



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

CIBA-IPN TLAXCALA

**DIFERENCIACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
ESPECTROSCÓPICA DE CÉLULAS MADRE
EMBRIONARIAS DE RATÓN A CÉLULAS
PANCREÁTICAS**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:
M. en C. Gustavo Jesús Vázquez Zapién**

DIRECTORES DE TESIS:

**Dr. Marlon Rojas López
Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara**

Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala; Abril, 2017.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizabal siendo las 12:00 horas del día 6 del mes de abril del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA Tlaxcala para examinar la tesis titulada:

Diferenciación y caracterización espectroscópica de células madre embrionarias de ratón a células pancreáticas

Presentada por el alumno (a):

VÁZQUEZ

Apellido paterno

ZAPIÉN

Apellido materno

GUSTAVO JESÚS

Nombre(s)

Con registro:

A	1	4	0	8	8	4
----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Marlon Rojas López

Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara

Dr. Raúl J. Delgado Macuil

Dra. Virginia Sánchez Monroy

Dr. Miguel Ángel Villalobos López

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. María Myrna Solís Oba



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada
Unidad Tlaxcala
Dirección



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **Tepetitla de Lardizabal** el día **4** del mes **Abril** del año **2017**, el (la) que suscribe **Gustavo Jesús Vázquez Zapién** alumno (a) del Programa de **Doctorado en Ciencias en Biotecnología** con número de registro **A140884**, adscrito a **Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada**, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Marlon Rojas López** y cede los derechos del trabajo titulado **Diferenciación y caracterización espectroscópica de células madre embrionarias de ratón a células pancreáticas**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **gus1202@hotmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Gustavo Jesús Vázquez Zapién

Nombre y firma

NOTAS DE AGRADECIMIENTO Y DEDICATORIAS

Agradezco a Dios por mantenerme en el camino de la ciencia y permitirme desarrollarme en lo humano y en lo profesional.

Gracias a Mony, mi todo, mi corazón, mi esposa, mi colaboradora, mi socia, mi compañera, que siempre está en todo momento sin importar las circunstancias.

Gracias a nuestras Instituciones, la Secretaría de la Defensa Nacional y el Instituto Politécnico Nacional, a través de sus Mandos, Directivos, Profesores, Administrativos, que se preocupan por la superación personal y la preparación de la sociedad para una mejor Nación. Gracias a la Escuela Médico Militar, que nos ha hecho sus hijos y producto de sus 100 años de historia que celebramos en este año.

Gracias a nuestros Maestros y Mentores, que nos orientan y enseñan no solo en lo técnico, sino también en lo humano. A los Doctores Guillermo, Marlon, Raúl, César, Irasema, Vianney, por su confianza y amistad, especialmente a la Dra. y maestra Vicky que nos ha enseñado y orientado para nuestro desarrollo personal y profesional.

Gracias a nuestros compañeros en el laboratorio y alumnos, Adri, Laurita, Norma, Carlita, y muchos más por ser parte de esto.

Y gracias indudablemente a las familias, que siempre están con nosotros, nos alientan, no orientan, nos calman, nos aman e interceden por nosotros, especialmente a Alberto,

Ana María, Juan y Constantina.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
LISTA DE ABREVIATURAS.....	2
LISTA DE FIGURAS.....	4
LISTA DE TABLAS.....	6
LISTA DE GRÁFICAS.....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	10
<u>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.</u>	
A. MARCO TEÓRICO Y DE REFERENCIA.....	12
B. JUSTIFICACIÓN.....	38
C. OBJETIVOS	39
a. General	39
b. Específicos	40
<u>CAPÍTULO II. PLAN DE LA INVESTIGACIÓN.</u>	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
<u>CAPÍTULO III. RESULTADOS.</u>	67
<u>CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN.</u>	95
<u>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.</u>	109
<u>CAPÍTULO VI. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.</u>	111
<u>ANEXOS.</u>	112
<u>BIBLIOGRAFÍA.</u>	129

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN DE LA ABREVIATURA
ACP	Análisis de componentes principales
ADA	Asociación americana de Diabetes del inglés American Diabetes Association.
ATCC	Colección de cultivos celulares americanos del inglés American Type Culture Collection.
ATR	Reflectancia total atenuada del inglés attenuated total reflection.
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico del inglés basic fibroblast growth factor.
C_T	Ciclo umbral del inglés threshold cycle.
DT1	Diabetes tipo 1.
DT2	Diabetes tipo 2.
DMEM	Medio eagle modificado por Dulbecco del inglés Dulbecco's modified Eagle medium.
EBs	Cuerpos embrionarios del inglés embryonic bodies.
ESC	Células madre embrionarias del inglés embryonic stem cells.
FBS	Suero fetal bovino del inglés fetal bovine serum.
FCS	Suero fetal de ternera del inglés fetal calf serum.
FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos purificados recombinante humano.
FTIR	Infrarrojo por transformada de Fourier del inglés Fourier Transform Infrared.
GLP-1	Péptido similar al glucagón del inglés glucagon like peptide 1.
HE	Hematoxilina-Eosina (tinción).
hECC	Células del carcinoma embrionario del inglés human embryonic carcinoma cells.
hESC	Células madre embrionarias humanas del inglés human embryonic stem cells.
HSC	Células madre hematopoyéticas del inglés hematopoietic stem cells

HNF3 β	Factor de necrosis humoral 3 β del inglés humoral necrotic factor.
ICM	Masa celular interna del inglés inner cell mass.
IMDM	Medio Dulbecco modificado por Iscove del inglés Iscove's modified Dulbecco's médium.
iPSC	Células madre pluripotenciales inducidas del inglés induced pluripotency stem cells.
LIF	Factor inhibidor de leucemia del inglés leukemia inhibitory factor.
MAPC	Células progenitoras multipotenciales adultas.
MEFs	Fibroblastos embrionarios de ratón del inglés mouse embryonic fibroblasts.
MTG	Monotioglicerol.
MSC	Células madre mesenquimatosas del inglés mesenchymal stem cells.
mESC	Células madre embrionarias de ratón del inglés mouse embryonic stem cells.
NOM	Norma Oficial Mexicana.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PBS	Solución buffer fosfatada del inglés phosfated buffer solution.
PP	Polipéptido pancreático.
SR	Suero de reemplazo del inglés knockout serum replacement.
STO	S, SIM; T, 6-resistente a la tioguanina; O, resistente a la ouabaina.
STZ	Estreptozotocina
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante β 1 del inglés transforming growth factor.
TiO₂ NPs	Nanopartículas de dióxido de titanio
VIP	Péptido intestinal vasoactivo.

LISTA DE FIGURAS

No.	TÍTULO DE LA FIGURA
FIGURA 1	Tejido exócrino del páncreas.
FIGURA 2	Tejido endócrino del páncreas.
FIGURA 3	Células diferenciadas productoras de insulina y glucagón.
FIGURA 4	Estrategia experimental.
FIGURA 5	Protocolo de diferenciación de mESC a CPD.
FIGURA 6	Extracción quirúrgica de páncreas de ratón.
FIGURA 7	Titulación de los anticuerpos primarios.
FIGURA 8	Titulación de los anticuerpos secundarios.
FIGURA 9	Fibroblastos embrionarios de ratón.
FIGURA 10	Cultivo de mESC.
FIGURA 11	Diferenciación de mESC a CPD, 200X.
FIGURA 12	Diferenciación de mESC a CPD, 100X.
FIGURA 13	Integridad del RNA obtenido.
FIGURA 14	Curvas de disociación de las concentraciones ideales de los oligonucleótidos diseñados.
FIGURA 15	Productos de PCR de los genes estudiados.
FIGURA 16	Validación de los oligonucleótidos diseñados.
FIGURA 17	Ausencia de autofluorescencia en mESC.
FIGURA 18	Inmunodetección de pluripotencia en mESC.
FIGURA 19	Ausencia de autofluorescencia en tejido pancreático.
FIGURA 20	Inmunodetección de insulina y glucagón en tejido pancreático.
FIGURA 21	Ausencia de inmunodetección de insulina y glucagón en mESC.
FIGURA 22	Inmunodetección de insulina y glucagón en CPD.
FIGURA 23	Ausencia de pluripotencialidad en CPD.
FIGURA 24	Análisis vibracional FTIR durante el proceso de diferenciación de mESC a CPD.
FIGURA 25	Análisis de los espectros vibracionales FTIR en las regiones de proteínas durante el proceso de diferenciación de mESC a CPD.

- FIGURA 26** Análisis de los espectros vibracionales FTIR en la región de ácidos nucleicos durante el proceso de diferenciación de mESC a CPD.
- FIGURA 27** Gráficas de puntuación del análisis de componentes principales en mESC y CPD.
- FIGURA 28** Diagrama de caja de la prueba t pareada del análisis bioquímico de 6 elementos en el modelo diabético murino

LISTA DE TABLAS

No.	TÍTULO DE LA TABLA
TABLA 1	Oligonucleótidos diseñados.
TABLA 2	Resumen de los valores de expresión relativa en diferentes tiempos de diferenciación.
TABLA 3	Concentraciones adecuadas posterior a la titulación de los anticuerpos.
TABLA 4	Parámetros bioquímicos séricos normales de ratón NIH.
TABLA 5	Estandarización de la dosis diabetogénica con STZ vía intraperitoneal en ratones NIH
TABLA 6	Comparativo de la química clínica de 6 elementos antes y después de la administración intraperitoneal de STZ en ratones NIH.

LISTA DE GRÁFICAS

No.	TÍTULO DE LA GRÁFICA
GRÁFICA 1	Expresión relativa del gen <i>Nanog</i> .
GRÁFICA 2	Expresión relativa del gen <i>SOX2</i> .
GRÁFICA 3	Expresión relativa del gen <i>SOX17</i> .
GRÁFICA 4	Expresión relativa del gen <i>Pdx1</i> .
GRÁFICA 5	Expresión relativa del gen <i>Ins-1</i> .
GRÁFICA 6	Expresión relativa del gen <i>Ins-2</i> .
GRÁFICA 7	Expresión relativa del gen <i>gcg</i> .
GRÁFICA 8	Resumen de la expresión relativa de los genes analizados.

RESUMEN

Una necesidad fundamental en la medicina contemporánea, es encontrar una fuente renovable de células para reemplazar células enfermas y tejidos dañados. El valor de las células madre embrionarias (ESC) para la medicina regenerativa se basa en su capacidad de autorenovación y pluripotencia.

La Diabetes al igual que otras enfermedades crónico degenerativas, es un padecimiento común en muchas partes del mundo con serias complicaciones. Es por esto, que las células pancreáticas diferenciadas (CPD) a partir de células madre, pueden representar una nueva alternativa terapéutica y una fuente de reemplazo de células β , pero es indispensable su caracterización mediante diferentes perfiles antes de considerarlas para terapia celular.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar molecular, fenotípica y espectroscópicamente el proceso de diferenciación de células madre embrionarias de ratón a células pancreáticas.

Para esto, primeramente, se caracterizaron ESC de ratón (mESC) morfológica, genética, fenotípica y espectroscópicamente. Enseguida se sometieron a un protocolo de diferenciación de 21 días para obtener CPD productoras de insulina y glucagón, analizando dicho proceso mediante expresión genética de endodermo y células pancreáticas, espectroscopia vibracional infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), caracterización morfológica y determinación de la expresión de insulina y glucagón mediante microscopía de fluorescencia; después, se realizó el análisis multivariado de componentes principales en las mESC y en las CPD a partir de los espectros vibracionales. Finalmente, se implementó un modelo murino con Diabetes empleando

estreptozotocina (STZ), el cual servirá para futuros trabajos experimentales con terapia celular.

Las mESC cultivadas expresaron genes y proteínas de pluripotencia (*Nanog* y *SOX2*).

Las CPD expresaron genes endodérmicos (*SOX17* y *Pdx1*) al día 11, un gen inductor del desarrollo del páncreas embrionario (*Pdx1*) al día 17 y genes y proteínas pancreáticas

(*Insulina* y *Glucagón*) al día 21 de diferenciación. Asimismo, se obtuvieron espectros FTIR de mESC y DPC en diferentes etapas de maduración (11, 17 y 21 días) que mostraron

bandas de absorción relacionadas con diferentes biomoléculas. Estos espectros FTIR exhibieron cambios espectrales significativos de acuerdo con el proceso de diferenciación, particularmente en bandas de proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos.

El análisis de componentes principales (ACP) permitió caracterizar y discriminar ESC y CPD en sus diferentes etapas de diferenciación en las regiones espectrales analizadas.

Así mismo, se estandarizó un modelo diabético murino en ratones NIH, administrando dosis única de 175 mg/kg de STZ vía intraperitoneal, obteniendo glucemias promedio de

762 mg/dl, con una eficiencia del 100% y sin letalidad en los primeros 10 días.

De los resultados obtenidos se puede concluir que se obtuvieron CPD a partir de mESC, las cuales, de acuerdo a los análisis genético y fenotípico, cursaron las etapas

cronológicas del desarrollo pancreático embrionario. Los cambios espectrales infrarrojos proporcionan un nuevo parámetro biofísico basado en marcadores moleculares que

indican el proceso de diferenciación de mESC a células pancreáticas. Los resultados infieren viabilidad técnica para proponer la espectroscopia FTIR y su ACP como técnicas

no invasivas, rápidas y eficientes para caracterizar un proceso de diferenciación celular.

ABSTRACT

A fundamental need in contemporary medicine is to find a renewable source of cells to replace diseased cells and damaged tissues. The value of embryonic stem cells (ESC) for regenerative medicine is based on their capacity for self-renewal and pluripotency.

Diabetes, like other degenerative chronic diseases, is a common condition in many parts of the world with serious complications. It is for this reason that differentiated pancreatic cells (DPC) from stem cells may represent a new therapeutic alternative and a source of β -cell replacement, but its characterization through different profiles is indispensable before considering them for cell therapy.

The objective of the present work was to characterize molecular, phenotypic and spectroscopically the differentiation process of mouse embryonic stem cells to pancreatic cells.

For this, firstly, mouse ESC (mESC) were characterized morphological, genetic, phenotypic, and spectroscopically. They were then subjected to a 21-day differentiation protocol to obtain DPC producing insulin and glucagon, analyzing the process by gene expression of endoderm and pancreatic cells, Fourier transform infrared (FTIR) vibrational spectroscopy, morphological characterization and expression determination of insulin and glucagon by fluorescence microscopy; Then, the multivariate analysis of principal components was performed on mESC and DPC from the vibrational spectra. Finally, a murine model with Diabetes using streptozotocin (STZ) was implemented, which will be utilized for future experimental work with cell therapy.

Cultured mESC expressed pluripotency genes and proteins (Nanog and SOX2). The DPC expressed endodermal genes (*SOX17* and *Pdx1*) at day 11, an inductor gene of the

embryonic pancreas development (*Pdx1*) at day 17, and pancreatic genes and proteins (Insulin and Glucagon) at day 21 of differentiation. Also, FTIR spectra of mESC and DPC were obtained in different maturation stages (11, 17 and 21 days) showing absorption bands related to different biomolecules. These FTIR spectra exhibited significant spectral changes according to the differentiation process, particularly in protein, carbohydrate, and nucleic acid bands. The principal component analysis (PCA) allowed to characterize and discriminate ESC and DPC in their different stages of differentiation in the spectral regions analyzed. Also, a murine diabetic model was standardized in NIH mice, administering a single dose of 175 mg/kg STZ intraperitoneally, obtaining average glycemic levels of 762 mg/dl, with an efficiency of 100% and without lethality in the first ten days.

From the obtained results, we can conclude that DPC were obtained from mESC, which, according to the genetic and phenotypic analysis, passed the successive stages of the embryonic pancreatic development. Infrared spectral changes provide a new biophysical parameter based on molecular markers that indicate the differentiation process of mESC into pancreatic cells. The results infer technical feasibility to propose FTIR spectroscopy and its PCA as non-invasive, fast and efficient techniques to characterize a process of cellular differentiation.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

A. MARCO TEÓRICO Y DE REFERENCIA.

Generalidades sobre Células Madre.

Una necesidad fundamental en la medicina contemporánea, es encontrar una fuente renovable de células para reemplazar células enfermas y tejidos dañados¹.

Las células madre (SC) están siendo un gran paso a una nueva era en la medicina. Sin embargo, la ciencia aún se ha visto superada por diferentes ámbitos a la hora de decidir el lugar y el momento en que esta nueva alternativa se haga realidad.

El trasplante de SC representa una herramienta para la regeneración de tejidos enfermos, dañados o defectuosos. Las células madre hematopoyéticas (HSC) ya se han utilizado para restaurar células hematopoyéticas desde hace más de 50 años. Los rápidos adelantos en la investigación con SC, han planteado la posibilidad de usar otros tipos de SC para el reemplazo celular y tisular².

Las SC son células inmaduras, autorrenovables y capaces de generar uno o más tipos de células diferenciadas. En condiciones adecuadas, estas células pueden dividirse indefinidamente conservando siempre una población estable de SC, que bajo las condiciones apropiadas y recibiendo los estímulos adecuados, pueden diferenciarse hacia células especializadas de un organismo adulto³.

Desde que se obtuvieron los primeros cultivos de células madre embrionarias de ratón (mESC) derivadas de blastocistos en 1981 por Evans y Kaufman, se sentaron las bases

para el desarrollo de las metodologías necesarias que conducirían más tarde a generar ESC humanas (hESC), con características similares a las del ratón⁴.

En noviembre de 1998, el grupo estadounidense liderado por el Dr. James Thomson publicó los datos sobre la derivación de las primeras líneas de hESC a partir de un blastocisto en fase de preimplantación, abriendo una puerta para la curación de enfermedades hasta ahora incurables, además de descubrir una herramienta biológica para llevar a cabo investigación básica⁵.

Este grupo consiguió 5 líneas de hESC a partir de 14 blastocistos mediante la técnica de inmunocirugía utilizando un cultivo sobre fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs). Todas las líneas de hESC fueron caracterizadas mediante métodos fenotípicos y genotípicos en estudios funcionales *in vitro* e *in vivo*⁵.

Clasificación de las células madre.

Las SC se dividen de manera general en células adultas o somáticas y células madre embrionarias⁶.

Si estas células se clasifican según su descendencia y potencialidad de desarrollo, es posible reconocer cuatro niveles de células madre: totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes².

A continuación, se describen estos cuatro niveles de clasificación de las SC:

1. Células madre totipotentes.

La célula madre por excelencia que ocupa el primer nivel, corresponde al óvulo fecundado o cigoto, el cual es totipotente ya que puede generar todas las células que darán lugar al organismo adulto, incluidas las células somáticas, germinales y extraembrionarias⁷.

2. Células madre pluripotentes.

Corresponden principalmente a las células madre embrionarias (ESC), en las que se enfoca este proyecto de investigación.

Estas células derivan de la masa celular interna (ICM) de un embrión en estado de blastocisto, dependiendo de la especie, de 4 a 7 días después de la fecundación⁸.

Esta estructura particular surge como resultado de una serie de divisiones sucesivas de las células blastómeras, las cuales se especializan para conformar una estructura hueca constituida por una capa externa de células denominada trofoectodermo, e interiormente por células en forma de racimo (ICM)⁸.

La capa externa de células continúa su desarrollo para formar la placenta y otros tejidos necesarios para la implantación y posterior desarrollo fetal del embrión en el útero, mientras que las células internas se desarrollan y especializan en los tejidos de las diferentes capas germinales del embrión, que son endodermo, mesodermo y ectodermo, formando así todos los tejidos de un organismo⁸.

Las ESC son denominadas entonces pluripotentes, ya que pueden generar todos los tipos celulares del cuerpo, pero no pueden dar origen a las células del tejido extraembrionario. De esta forma, los embriones preimplantacionales constituían el material de partida de elección para el aislamiento de ESC, convirtiéndose en el principal foco de controversia para la aplicación de esta tecnología en humanos, ya que para su derivación era necesaria la obtención del embrión.

En las últimas décadas se describieron técnicas que permiten la extracción de una célula madre embrionaria única sin la destrucción del embrión, similar a la técnica utilizada en la preimplantación para el diagnóstico genético⁹.

A partir del aislamiento de las primeras líneas de mESC por Evans y Kaufman en 1981⁴, este tipo de células han sido investigadas intensamente ya que poseen tres características que las hacen únicas en relación a otras SC específicas de órganos identificadas hasta la fecha, las cuales son las siguientes:

- i. Capacidad de autorenovación *in vitro*, es decir, pueden mantenerse en cultivo luego de numerosos pases y durante períodos prolongados como una población homogénea de células indiferenciadas, conservando un cariotipo normal.
- ii. Pluripotencialidad, pudiendo originar bajo estímulos adecuados, casi todas las células de un individuo. Esta capacidad quedó en evidencia cuando Bradley y col. en 1984 inyectaron mESC en blastocistos en desarrollo, observando más tarde la contribución de estas células a todos los tejidos de los ratones quimeras adultos generados, incluyendo la línea germinal¹⁰.
- iii. Inmunogenicidad baja en comparación con SC adultas alogénicas, debido a la baja expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad I (MHC-I) y falta de expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad II (MHC-II), aunque se ha

probado en un modelo murino que aún niveles bajos de MHC-I puede desencadenar una respuesta citotóxica¹¹.

3. Células madre multipotentes.

Las SC adultas son consideradas células multipotentes, ya que poseen una capacidad limitada para diferenciarse dando origen sólo a las células de un órgano concreto en el embrión y/o en el adulto. El ejemplo clásico de estas células, son las SC mesenquimales de la médula ósea (MSC), las cuales pueden generar tipos celulares de la sangre y del sistema inmune¹².

Otro ejemplo de MSC son las células de placenta y cordón umbilical, que se extraen al momento del parto, las cuales se criopreservan por tiempo indefinido para futuros tratamientos de enfermedades, sobre todo de tipo hematológico como leucemias, anemias y linfomas.

4. Células madre unipotentes.

Son células con limitada capacidad proliferativa y pueden originar solamente células terminales. Algunos ejemplos de estas células son las células progenitoras eritroides o las células progenitoras neuronales, las cuales se diferencian exclusivamente en eritrocitos y neuronas, respectivamente.

5. Células madre pluripotentes inducidas (iPSC).

Recientemente se describió una nueva técnica que permite la generación de células madre pluripotentes sin utilizar ESC. Esencialmente se descubrió, que algunas células adultas pueden ser tratadas con procesos de modificación genética introduciendo factores genéticos definidos. Por

ejemplo, en el 2006 en la universidad de Kyoto, Japón, el Dr. Shinya Yamanaka y cols. reprogramaron células somáticas o adultas al insertar cuatro genes de pluripotencia, produciendo células madre pluripotentes inducidas (iPSC)^{13, 14}.

Con estos procedimientos de reprogramación celular y generación de iPSC, se pretende suplir a las ESC por su potencial de diferenciación pluripotente¹⁵.

Características esenciales de las ESC.

Las características esenciales que permiten que una célula se defina como célula madre embrionaria pluripotente se pueden reducir a las siguientes¹⁶.

1. Se derivan de células pluripotentes de la ICM del blastocisto.
2. Son células diploides estables y poseen un cariotipo normal cuando se cultivan *in vitro*.
3. Su variante transformada se conoce como células de carcinoma embrionario (hECC).
4. Se pueden propagar de forma indefinida en estado embrionario indiferenciado y por lo tanto son capaces de experimentar un número teóricamente ilimitado de divisiones mitóticas simétricas sin diferenciarse.
5. Se pueden diferenciar de forma espontánea para dar lugar a múltiples células que representan las tres capas germinales embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo).

6. Se pueden diferenciar al ser trasplantadas tanto en un embrión temprano como en uno tardío, es decir, capaces de integrarse en todos los tejidos fetales durante el desarrollo. En otro sentido son capaces de generar quimeras, las cuales solo son aprobadas éticamente con mESC.
7. Se pueden diferenciar *in vitro* de forma dirigida en las condiciones apropiadas.

Aunque todos estos requisitos son necesarios para definir con precisión el carácter pluripotente de una ESC, los elementos esenciales se pueden reducir a dos: que las ESC se puedan cultivar *in vitro* y que se puedan expandir de forma indefinida manteniendo el carácter indiferenciado de las células de las que originalmente se derivaron.

Marcadores característicos de las ESC.

Aunque no parece que existe duda de que las ESC aisladas de blastocistos tengan capacidad pluripotente, la cuestión importante está en saber si también las líneas celulares que crecen permanentemente en cultivo retienen sus características iniciales. La presencia o ausencia de marcadores específicos, indica si las ESC en cultivo permanecen o no en el estado indiferenciado.

Un gran número de marcadores de superficie están siendo utilizados actualmente para caracterizar ESC, incluyendo varios glucolípidos y glucoproteínas que fueron identificados originalmente en hECC o en embriones en estado preimplantacional¹⁷.

Según la Iniciativa Internacional de SC, las ESC deben poseer una expresión similar de marcadores característicos de su capacidad de autorenovación y pluripotencia. Estos marcadores de superficie deben expresar los antígenos SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA1-81, GCMT2 y GCT343. Además, deben expresar una serie de genes asociados al

mantenimiento de la pluripotencia: NANOG, POU5F1 (OCT-3/4) y otros 14 genes cuya expresión está asociada a NANOG¹⁸.

Además, esta Iniciativa Internacional propone que las ESC sean capaces de dar lugar a la formación de teratomas cuando se inyectan en ratones inmunodeficientes para demostrar su capacidad en las tres líneas germinales *in vivo*¹⁸.

Sistemas actuales de cultivo de ESC.

Originalmente las ESC fueron derivadas en un medio que contenía suero utilizando una monocapa de MEFs que secretaba factores esenciales para el mantenimiento del estado de indiferenciación.⁵ Sin embargo, este suero era una mezcla compleja de proteínas de composición desconocida, donde el 99% era albúmina¹⁹.

Sería deseable solucionar ese problema mediante el uso de un sistema de cultivo sin células alimentadoras y utilizando medios de composición proteica conocida para minimizar la variabilidad en las condiciones de cultivo que afectan al crecimiento adecuado de las ESC. Además, desde un posible punto de vista terapéutico futuro, es importante que las hESC sean derivadas y mantenidas bajo condiciones libres de componentes xenobióticos²⁰.

El primer cultivo de hESC libre de fibroblastos se realizó utilizando medio condicionado por los factores secretados por MEFs y creciendo sobre un soporte de MatrigelTM o placas con laminina²¹. MatrigelTM es una mezcla compleja con origen en sarcoma murino que contiene proteínas de la matriz extracelular, mayoritariamente laminina, colágeno IV, proteoglicanos y entactina. El suero animal fue reemplazado por un nuevo medio más definido llamado suero de reemplazo (RS) que contiene componentes tales como la insulina, transferrina y albúmina bovina rica en lípidos²².

Todos estos hallazgos buscaban un aspecto importante que hay que tener en cuenta durante el cultivo de ESC. Se trataba que las células que se utilizaban como soporte de ESC pudieran producir factores que promovieran o prolongaran el mantenimiento de ESC. Un ejemplo de este hecho fue el mantenimiento de ESC utilizando una matriz de fibronectina y medio con suero de reemplazo, pero no condicionado por MEFs, además con factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF) y factor de crecimiento transformante- β 1²³.

Actualmente, se considera indispensable el suplemento de cualquier medio de cultivo para ESC con bFGF²⁴. Este estudio ha demostrado que la molécula del bFGF actúa sobre células accesorias que necesita la célula madre para vivir. Además, el bFGF actúa sobre la célula madre evitando que ésta se diferencie en alguno de los 200 tipos de células especializadas del organismo, lo que permite al investigador conservar en el laboratorio el material biológico en el estado adecuado y el tiempo necesario hasta destinarlo a futuras aplicaciones.

Las ESC han sido también mantenidas en estado indiferenciado utilizando medio no condicionado suplementado con altas concentraciones de bFGF, una combinación de *noggin*, un antagonista de la proteína morfogenética del hueso²⁵, o mediante una combinación de factor de crecimiento de queratinocitos, nicotinamida y activina A²⁶.

Recientemente, las ESC se han mantenido y diferenciado a células hematopoyéticas utilizando células del estroma derivadas a partir de nichos hematopoyéticos, lo que podría abrir unas buenas expectativas respecto a la derivación de ESC utilizando como soporte distintos tipos de MSC²⁷.

Aplicación y relevancia de las ESC.

Las ESC se postulan como una herramienta de enorme valor para la investigación básica dirigida hacia el rastreo de nuevos fármacos, así como un modelo para estudiar la etiología de las enfermedades que tienen su origen durante la etapa prenatal o, como fuente futura de células con potencial en terapia de reemplazo²⁸.

Cabe destacar que las hESC son la única alternativa para estudiar los mecanismos celulares y moleculares que definen la especificación tisular durante el desarrollo embrionario humano. Los estudios sobre ESC constituyen hoy en día uno de los temas más controvertidos en el campo de las ciencias biomédicas. Por una parte, han logrado motivar a la comunidad científica, y además, han trascendido hasta el ámbito social, convirtiéndose en un objeto de atención generalizada.

La aplicación de las ESC que ha recibido mayor atención en los últimos años es la terapia de reemplazo celular o medicina regenerativa, que permitiría el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades debilitantes, tales como Diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedad de Parkinson y enfermedades de las células sanguíneas²⁹. En este caso, lo que se busca es reemplazar células dañadas por células funcionales que restituyan la función normal de los tejidos u órganos de forma más eficiente que a través de terapias convencionales como son los trasplantes, las terapias farmacológicas y/o los tratamientos con proteínas recombinantes.

Actualmente existen muchas investigaciones enfocadas a descubrir células progenitoras como banco de células para usos terapéuticos como en el caso de la Diabetes, evaluándose varias estrategias que incluyen terapias celulares derivadas de células autólogas, de líneas celulares establecidas desde una variedad de SC incluyendo médula

ósea y cordón umbilical, ESC, así como células de tejidos y órganos de animales genéticamente modificados³⁰.

Diabetes.

De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA), la Diabetes es un grupo de trastornos metabólicos caracterizados por la hiperglucemia resultante de los defectos de la secreción o la acción de la insulina, o ambas³¹.

Existen muchos procesos fisiopatogénicos involucrados en su aparición, que varían desde la destrucción autoinmunitaria de las células β del páncreas hasta alteraciones que conducen a la resistencia a la acción de la insulina. La base de todas las alteraciones metabólicas es la acción deficiente de la insulina sobre los tejidos blanco³¹.

Entre las consecuencias agudas y potencialmente mortales de la Diabetes no controlada se encuentra la hiperglucemia con cetoacidosis o el síndrome hiperosmolar no cetósico.³¹

Entre las complicaciones a largo plazo se presentan la retinopatía, la neuropatía periférica y la neuropatía autonómica, que causa síntomas gastrointestinales, cardiovasculares y disfunción sexual, la insuficiencia renal, entre otros³¹.

La ADA considera que esta enfermedad podría estar presente, pero sin haber alcanzado el suficiente grado de desarrollo para causar hiperglucemia, distinguiendo la glucemia alterada en ayunas y la tolerancia alterada a la glucosa, que no alcanzan la categoría de Diabetes³¹.

El grado de hiperglucemia refleja la gravedad del proceso metabólico subyacente y su tratamiento, más que la naturaleza del proceso en sí mismo³¹.

Clasificación de la Diabetes.

Con fines de diagnóstico y tratamiento se emplea la siguiente clasificación³¹:

1. Diabetes Tipo 1 (DT1).
 - i. Mediada inmunitariamente.
 - ii. Idiopática.
2. Diabetes Tipo 2 (DT2).
3. Otros tipos específicos.
 - i. Defectos genéticos en la función de las células β .
 - ii. Defectos genéticos en la acción de la insulina.
 - iii. Enfermedades del páncreas exócrino.
 - iv. Endocrinopatías.
 - v. Inducida por drogas o fármacos.
 - vi. Infecciones.
 - vii. Formas raras de Diabetes mediadas por procesos inmunes.
 - viii. Otros síndromes genéticos ocasionalmente asociados con Diabetes.
4. Diabetes Gestacional.

La DT1 es el tipo de Diabetes donde existe destrucción de células β del páncreas generalmente con deficiencia absoluta de insulina. Los pacientes regularmente son delgados y suelen presentar comienzo abrupto de signos y síntomas con insulinopenia antes de los 30 años de edad³².

La DT2 es el tipo de Diabetes en el que se presenta resistencia periférica a la insulina y en forma concomitante deficiencia en su producción

absoluta o relativa. Los pacientes suelen ser mayores de 30 años cuando se hace el diagnóstico, son obesos y presentan relativamente pocos síntomas clásicos³².

La Diabetes gestacional, es la alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono que se detecta por primera vez durante el embarazo, traduciendo una insuficiente adaptación a la insulino-resistencia que se produce en la gestante³².

Epidemiología.

La epidemia de la Diabetes es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una amenaza mundial. Se calcula que en el mundo existen más de 180 millones de personas con Diabetes y es probable que la cifra aumente a más del doble para el 2030³².

Algunos factores que contribuyen al aumento de la enfermedad son crecimiento de la población, envejecimiento, urbanización, aumento de la prevalencia de obesidad e inactividad física. Wild y cols. reportaron una prevalencia mundial de Diabetes del 2.8% en el año 2000 y visualizaron un 4.4% para el 2030³².

Entre 1995 y 2025 se ha estimado un incremento de 35% en la prevalencia, predominando el sexo femenino y siendo más frecuente en el grupo de edad de 45 a 64 años. En Latinoamérica y el Caribe la prevalencia global es de 5.7%, para el año 2025 se espera 8.1%. La prevalencia más alta se encuentra en Uruguay con 8.1%, pero el país latinoamericano con mayor incremento en la prevalencia es México (de 7.7% a 12.3%) y a nivel mundial es India³³.

La Diabetes es una enfermedad con muy alta prevalencia en nuestro país y es sin duda alguna el mayor reto que enfrenta el Sistema Nacional de Salud, siendo la primera causa de muerte y la principal causa de demanda de atención médica en consulta externa, situada dentro de las principales causas de hospitalización y la enfermedad que consume el mayor porcentaje del gasto de nuestras instituciones públicas (alrededor de 20%).³⁴

A nivel nacional, entre 2001 y 2005, la tasa estandarizada de mortalidad por esta causa pasó de 79.9 a 89.9 por 100,000 habitantes en mujeres y de 73.7 a 86.1 en hombres. A diferencia de los rezagos en salud, que afectan mayormente a los pobres (infecciones comunes, desnutrición, problemas reproductivos), la Diabetes se presenta por igual en toda la población, independientemente de su nivel socioeconómico³⁴.

Manejo terapéutico.

Según la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, el tratamiento de la Diabetes tiene como propósito aliviar los síntomas, mantener el control metabólico, prevenir las complicaciones agudas y crónicas, mejorar la calidad de vida y reducir la mortalidad por esta enfermedad y sus complicaciones³².

El tratamiento de la diabetes principalmente gira alrededor de fármacos hipoglucemiantes y terapia de reemplazo con insulina. El trasplante de los islotes pancreáticos es una alternativa, pero su uso está restringido a los órganos donados, el rechazo inmune y la necesidad de inmunosupresores de por vida³⁵.

