



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE
JALISCO, A.C.**



**“Evaluación del efecto de hesperidina en la diferenciación de células
troncales mesenquimales de cordón umbilical (CTMCU) hacia células
productoras de insulina (CPI)”**

TESIS

**Para obtener el grado académico de
Maestría en Ciencias en Innovación Biotecnológica**

P R E S E N T A

Israel Sánchez Gómez

Dirección: Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo

Co-Dirección: M. en C. Flor Yohana Flores Hernández

Asesor: Dr. Jorge Bravo Madrigal

Guadalajara, Jal. Julio 2018



Guadalajara, Jalisco a 27 de julio de 2018

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del (la) estudiante **Israel Sánchez Gómez**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “EVALUACIÓN DEL EFECTO DE HESPERIDINA EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE CORDÓN UMBILICAL (CTMCU) HACIA CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA (CPI)” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica con especialidad en Biotecnología Médica durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 30 del mes de julio del año dos mil dieciocho.

Nombre y firma

Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo

Nombre y firma

Mtra. Flor Flores Hernández.

Nombre y firma

Dr. Jorge Bravo Madrigal.

Directora de tesis

Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Co-directora

M. en C. Flor Yohana Flores Hernández
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Asesor

Dr. Jorge Bravo Madrigal
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Jurado de Examen de Grado

Presidente

Dr. Jorge Gaona Bernal
Departamento de Microbiología
Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Secretario

Dr. Jorge Bravo Madrigal
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Vocal

Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

La presente tesis de maestría se llevó a cabo gracias a la beca CONACYT otorgada al QFB. Israel Sánchez Gómez Reg. No. 456496 y al proyecto aprobado por el Fondo Sectorial de Salud FOSSIS IMSS/ISSTE /SS 233146.

DEDICATORIA

A Dios primeramente porque por él llegué hasta aquí.

A mis padres, hermanos y cada integrante de mi familia por su apoyo, comprensión y respaldo para impulsarme a continuar con mis estudios alentándome en cada momento.

A mi esposa Laura y su amor por mí y por su apoyo en el camino de la ciencia.

A cada integrante de mi comité tutorial, por sus valiosas aportaciones, su respaldo y confianza.

Y muy en especial al Dr. Gustavo Dávila, porque tuve el privilegio de compartir en esta tierra un poco de tiempo, suficiente para dejarme una enseñanza tremenda por amar lo que uno hace y a tu familia, aunque no siempre sea de sangre.

AGRADECIMIENTOS

A Dios primeramente por la vida, la fuerza y la gracia para completar cada una de las metas que he alcanzado hasta hoy, porque sin Él nada tendría sentido.

A mi Amada esposa no solo por su apoyo en encontrar la respuesta a los problemas diarios sino por su amor, comprensión y paciencia de seguir a mi lado para superarnos día a día en todas las áreas de la vida.

A mis padres Inés y Eduardo, que forjaron en mí un carácter que no me permite rendirme ante ningún problema, así como un enorme ejemplo de amor entre ellos y por el prójimo.

A cada uno de mis hermanos, no solo de sangre, por su apoyo incondicional y su respaldo en todo momento dándome valiosos consejos para lograr mis sueños.

A mis directoras de tesis, la Dra. Nahomy y la Mtra. Flor, por su confianza, mucha paciencia, respaldo en cuestiones técnicas y sobre todo el ejemplo de ser personas de gran carácter que en el ámbito de la ciencia “fría”, como a muchos les parece, puede y debe existir un calor humano y amistad que alimentan el espíritu de curiosidad por mejorar un poquito la sociedad y a uno mismo.

Al Dr. Jorge Bravo, hombre íntegro que forma una mancuerna ideal con mis directoras, me mostró que no hay que conformarse con lo que uno ve, sino que hay que excavar para descubrir el porqué de lo que observamos para contribuir a nuestra edificación sólida y el de la sociedad.

