratinocyte Growth Factor) secretat per les HpSC afavoreix la regeneració del fetge i/o la supervivència dels hepatòcits en pacients amb malalties hepàtiques cròniques (Steiling et al., 2004). En aquest sentit, altres estudis indiquen que el co-cultiu de HpSC amb hepatòcits pot millorar alguns aspectes funcionals d'aquests (Thomas et al., 2005). També en fetge hi ha indicis de la capacitat de les cèl·lules estrellades com a inductores de la diferenciació: el co-cultiu de HpSC amb cèl·lules mare dona lloc a hepatòcits

(Nagai et al., 2002). De moment, no hi ha estudis similars en pàncreas. Així doncs, basant-nos en aquestes funcions descrites fins ara de les HpSC sobre altres tipus cel·lulars, els efectes del medi condicionat del nostre cultiu primari sobre la línia ARIP es van centrar en la investigació de possibles efectes sobre proliferació i expressió gènica.

EFFECTES PARACRINS DEL MEDI CONDICIONAT DE PaSC

Les cèl·lules ARIP van ser tractades amb medi condicionat de PaSC/ABCG2+ (que conté tots els factors que han secretat les cèl·lules estrellades) durant diferents temps. Amb el tractament amb el medi condicionat observem una inhibició significativa de la proliferació de la línia ARIP. L'assaig de BrdU mesura la incorporació de l'anàleg de timidina durant la fase S, i per tant és una mesura directa de la **proliferació**. Aquesta disminució de la proliferació podria ser deguda a la toxicitat del medi, amb afectació de la maquinària cel·lular, on a més de deixar de proliferar, la cèl·lula perdria la seva viabilitat. Per resoldre aquesta possibilitat realitzem assajos de MTT, i els resultats ens indiquen que la viabilitat no està modificada pel tractament amb medi condicionat. En aquest assaig es mesura la reducció del compost MTT cap a una sal de formazan gràcies als enzims mitocondrials, per tant és una mesura **l'activitat metabòlica** de la cèl·lula, de la seva viabilitat.

Per tant, les cèl·lules deixen de proliferar però segueixen sent metabòlicament actives. Una altra explicació a la disminució de la proliferació podria ser que el medi hagués perdut part dels nutrients, i que això hagués provocat que les cèl·lules ARIP deixessin de proliferar. Per descartar aquesta segona hipòtesi fem els mateixos experiments amb medi condicionat provinent d'altres línies cel·lulars pancreàtiques com α TC (endocrines) i mPAC (ductals), i els resultats demostren que la proliferació i la viabilitat de cèl·lules ARIP tractades amb medi condicionat provinent d'altres línies no es veu afectada. En conclusió, la disminució de la proliferació no es per manca de nutrients del medi, ni per toxicitat del mateix, sinó que podem suggerir que els efectes són deguts a substàncies secretades per les cèl·lules estrellades, que podrien tenir un efecte sobre les ciclines o altres proteïnes que regulen la proliferació cel·lular.

Amb aquest efecte inhibitori sobre la proliferació clarament demostrat, i amb la premissa del balanç entre proliferació i diferenciació en els sistemes biològics (Cras-Meneur et al., 2001), observem que el medi condicionat de PaSC és capaç de produir canvis gènics i proteics en les cèl·lules ARIP tractades:

(1) La disminució de CK19, filament intermedi marcador del tipus cel·lular ductal, es va veure clarament tant a nivell immunocitoquímic com a nivell de mRNA, arribant a reduir l'expressió d'aquesta citoqueratina a la meitat. Aquest fet que ens podria indicar que les cèl·lules estan perdent, en part, el seu propi fenotip ductal.

(2) En el cas de Pdx1, l'increment a nivell proteic era molt evident, i presentava localització nuclear (fet que indica l'estat actiu d'aquest factor de transcripció). A nivell de mRNA, veiem que alguns passatges ja expressaven nivells de Pdx1 basals abans de ser tractats amb medi condicionat. Tot i això, després del tractament amb medi condicionat, sempre veiem un increment significatiu d'aquest factor de transcripció en tots els experiments realitzats, i això ens fa pensar que factors solubles secretats per les PaSC poden actuar de manera directa sobre la cèl·lula o de manera indirecta mitjançant altres factors, i poden modificar l'expressió gènica i proteica de les cèl·lules ARIP. En canvi, observem nivells basals de Ngn3, Pax-6 i Nkx 2.2 en el cultiu de cèl·lules ARIP, que no es modifiquen pel tractament amb medi condicionat.

Malgrat l'increment d'expressió de PDX1 no arribem a detectar l'expressió d'insulina. Alguns grups, però, són capaços de transdiferenciar les cèl·lules ARIP cap a cèl·lules productores d'insulina després del tractament amb GLP1 (Bulotta et al., 2002),(Hui et al., 2001), o HGF (Anastasi et al., 2005). Una possible explicació a la nostra incapacitat per completar el procés de transdiferenciació seria per la limitació del model, ja que segons el clon de la línia utilitzat, les cèl·lules ARIP poden no ser un bon model de diferenciació (Silver and Yao, 2001). El clon utilitzat en els estudis que aconseguen produir insulina amb el tractament amb GLP-1 (Hui et al., 2001) havia estat cedit pel Dr J.M Egan de Baltimore; en canvi, el nostre clon cel·lular provinent de l'ATCC (*American Type Culture Collection*) tractat amb exendin-4 no era capaç de produir insulina. Aquesta evidència ens fa pensar que el clon cel·lular del que hem disposat per realitzar el nostre estudi no és el més adequat per dur a terme experiments de transdiferenciació cel·lular.

CARACTERITZACIÓ DEL SECRETOMA DE PaSC

Els efectes antiproliferatius d'aquest medi, i la seva capacitat de modificar l'expressió gènica de la línia ARIP, ens porten a caracteritzar el secretoma del nostre cultiu primari de PaSC/ABCG2+ per obtenir la composició del medi condicionat. Per fer-ho, passem a caracteritzar per primera vegada el secretoma de cèl·lules pancreàtiques estrellades.

Aconsegüim la identificació del 68 % de les proteïnes analitzades (76 *spots* d'un total de 112). La identificació de 61 proteïnes a partir de 76 *spots* s'explica pel fet que hem obtingut formes diferents de la mateixa proteïna (en estats de reducció, metilació, o bé fragments de les mateixes). Pel que fa a la identificació de proteïnes intracel·lulars en el medi, el percentatge obtingut en el nostre estudi és semblant al d'altres estudis de secretoma que utilitzen el mateix procediment experimental per l'obtenció del medi condicionat (Wang et al., 2004). Aquestes proteïnes no secretades podrien correspondre a proteïnes estructurals procedents de cèl·lules desenganxades durant el processament de la mostra. Tot i que no podem atribuir els efectes del secretoma a les proteïnes intracel·lulars, ens han servit per completar la caracterització de les nostres PaSC/ABCG2+ i reafirmar la seva identificació com a cèl·lules pancreàtiques estrellades.

En la classificació per funcions de totes les proteïnes obtingudes en el secretoma, destaquem que les proteïnes de creixement, diferenciació i desenvolupament corresponen a un 11% del total, i un 9,84% corresponen a proteïnes classificades en la funció de resposta immune. Les cèl·lules hepàtiques estrellades expressen molècules de presentació d'antígens i poden dur a terme el procés de fagocitosi, per tant tenen un paper en la funció immunitària (Unanue, 2007; Vinas et al., 2003; Winau et al., 2007). També s'ha descrit que les HpSC poden modular la resposta immunitària en trasplants (Chen et al., 2006). En el pàncreas, la seva capacitat de fagocitar ha estat descrita recentment (Shimizu et al., 2005), i en el nostre estudi corroborem aquesta propietat. També pels resultats del secretoma identifiquem les proteïnes MHC classe I, lisozim C, RAG1, ICA 1, APG16 i *cutaneous T-cell lymphoma associated antigen*, que podrien contribuir en el possible paper de les PaSC en la funció immunitària.

Observem certes coincidències dels nostres resultats amb l'estudi de secretoma realitzat en HpSC, on també identifiquen proteïnes intracel·lulars (Kristensen et al., 2000). Les proteïnes comunes en els dos estudis són: MMP2, HSPA5, enolasa, calreticulín, cathepsin, col·lagens I i III, piruvat quinasa, SPARC, tropomiosina, ubiquitina i vimentina. Les cèl·lules estrellades de pàncreas i de fetge han estat comparades a nivell transcripcional i presenten variacions òrgan-específiques però tenen un fenotip transcripcional comú (Buchholz et al., 2005). Podem destacar però com a novetat en aquest camp, que el nostre estudi descriu per primera vegada la secreció de PEDF, Wnt5b i LIF per part de les cèl·lules estrellades pancreàtiques.

Quan classifiquem només de les proteïnes solubles en famílies segons les seves funcions, la més abundant passa a ser l'agrupació de proteïnes de matriu extracel·lular, corroborant la principal funció descrita d'aquestes cèl·lules en la formació de la matriu extracel·lular. La matriu està formada per una mescla insoluble de molècules que inclouen, entre altres, col·lagens, laminines, fibronectines, i heparan sulfat proteoglicans. La matriu no només facilita un suport sòlid a les cèl·lules sinó que també actuaria com un reservori de citoquines i factors de creixement. El nostre estudi ha identificat perlecan i col·lagens secretats per PaSC/ABCG2+, a més de substàncies remodeladores d'aquesta matriu com MMP2, molècules que ens permeten destacar la importància del microambient que es crea al voltant d'aquestes cèl·lules. De la classificació dels factors solubles també destaquem que les proteïnes de diferenciació i desenvolupament es segueix mantenint en un 11% (igual que en la classificació del secretoma complet). Veiem que les proteïnes de desenvolupament i diferenciació seria un agrupació funcional que no perd importància quan s'analitza el secretoma tenint en compte únicament els factors solubles. Així doncs, tot i que la funció principal d'aquestes cèl·lules estaria relacionada amb la regulació de la matriu extracel·lular, si que podem suggerir que en determinades circumstàncies aquestes cèl·lules podrien contribuir en el complex procés de la neogènesi.

Per la identificació de les proteïnes solubles ens hem basat en la predicció de la presència de pèptid senyal o de la possible secreció de vies no clàssiques amb la metodologia que ens ofereix el programa SecretomeP. Els autors dels algorismes que utilitza el programa per donar els resultats de secreció han publicat la metodologia (Bendtsen et al., 2004) i la fiabilitat d'aquest programa ha estat validada per grups externs (Emanuelsson et al., 2007). En estudis recents de secretoma ja s'accepta aquest tipus de resultats basats en la predicció del SecretomeP com a secreció per la via no clàssica (Alvarez-Llamas et al., 2007). Del total de proteïnes identificades en el nostre estudi, el 61% eren secretades (37 de 61). El tipus de secreció majoritària però seria la via clàssica (70%), mentre que a la resta proteïnes secretades per les vies no clàssiques serien minoritàries (correspondrien únicament al 30%).

La maquinària de secreció de les cèl·lules eucariotes consisteix principalment en la via clàssica, que passa pel reconeixement del pèptid senyal, el trasllat al reticle endoplasmàtic (RE) i l'empaquetament en vesícules de transport fins a l'aparell de Golgi, on el transport post-Golgi secretarà la proteïna a l'exterior de la cèl·lula. Però pel trasllat d'una proteïna a l'espai extracel·lular també hi ha descrits quatre mecanismes alternatius a la via clàssica, dos d'ells basats en el sistema intracel·lular de vesícules (1 i 3), i dos d'ells basats en la translocació directa del factor citosòlic a través de la membrana plasmàtica (2 i 4) (veure **figura 5**). **(1)** Veiem que un dels mecanismes correspon a la secreció a través de lisosomes que tenen la capacitat de fusionar-se amb la membrana plasmàtica. **(2)** Una altra manera de secretar substàncies és a través canals

formats per proteïnes transportadores residents a la membrana plasmàtica; i un exemple de família de transportadors seria la ABC (ATP-Binding-Cassette). En el nostre cas, la presència del subtipus ABCG2 en les cèl·lules estrellades podria haver afavorit el transport d'alguna de les substàncies sense pèptid senyal cap a l'espai extracel·lular. **(3)** Un tercer mecanisme que permet la secreció no clàssica és a través d'exosomes derivats de cossos multivesiculars; **(4)** i la darrera via de secreció no convencional seria a través d'un procés anomenat "membrane blebbing" que allibera la proteïna i microvesícules derivades de la membrana plasmàtica a l'espai extracel·lular.

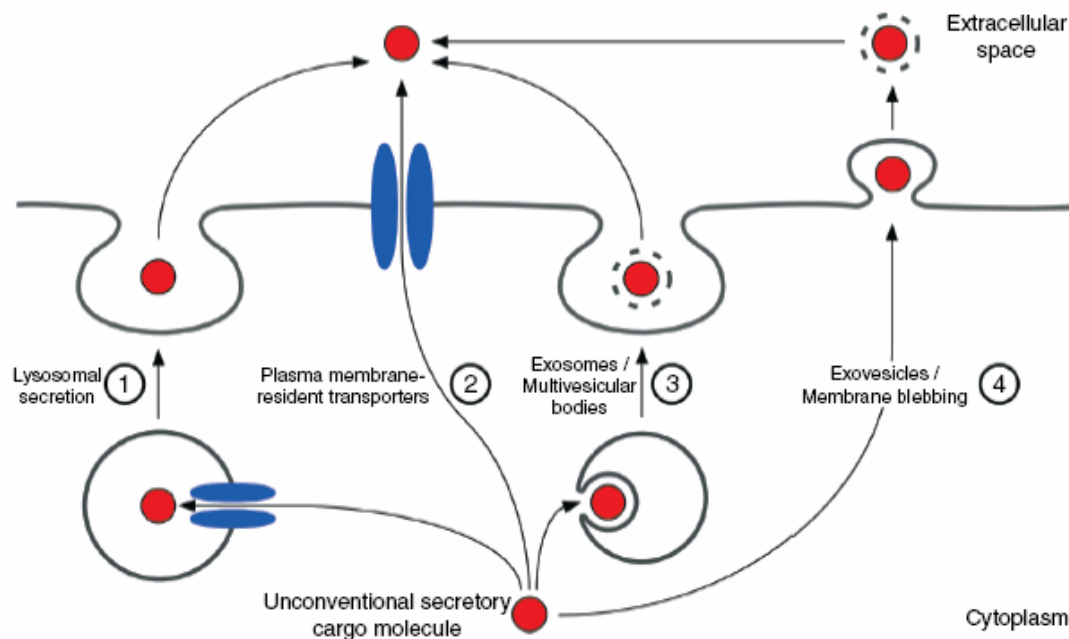


Figura 5.- Esquema dels tipus de secreció per vies no clàssiques (Nickel, 2005)

El programa *Ingenuity Pathways* ens permet la identificació de xarxes d'interaccions biològiques i les associa a les seves funcions més rellevants. En el nostre model ens va servir per intentar relacionar entre elles les molècules identificades en el secretoma de les PaSC/ABCG2+, i sobretot per suggerir possibles funcions de les molècules solubles secretades en el pàncreas. L'anàlisi del nostre secretoma per *Ingenuity Pathways* ens va proposar tres xarxes principals:

Xarxa 1.- Les funcions d'aquesta xarxa identificades pel programa serien organització i ensamblatge cel·lular. El punt més important que destaquem d'aquesta xarxa és que identifica TGFβ1 (Factor de creixement transformant) com a node central "non focus". Això ens fa plantejar estudiar més profundament aquest factor en el nostre cultiu primari.

El factor TGFβ1 pertany a una família de proteïnes que inclou entre altres, activines, TGFβ, i BMP (Proteïna morfogènica de l'òs). Són citokines secretades que regulen diferents funcions cel·lulars com proliferació, apoptosi, diferenciació, i migració en diferents tipus cel·lulars, i tenen un paper clau en el desenvolupament embrionari de l'organisme (Galvez-Gastelum et al., 2004). El TGFβ està implicat en

diverses patologies humanes que inclouen desordres autoimmunes i vasculars, malalties fibròtiques i càncer (Massague et al., 1992). Està considerada una citoquina multifuncional (pleiotròpica) pels diferents efectes que té sobre diferents tipus cel·lulars. TGF β està considerat com un potent inhibidor de la proliferació en la majoria de tipus cel·lulars, sobretot en cèl·lules epitelials, endotelials i hematopoètiques, però estimula el creixement de determinades cèl·lules mesenquimals (Huang and Huang, 2005), (Damdinsuren et al., 2006). També s'ha descrit que en altres models cel·lulars TGF β té efectes diferenciadors, per exemple la seva expressió en múscul llis és capaç d'induir la diferenciació de progenitors endotelials, obrint noves vies en el camp de l'enginyeria de teixits vasculars (Zhu et al., 2005), i en ESC s'ha demostrat que la senyalització aberrant de TGF β té efectes en la seva posterior diferenciació tant *in vivo* com *in vitro* (Goumans et al., 1998). En el sistema immunitari és capaç de diferenciar cèl·lules T reguladores (Luo et al., 2007) i també hi ha estudis que demostren que promou la diferenciació de condrocits (Han et al., 2005). En el cas del pàncreas, veiem que és capaç d'influir el desenvolupament de pàncreas exocrí i endocrí (Sanvito et al., 1994); i estudis amb ratolins transgènics amb dominant negatiu de TGF β RII demostren la implicació de TGF β en el creixement i diferenciació de les cèl·lules exocrines (Bottinger et al., 1997). Tot i això, també s'ha descrit que en combinació amb GLP-1 durant el desenvolupament pot afavorir la porció endocrina (Tei et al., 2005). En línies cel·lulars, la seva senyalització és necessària de transdiferenciar les cèl·lules exocrines AR42J tractades amb exendin-4 en cèl·lules productores d'insulina (Yew et al., 2004), (Yew et al., 2005). Finalment, TGF β també té implicacions en els processos de EMT relacionats amb la fibrosi (Kalluri and Neilson, 2003), (Kondo et al., 2004).

En el camp de les cèl·lules estrellades, TGF β 1 pot exercir diversos efectes. En les PaSC, la secreció d'aquesta proteïna està implicada en processos profibrogènics (Rane et al., 2006). A més, en cèl·lules estrellades de pulmó s'ha identificat TGF β 1 com la molècula que afavoreix la diferenciació cap a miofibroblasts (Evans et al., 2003), com també en HpSC (Wiercinska et al., 2006) i PaSC (Apte et al., 2004). Altres efectes descrits de TGF β 1 en el model de PaSC serien el control del seu creixement de manera autocrina (Kruse et al., 2000), efectes potenciats en combinació amb PDGF (Kordes et al., 2005).

S'han descrit 5 isoformes de TGF β en diferents organismes (en mamífers TGF β 1,2,3 i en aus i amfibis 4 i 5 respectivament). El TGF β es produeix com un precursor dimèric de 25 kDa secretat en forma latent, i queda anclat a la superfície cel·lular o a la matriu extracel·lular a través de la proteïna d'unió a TGF β latent (LTBP) (veure **figura 6**). La porció C-terminal de 112-114 aminoàcids és la regió activa després de ser tallada proteolíticament. L'activació de TGF β es dona per diversos factors, incluint pH extrem, altes temperatures, proteolisis limitada o desglucosilació del pèptid associat a la latència (LAP). S'ha descrit que la proteïna MMP2, amb activitat proteolítica, pot activar directament TGF β 1 per dissociació del pèptid LAP (Mott and Werb, 2004). En el nostre cultiu primari hem detectat ambdues molècules (MMP2 i TGF β 1 actiu).