Aunque el trasplante cadavérico de páncreas ha sido explorado, presenta desventajas y complicaciones tales como la dificultad de donadores compatibles y el rechazo inmune del páncreas trasplantado. Esto ha guiado a los investigadores a buscar alternativas de tratamiento para la Diabetes³⁵.

Es por eso que las células productoras de insulina generadas de células madre, pueden representar una nueva alternativa terapéutica y una fuente de reemplazo de células β . La habilidad de las células madre de varios orígenes para la diferenciación en células productoras de insulina, ha traído nuevas esperanzas terapéuticas³⁵.

Se han propuesto alternativas para la obtención de células β para sustituir la escasez de este linaje celular a partir de células madre embrionarias³⁶ o de células madre de tejido adulto como páncreas, hígado, sistema nervioso central, médula ósea, y adipocitos, así como también de las células madre mesenquimales³⁷.

En la última década se ha visto un progreso muy marcado basado en la terapia celular, tanto en la Diabetes tipo 1 como en la Diabetes tipo 2. Se han desarrollado protocolos sobre células madre embrionarias humanas que pueden inducirse para diferenciarse en células β funcionales³⁸.

Una célula β funcional ha sido generada *in vitro* a partir de células madre, por lo que el futuro apunta a la recreación de la configuración tridimensional apropiada lo cual favorecerá el contacto celular correcto y las interacciones de la matriz extracelular, así como las vías de señalización activadas a través de numerosos tipos celulares, incluyendo endócrino, mesenquimal, neuronal y endotelio vascular, que se sabe forman parte estructural de los islotes³⁸.

Es anticipado que estos protocolos proveerán células madre pluripotenciales inducibles, llevando consigo asuntos bioéticos relacionados con el uso de blastocistos humanos y la demanda para más líneas celulares de células madre³⁸.

Estructura histológica pancreática.

El páncreas es una glándula mixta que contiene tejido exócrino conformado por células acinosas productoras de enzimas digestivas (Figura 1); y también presenta un tejido endócrino compuesto por las células de los islotes de Langerhans, que producen hormonas que mantienen la homeostasis de la glucosa. En conjunto, los islotes representan alrededor 1% del peso de la glándula³⁹.

El páncreas está cubierto por una capa de tejido conectivo, rico en células mesoteliales, con finos tabiques que dividen a la glándula en lóbulos. Las células de los islotes están delimitadas en forma incompleta por una capa delgada de tejido conectivo reticular que se continúa en el interior de los islotes en escasa cantidad⁴⁰.

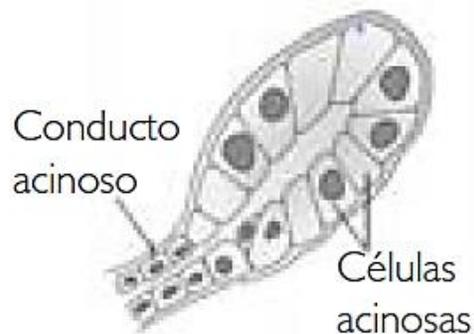


Figura 1. Tejido exócrino del páncreas. Representación esquemática de las células acinosas productoras de enzimas digestivas del tejido exócrino del páncreas (tomada de Olvera-Granados y cols., 2008).

El tejido endócrino adulto contiene cuatro tipos celulares diferentes, con mayor densidad en la zona de la cola⁴¹. Estas células son: células productoras de insulina o β , que representan 70%; células productoras de glucagón o α , que representan 20%; las células productoras de somatostatina o δ , que representan entre 5% y 10%, y las células productoras del polipéptido pancreático o PP, que abarcan alrededor del 2% (Figura 2)⁴⁰.

Existen otros tipos celulares tales como las células productoras del polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) y las células secretoras mixtas (EC o enterocromafines)⁴¹.

Los islotes de Langerhans están contenidos en una estructura altamente organizada, donde las células β están en el interior del islote y el resto de los grupos celulares se encuentran en la periferia. La organización para el aporte vascular permite llevar la sangre del núcleo a la periferia y se le conoce como BAD (β - α - δ) por su forma centrífuga de aporte vascular⁴².

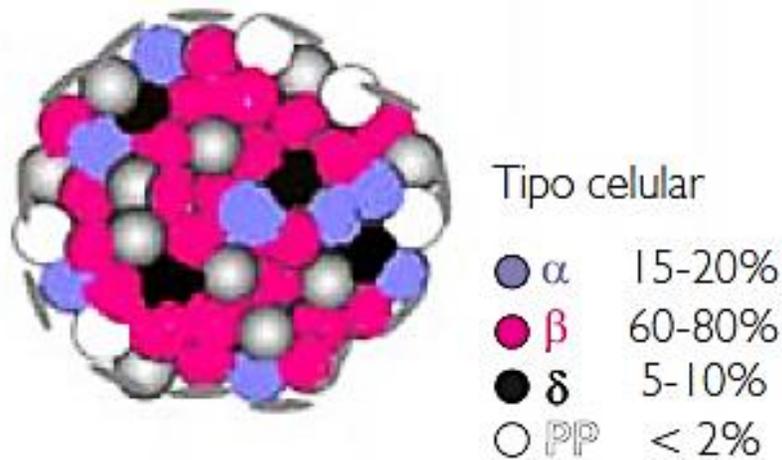


Figura 2. Tejido endócrino del páncreas. Representación esquemática de un Islote de Langerhans con los porcentajes de las células endócrinas del páncreas (tomada de Olvera-Granados y cols., 2008).

Desarrollo embrionario del páncreas.

El páncreas es un derivado de los brotes endodérmico dorsal y ventral que surgen de la parte caudal del intestino anterior y que se fusionan durante la rotación del estómago e intestino. Cada brote tiene un sistema de conductos. El brote endodérmico dorsal formará la mayor parte del páncreas, incluyendo cabeza, cuerpo y cola, mientras que el brote ventral desarrollará la apófisis uncinada y parte de la cabeza del páncreas⁴³.

El primer paso para el desarrollo del páncreas es que se excluyan genes que dictan la

diferenciación intestinal como el *sonic* además de los factores excluyentes como la activina β y el factor de crecimiento fibroblástico⁴⁴.

El desarrollo normal del páncreas está en relación directa con la interacción cercana entre las células epiteliales y mesenquimales que forman el primer brote; así mismo, ambos tipos celulares expresan el factor del islote 1 importante para la diferenciación pancreática⁴⁵.

Para promover la diferenciación hacia células endocrinas se inactiva el receptor para el factor del islote 1 y comienza a expresar neurogenina-3 y nestina⁴⁶. Durante la diferenciación, las células migran al mesénquima adyacente donde se agrupan y esperan señales inductivas para diferenciarse a los distintos tipos celulares endócrinos, por ejemplo, la proteína asociada a la neogénesis de los islotes también conocida como INGAP⁴².

Diversos factores de transcripción participan en el desarrollo y diferenciación de los diferentes linajes celulares, como el factor de necrosis humoral 3β (HNF3 β) y el HNF-1 α , que promueven la diferenciación hacia linajes endodérmicos⁴⁷.

El HNF3 β es un factor que puede iniciar la respuesta positiva a las señales inductivas y es expresado en el feto de ratón antes de la expresión de *Pdx-1* en el día ocho embrionario⁴⁸.

Para el día 13 embrionario, incrementa el número de células y comienzan a expresar marcadores específicos de los islotes de Langerhans como Glut2, antes de desarrollar la capacidad de secretar la hormona; es por eso que ha servido como marcador de células primordiales en el sistema ductal⁴⁹.

Cada estirpe endocrina depende de un tiempo apropiado de expresión de algunos genes, entre los que se encuentran *Pax 4*, *Pax 6* y *Pdx-1*, este último conocido como factor 1

homeobox pancreático y duodenal⁵⁰.

El HNF-1 α es necesario para mantener la expresión específica de las células de los islotes ya que es requerido durante toda la vida. El desarrollo de la sensibilidad a la glucosa empieza a las dos semanas de vida postnatal⁵¹. Existen drogas o sustancias químicas que son capaces de provocar Diabetes o estados de hiperglucemia. Algunas de estas drogas pueden inducir resistencia a la insulina o daño a las células β provocando dicha enfermedad. En los animales, tienen un efecto similar y los biomodelos son empleados para estudiar la inducción de Diabetes y sus efectos metabólicos. Dentro de estas sustancias se encuentra la estreptozotocina (STZ), de la cual se hablará a continuación.

Estreptozotocina.

La STZ es un antibiótico de amplio espectro citotóxico producido por *streptomyces achromogenes*. El efecto diabetogénico de la STZ fue reportado por primera vez en 1963 por Rakietyen después de una sola dosis intravenosa en ratas y perros⁵².

La STZ puede ser empleada en ratas, ratones, perros, hámsteres, ovejas y monos. Se puede administrar de dos formas: en dosis altas simples dependiendo de la especie (50-240 mg/kg) vía intravenosa o intraperitoneal, que causan la muerte de las células β dentro de las primeras 24 horas, siendo esta probablemente el modelo más usado, o mediante dosis bajas subdiabetogénicas (5mg/kg) repetidas a los 5-6 días, desarrollando un síndrome en el que aparece insulinitis, modelo que se utiliza para estudiar la vía por la cual se acrecientan los efectos de los agentes β citotóxicos⁵³.

La STZ, es un compuesto químico cuya fórmula química es $C_8H_{15}N_3O_7$ y su nombre de acuerdo a la IUPAC es (2-deoxy-2(3-metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranos), una nitrosourea ampliamente utilizada para inducir Diabetes en animales de experimentación. La gran capacidad diabetogénica de este compuesto se debe a que causa daño en las células β del páncreas, que son la única fuente de insulina del organismo. La porción glucosídica de su estructura le permite a la STZ utilizar el transportador GLUT2 en estas células, y el metilo de nitrosamida (metilnitrosourea) es responsable de la toxicidad del compuesto. La exposición a este compuesto produce daños en el DNA de las células (alquilación) generando su fragmentación. Como consecuencia, la célula pone en marcha una serie de mecanismos de reparación del DNA, principalmente el que involucra a la poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1). Esta enzima cataliza la síntesis de poli (ADP-ribosa) dependiente de NAD^+ . La STZ lleva a la hiperactividad de PARP-1 que resulta perjudicial para las células β , ya que se produce una depleción importante del factor NAD^+ . Esta molécula es muy importante en el metabolismo energético y una disminución de la misma, conlleva a un déficit de ATP (pues la biosíntesis de NAD^+ es ATP-dependiente). La deficiencia de ATP no solo ocurre por un aumento de la actividad de PARP-1 sino también porque la STZ provoca disfunción mitocondrial disminuyendo el consumo de oxígeno. Adicionalmente a estos efectos, la STZ produce cantidades pequeñas de especies reactivas de oxígeno en las células β del páncreas que contribuyen al daño celular⁵⁴.

Hay tres mecanismos para que resulte la muerte celular β pancreática: en primer lugar, por metilación del DNA por la formación de ion carbonado CH_3^+ , resultando en la activación de la enzima nuclear poli ADN- ribosa sintetasa como un mecanismo de

reparación celular y en consecuencia una depleción de NAD⁺; por la generación de radical peróxido de hidrógeno; y por la producción de óxido nítrico⁵².

Para explicar la acción diabetogénica de la STZ, hay mucha controversia ya que varios autores publican que la STZ es acumulativa en el páncreas, pero esto depende de la especie animal. Sin embargo, ya se ha demostrado que en ratones a los cuales se inyectó STZ marcada, es acumulativa en los islotes pancreáticos⁵⁵.

Efectos de la STZ en el modelo murino.

La observación con un microscopio de luz y electrónico de los islotes de Langerhans de los ratones con STZ, revelaron una temprana agregación de cromatina y una vesiculación citoplasmática en las células β , en las primeras dos horas posinyección.

La contracción nuclear y pinocitosis con hinchamiento de la mitocondria y del retículo endoplásmico fue evidente 8 horas después, y la lisis de las células β ocurrió 12 horas después de la inyección⁵².

La morfología de las células α , están perfectamente inalteradas. La infiltración de macrófagos, después de la lisis de las células β , se vio 24 horas después de la administración de STZ, donde se apreciaban vacuolas fagocíticas largas y claras.

Las figuras necrobióticas y fagocíticas desaparecieron 48 horas después de la inyección en los páncreas ya seccionados y los islotes era más pequeños, con las células α y δ intactas, apreciándose ocasionalmente degranulación de células β . No hay datos de apoptosis, y la glándula exocrina pancreática estaba protegida de los efectos de la STZ⁵².

La Diabetes, a menudo involucra un metabolismo anormal de lípidos que contribuye a las complicaciones diabéticas; la hiperglucemia produce un marcado incremento de triglicéridos séricos. La insulina activa la lipoproteína lipasa que hidroliza los triglicéridos.

El déficit de insulina, provoca un fallo para activar la lipasa, provocando hipertrigliceridemia, es decir, la STZ además de causar toxicidad hepática también produce una alteración lipídica⁵⁶.

La ausencia de insulina en los ratones con STZ predispone a inmunodeficiencia, aunque no se exenta que también contribuya la STZ. Los efectos inmunosupresores directos de la STZ se ven en el decremento de linfocitos en timo, en nódulos linfáticos y bazo.

Los linfocitos esplénicos de ratones diabéticos de 7-14 días tenían respuesta disminuida. La generación de células citotóxicas *in vitro* fue menor en las células esplénicas para el ratón de 22 días, pero la respuesta de los blastocistos no fue deprimida⁵⁷.

Las enzimas Transaminasa Glutámico Oxalacética (TGO), Transaminasa glutámico-pirúvica (TGP) y Gamma glutamil transpeptidasa (GGT), son consideradas marcadores de toxicidad hepática que se ha reportado producen un cambio a nivel sérico de roedores diabéticos. También se ha reportado que las transaminasas están aumentadas en la deficiencia de insulina, estos cambios se han asociado con el aumento de gluconeogénesis y cetogénesis durante la Diabetes⁵⁵.

En ratones suizos albinos NIH se indujo con una sola dosis de STZ de 200 mg/kg, que causó pérdida de peso del 20% y los síntomas de Diabetes, como poliuria y polifagia, corroborándose además alteración en la locomoción, comprobado su deficiencia al nadar. El tratamiento con insulina diaria de 0.1 UI/g/día parcialmente contrarrestaba esta incapacidad⁵⁸.

Hasta ahora, se ha aceptado el hecho de que la elevada glucemia da lugar a una aumentada producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por la mitocondria, contribuyendo en el daño celular que finalmente terminan en disfunción endorgánica y cambios estructurales. Esto se ve reflejado en nefropatía, neuropatía y

retinopatía. Aun no se sabe cómo la glucosa aumenta la producción del anión superóxido⁵⁹.

Una cantidad inapropiada de insulina y glucagón esta frecuentemente asociada con alteraciones metabólicas que acompañan la Diabetes. Se determinaron inmunoreactivos de insulina plasmática (IRI) y de glucagón (IRG) en ratones de genéticamente diabéticos (dB/dB) y ratones inducidos con STZ. Niveles plasmáticos de IRI en los mutantes genéticos estaban elevados a las 9 semanas de edad, así como la prevalencia de hiperglucagonemia desde el inicio, a diferencia de los ratones con STZ que tenía niveles bajos de IRI y altos valores de IRG⁵⁹.

Hay un importante papel de los radicales libres y oxidantes en la etiología de la neuropatía diabética. En estudios pasados, el peroxinitrito se ha relacionado con deficiencia de la conducción de los nervios sensitivos y periféricos, así como con la activación de ADP-ribosa en la DT1. Un estudio probó que en modelos de ratón inducidos con STZ después de 6 semanas de duración de Diabetes, desarrollaron hipoalgesia, alodinia, pérdida de fibras nerviosas intraepidérmicas. La respuesta táctil mejoró con el tratamiento catalítico del peroxinitrito, pero no mejoro del todo⁶⁰.

El aumento de la actividad de la isoforma β de la proteincinasa c (PKC- β) está ligada a complicaciones neurales y vasculares de la Diabetes. El tratamiento con un inhibidor PKC- β , mejora la función somática neural y circulación vascular en ratas diabéticas, las cuales fueron previamente inducidas con STZ, los cuales duraron 4 semanas⁶¹.

Con todos los efectos mencionados en modelos diabéticos y muchos de ellos presentes en el humano, se ha planteado la posibilidad de opciones terapéuticas que regeneren la estructura y funcionalidad del páncreas endócrino, razón por la cual existe un avance considerable en la investigación con SC y su diferenciación a células especializadas,

como son las células pancreáticas.

Diferenciación de células madre a células pancreáticas.

Históricamente el término “célula madre” fue utilizado por primera vez por Ernst Haeckel (1868), cuando lo empleó en alemán “Stammzelle” para describir al ancestro de los organismos unicelulares del cual presumiblemente descienden todos los organismos multicelulares⁶², en tanto Alexander Maximow (1908) describe por primera vez la existencia de las células madres hematopoyéticas durante un congreso de hematología en Berlín⁶³.

Becker y cols. (1963) inyectaron MSC de la médula ósea en ratones irradiados y reportaron el desarrollo de nódulos en el bazo de los ratones. Esos nódulos se encontraban en proporción al número de MSC inyectadas, además de que evidenciaron que las células de los nódulos tenían la capacidad de renovación infinita, concluyendo que cada nódulo se había formado de una célula mesenquimal única⁶⁴.

Hsun Teresa Ku y cols. (2004), diferenciaron mESC utilizando los cuerpos embrionarios (EBs) derivados de las líneas celulares R1, E14.1 y CCE. Estos EBs fueron cultivados en presencia de concentraciones específicas de monotioglicerol (MTG) y adicionando factores de diferenciación y especificación para células β como la activina β B, nicotinamida y exedina-4. Este estudio reportó la expresión de marcadores genéticos para endodermo y páncreas, así como la producción intracelular de insulina y glucagón detectada mediante técnicas de inmunofluorescencia (Figura 3), concluyendo que las manipulaciones de cultivos celulares de ESC con factores de diferenciación y especificación para células β en días específicos, inducen la formación de células pancreáticas endócrinas tempranas⁶⁵.

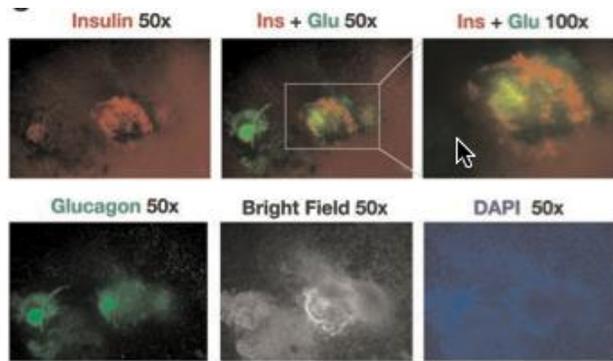


Figura 3. Células diferenciadas productoras de insulina y glucagón. Células diferenciadas conformando EBs teñidas contra insulina y glucagón mediante técnica de inmunofluorescencia (tomado de Teresa Ku y cols., 2004).

Jiang W y cols. (2007) derivaron células funcionales productoras de insulina *in vitro* a partir de hESC utilizando inductores para endodermo como la activina A y ácido retinoico entre otros como promotores pancreáticos, analizando mediante RT-PCR marcadores génicos para endodermo y páncreas temprano, así como la detección de las proteínas pancreáticas mediante técnicas de inmunofluorescencia a los 20 días de la diferenciación. Ellos concluyeron que un protocolo escalonado utilizando la activina A, el ácido retinoico y otros factores de maduración pueden diferenciar a las ESC a células productoras de insulina, pero con una coproducción baja de glucagón, lo cual produjo células con una eficiencia baja para futuros trasplantes para la terapia de DT1⁶⁶.

Peter T. W. Kim y cols. (2010) diferenciaron mESC sin la formación de cuerpos embrionarios a endodermo y células precursoras pancreáticas, utilizando ácido retinoico, factor de crecimiento de fibroblastos básico y dibutilil cAMP. Sus células diferenciadas fueron analizadas con reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (PCR), inmunohistoquímicas y ensayos de liberación de insulina, reportando la expresión de marcadores para la línea endodérmica y pancreática, así como la disminución de los marcadores específicos de pluripotencialidad de las ESC, concluyendo que la

diferenciación de endodermo definitivo a partir de las ESC es el primer paso esencial para la generación de tejidos pancreáticos⁶⁷.

Liu Ge-ling y sus cols. (2010) diferenciaron MSC de la médula ósea a células parecidas a los islotes pancreáticos que utilizaron posteriormente en trasplantes autólogos. Para su diferenciación emplearon agentes inductores pancreáticos como la nicotinamida y exedina-4, además de diferentes concentraciones de glucosa, comprobando mediante PCR en tiempo real, inmunocitoquímicas e inmunoensayos la producción de insulina, y posteriormente en un modelo murino de DT1 con estreptozotocina (STZ), se hicieron trasplantes autólogos con las células diferenciadas observando disminución en los niveles de glucemia. Concluyeron que las MSC pueden ser inducidas a la diferenciación de células pancreáticas con morfología, estructura y función similares, aunque con la perspectiva de seguir investigando el rol de estas células *in vivo*⁶⁸.

Hongxiang Hui y cols. (2010) analizaron los procesos y las vías de señalización involucradas al diferenciar células madre embrionarias humanas de la línea celular HUES1 en células β productoras de insulina, utilizando principalmente para su diferenciación el péptido similar al glucagón (GLP-1), además de exedina-4 y exedina-9, comprobando la diferenciación de las hESC mediante retrotranscripción en la cadena de la polimerasa (RT-PCR) de *β -actina* e *insulina* y citometría de flujo, reportando la expresión de insulina hasta el día 21 de diferenciación, concluyendo que el GLP-1 dirige la diferenciación de las hESC a células productoras de insulina a través de diferentes vías de señalización⁶⁹.

Chialin Chen y cols. (2011) diferenciaron células madre embrionarias de ratón a células pancreáticas, utilizando 3 líneas de mESC: R1, PDX1-EGFP y MIP. Durante su protocolo de diferenciación, caracterizaron mediante RT-PCR la activación secuencial de múltiples

marcadores genéticos evaluando las mESC indiferenciadas (*Oct4*), la formación del epiblasto (*rex-1*), el endodermo definitivo (*SOX17* y *foxa-2*) y las líneas pancreáticas diferenciadas (*neurogenina 3*, *Ins-1*, *gcg* y *somatostatina*). Al día 20 de diferenciación, observaron mediante técnicas de inmunofluorescencia la producción de las proteínas insulina, amilasa, glucagón y péptido C, concluyendo que los ensayos de diferenciación de ESC son una herramienta valiosa que puede ser usada como una plataforma inicial con un potencial para el descubrimiento y producción de tratamientos para la Diabetes⁷⁰. Es por eso que en este trabajo nos propusimos la obtención de células pancreáticas a partir de ESC, caracterizándolas mediante diferentes técnicas para su posterior empleo como terapia celular en un modelo murino con Diabetes en futuros trabajos.

B. JUSTIFICACIÓN.

La Diabetes al igual que otras enfermedades crónico degenerativas, es un padecimiento común en muchas partes del mundo con serias complicaciones y un alto impacto en los sistemas de salud. Es por esto, que las células productoras de insulina y otras proteínas generadas a partir de SC, representan una nueva alternativa terapéutica y fuente de reemplazo celular.

En nuestro país, la Diabetes es una enfermedad con una elevada prevalencia y es sin duda alguna el mayor reto que enfrenta el Sistema Nacional de Salud, siendo la primera causa de muerte y la principal causa de demanda de atención médica en consulta externa, situada dentro de las principales causas de hospitalización y la enfermedad que consume el mayor porcentaje del gasto de nuestras instituciones públicas, además de que su tratamiento tiene como propósito aliviar los síntomas, mantener el control metabólico, prevenir complicaciones agudas y crónicas, mejorar la calidad de vida y

reducir la mortalidad y sus complicaciones, pero sin considerar el aumento o regeneración de la función pancreática.

Una necesidad realizable de la investigación aplicada para la medicina, es encontrar una fuente renovable de células para reemplazar células enfermas y tejidos dañados. Debido al valor de las ESC basado en su capacidad de autorenovación y pluripotencia, puede ser posible la obtención de células pancreáticas diferenciadas (CPD) a partir de este tipo celular para futuros implantes celulares.

En varios laboratorios se han realizado protocolos para diferenciación de células especializadas a partir de mESC, pero en pocos trabajos se han conjuntado diversas técnicas de caracterización a través de la diferenciación pancreática y ninguno ha realizado una caracterización biomolecular mediante espectroscopia vibracional Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) ni el análisis numérico de los espectros obtenidos mediante ésta última técnica experimental.

Es por ello, que en este trabajo nos propusimos obtener células pancreáticas a partir de mESC y poder contar con una técnica no invasiva y rápida para poder caracterizar SC y su diferenciación específica, con sustento biomolecular y fenotípico, para poder emplearla en futuros trabajos previo al implante celular, así como proponer su factibilidad en alguna otra línea de diferenciación especializada, que busque la opción de la medicina regenerativa para una terapia celular de reemplazo en algún padecimiento específico.

C. OBJETIVOS.

a. Objetivo General:

Caracterizar molecular, fenotípica y espectroscópicamente el proceso de diferenciación de células madre embrionarias de ratón a células pancreáticas.

b. Objetivos Específicos:

1. Caracterizar genética y fenotípicamente las células madre embrionarias (*Nanog*, *SOX2*).
2. Realizar el protocolo de diferenciación de células madre embrionarias a células pancreáticas *in vitro*, evaluándolo genética (*SOX17*, *Pdx1*, *Ins-1*, *Ins-2* y *gcg*) y proteicamente (insulina y glucagón).
3. Analizar mediante espectroscopia vibracional FTIR y análisis multivariado, el proceso de diferenciación de células pancreáticas a partir de células madre embrionarias de ratón.
4. Implementar un modelo diabético murino con estreptozotocina para su posterior empleo en futuros trabajos experimentales con terapia celular utilizando células pancreáticas diferenciadas.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia experimental.

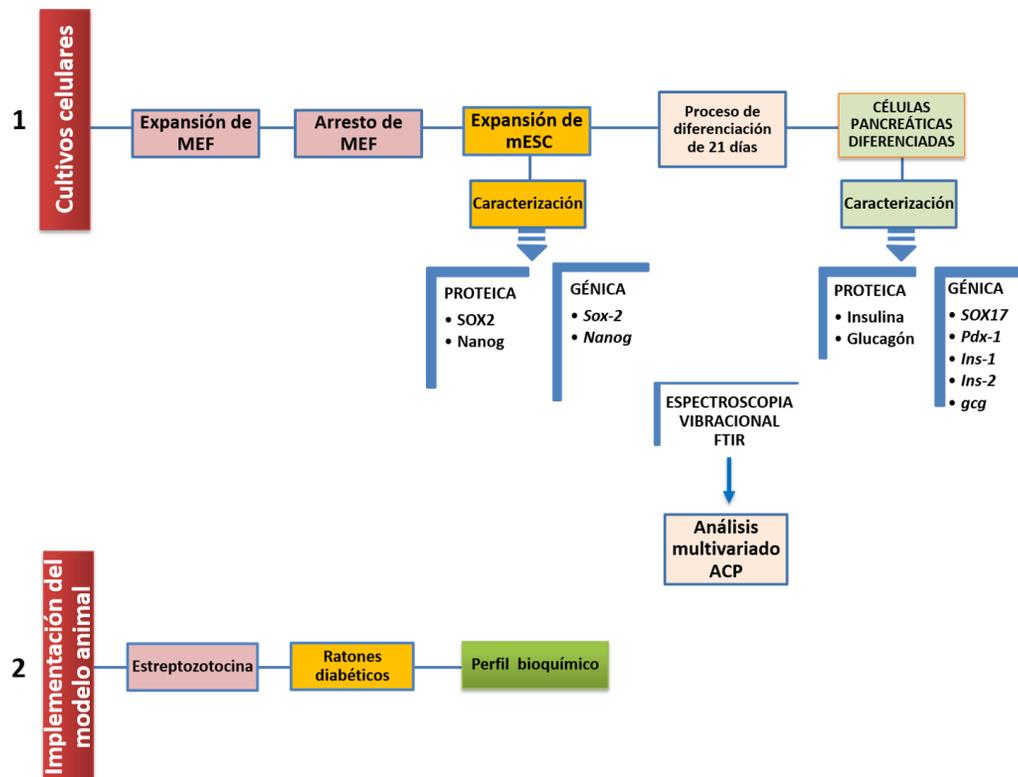


FIGURA 4. Estrategia experimental. Diagrama de flujo donde se observa la estrategia experimental dividida en dos fases: 1. Caracterización de cultivos celulares y, 2. Implementación de un modelo diabético animal.

Cultivo de MEFs.

Para poder expandir mESC, es indispensable contar con una monocapa alimentadora de MEFs los cuales liberan factor inhibidor de leucemia (LIF) para mantener indiferenciadas a las mESC. Con lo anterior, los cultivos celulares iniciaron con la expansión y arresto celular de MEFs como se detalla en seguida.

1. Expansión de MEFs.

La expansión de MEFs se hizo siguiendo los protocolos descritos por ATCC, para lo cual se utilizaron MEFs de la línea celular STO (S, SIM; T, 6-resistente a la tioguanina; O, resistente a la ouabaina).

Inicialmente se procedió a la preparación del medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), completándolo con lo siguiente: 85% de DMEM (ATCC, cat: 30-2002), 15% de Suero Fetal Bovino (FBS) (ATCC, cat: 30-2020) y 1% de penicilina 10,000 UI/ml / estreptomicina 10,000 µg/ml (Invitrogen, cat: 15140).

Una vez preparado el DMEM completo, se procedió a descongelar un vial con MEFs a 37°C; se colocaron 5 ml de DMEM completo en un tubo falcón de 15 ml. Descongelado el vial, se adicionó el contenido al tubo falcón de 15 ml y se centrifugó la suspensión celular a 1000 rpm durante 3 minutos. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de MEFs con 1 ml de DMEM completo, procediendo en seguida a la siembra de MEFs en una placa de cultivo P60 de 60 X 15 mm, a la que se le adicionaron 2 ml de DMEM completo para un volumen final de 3 ml.

La placa P60 con MEFs, se colocó en una incubadora Nuair a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂ para mantener las células en condiciones óptimas hasta llegar a un 80% de confluencia.

Una vez alcanzada la confluencia de los MEFs, se procedió a despegarlos con 1 ml de tripsina/0.53 EDTA (ATCC, cat: 30-2101),

incubándose de 2 a 3 minutos e inactivándola con 1 ml de DMEM completo. A continuación, se pasaron los 2 ml del contenido celular de la P60 a un tubo falcón de 15 ml, centrifugándose a 900 rpm durante 3 minutos, obteniéndose nuevamente un pellet con MEFs, decantando el contenido líquido y resuspendiendo el pellet con 1 ml de DMEM completo. Posteriormente se procedió al conteo celular empleando el contador automático (*Invitrogen cell counter*), para lo cual se mezclaron 5 μ l de la suspensión celular y 5 μ l de azul tripano, con la finalidad de conocer la viabilidad y número celular para resembrar los MEFs en cajas de cultivo P60 a una densidad de 55,000 células/cm².

Por último, se incubaron las cajas P60 a las condiciones antes mencionadas, ya sea para que se pasaran los MEFs una vez que se obtuviera la confluencia deseada de acuerdo a la metodología señalada o, para que 24 horas después de haberlos sembrado, se realizara el arresto del ciclo celular con mitomicina.

2. Arresto celular de MEFs.

Posterior a la expansión de los MEFs, el siguiente objetivo fue bloquearles su ciclo celular para que pudieran servir como monocapa de células alimentadoras.

Para realizar el arresto celular, se utilizó mitomicina en presentación liofilizada de 1 mg activándola con 1 ml de DMEM completo.

Una vez sembrados los MEFs en las P60 a una densidad de 55,000 células/cm², se incubaron durante 24 horas para permitir su adherencia

a la placa de cultivo. Posteriormente se aspiraron los 3 ml del DMEM completo y se agregaron 3 ml del medio con mitomicina a razón de 10 μ l/ml de DMEM completo, incubando nuevamente los MEFs a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂ durante 4 horas.

Cumplido el tiempo, los MEFs se lavaron dos veces con solución buffer fosfato (PBS) y posteriormente se despegaron con 1 ml de tripsina/EDTA 0.53, la cual se incubó durante 3 minutos. A continuación, se inactivó la tripsina con 1 ml de DMEM completo, se lavó la placa manualmente y se pasaron los 2 ml de la suspensión celular a un tubo falcón de 15 ml, mismo que se centrifugó a 900 rpm durante 3 min, obteniéndose un pellet, el cual se resuspendió con 1 ml de DMEM completo.

Los MEFs arrestados se volvieron a sembrar en placas de cultivo P60 a una densidad de 55,000 células/cm². A partir de este momento, el recambio del DMEM completo se realizó cada 3 días durante el tiempo de viabilidad de los MEFs arrestados.

Cultivo de mESC.

Se siguieron los protocolos de descongelamiento, expansión y criopreservación para mESC recomendados por ATCC.

1. Descongelamiento del vial con mESC.

Se preparó el medio basal completo para mESC, el cual contenía lo siguiente: 85% de medio basal para mESC (ATCC, cat: SCRR-2010), 15% de FBS, 2- β mercaptoetanol al 0.1 mM (Invitrogen, cat: 21985023) y LIF a razón de 1 000 U/ml (Chemicon, cat: ESG1107).

Completado el medio basal para mESC, se reemplazó una hora antes el DMEM completo donde se encontraban los MEFs arrestados para posteriormente descongelar el vial que contenía las mESC. Descongelado el vial, se transfirió su contenido a un tubo falcón de 15 ml que contenía 4 ml de medio basal completo para mESC, se enjuagó el vial con 1 ml de medio basal y se centrifugó a 900 rpm durante 3 minutos, obteniéndose un pellet, se decantó el sobrenadante y se resuspendió con 1 ml de medio basal completo para mESC.

A continuación, se transfirió la suspensión celular con mESC a la placa de cultivo P60 que contenía la monocapa alimentadora de MEFs arrestados, completando finalmente 3 ml de medio basal completo para mESC, incubándose a 37°C, humedad del 95% y CO₂ al 5%, cambiando el medio basal completo para mESC diariamente hasta observarse una confluencia adecuada del 80%.

2. Expansión de las ESC de ratón.

Una vez obtenida la confluencia de las mESC, se procedió a realizar el primer pase celular siguiendo el protocolo de ATCC.

Una hora antes de despegar las mESC, se reemplazó el DMEM completo que contenía los MEFs arrestados por 2 ml de medio basal completo para mESC. Cumplido el tiempo, se procedió a despegar las mESC con 1 ml de tripsina / EDTA 0.53 dejándose incubar 1 minuto.

Posteriormente, se inactivó la tripsina con 1 ml de medio basal completo y se lavó la placa de cultivo manualmente, colocando los 2 ml de la

suspensión celular en un tubo falcon de 15 ml el cual se centrifugó a 900 rpm durante 3 minutos. Obteniéndose un pellet posterior a la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 1 ml de medio basal completo para mESC; en seguida se realizó el conteo celular para posteriormente resembrar las mESC a una densidad de 50,000 células/cm² en las placas de cultivo P60 que contenían los MEFs arrestados, incubándose a 37°C, humedad del 95% y CO₂ al 5%, cambiando el medio basal completo para mESC diariamente hasta observar una confluencia adecuada, y así nuevamente, repetir los pasos de la metodología ya sea para la expansión, pase celular o criopreservación de mESC, de manera que se fuera creando una reserva de mESC en nitrógeno líquido.