A cada una de las hermosas e invaluable personas que me que me apoyaron y participaron en la realización de este proyecto no solo el grupo de Investigadores del CIATEJ entre los que cabe resaltar al Dr. Gustavo Dávila, Dr. Jorge Gaona, Dr. Mario Flores y claro de mis compañeros de estudio Sara, Luis, Ulises, Jonathan, Paco, Hilda, Daniel, Damián y a todos mis demás compañeros de generación, gracias.

Y por último a la sociedad mexicana que me dio la oportunidad de llevar a cabo este proyecto, gracias.

RESUMEN

La hesperidina es un glucósido-flavonona encontrado en cítricos, principalmente de la naranja ordinaria y cítricos del género citrus-rutacea, cabe resaltar que es un subproducto abundante de desecho de los procesos industriales del cultivo, procesamiento y producción de cítricos, el cuál puede ser aprovechado generando valor agregado a este desecho. Se ha reportado que sus metabolitos protegen de la oxidación celular y pueden regular la ruta de la fosfatidil-inositol 3-cinasa, la proteína cinasa activada por mitógenos y la ruta de β -catenina, las cuales están implicadas en el desarrollo de las células β -pancreáticas, por lo que en este trabajo se adicionó la hesperidina a un proceso de diferenciación guiado por distintos factores para la obtención de células productoras de insulina a partir de células troncales de cordón umbilical, para ofrecer una posible fuente terapéutica celular en enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, padecimiento caracterizado por una falta de insulina funcional debido a un daño en las células β del páncreas, esta es una enfermedad que encabeza la lista de trastornos metabólicos con una creciente mortalidad, en México representa la primera causa de muerte, por ello la incorporación de la hesperidina al proceso de diferenciación surge como una alternativa para la búsqueda y evaluación de nuevas moléculas que pudieran ampliar la posibilidad de obtener un mayor rendimiento en la producción de insulina de las células obtenidas por diferenciación *in vitro*.

ABSTRACT

The hesperidin is a glucoside-flavonone found in citrus, mainly from the ordinary orange and citrus of the genus citrus-rutacea, it is worth mentioning that it is an abundant waste by product of the industrial processes of citrus cultivation, processing and production, which can be exploited by generating added value to this waste. It has been reported that their metabolites protect from cell oxidation and can regulate the route of phosphatidylinositol 3-kinase, mitogen activated protein kinase and the β -catenin pathway, which are involved in the development of pancreatic β cells so in this work, hesperidin was added to a differentiation process guided by different factors to obtain insulin-producing cells from umbilical cord stem cells, in order to offer a possible cellular therapeutic source in chronic diseases such as diabetes mellitus, a condition characterized by a lack of functional insulin due to damage to the β cells of the pancreas, this is a disease that tops the list of metabolic disorders with increasing mortality. In Mexico represents the first cause of death, so the incorporation of hesperidin to the differentiation process arises as an alternative for the search and evaluation of new molecules that could expand the possibility to obtaining greater performance in the production of insulin from cells obtained by differentiation *in vitro*.