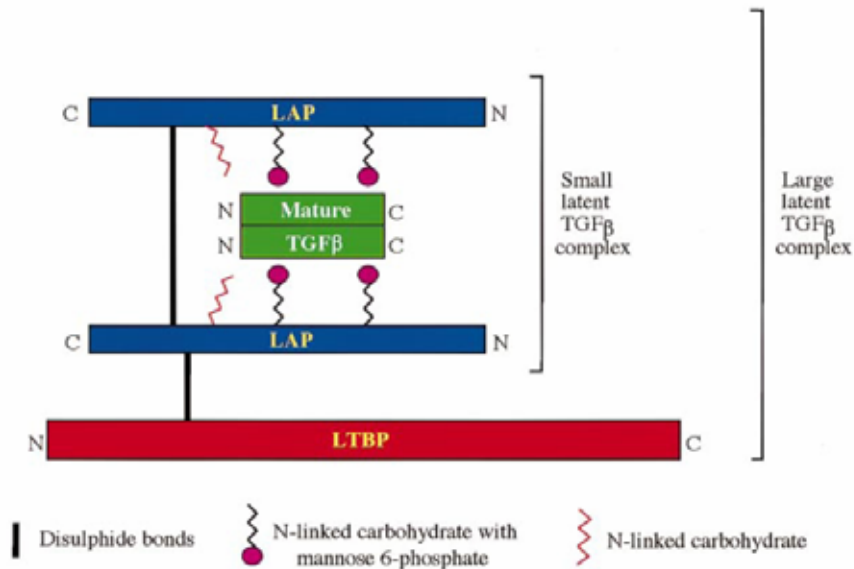


Figura 6.- Estructura de TGFβ i les seves unions al pèptid associat a la latència (LAP) i a la proteïna d'unió a TGFβ latent (LTBP) (Oklu and Hesketh, 2000).

Malgrat que està descrit que les PaSC secreten TGFβ1 (Shek et al., 2002), aquest factor no va poder ésser identificat per proteòmica perquè els gels utilitzats en el nostre estudi de proteòmica tenen una resolució mínima de 20 KDa. Per detectar aquest factor en el medi condicionat utilitzem la tècnica d'ELISA. La quantitat de TGFβ1 actiu en el nostre medi condicionat és comparable a la descrita en altres estudis (Shek et al., 2002), (Aoki et al., 2006).

EFFECTES DE TGFβ1 SOBRE LA LÍNIA DUCTAL ARIP

Les propietats de TGFβ1 descrites en la inhibició de proliferació de cèl·lules epitelials (Boyd and Massague, 1989) ens van fer pensar que podria ser la molècula causant dels efectes descrits en el nostre model ductal ARIP (també epitelial). Estudis en ratolí havien demostrat que TGFβ1 exercia una inhibició específica del creixement dels ductes mamaris sense afectar l'estroma del voltant (Daniel et al., 1989). Per estudiar si TGFβ1 tenia efectes sobre el nostre model ARIP, el primer que calia era comprovar l'expressió dels receptors de TGFβ en aquestes cèl·lules. S'han descrit tres receptors que permeten la funció de senyalització de TGFβ (TGFβR-I, TGFβR-II, TGFβR-III), encara que alguns investigadors han proposat l'existència de tres receptors addicionals (tipus IV, V i VI) en determinats tipus cel·lulars (Massague et al., 1987). En absència de lligand, els receptors tipus I i II, que són *Ser/Thr protein kinases*, estan com a homodímers a la superfície cel·lular. TGFβ1 es pot unir directament al receptor II o bé arribar-hi a través del receptor III. Quan TGFβ1 està unit al receptor II, es forma un complex heterotetramèric amb el receptor I, que transmet la senyal de transducció intracel·lular, que principalment és dependent de Smads, però també pot tenir efectes independents d'aquesta via (Heldin et al., 1997), (Derynck and Zhang, 2003).

La presència dels 3 receptors va ésser positiva en el nostre model ARIP, i vam passar a investigar si era el factor antiproliferatiu del medi condicionat que actuava sobre la línia ARIP. En l'experiment de proliferació amb el segrestador de TGF β en el medi condicionat recuperem la proliferació fins a nivells basals, fet que demostra que TGF β és el factor que ens està induint la inhibició de la proliferació. Aquests resultats es confirmen amb la presència de TGF β 1 exogen al medi basal, que disminueix la proliferació a uns nivells semblants al medi condicionat. Aquests experiments, junt amb la comprovació que la viabilitat no es veu modificada en cap dels tractaments, ens permeten suggerir el paper clau de TGF β 1 del medi condicionat en la inhibició de la proliferació de les cèl·lules ARIP.

D'altra banda, per investigar la implicació de TGF β 1 del medi condicionat en l'increment de PDX1 observat, vam utilitzar el mateix anticòs segrestador que en l'experiment de proliferació. Tot i que observem una lleugera disminució de l'increment de PDX1 en la condició on hem segrestat TGF β , aquest no arriba a disminuir fins a nivells basals. Aquest resultat, juntament amb el fet que l'addició de TGF β 1 exogen no sigui capaç d'incrementar PDX1 ens indica que en el medi condicionat hi ha una combinació de factors amb capacitat d'augmentar l'expressió d'aquest factor de transcripció, on TGF β 1 jugaria un discret paper.

Com a conclusió d'aquesta part podem dir que en el nostre model TGF β 1 inhibeix la proliferació de la línia ARIP, suggerint efectes paracrins d'aquesta molècula a nivell ductal. En canvi, no demostrem el paper de TGF β 1 en la inducció de PDX1. Això ens porta a investigar altres factors identificats en el secretoma.

ALTRES CANDIDATS AMB POSSIBLES EFECTES PARACRINS SOBRE LA LÍNIA ARIP

Continuant amb l'anàlisi bioinformàtic dels resultats del secretoma, en les xarxes 2 i 3 obtenim la següent informació:

Xarxa 2.- Identifica wnt5b, PEDF (serpinF1), SPARC, MMP2, i col·lagens, entre altres, a la fracció extracel·lular de la xarxa.

Wnt5b és una proteïna glicosilada membre de la família Wnt (Wingless type) que una vegada secretada pot quedar associada a la superfície cel·lular o a la matriu extracel·lular (Smolich et al., 1993). S'han descrit 10 membres d'aquesta família, que poden realitzar funcions diverses en com a molècules de senyalització en desenvolupament, diferenciació i tumorigènesi (Wodarz and Nusse, 1998). També s'han descrit funcions d'aquesta família en proliferació, i diferenciació neural (Lange et al., 2006), com també en l'autorenovació de cèl·lules troncales hematopoiètiques (Reya et al., 2003). Les seves principals vies d'actuació inclouen la via canònica (a través de β -catenina) i la no-canònica.

S'ha demostrat que Wnt5b, la molècula indentificada en el nostre secretoma, s'expressa en el mesènquima el dia embrionari 15.5 del desenvolupament pancreàtic (Heller et al., 2002), mentre que en adults s'expressa en la fracció exocrina però no en els illots humans (Heller et al., 2003). En un estudi realitzat en població japonesa detecten una associació entre Wnt5b i la diabetis mellitus tipus 2, alhora que descriuen que la seva expressió augmenta en les primeres fases de la diferenciació adipocitària de la línia 3T3-L1 (Kanazawa et al., 2005; Kanazawa et al., 2004). La presència de Wnt5b en

el medi condicionat, i la seva identificació com a molècula secretada en models de diferenciació, ens permet suggerir que pot haver jugat algun paper en els efectes observats en la línia ARIP tractada amb medi condicionat.

PEDF és una glicoproteïna secretada de 50 kDa que va ser identificada per primera vegada al 1989 en medi condicionat de cultius cèl·lules epitelials humanes de retina (Tombran-Tink and Johnson, 1989). Es va caracteritzar per la seva activitat neurotròfica en cèl·lules del retinoblastoma Y79 tractades amb medi condicionat que contenia PEDF (Tombran-Tink et al., 1991). Posteriorment es va demostrar que promovia la supervivència de cultius primaris de neurones granulars del cerebel en rata (Taniwaki et al., 1995). La seva funció en promoure la supervivència i diferenciació de neurones va ser confirmada posteriorment tant *in vivo* com *in vitro* en neurones de pollet (Houenou et al., 1999). Els processos de supervivència i diferenciació necessiten una regulació molt acurada i l'establiment d'unes condicions determinades, i en el cas de PEDF la seva actuació en un procés o un altre depèn del tipus cel·lular i les condicions del nínxol. En aquest sentit, cal destacar que recentment s'ha descrit que PEDF secretat per la zona subventricular ajuda a mantenir el nínxol de cèl·lules troncales neurals i promou la seva renovació (Ramirez-Castillejo et al., 2006), establint una connexió entre les cèl·lules vasculares i neurals (Pumiglia and Temple, 2006).

PEDF es va incloure dins de la família de les serpinines (també s'anomena serpin F1), tot i que no presenta la típica funció de peptidasa característica d'aquesta família (Steele et al., 1993). A més de la retina, s'ha detectat la seva expressió per Northern Blot en molts teixits humans com pulmó, cor, fetge i múscul esquelètic, tot i que en pàncreas la seva expressió és gairebé indetectable (Tombran-Tink et al., 1996). Tot i això, el ratolí *knock-out* per serpin f1 presenta hiperplàsia de les cèl·lules epitelials exocrines i una angiogènesi excessiva (Doll et al., 2003).

Altres funcions associades a aquest factor serien la inhibició de la capacitat de migració d'alguns tipus cel·lulars, com també del creixement tumoral de pròstata, glioma, osteosarcoma i melanoma (Fernandez-Garcia et al., 2007). Aquestes evidències obren un nou camp de recerca de PEDF i la seva implicació en l'acció antitumoral. Altres nivells d'actuació de PEDF inclouen el camp de la diferenciació adipocitària, on un estudi de proteòmica ha identificat PEDF en 3T3-L1 com a molècula secretada diferencialment per pre-adipòcits però no per adipòcits madurs (Kratchmarova et al., 2002). Aquesta identificació va ser confirmada en un altre estudi de 3T3-L1 on caracteritzen noves adipoquines relacionades amb la diferenciació (Wang et al., 2004), i recentment en humans s'ha detectat la seva presència en el secretoma de teixit adipós visceral (Alvarez-Llamas et al., 2007) i en teixit adipós derivat de cèl·lules progenitores (Zvonic et al., 2007). Aquestes evidències suggereixen un possible paper de PEDF en la formació i fisiologia de l'adipòcit.

L'existència de receptors per aquesta substància ha estat àmpliament estudiada pel grup de la Dra Patricia Becerra, que va descriure cronològicament l'existència de receptors de PEDF en cèl·lules de retinoblastoma Y79 (Alberdi et al., 1999), en cèl·lules de retina bovina (Aymerich et al., 2001) i finalment en rosegadors i humans (Notari et al., 2006). En el secretoma de HpSC no s'ha identificat PEDF, com tampoc tenim constància fins ara de la seva localització pancreàtica. La detecció per primera vegada d'aquest factor en el medi condicionat de PaSC/ABCG2+, el ventall de funcions descrites d'aquesta molècula i la presència dels seus receptors en la línia ARIP ens fa pensar en una possible implicació de PEDF en l'efecte del medi condicionat observat en

les cèl·lules ARIP condicionades, tot i que desconeixem si aquests receptors s'expressen a les cèl·lules ductals *in vivo*. D'altra banda, el nostre cultiu primari també expressa receptors de PEDF, que podrien col·laborar a la seva pròpia transdiferenciació cap a fenotip endocrí (funció autocrina).

SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) és una proteïna de la matriu extracel·lular d'expressió restringida en teixits de vertebrats adults que estan en constant renovació com el teixit ossi, o en teixits danyats (Bradshaw and Sage, 2001). Per ser el component majoritari de l'os, a excepció dels col·lagens, aquesta proteïna també ha estat anomenada osteonectina. La seva capacitat per interaccionar amb proteïnes residents a la matriu extracel·lular i de regular l'expressió de MMP fa pensar en SPARC com a reguladora de les interaccions entre les cèl·lules i el medi extracel·lular tant en resposta a danys com en desenvolupament. Aquesta molècula està implicada en la diferenciació *in vitro* de miofibroblasts esquelètics (Cho et al., 2000), i també s'ha identificat com un factor amb una expressió elevada en models murins d'obesitat experimental (Tartare-Deckert et al., 2001). En cèl·lules mesenquimals de ratolins *knock-out* per SPARC s'observa una morfologia alterada i un augment de la proliferació (Bradshaw et al., 1999)

En el cas de les HpSC, la molècula SPARC ja ha estat identificada en el seu secretoma i la seva expressió està correlacionada amb els estadis de la fibrogènesi en les hepatitis humanes cròniques (Nakatani et al., 2002). En el nostre estudi de secretoma de PaSC/ABCG2+ podem destacar que és la proteïna més abundant, ja que correspon a l'*spot* més gran en tots els gels analitzats.

Les metal·loproteïnases (**MMP**) són una família d'enzims depenents de zinc que es classifiquen en 5 grups majoritaris segons la seva especificitat de substrat i les seves característiques estructurals. Concretament MMP2 i MMP9 són gelatinases, i degraden el col·lagen de la membrana basal tipus IV que formaria la matriu extracel·lular subendotelial normal, fet que afavoriria la seva reposició patològica per col·lagen formador de fibres. L'activitat de les MMP pot ser inhibida per TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*). Fins al moment s'han identificat quatre subtipus de TIMPs; però TIMP2 seria el que està particularment implicat en la inhibició de MMP2 (Corcoran et al., 1996).

Les MMPs regulen la composició de la matriu extracel·lular i contribueixen a crear un microambient determinat en resposta a estímuls. A més de tallar col·lagen, les MMPs també poden tallar l'heparan sulfat (o perlecan), i les laminines (Mott and Werb, 2004). En el nostre cas, podem pensar que les MMPs podrien haver contribuït a crear el microambient idoni perquè les cèl·lules estrellades secretin diferents substàncies en resposta a estímuls. Estudis anteriors ja havien descrit que les PaSC secretaven metal·loproteïnases, en concret MMP2, MMP9 i MMP13, i els seus inhibidors TIMP1 i TIMP2 (Phillips et al., 2003), suggerint que la implicació de les PaSC en la formació de matriu extracel·lular i en fibrogènesi estaria relacionada amb la seva capacitat de regular la degradació i la síntesi de proteïnes de la matriu extracel·lular. A més, aquest estudi també indica que el tractament amb TGFβ1 augmentaria la síntesi de MMP2 (Phillips et al., 2003), fet que podria explicar la detecció d'aquesta metal·loproteïnasa concreta en el nostre model de PaSC que també secreta TGFβ1.

Podem destacar que a la xarxa 2 l'anàlisi bioinformàtic ens ha localitzat la majoria de les proteïnes relacionades amb diferenciació a l'espai extracel·lular, amb possibilitat d'interacció amb les cèl·lules veïnes. Les principals funcions d'aquesta xarxa identificades en l'anàlisi bioinformàtic estarien relacionades amb desenvolupament de teixits. En el nostre model seria potser la combinació de les molècules extracel·lulars i les seves interaccions el que proporcionaria un ambient idoni per les possibles accions de les PaSC/ABCG2+ sobre altres línies.

Xarxa 3.- Per últim, en aquesta xarxa, tenim una única proteïna focus extracel·lular, el Leukemia inhibitory factor (**LIF**).

LIF va ser identificada en medi condicionat de cèl·lules tumorals amb capacitat d'inhibir la leucèmia mieloide murina. És una glicoproteïna polifuncional que pot ser induïda en gairebé tots els teixits de l'organisme (Metcalf, 2003). En desenvolupament embrionari, LIF és imprescindible per la implantació del blastocit (Lass et al., 2001), i el ratolí *knock-out* per LIF presenta anomalies en l'hipocamp (Bugga et al., 1998).

En cèl·lules embrionàries LIF es caracteritza per donar-los la capacitat de **mantenir la seva pluripotencialitat** (Williams et al., 1988). Aquesta propietat l'ha convertit en un element indispensable en la majoria de cultius de cèl·lules troncales *in vitro*, fins a arribar a la fase de formació de cossos embrionaris (Smith et al., 1988), (Amit et al., 2004). Concretament en el camp de les cèl·lules troncales neurals ja s'han descrit grups de gens implicats en l'autorenovació d'aquestes cèl·lules regulats directa o indirectament per LIF (Wright et al., 2003); i també en models pancreàtics es fa servir LIF per mantenir l'estat indiferenciat i potenciar l'autorenovació de les ESC fins al moment de la diferenciació (Lumelsky et al., 2001).

La molècula LIF també s'anomena "Differentiation factor" tot i que, no es pot considerar que la **inducció de diferenciació** sigui una de les seves accions principals. En desenvolupament de sistema nerviós exerceix la funció diferenciadora d'astròcits (Bugga et al., 1998; Nakashima et al., 1999), i s'ha demostrat la necessitat de la senyalització a través del receptor de LIF per obtenir la diferenciació d'astròcits a partir de precursors neurals (Koblar et al., 1998), en combinació amb IL6 (Nakanishi et al., 2007). Les accions diferenciadores en pàncreas inclouen la generació de cèl·lules productores d'insulina a partir de cèl·lules exocrines de rata adulta mitjançant el cultiu combinat de EGF i LIF (Baeyens et al., 2005), i recentment s'ha demostrat que algunes de les vies que actuen en aquesta diferenciació serien a través de Ngn3 i JAK/STAT (Baeyens et al., 2006). Així doncs, les accions pleiotròpiques de LIF són molt diverses i poden arribar a ser contràries segons el tipus cel·lular on actua i el temps: veiem l'efecte diferenciador en cèl·lules del sistema nerviós, en canvi en cèl·lules embrionàries el que fa es mantenir l'estat indiferenciat.

Aquesta molècula actua per la unió a un receptor de membrana heterodimèric format per una subunitat anomenada LIF-R β (gp190) i una subunitat anomenada gp130, que comparteix amb altres citocines com la interleucina-6. Concretament en el cas del pàncreas de rata s'ha analitzat la presència de LIF i els seus receptors en condicions normals i en regeneració (De Breuck et al., 2006). Per immunocitoquímica detecten LIF en els ductes, tot i que els seus receptors s'expressen tant en ductes com en cèl·lules acinars, suggerint funcions autocrines i paracrines de LIF. En el nostre estudi hem determinat la presència de receptors de LIF en cèl·lules ARIP. Les seves implicacions descrites en els camps de la diferenciació neural o endocrina, fan que ens plantejem la possibilitat que en el nostre model ARIP, LIF hagués exercit alguna funció en els efectes del medi condicionat; com també l'expressió de receptors de LIF en el cultiu primari suggereix els seus efectes autocrins.

Com a resum d'aquest segon objectiu podem dir que la localització *in vivo* de les PaSC i la seva capacitat de secretar substàncies ens van fer plantejar possibles efectes paracrins sobre altres tipus cel·lulars pancreàtics. Concretament hem demostrat que el medi condicionat de PaSC té efectes antiproliferatius sobre la línia cel·lular ductal ARIP a través de TGF β 1. El medi condicionat també té capacitat per induir canvis d'expressió gènica i proteica a les cèl·lules ARIP. Finalment hem caracteritzat per primera vegada el secretoma de PaSC, identificant molècules com PEDF, LIF i Wnt5b. Podem suggerir que alguns d'aquests factors secretats per les PaSC podrien haver afavorit els processos de transdiferenciació cel·lular descrits en l'objectiu I.

MODEL PROPOSAT DELS EFECTES DEL SECRETOMA DE PaSC

Les dades aportades en aquesta tesi suggereixen un doble paper de les substàncies secretades per les PaSC/ABCG2+: sobre elles mateixes (efecte autocrí, veure **figura 7**) i sobre les cèl·lules ductals (efecte paracrí, veure **figura 8**).

En el nostre model, les cèl·lules PaSC/ABCG2+ cultivades en plàstic s'activarien i procedirien a secretar els factors solubles que detectem durant la caracterització del model, com FGF i la resta de factors identificats en el secretoma, d'entre els que destaquem PEDF, LIF i TGFβ1. El cultiu també expressa els receptors per aquests lligands, indicant que poden actuar sobre elles mateixes.

Una part del cultiu primari s'inactiva i adopta en el fenotip quiescent, amb la propietat d'acumular retinol i formar agrupacions tridimensionals, i mantenint l'expressió dels receptors del fenotip actiu.

El cultiu en Matrigel suplementat amb exendin-4 permetria que les PaSC/ABCG2+ es transdiferenciessin cap a un fenotip endocrí amb capacitat de biosintetitzar i secretar insulina en resposta a glucosa, i expressar gens que no li són propis com glut2, IAPP, glucagó, PC1/3, i PC2. La presència també de CK19 podria representar en estadi intermig en la transdiferenciació que ha passat de mesènquima a epitelí.