3. Criopreservación de mESC.

El medio que se utilizó para la criopreservación de mESC, fue medio basal completo para mESC modificado, conteniendo lo siguiente: medio basal completo para mESC, 10% adicional de FBS y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, cat: 472301).

Una vez que se observó la confluencia adecuada, las mESC se despegaron con tripsina, posteriormente se centrifugaron, se decantó el sobrenadante y el pellet en el que se encontraban las mESC se resuspendió con 1 ml del medio para criopreservación, procediendo a contar la suspensión celular y pasándola en seguida a un criovial (Corning, cat: 430488), el cual se mantuvo 24 horas a -20°C y,

posteriormente, se transfirió al contenedor de nitrógeno líquido para su preservación a -170°C.

Diferenciación de mESC a células pancreáticas diferenciadas.

Se realizó el protocolo de diferenciación de mESC a CPD, basándose en los trabajos de Hsun Teresa Ku (2004) con mínimas modificaciones.

De acuerdo a este protocolo, las mESC se mantuvieron en diferentes medios de diferenciación con factores de inducción pancreáticos específicos, los cuales se reemplazaron en días establecidos (Figura 5) como se detalla a continuación:

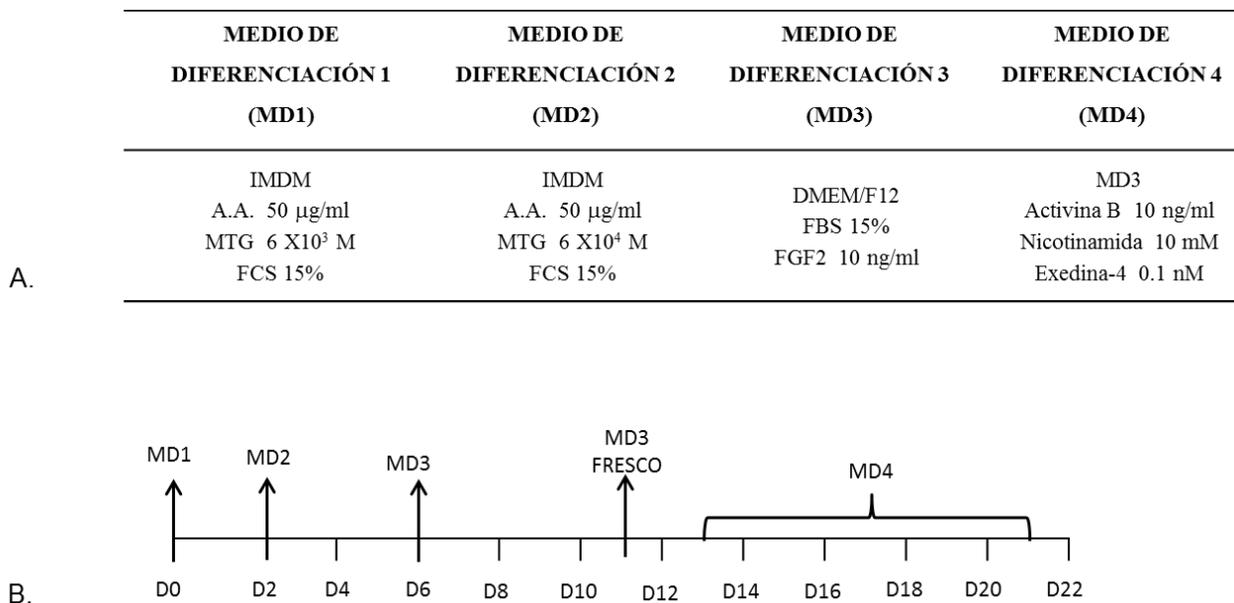


FIGURA 5. Protocolo de diferenciación de mESC a CPD. Proceso de diferenciación de mESC a CPD en 21 días. **A.** Medios de diferenciación utilizados y **B.** Cambios de medios en el transcurso de la diferenciación.

1. Etapa 1 de diferenciación.

Una vez expandidas las mESC, se procedió a despegarlas y centrifugar como se describió anteriormente, se decantó el sobrenadante y el pellet

que contenía las mESC se resuspendió en medio de diferenciación 1, el cual contenía lo siguiente: 85% de Medio Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM) (Sigma, cat: 51471C), ácido ascórbico (AA) a razón de 50 µg/ml (Sigma, cat: A5960), monotioglicerol (MTG) al 6×10^3 M (Sigma, cat: M4165) y 15% de Suero Fetal de Ternera (FCS) (Promocell, cat: C-37350).

Después de resuspender el pellet con medio de diferenciación 1, se procedió al conteo celular e inmediatamente las mESC en diferenciación se sembraron en placas de cultivo P60 de 3 ml a una densidad de 200,000 células/ml.

A partir de este momento, se consideró que las mESC se encontraban en el día 0 de diferenciación, permaneciendo en el mismo medio durante 48 horas a 37°C, humedad del 95% y CO₂ al 5%.

2. Etapa 2 de diferenciación.

Transcurridas 48 horas de haberse mantenido las células en el medio de diferenciación 1 y encontrándose en el 2doº día de diferenciación, se procedió al cambio por el medio de diferenciación 2, el cual contenía lo siguiente: 85% de IMDM, AA a razón de 50 µg/ml, MTG al 6×10^4 M y 15% de FCS.

En este medio de diferenciación 2, las células en diferenciación permanecieron hasta el día 6 en condiciones de 37°C, humedad al 95% y CO₂ al 5%.

3. Etapa 3 de diferenciación.

Para el día 6 de diferenciación, las células conformaban cuerpos embrionarios (EBs) a los cuales se les cambió el medio de diferenciación 2 por medio de diferenciación 3 que contenía lo que a continuación se indica: 85% de DMEM/F12 (Invitrogen, cat: 11320-033), 15% de FBS (Invitrogen, cat: 10828010) y FGF2 a razón de 10ng/ml (Sigma, cat: F0291).

Con este medio de diferenciación 3, los EBs se mantuvieron hasta el día 13 de diferenciación en las mismas condiciones antes señaladas, reemplazando solamente medio 3 fresco al día 10 de diferenciación.

4. Etapa 4 de diferenciación.

Posteriormente para el día 13 de diferenciación, el medio de diferenciación 3 en el que se encontraban los EBs se reemplazó por medio de diferenciación 4, el cual contenía inductores pancreáticos específicos, quedando como sigue: medio de diferenciación 3, nicotinamida al 10 mM (Sigma, cat: N0636), exedina 4 al 0.1 nM (American Peptide Company, cat: 46-3-12) y activina-B humana recombinante a razón de 10 ng/ml (Sigma, cat: A1729).

Los EBs conformados por CPD, permanecieron en este medio de diferenciación 4 hasta el final del protocolo (día 21) en las mismas condiciones de 37°C, humedad del 95% y CO₂ al 5%, pero durante este intervalo se realizó un cambio de medio de diferenciación 4 fresco al día 17 de diferenciación.

Al final del protocolo al día 21 de diferenciación, se retiró el medio de cultivo y se analizaron las CPD con las técnicas genéticas, fenotípicas (inmunofluorescencia y morfológicas) y espectroscópicas que se describen a continuación.

Descripción morfológica

Las mESC y los EBs conformados por CPD a los días 11,17 y 21 de diferenciación, fueron analizados durante los 21 días del protocolo de diferenciación empleando un microscopio invertido Ti-U Eclipse Nikon, determinando el diámetro, forma y confluencia celular de los EBs.

Se utilizó una prueba Anova para comparar las diferencias entre los diámetros de los EBs en las diferentes etapas de diferenciación.

Diseño, estandarización y validación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Mediante esta técnica se analizó la expresión relativa de: genes de pluripotencia, *Nanog* y *SOX2*; genes de la línea germinal endodérmica, SRY-box que contiene el gen 17 (*SOX17*) y Homebox 1 pancreático y duodenal (*Pdx1*); genes pancreáticos, insulina 1 (*Ins-1*), insulina 2 (*Ins-2*) y glucagón (*gcg*); y, gen endógeno, peptidil propil isomerasa A (ciclofilina) (*ppia*).

Para la realización de esta técnica, primeramente, se diseñaron los oligonucleóticos; una vez adquiridos, se hidrataron y estandarizaron las concentraciones adecuadas, las cuales fueron posteriormente validadas para comprobar su eficiencia, antes de utilizar los oligonucleótidos para el análisis de las CPD a partir de mESC.

1. Diseño de los oligonucleótidos.

El diseño de la secuencia de los oligonucleótidos para los genes que se estudiaron (*Nanog*, *SOX2*, *SOX17*, *Pdx1*, *Ins-1*, *Ins-2*, *gcg* y *ppia*) se desarrolló en el programa Primer Express Real-Time PCR ver. 3.0 de Applied Biosystems (Tabla 1).

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía Uniparts S.A. de C.V.

Una vez entregados los oligonucleótidos, se hidrataron y ajustaron a una concentración final de 10 μ m. A partir de la concentración de 10 μ m, se hicieron 3 diluciones de cada uno de los iniciadores para ajustarlos a 0.5, 3 y 9 μ m, las cuales fueron utilizadas para la estandarización de la PCR con cada uno de los genes.

TABLA 1
OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS

Gen	Iniciador sentido 5' - 3'	Iniciador antisentido 5 - 3
<i>Nanog</i>	TCTCTCAGGCCAGCTGTGT	CGCTTGCACTTCATCCTTTG
<i>SOX2</i>	AACCGATGCACCGCTACG	TTGACCACAGAGCCCATGG
<i>SOX17</i>	CTTCCCTACCAGGGACACGA	ACTGCTTCTGGCCCTCAGGT
<i>Pdx1</i>	GGTGCTTACACAGCGGAACC	CGGTCAAGTTCAACATCACTGC
<i>Insulina-1</i>	ACAGCATCTTTGTGGTCCCC	CAGCACTGATCCACAATGCC
<i>Insulina-2</i>	GCTCTTCCTCTGGGAGTCCC	AAGGTCTGAAGGTCACCTGCTC
<i>Glucagón</i>	GCCACTCACAGGGCACATT	GTCCCTTCAGCATGCCTCTC
<i>ppia</i>	CCAGGATTCATGTGCCAGG	GCCATCCAGCCATTCAGTCT

2. Estandarización y validación de los oligonucleótidos.

Para la estandarización y validación de los oligonucleótidos, se obtuvieron tres replicas biológicas de páncreas embrionarios, páncreas adultos y mESC para la extracción del ácido ribonucleico (RNA). El total del RNA se aisló y se cuantificó; posteriormente fue tratado con DNAsas y se sintetizó ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real se realizó en un equipo ABI PRISM 7000 sequence Detection system-SDS, y se utilizó SYBR Green como sistema de detección.

Estandarizadas las concentraciones adecuadas para cada uno de los oligonucleótidos, se validó y comprobó su eficiencia antes de ser utilizados para el análisis de las CPD.

i. Extracción del RNA.

La extracción se realizó según el método de Chomczynski y Sacchi, 1987, de acuerdo al siguiente protocolo: se obtuvieron tres muestras de páncreas de ratón adulto y tres muestras de feto de ratón (10 días); se transfirieron a razón de 10 mg de células x 1 ml de trizol (Invitrogen, 15596-018) en un tubo eppendorf, posteriormente se homogeneizó el tejido de cada una de las muestras y se transfirió cada una de las muestras a otro tubo limpio agregándosele 200 µl de cloroformo (J. T. Baker, 9180-22) x 1 ml de trizol; las mezclas se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente por 3 minutos para separar la fase acuosa de la mezcla; se centrifugaron a 11,000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

Una vez separada la fase acuosa, se transfirieron a un tubo limpio y se le adicionaron 500 μ l de isopropanol (J. T. Baker, 9080) para precipitar el RNA. Se dejaron incubar por 10 min y se centrifugaron a 11,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Una vez precipitadas las muestras, se lavaron con 1 ml de etanol (J. T. Baker, 8006) al 75% por cada ml de trizol adicionado, posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm por 3 minutos y se eliminó el sobrenadante, dejándose secar el RNA al aire libre. Una vez seco el RNA, se le agregaron 50 μ l de dietilpirocarbonato (DEPC) a cada muestra y se procedió a disolver el pellet hasta obtener una mezcla homogeneizada.

ii. Cuantificación de RNA total por espectrofotometría.

La cuantificación del RNA extraído se realizó directamente y se tomaron lecturas a longitudes de onda de 260 nm en un espectrofotómetro (NanoDrop). Las concentraciones se ajustaron a 100 ng/ μ l y se procedió a evaluar la integridad del RNA en un gel desnaturizante de agarosa (Invitrogen) al 1%, teñido con bromuro de etidio.

iii. Purificación del RNA.

Todas las muestras se trataron con DNasa (RQ1 RNase-Free DNase Promega, cat: M6101), para evitar la contaminación por DNA genómico de acuerdo con el siguiente protocolo; se preparó la mezcla de reacción: 8 μ l RNA (100 μ g/ μ l), 1 μ l Buffer y 1 μ l DNasa RQ1. Posteriormente se incubó la mezcla a 37°C durante 30 minutos y pasado el tiempo de incubación, se le adicionó 1 μ l de solución de

paro (EDTA 20 mM, pH = 8.0) para la enzima RQ1. Finalmente se incubó la mezcla a 65°C durante 10 minutos para inactivar la enzima.

iv. Síntesis del cDNA para la amplificación en tiempo real.

El cDNA se sintetizó utilizando el kit first strand cDNA (Invitrogen, cat: 12328-040) de acuerdo a las instrucciones del fabricante como se describe en el siguiente protocolo; se hizo la siguiente mezcla de reacción: 1 µl de primer (oligo dT), 5 µl del RNA tratado con DNasa, 2 µl de 10mM dNTP mix y finalmente 4 µl de agua con DEPC. Se desnaturalizó el RNA y el iniciador, incubándolos a 65°C por 5 minutos, luego se preparó la siguiente mezcla de reacción: 4 µl de Buffer de síntesis de cDNA, 1 µl de 0.1 M DTT, 1 µl de RNasaOUT (40 U/ µl), 1 µl de agua con DEPC y 1 µl de AMV RT (15 U/ µl). Se vertieron 8 µl de la mezcla de reacción en cada tubo de reacción con el RNA y se incubó durante 45 minutos a 50°C y posteriormente 5 minutos a 85°C.

v. Amplificación de genes por PCR en tiempo real.

La PCR en tiempo real se realizó en un equipo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System-SDS versión del programa 1.1 PE Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), utilizando SYBR Green como sistema de detección y el kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 12.5 µl, los cuales contenían 6.25 µl del Master Mix SYBR Green, 1.75 µl de agua, 2 µl del templado (sentido y antisentido) y 1.25 µl de cada uno de los iniciadores a diferentes

concentraciones (sentido/antisentido, 0.5/0.5, 0.5/0.3, 0.5/0.9, 0.3/0.5, 0.3/0.3, 0.3/0.9, 0.9/0.5, 0.9/0.3, 0.9/0.9).

Las reacciones se realizaron en placas ópticas y se sometieron a las condiciones de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto.

vi. Curvas de disociación de los genes amplificados.

Finalizada la PCR, las reacciones se sometieron a incrementos de temperatura desde 60°C a 95°C para construir una curva de disociación de cada gen amplificado en las diferentes concentraciones de los iniciadores. Esta curva se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas crecientes después de la PCR, para monitorear la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Mediante esta aplicación se puede determinar la temperatura de alineamiento de los iniciadores (T_m) para comprobar su especificidad.

vii. Validación.

Una vez que se logró seleccionar la concentración ideal de cada uno de los iniciadores (*Nanog* 0.5/3, *SOX2* 9/3, *SOX17* 3/9, *Pdx1* 3/3, *Ins-1* 3/9, *Ins-2* 9/3, *gcg* 3/3 y *ppia* 3/9), se validaron bajo el siguiente protocolo: se cuantificaron las concentraciones de los productos de PCR obtenidas en el Nanodrop y se ajustaron a 5 ng/μl; a partir de esta dilución, se realizaron 5 diluciones decuplex, de manera que se obtuvieron las siguientes concentraciones en cada uno de los iniciadores: 0.05, 0.005, 0.0005, 0.00005 y 0.000005 ng/μl.

De cada una de las diferentes concentraciones, se realizaron por triplicado PCRs con los iniciadores ya estandarizados para cada uno de los genes, obteniendo los valores del ciclo umbral (C_T) los cuales fueron graficados contra el logaritmo (log) de la concentración del cDNA para obtener una recta, ecuación de ésta y valor de la pendiente.

3. Evaluación de los cambios de expresión de los genes estudiados.

Una vez validada y comprobada la eficiencia, se procedió a la cuantificación relativa de los genes *Nanog*, *SOX2*, *SOX17*, *Pdx1*, *Ins-1*, *Ins-2*, *gcg* y *ppia* en tres replicas biológicas de las células cultivadas a los 0, 11, 17 y 21 días de diferenciación.

Para evaluar y comparar los cambios en la expresión de los genes estudiados, se extrajo RNA de mESC (día 0 de diferenciación) y de CPD a los días 11, 17 y 21 de diferenciación; las muestras se trataron con DNasas y se sintetizó cDNA como se describió anteriormente.

En la PCR tiempo real, los valores de fluorescencia son medidos cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado en la reacción. Entre más templado presente una reacción al comienzo de la PCR, menor es el número de ciclos que se necesitan para alcanzar un punto en el que la fluorescencia es medida por encima de la fluorescencia normal de la reacción de C_T .

Es por eso que las muestras de RNA extraído en los diferentes días se ajustaron para cada cinética a 100 ng/ μ l.

Se utilizó el método de cuantificación relativa, en el que se compara el C_T de mESC (día 0 de diferenciación) contra las CPD en días 11, 17 y 21 de diferenciación. Todas las cuantificaciones fueron realizadas por triplicado y normalizadas con un control endógeno (ciclofilina) para tener en cuenta la variación en la concentración inicial, calidad del RNA y en la eficiencia de reacción en la transcripción reversa.

Cada una de las muestras en los diferentes días de maduración, se estudió por triplicado con los diferentes genes.

Una vez obtenidos los C_T de las cinéticas, se utilizó el método del $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de Livak, el cual analiza los cambios de expresión relativa, seleccionado debido a que es sencillo, fácil de manejar y de análisis rápido. En primer lugar, se determinó el C_T del producto del gen problema (C_{TPb}) y del control interno ppia (C_{Tppia}) en cada muestra. Con estos datos se calculó el ΔC_T , el cual resultó de la diferencia del C_{TPb} y C_{Tppia} , haciéndose este cálculo para normalizar las diferencias de extracción del RNA y en la eficiencia de la reacción de síntesis de cDNA. Posteriormente se calculó el $\Delta\Delta C_T$ en cada muestra, éste se obtuvo de la diferencia del ΔC_T de cada muestra y de la media de los ΔC_T del calibrador (mESC o CPD en 11, 17 y 21 días, según correspondiera). Por último, se calculó el $2^{-\Delta\Delta C_T}$ sobre el resultado obtenido.

La diferencia en la expresión del gen Pb se expresó como n-veces relativa a las mESC o CPD del día 11, 17 o 21 días según correspondiera.

Las ecuaciones que se consideraron para calcular el $\Delta\Delta C_T$ para el método de cuantificación relativa fueron:

$$C_T \text{ gen Pb} - C_{tppia} = \Delta C_T$$

$$\Delta C_T \text{ de la muestra} - \Delta C_T \text{ del calibrador} = \Delta\Delta C_T$$

$$\text{Cantidad relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

4. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos y los gráficos, se realizaron utilizando el programa Past versión 3.08. Se usó una prueba Anova para comparar los cambios de expresión entre las mESC y las CPD obtenidas en diferentes tiempos de diferenciación.

Técnica de inmunocitoquímica para microscopía de fluorescencia.

Mediante esta técnica de inmunodetección, se realizó la caracterización fenotípica de mESC y CPD determinando la presencia de las proteínas en estudio.

Para la estandarización de esta técnica, primeramente, se titularon los anticuerpos (Abs) primarios y secundarios para evidenciar el marcaje y funcionalidad de los Abs contra las proteínas Nanog, SOX2, insulina y glucagón, para lo cual se emplearon cultivos de mESC en pase 1 y cortes histológicos de páncreas de ratón sano, los cuales se obtuvieron mediante técnica quirúrgica como se muestra en la figura 6.

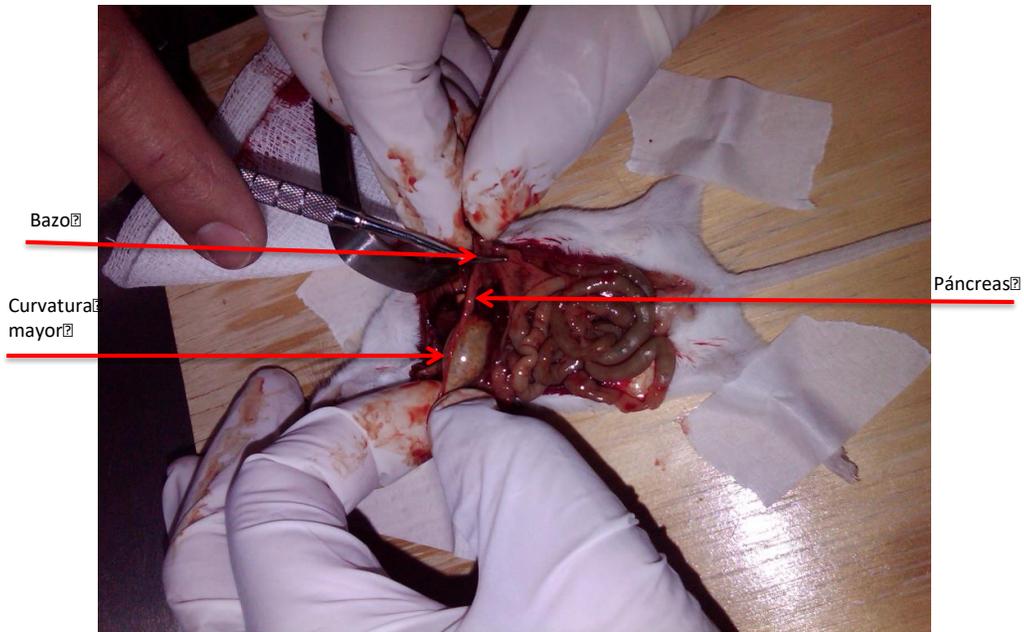


Figura 6. Extracción quirúrgica de páncreas de ratón. Extracción de un páncreas de ratón mediante técnica quirúrgica entre la curvatura mayor del estómago y el bazo.

Respecto a las muestras histológicas, después de extraer el órgano, se colocó en hielo para posteriormente realizar cortes histológicos de 6 μm de grosor con un criostato de pie (Jaelsa) a una temperatura de -30°C . Una vez obtenidos los criocortes, se procedió a estandarizar la técnica de inmunocitoquímica empleando el protocolo de Santa Cruz Biotechnology, *Inc.*, como a continuación se indica.

Los cortes histológicos pancreáticos de 6 μm , al igual que los cultivos de mESC, se fijaron con paraformaldehído (Sigma, cat: P6148) al 4% y ácido pícrico (Sigma, cat: 197378) al 0.15% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, lavándose 2 veces con PBS al término de la fijación.

Posteriormente, se permeó la membrana celular con Tritón X100 (Sigma, cat: X100) al 0.1% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS y en seguida se adicionaron 200 μl de proteína bloqueadora (Dako, cat: X0909) durante 20 minutos para

inhibir tinciones no específicas. Concluido el tiempo, se eliminó el exceso de suero y se procedió a realizar el marcaje con los anticuerpos primarios (Abs 1º) en las preparaciones citológicas e histológicas para la titulación, adicionando 200 µl de los Abs 1º en 3 muestras por cada dilución y su control como se muestra en la figura 7, empleando las siguientes concentraciones:

1. Ab 1º de conejo anti-Nanog (abcam, ab80892), 1:100, 1:200 y 1:400.
2. Ab 1º de conejo anti-SOX2 (abcam, ab97959), 1:100, 1:250 y 1:500.
3. Ab 1º de cobayo anti-Insulina (Dako, A0564), 1:10, 1:20, 1:25.
4. Ab 1º de conejo anti-Glucagón (Dako, A565), 1:50, 1:75, 1:100.

Los Abs primarios y los controles (proteína bloqueadora) contra Nanog y SOX2 se incubaron durante 24 horas en refrigeración, en tanto los Abs contra Insulina y Glucagón y sus controles se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. Pasados los tiempos, se lavaron dos veces con PBS.

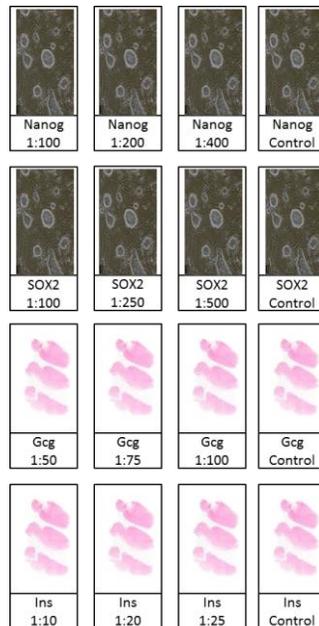


Figura 7. Titulación de los anticuerpos primarios. Esquematización de la titulación de los anticuerpos primarios para cada una de las proteínas: Nanog, SOX2, Insulina y Glucagón.

Posteriormente se realizaron las diluciones correspondientes a los Abs secundarios (Abs 2º) conjugados contra conejo (dylight 488) (Green Fluorescent, GF) (abcam, ab96895) y contra cobayo (alexa fluor 488) (GF) (Jackson, 706-546-148) a razón de 1:100, 1:200 y 1:400, adicionándose 200 µl del Ab 2º a las preparaciones citológicas e histológicas que se habían incubado previamente con los Abs 1º. Con lo anterior, las combinaciones de las titulaciones se esquematizan en la figura 8.

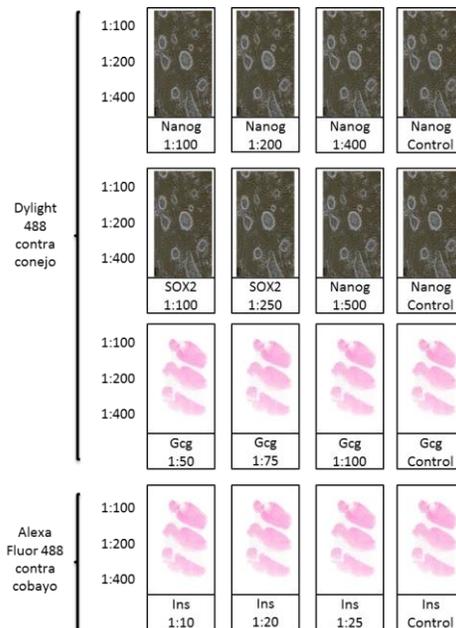


Figura 8. Titulación de los anticuerpos secundarios. Esquemización de la titulación de los anticuerpos secundarios contra conejo y contra ratón.

Los Abs 2º conjugados se incubaron durante 45 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron 3 veces con PBS. En seguida se agregaron 10 µl de glicerol al 10% y se les colocó cubreobjetos. Finalmente, las muestras fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia TiU-Eclipse (Nikon, Japón).

Una vez establecida la titulación para cada uno de los Abs, se procedió a realizar la inmunocitoquímica en tres replicas biológicas de cultivos celulares con mESC y CRD al día 21 de diferenciación; ambos tipos de cultivos para su análisis mediante microscopía

de fluorescencia, se realizaron en cajas de deslizamiento para cultivo (Lab-Tek cat: 177372).

Análisis mediante espectroscopía vibracional FTIR.

Se realizaron análisis por espectroscopia vibracional para determinar la propiedades estructurales y químicas de mESC y CPD, empleando un espectrómetro FTIR (Bruker, Vertex 70) en el intervalo espectral entre 4000-400 cm^{-1} , con una resolución espectral de 4 cm^{-1} y utilizando el modo de muestreo por Reflectancia Total Atenuada (ATR). Todas las muestras en sus diferentes condiciones fueron analizadas por triplicado.

Para el análisis de las mESC indiferenciadas y CPD a los días 11, 17 y 21 de diferenciación, se obtuvieron 100,000 células aproximadamente para cada condición, las cuales se despegaron de las cajas de cultivo y se resuspendieron en 1 ml de PBS. Posteriormente se centrifugaron a 1,200 rpm durante 3 minutos; se retiró el sobrenadante obteniéndose un pellet, del cual se tomaron 3 μl de la muestra celular concentrada, la cual fue colocada sobre la superficie del cristal ATR. Se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 minutos para eliminar el exceso de agua, midiendo los espectros FTIR hasta que las bandas de absorción relacionadas con el agua fueran indetectables. La radiación infrarroja propagada a través del cristal para obtener los espectros correspondientes, fue promediada a través de la adquisición de los múltiples barridos realizados (120 adquisiciones).

Tratamiento espectral y análisis multivariado.

Una vez que se adquirieron todos los espectros FTIR (espectros en crudo), se les aplicó un tratamiento de normalización de variable aleatoria normal tipificada (SNV) utilizando

el programa Unscrambler X versión 10.3 (CAMO Software AS); posteriormente, se realizó el cálculo de la segunda derivada de cada espectro empleando el algoritmo Savitzky-Golay, el cual aplica un ajuste sucesivo de subconjuntos de datos puntuales adyacentes con un bajo grado polinomial por mínimos cuadrados a la aproximación lineal. Después de que los espectros fueron tratados y calculados en segunda derivada, se utilizaron como datos de entrada para la aplicación del método multivariado de Análisis de Componentes Principales (ACP) mediante el programa Unscrambler X 10.3. Este método de ACP es una técnica estadística de síntesis de la información o reducción de dimensión (número de variables), es decir, ante un banco de datos con muchas variables (espectros FTIR), el objetivo es reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible buscando combinaciones lineales de las variables originales que representan lo mejor posible la variabilidad presente en los datos. De este modo, con unas pocas combinaciones lineales, que son los componentes principales, sería suficiente para entender la información contenida en los datos. Al mismo tiempo, la forma en que se construyeron los componentes (gráficas de puntuación), sirvió para entender la estructura de correlación (formando agrupaciones y/o trayectorias) inherente a los datos.

Implementación del modelo diabético murino.

Para inducir Diabetes en un modelo de ratón, fue necesario estandarizar la obtención de muestras sanguíneas para el análisis bioquímico; una vez que se analizaron los parámetros normales, se estandarizó la aplicación de STZ vía intraperitoneal y se determinó la dosis ideal analizando los cambios bioquímicos dependientes de la dosis. La implementación de este modelo siguió las directrices de las Normas Oficiales

Mexicanas “Guía para el uso y cuidado de los animales de laboratorio” (NOM-062-ZOO-1999) y “Guía para la eliminación de residuos biológicos” (NOM-087-ECOL-1995). Se utilizaron ratones machos de la cepa NIH, manteniéndose con dieta estándar y libre disposición de agua, aclimatándose durante una semana en jaulas metabólicas antes de iniciar el proyecto, manteniéndose con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, con humedad controlada del 50-60% y condiciones de temperatura constante de 21 ± 1 °C.

1. Obtención de muestra sanguínea.

La extracción de sangre venosa se realizó de la vena facial sin necesidad de anestesia y con mínima invasión, empleando una aguja de 19–21 G de acuerdo a la técnica que se explica a continuación: se sujetó firmemente al ratón de manera que la cabeza quedó alineada con el cuerpo, comprimiendo ligeramente los vasos del cuello del lado opuesto al que se realizó la punción. Se localizó la vena entre el vértice de la oreja y la comisura labial, aproximadamente al nivel del ojo. Con una aguja de 19-21 G, dependiendo de la edad y/o tamaño del ratón, se realizó la punción (inclinación de 45° aproximadamente) en la zona anteriormente descrita. La profundidad óptima fue de 2-3 mm. Se colocaron 10 gotas de sangre en un tubo para toma de muestra y recolección de sangre pediátrico (BD Microtainer, cat: 365967). Una vez obtenida la muestra, se hizo hemostasia por 5 segundos y se liberó al ratón.

2. Determinación del perfil bioquímico sérico.

Una vez que se obtuvo la muestra sanguínea con la técnica antes descrita, se procedió a centrifugarla en una centrífuga para tubos Eppendorf a 3,500 rpm durante 5 minutos para obtener el suero.

Posteriormente se diluyó el suero de las muestras que no era suficiente para completar un volumen final de 150 µl necesarios para su análisis bioquímico.

En seguida se realizó el análisis sanguíneo de 6 elementos (glucosa, creatinina, triglicéridos, ácido úrico, urea, BUN) en un equipo automatizado para química clínica (Autoanalyzer QCA Mini line).

3. Estandarización de la aplicación intraperitoneal de estreptozotocina.

Fue necesario estandarizar la aplicación intraperitoneal antes de administrar la STZ, para poder corroborar que la técnica fuera la adecuada y no se administrara el medicamento en algún órgano o fuera de la cavidad peritoneal, para lo cual se implementó la siguiente técnica: se sujetó al ratón en decúbito supino, inclinándolo 45 grados con la cabeza hacia abajo, para descender los órganos intraperitoneales.

Posteriormente se administraron 500 µl intraperitoneales de azul tripano, introduciendo la aguja a 45° en el cuadrante inferior izquierdo de la pared abdominal, aspirando previamente para descartar salida de materia fecal o sanguínea asegurando la administración intraperitoneal.

Finalmente se sacrificó al ratón y se corroboró la inyección intraperitoneal mediante incisión abdominal.

4. Determinación de la dosis intraperitoneal de STZ.

Realizada la estandarización de las técnicas antes descritas, se procedió a realizar la determinación de la dosis óptima de STZ para inducir Diabetes en los ratones NIH, para lo cual se utilizaron dosis intraperitoneales entre los 150-250 mg/kg de peso y se realizaron en grupos conformados entre 5 y 10 ratones (n=10).

La STZ (Sigma, cat: S0130) se pesó de acuerdo a la dosis indicada y se diluyó en buffer citrato para su aplicación intraperitoneal.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

A. EXPANSIÓN DE MEFs.

En relación a la expansión de MEFs, se observó mediante microscopía directa de campo claro y contraste de fases, que los MEFs son células adherentes a la superficie de la placa de cultivo, adquiriendo la morfología típica alargada, fusiforme y formando una monocapa celular en las cajas de cultivo.

En las primeras 24 horas de cultivo se observaban adheridos los MEFs, aunque la confluencia celular inicial esperada se observó a los 5 días de haber descongelado el vial e iniciado la expansión.

Posterior al haber obtenido la confluencia inicial y realizar el primer pase celular, los MEFs se adherían casi en su totalidad en la primera hora posterior al pase, aunque no se observaba la morfología típica hasta pasadas las primeras 24 horas, duplicándose en número entre las 24 y 48 horas de cultivo y confluyendo al 80% cada 72 horas, por lo que se les realizó el pase correspondiente cada tercer día (Figura 9).