INDICE DE CONTENIDO

Índice de Figuras	viii
Índice de Tablas	x
Lista de abreviaturas	xi
1. ANTECEDENTES	1
1.1. DIABETES MELLITUS (DM)	1
1.1.1. Definición	1
1.1.2. Clasificación y tipos de DM	1
1.1.3. Epidemiología	3
1.1.4. Resistencia a la insulina y disfunción de las células β	5
1.1.5. Terapias para la DM	6
1.1.6. Terapia Celular	7
1.1.7. Células Troncales	8
1.1.7.1. <i>Células troncales mesenquimales de cordón umbilical (CTMCU)</i>	9
1.2. PÁNCREAS Y CÉLULAS BETA	10
1.2.1. Páncreas	10
1.2.2. Organogénesis del páncreas: maduración de las células β	11
1.2.3. Transición Primaria	15
1.2.4. Transición secundaria	16
1.2.5. Transición terciaria	19
1.2.6. Células β	23
1.2.6.1. <i>Síntesis de insulina</i>	24
1.3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE PARTICIPAN EN LA DIFERENCIACIÓN Y	24
1.3.1. Vía de Notch	24
1.3.1.1. <i>Mantenimiento de los progenitores pancreáticos</i>	27
1.3.2. Vía de Fosfatidil inositol 3 cinasa/proteína cinasa B (PI3K/Akt)	28
1.3.2.1. <i>Akt y Apoptosis</i>	31
1.4. HESPERIDINA: MOLÉCULA A EVALUAR COMO INDUCTORA EN LA DIFERENCIACIÓN	33
1.5. MOLÉCULAS DE DIFERENCIACIÓN EN MODELOS <i>IN VITRO</i>	35
1.5.1. Activina A	35
1.5.2. Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)	36
1.5.3. Nicotinamida	38
1.5.4. Ácido retinoico (AR)	39
1.5.5. GLP-1	39
1.5.6. B27	40
1.5.7. ITS	40
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
3. JUSTIFICACIÓN	40
4. HIPÓTESIS	41
5. OBJETIVOS	42
5.1. OBJETIVO GENERAL	42
5.1.1. Objetivos específicos	42
6. METODOLOGÍA	43
6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	43
7. MATERIAL Y MÉTODOS	45
7.1. LÍNEA CELULAR DE CORDÓN UMBILICAL (CTMCU)	45

INDICE DE CONTENIDO

7.1.1.	Cultivo y propagación	45
7.2.	CURVA DE VIABILIDAD DE HESPERIDINA POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	45
7.3.	ANÁLISIS DE MARCADORES CARACTERÍSTICOS DE CÉLULAS MESENQUIMALES.....	46
7.4.	DIFERENCIACIÓN <i>IN VITRO</i> HACIA CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA (CPI)	47
7.5.	IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS OBTENIDAS	49
7.5.1.	Búsqueda y selección de iniciadores	49
7.5.2.	Análisis de la expresión génica.	49
7.5.2.1.	<i>Extracción de RNA total.</i>	49
7.5.2.2.	<i>Cuantificación de RNA</i>	50
7.5.2.3.	<i>Síntesis de cDNA</i>	51
7.5.2.4.	<i>Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	52
7.5.2.5.	<i>Análisis de expresión génica por densitometría</i>	53
7.5.3.	Análisis de insulina intracelular	53
7.5.4.	Análisis de insulina liberada al medio	54
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
8.1.	STOCK DE TRABAJO DE CTMCU	56
8.1.1.	Análisis de viabilidad con hesperidina.....	56
8.2.	IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS OBTENIDAS	58
8.2.1.	Búsqueda y selección de iniciadores	58
8.2.2.	Estandarización de condiciones de la PCR para los iniciadores	58
8.2.3.	Análisis de marcadores de tipo mesenquimal de CTMCU.....	59
8.2.4.	Análisis de insulina intracelular	59
8.2.5.	Análisis de expresión de mRNA por densidad relativa.	61
	DISCUSIÓN.....	67
9.	CONCLUSIONES.....	75
10.	PERSPECTIVAS.....	76
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	77
12.	ANEXOS	87
12.1.	PRODUCTOS ACADÉMICOS	87