EFFECTES AUTOCRINS

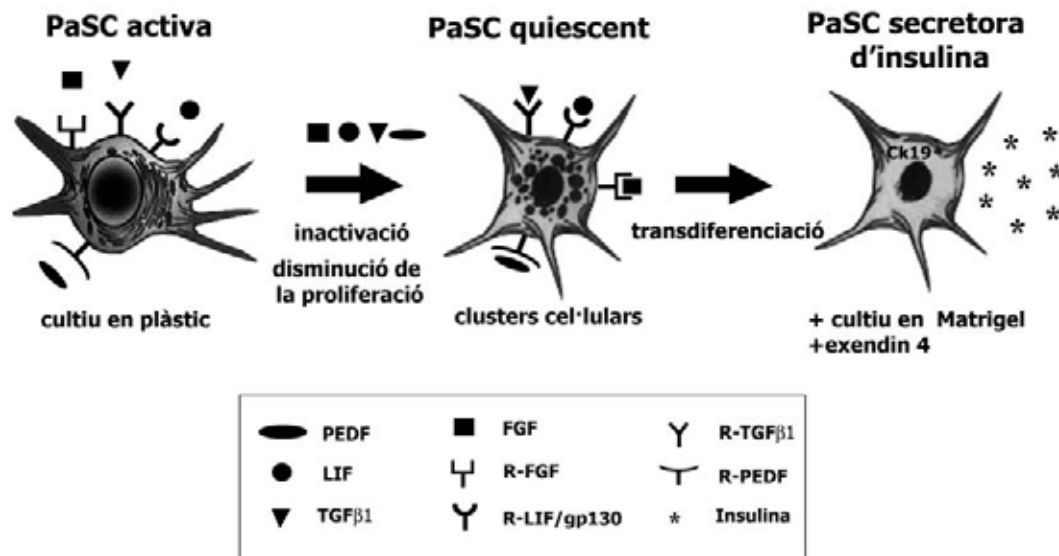


Figura 7: Model proposat dels efectes autocrins del secretoma de PaSC.

Pel que fa als efectes dels factors solubles secretats per PaSC/ABCG2+ sobre la línia cel·lular ductal ARIP, les nostres dades mostren que el secretoma de PaSC/ABCG2+ produeix una inhibició de la proliferació significativa de les cèl·lules ductals, així com canvis d'expressió gènica. Amb els experiments realitzats en aquesta tesi demostrem que el TGFβ1 secretat per les cèl·lules estrellades és el factor que causa la inhibició de la proliferació de les cèl·lules ARIP, en canvi no identifiquem el factor causant dels canvis d'expressió gènica, tot i que els candidats proposats serien PEDF i LIF.

EFFECTES PARACRINS

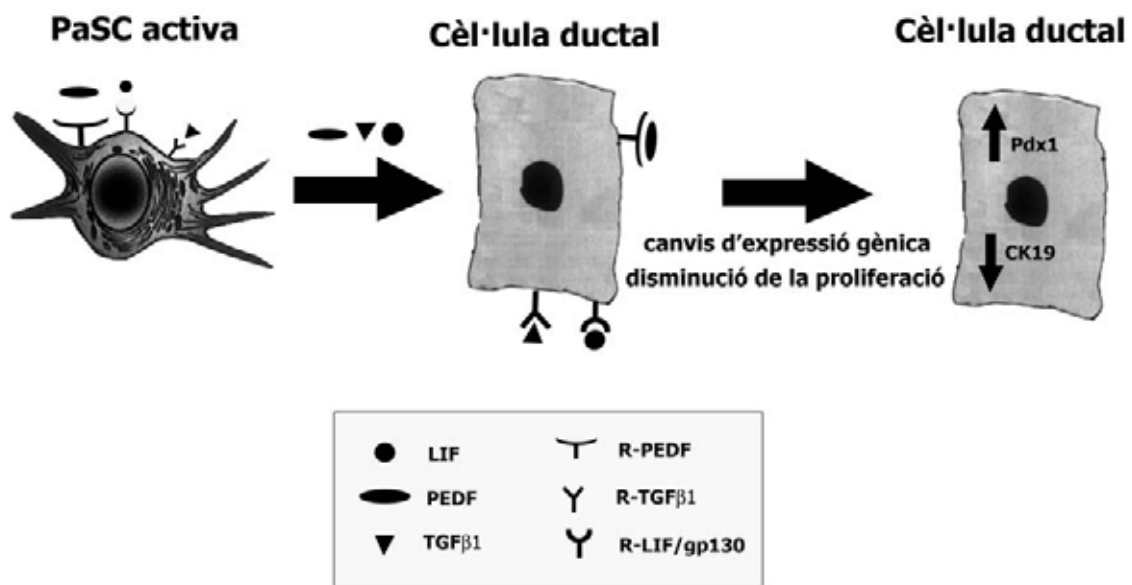


Figura 8: Model proposat dels efectes paracrins del secretoma de PaSC sobre les cèl·lules ARIP ductals.

VI.- CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- 1.- La població pancreàtica ABCG2(+) obtinguda mitjançant la selecció amb mitoxantrone correspon al fenotip de cèl·lules estrellades pancreàtiques (PaSC), i presenta marcadors propis de cèl·lules troncal adults.
- 2.- El cultiu en Matrigel i exendin-4 de les cèl·lules PaSC/ABCG2+ en estat quiescent provoca la seva transdiferenciació cap a un fenotip endocrí i de cèl·lula productora d'insulina.
- 3.- El secretoma de la població PaSC/ABCG2+ inhibeix la proliferació de la línia ductal ARIP sense afectar la seva viabilitat, alhora que indueix canvis gènics i proteïcs a la mateixa. El factor TGF β 1 secretat per les PaSC/ABCG2+ és el responsable de la inhibició de la proliferació de la línia ductal ARIP.
- 4.- La caracterització del secretoma identifica un total de 37 proteïnes solubles i 24 proteïnes intracel·lulars. Entre les proteïnes solubles, es descriu per primera vegada la presència de PEDF, LIF i Wnt5b en aquest tipus cel·lular.

VII.- ANNEX

Taula I.- Primers utilitzats en l'objectiu I

Nom	Seqüència	pb	F/R	T annealing	GenBank
ABCG2	ACAAAAGCTGAATTAGATCAACTT	641	FW	59	NM_181381
	GAGATTCACCAAGAGGCCAG		RV		
NESTINA	GCGGGGCGGTGCGTACTAC	523	FW	62	NM_012987
	AGGCAAGGGGAAGAGAAGGATGT		RV		
THY 1.1	CGCTTTATCAAGGTCCTTACTC	343	FW	52	P01830
	GCGTTTTGAGATATTTGAAGGT		RV		
NCAM	CAGCGTTGGAGAGTCCAAAT	300	FW	54	NM_031521
	TTAAACTCCTGTGGGGTTGG		RV		
INSULINA	TGGCCCTGTGGATCCG	329	FW	52	NM_019129
	AGTTGCAGTAGTTCTCCAGCTGG		RV		
PDX-1	GAGCCCAGCCGCGTTCATCT	318	FW	60	NM_022852
	CCCCGCTCGTTGTCCCGCTACTA		RV		
GLUCAGÓ	ATCATTCCAGCTTCCAGA	161	FW	72	NM_012707
	CGGTTCTCTTGGTGTTTAT		RV		
SOMATOSTATINA	CAGACTCCGTGAGTTTCTGCA	270	FW	72	NM_012659
	GCTAACAGGATGTGAATGTC		RV		
TBP	ACCCTTCACCAATGACTCCTATG	190	FW	60	NM_001004198
	ATGATGACTGCAGCAAATCGC		RV		
IAPP (AMILINA)	AGTCCTCCACCAACCAATGT	220	FW	62	NM_012586
	AGCACAGGCACGTTGTTGTAC		RV		
CHROMOGRANINA A	CGGCTTTGGCGCTTCTGCT	401	FW	60	NM_021655
	CTTGGAGGGGGCTTCTGATGCT		RV		
PC 1/3	ATCGCCGCCAGCCTCTC	449	FW	56	NM_017091
	GTTCCGCCCATATCACACGA		RV		
PC2	GGACCGCCTTGTATGACGAGAG	440	FW	58	NM_012746
	CAACTTGCCGGTGGGTATTTT		RV		
GLUT2	GACACCCACTCATAGTCACAC	270	FW	57	P12336
	CAGCAATGATGAGAGCATGTG		RV		
GLP1R	TCTCTTCTGCAACCGAACCT	350	FW	55	NM_012728
	CTGGTGAGTCAAGTGTCT		RV		
CK 19	ACAGCCAGTACTTCAAGACC	690	FW	57	AY464140
	CTGTGTCAGCACGCACGTTA		RV		
INSULIN	TGGCCCTGTGGATCCG	329	FW	52	NM_019129
	AGTTGCAGTAGTTCTCCAGCTGG		RV		
NGN3	TGGCGCCTCATCCCTTGGATG	160	FW	60	NM_021700.1
	CAGTCACCTGCTTCTGCTTCG		RV		
VIMENTINA	GCCAGCAGTATGAAAGTGTG	496	FW	60	NM_031140
	AGTGGGTGTCAACCAGAGGAA		RV		
DESMINA	AGACTTGACTCAGGCAGCCAAT	384	FW	60	NM_022531
	CGGAAGTTGAGAGCAGAGAAGG		RV		
GFAP	TGGCCACCAGTAACATGCA	538	FW	60	NM_017009
	GACTCCTTAATGACCTCGCCAT		RV		
ALFA-ACTINA	ATCCGATAGAACACGGCCTC	500	FW	60	RGD:1559154
	AGAAGAGGAAGCAGCAGTGG		RV		
Col-lagen I	GCCACCTCAAGAGAAGTC	440	FW	58.5	BC133728.1
	ATAGCGACATCGGCAGGATCG		RV		
MMP2	GCTGATACTGACTGTTACTG	217	FW	60	NM_031054
	CAATCTTTTCTGGGAGCTC		RV		
RTGFB I	ACCGCGTGCCAAATGAAGAGGAT	464	FW	55°C	L26110.1
	TGCCGTGGACAGAGCGAGTTTGAT		RV		
RTGFB II	TGGCCGCTGCACATCGTCTG	366	FW	55°C	AF474028.1
	CTCGCCCGCCCTTTTCTTTTCTT		RV		
RTGFB III	AGCAGCGCGGCCACAGCATC	531	FW	55°C	NM_017256.1
	GAAGGGGCATCCAGGGCGAGACT		RV		
TIMP-1	ACAGCTTTCTGCAACTCG	335	FW	61°C	NM_053819.1
	CTATAGGTCTTTACGAAGGCC		RV		
AMILASA	TGATGCTGCTAAGCACATGT	581	FW	59°C	NM_031502
	TGACGCCATCGATGTTTACA		RV		

Annex

P48	TGCAGTCTATCAACGACGC GGACAGAGATCTTCCAGTTC	714	FW RV	57°C	X98446.1
FGF 1	GGTGCTCCCTATTTTTGGTTGAC TACACATGGCTCCCCTCTTTGTA	281	FW RV	57°C	NM_012846.1
FGF 7	ATCCTGCCAACTCTGCTCTACAGA CTTCCCTTTGACCAGGAATCCCCTT	500	FW RV	57°C	Z22703.1
FGF 10	TGTTGCTCTTCTTGGTGTCTTCC GACCTTGCCGTTCTTTTCAATCT	244	FW RV	57°C	NM_012951.1
FGF 8	CGTGCTGGAGAACAACACTACA GGGTAGTTGAGGAACTCGAAG	194	FW RV	56°C	NM_133286.1
NEURO D1	AGGAAGAAGAGGAAGAGGAGGATG TTGGTGGTGGGTTGGGATAAG	350	FW RV	58°C	D82347.1
PAX 4	AGCTGTTTTGGCTCCAGCTGTC AACCAGACCCTCACCGTGTC	219	FW RV	58°C	NM_031799
PAX 6	ACTGAGGAACCAGAGAAGACAGGC GGAACCTTGACACTCCAGGTGAAATG	402	FW RV	58°C	NM_013001.2
ADD NGN3 humà	CGGAATTCGTAGGATGACGC TCGGATCCCCTTTCACAGAA	700	FW RV	55°C	NM_020999
FGFR1-IIIb	TTATAGCTCGGATGCGGAGGTG TCAGAGACGCCAGCTAGCATGG	445	FW RV	56°C	AF000144
FGFR2-IIIb	TAAATAGCTCCAATGCAGAAGTGC GATGTCTCCCCTTGAGGAAAGACG	424	FW RV	56°C	Z35138
FGFR2-IIIc	GGAATGTAACCTTTGAGGACGCTGG GATGTCTCCCCTTGAGGAAAGACG	377	FW RV	56°C	Z35137
FGFR 4	AAGGATTTGGCAGACCTGATC TGCACTCCGAGACTCCAGATAC	291	FW RV	56°C	BC100260.1

Taula II.- Primers utilitzats en l'objectiu II

Nom	Seqüència	pb	F/R	T annealing	GenBank
Calreticulín	GGGCCCTGATACCAAATGTC CTCTCGCCGCTGCCTTCC	467	FW RV	57	XM_001067664
Wnt5b	GCGCTGCTGGTGTGGTGAATG CCGGGCTGGGCTGGTTGA	415	FW RV	60	XM_342747
Calumenin	AGCTCCGGGAAAACCTCAG CTCCGCTCATCTTAACCATAATC	501	FW RV	60	NM_022535
SPARC	AAACCCCTGCCAGAACCATTG CTCCAGGCGCTTCTCGTTCTCGTG	415	FW RV	60	NM_012656
DIXDC1	GGGCAAATATGGATAAGGATGAGC GTGACCGCCCCGAACC	435	FW RV	57	NM_001037654
Neuromodulin-GAP 43	CTCCCGTTGCTGATGGTGTGG GGTCAGCCTCGGGTCTTCTTTAC	453	FW RV	60,5	NM_017195
Synaptotagmin V	CAGGGCAGAACACGCACGCACATA CTCCGGCCAGCTCCTTCACTTCC	524	FW RV	59	BC_092198
Transcobalamin 2	TGGGCCAGCGTCTTACCTT CCGGCCATGGCTTCTGTGTC	508	FW RV	60,5	NM_022534
PEDF (serpin F1)	GGAGCCCGTAGTGGAGGAGGATGA ATGCGAGGGTTGCCAGTGAGGATT	417	FW RV	60	BC_078686
AHNAK	GTCGGCTCCTCAAGTCTCCATACC TCCCCGACACTTTCACACCATCT	482	FW RV	57	XR_005457
DHRS4	AGGCGGCTCGGTGGTGATT TGCCGGTGGCAAGGAAGG	441	FW RV	58	NM_153315
Glypican 1 variant	GCTGCTGCTGCCCGATGACTAT CCGCAGCCCTGGATGACCTTA	489	FW RV	61	NM_030828
RAB15	GCCGGGCCGCTTCTTCT GCGCTCGCTGCTAATGTCGTA	404	FW RV	61	NM_198749
ARHGEF2	AGACCCGGGAAAAGGAGAAGATGA TGACGCAGCCCCAGAGGAGAC	445	FW RV	58	NM_001012079
ICA 1-like	TCGGTTTGCTCAAGATAAGTCAGT TGGCCCGATGTCTAAAAGTCTCTA	404	FW RV	54.5	NM_030844

LIF	AGGTCTTGGCCGAGGGATTG TCGGGGACACAGGGCACAT	508	FW RV	58	NM_022196
ERABP	CATGGTGGTCGAGCTGAAAGAGAA GTAGGGAAGGAGAGGCCAGGTAGG	448	FW RV	55	NM_024136
RAB14	TCGGGGATATGGGAGTAGGAA GGGGCTGAGGGTTTGTGTTGTA	541	FW RV	54.5	NM_053589
APG16 like	CGGCCACAGCGGGAAAGTT CCCACGCCACCGCATTGATAGAAG	542	FW RV	58	XM_001067061
MMP2	GCTGATACTGACACTGGTACTG CAATCTTTTCTGGGAGCTC	217	FW RV	60	NM_031054
Collagen I	GCCACCTCAAGAGAAGTC ATAGCGACATCGGCAGGATCG	440	FW RV	58.5	BC133728.1
Vimentin	GCCAGCAGTATGAAAGTGTG AGTGGGTGTCAACCAGAGGAA	496	FW RV	60	NM_031140
Desmin	AGACTTGACTCAGGCAGCCAAT CGGAAGTTGAGAGCAGAGAAGG	384	FW RV	60	NM_022531
GFAP	TGGCCACCAGTAACATGCA GACTCCTTAATGACCTCGCCAT	538	FW RV	60	NM_017009
TBP	ACCTTCACCAATGACTCCTATG ATGATGACTGCAGCAAATCGC	190	FW RV	60°C	NM_001004198
PDX1	GAGCCCAGCCGCGTTCATCT CCCCGCTCGTTGTCCCGCTACTA	318	FW RV	60°C	NM_022852
CK19	ACAGCCAGTACTTCAAGACC CTGTGTCAGCACGCACGTTA	690	FW RV	57°C	AY_464140
RTGFB I	ACCGCGTGCCAAATGAAGAGGAT TGCCGTGGACAGAGCGAGTTTGAT	464	FW RV	55°C	L26110.1
RTGFB II	TGGCCGCTGCACATCGTCTG CTCGCCCGCCCTTTTCTTTTCTT	366	FW RV	55°C	AF474028.1
RTGFB III	AGCAGCGCGGCCACAGCATC GAAGGGGGCATCCAGGGCGAGACT	531	FW RV	55°C	NM_017256.1
NGN3	TGGCGCCTCATCCCTTGATG CAGTCACCTGCTTCTGCTTCG	160	FW RV	60	NM_021700.1
Nkx 2.2	GCTGACCAACACAAAGACG CTGGGTCTCCTTGTCAATTG	352	FW RV	59°C	XM_001056116.1
Pax 6	ACTGAGGAACCAGAGAAGACAGGC GGAACCTTGACACTCCAGGTGAAATG	402	FW RV	58°C	NM_013001.2
PEDF R	TGTGGCCTCATTCTCCTAC TGAGAATGGGGACACTGTGA	190	FW RV	58°C	XM_341960
LIF R	TTGGAATACGTTCCGCCCT GGAACACTGCCGATTTTCTCTG	302	FW RV	58°C	NM_031048
gp 130	TCCAGCGTGGCTCTAACTTCA CACAGCATGTTCTTCCCCTCA	318	FW RV	58°C	NM_001008725.2
TBP Real Time	TTCGTGCCAGAAATGCTGAA GTTTCGTGGCTCTCTTATTCTCATG		FW RV		NM_001004198
PDX1 Real Time	CCGCGTTCATCTCCCTTTC CTCCTGCCCACTGGCTTTT		FW RV		NM_022852
CK19 Real Time	AAGGTCCAGGACCTTGAGATTG CCTTCCAGGGCAGCTTTCA		FW RV		AY_464140

Taula III. Anticossos utilitzats durant la caracterització del cultiu primari.

ANTICOSSOS PRIMARIS	DILUCIÓ	CASA COMERCIAL	2ari
ANTI-GFAP	1000	DAKO Z-0334	RABBIT
ANTI-CROMOGRANINA A	100	BioNova RB-9003	MOUSE
ANTI-DESMINA	100	Chemicon MAB-3430	MOUSE
ANTI-VIMENTINA	100	Chemicon MAB-3400	MOUSE
ANTI-C PÈPTID	100	LINCO 4023-01	GOAT
ANTI-NESTINA	100	BD BIOSCIENCES 556309	MOUSE
ANTI-PSA NCAM	250	US BIOLOGICAL P-4460	MOUSE
ANTI-NCAM	100	SIGMA C-9672	MOUSE
ANTI-ALFA ACTINA	10	US BIOLOGICAL A0760-22	MOUSE
ANTI-INSULINA	2000	DAKO A-0564	GUINEA PIG
ANTI-CD38	10	Cedit pel Dr Pablo Engel	MOUSE
ANTI-CD106 (VCAM)	200	BD BIOSCIENCES 553330	MOUSE
ANTI-LAMP2	100	Santa Cruz sc-8100	GOAT
ANTI PDX1	100	Santa Cruz sc-14662	GOAT
ANTI-CK19	1000	DAKO Z-0622	RABBIT
ANTI-CD90 (THY-1.1)	100	BD BIOSCIENCES 554897	DIRECTE (FITC CONJUGAT)
ANTICOSSOS SECUNDARIS	DILUCIÓ	CASA COMERCIAL	
anti rabbit Cy2 TM	500	Jackson Immuno Research 711-225-152	
anti guinea pig-AMCA	500	Jackson Immuno Research 706-155-148	
anti mouse Cy3 TM	500	Jackson Immuno Research 705-225-147	
anti mouse IgM-FITC	500	Sigma F-9259	
Goat TRITC	500	Sigma T-7028	
anti rabbit Cy3 TM	500	Jackson Immuno Research 711-165-152	
anti mouse Cy2 TM	500	Jackson Immuno Research 715-225-150	

Taula IV.- Proteïnes identificades per empremta peptídica en el secretoma de PaSC/ABCG2+. **MW(T)-pI(T):** pes molecular i punt isoelèctric teòrics, **MW-pI:** pes molecular i punt isoelèctric obtinguts en el gel, **Hits:** nombre de pèptids adjudicats a cada proteïna, **% Cov:** percentatge de seqüència que cobreixen, **AC:** número d'accés obtingut a la base de dades Swiss Prot.