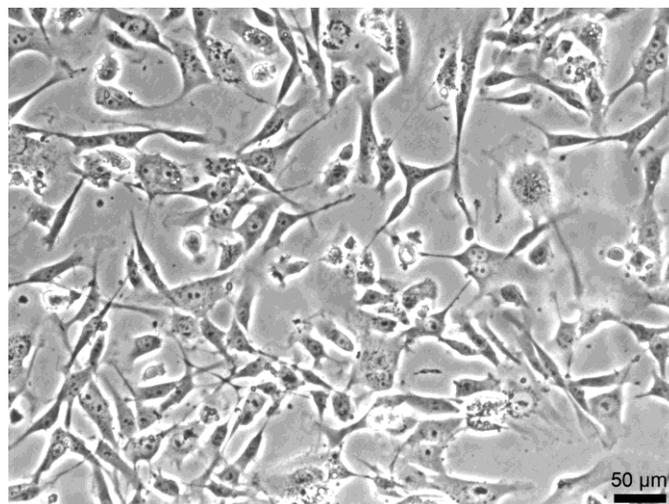


Figura 9. Fibroblastos embrionarios de ratón. MEFs en cultivo, 100X.

B. ARRESTO CELULAR DE LOS MEFs.

Los MEFs cultivados a una densidad de 55,000 células/cm² que se expusieron a mitomicina, se sometieron a conteos celulares cada 3 días comprobando su arresto del ciclo celular, observando que las cifras totales de los MEFs arrestados, presentaron una tendencia hacia la disminución de su población, de manera que, transcurridos 15 días de haberlos arrestado, los MEFs se encontraron en su mayoría no viables.

Cabe mencionar que los MEFs expuestos a mitomicina para su arresto celular, no cambiaron sus características de adherencia ni morfología típica.

C. CULTIVO DE mESC.

Referente a las mESC, se observó mediante microscopía directa de campo claro y contraste de fases, que estas células son adherentes a la superficie de la placa de cultivo y sobre la monocapa de MEFs, adquiriendo una morfología esférica, simétrica y con tendencia a formar colonias celulares (Figura 10).

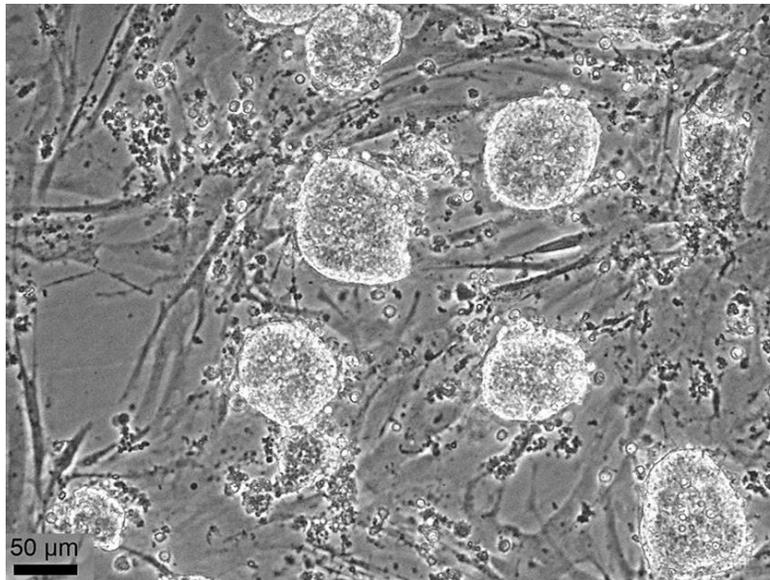


Figura 10. Cultivo de células madre embrionarias de ratón (mESC). Cultivo de mESC sobre monocapa celular de fibroblastos embrionarios de ratón, 100X.

Así mismo se observó que las mESC se adhirieron a la superficie de la caja de cultivo en las primeras 4 horas, pero uniéndose entre ellas para formar colonias posteriores a las 24 horas de cultivo, logrando una confluencia celular inicial esperada del 80% hasta el día 7^o después de haber descongelado el vial de mESC e iniciado la expansión sobre la monocapa de MEFs.

Posteriormente a estas colonias de mESC confluentes se les realizó el primer pase, observando que se adherían en las primeras 24 horas y se replicaban entre las 24 y 48 horas posteriores a su cultivo, obteniendo una confluencia del 80% cada tercer día posterior al primer pase, realizando los pases para su expansión cada 3 días.

D. DIFERENCIACIÓN DE mESC A CPD.

Para la diferenciación de mESC a células pancreáticas diferenciadas, el protocolo realizado tuvo una duración de 21 días, en los cuales se observaron ciertos patrones de diferenciación (Figura 10 y 11) que se detallan en seguida.

Primeramente, las mESC durante la etapa 1 de diferenciación, se adhirieron a la superficie de la caja de cultivo en las primeras 24 horas, presentando una morfología esférica y sin la formación de colonias celulares, manteniendo esta tendencia durante las primeras 48 horas de diferenciación.

Al inicio de la segunda etapa de diferenciación, las mESC comenzaron a unirse formando EBs apenas perceptibles a la microscopía directa con un aumento de 200X, siendo más evidentes al final de esta segunda etapa de diferenciación (Figura 11A y 12A).

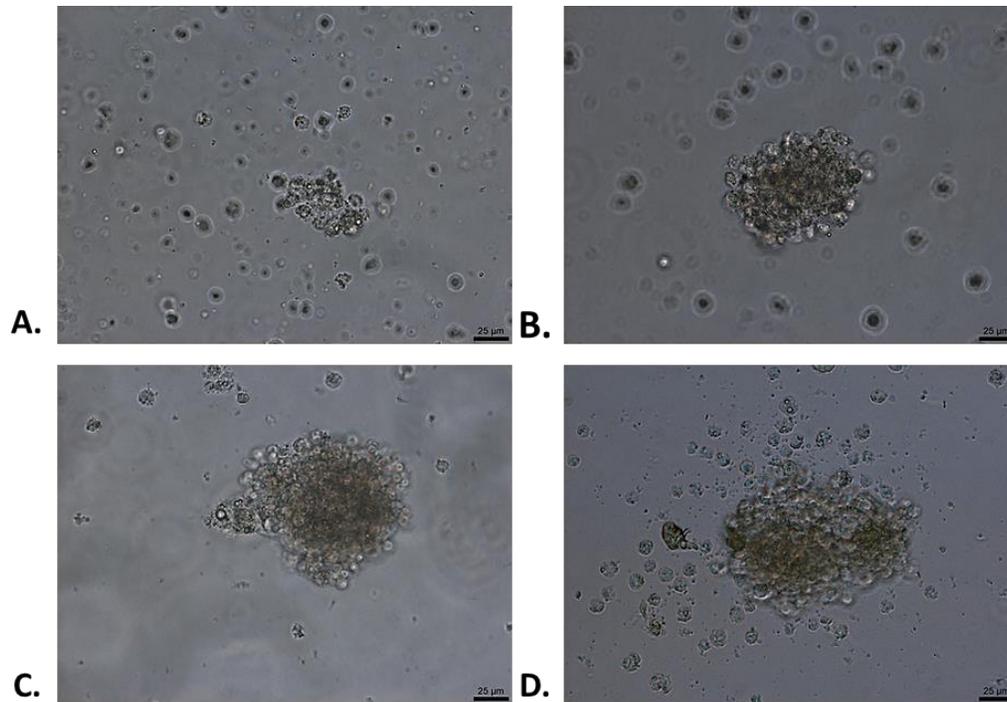


Figura 11. Diferenciación de células madre embrionarias de ratón (mESC) a células pancreáticas diferenciadas (CPD), 200X. Diferenciación de mESC a cuerpos embrionarios (EBs) conformados por CPD. **A.** Células en 6 días de diferenciación conformando un EB. **B.** Aumento del EB conformado por células en 11 días de diferenciación. **C.** EB de 17 días de diferenciación. **D.** EB denso conformado por CPD al día 21 de diferenciación.

Para el sexto día, ya encontrándose en la tercera etapa de diferenciación, los EBs se localizaban con facilidad mediante microscopía óptica con un aumento de 100X, aumentando su población celular.

En el día 11° de diferenciación se apreció que la densidad de los EBs aumentó considerablemente (Figuras 11B y 12B) y, entre los días 11 y 13 de diferenciación, no se presentaron cambios significativos, pero a partir del día 16° de diferenciación ya en la cuarta etapa, se observó un aumento en la población celular y en la formación de EBs cada vez fue más confluentes (Figuras 11C y 12C).

Finalmente, en el día 21 de diferenciación, los cultivos celulares en los que se encontraban los EBs tridimensionales (Figuras 11D y 12D), se retiraron del medio de cultivo para sus respectivos análisis.

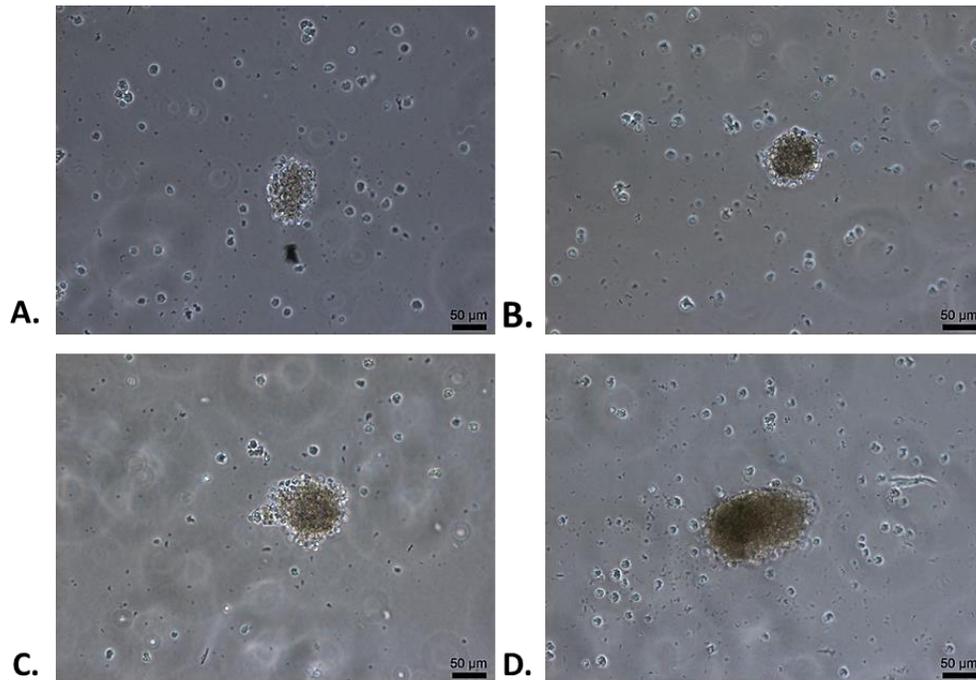


Figura 12. Diferenciación de células madre embrionarias de ratón (mESC) a células pancreáticas diferenciadas (CPD), 100X. Diferenciación de mESC a cuerpos embrionarios (EBs) conformados por CPD. **A.** Células en 6 días de diferenciación conformando un EB. **B.** Aumento del EB conformado por células en 11 días de diferenciación. **C.** EB de 17 días de diferenciación. **D.** EB denso conformado por CPD al día 21 de diferenciación.

E. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL.

Extracción y cuantificación de RNA.

Se obtuvo RNA de mESC y 5 muestras de RNA de páncreas de ratón adulto y fetal, con la finalidad de estandarizar y validar los iniciadores.

Los resultados mostraron la obtención de un RNA integro; en la figura 13, se aprecia en los carriles una señal difusa a lo largo de todo el gel, que corresponde al RNA mensajero, bandas superiores correspondientes al RNA ribosomal 28S y 18S, así como unas bandas

difusas inferiores que bien podrían pertenecer al RNA ribosomal 5S y/o al RNA de transferencia.

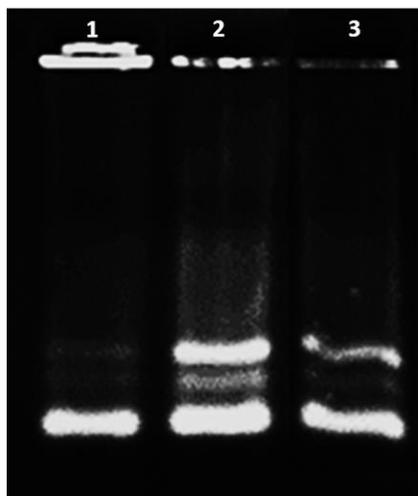


Figura 13. Integridad del RNA obtenido. El RNA se extrajo por el método Chomczynski y Sacchi. Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio. **1.** RNA de páncreas de ratón adulto. **2.** RNA de páncreas fetal de ratón. **3.** RNA de células madre embrionarias de ratón (mESC).

Curvas de disociación de los genes amplificados.

Una vez extraído y verificada la integridad del RNA, se trató con DNasas para la eliminación total del DNA y se sintetizó el cDNA como se describe en material y métodos. Con el cDNA sintetizado, se estandarizaron las condiciones para la amplificación de los genes (*Nanog*, *SOX2*, *SOX17*, *Pdx1*, *Ins-1*, *Ins-2*, *gcg* y *ppia*).

Las concentraciones ideales de amplificación para los iniciadores, quedaron como sigue: *Nanog* 0.5/3, *SOX2* 9/3, *SOX17* 3/9, *Pdx1* 3/3, *Ins-1* 3/9, *Ins-2* 9/3, *gcg* 3/3 y gen endógeno *ppia* 3/9 ng/ul.

Finalizadas las PCRs de amplificación para cada uno de los genes, se corrió una curva de disociación que nos permitió observar un solo pico estrecho para los amplificados y la

ausencia de amplificación en los blancos (Figura 14) indicándonos que las PCRs eran específicas para el fragmento diseñado.

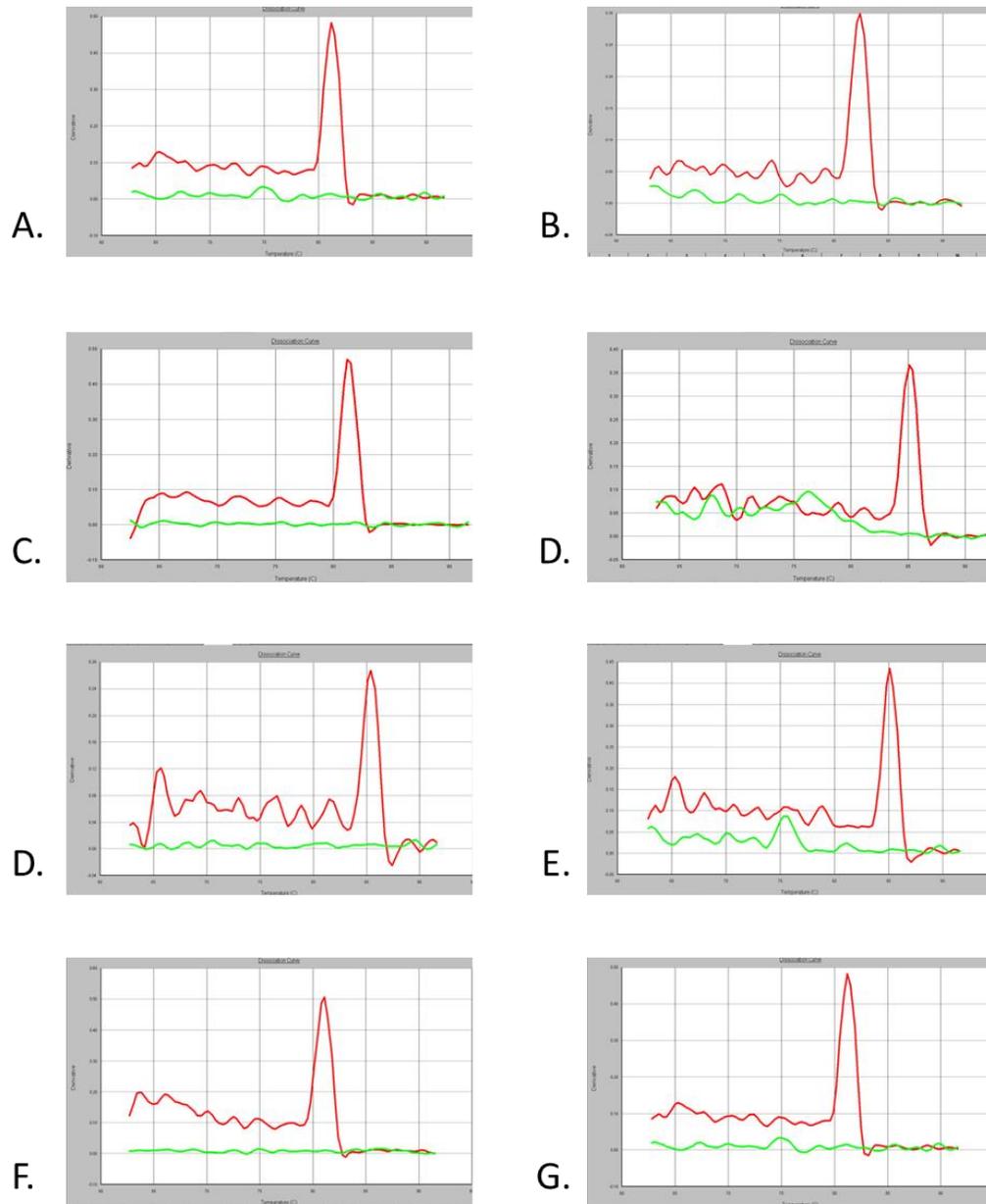


Figura 14. Curvas de disociación de las concentraciones ideales de los oligonucleótidos diseñados. Se muestran en rojo las curvas de disociación realizadas con cDNA, sintetizado a partir de RNA de mESC y páncreas de ratón adulto y fetal y, en verde, los blancos de reactivos (todos los reactivos de la reacción excepto material genético). **A. Nanog**, **B. SOX2**, **C. SOX17**, **D. Pdx1**, **E. Insulina-1**, **F. Insulina-2**, **G. Glucagón**, **H. Ciclofilina**.

De igual forma en un gel de agarosa al 3%, se verificó la amplificación de un sólo amplificado y que el tamaño de éste correspondiera al que previamente se había diseñado (Figura 15).

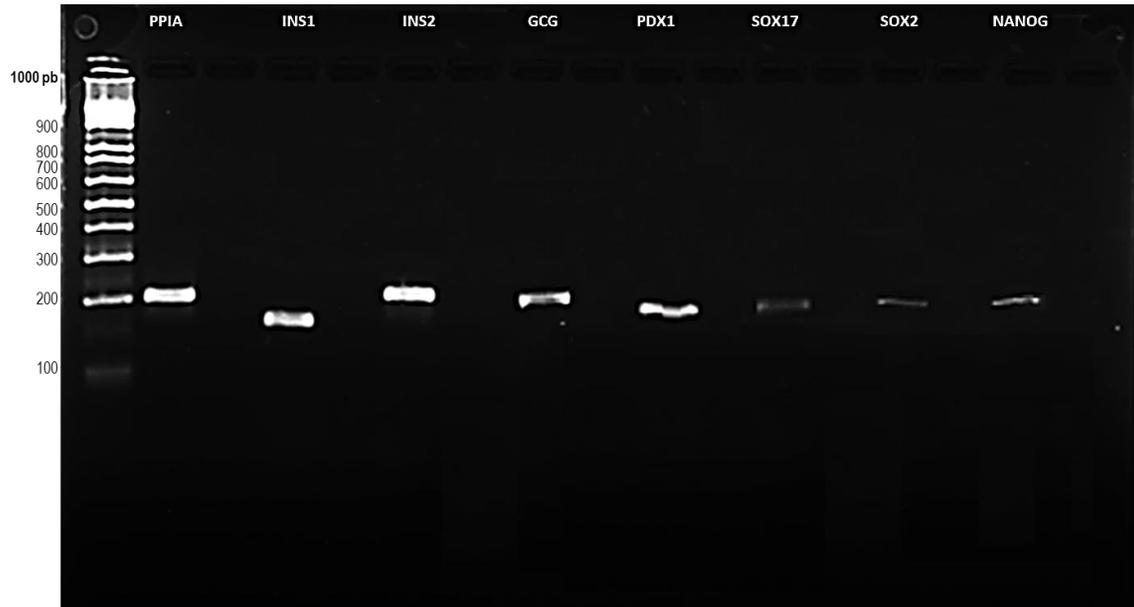


Figura 15. Productos de PCR de los genes estudiados. Se muestra un gel de agarosa al 3% donde se aprecia la amplificación de un solo amplificado y el tamaño de cada uno que corresponde al que previamente se había diseñado.

Validación.

Una vez que se logró la estandarización, se procedió a validar la eficiencia de amplificación, realizando diluciones decuplex del producto de PCR y graficando los C_T obtenidos de la amplificación contra los logaritmos de las concentraciones utilizadas para la amplificación. Las gráficas obtenidas se muestran en la figura 16 donde se observan las pendientes con valores próximos a 3, lo que nos indica eficiencias cercanas al 100% de acuerdo a la ecuación descrita por Rasmussen, validando con esto, los resultados de las PCRs.

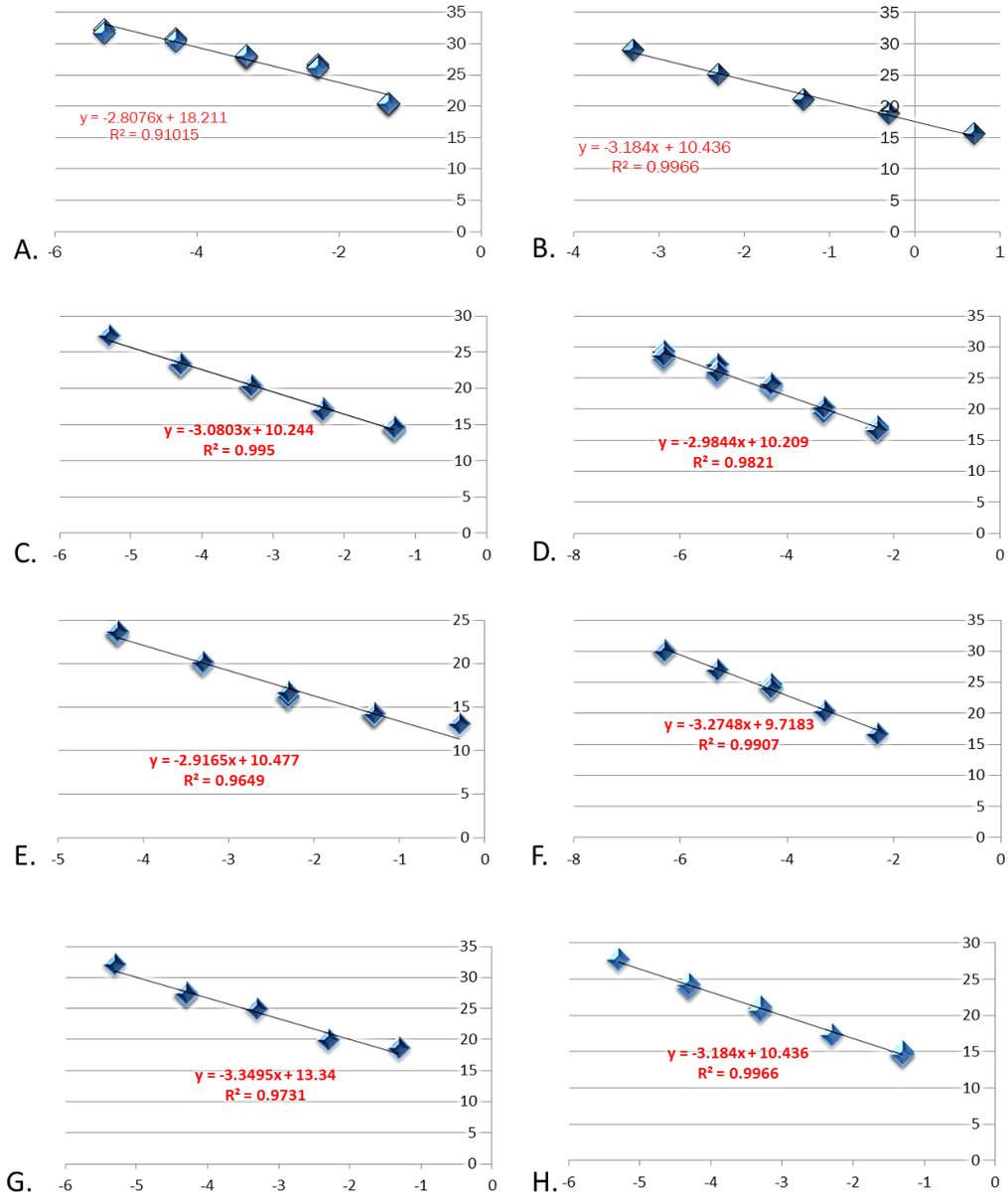


Figura 16. Validación de los oligonucleótidos diseñados. Gráficas con los valores de C_T de cada uno de los iniciadores ya estandarizados. Se graficaron los C_T obtenidos para cada uno de los genes contra el logaritmo de la concentración del cDNA, con valores de eficiencia y reproducibilidad cercanas al 100%. **A.** *Nanog*, **B.** *SOX2*, **C.** *SOX17*, **D.** *Pdx1*, **E.** *Insulina-1*, **F.** *Insulina-2*, **G.** *Glucagón*, **H.** *Ciclofilina*.

Evaluación de los cambios de expresión de los genes estudiados.

Una vez estandarizada y validada la PCR en tiempo real, se evaluaron los cambios de expresión relativa en los diferentes tiempos de diferenciación para los genes *Nanog*,

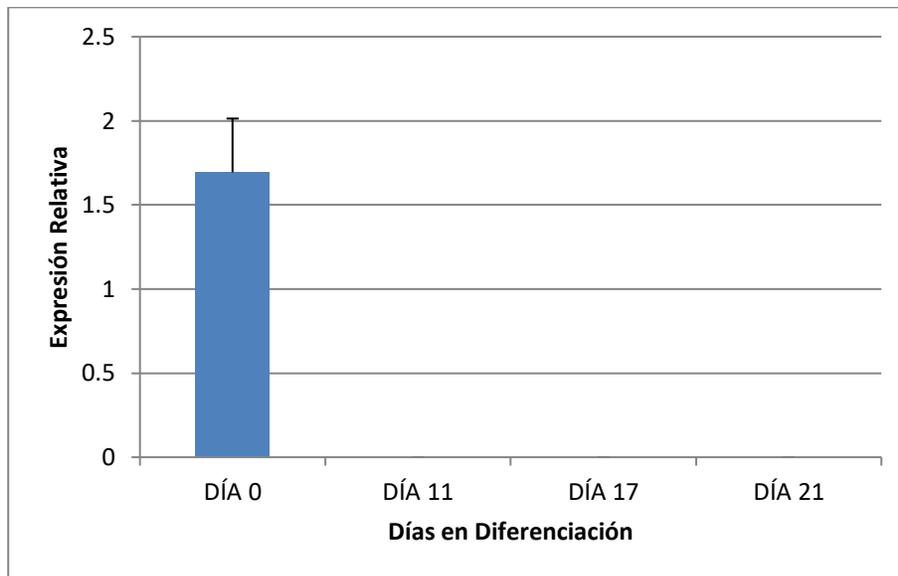
SOX2, SOX17, Pdx1, *Ins-1*, *Ins-2* y *gcg*. La tabla 2 resume los valores del promedio de expresión relativa (\bar{X}) y error estándar (EE) calculado con las réplicas realizadas para mESC indiferenciadas consideradas al día 0 y CPD a los días 11, 17 y 21 de diferenciación, así como el valor de “p” para cada uno de los genes analizados.

TABLA 2.
RESUMEN DE LOS VALORES DE EXPRESIÓN RELATIVA
EN DIFERENTES TIEMPOS DE DIFERENCIACIÓN

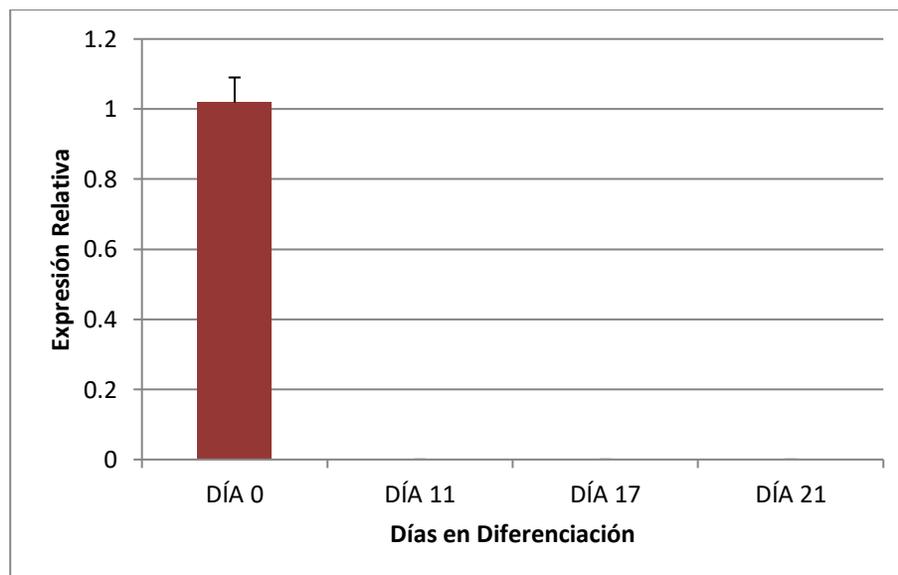
Gen	Día 0 ($\bar{X} \pm EE$)	Día 11 ($\bar{X} \pm EE$)	Día 17 ($\bar{X} \pm EE$)	Día 21 ($\bar{X} \pm EE$)
<i>Nanog</i>	1.6937 ± 0.3195	No se detectó el transcrito	No se detectó el transcrito	No se detectó el transcrito
	p < 0.001			
SOX2	1.0188 ± 0.0713	No se detectó el transcrito	No se detectó el transcrito	No se detectó el transcrito
	p < 0.001			
SOX17	0.9655 ± 0.1007	5.4799 ± 1.4050	0.2987 ± 0.2012	No se detectó el transcrito
	p < 0.001			
<i>Pdx1</i>	No se detectó el transcrito	0.9906 ± 0.1734	0.0037 ± 0.0001	No se detectó el transcrito
	p < 0.001			
<i>Ins-1</i>	No se detectó el transcrito	No se detectó el transcrito	1.4400 ± 0.4466	178 ± 52
	p < 0.001			
<i>Ins-2</i>	No se detectó el transcrito	No se detectó el transcrito	1.2990 ± 0.1456	114.1925 ± 20.49
	p < 0.001			
<i>gcg</i>	No se detectó el transcrito	0.0002 ± 0.00001	1.2196 ± 0.5265	46.35 ± 14.69
	p < 0.001			

Las expresiones relativas de *Nanog* y SOX2 se detectaron únicamente al día 0, expresándose 1.69 y 1.01 veces más respectivamente en comparación con los días 11,

17 y 21 de diferenciación, corroborando el estado de indiferenciación de las mESC (Gráficas 1 y 2).

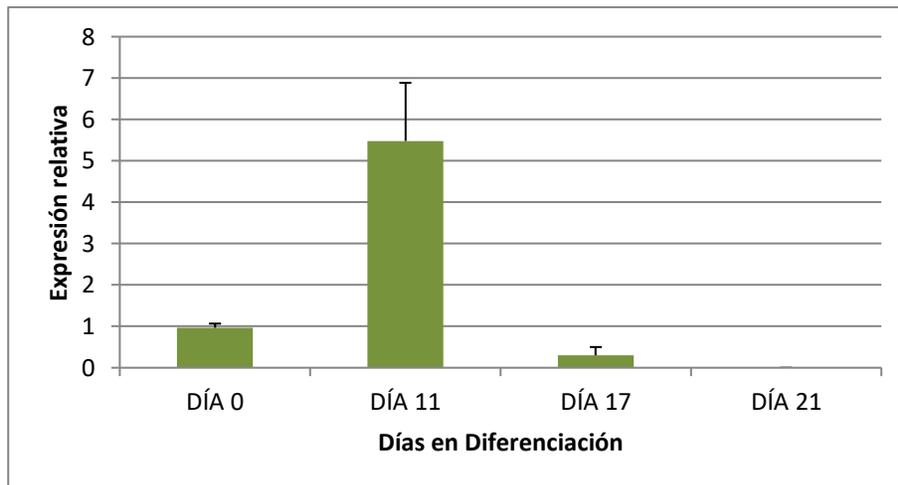


Gráfica 1. Expresión relativa del gen *Nanog*. Valores de la expresión relativa del gen *Nanog* a los días 0, 11, 17 y 21 de diferenciación.



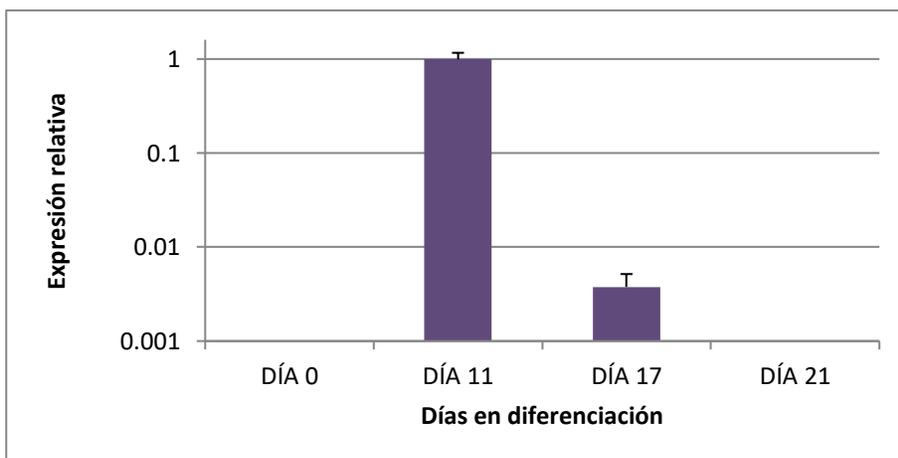
Gráfica 2. Expresión relativa del gen *SOX2*. Valores de la expresión relativa del gen *SOX2* a los días 0, 11, 17 y 21 de diferenciación.

En relación a *SOX17*, presento una expresión relativa de 0.96 veces al día 0 en las mESC, pero al día 11 de diferenciación, incrementó su expresión 5.47 veces más siendo la etapa de mayor expresión, disminuyendo a 0.29 veces al día 17 de diferenciación (Gráfica 3).