Protein	Description	AC	pI (T)	MW (T)	Pi	Mw	Hits	% Cov
1	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1.	<u>O08628</u>	8,2	48000	7,1	55793	8	18
1	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1.	<u>O08628</u>	8,2	48000	7,6	55793	7	18
1	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1.	<u>O08628</u>	8,2	48000	6,7	56509	11	33
1	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1.	<u>O08628</u>	8,2	48000	6,2	57108	10	28
2	72 kDa type IV collagenase (MMP2)	<u>P33436</u>	5,1	62000	5,0	68834	16	26
3	Alpha-2 antiplasmin	<u>Q80ZA3</u>	6	46000	5,5	52395	10	28
3	Alpha-2 antiplasmin	<u>Q80ZA3</u>	6	46000	5,4	53373	9	26
4	Isoform 4 of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15	<u>Q8R5H1-4</u>	5,4	26000	5,3	31776	8	38
5	Adult male cDNA proteasome regulatory particle	<u>Q8C1T2</u>	4,9	28000	4,9	31776	5	22
6	Cathepsin B.	<u>Q6IN22</u>	5,5	38000	5,1	42629	6	23
7	ATPase 3 (Fragment).	<u>Q6PW16</u>	6,2	14000	7,1	27988	7	57
8	Glial fibrillary acidic protein (fragment)	<u>Q866S9</u>	5,2	48000	4,7	44342	11	24
8	Glial fibrillary acidic protein (fragment)	<u>P03995</u>	5,4	50000	5,0	31776	9	21
9	Testis cDNA, similar to human desmin	<u>Q4R7K6</u>	5,1	24000	4,7	24070	12	38
10	Vimentin.	<u>P31000</u>	5,1	54000	4,5	23085	15	22
10	Vimentin.	<u>P31000</u>	5,1	54000	5,1	22777	14	23
10	Vimentin.	<u>P31000</u>	5,1	54000	4,6	21138	17	28
10	Vimentin.	<u>P31000</u>	5,1	54000	4,6	20825	13	22
11	Tropomyosin-1.	<u>Q60527</u>	4,6	33000	4,6	40365	16	51
11	Tropomyosin alpha isoform.	<u>Q923Z2</u>	4,7	33000	4,6	36876	8	24
11	Tropomyosin isoform 8 of P04692	<u>P04692-8</u>	4,8	29000	4,9	37590	7	24
11	Tropomyosin isoform 4 of P04692	<u>P04692-4</u>	4,8	29000	5,4	42564	10	38
12	Alpha-tropomyosin 3.	<u>Q63607</u>	4,7	33000	9,3	49605	11	29
13	Tropomyosin 3, gamma.	<u>Q8K0Z5</u>	4,7	33000	4,8	27739	10	32
14	Tropomyosin isoform 6.	<u>Q63610</u>	4,8	29000	4,7	32061	14	46
14	Tropomyosin isoform 6.	<u>Q63610</u>	4,8	29000	4,8	32157	8	36
15	Tropomyosin alpha-4 chain.	<u>P09495</u>	4,7	28000	4,6	32471	15	43
16	Lamin-A.	<u>P48679</u>	6,5	74000	5,2	42694	13	21
16	LMNA protein.	<u>Q8N519</u>	6	53000	5,5	38527	10	19
17	Lamin-B2.	<u>P21619</u>	5,4	67000	5,6	59799	12	18
18	Transgelin.	<u>P31232</u>	8,9	22000	9,6	24360	7	40
19	Myosin light polypeptide 6.	<u>Q64119</u>	4,5	17000	4,3	19735	5	39
20	Neuromodulin.	<u>Q6S9D9</u>	4,7	25000	4,5	23714	9	22
21	Pigment epithelium-derived factor.	<u>P97298</u>	6,5	44000	5,5	52395	8	20
21	Pigment epithelium-derived factor.	<u>P97298</u>	6,5	44000	5,4	51521	6	14
22	Protein Wnt-5b.	<u>Q9H1J7</u>	8,8	39000	5,7	23432	8	20
23	DIXDC1 protein (Fragment).	<u>Q8IVY4</u>	6	41000	6,0	33333	9	24
24	AHNAK 1 (Fragment).	<u>Q38PG1</u>	5,2	59000	5,2	38623	14	22
25	SPARC	<u>Q6GSZ4</u>	4,8	34000	4,7	44342	15	38

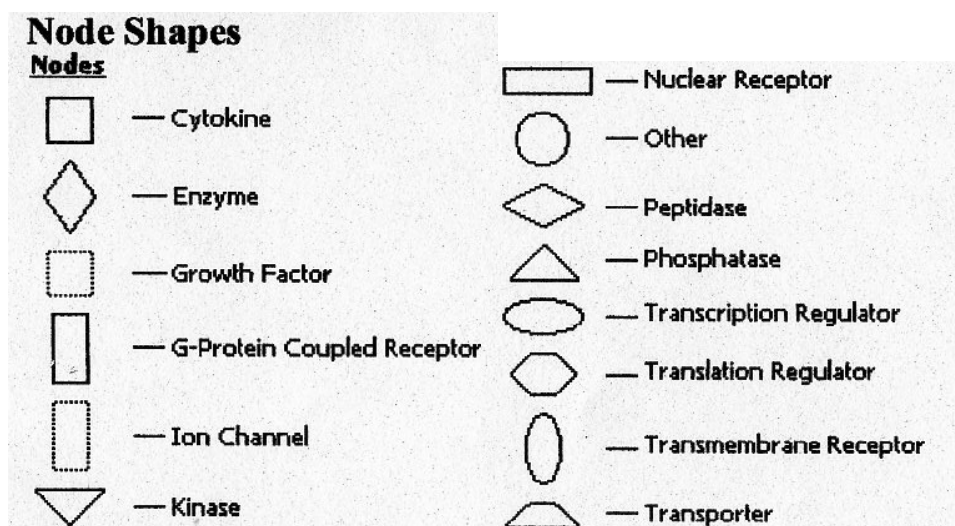
26	Leukemia inhibitory factor.	P1777	9	20000	6,0	23432	4	30
27	Calreticulin.	P18418	4,3	46000	4,3	53430	14	38
28	Heat shock protein 8.	Q4FZ77	5,4	71000	5,4	69248	26	51
29	78 kDa glucose-regulated protein.	P06761	5	70000	5,0	68834	13	25
30	Serpinh1 protein.	Q5RJR9	8,9	47000	9,3	49605	17	40
31	Calumenin.	Q35783	4,4	35000	4,3	49231	5	24
32	Phosphoglycerate kinase 1.	P16617	7,5	44000	8,0	46687	14	41
33	Enolase 1, alpha.	Q5EB49	6,2	47000	6,0	53471	10	28
34	Fructose-bisphosphate aldolase A.	P05065	8,4	39000	8,8	42888	12	29
35	Isoform M2 of Pyruvate kinase	P11980-2	7,4	58000	7,4	61394	23	52
36	Carbonyl reductase [NADPH] 1.	P47727	8,2	30000	6,7	27573	9	32
37	Adult male cDNA, similar to GTPasa	Q3UJH20	7	43000	4,6	28837	12	20
38	Transcobalamin-2.	Q9R0D6	7,8	46000	8,0	46687	11	25
39	Ferritin light chain 1.	Q6P7T1	6	21000	6,0	20981	7	53
40	Syntaxin-binding protein 3.	Q60770	8,3	68000	6,0	64613	16	24
41	Synaptotagmin 5.	Q56A28	9,4	43000	9,1	43084	8	20
42	AP-4 complex subunit sigma-1.	Q9Y587	5,1	17000	3,7	18044	4	36
43	Ras-related protein Rab-14.	Q91V41	5,9	24000	6,0	23432	7	39
44	RAB15, member RAS oncogene family.	Q504L6	5,4	24000	4,4	19298	6	29
45	Rho/Rac guanine nucleotide exchange fact	Q92974	8,7	101000	7,0	89066	6	8
46	MHC class I antigen.	Q9MXM3	5,5	40000	5,9	30475	10	38
47	Lysozyme C.	P61626	9,3	15000	8,5	18234	7	39
48	Cutaneous T-cell lymphoma-associated antigen	Q8IX95	4,9	18000	6,0	38747	5	48
49	Recombination-activating gene 1	Q5W9V9	6,4	38000	4,6	37876	11	41
50	Islet cell autoantigen 1-like protein.	Q6RUG5	5,2	49000	5,4	59799	8	24
51	APG16 autophagy 16-like	Q3TDQ5	5,9	66000	7,0	61394	8	18
52	Alpha-1 type I procollagen (Fragment).	Q60785	5,7	35000	5,2	34660	11	42
53	Col1a1 protein (Fragment).	Q99LL6	5,9	59000	5,7	51246	7	20
53	Col1a1 protein (Fragment).	Q99LL6	5,9	59000	5,6	51626	12	30
54	Col1a2 protein (Fragment).	Q91VL4	7,1	57000	6,0	32431	7	15
55	procollagen, type III, alpha 1,	Q8BJU6	5,9	36000	5,3	33602	10	36
56	Collagen alpha-1(III) chain.	P13941	9,4	94000	7,6	174792	15	20
57	Collagen alpha 1 (V) (Fragment).	O70603	4,8	22000	4,4	36028	7	52
58	Glypican 1 variant (Fragment).	Q59G17	6,5	36000	5,6	33085	6	22
59	Perlecan	Q05793	5,9	17800	6,2	23432	8	11
60	Dehydrogenase/reductase SDR family membe	Q9BTZ2	7,7	28000	8,0	36876	4	11
61	Epididymal retinoic acid-binding protein	P06911	5,5	18000	5,3	23432	4	37
TOTAL 76 SPOTS								

Taula V.- Proteïnes focus incloses en les xarxes proposades pel programa Ingenuity Pathways

(c)2000-2007 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

id	genes	score	focus genes	top functions
1	ANXA4,ARHGFEF2,BAT1,CALU,CNN3,COL5A1,DDX18,DES,DHRS4,DIXDC1,ENO1, FOS,HSPA5,IL15,MAPK8,MYC,OMG,PDLIM7,PGK1,PKIG,PLS3,PRL,PSMD6, RPS18,SUMO2,TGFB1,TOR2A,TPM1,TPM2,TPM3,TPM4,TSPAN7,YY2,ZFP161	27	15	Cellular Assembly and Organization, Cell Death
2	CIAA1,CIAA2,COL10A1,COL11A2,COL14A1,COL1A1,COL1A2,COL2A1,COL3A1, COL5A3,DDR1,DDR2,GAP43,HSPA8,HSPH1,LMNA,MMP2,P4HA1,P4HB, PCOLCE,PLXNB2,PPP1R15A,RAB14,SERPINE1,SERPINF1,SERPINH1, SMARCB1,SPARC,TCN2,THBS2,TP53,UPP1,VIM,WNT5B,ZBTB7B	27	15	Dermatological Diseases and Conditions, Cardiovascular System Development and Function, Tissue Development
3	AHNAK,AK2,ALDOA,CALR,CBR1,CD300D,CIB2,CTSB,ELF3,F2,FCGR1B,FCGR1C, FFAR2,FTL,GFAP,GST44,IL6,IL1F6,IL1F9,KCTD13,KNG1,LARGE,LIF,MYCN,MYL6, PKM2,RAG1,SERPINB8,SLC16A5,SLCO1A2,SP1,STXB3,TAGLN,TNF,UBR2	22	13	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cellular Growth and Proliferation, Connective Tissue Development and Function
4	RAB27A,SYTL5	2	1	Cellular Assembly and Organization, Hair and Skin Development and Function
5	RAB15,RABIF,RPH3A,ZFYVE20	2	1	Cellular Assembly and Organization, Molecular Transport, Protein Trafficking

Llegenda per a la visualització gràfica (corresponent a les figures 46, 47 i 48 de resultats) amb les funcions de les proteïnes descrites pel programa Ingenuity Pathways.



Taula VI. Abreviacions de totes les proteïnes que formen part de les vies biològiques proposades pel programa Ingenuity Pathways

(c)2000-2007 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

name	description	genbank	networks	location	family
AHNAK	AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)	DQ203293	3	Nucleus	other
AK2	adenylate kinase 2	--	3	Cytoplasm	kinase
ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate	M12919	3	Cytoplasm	enzyme
ANXA4	annexin A4	--	1	Plasma Membrane	other
ARHGEF2	rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	NM_001012079	1	Cytoplasm	other
BAT1	HLA-B associated transcript 1	--	1	Nucleus	enzyme
CALR	calreticulin	D78308	3	Nucleus	transcription regulator
CALU	calumenin	AJ001929	1	Unknown	other
CBR1	carbonyl reductase 1	X84349	3	Cytoplasm	enzyme
CD300D	Cd300D antigen	--	3	Plasma Membrane	transmembrane receptor
CIAA1	CIA Autoantibody QTL 1	--	2	Unknown	other
CIAA2	CIA Autoantibody QTL 2	--	2	Unknown	other
CIB2	calcium and integrin binding family member 2	--	3	Unknown	kinase
CNN3	calponin 3, acidic	--	1	Cytoplasm	other
COL10A1	collagen, type X, alpha 1	--	2	Extracellular Space	other
COL11A2	collagen, type XI, alpha 2	--	2	Extracellular Space	other
COL14A1	collagen, type XIV, alpha 1 (undulin)	--	2	Extracellular Space	other
COL1A1	collagen, type I, alpha 1	XM_213440	2	Extracellular Space	other
COL1A2	collagen, type I, alpha 2	AF121217	2	Extracellular Space	other
COL2A1	collagen, type II, alpha 1	--	2	Extracellular Space	other
COL3A1	collagen, type III, alpha 1	BC087039	2	Extracellular Space	other
COL5A1	collagen, type V, alpha 1	AJ005394	1	Extracellular Space	other
COL5A3	collagen, type V, alpha 3	--	2	Extracellular Space	other
CTSB	cathepsin B	NM_022597	3	Cytoplasm	peptidase
DDR1	discoidin domain receptor family, member 1	--	2	Plasma Membrane	kinase
DDR2	discoidin domain receptor family, member 2	--	2	Plasma Membrane	kinase
DDX18	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18	--	1	Nucleus	enzyme
DES	desmin	NM_022531	1	Unknown	other
DHRS4	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4	NM_153315	1	Unknown	enzyme
DIXDC1	DIX domain containing 1	NM_001037654	1	Unknown	other
ELF3	E74-like factor 3	--	3	Nucleus	transcription regulator
ENO1	enolase 1, (alpha)	BC090069	1	Cytoplasm	transcription regulator
F2	coagulation factor II (thrombin)	--	3	Extracellular Space	peptidase
FCGR1B	Fc fragment of IgG, high affinity Ib, receptor (CD64)	--	3	Plasma Membrane	transmembrane receptor
FCGR1C	Fc fragment of IgG, high affinity Ic, receptor (CD64)	--	3	Plasma Membrane	transmembrane receptor
FFAR2	free fatty acid receptor 2	--	3	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
FOS	v-fos FBJ murine oncogene homolog	--	1	Nucleus	transcription regulator
FTL	ferritin, light polypeptide	BC061525	3	Cytoplasm	other
GAP43	growth associated protein 43	NM_017195	2	Plasma Membrane	other
GFAP	glial fibrillary acidic protein	U03700	3	Cytoplasm	other
GSTA4	glutathione S-transferase A4	--	3	Cytoplasm	enzyme
HSPA5	heat shock 70kDa protein 5	M14050	1	Cytoplasm	other
HSPA8	heat shock 70kDa protein 8	BC098914	2	Cytoplasm	enzyme
HSPH1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	--	2	Cytoplasm	other
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	--	3	Extracellular Space	cytokine
IL15	interleukin 15	--	1	Extracellular Space	cytokine
IL1F6	interleukin 1 family, member 6 (epsilon)	--	3	Extracellular Space	cytokine
IL1F9	interleukin 1 family, member 9	--	3	Extracellular Space	cytokine
KCTD13	potassium channel domain containing 13	--	3	Cytoplasm	ion channel
KNG1	kininogen 1	--	3	Extracellular Space	other
LARGE	like-glycosyltransferase	--	3	Cytoplasm	enzyme
LIF	leukemia inhibitory factor	NM_022196	3	Extracellular Space	cytokine
LMNA	lamin A/C	NM_001002016	2	Nucleus	other
MAPK8	mitogen-activated protein kinase 8	--	1	Cytoplasm	kinase
MMP2	matrix metalloproteinase 2	X71466	2	Extracellular Space	peptidase
MYC	v-myc viral oncogene homolog	--	1	Nucleus	transcription regulator
MYCN	v-myc viral related oncogene	--	3	Nucleus	transcription regulator
MYL6	myosin, light polypeptide 6	XM_001053789	3	Cytoplasm	other
OMG	oligodendrocyte myelin glycoprotein	--	1	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
P4HA1	procollagen-proline alpha polypeptide I	--	2	Cytoplasm	enzyme
P4HB	procollagen-proline, beta polypeptide	--	2	Cytoplasm	enzyme

PCOLCE	procollagen C-endopeptidase enhancer	U94710	2	Extracellular Space	other
PDLIM7	PDZ and LIM domain 7 (enigma)	--	1	Cytoplasm	other
PGK1	phosphoglycerate kinase 1	BC063161	1	Cytoplasm	kinase
PKIG	protein kinase inhibitor gamma	--	1	Unknown	other
PKM2	pyruvate kinase, muscle	M24359	3	Cytoplasm	kinase
PLS3	plastin 3 (T isoform)	--	1	Cytoplasm	other
PLXNB2	plexin B2	--	2	Plasma Membrane	other
PPP1R15A	protein phosphatase 1, subunit 15A	--	2	Cytoplasm	other
PRL	prolactin	--	1	Extracellular Space	cytokine
PSMD6	proteasome 26S subunit, non-ATPase, 6	NM_198730	1	Cytoplasm	other
RAB14	RAB14, member RAS oncogene family	NM_053589	2	Cytoplasm	enzyme
RAB15	RAB15, member RAS oncogene family	NM_198749	5	Cytoplasm	enzyme
RAB27A	RAB27A, member RAS oncogene family	--	4	Cytoplasm	enzyme
RABIF	RAB interacting factor	--	5	Unknown	transporter
RAG1	recombination activating gene 1	XM_001079242	3	Nucleus	enzyme
RPH3A	rabphilin 3A homolog (mouse)	--	5	Plasma Membrane	transporter
RPS18	ribosomal protein S18	--	1	Cytoplasm	other
SERPINB8	serpin peptidase inhibitor, clade B member 8	--	3	Cytoplasm	other
SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E member 1	--	2	Extracellular Space	other
SERPINF1	serpin peptidase inhibitor, clade F (pigment epithelium derived factor)	BC078686	2	Extracellular Space	other
SERPINH1	serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47)	BC086529	2	Extracellular Space	other
SLC16A5	solute carrier family 16, member 5 (monocarboxylic acid transporter 6)	--	3	Plasma Membrane	transporter
SLCO1A2	solute carrier organic anion transporter family, member 1A2	--	3	Plasma Membrane	transporter
SMARCB1	SWI/SNF related, matrix associated, subfamily b, member 1	--	2	Nucleus	other
SP1	Sp1 transcription factor	--	3	Nucleus	transcription regulator
SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	BC061777	2	Extracellular Space	other
STXBP3	syntaxin binding protein 3	NM_053637	3	Plasma Membrane	transporter
SUMO2	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2 (yeast)	--	1	Unknown	other
SYTL5	synaptotagmin-like 5	NM_178333	4	Unknown	other
TAGLN	transgelin	NM_031549	3	Cytoplasm	other
TCN2	transcobalamin II; macrocytic anemia	AF054810	2	Extracellular Space	transporter
TGFB1	transforming growth factor, beta 1	--	1	Extracellular Space	growth factor
THBS2	thrombospondin 2	--	2	Extracellular Space	other
TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	--	3	Extracellular Space	cytokine
TOR2A	torsin family 2, member A	--	1	Extracellular Space	other
TP53	tumor protein p53	--	2	Nucleus	transcription regulator
TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	M60667	1	Cytoplasm	other
TPM2	tropomyosin 2 (beta)	BC090009	1	Cytoplasm	other
TPM3	tropomyosin 3	NM_057208	1	Cytoplasm	other
TPM4	tropomyosin 4	J02780	1	Cytoplasm	other
TSPAN7	tetraspanin 7	--	1	Plasma Membrane	other
UBR2	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 2	--	3	Unknown	enzyme
UPP1	uridine phosphorylase 1	--	2	Cytoplasm	enzyme
USP15	ubiquitin specific peptidase 15	AF106657	3	Cytoplasm	peptidase
VIM	vimentin	X62952	2	Cytoplasm	other
WNT5B	wingless-type MMTV integration site family, member 5B	AF481944	2	Extracellular Space	other
YY2	YY2 transcription factor	--	1	Unknown	other
ZBTB7B	zinc finger and BTB domain containing 7B	--	2	Nucleus	transcription regulator
ZFP161	zinc finger protein 161 homolog (mouse)	--	1	Nucleus	other
ZFYVE20	zinc finger, FYVE domain containing 20	--	5	Cytoplasm	other

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- Abraham, E. J., Leech, C. A., Lin, J. C., Zulewski, H., and Habener, J. F. (2002). Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology* 143, 3152-3161.
- Ahlgren, U., Jonsson, J., and Edlund, H. (1996). The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development* 122, 1409-1416.
- Ahlgren, U., Jonsson, J., Jonsson, L., Simu, K., and Edlund, H. (1998). beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 12, 1763-1768.
- Ahlgren, U., Pfaff, S. L., Jessell, T. M., Edlund, T., and Edlund, H. (1997). Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* 385, 257-260.
- Alberdi, E., Aymerich, M. S., and Becerra, S. P. (1999). Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons. Evidence for a PEDF receptor. *J Biol Chem* 274, 31605-31612.
- Alvarez-Llamas, G., Szalowska, E., de Vries, M. P., Weening, D., Landman, K., Hoek, A., Wolffenbuttel, B. H., Roelofsen, H., and Vonk, R. J. (2007). Characterization of the human visceral adipose tissue secretome. *Mol Cell Proteomics* 6, 589-600.
- Amit, M., Shariki, C., Margulets, V., and Itskovitz-Eldor, J. (2004). Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 70, 837-845.
- Anastasi, E., Santangelo, C., Bulotta, A., Dotta, F., Argenti, B., Mincione, C., Gulino, A., Maroder, M., Perfetti, R., and Di Mario, U. (2005). The acquisition of an insulin-secreting phenotype by HGF-treated rat pancreatic ductal cells (ARIP) is associated with the development of susceptibility to cytokine-induced apoptosis. *J Mol Endocrinol* 34, 367-376.
- Andersen, K. B., Nilsson, A., Blomhoff, H. K., Oyen, T. B., Gabrielsen, O. S., Norum, K. R., and Blomhoff, R. (1992). Direct mobilization of retinol from hepatic perisinusoidal stellate cells to plasma. *J Biol Chem* 267, 1340-1344.
- Aoki, H., Ohnishi, H., Hama, K., Shinozaki, S., Kita, H., Yamamoto, H., Osawa, H., Sato, K., Tamada, K., and Sugano, K. (2006). Existence of autocrine loop between interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in activated rat pancreatic stellate cells. *J Cell Biochem* 99, 221-228.
- Apte, M. V., Haber, P. S., Applegate, T. L., Norton, I. D., McCaughan, G. W., Korsten, M. A., Pirola, R. C., and Wilson, J. S. (1998). Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 43, 128-133.
- Apte, M. V., Haber, P. S., Darby, S. J., Rodgers, S. C., McCaughan, G. W., Korsten, M. A., Pirola, R. C., and Wilson, J. S. (1999). Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 44, 534-541.
- Apte, M. V., Park, S., Phillips, P. A., Santucci, N., Goldstein, D., Kumar, R. K., Ramm, G. A., Buchler, M., Friess, H., McCarroll, J. A., *et al.* (2004). Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas* 29, 179-187.
- Arvan, P., Kuliawat, R., Prabakaran, D., Zavacki, A. M., Elahi, D., Wang, S., and Pilkey, D. (1991). Protein discharge from immature secretory granules displays both regulated and constitutive characteristics. *J Biol Chem* 266, 14171-14174.
- Ashcroft, S. J., Bunce, J., Lowry, M., Hansen, S. E., and Hedekov, C. J. (1978). The effect of sugars on (pro)insulin biosynthesis. *Biochem J* 174, 517-526.

Bibliografia

- Atouf, F., Park, C. H., Pechhold, K., Ta, M., Choi, Y., and Lumelsky, N. L. (2007). No evidence for mouse pancreatic beta-cell epithelial-mesenchymal transition in vitro. *Diabetes* 56, 699-702.
- Attali, M., Stetsyuk, V., Basmaciogullari, A., Aiello, V., Zanta-Boussif, M. A., Duvillie, B., and Scharfmann, R. (2007). Control of beta-cell differentiation by the pancreatic mesenchyme. *Diabetes* 56, 1248-1258.
- Aymerich, M. S., Alberdi, E. M., Martinez, A., and Becerra, S. P. (2001). Evidence for pigment epithelium-derived factor receptors in the neural retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 3287-3293.
- Baba, S., Fujii, H., Hirose, T., Yasuchika, K., Azuma, H., Hoppo, T., Naito, M., Machimoto, T., and Ikai, I. (2004). Commitment of bone marrow cells to hepatic stellate cells in mouse. *J Hepatol* 40, 255-260.
- Bachem, M. G., Schneider, E., Gross, H., Weidenbach, H., Schmid, R. M., Menke, A., Siech, M., Beger, H., Grunert, A., and Adler, G. (1998). Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 115, 421-432.
- Baekkeskov, S., Nielsen, J. H., Marnier, B., Bilde, T., Ludvigsson, J., and Lernmark, A. (1982). Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* 298, 167-169.
- Baeyens, L., Bonne, S., German, M. S., Ravassard, P., Heimberg, H., and Bouwens, L. (2006). Ngn3 expression during postnatal in vitro beta cell neogenesis induced by the JAK/STAT pathway. *Cell Death Differ* 13, 1892-1899.
- Baeyens, L., De Breuck, S., Lardon, J., Mfopou, J. K., Rooman, I., and Bouwens, L. (2005). In vitro generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells. *Diabetologia* 48, 49-57.
- Bai, L., Meredith, G., and Tuch, B. E. (2005). Glucagon-like peptide-1 enhances production of insulin in insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells. *J Endocrinol* 186, 343-352.
- Banerjee, M., and Bhonde, R. R. (2003). Islet generation from intra islet precursor cells of diabetic pancreas: in vitro studies depicting in vivo differentiation. *Jop* 4, 137-145.
- Banerjee, M., Kanitkar, M., and Bhonde, R. R. (2005). Approaches towards endogenous pancreatic regeneration. *Rev Diabet Stud* 2, 165-176.
- Barcelo-Batllori, S., Andre, M., Servis, C., Levy, N., Takikawa, O., Michetti, P., Reymond, M., and Felley-Bosco, E. (2002). Proteomic analysis of cytokine induced proteins in human intestinal epithelial cells: implications for inflammatory bowel diseases. *Proteomics* 2, 551-560.
- Barcelo-Batllori, S., Corominola, H., Claret, M., Canals, I., Guinovart, J., and Gomis, R. (2005). Target identification of the novel antiobesity agent tungstate in adipose tissue from obese rats. *Proteomics* 5, 4927-4935.
- Barroso, I. (2005). Genetics of Type 2 diabetes. *Diabet Med* 22, 517-535.
- Bates, S. E., Robey, R., Miyake, K., Rao, K., Ross, D. D., and Litman, T. (2001). The role of half-transporters in multidrug resistance. *J Bioenerg Biomembr* 33, 503-511.
- Bazan, E., Alonso, F. J., Redondo, C., Lopez-Toledano, M. A., Alfaro, J. M., Reimers, D., Herranz, A. S., Paino, C. L., Serrano, A. B., Cobacho, N., *et al.* (2004). In vitro and in vivo characterization of neural stem cells. *Histol Histopathol* 19, 1261-1275.
- Bell, G. I., Pictet, R. L., Rutter, W. J., Cordell, B., Tischer, E., and Goodman, H. M. (1980). Sequence of the human insulin gene. *Nature* 284, 26-32.

- Ben-Hur, T., Rogister, B., Murray, K., Rougon, G., and Dubois-Dalcq, M. (1998). Growth and fate of PSA-NCAM⁺ precursors of the postnatal brain. *J Neurosci* 18, 5777-5788.
- Bendtsen, J. D., Jensen, L. J., Blom, N., Von Heijne, G., and Brunak, S. (2004). Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel* 17, 349-356.
- Beresford, W. A. (1990). Direct transdifferentiation: can cells change their phenotype without dividing? *Cell Differ Dev* 29, 81-93.
- Bergholdt, R., Storling, Z.M., Lage, K., Karlberg, E.O., Olason, P.I., Aalund, M., Nerup, J., Brunak, S., Workman, C.T., Pociot, F. (2007) Novel human protein networks of genetic interactions in type 1 diabetes *Genome Biol* 28;8(11):R253
- Bergsten, P., Grapengiesser, E., Gylfe, E., Tengholm, A., and Hellman, B. (1994). Synchronous oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ and insulin release in glucose-stimulated pancreatic islets. *J Biol Chem* 269, 8749-8753.
- Berman, J. W., and Basch, R. S. (1985). Thy-1 antigen expression by murine hematopoietic precursor cells. *Exp Hematol* 13, 1152-1156.
- Bernard-Kargar, C., Kassis, N., Berthault, M. F., Pralong, W., and Ktorza, A. (2001). Sialylated form of the neural cell adhesion molecule (NCAM): a new tool for the identification and sorting of beta-cell subpopulations with different functional activity. *Diabetes* 50 *Suppl* 1, S125-130.
- Bertelli, E., and Bendayan, M. (1997). Intermediate endocrine-acinar pancreatic cells in duct ligation conditions. *Am J Physiol* 273, C1641-1649.
- Bonner-Weir, S. (2000). Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol* 24, 297-302.
- Bonner-Weir, S., and Sharma, A. (2002). Pancreatic stem cells. *J Pathol* 197, 519-526.
- Bonner-Weir, S., Taneja, M., Weir, G. C., Tatarkiewicz, K., Song, K. H., Sharma, A., and O'Neil, J. J. (2000). In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7999-8004.
- Bonner-Weir, S., Toschi, E., Inada, A., Reitz, P., Fonseca, S. Y., Aye, T., and Sharma, A. (2004). The pancreatic ductal epithelium serves as a potential pool of progenitor cells. *Pediatr Diabetes* 5 *Suppl* 2, 16-22.
- Bottazzo, G. F., Florin-Christensen, A., and Doniach, D. (1974). Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 2, 1279-1283.
- Bottinger, E. P., Jakubczak, J. L., Roberts, I. S., Mumy, M., Hemmati, P., Bagnall, K., Merlino, G., and Wakefield, L. M. (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, 2621-2633.
- Bouwens, L., and Pipeleers, D. G. (1998). Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. *Diabetologia* 41, 629-633.
- Bouwens, L., and Rooman, I. (2005). Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev* 85, 1255-1270.
- Boyd, F. T., and Massague, J. (1989). Transforming growth factor-beta inhibition of epithelial cell proliferation linked to the expression of a 53-kDa membrane receptor. *J Biol Chem* 264, 2272-2278.
- Bradshaw, A. D., Francki, A., Motamed, K., Howe, C., and Sage, E. H. (1999). Primary mesenchymal cells isolated from SPARC-null mice exhibit altered morphology and rates of proliferation. *Mol Biol Cell* 10, 1569-1579.

Bibliografia

- Bradshaw, A. D., and Sage, E. H. (2001). SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest* 107, 1049-1054.
- Brion, C., Miller, S. G., and Moore, H. P. (1992). Regulated and constitutive secretion. Differential effects of protein synthesis arrest on transport of glycosaminoglycan chains to the two secretory pathways. *J Biol Chem* 267, 1477-1483.
- Buchholz, M., Kestler, H. A., Holzmann, K., Ellenrieder, V., Schneiderhan, W., Siech, M., Adler, G., Bachem, M. G., and Gress, T. M. (2005). Transcriptome analysis of human hepatic and pancreatic stellate cells: organ-specific variations of a common transcriptional phenotype. *J Mol Med* 83, 795-805.
- Bugga, L., Gadiant, R. A., Kwan, K., Stewart, C. L., and Patterson, P. H. (1998). Analysis of neuronal and glial phenotypes in brains of mice deficient in leukemia inhibitory factor. *J Neurobiol* 36, 509-524.
- Bulotta, A., Hui, H., Anastasi, E., Bertolotto, C., Boros, L. G., Di Mario, U., and Perfetti, R. (2002). Cultured pancreatic ductal cells undergo cell cycle re-distribution and beta-cell-like differentiation in response to glucagon-like peptide-1. *J Mol Endocrinol* 29, 347-360.
- Bunting, K. D. (2002). ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells* 20, 11-20.
- Bunting, K. D., and Hawley, R. G. (2003). Integrative molecular and developmental biology of adult stem cells. *Biol Cell* 95, 563-578.
- Burke, Z. D., and Tosh, D. (2005). Therapeutic potential of transdifferentiated cells. *Clin Sci (Lond)* 108, 309-321.
- Cabrera, O., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Berggren, P. O., and Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2334-2339.
- Cantor, A. B., Krischer, J. P., Cuthbertson, D. D., Schatz, D. A., Riley, W. J., Malone, J., Schwartz, S., Quattrin, T., and Maclaren, N. K. (1995). Age and family relationship accentuate the risk of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in relatives of patients with IDDM. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 3739-3743.
- Celli, G., LaRochelle, W. J., Mackem, S., Sharp, R., and Merlino, G. (1998). Soluble dominant-negative receptor uncovers essential roles for fibroblast growth factors in multi-organ induction and patterning. *Embo J* 17, 1642-1655.
- Cirulli, V., Baetens, D., Rutishauser, U., Halban, P. A., Orci, L., and Rouiller, D. G. (1994). Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in rat islets and its role in islet cell type segregation. *J Cell Sci* 107 (Pt 6), 1429-1436.
- Cirulli, V., Beattie, G. M., Klier, G., Ellisman, M., Ricordi, C., Quaranta, V., Frasier, F., Ishii, J. K., Hayek, A., and Salomon, D. R. (2000). Expression and function of alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) integrins in the developing pancreas: roles in the adhesion and migration of putative endocrine progenitor cells. *J Cell Biol* 150, 1445-1460.
- Cirulli, V., Crisa, L., Beattie, G. M., Mally, M. I., Lopez, A. D., Fannon, A., Ptasznik, A., Inverardi, L., Ricordi, C., Deerinck, T., et al. (1998). KSA antigen Ep-CAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development. *J Cell Biol* 140, 1519-1534.
- Clark, A. (2004). Morphology of the pancreas in normal and diabetic states. Chapter 5. *International Textbook of Diabetes Mellitus* 1, 79-95. 3rd edition. Ed John Wiley & Sons Ltd.

- Clark, S. A., Borland, K. M., Sherman, S. D., Rusack, T. C., and Chick, W. L. (1994). Staining and in vitro toxicity of dithizone with canine, porcine, and bovine islets. *Cell Transplant* 3, 299-306.
- Conget, J. I., Sarri, Y., Gonzalez-Clemente, J. M., Casamitjana, R., Vives, M., and Gomis, R. (1994). Deleterious effect of dithizone-DMSO staining on insulin secretion in rat and human pancreatic islets. *Pancreas* 9, 157-160.
- Corcoran, M. L., Hewitt, R. E., Kleiner, D. E., Jr., and Stetler-Stevenson, W. G. (1996). MMP-2: expression, activation and inhibition. *Enzyme Protein* 49, 7-19.
- Cras-Meneur, C., Elghazi, L., Czernichow, P., and Scharfmann, R. (2001). Epidermal growth factor increases undifferentiated pancreatic embryonic cells in vitro: a balance between proliferation and differentiation. *Diabetes* 50, 1571-1579.
- Cras-Meneur, C., and Scharfmann, R. (2002). FGFR1-IIIb is a putative marker of pancreatic progenitor cells. *Mech Dev* 116, 205-208.
- Czyz, J., and Wobus, A. (2001). Embryonic stem cell differentiation: the role of extracellular factors. *Differentiation* 68, 167-174.
- Chae, J. H., Stein, G. H., and Lee, J. E. (2004). NeuroD: the predicted and the surprising. *Mol Cells* 18, 271-288.
- Chen, C. H., Kuo, L. M., Chang, Y., Wu, W., Goldbach, C., Ross, M. A., Stolz, D. B., Chen, L., Fung, J. J., Lu, L., and Qian, S. (2006). In vivo immune modulatory activity of hepatic stellate cells in mice. *Hepatology* 44, 1171-1181.
- Chen, Y. E., and Drucker, D. J. (1997). Tissue-specific expression of unique mRNAs that encode proglucagon-derived peptides or exendin 4 in the lizard. *J Biol Chem* 272, 4108-4115.
- Cho, W. J., Kim, E. J., Lee, S. J., Kim, H. D., Shin, H. J., and Lim, W. K. (2000). Involvement of SPARC in in vitro differentiation of skeletal myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 630-634.
- Choi, J. B., Uchino, H., Azuma, K., Iwashita, N., Tanaka, Y., Mochizuki, H., Migita, M., Shimada, T., Kawamori, R., and Watada, H. (2003). Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46, 1366-1374.
- D'Alessandro, J. S., Lu, K., Fung, B. P., Colman, A., and Clarke, D. L. (2007). Rapid and efficient in vitro generation of pancreatic islet progenitor cells from nonendocrine epithelial cells in the adult human pancreas. *Stem Cells Dev* 16, 75-89.
- D'Amour, K. A., Bang, A. G., Eliazer, S., Kelly, O. G., Agulnick, A. D., Smart, N. G., Moorman, M. A., Kroon, E., Carpenter, M. K., and Baetge, E. E. (2006). Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 24, 1392-1401.
- Damdinsuren, B., Nagano, H., Kondo, M., Natsag, J., Hanada, H., Nakamura, M., Wada, H., Kato, H., Marubashi, S., Miyamoto, A., *et al.* (2006). TGF-beta1-induced cell growth arrest and partial differentiation is related to the suppression of Id1 in human hepatoma cells. *Oncol Rep* 15, 401-408.
- Daniel, C. W., Silberstein, G. B., Van Horn, K., Strickland, P., and Robinson, S. (1989). TGF-beta 1-induced inhibition of mouse mammary ductal growth: developmental specificity and characterization. *Dev Biol* 135, 20-30.
- De Breuck, S., Baeyens, L., and Bouwens, L. (2006). Expression and function of leukaemia inhibitory factor and its receptor in normal and regenerating rat pancreas. *Diabetologia* 49, 108-116.
- De Leon, D. D., Deng, S., Madani, R., Ahima, R. S., Drucker, D. J., and Stoffers, D. A. (2003). Role of endogenous glucagon-like peptide-1 in islet regeneration after partial pancreatectomy. *Diabetes* 52, 365-371.