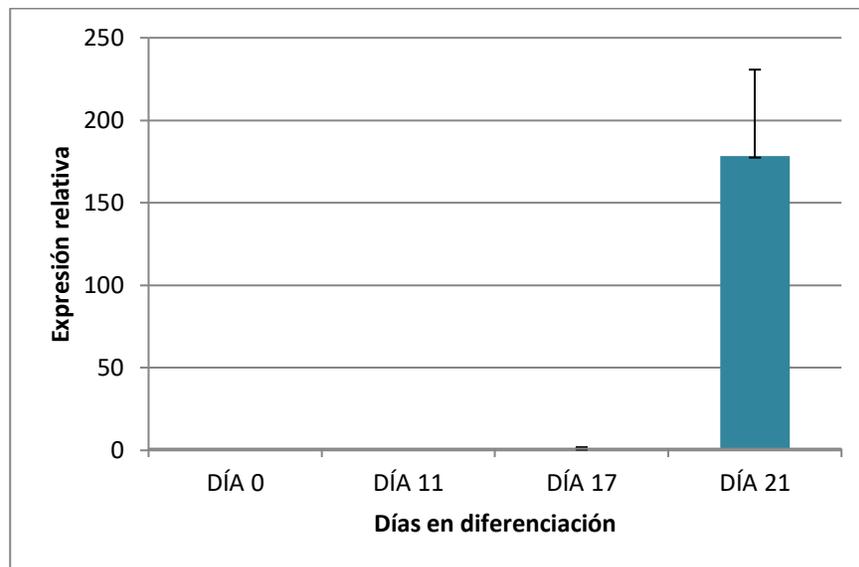
Gráfica 3. Expresión relativa del gen *SOX17*. Valores de la expresión relativa del gen *SOX17* a los días 0, 11, 17 y 21 de diferenciación.

La expresión relativa de *Pdx1* en las CPD, se presentó al día 11 de diferenciación siendo 0.99 veces más, disminuyendo a 0.003 veces al día 17 de diferenciación (Gráfica 4).

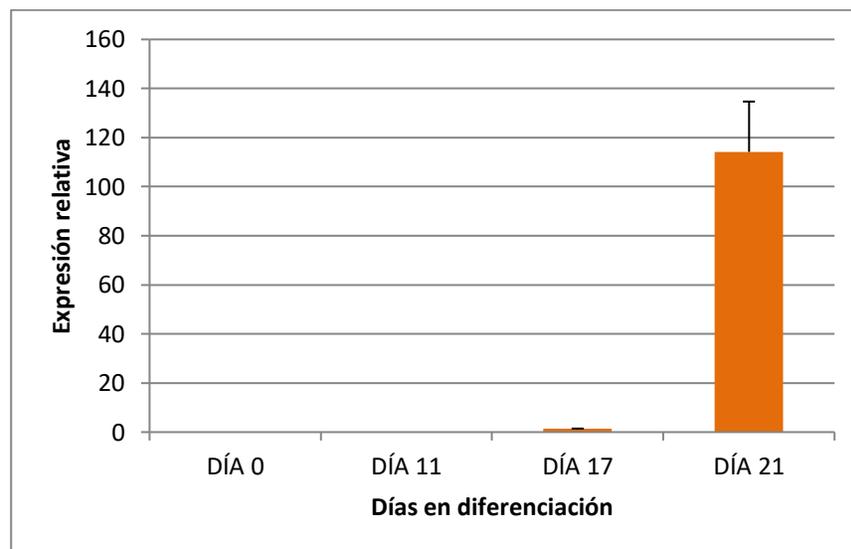


Gráfica 4. Expresión relativa del gen *Pdx1*. Valores de la expresión relativa del gen *Pdx1* a los días 0, 11, 17 y 21 de diferenciación.

Referente a las expresiones relativas de Insulina-1 e Insulina-2, se presentaron a partir del día 17 de diferenciación, expresándose 1.44 y 1.29 veces más respectivamente, aumentando considerablemente al día 21 de diferenciación, siendo 178 y 114 veces más respectivamente al final del protocolo de diferenciación (Gráficas 5 y 6).

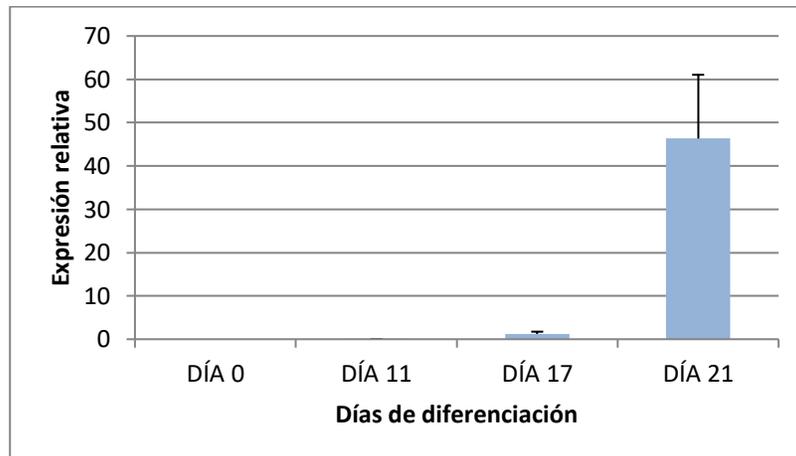


Gráfica 5. Expresión relativa del gen *Ins-1*. Valores de la expresión relativa del gen *Insulina-1* a los días 0, 11, 17 y 21 de diferenciación.



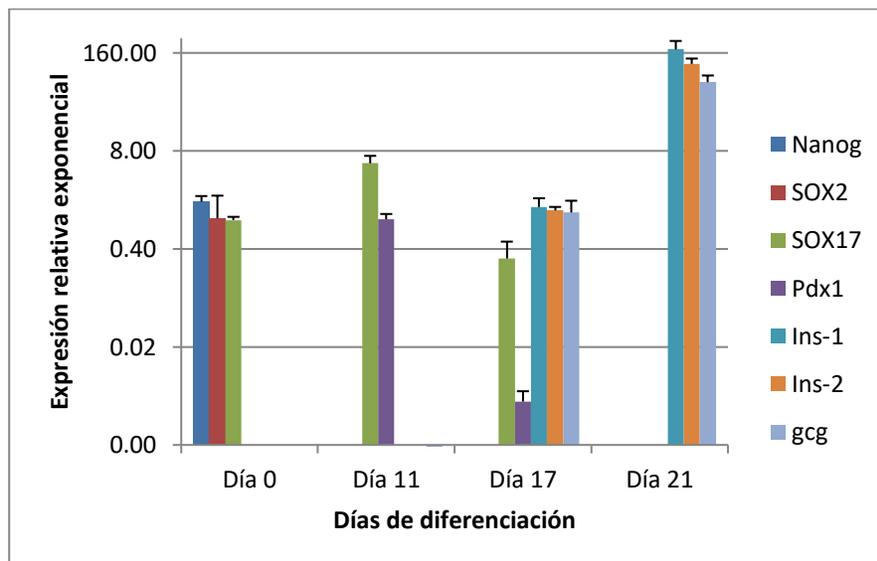
Gráfica 6. Expresión relativa del gen *Ins-2*. Valores de la expresión relativa del gen *Insulina-2* a los días 0, 11, 17 y 21 de diferenciación.

Respecto a la expresión relativa del gen *gcg*, al día 11 de diferenciación su expresión fue mínima de 0.002 veces, aumentando a 1.21 veces al día 17 de diferenciación y presentando la máxima expresión de 46.35 veces más al final del protocolo, es decir, al día 21 de diferenciación (Gráfica 7).



Gráfica 7. Expresión relativa del gen *gcg*. Valores de la expresión relativa del gen *glucagón* a los días 0, 11, 17 y 21 de diferenciación.

En la gráfica 8 se muestra el resumen de la expresión relativa de los genes estudiados a lo largo de la diferenciación.



Gráfica 8. Resumen de la expresión relativa de los genes analizados. Valores de expresión relativa de cada uno de los genes estudiados en los diferentes días de diferenciación.

F. ANALISIS FENOTÍPICO DE LAS mESC Y CPD MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE PROTEINAS.

Para demostrar la presencia de las proteínas (marcadores de pluripotencia) Nanog y SOX2 en mESC, así como las proteínas insulina y glucagón en CPD, fue necesario realizar las titulaciones de los anticuerpos primarios y secundarios, para lo cual se analizaron las preparaciones citológicas (mESC) e histológicas (páncreas de ratón) antes citadas de acuerdo a la metodología descrita, resultando las titulaciones más adecuadas las que se indican en la tabla 3.

TABLA 3.
CONCENTRACIONES ADECUADAS POSTERIOR A LA
TITULACIÓN DE LOS ANTICUERPOS

ANTICUERPOS	DILUCIÓN
Ab 1º de conejo contra Nanog	1:200
Ab 1º de conejo contra SOX2	1:250
Ab 1º de cobayo contra insulina	1:20
Ab 1º de conejo contra glucagón	1:50
Ab 2º conjugado anti conejo (488, Dylight)	1:200
Ab 2º conjugado anti cobayo (488, Alexa Fluor)	1:200

De acuerdo a las titulaciones realizadas y respecto a los marcadores de pluripotencia Nanog y SOX2 en mESC, en la figura 17 se muestran los controles negativos que descartan autofluorescencia en las mESC.

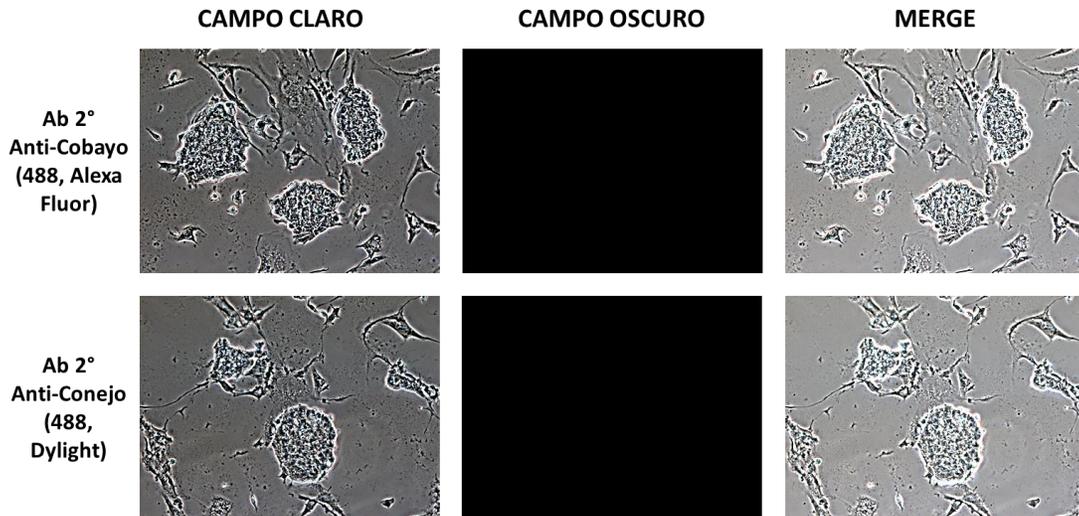


Figura 17. Ausencia de autofluorescencia en células madre embrionarias de ratón (mESC). Imagen representativa de ausencia de autofluorescencia (controles negativos) en mESC para los anticuerpos secundarios conjugados Anti-cobayo (488, Alexa Fluor) y Anti-conejo (488, Dylight), N=3, 100X.

En la figura 18, se muestran los controles positivos con lo que se comprueba la funcionalidad y marcaje de los anticuerpos contra Nanog y SOX2, así como el estado de pluripotencia de las mESC cultivadas.

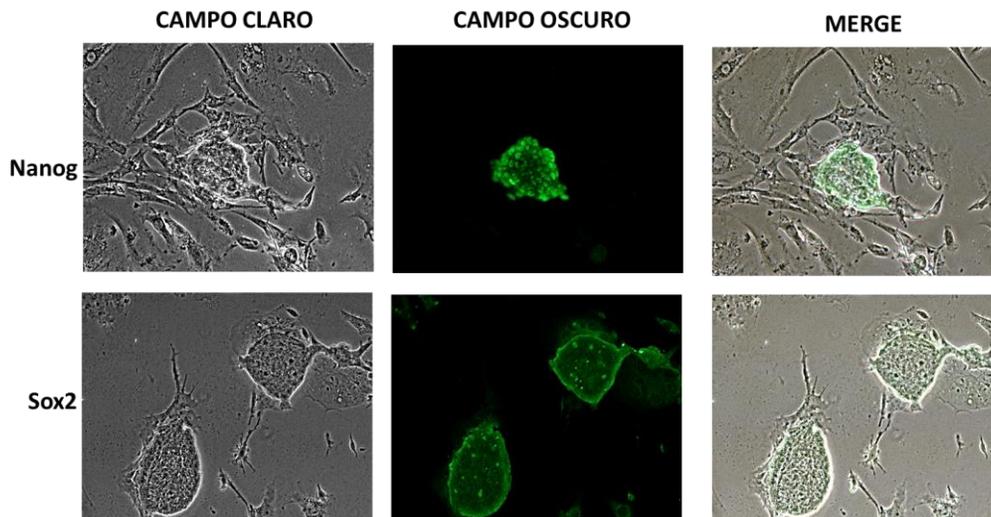


Figura 18. Inmunodetección de pluripotencia en células madre embrionarias de ratón (mESC). Imagen representativa de inmunodetección de las proteínas Nanog y SOX2 (marcadores de pluripotencia) en mESC cultivadas (488, Dylight), N=3, 100X.

Respecto a los resultados obtenidos de las titulaciones para las proteínas pancreáticas, la figura 19 representa los controles negativos en cortes histológicos de páncreas de ratón, descartando auto fluorescencia del tejido pancreático.

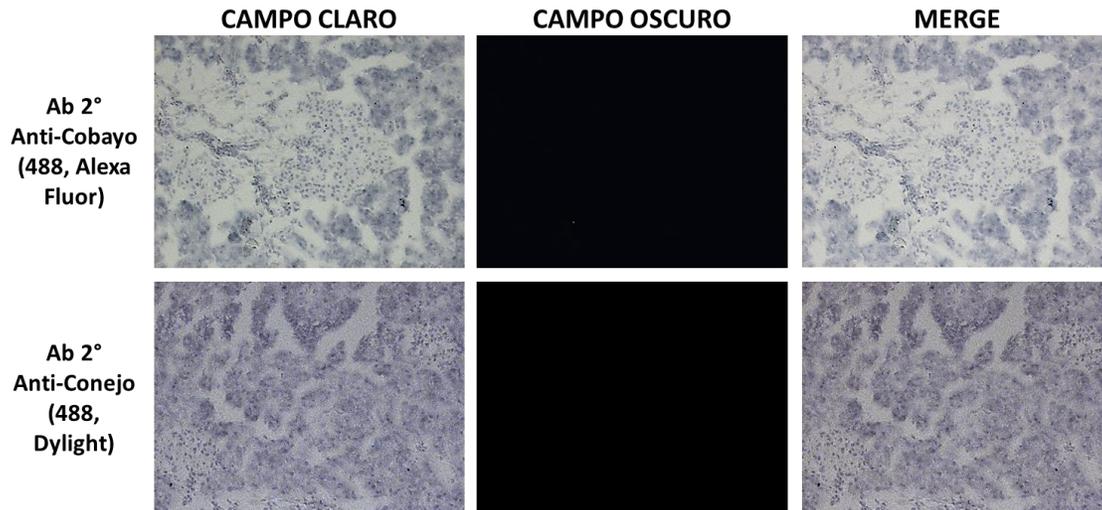


Figura 19. Ausencia de autofluorescencia en tejido pancreático. Imagen representativa de ausencia de autofluorescencia en tejido pancreático (controles negativos) para los anticuerpos secundarios conjugados Anti-cobayo (488, Alexa Fluor) y Anti-conejo (488, Dylight), N=3, 100X.

En la figura 20, se muestran los controles positivos durante la titulación en cortes histológicos de páncreas de ratón, demostrando la funcionalidad y el marcaje de los Abs primarios contra insulina y glucagón.

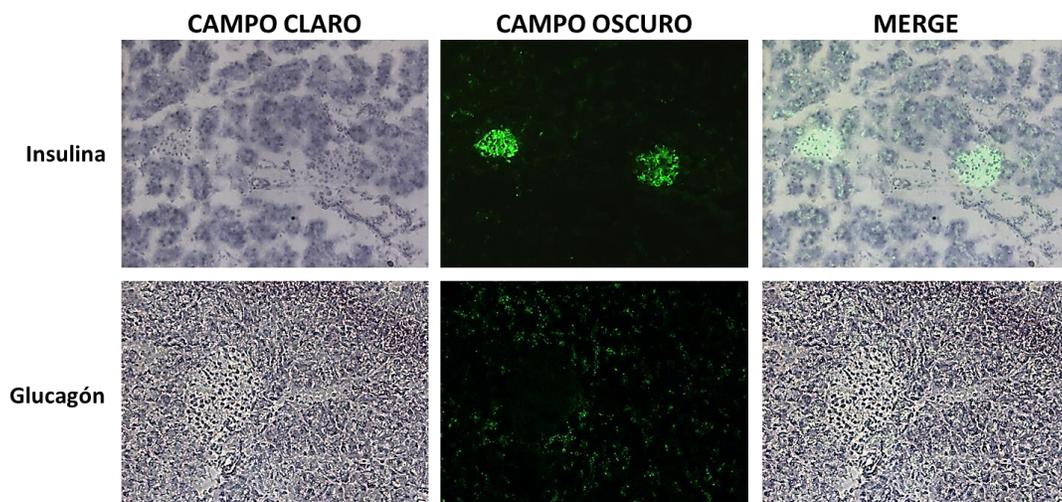


Figura 20. Inmunodetección de insulina y glucagón en tejido pancreático. Imagen representativa de inmunodetección (controles positivos) de las proteínas insulina y glucagón en cortes histológicos de páncreas de ratón, 100X.

Con las titulaciones adecuadas, se demostró la ausencia de la expresión de las proteínas pancreáticas insulina y glucagón en mESC (Figura 21) y, posteriormente, al someterlas a diferenciación se demostró la expresión de dichas proteínas en los EBs conformados por CPD a los 21 días de finalizado el protocolo de diferenciación (Figura 22).

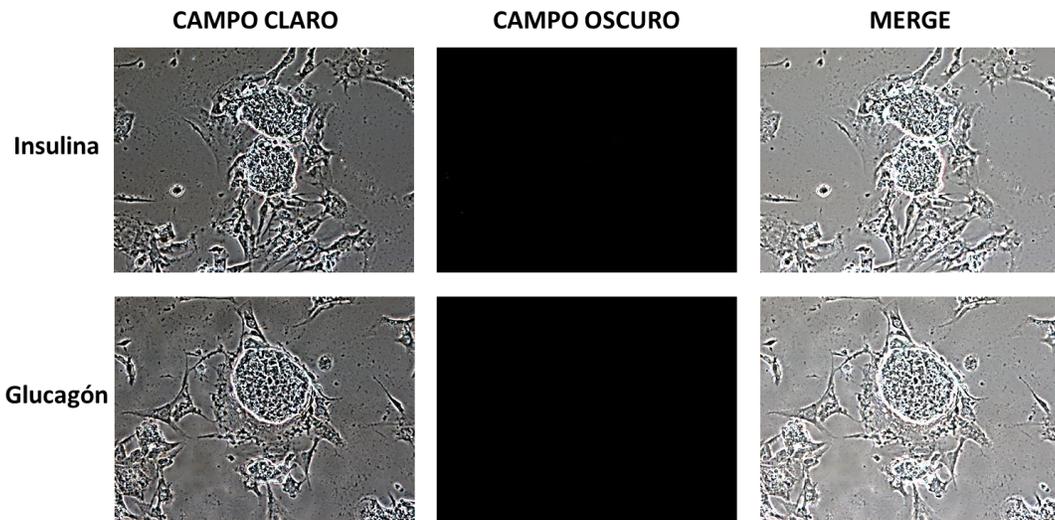


Figura 21. Ausencia de inmunodetección de insulina y glucagón en células madre embrionarias de ratón (mESC). Imagen representativa de ausencia de inmunodetección de las proteínas pancreáticas insulina y glucagón en mESC, N=3, 100X.

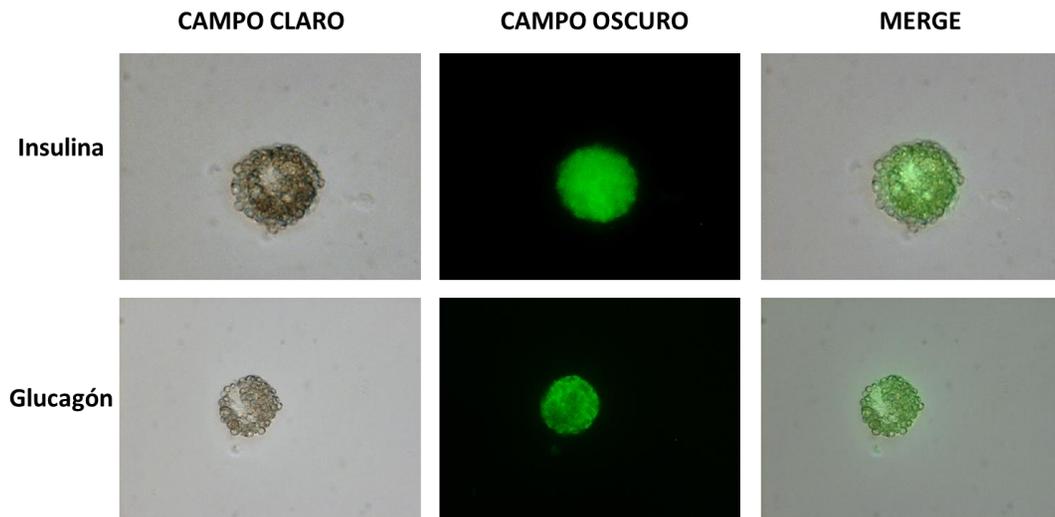


Figura 22. Inmunodetección de insulina y glucagón en células pancreáticas diferenciadas (CPD). Imagen representativa de inmunodetección de las proteínas insulina y glucagón en cuerpos embrionarios (EBs) conformados por CPD a partir de mESC, N=3, 400X.

En la figura 23 se muestran EBs conformados por CPD al día 21 de diferenciación, en los que se descarta inmunodetección de los marcadores de pluripotencia Nanog y SOX2, comprobándose la pérdida de pluripotencialidad en las CPD diferenciadas a partir de mESC.

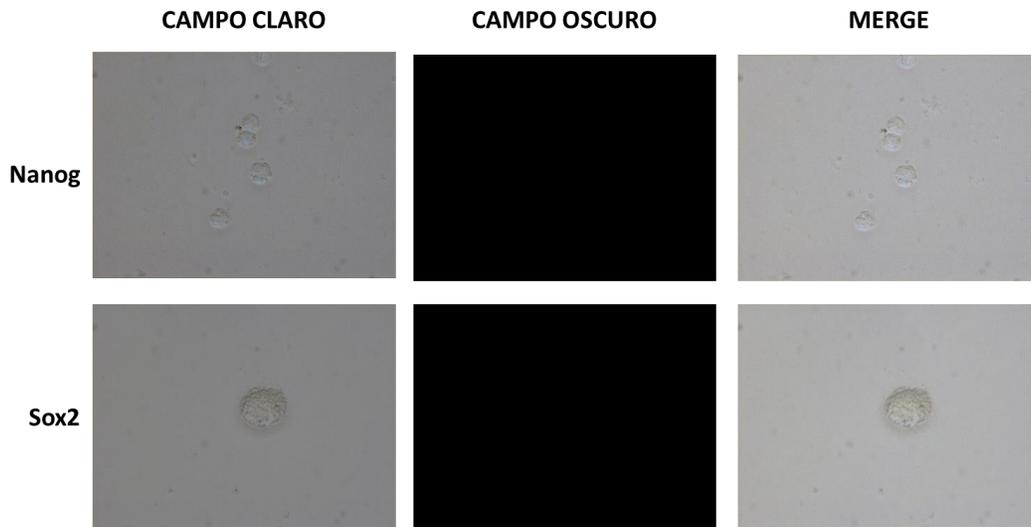


Figura 23. Ausencia de pluripotencialidad en células pancreáticas diferenciadas (CPD). Imagen representativa de ausencia de pluripotencialidad (Nanog y SOX2) en cuerpos embrionarios (EBs) conformados por CPD al día 21 de diferenciación, N=3, 400X.

Con los resultados del análisis fenotípico y congruentes con los resultados de expresión genética, se demostró el estado de pluripotencia de las mESC que se sometieron al proceso de diferenciación, y una vez finalizado este proceso, se pudo comprobar que los EBs conformados por CPD expresaron proteínas típicas de páncreas endócrino y dejaron de expresar proteínas de pluripotencia, con lo cual se demuestra genética y fenotípicamente el estado de indiferenciación o diferenciación de las células antes de someterlas al análisis espectroscópico FTIR.

G. ANALISIS DE ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL FTIR.

Respecto a los resultados FTIR de mESC y CPD en sus diferentes etapas de maduración (0, 11, 17 y 21 días), se observó en los espectros en crudo normalizados (Figura 24) bandas de absorción en el intervalo espectral de 1900 a 800 cm^{-1} (huella dactilar biológica), las cuales están asociadas con diferentes tipos de biomoléculas, incluyendo lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, característicos de muestras biológicas, encontrando diferencias en la composición estructural y bioquímica entre mESC y CPD.

En la figura 24, se observa la presencia de bandas de absorción a 1744 cm^{-1} relacionadas con las vibraciones de extensión del grupo éster C=O de lípidos, mientras que dos bandas intensas a 1650 cm^{-1} y 1540 cm^{-1} están relacionadas con los grupos funcionales amida I y amida II de proteínas respectivamente. Las bandas a 1454 cm^{-1} corresponden a los grupos metilo y metileno de lípidos y proteínas, en tanto las bandas a 1396 cm^{-1} se deben a las vibraciones de extensión COO⁻ de las cadenas laterales de aminoácidos. Las siguientes bandas a 1238 cm^{-1} y 1080 cm^{-1} están relacionadas con las vibraciones de extensión asimétricas y simétricas P=O de los grupos fosfodiéster PO₂ de moléculas fosforiladas. Enseguida, las bandas a 1030 cm^{-1} corresponden a la absorción de vibraciones C-O de glucógeno. Por último, las bandas en el intervalo de 992-986 cm^{-1} están asociadas con la cadena principal de fosfato ribosa, mientras que la banda a 966 cm^{-1} provienen de las vibraciones de extensión del esqueleto de DNA.

Los espectros crudos FTIR de mESC y CPD en sus diferentes días de diferenciación en las regiones amida I y amida II de proteínas entre 1700-1500 cm^{-1} se observan en la figura 25A. Se puede apreciar una disminución en la intensidad de la banda amida I a 1650 cm^{-1} (C=O estiramiento vibracional) en las CPD en comparación con la banda de

amida I correspondiente a mESC. Respecto a la banda amida II a 1540 cm^{-1} , se observa mayor intensidad y ensanchamiento de esta banda en las mESC con respecto a las CPD.

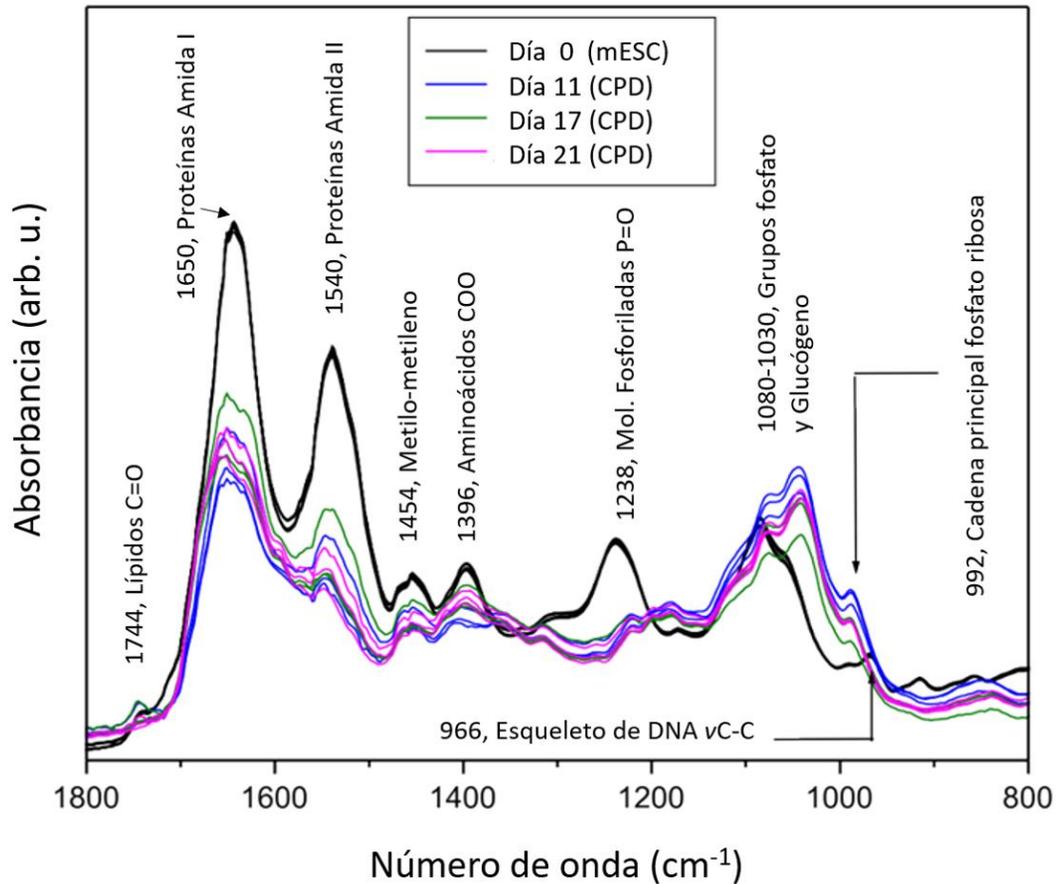


Figura 24. Análisis vibracional FTIR durante el proceso de diferenciación de células madre embrionarias de ratón (mESC) a células pancreáticas diferenciadas (CPD). Se aprecian cambios en las diversas bandas de absorción en las diferentes etapas de diferenciación (0, 11, 17 y 21 días), N=3.

Respecto a la segunda derivada de los espectros FTIR de mESC y CPD en la región amida I de proteínas entre $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ (Figura 25B), se observan bandas relacionadas con los componentes de la estructura secundaria de proteínas como giros β (1693 cm^{-1} y 1682 cm^{-1}), hélices α (1650 cm^{-1}) y láminas β (1634 cm^{-1}), los cuales son específicos y sensibles a cambios estructurales y conformacionales de las proteínas, apreciando un aumento en la intensidad de las bandas respectivas a giros- β y

disminución en la intensidad de las bandas de hélices- α y láminas- β en las CPD respecto a las mESC.

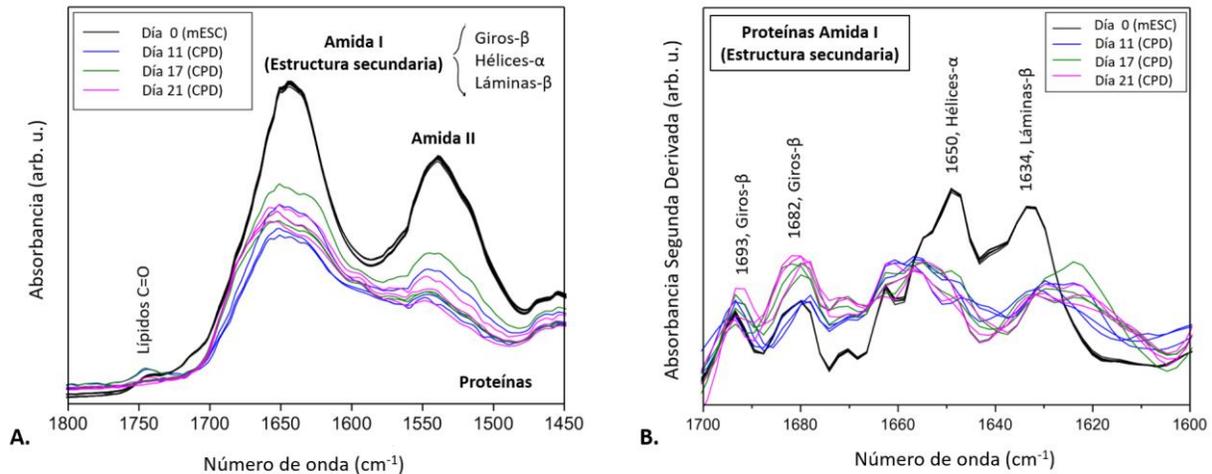


Figura 25. Análisis de los espectros vibracionales FTIR en las regiones de proteínas durante el proceso de diferenciación de células madre embrionarias de ratón (mESC) a células pancreáticas diferenciadas (CPD). Se observan cambios específicos en las diversas bandas de absorción en las diferentes etapas de diferenciación (0, 11, 17 y 21 días), N=3. **A.** Espectros crudos de las regiones amida I y amida II de proteínas, y **B.** Segunda derivada de los espectros de la región amida I de proteínas.

Referente a los espectros crudos de mESC y CPD en sus diferentes etapas de diferenciación en la región de carbohidratos y ácidos nucleicos (1100-850 cm⁻¹) (Figura 26A), se observan bandas anchas en el intervalo espectral de 1080-1030 cm⁻¹ que se pueden asociar con glucógeno y otros hidratos de carbono, cuya mayor intensidad se presenta en las CPD. Además, se observan bandas superpuestas a 992 cm⁻¹ (cadena principal de fosfato de ribosa) y 986 cm⁻¹ (estiramiento vibracional C-C de la columna vertebral del DNA) en las CPD. Así mismo, la banda asociada con el estiramiento vibracional C-C de columna vertebral del DNA en las mESC, se encuentran a 966 cm⁻¹, y otra banda a 914 cm⁻¹ debido a la vibración del anillo de ribosa el cual está ligeramente más aumentada en estas células.

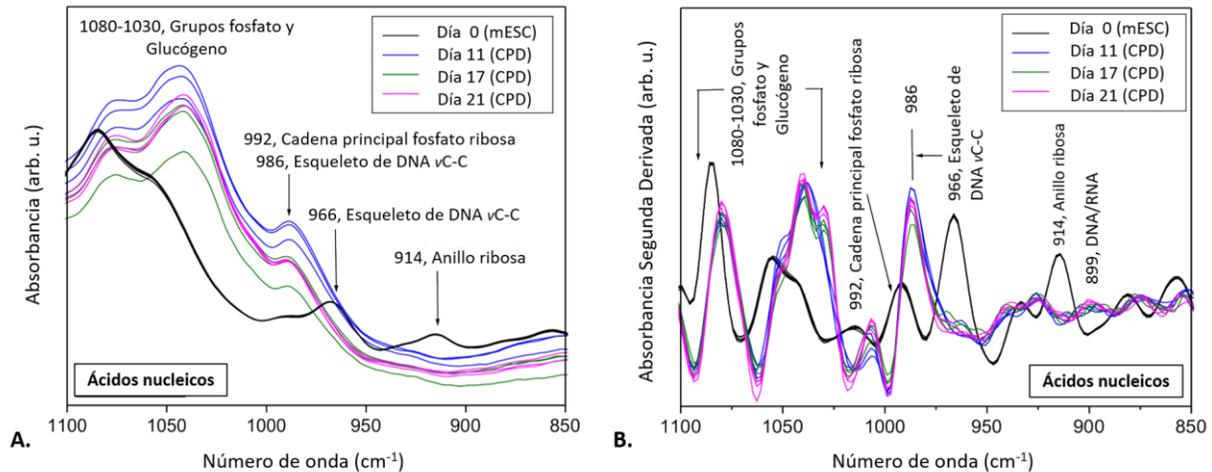


Figura 26. Análisis de los espectros vibracionales FTIR en la región de ácidos nucleicos durante el proceso de diferenciación de células madre embrionarias de ratón (mESC) a células pancreáticas diferenciadas (CPD). Se observan cambios específicos en las diversas bandas de absorción en las diferentes etapas de diferenciación (0, 11, 17 y 21 días), N=3. **A.** Espectros crudos, y **B.** Segunda derivada de absorbancia.