Bibliografia

- De Leon, D. D., Farzad, C., Crutchlow, M. F., Brestelli, J., Tobias, J., Kaestner, K. H., and Stoffers, D. A. (2006). Identification of transcriptional targets during pancreatic growth after partial pancreatectomy and exendin-4 treatment. *Physiol Genomics* 24, 133-143.
- Demeterco, C., Beattie, G. M., Dib, S. A., Lopez, A. D., and Hayek, A. (2000). A role for activin A and betacellulin in human fetal pancreatic cell differentiation and growth. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 3892-3897.
- Derynck, R., and Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577-584.
- Desai, B. M., Oliver-Krasinski, J., De Leon, D. D., Farzad, C., Hong, N., Leach, S. D., and Stoffers, D. A. (2007). Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet beta cell, regeneration. *J Clin Invest* 117, 971-977.
- Dichmann, D. S., Miller, C. P., Jensen, J., Scott Heller, R., and Serup, P. (2003). Expression and misexpression of members of the FGF and TGFbeta families of growth factors in the developing mouse pancreas. *Dev Dyn* 226, 663-674.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17, 5046-5061.
- Doll, J. A., Stellmach, V. M., Bouck, N. P., Bergh, A. R., Lee, C., Abramson, L. P., Cornwell, M. L., Pins, M. R., Borensztajn, J., and Crawford, S. E. (2003). Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med* 9, 774-780.
- Donovan, P. J., and Gearhart, J. (2001). The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 414, 92-97.
- Dor, Y., Brown, J., Martinez, O. I., and Melton, D. A. (2004). Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429, 41-46.
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., and Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15665-15670.
- Duvillie, B., Attali, M., Bounacer, A., Ravassard, P., Basmaciogullari, A., and Scharfmann, R. (2006). The mesenchyme controls the timing of pancreatic beta-cell differentiation. *Diabetes* 55, 582-589.
- Edenfeld, G., Pielage, J., and Klambt, C. (2002). Cell lineage specification in the nervous system. *Curr Opin Genet Dev* 12, 473-477.
- Eguchi, G., and Kodama, R. (1993). Transdifferentiation. *Curr Opin Cell Biol* 5, 1023-1028.
- Eidelman, S., Damsky, C. H., Wheelock, M. J., and Damjanov, I. (1989). Expression of the cell-cell adhesion glycoprotein cell-CAM 120/80 in normal human tissues and tumors. *Am J Pathol* 135, 101-110.
- Elghazi, L., Cras-Meneur, C., Czernichow, P., and Scharfmann, R. (2002). Role for FGFR2IIIb-mediated signals in controlling pancreatic endocrine progenitor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3884-3889.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* 2, 953-971.
- Esni, F., Stoffers, D. A., Takeuchi, T., and Leach, S. D. (2004). Origin of exocrine pancreatic cells from nestin-positive precursors in developing mouse pancreas. *Mech Dev* 121, 15-25.
- Esni, F., Taljedal, I. B., Perl, A. K., Cremer, H., Christofori, G., and Semb, H. (1999). Neural cell adhesion molecule (N-CAM) is required for cell type segregation and normal ultrastructure in pancreatic islets. *J Cell Biol* 144, 325-337.

- Eswarakumar, V. P., Lax, I., and Schlessinger, J. (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 139-149.
- Evans, R. A., Tian, Y. C., Steadman, R., and Phillips, A. O. (2003). TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins. *Exp Cell Res* 282, 90-100.
- Fellous, T. G., Guppy, N. J., Brittan, M., and Alison, M. R. (2007). Cellular pathways to beta-cell replacement. *Diabetes Metab Res Rev* 23, 87-99.
- Ferber, S., Halkin, A., Cohen, H., Ber, I., Einav, Y., Goldberg, I., Barshack, I., Seiffers, R., Kopolovic, J., Kaiser, N., and Karasik, A. (2000). Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* 6, 568-572.
- Fernandez-Garcia, N. I., Volpert, O. V., and Jimenez, B. (2007). Pigment epithelium-derived factor as a multifunctional antitumor factor. *J Mol Med* 85, 15-22.
- Fetsch, P. A., Abati, A., Litman, T., Morisaki, K., Honjo, Y., Mittal, K., and Bates, S. E. (2006). Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Lett* 235, 84-92.
- Filiz, S., Dalcik, H., Yardimoglu, M., Gonca, S., and Ceylan, S. (2002). Localization of neural cell adhesion molecule (N-CAM) immunoreactivity in adult rat tissues. *Biotech Histochem* 77, 127-135.
- Friedman, S. L. (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275, 2247-2250.
- Fuchs, E., Tumber, T., and Guasch, G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116, 769-778.
- Fujisawa, M., Notohara, K., Tsukayama, C., Mizuno, R., and Okada, S. (2003). CD56-positive cells with or without synaptophysin expression are recognized in the pancreatic duct epithelium: a study with adult and fetal tissues and specimens from chronic pancreatitis. *Acta Med Okayama* 57, 279-284.
- Gaca, M. D., Pickering, J. A., Arthur, M. J., and Benyon, R. C. (1999). Human and rat hepatic stellate cells produce stem cell factor: a possible mechanism for mast cell recruitment in liver fibrosis. *J Hepatol* 30, 850-858.
- Gaidar, Y. A., Lepekhin, E. A., Sheichetova, G. A., and Witt, M. (1998). Distribution of N-cadherin and NCAM in neurons and endocrine cells of the human embryonic and fetal gastroenteropancreatic system. *Acta Histochem* 100, 83-97.
- Galvez-Gastelum, F. J., Sandoval-Rodriguez, A. S., and Armendariz-Borunda, J. (2004). [Transforming growth factor-beta as a therapeutic target]. *Salud Publica Mex* 46, 341-350.
- Gallo, R., Gambelli, F., Gava, B., Sasdelli, F., Tellone, V., Masini, M., Marchetti, P., Dotta, F., and Sorrentino, V. (2007). Generation and expansion of multipotent mesenchymal progenitor cells from cultured human pancreatic islets. *Cell Death Differ* 14, 1860-1871.
- Gao, R., Ustinov, J., Pulkkinen, M. A., Lundin, K., Korsgren, O., and Otonkoski, T. (2003). Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes* 52, 2007-2015.
- Garcia-Escarp, M., Martinez-Munoz, V., Sales-Pardo, I., Barquinero, J., Domingo, J. C., Marin, P., and Petriz, J. (2004). Flow cytometry-based approach to ABCG2 function suggests that the transporter differentially handles the influx and efflux of drugs. *Cytometry A* 62, 129-138.
- Gasa, R. (2005). Transcriptional control of pancreatic endocrine cell development. *Drug News Perspect* 18, 567-576.

Bibliografía

- Gasa, R. (2007). Plasticidad celular. Capítulo 24. Tratado de diabetes mellitus. Bases moleculares y tratamiento 1, 243-251. Ed Panamericana
- Geerts, A. (2001). History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 21, 311-335.
- Geerts, A. (2004). On the origin of stellate cells: mesodermal, endodermal or neuroectodermal? *J Hepatol* 40, 331-334.
- Gershengorn, M. C., Geras-Raaka, E., Hardikar, A. A., and Raaka, B. M. (2005). Are better islet cell precursors generated by epithelial-to-mesenchymal transition? *Cell Cycle* 4, 380-382.
- Gershengorn, M. C., Hardikar, A. A., Wei, C., Geras-Raaka, E., Marcus-Samuels, B., and Raaka, B. M. (2004). Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells. *Science* 306, 2261-2264.
- Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S., and Mische, S. M. (1999). Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20, 601-605.
- Glass, A., Kundt, G., Brock, P., Jaster, R., Liebe, S., Emmrich, J., and Sparmann, G. (2006). Delayed response toward activation stimuli in pancreatic stellate cells. *Pancreas* 33, 293-300.
- Goke, R., Fehmann, H. C., Linn, T., Schmidt, H., Krause, M., Eng, J., and Goke, B. (1993). Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *J Biol Chem* 268, 19650-19655.
- Gokhale, P. J., and Andrews, P. W. (2006). A prospective on stem cell research. *Semin Reprod Med* 24, 289-297.
- Goldfarb, M. (1996). Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 311-325.
- Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S., and Mulligan, R. C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183, 1797-1806.
- Goumans, M. J., Ward-van Oostwaard, D., Wianny, F., Savatier, P., Zwijsen, A., and Mummery, C. (1998). Mouse embryonic stem cells with aberrant transforming growth factor beta signalling exhibit impaired differentiation in vitro and in vivo. *Differentiation* 63, 101-113.
- 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 U S A* 97, 1607-1611.
- Greig, N. H., Holloway, H. W., De Ore, K. A., Jani, D., Wang, Y., Zhou, J., Garant, M. J., and Egan, J. M. (1999). Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations. *Diabetologia* 42, 45-50.
- Gressner, A. M. (1998). The cell biology of liver fibrogenesis - an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell Tissue Res* 292, 447-452.
- Gu, D., Lee, M. S., Krahl, T., and Sarvetnick, N. (1994). Transitional cells in the regenerating pancreas. *Development* 120, 1873-1881.
- 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.
- Gutierrez-Ruiz, M. C., Robles-Diaz, G., and Kershenovich, D. (2002). Emerging concepts in inflammation and fibrosis. *Arch Med Res* 33, 595-599.

- Guz, Y., Nasir, I., and Teitelman, G. (2001). Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinology* 142, 4956-4968.
- Habener, J. F., Kemp, D. M., and Thomas, M. K. (2005). Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology* 146, 1025-1034.
- Haeryfar, S. M., and Hoskin, D. W. (2004). Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. *J Immunol* 173, 3581-3588.
- Halban, P. A. (1994). Proinsulin processing in the regulated and the constitutive secretory pathway. *Diabetologia* 37 Suppl 2, S65-72.
- Hama, K., Ohnishi, H., Yasuda, H., Ueda, N., Mashima, H., Satoh, Y., Hanatsuka, K., Kita, H., Ohashi, A., Tamada, K., and Sugano, K. (2004). Angiotensin II stimulates DNA synthesis of rat pancreatic stellate cells by activating ERK through EGF receptor transactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 905-911.
- Han, F., Adams, C. S., Tao, Z., Williams, C. J., Zaka, R., Tuan, R. S., Norton, P. A., and Hickok, N. J. (2005). Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) regulates ATDC5 chondrogenic differentiation and fibronectin isoform expression. *J Cell Biochem* 95, 750-762.
- Hansson, M., Tønning, A., Frandsen, U., Petri, A., Rajagopal, J., Englund, M. C., Heller, R. S., Hakansson, J., Fleckner, J., Skold, H. N., *et al.* (2004). Artfactual insulin release from differentiated embryonic stem cells. *Diabetes* 53, 2603-2609.
- Hao, E., Tyrberg, B., Itkin-Ansari, P., Lakey, J. R., Geron, I., Monosov, E. Z., Barcova, M., Mercola, M., and Levine, F. (2006). Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelial cells of the adult human pancreas. *Nat Med* 12, 310-316.
- Harrison, K. A., Thaler, J., Pfaff, S. L., Gu, H., and Kehrl, J. H. (1999). Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in Hlxb9-deficient mice. *Nat Genet* 23, 71-75.
- Hart, A. W., Baeza, N., Apelqvist, A., and Edlund, H. (2000). Attenuation of FGF signalling in mouse beta-cells leads to diabetes. *Nature* 408, 864-868.
- 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.
- Heldin, C. H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-471.
- Heller, R. S., Dichmann, D. S., Jensen, J., Miller, C., Wong, G., Madsen, O. D., and Serup, P. (2002). Expression patterns of Wnts, Frizzleds, sFRPs, and misexpression in transgenic mice suggesting a role for Wnts in pancreas and foregut pattern formation. *Dev Dyn* 225, 260-270.
- Heller, R. S., Klein, T., Ling, Z., Heimberg, H., Katoh, M., Madsen, O. D., and Serup, P. (2003). Expression of Wnt, Frizzled, sFRP, and DKK genes in adult human pancreas. *Gene Expr* 11, 141-147.
- Heremans, Y., Van De Casteele, M., in't Veld, P., Gradwohl, G., Serup, P., Madsen, O., Pipeleers, D., and Heimberg, H. (2002). Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. *J Cell Biol* 159, 303-312.
- Hess, D., Li, L., Martin, M., Sakano, S., Hill, D., Strutt, B., Thyssen, S., Gray, D. A., and Bhatia, M. (2003). Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* 21, 763-770.
- Hirosawa, K., and Yamada, E. (1973). The localization of the vitamin A in the mouse liver as revealed by electron microscope radioautography. *J Electron Microsc* (Tokyo) 22, 337-346.

Bibliografia

- Hisaoka, M., Haratake, J., and Hashimoto, H. (1993). Pancreatic morphogenesis and extracellular matrix organization during rat development. *Differentiation* 53, 163-172.
- Hogan, B. L. (1999). Morphogenesis. *Cell* 96, 225-233.
- Hong, O. K., Lee, S. H., Rhee, M., Ko, S. H., Cho, J. H., Choi, Y. H., Song, K. H., Son, H. Y., and Yoon, K. H. (2007). Hyperglycemia and hyperinsulinemia have additive effects on activation and proliferation of pancreatic stellate cells: Possible explanation of islet-specific fibrosis in type 2 diabetes mellitus. *J Cell Biochem*.
- Houenou, L. J., D'Costa, A. P., Li, L., Turgeon, V. L., Enyadike, C., Alberdi, E., and Becerra, S. P. (1999). Pigment epithelium-derived factor promotes the survival and differentiation of developing spinal motor neurons. *J Comp Neurol* 412, 506-514.
- Huang, H., and Tang, X. (2003). Phenotypic determination and characterization of nestin-positive precursors derived from human fetal pancreas. *Lab Invest* 83, 539-547.
- Huang, S. S., and Huang, J. S. (2005). TGF-beta control of cell proliferation. *J Cell Biochem* 96, 447-462.
- Huang, W., Connor, E., Rosa, T. D., Muir, A., Schatz, D., Silverstein, J., Crockett, S., She, J. X., and Maclaren, N. K. (1996). Although DR3-DQB1*0201 may be associated with multiple component diseases of the autoimmune polyglandular syndromes, the human leukocyte antigen DR4-DQB1*0302 haplotype is implicated only in beta-cell autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 2559-2563.
- Hubschmann, M. V., Skladchikova, G., Bock, E., and Berezin, V. (2005). Neural cell adhesion molecule function is regulated by metalloproteinase-mediated ectodomain release. *J Neurosci Res* 80, 826-837.
- Hui, H., Wright, C., and Perfetti, R. (2001). Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells. *Diabetes* 50, 785-796.
- Humphrey, R. K., Bucay, N., Beattie, G. M., Lopez, A., Messam, C. A., Cirulli, V., and Hayek, A. (2003). Characterization and isolation of promoter-defined nestin-positive cells from the human fetal pancreas. *Diabetes* 52, 2519-2525.
- Hunziker, E., and Stein, M. (2000). Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 116-119.
- Hutton, J. C. (1994). Insulin secretory granule biogenesis and the proinsulin-processing endopeptidases. *Diabetologia* 37 Suppl 2, S48-56.
- Ianus, A., Holz, G. G., Theise, N. D., and Hussain, M. A. (2003). In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 111, 843-850.
- Ikejiri, N. (1990). The vitamin A-storing cells in the human and rat pancreas. *Kurume Med J* 37, 67-81.
- Ishiwata, T., Kudo, M., Onda, M., Fujii, T., Teduka, K., Suzuki, T., Korc, M., and Naito, Z. (2006). Defined localization of nestin-expressing cells in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Pancreas* 32, 360-368.
- Islam, M. O., Kanemura, Y., Tajria, J., Mori, H., Kobayashi, S., Hara, M., Yamasaki, M., Okano, H., and Miyake, J. (2005). Functional expression of ABCG2 transporter in human neural stem/progenitor cells. *Neurosci Res* 52, 75-82.
- Itoh, N., and Ornitz, D. M. (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* 20, 563-569.
- Ivanova, N. B., Dimos, J. T., Schaniel, C., Hackney, J. A., Moore, K. A., and Lemischka, I. R. (2002). A stem cell molecular signature. *Science* 298, 601-604.

- Jaster, R. (2004). Molecular regulation of pancreatic stellate cell function. *Mol Cancer* 3, 26.
- Jensen, J. (2004). Gene regulatory factors in pancreatic development. *Dev Dyn* 229, 176-200.
- Jensen, J., Pedersen, E. E., Galante, P., Hald, J., Heller, R. S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P., and Madsen, O. D. (2000). Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet* 24, 36-44.
- Jesnowski, R., Furst, D., Ringel, J., Chen, Y., Schrodell, A., Kleeff, J., Kolb, A., Schareck, W. D., and Lohr, M. (2005). Immortalization of pancreatic stellate cells as an in vitro model of pancreatic fibrosis: deactivation is induced by matrigel and N-acetylcysteine. *Lab Invest* 85, 1276-1291.
- Jiang, F. X., Cram, D. S., DeAizpurua, H. J., and Harrison, L. C. (1999). Laminin-1 promotes differentiation of fetal mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes* 48, 722-730.
- Jiang, F. X., and Harrison, L. C. (2002). Extracellular signals and pancreatic beta-cell development: a brief review. *Mol Med* 8, 763-770.
- Kahn, C. R. (1994). Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 43, 1066-1084.
- Kalluri, R., and Neilson, E. G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112, 1776-1784.
- Kanazawa, A., Tsukada, S., Kamiyama, M., Yanagimoto, T., Nakajima, M., and Maeda, S. (2005). Wnt5b partially inhibits canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway and promotes adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 505-510.
- Kanazawa, A., Tsukada, S., Sekine, A., Tsunoda, T., Takahashi, A., Kashiwagi, A., Tanaka, Y., Babazono, T., Matsuda, M., Kaku, K., *et al.* (2004). Association of the gene encoding wntless-type mammary tumor virus integration-site family member 5B (WNT5B) with type 2 diabetes. *Am J Hum Genet* 75, 832-843.
- Kania, G., Blyszczuk, P., and Wobus, A. M. (2004). The generation of insulin-producing cells from embryonic stem cells--a discussion of controversial findings. *Int J Dev Biol* 48, 1061-1064.
- Kilkenny, D. M., and Rocheleau, J. V. (2007). Fibroblast Growth Factor Receptor-1 Signaling in Pancreatic Islet {beta}-cells is Modulated by the Extracellular Matrix. *Mol Endocrinol*.
- Kim, M., Turnquist, H., Jackson, J., Sgagias, M., Yan, Y., Gong, M., Dean, M., Sharp, J. G., and Cowan, K. (2002). The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin Cancer Res* 8, 22-28.
- Kim, S. K., and Hebrok, M. (2001). Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev* 15, 111-127.
- Kim, S. K., Hebrok, M., and Melton, D. A. (1997). Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development. *Development* 124, 4243-4252.
- Kiss, J. Z., Wang, C., Olive, S., Rougon, G., Lang, J., Baetens, D., Harry, D., and Pralong, W. F. (1994). Activity-dependent mobilization of the adhesion molecule polysialic NCAM to the cell surface of neurons and endocrine cells. *Embo J* 13, 5284-5292.
- Kleinman, H. K., Philp, D., and Hoffman, M. P. (2003). Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol* 14, 526-532.

Bibliografia

- Knittel, T., Aurisch, S., Neubauer, K., Eichhorst, S., and Ramadori, G. (1996). Cell-type-specific expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in Ito cells of rat liver. Up-regulation during in vitro activation and in hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 149, 449-462.
- Knittel, T., Dinter, C., Kobold, D., Neubauer, K., Mehde, M., Eichhorst, S., and Ramadori, G. (1999). Expression and regulation of cell adhesion molecules by hepatic stellate cells (HSC) of rat liver: involvement of HSC in recruitment of inflammatory cells during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 154, 153-167.
- Koblar, S. A., Turnley, A. M., Classon, B. J., Reid, K. L., Ware, C. B., Cheema, S. S., Murphy, M., and Bartlett, P. F. (1998). Neural precursor differentiation into astrocytes requires signaling through the leukemia inhibitory factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3178-3181.
- Kodama, S., Toyonaga, T., Kondo, T., Matsumoto, K., Tsuruzoe, K., Kawashima, J., Goto, H., Kume, K., Kume, S., Sakakida, M., and Araki, E. (2005). Enhanced expression of PDX-1 and Ngn3 by exendin-4 during beta cell regeneration in STZ-treated mice. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 1170-1178.
- Koizumi, M., Doi, R., Fujimoto, K., Ito, D., Toyoda, E., Mori, T., Kami, K., Kawaguchi, Y., Gittes, G. K., and Imamura, M. (2005). Pancreatic epithelial cells can be converted into insulin-producing cells by GLP-1 in conjunction with virus-mediated gene transfer of pdx-1. *Surgery* 138, 125-133.
- Kondo, M., Cubillo, E., Tobiume, K., Shirakihara, T., Fukuda, N., Suzuki, H., Shimizu, K., Takehara, K., Cano, A., Saitoh, M., and Miyazono, K. (2004). A role for Id in the regulation of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cell Death Differ* 11, 1092-1101.
- Kordes, C., Brookmann, S., Haussinger, D., and Klonowski-Stumpe, H. (2005). Differential and synergistic effects of platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta1 on activated pancreatic stellate cells. *Pancreas* 31, 156-167.
- Kordes, C., Sawitza, I., Muller-Marbach, A., Ale-Agha, N., Keitel, V., Klonowski-Stumpe, H., and Haussinger, D. (2007). CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 352, 410-417.
- Kramer, B., and Clem, P. (2003). Regulation of the proportion of insulin cells in embryonic chick pancreas: effect of a growth factor-reduced extracellular matrix in combination with retinoic acid. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39, 196-198.
- Kratchmarova, I., Kalume, D. E., Blagoev, B., Scherer, P. E., Podtelejnikov, A. V., Molina, H., Bickel, P. E., Andersen, J. S., Fernandez, M. M., Bunkenborg, J., et al. (2002). A proteomic approach for identification of secreted proteins during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes. *Mol Cell Proteomics* 1, 213-222.
- Krishnamurthy, P., and Schuetz, J. D. (2006). Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46, 381-410.
- Kristensen, D. B., Kawada, N., Imamura, K., Miyamoto, Y., Tateno, C., Seki, S., Kuroki, T., and Yoshizato, K. (2000). Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 32, 268-277.
- Kruse, M. L., Hildebrand, P. B., Timke, C., Folsch, U. R., Schafer, H., and Schmidt, W. E. (2001). Isolation, long-term culture, and characterization of rat pancreatic fibroblastoid/stellate cells. *Pancreas* 23, 49-54.
- Kruse, M. L., Hildebrand, P. B., Timke, C., Folsch, U. R., and Schmidt, W. E. (2000). TGFbeta1 autocrine growth control in isolated pancreatic fibroblastoid cells/stellate cells in vitro. *Regul Pept* 90, 47-52.

- Kubota, H., Yao, H. L., and Reid, L. M. (2007). Identification and characterization of vitamin A-storing cells in fetal liver: implications for functional importance of hepatic stellate cells in liver development and hematopoiesis. *Stem Cells* 25, 2339-2349.
- Kuliawat, R., and Arvan, P. (1992). Protein targeting via the "constitutive-like" secretory pathway in isolated pancreatic islets: passive sorting in the immature granule compartment. *J Cell Biol* 118, 521-529.
- Kuliawat, R., and Arvan, P. (1994). Distinct molecular mechanisms for protein sorting within immature secretory granules of pancreatic beta-cells. *J Cell Biol* 126, 77-86.
- Lammert, E., Cleaver, O., and Melton, D. (2001). Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 294, 564-567.
- Lan, M. S., Wasserfall, C., Maclaren, N. K., and Notkins, A. L. (1996). IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6367-6370.
- Lange, C., Mix, E., Rateitschak, K., and Rolfs, A. (2006). Wnt signal pathways and neural stem cell differentiation. *Neurodegener Dis* 3, 76-86.
- Langley, O. K., Aletsee-Ufrecht, M. C., Grant, N. J., and Gratzl, M. (1989). Expression of the neural cell adhesion molecule NCAM in endocrine cells. *J Histochem Cytochem* 37, 781-791.
- Lardon, J., Huyens, N., Rooman, I., and Bouwens, L. (2004). Exocrine cell transdifferentiation in dexamethasone-treated rat pancreas. *Virchows Arch* 444, 61-65.
- Lardon, J., Rooman, I., and Bouwens, L. (2002). Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells. *Histochem Cell Biol* 117, 535-540.
- Larsson, O., Kindmark, H., Brandstrom, R., Fredholm, B., and Berggren, P. O. (1996). Oscillations in KATP channel activity promote oscillations in cytoplasmic free Ca²⁺ concentration in the pancreatic beta cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5161-5165.
- Lass, A., Weiser, W., Munafo, A., and Loumaye, E. (2001). Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Fertil Steril* 76, 1091-1096.
- Lechner, A., and Habener, J. F. (2003a). Bone marrow stem cells find a path to the pancreas. *Nat Biotechnol* 21, 755-756.
- Lechner, A., and Habener, J. F. (2003b). Stem/progenitor cells derived from adult tissues: potential for the treatment of diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E259-266.
- Lechner, A., Leech, C. A., Abraham, E. J., Nolan, A. L., and Habener, J. F. (2002). Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-binding cassette transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 670-674.
- Lechner, A., Yang, Y. G., Blacken, R. A., Wang, L., Nolan, A. L., and Habener, J. F. (2004). No evidence for significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic beta-cells in vivo. *Diabetes* 53, 616-623.
- Lee, C. S., De Leon, D. D., Kaestner, K. H., and Stoffers, D. A. (2006). Regeneration of pancreatic islets after partial pancreatectomy in mice does not involve the reactivation of neurogenin-3. *Diabetes* 55, 269-272.
- Lee, J. C., Smith, S. B., Watada, H., Lin, J., Scheel, D., Wang, J., Mirmira, R. G., and German, M. S. (2001). Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes* 50, 928-936.

Bibliografia

- Lemischka, I. R., and Moore, K. A. (2003). Stem cells: interactive niches. *Nature* 425, 778-779.
- Leng, S. H., and Lu, F. E. (2005). Induction of pancreatic duct cells of neonatal rats into insulin-producing cells with fetal bovine serum: a natural protocol and its use for patch clamp experiments. *World J Gastroenterol* 11, 6968-6974.
- Leon-Quinto, T., Jones, J., Skoudy, A., Burcin, M., and Soria, B. (2004). In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Diabetologia* 47, 1442-1451.
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., and Cole, S. P. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 204, 216-237.
- Li, H., Arber, S., Jessell, T. M., and Edlund, H. (1999). Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9. *Nat Genet* 23, 67-70.
- Li, M., Miyagawa, J., Moriwaki, M., Yuan, M., Yang, Q., Kozawa, J., Yamamoto, K., Imagawa, A., Iwahashi, H., Tochino, Y., *et al.* (2003). Analysis of expression profiles of islet-associated transcription and growth factors during beta-cell neogenesis from duct cells in partially duct-ligated mice. *Pancreas* 27, 345-355.
- Liu, H. K., Green, B. D., Gault, V. A., McCluskey, J. T., McClenaghan, N. H., O'Harte, F. P., and Flatt, P. R. (2004). N-acetyl-GLP-1: a DPP IV-resistant analogue of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with improved effects on pancreatic beta-cell-associated gene expression. *Cell Biol Int* 28, 69-73.
- Lovell-Badge, R. (2001). The future for stem cell research. *Nature* 414, 88-91.
- Lu, J., Li, Q., Xie, H., Chen, Z. J., Borovitskaya, A. E., Maclaren, N. K., Notkins, A. L., and Lan, M. S. (1996). Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2307-2311.
- 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.
- Luo, X., Tarbell, K. V., Yang, H., Pothoven, K., Bailey, S. L., Ding, R., Steinman, R. M., and Suthanthiran, M. (2007). Dendritic cells with TGF-beta1 differentiate naive CD4+CD25- T cells into islet-protective Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2821-2826.
- Madro, A., Celinski, K., and Slomka, M. (2004). The role of pancreatic stellate cells and cytokines in the development of chronic pancreatitis. *Med Sci Monit* 10, RA166-170.
- Malaisse, W. J., Sener, A., Herchuelz, A., and Hutton, J. C. (1979). Insulin release: the fuel hypothesis. *Metabolism* 28, 373-386.
- March, S., Graupera, M., Rosa Sarrias, M., Lozano, F., Pizcueta, P., Bosch, J., and Engel, P. (2007). Identification and functional characterization of the hepatic stellate cell CD38 cell surface molecule. *Am J Pathol* 170, 176-187.
- Marmur, R., Mabie, P. C., Gokhan, S., Song, Q., Kessler, J. A., and Mehler, M. F. (1998). Isolation and developmental characterization of cerebral cortical multipotent progenitors. *Dev Biol* 204, 577-591.
- Marra, F. (1999). Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *J Hepatol* 31, 1120-1130.
- Masamune, A., Kikuta, K., Satoh, M., Sakai, Y., Satoh, A., and Shimosegawa, T. (2002). Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma block activation of pancreatic stellate cells. *J Biol Chem* 277, 141-147.

- Masamune, A., Satoh, M., Kikuta, K., Suzuki, N., and Shimosegawa, T. (2003). Establishment and characterization of a rat pancreatic stellate cell line by spontaneous immortalization. *World J Gastroenterol* 9, 2751-2758.
- 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.
- Massague, J., Cheifetz, S., Ignatz, R. A., and Boyd, F. T. (1987). Multiple type-beta transforming growth factors and their receptors. *J Cell Physiol Suppl Suppl* 5, 43-47.
- Massague, J., Cheifetz, S., Laiho, M., Ralph, D. A., Weis, F. M., and Zentella, A. (1992). Transforming growth factor-beta. *Cancer Surv* 12, 81-103.
- Matsumoto, S., Okumura, K., Ogata, A., Hisatomi, Y., Sato, A., Hattori, K., Matsumoto, M., Kaji, Y., Takahashi, M., Yamamoto, T., *et al.* (2007). Isolation of tissue progenitor cells from duct-ligated salivary glands of swine. *Cloning Stem Cells* 9, 176-190.
- McCarroll, J. A., Phillips, P. A., Santucci, N., Pirola, R. C., Wilson, J. S., and Apte, M. V. (2006). Vitamin A inhibits pancreatic stellate cell activation: implications for treatment of pancreatic fibrosis. *Gut* 55, 79-89.
- Mellitzer, G., Bonne, S., Luco, R. F., Van De Casteele, M., Lenne-Samuel, N., Collombat, P., Mansouri, A., Lee, J., Lan, M., Pipeleers, D., *et al.* (2006). IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas. *Embo J* 25, 1344-1352.
- Metcalfe, D. (2003). The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. *Stem Cells* 21, 5-14.
- Mews, P., Phillips, P., Fahmy, R., Korsten, M., Pirola, R., Wilson, J., and Apte, M. (2002). Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. *Gut* 50, 535-541.
- Miller, B. A., and Lipton, J. M. (1983). Thy-1 antigen in murine hematopoietic progenitor differentiation. *Prog Clin Biol Res* 134, 389-397.
- Miller, C. P., McGehee, R. E., Jr., and Habener, J. F. (1994). IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *Embo J* 13, 1145-1156.
- Minami, K., Okuno, M., Miyawaki, K., Okumachi, A., Ishizaki, K., Oyama, K., Kawaguchi, M., Ishizuka, N., Iwanaga, T., and Seino, S. (2005). Lineage tracing and characterization of insulin-secreting cells generated from adult pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15116-15121.
- 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.
- Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T., and Bates, S. E. (1999). Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res* 59, 8-13.
- Molinete, M., Dupuis, S., Brodsky, F. M., and Halban, P. A. (2001). Role of clathrin in the regulated secretory pathway of pancreatic beta-cells. *J Cell Sci* 114, 3059-3066.
- Molinete, M., Irminger, J. C., Tooze, S. A., and Halban, P. A. (2000). Trafficking/sorting and granule biogenesis in the beta-cell. *Semin Cell Dev Biol* 11, 243-251.

Bibliografia

- Moller, C. J., Christgau, S., Williamson, M. R., Madsen, O. D., Niu, Z. P., Bock, E., and Baekkeskov, S. (1992). Differential expression of neural cell adhesion molecule and cadherins in pancreatic islets, glucagonomas, and insulinomas. *Mol Endocrinol* 6, 1332-1342.
- Moller, D. E. (2001). New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414, 821-827.
- Montana, E., Bonner-Weir, S., and Weir, G. C. (1994). Transplanted beta cell response to increased metabolic demand. Changes in beta cell replication and mass. *J Clin Invest* 93, 1577-1582.
- Morton, R. A., Geras-Raaka, E., Wilson, L. M., Raaka, B. M., and Gershengorn, M. C. (2007). Endocrine precursor cells from mouse islets are not generated by epithelial-to-mesenchymal transition of mature beta cells. *Mol Cell Endocrinol* 270, 87-93.
- Mott, J. D., and Werb, Z. (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16, 558-564.
- Munshi, H. G., and Stack, M. S. (2006). Reciprocal interactions between adhesion receptor signaling and MMP regulation. *Cancer Metastasis Rev* 25, 45-56.
- Nagai, H., Terada, K., Watanabe, G., Ueno, Y., Aiba, N., Shibuya, T., Kawagoe, M., Kameda, T., Sato, M., Senoo, H., and Sugiyama, T. (2002). Differentiation of liver epithelial (stem-like) cells into hepatocytes induced by coculture with hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 1420-1425.
- Nakanishi, M., Niidome, T., Matsuda, S., Akaike, A., Kihara, T., and Sugimoto, H. (2007). Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *Eur J Neurosci* 25, 649-658.
- Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., and Taga, T. (1999). Astrocyte differentiation mediated by LIF in cooperation with BMP2. *FEBS Lett* 457, 43-46.
- Nakatani, K., Seki, S., Kawada, N., Kitada, T., Yamada, T., Sakaguchi, H., Kadoya, H., Ikeda, K., and Kaneda, K. (2002). Expression of SPARC by activated hepatic stellate cells and its correlation with the stages of fibrogenesis in human chronic hepatitis. *Virchows Arch* 441, 466-474.
- Nakatani, K., Seki, S., Kawada, N., Kobayashi, K., and Kaneda, K. (1996). Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in perisinusoidal stellate cells of the human liver. *Cell Tissue Res* 283, 159-165.
- Naya, F. J., Huang, H. P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F. J., Leiter, A. B., and Tsai, M. J. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11, 2323-2334.
- Nickel, W. (2005). Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic* 6, 607-614.
- Nikolova, G., Jabs, N., Konstantinova, I., Domogatskaya, A., Tryggvason, K., Sorokin, L., Fassler, R., Gu, G., Gerber, H. P., Ferrara, N., *et al.* (2006). The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and Beta cell proliferation. *Dev Cell* 10, 397-405.
- Nomiyama, Y., Tashiro, M., Yamaguchi, T., Watanabe, S., Taguchi, M., Asaumi, H., Nakamura, H., and Otsuki, M. (2007). High glucose activates rat pancreatic stellate cells through protein kinase C and p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Pancreas* 34, 364-372.
- Norgaard, G. A., Jensen, J. N., and Jensen, J. (2003). FGF10 signaling maintains the pancreatic progenitor cell state revealing a novel role of Notch in organ development. *Dev Biol* 264, 323-338.

- Notari, L., Baladron, V., Aroca-Aguilar, J. D., Balko, N., Heredia, R., Meyer, C., Notario, P. M., Saravanamuthu, S., Nueda, M. L., Sanchez-Sanchez, F., *et al.* (2006). Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem* 281, 38022-38037.
- Ogawa, M., LaRue, A. C., and Drake, C. J. (2006). Hematopoietic origin of fibroblasts/myofibroblasts: Its pathophysiologic implications. *Blood* 108, 2893-2896.
- Oh, S. H., Muzzonigro, T. M., Bae, S. H., LaPlante, J. M., Hatch, H. M., and Petersen, B. E. (2004). Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab Invest* 84, 607-617.
- Ohnishi, H., Miyata, T., Yasuda, H., Satoh, Y., Hanatsuka, K., Kita, H., Ohashi, A., Tamada, K., Makita, N., Iiri, T., *et al.* (2004). Distinct roles of Smad2-, Smad3-, and ERK-dependent pathways in transforming growth factor-beta1 regulation of pancreatic stellate cellular functions. *J Biol Chem* 279, 8873-8878.
- Oklu, R., and Hesketh, R. (2000). The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *Biochem J* 352 Pt 3, 601-610.
- Omary, M. B., Lugea, A., Lowe, A. W., and Pandol, S. J. (2007). The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest* 117, 50-59.
- Ornitz, D. M., and Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2, REVIEWS3005.
- Orr-Urtreger, A., Bedford, M. T., Burakova, T., Arman, E., Zimmer, Y., Yayon, A., Givol, D., and Lonai, P. (1993). Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev Biol* 158, 475-486.
- Ozvegy-Laczka, C., Hegedus, T., Varady, G., Ujhelly, O., Schuetz, J. D., Varadi, A., Keri, G., Orfi, L., Nemet, K., and Sarkadi, B. (2004). High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. *Mol Pharmacol* 65, 1485-1495.
- Patapoutian, A., Wold, B. J., and Wagner, R. A. (1995). Evidence for developmentally programmed transdifferentiation in mouse esophageal muscle. *Science* 270, 1818-1821.
- Pera, M. F., Reubinoff, B., and Trounson, A. (2000). Human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 113 (Pt 1), 5-10.
- Perez-Villamil, B., Schwartz, P. T., and Vallejo, M. (1999). The pancreatic homeodomain transcription factor IDX1/IPF1 is expressed in neural cells during brain development. *Endocrinology* 140, 3857-3860.
- Petropavlovskaja, M., and Rosenberg, L. (2002). Identification and characterization of small cells in the adult pancreas: potential progenitor cells? *Cell Tissue Res* 310, 51-58.
- Pezzilli, R. (2007). Pancreatic stellate cells and chronic alcoholic pancreatitis. *Jop* 8, 254-257.
- Philp, D., Chen, S. S., Fitzgerald, W., Orenstein, J., Margolis, L., and Kleinman, H. K. (2005). Complex extracellular matrices promote tissue-specific stem cell differentiation. *Stem Cells* 23, 288-296.
- Phillips, P. A., McCarroll, J. A., Park, S., Wu, M. J., Pirola, R., Korsten, M., Wilson, J. S., and Apte, M. V. (2003). Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut* 52, 275-282.
- Pinzani, M. (1995). Novel insights into the biology and physiology of the Ito cell. *Pharmacol Ther* 66, 387-412.

Bibliografia

- Piper, K., Ball, S. G., Turnpenny, L. W., Brickwood, S., Wilson, D. I., and Hanley, N. A. (2002). Beta-cell differentiation during human development does not rely on nestin-positive precursors: implications for stem cell-derived replacement therapy. *Diabetologia* 45, 1045-1047.
- Pociot, F., and McDermott M F. (2002). Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes and Immunity* 3, 235-249.
- Poitout, V., Stein, R., Rhodes, C.J. (2004). Insulin gene expression and biosynthesis. Chapter 6. *International Textbook of Diabetes Mellitus 1*, 97-123. 3rd edition. Ed John Wiley & Sons Ltd.
- Pulkkinen, M. A., Spencer-Dene, B., Dickson, C., and Otonkoski, T. (2003). The IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 is required for proper growth and branching of pancreatic ductal epithelium but not for differentiation of exocrine or endocrine cells. *Mech Dev* 120, 167-175.
- Pumiglia, K., and Temple, S. (2006). PEDF: bridging neurovascular interactions in the stem cell niche. *Nat Neurosci* 9, 299-300.
- 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.
- Ramirez-Castillejo, C., Sanchez-Sanchez, F., Andreu-Agullo, C., Ferron, S. R., Aroca-Aguilar, J. D., Sanchez, P., Mira, H., Escribano, J., and Farinas, I. (2006). Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* 9, 331-339.
- Ramiya, V. K., Maraist, M., Arfors, K. E., Schatz, D. A., Peck, A. B., and Cornelius, J. G. (2000). Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 6, 278-282.
- Rane, S. G., Lee, J. H., and Lin, H. M. (2006). Transforming growth factor-beta pathway: role in pancreas development and pancreatic disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, 107-119.
- Rathjen, J., and Rathjen, P. D. (2001). Mouse ES cells: experimental exploitation of pluripotent differentiation potential. *Curr Opin Genet Dev* 11, 587-594.
- Rege, T. A., and Hagood, J. S. (2006). Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *Faseb J* 20, 1045-1054.
- Rescan, C., Le Bras, S., Lefebvre, V. H., Frandsen, U., Klein, T., Foschi, M., Pipeleers, D. G., Scharfmann, R., Madsen, O. D., and Heimberg, H. (2005). EGF-induced proliferation of adult human pancreatic duct cells is mediated by the MEK/ERK cascade. *Lab Invest* 85, 65-74.
- Reusens, B., and Remacle, C. (2006). Programming of the endocrine pancreas by the early nutritional environment. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 913-922.
- Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., and Weissman, I. L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 409-414.
- Robey, R. W., Honjo, Y., van de Laar, A., Miyake, K., Regis, J. T., Litman, T., and Bates, S. E. (2001). A functional assay for detection of the mitoxantrone resistance protein, MXR (ABCG2). *Biochim Biophys Acta* 1512, 171-182.
- Roche, E., Jones, J., Arribas, M. I., Leon-Quinto, T., and Soria, B. (2006). Role of small bioorganic molecules in stem cell differentiation to insulin-producing cells. *Bioorg Med Chem* 14, 6466-6474.
- Roche, E., Reig, J. A., Campos, A., Paredes, B., Isaac, J. R., Lim, S., Calne, R. Y., and Soria, B. (2005). Insulin-secreting cells derived from stem cells: clinical perspectives, hopes and hopes. *Transpl Immunol* 15, 113-129.