Respecto a la segunda derivada en la región de carbohidratos y ácidos nucleicos (Figura 26B), se observó un incremento significativo en la intensidad de las bandas correspondientes a los grupos fosfato y glucógeno entre 1080 y 1030 cm^{-1} en las CPD y una disminución significativa en las bandas correspondientes a la vibración de la cadena principal de fosfato ribosa (992 cm^{-1}) y al anillo de ribosa (914 cm^{-1}) en las mESC al someterlas al proceso de diferenciación pancreática. Así mismo, también se apreció en las CPD un desplazamiento y aumento de la intensidad en las bandas correspondientes a las vibraciones de extensión del esqueleto de DNA (986 cm^{-1}) así como la banda espectral a 899 cm^{-1} correspondiente a DNA/RNA.

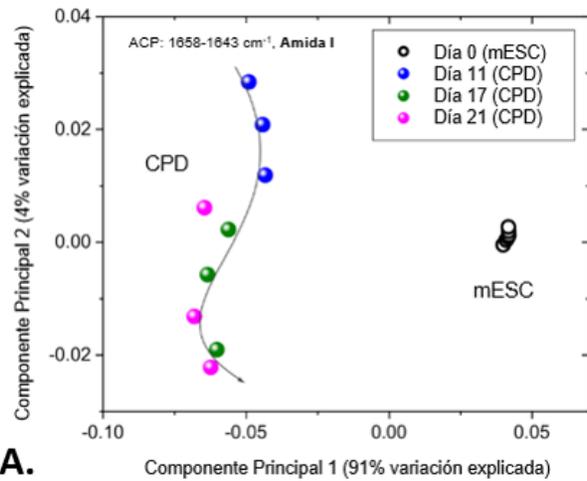
Finalmente, con los espectros tratados y calculados en segunda derivada, se utilizaron los datos espectrales de la región amida I de proteínas (1700-1600 cm^{-1}) así como de la región de carbohidratos y ácidos nucleicos (1100-850 cm^{-1}) para realizar el análisis multivariado de ACP (Figura 27). Este ACP nos facilitó el procesamiento para identificar

y evidenciar los cambios espectrales más significativos durante la diferenciación; en nuestro caso, la segunda derivada de los espectros de mESC y CPD en sus diferentes etapas de diferenciación, fue utilizada para proporcionar mayor precisión al ACP.

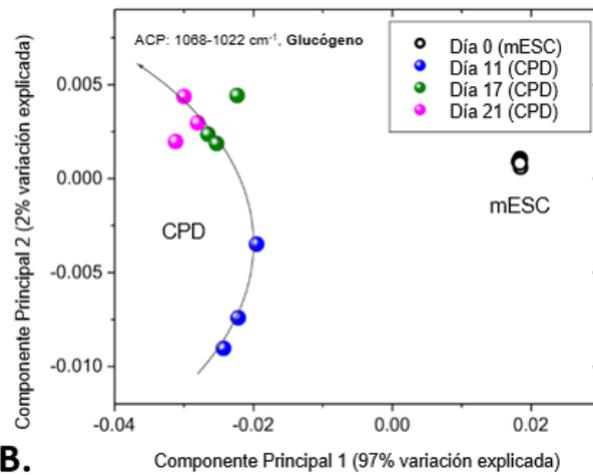
Se obtuvieron gráficas de puntuación en las siguientes regiones: región amida I de proteínas correspondiente a las hélices α (1658-1643 cm^{-1}) (Figura 27A), región de grupos fosfato y carbohidratos correspondiente al glucógeno (1068-1022 cm^{-1}) (Figura 27B), y región de ácidos nucleicos correspondiente a fosfato ribosa (1005-975 cm^{-1}) (Figura 27C). Se observa en las gráficas de puntuación de las tres regiones una clara discriminación entre datos asociados a mESC con respecto a los de CPD. Además de lo anterior, los datos asociados a CPD en las tres regiones espectrales analizadas pudieron ser agrupados en trayectorias, cuya magnitud del segundo componente principal determina la discriminación en las diferentes etapas del proceso de diferenciación de mESC a CPD. Esta discriminación resulta muy evidente en la tercera gráfica de puntuación correspondiente a la región de fosfato ribosa (1005-975 cm^{-1}).

Con los resultados presentados previamente de la caracterización genética, fenotípica y espectroscópica de mESC y CPD, se demuestra la factibilidad y precisión de obtener y caracterizar células especializadas a partir de SC, con la finalidad de evaluar en trabajos posteriores su empleo en modelos animales, de manera que se pueda determinar las características y condiciones ideales para proponer terapia celular mediante implante de células indiferenciadas o diferenciadas a un linaje específico.

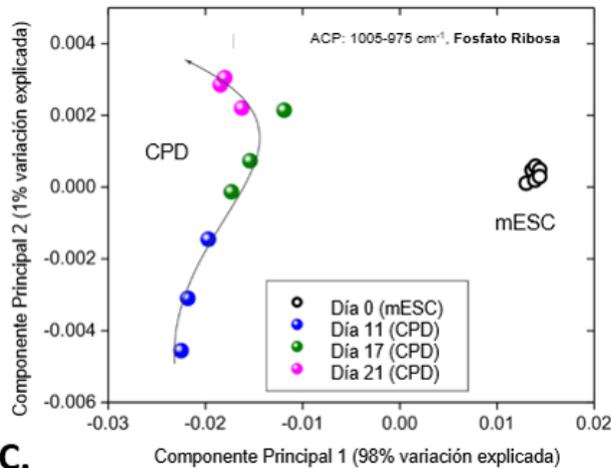
En nuestro caso, se propondrá la evaluación del implante de mESC y CPD en un modelo murino con Diabetes.



A.



B.



C.

Figura 27. Gráficas de puntuación del Análisis de Componentes Principales en células madre embrionarias de ratón (mESC) y células pancreáticas diferenciadas (CPD). Gráficas de puntuación obtenidas a partir de los espectros FTIR en las diferentes etapas de diferenciación (11, 17 y 21 días), en tres regiones (N=3). **A.** Hélices α de proteínas. **B.** Glucógeno. **C.** Cadena principal de Fosfato Ribosa.

H. MODELO DIABÉTICO MURINO.

Perfil bioquímico sérico normal.

Los resultados de los valores bioquímicos normales de ratón, obtenidos en el análisis del perfil bioquímico sérico se muestran en la tabla 4.

TABLA 4.
PARÁMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS NORMALES DE RATÓN NIH

QUIMICA CLINICA DE 6 ELEMENTOS	PROMEDIOS ± DESV. EST. (mg/dl)
GLUCOSA	162.5 ± 22.8
CREATININA	1.0 ± 0.1
UREA	85 ± 18.8
COLESTEROL	114 ± 16.8
TRIGLICÉRIDOS	113 ± 27.4
ACIDO ÚRICO	2.3 ± 1.4

Efectos bioquímicos con STZ.

Se inició la estandarización del modelo diabético en ratones NIH a una dosis de 150 mg/Kg, obteniendo una glucemia promedio de 336 ± 267 mg/dl con una eficiencia para inducir DM del 60%.

Posteriormente, se utilizó una dosis de STZ de 175 mg/kg, obteniendo glucemia promedio de 776 ± 94 mg/dl, con una eficiencia del 100% y sin presentar letalidad en los primeros 10 días postinducción.

Con lo anterior, podemos resumir en la tabla 5 los niveles de glucemia obtenidos al estandarizar la dosis de STZ óptima para inducir Diabetes en el modelo murino, con una eficiencia del 100% y una letalidad en los primeros 10 días de inducción del 0%.

TABLA 5.
ESTANDARIZACIÓN DE LA DOSIS DIABETOGÉNICA CON ESTREPTOZOTOCINA
VÍA INTRAPERITONEAL EN RATONES NIH

DOSIS (mg/kg)	n	GLUCEMIA PROMEDIO ± SD (mg/dl)	EFICIENCIA (%)	LETALIDAD
150	10	336 ± 267	60%	0%
175	10	776 ± 94	100%	0%

Respecto a la química clínica de 6 elementos, los resultados promedio obtenidos antes y 3 días después de la administración de STZ se muestran en la tabla 6.

TABLA 6.
COMPARATIVO DE LA QUÍMICA CLÍNICA DE 6 ELEMENTOS ANTES Y DESPUES DE LA
ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE STZ EN RATONES NIH

ELEMENTO	PROMEDIO	DESV. EST.
GLUCOSA	162.5	22.8
GLUCOSA POSTINYECCION	776.2	94.0
CREATININA	1.0	0.1
CREATININA POSTINYECCION	1.0	0.3
BUN	85.2	18.8
BUN POSTINYECCION	93.6	40.7
ACIDO URICO	2.3	1.4
ACIDO URICO POSTINYECCION	7.8	1.9
TRIGLICERIDOS	113	27.4
TRIGLICERIDOS POSTINYECCION	519.2	251
COLESTEROL	114.5	16.8
COLESTEROL POSTINYECCION	126.8	46.7

Análisis estadístico.

Se realizó el análisis estadístico mediante una prueba de t pareada con el programa SPSS, con la finalidad de correlacionar los resultados de la química clínica de 6 elementos y evaluar si hubo cambios significativos tras la inducción del modelo diabético murino con STZ. Los resultados mostrados en la figura 28 indican que la glucosa y los triglicéridos fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

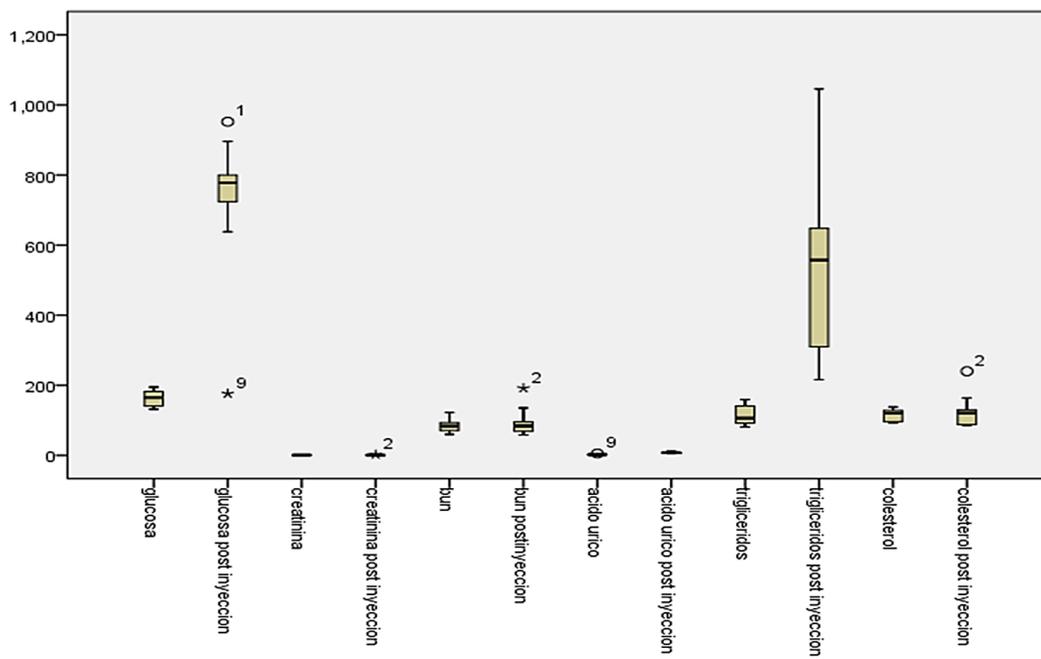


Figura 28. Diagrama de caja de la prueba t pareada del análisis bioquímico de 6 elementos en el modelo diabético murino. Prueba t pareada donde se observa diferencias significativas en glucosa y triglicéridos al administrar STZ para la inducción del modelo diabético murino.

Con los resultados presentados, observamos que la inducción de Diabetes en ratones NIH utilizando STZ, nos demuestra datos de insuficiencia pancreática y hepática caracterizados por hiperglucemia e hipertrigliceridemia, parámetros que podrán evaluados bioquímicamente posterior al implante celular de mESC y CPD en futuros trabajos.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

La investigación con SC y las características de los diferentes tipos celulares de acuerdo a su potencialidad, han abierto diversos campos de investigación en todo el mundo con la finalidad de obtener una fuente regenerativa o de reemplazo para células y tejidos dañados por enfermedades o degeneración biológica.

Recientes investigaciones en la última década, se han dirigido a la generación de células productoras de insulina utilizando sistemas de cultivo a partir de ESC y EBs⁶⁵ para proveer células trasplantables y útiles como herramienta terapéutica en enfermedades como la Diabetes.

Sin embargo, en nuestro país existen escasos grupos de investigación que trabajan con ESC ya sea para expansión o diferenciación hacia las 3 líneas germinales, por lo que en este trabajo propusimos una línea de investigación utilizando este tipo celular para diferenciación a endodermo y posteriormente a células pancreáticas diferenciadas productoras de insulina y glucagón, basándose en protocolos realizados en laboratorios internacionales^{65,71} pero caracterizando todo el proceso de diferenciación integralmente utilizando técnicas moleculares, microscópicas y espectroscópicas.

Basándose en trabajos de Smith y Hooper (1987) y Keira y cols. (2004), se emplearon MEFs de la línea celular STO, ya que refieren la secreción de LIF que ayuda a mantener las características esenciales de las ESC de ratón destacando la pluripotencialidad. De acuerdo a sus reportes se utilizó para su crecimiento el DMEM suplementado con FBS, obteniendo resultados similares de expansión al pasar los MEFs cada tercer día y observar la morfología fusiforme típica del fibroblasto⁷².

Una vez que se contó con MEFs para la monocapa celular, fue necesario arrestarlos de su ciclo celular para lo cual de acuerdo con la patente de Hernández y cols. (2008) se empleó mitomicina C, corroborando resultados similares al obtener conteos celulares mínimos a los 15 días de haber expuesto los MEFs a la mitomicina⁷³.

Posteriormente, sobre la monocapa celular de MEFs, se expandieron mESC de acuerdo al protocolo sugerido por ATCC y técnicas de cultivo similares a las utilizadas por Evans y Kaufman (1981), obteniendo resultados semejantes publicados por éstos últimos observando que las mESC crecieron en colonias y que una colonia de mESC se puede derivar a partir de una célula madre⁶⁵.

Las mESC una vez expandidas, se sometieron al proceso de diferenciación utilizando como referencia protocolos sugeridos por Hsun Teresa Ku y cols. (2004) así como Lumelsky y cols. (2001). Sin embargo, hubo una diferencia en nuestras condiciones de cultivo comparada con la de estos autores, consistiendo en la densidad celular sembrada al inicio del protocolo, ya que sugieren que el cultivo se inicie a una densidad de 5,000 células/ml, lo cual resultó con falta de adherencia de las células a la caja de cultivo, así como la unión entre ellas mismas y conllevando a la muerte celular en las primeras 24 horas de cultivo, por lo que se decidió aumentar esta densidad celular hasta llegar a una densidad de 250,000 células/ml, densidad con la cual se logró obtener resultados similares a los de Hsun Teresa Ku (2004) y otros autores consistentes en la formación de grupos tridimensionales dentro de las primeras 48 horas de diferenciación, los cuales se han nombrado cuerpos embrionarios⁶⁵.

Concordando también con las características morfológicas descritas por Dvash (2004), inicialmente los cuerpos embrionarios son paquetes celulares densos que están rodeados por una sola capa de células parecidas a las endodérmicas; esta capa llega a

ser cavitada y adicionalmente se acumula un fluido. El EB cístico resultante es producto de una diferenciación espontánea y posteriormente se forma un EB maduro que contiene diversos tipos celulares⁷⁴, como en este trabajo se dirigió su diferenciación hacia células pancreáticas.

Con lo anterior se postula al igual que lo reportado por Liu y cols. (2011), que la falta de unión entre las mESC sometidas al proceso de diferenciación, se debe a la baja densidad celular la cual provoca que la comunicación intercelular sea débil, produciendo células apoptóticas y posterior muerte celular, ya que como mencionan estos autores, las SC transmiten señales a través de su matriz extracelular y al entrar en contacto directo secretan factores solubles que se concentran localmente⁷⁵.

Para la diferenciación a CPD productoras de insulina y glucagón, se utilizaron factores específicos de diferenciación para células β productoras de estas proteínas, basándonos en estudios de Hsun y cols. (2004) así como de Liu Ge-Ling y cols (2010), los cuales utilizaron nicotinamida, exedina-4 y activina B estableciendo tiempos específicos durante el cultivo de diferenciación. Con la incorporación de estos factores se obtuvieron resultados congruentes a lo reportado por los autores, específicamente la obtención de una línea endodérmica y su diferenciación a CPD con producción de proteínas intracelulares como glucagón e insulina^{65, 68}.

Una vez estandarizados los métodos para cultivo, expansión y diferenciación de mESC a CPD, se procedió a cuantificar la expresión relativa de cada uno de los transcritos (*ppia*, *Nanog*, *SOX2*, *SOX17*, *Pdx1*, *Ins-1*, *Ins-2* y *gcg*) comparándolas a los días 0, 11, 17 y 21 de diferenciación. Primeramente, los marcadores de pluripotencia *Nanog* y *SOX2* se expresaron en las mESC al día 0 en su estado indiferenciado al igual que lo que refiere Takashi y Yamanaka (2006) y Chen y cols. (2008), entre otros; durante la embriogénesis

temprana, *Nanog* y *SOX2* se encuentran coexpresados en las células pluripotentes de la mórula, la masa celular interna, células del epiblasto y células germinales; sin embargo, la expresión de pluripotencialidad disminuye cuando las mESC comienzan a diferenciarse hasta que pierden su estado de pluripotencia y *Nanog* es completamente suprimido^{13, 14, 76}, resultados que coinciden con lo observado en este trabajo al dejar de expresarse *Nanog* y *SOX2* después de iniciar la diferenciación.

Respecto a la expresión de *SOX17* el cual es un determinante endodérmico y en ratones participa en la organogénesis y formación del tubo digestivo primitivo que originará el páncreas, entre algunos otros órganos viscerales⁷⁷, observamos que este gen se expresó desde el día 0 y tuvo su máxima expresión al día 11, dejándose de expresar al día 17; esto nos hace pensar que una vez que se logró diferenciar un tipo celular específico, en este caso CPD, deja de expresarse *SOX17*, coincidiendo con lo que expresan Young y cols. en el 2007 sobre las HSC fetales, las cuales expresan este gen; sin embargo, las HSC neonatales van disminuyendo su expresión gradualmente hasta dejar de expresarse al día 8 después del nacimiento⁷⁸.

De igual forma coincidimos en parte con Teresa Ku (2004), en donde la expresión de *SOX17* en las diferentes líneas celulares de ESC que utilizaron, alcanzaron su máximo pico de expresión al día 6 de diferenciación; nosotros no analizamos la expresión en el día 6, pero coincide con la expresión endodérmica referida al día 11 de diferenciación y además reportamos la disminución y desaparición de la expresión una vez que se obtienen CPD⁶⁵.

El siguiente gen que analizamos fue *Pdx1*, el cual es un factor de transcripción esencial para el desarrollo del páncreas, para la diferenciación de células β y para el mantenimiento de la función y regulación de células β maduras^{79, 80}, por lo que al

expresarse este gen, pudimos comprobar que el resultado en la trayectoria de la diferenciación era correcto, ya que sin la expresión de *Pdx1*, es imposible la diferenciación a células pancreáticas, enfatizando la importancia de este gen en la organogénesis del páncreas. Los resultados analizados de este gen fueron satisfactorios, ya que al día 11 de diferenciación se detectó una mayor expresión que al día 17, con lo que corroboramos la presencia de células pancreáticas progenitoras y/o epitelio pancreático temprano, que puede dar lugar a su vez células exocrinas, endocrinas y ductales. Sin embargo, es de gran importancia mencionar que la expresión de *Pdx1* en nuestra investigación fue disminuyendo hasta dejar de detectarse, al igual que en el trabajo realizado por Teresa Ku (2004), en donde la expresión persistió hasta el día 15 en los EBs. Es decir, la parte temporal de la expresión de este gen en la organogénesis está bien entendida, pero recordemos que *Pdx1* tiene otra función que es regular la función de células β maduras, por lo que, al dejarse de expresar este gen, intuimos que las células que estamos produciendo podrían ser células pancreáticas tempranas.

Referente a la expresión de los genes *Ins-1* e *Ins-2*, los ratones expresan dos genes de insulina no alélicos (genes I y II)⁸¹. Ambos genes se expresan en múltiples sitios durante el desarrollo del ratón; las neuronas expresan únicamente insulina II, el páncreas expresa ambas insulinas y, el hígado fetal y el saco vitelino expresan predominantemente insulina II⁶⁵. Dado que en el páncreas se expresan los dos genes de insulina, en este trabajo decidimos analizar la expresión relativa de ambos genes, los cuales se regulan de manera similar. Estudios en ratas han demostrado que los mRNA de ambas proinsulinas I y II están presentes en el día 15 o 16 del desarrollo embrionario y aumenta drásticamente a las 16 semanas después del nacimiento. En el ratón, el páncreas se deriva de dos evaginaciones duodenales (ventral y dorsal) a los días 9.5 y 10.5 de

gestación respectivamente. La evaginación coalece al día 11 y la insulina se ha detectado al día 11.5. En los estudios realizados por Deltour y cols. (1993) en embriones a los días 9.5 y 10.5, hubo menos mRNA de proinsulina II que I; al día 11.5 la diferencia fue menor y empezando el día 12.5, se invirtió la proporción, es decir, hubo más mRNA de proinsulina II que proinsulina I, como en el páncreas adulto⁸². De acuerdo al análisis genético en este trabajo, la expresión de *Ins-1* al día 17 de diferenciación fue ligeramente mayor que *Ins-2*, pero al día 21 de diferenciación, la diferencia fue aún mayor, lo que podría confirmar al igual que Deltour y cols. (1993), que las células que diferenciamos son células pancreáticas tempranas, coincidiendo además nuestros resultados con los de Teresa Ku (2004), ya que ella en sus resultados manifiesta que *Ins-1* se expresó hasta después de 11 días de diferenciación.

Tras la unión a su receptor, la insulina induce la dimerización del receptor y la activación de una cascada de fenómenos: efectos metabólicos que fomentan el transporte de glucosa, síntesis de glucógeno y proteínas, inhibición de la lipólisis, protección contra la apoptosis y liberación de óxido nítrico⁸³, por lo que al expresarse estos genes en las células que se han diferenciado, intuimos que también en ellas se podrán llevar a cabo estas funciones; sin embargo, será necesario determinar posteriormente que haya receptores para insulina.

El gen *gcg* estimula la producción de glucosa en el hígado durante periodos de ayuno para mantener los niveles de glucosa plasmática en el estado post-absortivo⁸⁴. En trabajos anteriores no fue posible la comprobación fehaciente de la expresión de *gcg* y, los resultados que se obtuvieron fueron aislados y no reproducibles⁸⁵. por lo que en este trabajo obtuvimos páncreas de ratones en ayuno con los cuales se hicieron los análisis genético y proteico, evidenciando la expresión de este gen desde el día 17 para aumentar

considerablemente al final del protocolo de diferenciación, por lo que deducimos que nuestras CPD expresan y producen glucagón similar a lo reportado por autores como Teresa Ku (2004).

Posterior a los ensayos de RT-qPCR, se realizó tinción para inmunofluorescencia en las mESC y DPC. Se ha informado de que Oct4, SOX2 y Nanog son marcadores típicos de pluripotencia que mantienen la pluripotencialidad tanto en embriones tempranos como en ESC¹⁴, razón por la cual en este trabajo buscamos la expresión de Nanog y SOX2 en mESC (día 0 de diferenciación), demostrando que nuestros cultivos de ESC expresaron estas proteínas, lo que confirmó su estado de pluripotencia. Posteriormente, como se esperaba, estos marcadores de pluripotencia eran indetectables en las CPD al día 21 de diferenciación.

Una vez terminado el protocolo de diferenciación y referente a la inmunofluorescencia, nuestros resultados fueron parecidos a lo reportado por Jiang y cols. (2007) al igual que Chialin Chen y cols. (2011)^{66, 70}, los cuales evaluaron la producción de insulina y glucagón a partir del día 20 de diferenciación, observando la inmunodetección similar a lo reportado en este trabajo. Cabe mencionar que la producción de insulina como lo hemos reportado en otro trabajo, es mayor comparándola con la producción de glucagón, lo cual no ha sido especificado en la mayoría de los trabajos reportados, por lo que se puede proponer que esta diferencia en la producción de las proteínas se debe a que las células pancreáticas endócrinas no están conformadas por un número equitativo *in vivo*, y posiblemente esta tendencia también se manifieste *in vitro*, como ha sido descrito por diferentes biólogos celulares en tratados de histología (Figura 2)^{40, 41, 85}.

Además es importante destacar, que Chialin y cols. (2011) mediante citometría de flujo reportan que el cambio en el tamaño de las mESC en comparación con las CPD no es

significativo, sin embargo, la complejidad entre ambas células si lo fue, al igual que lo observado en trabajos anteriores⁸⁵, por lo que postulamos que las mESC poseen características específicas relacionadas a su indiferenciación como es la baja complejidad, pero a medida que va aumentando su diferenciación y con ello su especialización en alguna línea celular específica, la complejidad aumenta de acuerdo al grado de madurez que logren alcanzar.

Con lo anterior podemos postular que el protocolo de diferenciación que se desarrolló utilizando factores de inducción y diferenciación para células β , produce células endócrinas productoras de insulina y glucagón, a diferencia de lo que enfatizan diversos trabajos con sistemas de cultivo similares, donde la importancia de sus resultados se enfoca a mencionar y referir solamente células β productoras de insulina, lo cual puede proponerse como CPD como se establece en este trabajo.

Respecto a las propiedades químicas y estructurales de las mESC y CPD analizadas mediante espectroscopia vibracional FTIR, fue posible confirmar la presencia de bandas de absorción relacionadas a diversos grupos funcionales característicos de muestras biológicas, las cuales se encontraron en el intervalo vibracional de 1900 a 800 cm^{-1} .

El espectro FTIR obtenido de mESC fue muy similar al espectro reportado por Cao y cols. (2013) y Ami y cols. (2008)^{86, 87}. Una vez diferenciadas éstas células, se observaron cambios marcados en las intensidades y frecuencias de las bandas de absorbancia entre mESC y CPD, particularmente en las bandas de proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, lo que refleja las diferencias estructurales entre estos linajes celulares. Además, de manera muy interesante, estos cambios espectrales fueron también reportados por Ami y cols. (2008) durante la diferenciación de ESC por la vía de la

formación de EBs, lo cual refuerza la obtención de EBs a partir de mESC mediante espectroscopia vibracional en este trabajo.

Concordante con algunos estudios de diferenciación de SC, el alcance y la detectabilidad local de las variaciones espectrales FTIR claramente son consistentes con el cambio conformacional de proteínas^{86, 88}. En particular, la absorción FTIR del grupo amida de 1700-1500 cm^{-1} puede indicar expresión de nuevas proteínas en las CPD y dar información sobre el contenido total de proteínas en comparación con las mESC.

Por esta razón, para darle mayor precisión a los espectros FTIR, realizamos la segunda derivada en la región de proteínas amida I de 1700 a 1600 cm^{-1} , en la que pudimos observar durante el proceso de diferenciación variaciones de la intensidad relativa de los componentes asociados con la estructura secundaria de las proteínas, tales como láminas plegadas β , hélices α y giros β , lo que sugiere que se expresaron proteínas específicas y hubo un reordenamiento estructural en las CPD lo largo de la diferenciación. Comparado con lo reportado por Ami y cols., observamos un aumento y desplazamiento de la banda correspondiente a las hélices α y una sobreexpresión de las bandas correspondiente a los giros β , lo que puede sugerir las características de un fenotipo pancreático. De acuerdo a lo reportado por Oyamada y cols., esta sobreexpresión de giros β está relacionada con un aumento de uniones gap durante la diferenciación de ESC⁸⁹.

Del mismo modo, observamos prominentes cambios en la frecuencia e intensidad de las bandas a 1238 y 1080 cm^{-1} en las CPD en comparación con las mESC, que pueden demostrar una absorción alterada de la vibración del anillo de hidratos de carbono, lo que podría ser asignada a moléculas de azúcares de ácidos nucleicos, al contenido modificado de las moléculas de azúcar en las células, tales como la glucosa, o a la

absorbancia de glucógeno que comienzan a aumentar durante la diferenciación de mESC⁸⁷.

Además, se observaron sobresalientes cambios en los espectros FTIR y sus segundas derivadas en la región de ácidos nucleicos de 1100 a 850 cm^{-1} . Estas variaciones en la intensidad y frecuencia durante el proceso de diferenciación, también pueden indicar cambios en el contenido del RNA debido a la sobre regulación a baja regulación de genes a lo largo del proceso de diferenciación o, sugerir que el interruptor transcripcional del genoma comenzó a lo largo de la diferenciación⁹⁰.

Referente al análisis de la segunda derivada en la región de los ácidos nucleicos de 1100-850 cm^{-1} , se observó un incremento significativo en la intensidad de las bandas asociadas con los hidratos de carbono (1030-1080 cm^{-1}) en las CPD comparado con las mESC, probablemente debido a que la autorenovación en las ESC se ve reforzada por la inhibición parcial de la glucógeno sintasa quinasa-3 (Gsk3), y cuando las ESC pierden su estado de indiferenciación, se activa la Gsk3 y aumentan los niveles de glucógeno en las células diferenciadas⁹¹.

Respecto a las huellas espectrales del RNA y DNA contenidos en las mESC, observamos cambios a lo largo del proceso de diferenciación, y similar a Ami y cols., las bandas correspondientes al modo del anillo de ribosa (914 cm^{-1}) y al modo de la cadena principal de fosfato de ribosa (992 cm^{-1}) de las mESC disminuyeron durante la diferenciación, posiblemente debido a que la PolyADP-ribosa (pADPr) contribuye al control de autorenovación de células madre y a la localización de ovocitos regulando de la traslación de DE-cadherina⁹², por lo que es normal encontrar altos contenidos de ribosa en las mESC.

De la misma manera, durante el proceso de diferenciación observamos un incremento y desplazamiento de la banda 966 cm^{-1} hacia 986 cm^{-1} , posiblemente debido a la aparición de una nueva banda que podría ser asignada a RNA como reportan Ami y cols. (2008) y Banyay y cols. (2003); así mismo, apreciamos en la CPD al final del protocolo de diferenciación la presencia de un nuevo componente a 899 cm^{-1} , que puede ser asignado a un modo vibracional de A-DNA, lo que indica que también puede comenzar a estar presente DNA/RNA híbridos^{87, 93}. Estos cambios espectrales pueden indicar la traducción del mRNA y expresión de proteínas específicas, lo que refleja la aparición de un nuevo fenotipo según con el análisis de proteínas.

Similar a otros estudios, como los reportados por Ami y cols. (2008) y Cao y cols. (2013)⁸⁶,⁸⁷, los espectros FTIR obtenidos en este trabajo de ESC y CPD fueron complejos, pero el uso del análisis multivariado facilitó el procesamiento para identificar y evidenciar los cambios espectrales más significativos durante la diferenciación; en nuestro caso, la segunda derivada de los espectros de mESC y CPD, fue utilizada para proporcionar mayor precisión al ACP debido a que es aún más sensible que los espectros FTIR crudos. Este ACP es una técnica estadística de síntesis de la información o reducción de dimensión (número de variables), es decir, ante un banco de datos con muchas variables como las obtenidas mediante los espectros FTIR de muestras biológicas, el objetivo es reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible buscando combinaciones lineales de las variables originales que representan lo mejor posible la variabilidad presente en los datos. De este modo, con unas pocas combinaciones lineales, que son los componentes principales, sería suficiente para entender la información contenida en los datos. Al mismo tiempo, la forma en que se

construyen los componentes (gráficas de puntuación), sirve para entender la estructura de correlación inherente a los datos.

Realizando el ACP, pudimos observar en el primer componente principal para las tres regiones exploradas, una clara discriminación entre mESC y CPD, evidenciando el cambio bioquímico y estructural que sufren las SC al ser diferenciadas, resultados que han sido reportados por diversos autores y nuestro grupo de investigación mediante técnicas moleculares o fenotípicas durante la diferenciación dirigida de ESC^{65, 70, 85, 87, 94, 95}.

Respecto al segundo componente principal en las primera y segunda regiones (proteínas y carbohidratos), este análisis nos permitió discriminar la primera fase de diferenciación (día 11), en la cual como se mencionó anteriormente, se ha reportado la expresión de nuevas proteínas relacionado con el aumento en la complejidad celular y en el contenido proteico, así como el aumento de las moléculas de azúcar por el metabolismo de los carbohidratos como el glucógeno durante la diferenciación de ESC^{85, 87, 90}. Además, esta segunda región analizada correspondiente al glucógeno, refuerza mediante ACP lo reportado por Walsh y cols., quienes mencionan que este intervalo espectral, constituye un buen indicador de las alteraciones en la estructura secundaria del DNA y lo destacan como una región fundamental para el proceso de diferenciación⁹⁶.

Por último, el segundo componente principal en la tercera región (fosfato ribosa), es el que nos permitió discriminar efectivamente todo el proceso de diferenciación (días 11, 17 y 21) y está relacionado con cambios en el contenido de RNA debido a una sobre o baja regulación de los genes y a la activación transcripcional que se lleva a cabo durante la diferenciación de SC⁸⁹.

La aplicación de esta metodología puede ser útil para caracterizar SC y su proceso de diferenciación a diversos linajes celulares en tiempos cortos, aunque se necesitan otros ensayos para caracterizar y discriminar células diferenciadas altamente especializadas. Por otro lado, en lo que se refiere al modelo diabético murino con STZ, inducimos diabetes con una dosis de 175 mg/kg en nuestros ratones NIH, resultado similar a los reportado por Ventura-Sobrevilla y cols. en el 2011, los cuales establecen que una dosis única en ratos machos entre 130 o 150 mg/kg de STZ, es capaz de inducir diabetes similar al tipo 1. Sin embargo, nosotros con la dosis de 150 mg/kg obtuvimos 60% de los individuos diabéticos sin presentar mortalidad, pero al aumentarla a 175 mg/kg, inducimos al 100% con una letalidad posterior a los 10 días posinducción, a diferencia de lo que refiere Ventura-Sobrevilla (2011), de una sobrevivencia con diabetes hasta por 21, lo cual tiene que ser considerado para evaluar los efectos bioquímicos e histológicos en futuros modelos diabéticos que serán tratados con terapia celular⁵².

Otro resultado a considerar en futuras evaluaciones clínicas en modelos animales posterior a ser tratados con implantes de ESC o CPD, es la función hepática y lipídica, ya que como observamos en nuestros resultados, el modelo diabético presentó hipertrigliceridemia y elevación del ácido úrico sérico, resultado similar a lo reportado por Kunjathoor y cols. (1996), los cuales establecen que la diabetes inducida por STZ está acompañada de aumento de triglicéridos con progresión crónica de aterosclerosis⁵⁶.

Es necesario seguir investigando protocolos de expansión, diferenciación e implante celular en modelos animales y posteriormente en humanos, para poder determinar biodistribución, dosis a emplear, número de células entre otras cuestiones.

Finalmente, es importante considerar la importancia del empleo de células madre para su implantación y diferenciación a linajes especializados para opciones terapéuticas de

diversas enfermedades de impacto mundial e institucional, y proponer con investigaciones formales y divulgación científica, el cambio en el paradigma de la salud, ya que como se ha visto en las últimas décadas, la demanda se está viendo superada por el crecimiento exponencial de la población, aunado al aumento en la longevidad de los pacientes y, lamentablemente, la mayoría de los tratamientos actuales para la medicina curativa, son sintomáticos y no evitan el deterioro acelerado ni consideran la posibilidad de un aumento en la funcionalidad, ya sea aumentando la respuesta autoregenerativa del organismo o el uso de terapia celular para promover la regeneración. Es por esto, que en los últimos años está emergiendo una nueva especialidad médica a considerarse en poco tiempo en nuestros sistemas de salud, la cual se denomina “Medicina Regenerativa”.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Se diferenciaron células pancreáticas a partir de mESC, las cuales cursaron las etapas cronológicas del desarrollo pancreático embrionario durante el proceso de diferenciación, ya que se obtuvieron células endodérmicas al día 11 que expresaron *SOX17* y *Pdx1*, precursores pre-pancreáticos al día 17 que expresaron *SOX17*, *Ins-1*, *Ins-2* y *gcg*, y finalmente, células pancreáticas diferenciadas al día 21 que expresaron los genes y proteínas de insulina y glucagón específicos del páncreas adulto.

El comportamiento espectral observado por FTIR, proporciona un nuevo parámetro biofísico basado en marcadores moleculares que indican el proceso de diferenciación de mESC a células pancreáticas.

La espectroscopía FTIR y el ACP, permiten caracterizar bioquímica y estructuralmente SC y su diferenciación a células especializadas, demostrando cambios en la estructura secundaria de las proteínas, aumento de las moléculas fosforiladas y modificaciones en las bandas de ácidos nucleicos durante el proceso de diferenciación, acorde con lo obtenido en los análisis genético y fenotípico.

Los resultados infieren viabilidad técnica para proponer la espectroscopia FTIR y su ACP como técnicas no invasivas, rápidas y eficientes para caracterizar un proceso de diferenciación celular.

La administración intraperitoneal de STZ a dosis de 175 mg/kg en ratones NIH, es efectiva para inducir Diabetes en el 100% de la población sin presentar letalidad en los primeros 10 días.

CAPÍTULO VI

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Analizar la similitud entre células pancreáticas diferenciadas y células pancreáticas de ratón mediante micro-espectroscopia vibracional FTIR y análisis multivariado, determinando las características espectroscópicas precisas de los islotes de Langerhans.

Evaluar si las células pancreáticas diferenciadas marcadas con nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂ NPs) se incorporan al tejido pancreático mediante análisis histopatológico y micro-espectroscópico FTIR.

Comparar cortes histopatológicos pancreáticos con microscopía de campo claro y micro-espectroscopia vibracional FTIR para evaluar el proceso regenerativo y localización de células pancreáticas diferenciadas marcadas con TiO₂ NPs.

A. ARTÍCULOS PUBLICADOS DERIVADOS DE ESTA TESIS DOCTORAL.

Hindawi Publishing Corporation
Stem Cells International
Volume 2016, Article ID 6709714, 10 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/6709714>



Research Article

FTIR Spectroscopic and Molecular Analysis during Differentiation of Pluripotent Stem Cells to Pancreatic Cells

Gustavo Jesus Vazquez-Zapien,^{1,2} Monica Maribel Mata-Miranda,^{1,3}
Virginia Sanchez-Monroy,^{4,5} Raul Jacobo Delgado-Macull,¹
David Guillermo Perez-Ishiwara,^{1,5} and Marlon Rojas-Lopez¹

¹CIBA-Tlaxcala, Instituto Politécnico Nacional, 90700 Tepetitla, TLAX, Mexico

²Laboratorio de Embriología, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, 11200 Ciudad de México, Mexico

³Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, 11200 Ciudad de México, Mexico

⁴Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, 11200 Ciudad de México, Mexico

⁵Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, 07320 Ciudad de México, Mexico

Correspondence should be addressed to Marlon Rojas-Lopez; marlonrl@yahoo.com.mx

Received 9 March 2016; Revised 12 July 2016; Accepted 20 July 2016

Academic Editor: Leonard M. Eisenberg

Copyright © 2016 Gustavo Jesus Vazquez-Zapien et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Some of the greatest challenges in stem cells (SCs) biology and regenerative medicine are differentiation control of SCs and ensuring the purity of differentiated cells. In this work, we differentiated mouse pluripotent stem cells (mPSCs) toward pancreatic cells characterizing this differentiation process by molecular and spectroscopic techniques. Both mPSCs and Differentiated Pancreatic Cells (DPCs) were subjected to a genetic, phenotypic, and biochemical analysis by real-time quantitative PCR (RT-qPCR), immunocytochemistry, and Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. Cultured mPSCs expressed pluripotent genes and proteins (*Nanog* and *SOX2*). DPCs expressed endodermal genes (*SOX17* and *Pdx1*) at day 11, an inductor gene of embryonic pancreas development (*Pdx1*) at day 17 and pancreas genes and proteins (*Insulin* and *Glucagon*) at day 21 of differentiation. Likewise, FTIR spectra of mPSCs and DPCs at different maturation stages (11, 17, and 21 days) were obtained and showed absorption bands related with different types of biomolecules. These FTIR spectra exhibited significant spectral changes agreeing with the differentiation process, particularly in proteins and nucleic acids bands. In conclusion, the obtained DPCs passed through the chronological stages of embryonic pancreas development and FTIR spectra provide a new biophysical parameter based on molecular markers indicating the differentiation process of mPSCs to specialized cells.

1. Introduction

Currently, world healthcare system is being overwhelmed by the increase in average life expectancy worldwide, leading to increase in the prevalence of several chronic degenerative diseases as well as their complications. Unfortunately, actual treatment options for most of these diseases do not slow any further deterioration or restore the function; rather they only treat the symptoms or partially replace the function, accumulating comorbidities and the consequent health deterioration.

Current stem cells (SCs) researches have opened new possibilities for the treatment of chronic diseases, and cell therapy now stands at the front-line of regenerative medicine and tissue engineering [1]. SCs can be used to improve healthcare, augmenting the regenerative potential of the body or for the development of new therapies [2].

An essential property of SCs is their potentiality, which refers to their capability to differentiate into different cell lineages under certain culture conditions. According to their origin and differentiation potential, SCs are classified as

[dx.doi.org/10.17488/RMIB.38.1.17](https://doi.org/10.17488/RMIB.38.1.17)

Componentes Principales mediante Espectroscopia FTIR como Técnica de Caracterización Innovadora durante la Diferenciación de Células Madre Pluripotentes a Células Pancreáticas

Principal Components by FTIR Spectroscopy as Innovative Characterization Technique during Differentiation of Pluripotent Stem Cells to Pancreatic Cells

M.M. Mata-Miranda^{1,2}, C.I. Guerrero-Robles³, M. Rojas-López², R.J. Delgado-Macui², C.A. González-Díaz^{1,3}, V. Sánchez-Monroy^{1,4}, D. G. Pérez-Ishiwara⁴, G.J. Vázquez-Zapién^{1,2}

¹SEDENA, Centro Militar de Ciencias de la Salud, Escuela Médico Militar-Escuela Militar de Graduados de Sanidad, México.

²Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada-Tlaxcala, México.

³Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Medicina, México.

⁴Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, México.

RESUMEN

Dos de los grandes retos en la biología de las Células Madre (CM) y la Medicina Regenerativa, son el control en la diferenciación de estas células y asegurar la pureza de las células diferenciadas, por lo que es necesario contar con técnicas rápidas, eficientes y precisas para la caracterización de CM y su diferenciación a diferentes linajes celulares. El objetivo de este trabajo fue analizar Células Madre Pluripotentes (CMP) y Células Pancreáticas Diferenciadas (CPD) mediante espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y Análisis de Componentes Principales (ACP). Para ello se diferenciaron CMP a CPD, caracterizando el proceso de diferenciación a los días 0, 11, 17 y 21 mediante microscopía óptica y espectroscopia vibracional. Los espectros FTIR se analizaron con el método multivariado de ACP, utilizando su segunda derivada en las regiones de proteínas, carbohidratos y ribosas. Los resultados indican que el ACP permite caracterizar y discriminar CMP y CPD en sus diferentes etapas de diferenciación en las regiones espectrales analizadas. Con lo anterior concluimos que el ACP permite caracterizar química y estructuralmente CMP y diferentes etapas de su diferenciación en una forma rápida, precisa y no invasiva.

PALABRAS CLAVE: Células Madre pluripotentes, Diferenciación, Espectroscopía FTIR, Componentes Principales.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Morphological, molecular and FTIR spectroscopic analysis during the differentiation of kidney cells from pluripotent stem cells

Monica Maribel Mata-Miranda^{1,2}, Gustavo Jesus Vazquez-Zapien^{1,3}, Marlon Rojas-Lopez¹, Virginia Sanchez-Monroy⁴, David Guillermo Perez-Ishiwara⁴ and Raul Jacobo Delgado-Macuil^{1*}

Abstract

Background: Kidney diseases are a global health problem. Currently, over 2 million people require dialysis or transplant which are associated with high morbidity and mortality; therefore, new researches focused on regenerative medicine have been developed, including the use of stem cells.

Results: In this research, we generate differentiated kidney cells (DKCs) from mouse pluripotent stem cells (mPSCs) analyzing their morphological, genetic, phenotypic, and spectroscopic characteristics along differentiation, highlighting that there are no reports of the use of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy to characterize the directed differentiation of mPSCs to DKCs. The genetic and protein experiments proved the obtention of DKCs that passed through the chronological stages of embryonic kidney development. Regarding vibrational spectroscopy analysis by FTIR, bands related with biomolecules were shown on mPSCs and DKCs spectra, observing distinct differences between cell lineages and maturation stages. The second derivative of DKCs spectra showed changes in the protein bands compared to mPSCs. Finally, the principal components analysis obtained from FTIR spectra allowed to characterize chemical and structurally mPSCs and their differentiation process to DKCs in a rapid and non-invasive way.

Conclusion: Our results indicated that we obtained DKCs from mPSCs, which passed through the chronological stages of embryonic kidney development. Moreover, FTIR spectroscopy resulted in a non-invasive, rapid and precise technic that together with principal component analysis allows to characterize chemical and structurally both kind of cells and also discriminate and determine different stages along the cell differentiation process.

Keywords: Pluripotent stem cells, Differentiated kidney cells, Vibrational spectroscopy, Fourier transform infrared, Principal components analysis

Background

Kidney diseases are a global public health problem, worldwide mortality rates between 50 and 80%. Currently, the leading cause of end-stage renal failure is diabetes [1, 2]. Over 2 million people now require renal replacement therapy, but this likely represents less than 10% of those who need [3, 4]. When a sufficiently extensive chronic renal injury occurs, whatever the cause, kidney function progressively declines until reaching

terminal renal failure with no treatment capable of reversing the process [5].

The kidney performs essential physiological functions such as the excretion of metabolic waste products and, homeostatic and synthesis functions. However, some of these roles are not compensated by current replacement therapy [5, 6].

Available treatments include replacement function by dialysis or transplant, but unfortunately, these therapies are associated with a high morbidity and mortality, and kidney transplantation is limited by the shortage of donor organs, immune rejection and lifelong treatment with immunosuppressive [3].

*Correspondence: rdmacuil@yahoo.com.mx; rdelgadam@ipn.mx

¹ Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, CIBA-Tlaxcala, Instituto Politécnico Nacional, 90700 Tepetitla, Tlaxcala, Mexico
Full list of author information is available at the end of the article

REVIEW ARTICLE

Potential Therapeutic Strategies of Regenerative Medicine for Renal Failure

Monica Maribel Mata-Miranda^{1,2}, Raul Jacobo Delgado-Macuil², Marlon Rojas-Lopez², Ricardo Martinez-Flores¹ and Gustavo Jesus Vazquez-Zapien^{2,3,*}

¹Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Escuela Médico Militar, Centro Militar de Ciencias de la Salud, Secretaría de la Defensa Nacional, Ciudad de México, C.P. 11200, México; ²Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional, Tepetitla, Tlaxcala, 90700, México; ³Laboratorio de Embriología, Escuela Médico Militar, Centro Militar de Ciencias de la Salud, Secretaría de la Defensa Nacional, Ciudad de México, C.P. 11200, México

Abstract: Kidney diseases are a public health problem worldwide. Available therapies include function replacement by dialysis or transplant, which are associated with a high morbidity and mortality. Likewise, none of these treatments compensate all kidney functions. There is a great concern in developing more effective therapies with the ability to replace the wide range of renal functions, so that, new studies on developing therapeutic strategies have focused on regenerative medicine. The aim of this paper is to review the new advances in regenerative medicine for renal failure treatment. Regenerative medicine comprises two therapeutic strategies: cell therapy and tissue engineering. Cell therapy techniques depend on cell and tissue cultures, with the aim to replace morphological structures, tissues, and functions. The main strategic strength of cell therapy in renal failure is the incorporation of additional cells in a damaged kidney, for which purpose different kind of Stem Cells (SCs) have been used such as Embryonic SCs, induced Pluripotent SCs, Multipotent SCs, Renal SCs, or drugs that increase survival and mobilization of SCs. Tissue engineering complements cell therapy combining techniques of biological sciences and engineering to create structures and devices as scaffolds, matrices or 3D biocompatible materials. Even though there is a significant advance in regenerative medicine strategies, we are far from using any of its techniques on health institutions, due to it is necessary to evaluate side effects, biodistribution, dosage, type of administration, vehicle of cell therapy, as well as the evaluation of response time and long-term studies, among other studies.

ARTICLE HISTORY

Received: October 29, 2016
Revised: January 12, 2017
Accepted: March 10, 2017
DOI:
10.2174/1574888X12666170317163416

Keywords: Renal failure, regenerative medicine, cell therapy, tissue engineering.

INTRODUCTION

Kidney diseases are a global public health problem, causing devastating consequences in society. Globally, the mortality rate is between 50% and 80%, and more than 2 million people receive renal replacement therapy, but this probably represents less than 10% of those who need it [1, 2]. There is an increase in this epidemiologic tendency correlated with the rise of longevity and the conditions that cause renal complications such as cardiovascular disease, arterial hypertension and diabetes [3].

Usually, Renal Failure (RF) is divided into acute and chronic, and these stages cover a broad range of etiologies. When elevated blood urea nitrogen (BUN) or alterations in the urinary parameters are developed in hours or days, it is an acute process; on the other hand, if renal disease signs are

prolonged up to several weeks, it represents a progressive process (subacute) and finally, when it is extended up to months or years it will take a chronic course and can be associated with acute exacerbations [4].

The kidney performs essential physiological functions such as excretion of metabolic waste, homeostatic functions, glutathione synthesis, ammoniogenesis, hormones and growing factors catabolism, immunologic regulation, as well as the production and regulation of multiple inflammation cytokines [5]. Although most kidney diseases do not have symptoms until later in their course, some of the physiological affectations above mentioned may cause nausea, vomiting, dyspnea, edema, muscle cramps, lack of appetite, dysuria, poor concentration, sleep disturbance, and constipation [6].

Available therapies for RF are the replacement of function with dialysis or transplant, but unfortunately, dialysis is associated with an elevated morbidity and mortality, and despite the progress in kidney transplant, the lack of organ donors limits the treatment, besides the immune rejection and the need for lifelong immunosuppressive therapy [7, 8].

*Address correspondence to this author at the Laboratorio de Embriología, Escuela Médico Militar, Centro Militar de Ciencias de la Salud, Secretaría de la Defensa Nacional, Cerrada de Palomas S/N, Lomas de Sotelo, Miguel Hidalgo, Ciudad de México, 11200, México; Tel: +52 55 55 40 77 28 Exts. 1575, 1577; E-mail: gus1202@hotmail.com

RESEARCH

Open Access

Histologic and spectroscopic study of pluripotent stem cells after implant in ocular traumatic injuries in a murine model

Gustavo Jesús Vázquez-Zapién^{1,2†}, Marlon Rojas-López^{2†}, Raúl Jacobo Delgado-Macuil^{2†}, Luis Rubén Martínez-Nava^{3†}, David Guillermo Pérez-Ishiwara^{2,4†} and Mónica Maribel Mata-Miranda^{2,5*†}

Abstract

Introduction: Ocular trauma is defined as a trauma caused by blunt or penetrating mechanisms on the eyeball and its peripheral structures, causing damage with different degrees of affection with temporary or permanent visual function compromise. Ocular trauma is a major cause of preventable blindness worldwide; it constitutes 7% of all corporal injury and 10% to 15% of all eye diseases. Regenerative medicine research has opened up the possibility to use stem cells as a source of cell replacement, so that experimental studies on embryonic stem cells and bone marrow stem cells have been carried out. In this study, we analyzed the histopathological and spectroscopic changes in ocular tissue with trauma, treated with mouse pluripotent stem cells.

Methods: Firstly, mouse embryonic stem cells were seeded. Subsequently, the obtained cells were implanted in a murine model of scleral and retinal damage at the first, second, and fourth weeks post-trauma. At week 12 post-trauma, the eyes were enucleated for histopathologic study (inflammatory response and histological integrity) and spectroscopic analysis by Fourier transform infrared spectroscopy in the attenuated total reflection configuration. Data were analyzed by one-way analysis of variance.

Results: Histopathological results showed that the experimental groups treated with stem cells presented a decrease in the inflammatory response, and the histological integrity was restored, which contrasted with the experimental group treated with saline solution. Moreover, in the spectroscopic analysis, characteristic bands of biological samples were observed in all tissues, highlighting in healthy tissues the presence of C = O bond at $1,745\text{ cm}^{-1}$, which was not observed in the injured and treated tissues. Also, the absorption spectrum of the tissues treated with embryonic stem cells showed bands whose intensity was high at around $1,080$ to $1,070\text{ cm}^{-1}$. It has been reported that these bands are characteristic of pluripotent stem cells.

Conclusions: The implant of embryonic stem cells could be a useful therapeutic treatment after traumatic eye injuries or many other eye diseases to reduce the inflammatory response and restore histological integrity. Furthermore, the spectroscopic technique could be used as a complementary technique for detecting stem cell incorporation into various tissues.

* Correspondence: mmcmaribel@gmail.com

†Equal contributors

²CIBA-Tlaxcala, Instituto Politécnico Nacional, Tepetitla, Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala 90700, Mexico

⁵Cell Biology Laboratory, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, Cerrada de Palomas S/N, Lomas de Sotelo, Delegación Miguel Hidalgo, México DF 11200, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article

B. OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE LA ESTANCIA DOCTORAL.

Histochem Cell Biol
DOI 10.1007/s00418-016-1437-4



ORIGINAL PAPER

Morphological, genetic and phenotypic comparison between human articular chondrocytes and cultured chondrocytes

Mónica Maribel Mata-Miranda^{1,2} · Claudia María Martínez-Martínez¹ · Jesús Emmanuel Noriega-González³ · Luis Enrique Paredes-González⁴ · Gustavo Jesús Vázquez-Zaplén^{2,3}

Accepted: 12 April 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Articular cartilage is an avascular and aneural tissue with limited capacity for regeneration. On large articular lesions, it is recommended to use regenerative medicine strategies, like autologous chondrocyte implantation. There is a concern about morphological changes that chondrocytes suffer once they have been isolated and cultured. Due to the fact that there is little evidence that compares articular cartilage chondrocytes with cultured chondrocytes, in this research we proposed to obtain chondrocytes from human articular cartilage, compare them with themselves once they have been cultured and characterize them through genetic, phenotypic and morphological analysis. Knee articular cartilage samples of 10 mm were obtained, and each sample was divided into two fragments; a portion was used to determine gene expression, and from the other portion, chondrocytes were obtained by enzymatic disaggregation, in order to be cultured and expanded in vitro. Subsequently, morphological, genetic and phenotypic characteristics were compared between in situ (articular cartilage) and cultured chondrocytes. Obtained

cultured chondrocytes were rounded in shape, possessing a large nucleus with condensed chromatin and a clear cytoplasm; histological appearance was quite similar to typical chondrocyte. The expression levels of *COL2A1* and *COL10A1* genes were higher in cultured chondrocytes than in situ chondrocytes; moreover, the expression of *COL1A1* was almost undetectable on cultured chondrocytes; likewise, COL2 and SOX9 proteins were detected by immunofluorescence. We concluded that chondrocytes derived from adult human cartilage cultured for 21 days do not tend to dedifferentiate, maintaining their capacity to produce matrix and also retaining their synthesis capacity and morphology.

Keywords Cultured chondrocytes · Articular injuries · Characterized chondrocytes

Introduction

Cartilage damage is a relatively common type of injury seen in today's clinical orthopedic practice. Articular cartilage is an avascular and aneural tissue with a limited capacity of regeneration, promoting its deterioration and consequently, the development and progression to osteoarthritis (OA) (Zhang et al. 2014).

OA is the most common chronic condition of the joints, affecting approximately 27 million of adults in USA during 2005, and definitely, it has an impact on society and health institutions because it represents a high cost in healthcare resources and diminishes patient's quality of life. According to some investigations, it is estimated that the expenses overpass 89 billion dollars per year (Esser and Bailey 2011).

✉ Gustavo Jesús Vázquez-Zaplén
gus1202@hotmail.com

- ¹ Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, 11200 Ciudad de México, Mexico
- ² CIBA-Tlaxcala, Instituto Politécnico Nacional, 90700 Tepetitla, Tlaxcala, Mexico
- ³ Laboratorio de Embriología, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, Cerrada de Palomas SN, Lomas de Sotelo, Miguel Hidalgo, 11200 Ciudad de México, Mexico
- ⁴ Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, 11200 Ciudad de México, Mexico

Published online: 19 April 2016

Springer



REVISIÓN

Implante de condrocitos autólogos con potencial regenerativo en lesiones articulares



Monica Maribel Mata-Miranda^a, Luis Enrique Paredes-González^b,
Claudia María Martínez-Martínez^c y Gustavo Jesús Vázquez-Zapién^{d,*}

^a Maestra en Ciencias Biomédicas, Mayor Médico Cirujano Jefe del Laboratorio de Biología Celular y Tissular de la Escuela Médico Militar y alumna de doctorado del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, México

^b Residente de la especialidad de Ortopedia y Traumatología, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, México

^c Químico clínico, profesor titular de tiempo completo de la Escuela Médico Militar, México

^d Maestro en Ciencias Biomédicas, Mayor Médico Cirujano Jefe del Laboratorio de Embriología de la Escuela Médico Militar y alumno de doctorado del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, México

Recibido el 24 de marzo de 2015; aceptado el 20 de octubre de 2015
Disponible en Internet el 27 de noviembre de 2015

PALABRAS CLAVE

Lesión articular;
Condrocitos;
Implante

Resumen Las lesiones del cartilago articular son una de las principales causas de atención en los sistemas de salud y se han convertido en un problema real de salud pública, especialmente en países en los cuales la esperanza de vida y, consecuentemente, la patología articular han incrementado. El cartilago articular es un tejido altamente especializado que proporciona una superficie de unión en el extremo final de las articulaciones de los huesos que forman el cartilago. El único tipo celular del cartilago articular es el condrocito, el cual es una célula altamente diferenciada que tiene capacidad limitada de proliferación y migración, además de carecer de aporte sanguíneo, tejido nervioso y vasos linfáticos, lo que condiciona un bajo potencial de reparación. Las lesiones de cartilago articular generalmente conducen a degeneración progresiva de las articulaciones. A pesar de los grandes avances en ciencias básicas, ingeniería genética y de tejidos, estas lesiones siguen siendo un problema complejo ya que en la actualidad no existe ningún tratamiento que garantice plenamente resultados satisfactorios en el paciente a medio y largo plazos. El implante de condrocitos autólogos (ICA) es una opción terapéutica prometedora y eficaz para el manejo de lesiones del cartilago hialino, con buenos y, principalmente, duraderos resultados funcionales en el momento de compararlo con otras opciones terapéuticas. La obtención y expansión de condrocitos humanos son procedimientos iniciales para el posterior ICA, lo cual proveería de una fuente de reemplazo articular y regenerativa que evitaría la incapacidad de pacientes con lesiones condrales.

Nivel de evidencia clínica: Nivel IV

© 2015 Sociedad Colombiana de Ortopedia y Traumatología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.
Correo electrónico: gus1202@hotmail.com (G.J. Vázquez-Zapién).

Effect of Resveratrol on Mitochondrial Activity in Differentiated Mature Adipocytes

Efecto del Resveratrol sobre la Actividad Mitocondrial en Adipocitos Maduros Diferenciados

Noriega-González, J. E.^{*}; Chirino, Y. I.^{**}; Mata-Miranda, M. M.^{***}; Vázquez-Zapién, G. J.^{****} & Sánchez-Monroy, V.^{*****}

NORIEGA-GONZÁLEZ, J. E.; CHIRINO, Y. I.; MATA-MIRANDA, M. M.; VÁZQUEZ-ZAPIÉN, G. J. & SÁNCHEZ-MONROY, V. Effect of resveratrol on mitochondrial activity in differentiated mature adipocytes. *Int. J. Morphol.*, 33(3):1085-1092, 2015.

SUMMARY: Obesity has reached epidemic proportions, the World Health Organization (WHO) estimates that there are more than 1,000 million overweight adults world-wide. Furthermore, obesity is characterized as an overgrowth of white adipose tissue as a result of adipocyte hypertrophy and hyperplasia. Mitochondria is considered the source of energy within the adipocyte, since it contains the molecular machinery, and it is involved in a large number of metabolic pathways, besides the transformation of chemical energy into adenosine triphosphate. Mitochondria shortage and adipocyte dysfunction result in an excessive accumulation of triacylglycerol in the cytoplasm, which determines an imbalance between energy production and energy expenditure. Resveratrol (RSV) is a polyphenol found in different plants and its effects have been associated with mitochondrial biogenesis. An adipogenesis *in vitro* model (3T3-L1 preadipocytes) was used, and these cells were differentiated into mature adipocytes. Subsequently the effect of RSV on the adipocytes morphology, the lipid content and mitochondrial activity was evaluated using microscopic and flow cytometry techniques. The effect of RSV on differentiated mature adipocytes, was characterized by the decrease in lipid content and the consequently declination of the mitochondrial activity. 3T3-L1 preadipocytes retained the differentiation ability until passage 18. The RSV at doses of 25 and 50 μM for 48 hours in differentiated mature adipocytes promoted the decreased in lipid content probably due to an increase in mitochondrial activity in the early hours of RSV exposure, causing the consequently declination of mitochondrial activity at the end of 48 hours.

KEY WORDS: Preadipocytes; Differentiated mature adipocyte; Mitochondrial activity; Resveratrol.

INTRODUCTION

Obesity is defined as body mass index greater than 30 kg/m², and it is becoming a major health problem in the world. Obesity has taken epidemic global dimensions; the World Health Organization estimates that there are more than 1,000 million overweight adults, of these about 300 million are obese (Kopelman, 2007). Social change and nutrition transition have turned obesity into a global epidemic.

Economic development, modernization, urbanization and globalization of food markets, are some of the elements that have contributed to the epidemic of obesity, besides the significant decrease in the physical activity, which is associated with the increased use of automated transport, the use of technology at home, among others (WHO, 2013).

Obesity is associated with premature death through the increased risk of many chronic diseases, including type 2 diabetes mellitus (DM2), cardiovascular disease and certain cancers, besides being related with respiratory distress syndrome, chronic musculoskeletal problems, skin diseases and infertility. Obesity is characterized as an overgrowth of white adipose tissue as a result of adipocyte hypertrophy and hyperplasia (Guh *et al.*, 2009). There are two kinds of human adipose tissue, white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT). The most abundant is the WAT, the same that is distributed throughout the body, it has the ability to expand massively, and it is a heterogeneous tissue since it contains diverse cell types, mostly white adipocyte. These adipocytes are surrounded by fibroblasts, endothelial cells, immune cells and nerves (Cristancho & Lazar, 2011).

^{*} Laboratorio de Embriología, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, México D.F., México.

^{**} Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, México.

^{***} Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, México D.F., México.

^{****} CIBA-Tlaxcala, Instituto Politécnico Nacional, Tepetitla, Tlaxcala, México.

^{*****} Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, México D.F., México.

^{*****} Programa Institucional de Biomedicina Molecular ENMyH, Instituto Politécnico Nacional, México D.F., México.

Eficacia en la cicatrización de lesiones retinianas traumáticas al implantar células madre pluripotentes de ratón. Modelo experimental en ratas

Mayor M.C. Gustavo Jesús Vázquez-Zapién,*

Mayor M.C. Luis Rubén Martínez-Nava,** Mayor M.C. Mónica Maribel Mata-Miranda***

Escuela Médico Militar. Ciudad de México.

RESUMEN

Objetivo. Determinar la eficacia en la cicatrización del implante de células madre pluripotentes de ratón en un modelo murino con lesión retiniana traumática.

Material y métodos. Se cultivaron células madre embrionarias de ratón; posteriormente se implementó un modelo en rata con retinotomía con trocar de 27G. Se utilizaron cuatro grupos, cada uno con diez ratas *Rattus norvegicus* (40 ojos). Los grupos se trataron como sigue: Grupo Control no recibió tratamiento, Grupo 1 recibió 0.025 mL intravítreo de solución salina balanceada, Grupo 2 se le implantaron 20,000 células intravítreas y Grupo 3 recibió 50,000 células intravítreas re suspendidas en 0.025 mL de solución salina balanceada; se trataron a la primera, segunda y cuarta semanas posterior a la retinotomía. Tres meses después de la lesión se sometieron a estudio histopatológico.

Resultados. En todos los grupos se valoró histológicamente la respuesta inflamatoria e integridad anatómica, encontrando en el Grupo Control y Grupo 1 inflamación y alteración anatómica moderada, mientras que en los Grupos 2 y 3 la inflamación fue de escasa a nula, restaurándose la integridad anatómica.

Conclusiones. El implante de células madre embrionarias de ratón es eficaz para una mejor cicatrización de lesiones retinianas traumáticas al reducir la respuesta inflamatoria y restaurar la integridad anatómica.

Efficacy in healing traumatic retinal lesions by implanting mouse pluripotent stem cells. Experimental rat model

SUMMARY

Objective. To determine the efficiency of the cicatrization after implanting mouse pluripotent stem cells in a murine model with a retinal injury.

Material and methods. Mouse embryonic stem cells were cultured; later on a rat model with retinotomy was implemented using a 27G trocar. 4 experimental groups were studied, each one containing 10 rats *Rattus norvegicus* (40 eyes). The groups received different treatments in a intravitreal way as follows: control group did not received any treatment, Group 1 received 0.025 mL of balanced salt solution, Group 2 received 20,000 cells resuspended in 0.025 mL of balanced salt solution and Group 3 received 50,000 cells resuspended in 0.025 mL of balanced salt solution. All the groups received the treatment at the first, second and fourth weeks after the retinotomy. Three months after the retinal injury and histopathological study was done.

Results. The inflammatory response and histological integrity were studied in all the groups. The findings were as follows: Control Group and Group 1 showed moderate inflammation and anatomical changes, moreover Groups 2 and 3 showed a low or null inflammation and the anatomical integrity was restored.

Conclusions. Intravitreal implantation of Mouse embryonic stem cells is effective for better cicatrization of traumatic retinal injuries in order to reduce the inflammatory response and the anatomical changes.

Palabras clave: Células madre; retina; lesión retiniana.

Key words: Stem cells; retina; retinal injury.

* Maestro en Ciencias Biomédicas, Jefe del Laboratorio de Embriología de la Escuela Médico Militar y alumno de doctorado del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional. ** Especialista en Oftalmología, Jefe del Servicio de Oftalmología del Hospital Militar Regional de Tampico, Tamps. *** Maestra en Ciencias Biomédicas, Jefe del Laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar y alumna de doctorado del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional.

Correspondencia: Dra. Mónica Maribel Mata-Miranda

Escuela Médico Militar, Laboratorio de Embriología, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, Cerrada de Palomas S/N Esq. Periférico, Col. Lomas de San Isidro, C.P. 11200, México, D.F.
Correo e: mmcmiribel@gmail.com

Recibido: Mayo 24, 2014.

Aceptado: Octubre 4, 2014.

Investigación básica con células madre pluripotentes en la Escuela Médico Militar

Mayor M.C. Mónica Maribel Mata-Miranda,*

Cap. 1/o. Q.B. Virginia Sánchez-Monroy,** Mayor M.C. Gustavo Jesús Vázquez-Zapién***

Escuela Médico Militar, Ciudad de México.

RESUMEN

El estudio y uso de las células madre (SC, del inglés *stem cells*) en la terapia de reemplazo celular, ha establecido un gran paso a una nueva era en la medicina. Sin embargo, la ciencia aún se ha visto superada por diferentes ámbitos a la hora de decidir el lugar y el momento en que esta nueva alternativa se haga realidad.

Las SC son células inmaduras, autorrenovables y capaces de generar uno o más tipos de células diferenciadas y se clasifican de acuerdo con su potencial de diferenciación en totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales.

El trasplante de SC parece una herramienta prometedora para la regeneración de tejidos enfermos, dañados o defectuosos. Las células madre mesenquimales (MSC) ya se han utilizado para restaurar células hematopoyéticas desde hace más de 50 años, pero los rápidos adelantos en la investigación han planteado la posibilidad de usar otros tipos de células madre para el reemplazo celular y tisular, como las células madre embrionarias (ESC) pluripotentes en diabetes mellitus (DM).

En los Laboratorios de Investigación de la Escuela Médico Militar (EMM), recientemente se iniciaron trabajos de Investigación Básica para la caracterización y estandarización de cultivos celulares de ESC de ratón y su diferenciación a células pancreáticas tempranas.

El objetivo de este artículo es difundir las generalidades y aplicaciones de las SC, así como las Investigaciones Básicas que se realizan en el Instituto Armado con estas células.

Palabras clave: Células madre, células madre embrionarias, pluripotencialidad, cuerpos embrionarios, células pancreáticas diferenciadas.

Basic research with pluripotent stem cells in the Military Medical School

SUMMARY

The study and use of stem cells (SC) in cell replacement therapy are setting a great transition for a new medicine era. However, different fields have overtaken science at the time to decide where and when this new alternative will come a reality.

The SC are immature cells, self-renewable and capable to generate one or more types of differentiated cell, according to their differentiation capacity they classified in: totipotential, pluripotential, multipotential and unipotential.

SC transplantation seems a promising tool for the regeneration of diseased, damaged or defective tissue.

Mesenchymal stem cells (MSC) have been used to restore hematopoietic cells for over 50 years, but the expedited advances in research, have raised the possibility to use another type of SC for cell and tissue replacement, as embryonic SC (ESC) in diabetes mellitus (DM).

In the Research Laboratory at Escuela Médico Militar (EMM), recently some basic research have been initiated for the characterization and standardization of mouse ESC cultures, and their differentiation into early pancreatic cell.