- Rorsman, P., Eliasson, L., Renstrom, E., Gromada, J., Barg, S., and Gopel, S. (2000). The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci* 15, 72-77.
- Royer, P. J., Tanguy-Royer, S., Ebstein, F., Sapede, C., Simon, T., Barbieux, I., Oger, R., and Gregoire, M. (2006). Culture medium and protein supplementation in the generation and maturation of dendritic cells. *Scand J Immunol* 63, 401-409.
- Rukstalis, J. M., and Habener, J. F. (2007). Snail2, a mediator of epithelial-mesenchymal transitions, expressed in progenitor cells of the developing endocrine pancreas. *Gene Expr Patterns* 7, 471-479.
- Rutishauser, U., Acheson, A., Hall, A. K., Mann, D. M., and Sunshine, J. (1988). The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* 240, 53-57.
- Sander, M., and German, M. S. (1997). The beta cell transcription factors and development of the pancreas. *J Mol Med* 75, 327-340.
- Sander, M., Sussel, L., Connors, J., Scheel, D., Kalamaras, J., Dela Cruz, F., Schwitzgebel, V., Hayes-Jordan, A., and German, M. (2000). Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development* 127, 5533-5540.
- Sanderson, N., Factor, V., Nagy, P., Kopp, J., Kondaiah, P., Wakefield, L., Roberts, A. B., Sporn, M. B., and Thorgeirsson, S. S. (1995). Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2572-2576.
- Sanvito, F., Herrera, P. L., Huarte, J., Nichols, A., Montesano, R., Orci, L., and Vassalli, J. D. (1994). TGF-beta 1 influences the relative development of the exocrine and endocrine pancreas in vitro. *Development* 120, 3451-3462.
- Saotome, T., Inoue, H., Fujimiya, M., Fujiyama, Y., and Bamba, T. (1997). Morphological and immunocytochemical identification of periacinar fibroblast-like cells derived from human pancreatic acini. *Pancreas* 14, 373-382.
- Satoh, M., Masamune, A., Sakai, Y., Kikuta, K., Hamada, H., and Shimosegawa, T. (2002). Establishment and characterization of a simian virus 40-immortalized rat pancreatic stellate cell line. *Tohoku J Exp Med* 198, 55-69.
- Scharfmann, R. (2000). Control of early development of the pancreas in rodents and humans: implications of signals from the mesenchyme. *Diabetologia* 43, 1083-1092.
- Scheres, B. (2007). Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 345-354.
- Schmid, V., and Alder, H. (1984). Isolated, mononucleated, striated muscle can undergo pluripotent transdifferentiation and form a complex regenerate. *Cell* 38, 801-809.
- Schneider, E., Schmid-Kotsas, A., Zhao, J., Weidenbach, H., Schmid, R. M., Menke, A., Adler, G., Waltenberger, J., Grunert, A., and Bachem, M. G. (2001). Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C532-543.
- Schwitzgebel, V. M., Scheel, D. W., Connors, J. R., Kalamaras, J., Lee, J. E., Anderson, D. J., Sussel, L., Johnson, J. D., and German, M. S. (2000). Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 127, 3533-3542.
- Seaberg, R. M., Smukler, S. R., Kieffer, T. J., Enikolopov, G., Asghar, Z., Wheeler, M. B., Korbitt, G., and van der Kooy, D. (2004). Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol* 22, 1115-1124.

Bibliografia

- Seeberger, K. L., Dufour, J. M., Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Rajotte, R. V., and Korbitt, G. S. (2006). Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium. *Lab Invest* 86, 141-153.
- Selander, L., and Edlund, H. (2002). Nestin is expressed in mesenchymal and not epithelial cells of the developing mouse pancreas. *Mech Dev* 113, 189-192.
- Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Paty, B. W., Senior, P. A., Bigam, D. L., and Ryan, E. A. (2005). Strategic opportunities in clinical islet transplantation. *Transplantation* 79, 1304-1307.
- Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., Korbitt, G. S., Toth, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M., and Rajotte, R. V. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343, 230-238.
- Shek, F. W., Benyon, R. C., Walker, F. M., McCrudden, P. R., Pender, S. L., Williams, E. J., Johnson, P. A., Johnson, C. D., Bateman, A. C., Fine, D. R., and Iredale, J. P. (2002). Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis. *Am J Pathol* 160, 1787-1798.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.
- Shimano, K., Satake, M., Okaya, A., Kitanaka, J., Kitanaka, N., Takemura, M., Sakagami, M., Terada, N., and Tsujimura, T. (2003). Hepatic oval cells have the side population phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1. *Am J Pathol* 163, 3-9.
- Shimizu, K., Kobayashi, M., Tahara, J., and Shiratori, K. (2005). Cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand regulate phagocytosis by pancreatic stellate cells. *Gastroenterology* 128, 2105-2118.
- Shiroi, A., Yoshikawa, M., Yokota, H., Fukui, H., Ishizaka, S., Tatsumi, K., and Takahashi, Y. (2002). Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone. *Stem Cells* 20, 284-292.
- Silver, K., and Yao, F. (2001). ARIP cells as a model for pancreatic beta cell growth and development. *Pancreas* 22, 141-147.
- Sipione, S., Eshpeter, A., Lyon, J. G., Korbitt, G. S., and Bleackley, R. C. (2004). Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells. *Diabetologia* 47, 499-508.
- Skoudy, A., Rovira, M., Savatier, P., Martin, F., Leon-Quinto, T., Soria, B., and Real, F. X. (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, 749-756.
- Slack, J. M., and Tosh, D. (2001). Transdifferentiation and metaplasia--switching cell types. *Curr Opin Genet Dev* 11, 581-586.
- Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688-690.
- Smolich, B. D., McMahon, J. A., McMahon, A. P., and Papkoff, J. (1993). Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface. *Mol Biol Cell* 4, 1267-1275.
- Soria, B. (2001). In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation* 68, 205-219.

- 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.
- Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Torres, M., Oliver, G., and Gruss, P. (1997). The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386, 399-402.
- Sparmann, G., Hohenadl, C., Tornøe, J., Jaster, R., Fitzner, B., Koczan, D., Thiesen, H. J., Glass, A., Winder, D., Liebe, S., and Emmrich, J. (2004). Generation and characterization of immortalized rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G211-219.
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., and Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature* 414, 98-104.
- Steele, F. R., Chader, G. J., Johnson, L. V., and Tombran-Tink, J. (1993). Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1526-1530.
- Steiling, H., Muhlbauer, M., Bataille, F., Scholmerich, J., Werner, S., and Hellerbrand, C. (2004). Activated hepatic stellate cells express keratinocyte growth factor in chronic liver disease. *Am J Pathol* 165, 1233-1241.
- Steiling, H., and Werner, S. (2003). Fibroblast growth factors: key players in epithelial morphogenesis, repair and cytoprotection. *Curr Opin Biotechnol* 14, 533-537.
- Stoffers, D. A., Zinkin, N. T., Stanojevic, V., Clarke, W. L., and Habener, J. F. (1997). Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* 15, 106-110.
- Strauer, B. E., and Kornowski, R. (2003). Stem cell therapy in perspective. *Circulation* 107, 929-934.
- Street, C. N., Lakey, J. R., Seeberger, K., Helms, L., Rajotte, R. V., Shapiro, A. M., and Korbutt, G. S. (2004). Heterogenous expression of nestin in human pancreatic tissue precludes its use as an islet precursor marker. *J Endocrinol* 180, 213-225.
- Streuli, C. (1999). Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 11, 634-640.
- Sunshine, J., Balak, K., Rutishauser, U., and Jacobson, M. (1987). Changes in neural cell adhesion molecule (NCAM) structure during vertebrate neural development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5986-5990.
- Suskind, D. L., and Muench, M. O. (2004). Searching for common stem cells of the hepatic and hematopoietic systems in the human fetal liver: CD34+ cytokeratin 7/8+ cells express markers for stellate cells. *J Hepatol* 40, 261-268.
- Sussel, L., Kalamaras, J., Hartigan-O'Connor, D. J., Meneses, J. J., Pedersen, R. A., Rubenstein, J. L., and German, M. S. (1998). Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development* 125, 2213-2221.
- Suzuki, A., Nakauchi, H., and Taniguchi, H. (2004). Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes* 53, 2143-2152.
- Tanaka, Y., Slitt, A. L., Leazer, T. M., Maher, J. M., and Klaassen, C. D. (2005). Tissue distribution and hormonal regulation of the breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in rats and mice. *Biochem Biophys Res Commun* 326, 181-187.
- Taneera, J., Rosengren, A., Renstrom, E., Nygren, J. M., Serup, P., Rorsman, P., and Jacobsen, S. E. (2006). Failure of transplanted bone marrow cells to adopt a pancreatic beta-cell fate. *Diabetes* 55, 290-296.

Bibliografia

- Tang, D. Q., Cao, L. Z., Burkhardt, B. R., Xia, C. Q., Litherland, S. A., Atkinson, M. A., and Yang, L. J. (2004). In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes* 53, 1721-1732.
- Taniwaki, T., Becerra, S. P., Chader, G. J., and Schwartz, J. P. (1995). Pigment epithelium-derived factor is a survival factor for cerebellar granule cells in culture. *J Neurochem* 64, 2509-2517.
- Tartare-Deckert, S., Chavey, C., Monthouel, M. N., Gautier, N., and Van Obberghen, E. (2001). The matricellular protein SPARC/osteonectin as a newly identified factor up-regulated in obesity. *J Biol Chem* 276, 22231-22237.
- Tei, E., Mehta, S., Tulachan, S. S., Yew, H., Hembree, M., Preuett, B., Snyder, C. L., Yamataka, A., Miyano, T., and Gittes, G. K. (2005). Synergistic endocrine induction by GLP-1 and TGF-beta in the developing pancreas. *Pancreas* 31, 138-141.
- Thiery, J. P., Brackenbury, R., Rutishauser, U., and Edelman, G. M. (1977). Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina. *J Biol Chem* 252, 6841-6845.
- Thomas, R. J., Bhandari, R., Barrett, D. A., Bennett, A. J., Fry, J. R., Powe, D., Thomson, B. J., and Shakesheff, K. M. (2005). The effect of three-dimensional co-culture of hepatocytes and hepatic stellate cells on key hepatocyte functions in vitro. *Cells Tissues Organs* 181, 67-79.
- Tombran-Tink, J., Chader, G. G., and Johnson, L. V. (1991). PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res* 53, 411-414.
- Tombran-Tink, J., and Johnson, L. V. (1989). Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30, 1700-1707.
- Tombran-Tink, J., Mazuruk, K., Rodriguez, I. R., Chung, D., Linker, T., Englander, E., and Chader, G. J. (1996). Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. *Mol Vis* 2, 11.
- Tosh, D., and Slack, J. M. (2002). How cells change their phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 187-194.
- Treutelaar, M. K., Skidmore, J. M., Dias-Leme, C. L., Hara, M., Zhang, L., Simeone, D., Martin, D. M., and Burant, C. F. (2003). Nestin-lineage cells contribute to the microvasculature but not endocrine cells of the islet. *Diabetes* 52, 2503-2512.
- Tsai, R. Y., Kittappa, R., and McKay, R. D. (2002). Plasticity, niches, and the use of stem cells. *Dev Cell* 2, 707-712.
- Tyrberg, B., Eizirik, D. L., Hellerstrom, C., Pipeleers, D. G., and Andersson, A. (1996). Human pancreatic beta-cell deoxyribonucleic acid-synthesis in islet grafts decreases with increasing organ donor age but increases in response to glucose stimulation in vitro. *Endocrinology* 137, 5694-5699.
- Unanue, E. R. (2007). Ito cells, stellate cells, and myofibroblasts: new actors in antigen presentation. *Immunity* 26, 9-10.
- Vaca, P., Berna, G., Martin, F., and Soria, B. (2003). Nicotinamide induces both proliferation and differentiation of embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Transplant Proc* 35, 2021-2023.
- Vaca, P., Martin, F., Vegara-Meseguer, J. M., Rovira, J. M., Berna, G., and Soria, B. (2006). Induction of differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells by fetal soluble factors. *Stem Cells* 24, 258-265.

- Vinas, O., Bataller, R., Sancho-Bru, P., Gines, P., Berenguer, C., Enrich, C., Nicolas, J. M., Ercilla, G., Gallart, T., Vives, J., *et al.* (2003). Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* 38, 919-929.
- Wagers, A. J., and Weissman, I. L. (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116, 639-648.
- Wake, K. (1971). "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat* 132, 429-462.
- Walmod, P. S., Kolkova, K., Berezin, V., and Bock, E. (2004). Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem Res* 29, 2015-2035.
- Wang, M., and Drucker, D. J. (1995). The LIM domain homeobox gene *isl-1* is a positive regulator of islet cell-specific proglucagon gene transcription. *J Biol Chem* 270, 12646-12652.
- Wang, P., Mariman, E., Keijer, J., Bouwman, F., Noben, J. P., Robben, J., and Renes, J. (2004). Profiling of the secreted proteins during 3T3-L1 adipocyte differentiation leads to the identification of novel adipokines. *Cell Mol Life Sci* 61, 2405-2417.
- Watari, N., Hotta, Y., and Mabuchi, Y. (1982). Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. *Okajimas Folia Anat Jpn* 58, 837-858.
- Weissman, I. L., Anderson, D. J., and Gage, F. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 387-403.
- Whetton, A. D., and Graham, G. J. (1999). Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biol* 9, 233-238.
- Wiercinska, E., Wickert, L., Denecke, B., Said, H. M., Hamzavi, J., Gressner, A. M., Thorikay, M., ten Dijke, P., Mertens, P. R., Breitkopf, K., and Dooley, S. (2006). Id1 is a critical mediator in TGF-beta-induced transdifferentiation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 43, 1032-1041.
- Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Blyszczuk, P., Tarasov, K. V., Tarasova, Y., Wersto, R. P., Boheler, K. R., and Wobus, A. M. (2004). Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 61, 2510-2522.
- Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Gough, N. M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-687.
- Winau, F., Hegasy, G., Weiskirchen, R., Weber, S., Cassan, C., Sieling, P. A., Modlin, R. L., Liblau, R. S., Gressner, A. M., and Kaufmann, S. H. (2007). Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* 26, 117-129.
- Wodarz, A., and Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 59-88.
- Wollheim, C.B., Maechler, P. (2004). β cell biology of insulin secretion. Chapter 7. *International Textbook of Diabetes Mellitus 1*, 125-138. 3rd edition. Ed John Wiley & Sons Ltd.
- Wright, L. S., Li, J., Caldwell, M. A., Wallace, K., Johnson, J. A., and Svendsen, C. N. (2003). Gene expression in human neural stem cells: effects of leukemia inhibitory factor. *J Neurochem* 86, 179-195.

Bibliografia

- Xu, G., Stoffers, D. A., Habener, J. F., and Bonner-Weir, S. (1999). Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48, 2270-2276.
- Yatoh, S., Dodge, R., Akashi, T., Omer, A., Sharma, A., Weir, G. C., and Bonner-Weir, S. (2007). Differentiation of affinity-purified human pancreatic duct cells to {beta}-cells. *Diabetes*.
- Yew, K. H., Hembree, M., Prasad, K., Preuett, B., McFall, C., Benjes, C., Crowley, A., Sharp, S., Tulachan, S., Mehta, S., *et al.* (2005). Cross-talk between bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta signaling is essential for exendin-4-induced insulin-positive differentiation of AR42J cells. *J Biol Chem* 280, 32209-32217.
- Yew, K. H., Prasad, K. L., Preuett, B. L., Hembree, M. J., McFall, C. R., Benjes, C. L., Crowley, A. R., Sharp, S. L., Li, Z., Tulachan, S. S., *et al.* (2004). Interplay of glucagon-like peptide-1 and transforming growth factor-beta signaling in insulin-positive differentiation of AR42J cells. *Diabetes* 53, 2824-2835.
- Yue, F., Cui, L., Johkura, K., Ogiwara, N., and Sasaki, K. (2006). Glucagon-like peptide-1 differentiation of primate embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Tissue Eng* 12, 2105-2116.
- Zaret, K. S. (2006). Pancreatic beta cells: responding to the matrix. *Cell Metab* 3, 148-150.
- Zhang, Y. Q., Kanzaki, M., Furukawa, M., Shibata, H., Ozeki, M., and Kojima, I. (1999). Involvement of Smad proteins in the differentiation of pancreatic AR42J cells induced by activin A. *Diabetologia* 42, 719-727.
- Zhang, Y. Q., and Sarvetnick, N. (2003). Development of cell markers for the identification and expansion of islet progenitor cells. *Diabetes Metab Res Rev* 19, 363-374.
- Zhao, L., and Burt, A. D. (2007). The diffuse stellate cell system. *J Mol Histol* 38, 53-64.
- Zhou, S., Schuetz, J. D., Bunting, K. D., Colapietro, A. M., Sampath, J., Morris, J. J., Lagutina, I., Grosveld, G. C., Osawa, M., Nakauchi, H., and Sorrentino, B. P. (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 7, 1028-1034.
- Zhu, C., Ying, D., Zhou, D., Mi, J., Zhang, W., Chang, Q., and Li, L. (2005). Expression of TGF-beta1 in smooth muscle cells regulates endothelial progenitor cells migration and differentiation. *J Surg Res* 125, 151-156.
- Zimmermann, A., Gloor, B., Kappeler, A., Uhl, W., Friess, H., and Buchler, M. W. (2002). Pancreatic stellate cells contribute to regeneration early after acute necrotising pancreatitis in humans. *Gut* 51, 574-578.
- Zimmet, P., Alberti, K. G., and Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-787.
- Zulewski, H., Abraham, E. J., Gerlach, M. J., Daniel, P. B., Moritz, W., Muller, B., Vallejo, M., Thomas, M. K., and Habener, J. F. (2001). Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 50, 521-533.
- Zvonic, S., Lefevre, M., Kilroy, G., Floyd, Z. E., DeLany, J. P., Kheterpal, I., Gravois, A., Dow, R., White, A., Wu, X., and Gimble, J. M. (2007). Secretome of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation of serpins by adipogenesis. *Mol Cell Proteomics* 6, 18-28.

IX.- PUBLICACIONES
ORIGINADES
DURANT LA TESI

PUBLICACIONES ORIGINADES DURANT LA TESI

Comunicacions en congressos nacionals i internacionals

XVII Congrés de la Societat Espanyola de Diabetis SED. Valencia, 2004. **Póster-discussió** "Nuevo método de selección de células madre adultas en páncreas de rata". Lucas M, Petriz J, Martínez V, Gomis R, Nadal M, Novials A, Mato E.

XVIII Congrés de la Societat Espanyola de Diabetis SED. Madrid, 2006. **Póster-discussió** "Efecto de las células estrelladas pancreáticas sobre la proliferación y diferenciación en el modelo celular ductal (ARIP)" Lucas M, Mato E, Conget I, Novials A, Gomis R. **Comunicació oral** "¿Tiene la población ABCG2(+) obtenida de páncreas de rata la plasticidad de diferenciarse hacia un fenotipo endocrino? Mato E, Lucas M, Conget I, Gomis R, Novials A.

43rd Annual Meeting of the EASD (European Association for the Study of Diabetes). Amsterdam, 2007. **Comunicació oral** "Proteomic approach to identify novel soluble factors secreted by pancreatic stellate cells with paracrine effects on ARIP ductal cell model" M Lucas, E Mato, S Barceló, A. Novials, R. Gomis.

Articles

"Identification of pancreatic stellate cell (ABCG2 +) population with properties of progenitor cells: new role for stellate cells in pancreas" E Mato*, M Lucas*, J Petriz, R Gomis, A Novials (* These two authors contributed equally to this study). Article pendent de sotmetre a la revista Biochemical Journal

"Characterization of pancreatic stellate cells secretome with paracrine effects on ARIP ductal cells" M Lucas, E Mato, S Barceló, A Novials, R Gomis. Manuscrit en preparació.