The purpose of this article is to spread the generalities and applications of SC, and the basic research that is done in the Armed Forces Institute with this cells.

Key words: Stem cells, embryonic stem cells, pluripotentiality, embryonic bodies, differentiated pancreatic cells.

* Maestra en Ciencias Biomédicas, Jefe del Laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar y alumna de doctorado del Centro de Investigación en Biotecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional. ** Doctora en Ciencias con Especialidad en Biomedicina Molecular, adscrita a la Escuela Militar de Graduados de Sanidad y al Instituto Politécnico Nacional. *** Maestro en Ciencias Biomédicas, Jefe del Laboratorio de Embriología de la Escuela Médico Militar y alumno de doctorado del Centro de Investigación en Biotecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional.

Correspondencia: Dr. Gustavo Jesús Vázquez-Zapién
Escuela Médico Militar, Laboratorio de Embriología, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, Carretera de Palomas s/n. Esq. Periférico, Col. Lomas de San Isidro, C.P. 11200, México, D.F. Correo-e: gus1202@hotmail.com

Recibido: Enero 29, 2014.
Aceptado: Mayo 16, 2014.

C. PRESENTACIÓN DE TRABAJOS PRODUCIDOS DURANTE ESTA TESIS EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES.

conferenceseries.com

Gustavo Jesus Vazquez Zaplen, J Stem Cell Res Ther 2016, 6:7(Suppl)
<http://dx.doi.org/10.4172/157-7633.S1.021>

7th Annual Conference on

Stem Cell and Regenerative Medicine

August 04-05, 2016 Manchester, Uk

FTIR-DPC from PSC-FTIR spectroscopic and molecular analysis of differentiated pancreatic cells from pluripotent stem cells

Gustavo Jesus Vazquez Zaplen
Instituto Politécnico Nacional, Mexico

An essential property of stem cells (SCs) is the potentiality, which refers to their capability to differentiate into different cell lineages under certain culture conditions. Two of the greatest challenges in SCs biology and regenerative medicine are differentiation control of SCs and to ensure the purity of differentiated cells. In this work, mouse Pluripotent Stem Cells (mPSCs) were subjected to a differentiation protocol of 21 days obtaining Differentiated Pancreatic Cells (DPCs), characterizing this differentiation process by spectroscopic and genetic analysis through Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy and Real-Time PCR. FTIR spectra of mPSCs and DPCs at different maturation stages (11, 17 and 21 days) were obtained and showed absorption bands related with different types of biomolecules. These FTIR spectra exhibited significant changes particularly in the proteins, carbohydrates and nucleic acids bands agreeing with the differentiation process. The second derivative of these bands and the Principal Components Analysis allowed us to compare and discriminate mPSCs from DPCs. About gene expression, mPSCs expressed pluripotency genes (*Nanog* and *SOX2*) and the DPCs expressed endodermal genes (*SOX17* and *Pdx1*) at day 11, an inducer gene of embryonic pancreas development (*Pdx1*) at day 17 and pancreas genes (*Insulin* and *Glucagon*) at day 21 of differentiation. In conclusion, we obtained DPCs from mPSCs, which passed through the chronological stages of embryonic pancreas development. The FTIR spectral changes provide a new biophysical parameter based on molecular markers that indicate the differentiation process of mPSCs to specialized cells.

Biography

Gustavo Jesus Vazquez Zaplen is a Professor and Laboratory Head of Embryology at Escuela Medico Militar, Mexico. He has earned his BSc in Medicine at Escuela Medico Militar and MD with honor in Biomedical Sciences from Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Presently, he is a PhD candidate at Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada of the Instituto Politécnico Nacional. His work is based on stem cell applications and differentiation.

gus1202@hotmail.com



Componentes Principales mediante Espectroscopia FTIR como Técnica de Caracterización Innovadora durante la Diferenciación de Células Madre Pluripotentes a Células Pancreáticas.

Carla I. Guerrero-Robles¹, Mónica M. Mata-Miranda^{1,2}, César A. González-Díaz^{1,2},
Marlon Rojas-López¹, Virginia Sánchez-Monroy^{2,3}, Raúl J. Delgado-Macuil¹, David G. Pérez-Ishiwara¹ y
Gustavo J. Vázquez-Zapién^{1,2*}

¹ Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Medicina-Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, México.

² Centro Militar de Ciencias de la Salud, Escuela Médico Militar-Escuela Militar de Graduados de Sanidad, México.

³ Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, México.

* Correspondencia: gus1202@hotmail.com

Resumen— Dos de los grandes retos en la biología de las Células Madre (CM) y la Medicina Regenerativa, son el control en la diferenciación de estas células y asegurar la pureza de las células diferenciadas. Es necesario contar con técnicas rápidas, eficientes y precisas para la caracterización de CM y su diferenciación a diferentes linajes celulares. El objetivo de este trabajo fue analizar Células Madre Pluripotentes (CMP) y Células Pancreáticas Diferenciadas (CPD) mediante espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y Análisis de Componentes Principales (ACP). Para ello se diferenciaron CMP a CPD, caracterizando el proceso de diferenciación en diferentes etapas (días 0, 11, 17 y 21) mediante microscopía óptica y espectroscopia vibracional. Los espectros FTIR se analizaron con el método multivariado de ACP, utilizando su segunda derivada en las regiones de proteínas, carbohidratos y ribosas. Los resultados indican que el ACP permite caracterizar y discriminar CMP y CPD en sus diferentes etapas de diferenciación en las regiones espectrales analizadas. Con lo anterior concluimos que el ACP es útil para caracterizar las etapas de diferenciación de CM en una forma práctica, rápida, precisa y no invasiva.

Palabras clave—Células madre pluripotentes, Diferenciación, Espectroscopia FTIR, Componentes Principales.

I. INTRODUCCIÓN

Dos de los grandes retos en la biología de las Células Madre (CM) y la medicina regenerativa, son el control en la diferenciación de CM y asegurar la pureza de las células diferenciadas [1]. De acuerdo a su potencialidad, las CM se dividen en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. Una propiedad esencial de las Células Madre Pluripotentes (CMP) es su capacidad de diferenciarse en más de 200 tipos de células especializadas bajo ciertas condiciones de cultivo [2]. Diversos estudios experimentales en animales y algunos ensayos clínicos empleando CM, han demostrado su potencial terapéutico en enfermedades de impacto mundial y social como la Diabetes, en las cuales los tratamientos médicos actuales son insuficientes para el control metabólico y sin opción regenerativa [3]. Se han propuesto diversos protocolos para la obtención de Células Pancreáticas Diferenciadas (CPD) a partir de CMP,

caracterizándolas antes de ser implantadas en modelos diabéticos animales mediante técnicas especializadas como inmunocitoquímica, citometría de flujo y análisis de marcadores moleculares, las cuales requieren personal especializado, tiempo prolongado y en algunas ocasiones un gran número de células [4, 5].

Por estas razones, es necesario proponer técnicas eficientes, rápidas y no invasivas, que faciliten la identificación de células o etapas de maduración durante el proceso de diferenciación celular.

La espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) es una técnica potente empleada para obtener la huella dactilar molecular de una muestra biológica que absorbe la onda infrarroja de acuerdo con los enlaces químicos y estructurales de las moléculas, proporcionando información de la estructura específica de biomoléculas como proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos a través de una serie de bandas identificables de grupos funcionales en la región electromagnética del infrarrojo medio [6]. Algunos autores han reportado el uso de la espectroscopia FTIR para aplicaciones potenciales en sistemas biológicos, los cuales incluyen estudios citológicos, histológicos y microbianos, acercándose al diagnóstico clínico en combinación con técnicas computacionales [7]. El Análisis de Componentes Principales (ACP) obtenido a partir de bandas espectrales FTIR, permite discriminar diferentes tipos de linajes celulares [8]. Por esta razón, la biospectroscopia comienza a ser una herramienta común en la detección o diagnóstico de laboratorio. Hasta el momento, en la literatura no existen reportes sobre el análisis espectroscópico FTIR y sus componentes principales en la diferenciación de CM a células pancreáticas. El objetivo central de este proyecto es determinar si el ACP a partir de espectros vibracionales FTIR permite caracterizar el proceso de diferenciación de CM a CPD.

II. METODOLOGÍA

A. Diseño experimental.

Se sembraron CMP y se sometieron a un protocolo de diferenciación de 21 días. Durante el proceso de diferenciación, se caracterizaron morfológica y



BIT's 8th World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell-2015 Shanghai, China

Title: Biomolecular Analysis of Differentiated Pancreatic Cells from Embryonic Stem Cells

Dr. Gustavo J. Vazquez-Zapien
Professor
Escuela Medico Militar
Mexico
Collaborators: Marlon Rojas-Lopez, Raul J. Delgado-Macuil, David G. Perez-Ishiwara, Virginia Sanchez-Monroy, Claudia Martinez-Martinez and Monica M. Mata-Miranda

Abstract

Diabetes Mellitus is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia due to secretion defects, inadequate insulin action, or both. Diabetes treatment includes hypoglycemic drugs and insulin replacement therapy, however new alternatives such as cellular therapy need to be proposed. In this study, we differentiated mouse ESC (mESC) to pancreatic cells, determining their genetic, phenotypic, morphological and spectroscopic characterization. To this end, we seeded mESC, and subjected them into a differentiation protocol of 21 days, morphology and relative expression of genes were assessed at 11, 17 and 21 days; insulin and glucagon proteins were evaluated by fluorescence microscopy, and also a spectroscopic analysis by Fourier transform infrared in attenuated total reflection configuration was made. We obtained the following results: morphological analysis showed typical embryonic bodies (EBs), which expressed endodermal germ line genes (*sox-17* y *pdx-1*) at the beginning of differentiation, subsequently an inductor gene of embryonic pancreas development (*pdx-1*) was detected, and pancreas genes (*ins-1*, *ins-2* and *gcg*) were expressed at day 21. Similarly insulin and glucagon proteins were detected on EBs at day 21. mESC spectroscopic analysis show the presence of amide I band in the spectral interval from 1600 to 1700 cm^{-1} , however second derivative gave information of the presence of intramolecular -sheets (1634 cm^{-1}), ? helices (1650 cm^{-1}), and antiparallel -sheets (1693 cm^{-1}). For EBs (11, 17 and 21 days of differentiation) a relative intensity and spectral positions of this components was observed. These spectral variations could be associated with the presence of insulin and glucagon proteins.

Biography

Dr. Gustavo Vazquez now is a Professor and Laboratory Head of Embryology at Escuela Medico Militar, Mexico. He earned his B.Sc. in medicine at Escuela Medico Militar, he received his M.Sc. degree with honor in Biomedical Sciences from Escuela Militar de Graduados de Sanidad, and his M.Sc in Education from Universidad Interamericana para el Desarrollo. Nowadays, he is Ph.D. student at Instituto Politecnico Nacional. Dr. Gustavo Vazquez has based his work on pluripotent stem cells applications and differentiation; on 2014, he was awarded with the XIII Biennial Prize of Ophthalmology in Mexico.

Análisis de Células Madre Pluripotentes Indiferenciadas y Fibroblastos a través de Espectroscopia de Impedancia.

Carla I. Guerrero-Robles^{1,3}, Gustavo J. Vázquez-Zapién^{2,3}, Mónica M. Mata-Miranda^{2,3}, Jesús G. Silva-Escobedo², Lucila M. Lozano-Trenado³ y César A. González-Díaz^{2,3*}

¹Lic. En Biología en Universidad Juárez Autónoma de Tabasco-División Académica de Ciencias Biológicas, Vhsa, Tabasco, México.

²Universidad del Ejército y Fuerza Aérea-Escuela Médico Militar, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, D.F., México

³Instituto Politécnico Nacional-Escuela Superior de Medicina, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, México

* Correspondencia: cgonzalez@ipn.mx

Resumen— Las células madre pluripotentes tienen la capacidad de diferenciarse en distintos linajes celulares, lo cual tiene relevancia en la Ingeniería de regeneración de tejidos. La identificación y caracterización de células diferenciadas requiere de técnicas complejas tales como la citometría de flujo, inmunocitoquímica y la caracterización génica por medio de técnicas moleculares; tales técnicas demandan infraestructura y personal especializado. Por ello el objetivo de este trabajo fue analizar el uso de mediciones de Espectroscopia de Impedancia Eléctrica (EIE) como técnica alterna de identificación de células diferenciadas. Las mediciones de EIE en poblaciones de células madre pluripotentes indiferenciadas y fibroblastos fueron realizadas y comparadas. Los resultados indican que la EIE tiene sensibilidad a frecuencias bajas e intermedias para discriminar entre ambos tipos de poblaciones celulares. Se recomiendan estudios adicionales con diferentes concentraciones y tipos celulares a fin de evaluar cuantitativamente la sensibilidad y especificidad de la técnica propuesta.

Palabras clave—Células madre, Pluripotentes, Espectroscopia, Impedancia.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el cultivo de células madre (troncales) ha tenido un gran auge debido a su capacidad de originar distintos linajes celulares (potencialidad) bajo ciertas condiciones en cultivo [1]. Esta capacidad de diferenciación celular es la tendencia en la ingeniería médica para su uso en la terapia de regeneración de tejidos [2], [3]. Para poder identificar las células ya diferenciadas es necesario el uso de técnicas como la citometría de flujo, la cual se basa en un haz de luz láser para la detección de ciertos marcadores fluorescentes unidos a anticuerpos específicos [4]; la inmunocitoquímica, en la que las células son permeadas con el fin de que los anticuerpos (inmunoglobinas) marcados conjugados con un fluorocromo, como la fluoresceína, se unan al antígeno dentro de la célula y se observan mediante un microscopio de fluorescencia [5]. Finalmente para la caracterización génica se utiliza la PCR en tiempo real (reacción en cadena de la polimerasa), en la cual se extrae RNA y se cuantifican los niveles de expresión génica relativa de genes específicos para el desarrollo celular [6]. Las técnicas citadas son muy eficientes pero costosas y

requieren de infraestructura y personal especializado, por lo que resulta pertinente proponer técnicas emergentes que pudiesen facilitar la identificación de células diferenciadas. En ese sentido, en un estudio reportado por Arum Han *et al.* en el 2007 se mostró la viabilidad de diferenciar distintas líneas celulares tumorales a través de la caracterización de sus propiedades eléctricas medidas con Espectroscopia de Impedancia Eléctrica (EIE) [7]. Hasta donde conocemos, en la literatura no existen reportes sobre biosensores de células madre indiferenciadas y células especializadas basados en mediciones de EIE. El objetivo central de este trabajo fue analizar el uso de la EIE como técnica alterna para diferenciar poblaciones de células madre pluripotentes indiferenciadas de aquellas diferenciadas a fibroblastos, siendo la idea central evaluar la factibilidad técnica de proponer mediciones de EIE como técnica simple para identificar células madre diferenciadas.

II. METODOLOGÍA

A. Diseño experimental.

El concepto biofísico de mediciones de EIE en células en suspensión se muestra en la figura 1. Dos tipos de células son evaluadas: Células Madre Pluripotentes indiferenciadas y Fibroblastos Embrionarios de ratón (MEF), aproximadamente 200,000 células de cada tipo fueron suspendidas en 200 μ l de PBS y depositadas sobre una superficie de cuarzo con electrodos de oro embebidos, tales electrodos representan la interfase eléctrica-iónica que fundamentan las bases de nuestra propuesta de biosensor de células madre diferenciadas basado en mediciones de EIE. Espectros de bioimpedancia a múltiples frecuencias para cada tipo de células fueron realizadas por triplicado.

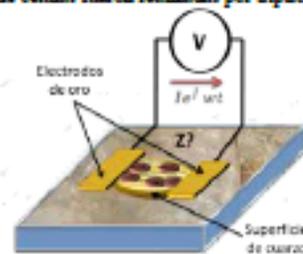


Fig. 1. Esquema biosensor de células madre basado en mediciones de EIE.



Instituto Politécnico Nacional
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada Tlaxcala

AWARDS THIS
CERTIFICATE OF PRESENTATION

to:
**MÓNICA MARIBEL MATA MIRANDA, GUSTAVO JESÚS VÁZQUEZ ZAPIÉN,
 MARLON ROJAS LOPEZ, DAVID GUILLERMO PÉREZ ISHIWARA, RAÚL
 DELGADO MACUIL AND LUIS RUBEN MARTÍNEZ NAVA**

for presenting the contribution entitled:

**HISTOLOGIC AND SPECTROSCOPIC STUDY OF PLURIPOTENT STEM CELLS
 AFTER IMPLANTIG IN OCULAR TRAUMATIC INJURIES IN A MURINE
 MODEL**

IN THE

**1ST BIOTECHNOLOGY & 9^o ENCUESTRO NACIONAL
 WORLD SYMPOSIUM DE BIOTECNOLOGÍA DEL IPN**

Atlihuetzia Tlaxcala, México, October 13 to 16, 2014.

Myrna Solis Oba
 Dra. Myrna Solis Oba
 Presidente del comité organizador

Norma Patricia Muñoz Sevilla
 Dra. Norma Patricia Muñoz Sevilla
 Secretaria de Investigación y Posgrado

David Guillermo Pérez Ishiwara
 Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara
 Director CIBA Tlaxcala

D. PREMIOS OBTENIDOS DURANTE EL DOCTORADO

 **SOMIB**
Sociedad Mexicana
de Ingeniería Biomédica

 **XXXIX**
Congreso Nacional de
Ingeniería Biomédica

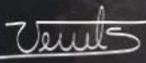
La Sociedad Mexicana de Ingeniería Biomédica A.C.
otorga el presente reconocimiento a:

CARLA I. GUERRERO-ROBLES, MÓNICA M. MATA-MIRANDA, CÉSAR A. GONZÁLEZ-DÍAZ, MARLON ROJAS-LÓPEZ, VIRGINIA SÁNCHEZ-MONROY, RAÚL J. DELGADO-MACUIL, DAVID. G. PÉREZ-ISHIWARA Y GUSTAVO J. VÁZQUEZ-ZAPIÉN.

Por su participación con el trabajo libre:

"Componentes Principales Mediante Espectroscopia FTIR como Técnica de Caracterización Innovadora durante la Diferenciación de Células Madre Pluripotentes a Células Pancreáticas" GANADOR DEL CONCURSO ESTUDIANTIL NIVEL POSGRADO.

en el XXXIX Congreso Nacional de Ingeniería Biomédica
realizado del 25 al 28 de septiembre del 2016 en Mérida, Yucatán.


Ing. Elliot Vernet
Presidente Somib


Dr. César A. González Díaz
Presidente del Comité Científico Somib

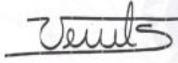
La Sociedad Mexicana de Ingeniería Biomédica
otorga el presente

 **ICFORO**
INTERNATIONAL CLINICAL ENGINEERING FORUM

RECONOCIMIENTO

a Gustavo J. Vázquez-Zapién

Po haber obtenido el primer lugar en el concurso estudiantil "Mtro. Enrique Hernández Matos" con el trabajo *Análisis de Células Madre Pluripotentes Indiferenciadas y Fibroblastos a Través de Espectroscopia de Impedancia del XXXVIII Congreso Nacional de Ingeniería Biomédica* .
Realizado del 29 al 31 de octubre de 2015.
Mazatlán, Sinaloa, México


I.B. Elliot A. Vernet Saavedra
Presidente SOMIB


I.B. Christian E. Vázquez Pizarro
Director ICFORO

 **SOMIB**
Sociedad Mexicana
de Ingeniería Biomédica

 **XXXVIII**
CNIB2015
<http://cnib.somib.org.mx>



La Universidad Nacional Autónoma de México
El PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

y la

ASOCIACIÓN PREMIO BIENAL DE OFTALMOLOGÍA

Otorgan el

XIII PREMIO BIENAL DE OFTALMOLOGÍA

a:

Luis Rubén Martínez Nava, Gustavo Jesús Vázquez Zapién
Gabriel Antonio Ochoa Maynez, Mónica Maribel Mata Miranda



Por el desarrollo del trabajo: "Eficacia en la cicatrización de lesiones retinianas traumáticas al implantar células madre pluripotentes de ratón. Modelo experimental en ratón", realizado en la Escuela Militar de Graduados de Sanidad y Escuela Médico Militar de la Universidad del Ejército y Fuerza Aérea.

Ciudad Universitaria, México D.F. a 17 de junio de 2014.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Dr. Joaquín López-Sáenz
Coordinador del Programa Universitario

Dr. Tito Ramírez Luquín
Presidente de la Asociación

BIBLIOGRAFÍA

1. Park JH, Kim SJ, Oh EJ, Moon SY, Roh SI, Kim CG, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell on sto, a permanently growing cell line. *Biol Reprod.* 2003; 69:2007-2014.
2. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Inmunología de Kuby*, Sexta edición, México, D.F.: McGraw Hill Interamericana, 2007:32-33.
3. Das S, Bonaguidi M, Muro K, Kessler JA. Generation of embryonic stem cells: limitations of and alternatives to inner cell mass harvest. *Neurosurg Focus.* 2008; 24:1-12
4. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981; 292:154-156.
5. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282:1145-1147.
6. Baker PS, Brown GC. Stem-cell therapy in retinal diseases. *Curr Opin Ophthalmol.* 2009; 20:175-181.
7. Gjorret JO, Maddox-Hyttel P. Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell-like cultures. *Reprod Fertil Dev.* 2005; 17:113-124.
8. Hooper ML. Embryonal stem cells: introducing planned changes into the germline. Evans HJ (ed) *Modern Genetics Vol. 1.* Switzerland. Harwood Academic Publishers, 1992: 52-55.

9. Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Li T, Maserati M, Lu SJ, et al. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell*. 2008; 2:113-117.
10. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*. 1984; 309:255-256.
11. Brunt KR, Weisel RD, RK Li. Stem cells and regenerative medicine - future perspectives. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012; 90:327-335.
12. Lovell-Badge R. The future for stem cell research. *Nature*. 2001; 414:88-91.
13. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131:861-872.
14. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126:663-676.
15. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; 318:1917-1920.
16. Alonso BC. Células troncales embrionarias (ES). Derivación, propiedades y capacidades funcionales. *Investigación en células madre. Fundación Medicina y Humanidades Médicas*. 2005:23-40.

17. Hoffman LM, Carpenter MK. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2005; 23:699-708.
18. Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, Beighton G, et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 2007; 25:803-816.
19. Bendall SC, Stewart MH, Menendez P, George D, Vijayaragavan K, Werbowetski-Ogilvie T, Ramos-Mejia V, et al. IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature.* 2007; 448:1015-1021.
20. Rao BM, Zandstra PW. Culture development for human embryonic stem cell propagation: molecular aspects and challenges. *Curr Opin Biotechnol.* 2005; 16:568-576.
21. Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2001; 19:971-974.
22. Price PJ, Goldsborough MD, Tilkins ML. Embryonic stem cell serum replacement. International Patent Application WO 98/30679.
23. Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J. Feeder layer-and serum free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod.* 2004; 70:837-845.

24. Levenstein ME, Ludwig TE, Xu RH, Llanas RA, VanDenHeuvel-Kramer K, Manning D, et al. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells*. 2006; 24:568-574.
25. Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods*. 2005; 2:185-190.
26. Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, Hinton A, Firpo MT, King CC et al. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells*. 2005; 23:489-495.
27. Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L, Dimmick I, Renström J, Lang R, et al. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell*. 2008; 3:85-98.
28. Menendez P, Bueno C, Wang L. Human embryonic stem cells: A journey beyond cell replacement therapies. *Cytotherapy*. 2006; 8:530-541.
29. Doss MX, Koehler CI, Gissel C, Hescheler J, Sachinidis A. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. *J Cell Mol Med*. 2004; 8:465-473.
30. Asahara T, Kalka C, Isner JM. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther*. 2000; 7:451-457.
31. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2011;S62-S69.

32. NOM-015-SSA2-2010. Para la prevención, tratamiento y control de la Diabetes mellitus. Norma Oficial Mexicana.
33. Altamirano LM. Medicina actual Epidemiología y Diabetes. Rev Fac Med UNAM. 2001; 44:36-38.
34. Secretaría de Salud (1a. Edición, 2007). Programa Nacional de Salud 2007-2012. México, D.F.: Secretaría de Salud.
35. Wong, RSY. Extrinsic Factors Involved in the Differentiation of Stem Cells into Insulin-Producing Cells: An overview. Exp Diabetes Res. 2011; 2011:406182.
36. Wolff SP. Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. Br Med Bull. 1993; 49:642-652.
37. Domínguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 Diabetes in children and adolescents. Diabetes Care. 1998; 21:1736-1742.
38. Baetge EE. Production of beta-cells from human embryonic stem cells. Diabetes Obes Metab. 2008; 10:186-194.
39. Olvera-Granados CP, Leo-Amador GE, Hernández-Montiel HM. Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endócrina. ¿Regeneración?. Bol Med Hosp Infan Mex. 2008; 65:306-324.
40. Ross, Romrell, Kaye. Histología, texto y atlas. 3a edición. México: Panamericana; 1997:511- 4.

41. Stevens A, Lowe J. Texto y atlas de histología. 2a. edición. Buenos Aires: Harcourt Brace; 1998:257-69.
42. Vinik A, Rosenberg L, Pittenger GL, Taylor-Fishwick D. Stimulation of pancreatic islet neogenesis: a possible treatment for type 1 and type 2 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes*. 2004; 11:125-140.
43. Mastsumara G, England M. Embriología, representaciones gráficas. España: Mosby/Doyma. 1996:208.
44. Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lóra J, Zaret KS. A bipotential precursor population for pancreas and liver with in the embryonic endoderm. *Development*. 2001; 128:871-881.
45. Zulewski H. Stem cells with potential to generate insulin producing cells in man. *Swiss Med Wkly*. 2006; 136:647-654.
46. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Müller B, et al. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine and hepatic phenotypes. *Diabetes*. 2001; 50:521-533.
47. Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N. The effect of over expression of Pdx1 and Foxa2 on the differentiation of human embryonic stem cells into pancreatic cells. *Stem Cells*. 2006; 24:1923-1930.
48. Edlund H. Transcribing pancreas. *Diabetes* 1998; 47:1817-1823.

49. Lammert E, Cleaver O, Melton D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science*. 2001; 294:564-567.
50. Rafaeloff R, Pittenger GL, Barlow SW, Qin XF, Yan B, Rosenberg L, et al. Cloning and sequencing of the pancreatic islet neogenesis associated protein (INGAP) gene and its expression in islet neogenesis in hamsters. *J Clin Invest* 1997; 99:2100-2109.
51. Shih DQ, Screenan S, Muñoz KN, Philipson L, Pontoglio M, Yaniv M, et al. Loss of HNF-1 α function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. *Diabetes*. 2001; 50:2472-80.
52. Ventura-Sobrevilla J, Boone-Villa VD, Aguilar CN, Román-Ramos R, Vega-Ávila E, Campos-Sepulveda E, et al. Effect of varying dose and administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 mice. *Proc West Pharmacol Soc*. 2011; 54:5-9.
53. Hugues-Hernandorena B, Rodríguez-Gonzalez JC, Rodríguez-García JC. Animales de laboratorio en la endocrinología: biomodelos de la diabetes mellitus tipo 1. *Rev Cubana Endocrinol*. 2001; 12:168-177.
54. Golde WT, Gollobin P, Rodriguez LL. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab anim*. 2005; 34:39-43.
55. Tjälve H, Wilander E, Johansson EB. Distribution of labeled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *J Endocr*. 1976; 69:455-456.

56. Kunjathoor VV, Wilson DL, LeBoeuf RC. Increased Atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Clin Invest.* 1996; 97:1767-1773.
57. Nichols WK, Spellman JB, Vann LL, Dynes RA. Immune responses of diabetic animals. Direct immunosuppressant effects of streptozotocin in mice. *Diabetologia.* 1979; 16:51-57.
58. Hilakivi-Clarke LA, Wozniak KM, Durcan MJ, Linnoila M. Behavior of streptozotocin-diabetic mice in tests of exploration, locomotion, anxiety, depression and aggression. *Physiol Behav.* 1990; 48:429-433.
59. Stearns SB, Benzo CA. Glucagon and insulin relationships in genetically diabetic (db/db) and in streptozotocin-induced diabetic mice. *Horm Metab Res.* 1978; 10:20-23.
60. Drel VR, Pacher P, Vareniuk I, Pavlov I, Ilnytska O, Lyzogubov VV, et al. A peroxy nitrite decomposition catalyst counteracts sensory neuropathy in streptozotocin-diabetic mice. *Eur J Pharmacol.* 2007; 569:48-58.
61. Nangle MR, Cotter MA, Cameron NE. Protein kinase C β inhibition and aorta and corpus cavernosum function in streptozotocin-diabetic mice. *Eur J Pharmacol.* 2003; 475:99-106.
62. Ramalho-Santos M, Wilenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell.* 2007; 1:35-38.

63. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblast. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105:2883-2888.
64. Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashmmakhj N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2008; 2:169-183.
65. Ku HT, Zhang N, Kubo A, O'Connor R, Mao M, Keller G, et al. Committing embryonic stem cells to early endocrine pancreas in vitro. *Stem Cells*. 2004; 22:1205-1217.
66. Jiang W, Shi Y, Zhao D, Chen S, Yong J, Zhang J, et al. In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Res*. 2007; 17:333–344.
67. Kim PT, Hoffman BG, Plesner A, Helgason CD, Verchere CB, Chung SW, et al. Differentiation of mouse embryonic stem cells into endoderm without embryoid body formation. *Plos One*. 2010; 5:1-8.
68. Liu GL, Lu YF, Li WJ, Xiao HZ, Sun GG, Yu F, et al. Differentiation of marrow-derived islet-like cells and their effects on diabetic rats. *Chin Med J*. 2010; 123: 3347-3350.
69. Hui H, Tang YG, Zhu L, Khoury N, HuiZ, Wang KY, et al. Glucagon like peptide-1 directed human embryonic stem cell differentiation into insulin-producing cells via hedgehog, cAMP, and PI3K pathways. *Pancreas*. 2010; 39:315-322.

70. Chen C, Chai J, Singh L, Kuo CY, Jin L, Feng T, et al. Characterization of an in vitro differentiation assay for pancreatic-like cell development from murine embryonic stem cells detailed gene expression analysis. *Assay Drug Dev Technol.* 2011; 9:403-419.
71. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science.* 2001; 292:1389–1394.
72. Keira SM, Ferreira LM, Gagnani A, Duarte IS, Santos IAN. Experimental model for fibroblast culture. *Acta Cir Bras.* 2004; 19:11-15.
73. Hernandez SC, Bartulos EO, Davila P, Jimenez AA. Uso de catecolamina para la diferenciación de células madre a cardiomiocitos. Organización mundial de la propiedad intelectual. 2010; WO2010/018297 A1.
74. Dvash T, Mayshar Y, Darr H, McElhaney M, Barker D, Yanuka O, et al. Temporal gene expression during differentiation of human embryonic stem cells and embryoid bodies. *Hum Reprod.* 2004; 19:2875-2883.
75. Liu L, Rando TA. Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *J Cell Biol.* 2011; 193:257-266.
76. Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, Vega VB, et al.: Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell.* 2008; 133:1106-1117.

77. Kanai-Azuma M, Kanai Y, Gad JM, Tajima Y, Taya C, Kurohmaru M, et al. Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development*. 2002; 129:2367-2379.
78. Jang YY, Sharkis SJ. Fetal to adult stem cell transition: knocking Sox17 off. *Cell*. 2007; 130:403-404.
79. Kaneto H, Miyatsuka T, Kawamori D, Matsuoka T. Pleiotropic Roles of PDX-1 in the Pancreas. *Rev Diabet Stud*. 2007; 4:209-225.
80. Akinci E, Banga A, Greder LV, Dutton JR, Slack JM. Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a beta (β) cell character using Pdx1, Ngn3 and MafA. *Biochem J*. 2012; 442:539-550.
81. Fomina-Yadlin D, Kubicek S, Vetere A, He KH, Schreiber SL, Wagner BK. GW8510 increases expression in pancreatic alpha cells through activation of p53 transcriptional activity. *Plos One*. 2012; 7:1-12.
82. Deltour L, Leduque P, Blume N, Madsen O, Dubois P, Jami J, et al. Differential expression of the two nonallelic proinsulin genes in the developing mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90; 527-531.
83. Madonna R, Caterina R. Aterogénesis y diabetes, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia. *Rev Esp Cardiol*. 2012; 65:309-313.
84. Teo AK, Ali Y, Wong KY, Chipperfield H, Sadasivam A, Poobalan Y, et al. Activin and BMP4 synergistically promote formation of definite endoderm in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2012; 30:631-642.

85. Vázquez-Zapién GJ, Sanchez-Monroy V, Chirino YI, Mata-Miranda MM. Morphological, genetic and protein characterization in the differentiation of embryonic stem cells to early pancreatic cells. *Int J Morphol*. 2013; 31:1421-1429.
86. Cao J, Ng ES, McNaughton D, Stanley EG, Elefanty AG, Tobin MJ, et al. The characterisation of pluripotent and multipotent stem cells using Fourier transform infrared microspectroscopy. *Int J Mol Sci*. 2013; 14:17453-17476.
87. Ami D, Neri T, Natalello A, Mereghetti P, Doglia SM, Zanoni M, et al. Embryonic stem cell differentiation studied by FT-IR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1783:98-106.
88. Downes A, Mouras R, Elfick A. Optical spectroscopy for noninvasive monitoring of stem cell differentiation. *Biomed Res Int*. 2010; 2010:101864.
89. Oyamada Y, Komatsu K, Kimura H, Mori M, Oyamada M. Differential regulation of gap junction protein (connexin) genes during cardiomyocytic differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Exp Cell Res*. 1996; 229:318-326.
90. Chen YJ, Cheng YD, Liu HY, Lin PY, Wang CS. Observation of Biochemical Imaging Changes in Human Pancreatic Cancer Tissue using Fourier-transform Infrared Microspectroscopy. *Chang Gung Med J*. 2006; 29:518-527.
91. Wray J, Kalkan T, Gomez-Lopez S, Eckardt D, Cook A, Kemler R, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat Cell Biol*. 2011; 13:838-845.

92. Ji Y, Tulin AV. Poly (ADP-ribose) controls DE-cadherin-dependent stem cell maintenance and oocyte localization. *Nat Commun.* 2012; 3:760.
93. Banyay M, Sarkar M, Graslund A. A library of IR bands of nucleic acids in solution. *Biophys Chem.* 2003; 104:477-488.
94. Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM, Kouskoff V, Kennedy M, Woo S, et al. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development.* 2004; 131:1651-1662.
95. Vázquez-Zapien GJ, Mata-Miranda MM, Sánchez-Monroy V, Delgado-Macuil RJ, Perez-Ishiwara DG, Rojas-López M. FTIR spectroscopic and molecular analysis during differentiation of pluripotent stem cells to pancreatic cells. *Stem Cells Int,* 2016; 2016:6709714.
96. Walsh MJ, Hammiche A, Fellous TG, Nicholson JM, Cotte M, Susini J, et al. Fourier transform infrared microspectroscopy identifies symmetric PO₂⁻ modifications as a marker of the putative stem cell region of human intestinal crypts. *Stem Cells.* 2008; 26:108-118.