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento de mortalidad por DM	3
Figura 2. Prevalencia de DM en nuestro país.....	4
Figura 3. Prospectiva de defunciones por DM en México (1992-2020).....	4
Figura 4. Ubicación del páncreas en la cavidad abdominal	11
Figura 5. Factores transcripcionales importantes en el desarrollo de la célula β pancreática y otras estirpes pancreáticas.....	20
Figura 6. Esquema de la regulación de glucosa de una célula	23
Figura 7. Esquema de varios efectos intracelulares de la vía Akt/PKB	30
Figura 8. Molécula de hesperidina.....	33
Figura 9. Células troncales mesenquimales de cordón umbilical.	56
Figura 10. Curva de viabilidad de hesperidina en células MSC de cordón umbilical	56
Figura 11. Análisis por citometría de curva de viabilidad de hesperidina en células MSC de cordón umbilical	57
Figura 12. Porcentaje de viabilidad celular.	57
Figura 13. Marcadores característicos de MSC.....	59
Figura 14. 1° Análisis de insulina intracelular por tratamiento.....	60
Figura 15. 2° Análisis de insulina intracelular por tratamiento con 3 réplicas.....	61
Figura 16. Densidad relativa de mRNA de etapa 1 (Tx2).....	62
Figura 17. Densidad relativa de mRNA de etapa 2 (Tx2).....	63
Figura 18. Densidad relativa de mRNA de etapa 3 (Tx2)	63
Figura 19. Densidad relativa de mRNA de etapa 1 (Tx3).....	63
Figura 20. Densidad relativa de mRNA de etapa 2 (Tx3).....	64
Figura 21. Densidad relativa de mRNA de etapa 3 (Tx3).....	64
Figura 22. Densidad relativa de genes de etapa 1 Tx2 vs Tx3.....	65
Figura 23. Densidad relativa de genes de etapa 2 Tx2 vs Tx3.....	65
Figura 24. Densidad relativa de genes de etapa 3 Tx2 vs Tx3.....	65

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales funciones de los factores de transcripción indispensables para la formación de células β	22
Tabla 2. Grupos para citometría para viabilidad.....	47
Tabla 3. Diseño de experimento	47
Tabla 4. Preparación de soluciones.....	50
Tabla 5. Preparación de soluciones Qubit™.....	51
Tabla 6. Preparación de soluciones para RT.	51
Tabla 7. Condiciones de retrotranscripción para la síntesis de cDNA.....	52
Tabla 8. Mix de PCR para una reacción.....	52
Tabla 9. Condiciones de la PCR para el análisis de los genes de interés.....	52
Tabla 10. Características de iniciadores seleccionados.....	58
Tabla 11. Tm óptimas de los iniciadores.....	58
Tabla 12. Análisis preliminar de insulina intracelular.	60
Tabla 13. 2° Análisis de insulina intracelular con 3 réplicas: Tratamiento control (Tx2) vs Mejor tratamiento con hesperidina (Tx3).	61
Tabla 14. Densidad relativa de mRNA.....	62
Tabla 15. Insulina extracelular	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	Ácidos grasos libres
AKT	Proteína cinasa B
AP1	Adaptador relacionado con el complejo proteico 1
APC	Regulador de la vía de señalización WNT
Arx	<i>Aristaless related homeobox</i>
ATCC	Colección Americana de Cepas de Cultivo
ATP	Adenosina trifosfato
Bad	Agonista de muerte celular asociado a BCL2
Bcl-2	Regulador de apoptosis Bcl2
BSA	Albúmina
Cdk	Cinasa dependiente de ciclina
c-Myc	Factor de transcripción de protooncogén bHLH
Cpa	Carboxipeptidasa
CPI	Células productoras de insulina
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP
CTMCU	Células troncales de cordón umbilical
CXCR4	Receptor 4 de la quimiocina
Dll1	Ligando delta 1 a Notch tipo canónico
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Medio mínimo esencial <i>Eagle Dulbecco's</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ED	Endodermo definitivo
EDTA	Ácido Etilenediaminotetrácetico
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas
EP	Endodermo pancreático
ERK1/2	Cinasas reguladas por señales extracelular
FGF	Factor Fibroblástico de crecimiento
FGFR	Receptor del Factor Fibroblástico de crecimiento
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
Fos	Fos proto-oncogén
FoxA1/2	<i>Forkhead box</i>
G6pc2	Glucosa-6-fosfatasa subunidad catalítica de proteínas 2
GATA	Proteína de unión a GATA
Glis3	Proteína finger zinc tipo Kruppel
GLP1	Péptido similar a glucagón tipo 1
GSK3 β	Glucógeno sintasa cinasa 3 β
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
Hes1	<i>Hairy and enhancer of split-1</i>
hESC	Células troncales embrionarias humanas
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
Hlx _{b9}	<i>Motor neuron and pancreas homeobox 1</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

HO [·]	Radical oxhidrilo
Ia2	Antígeno de islotes 2
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IFN-γ	Interferón gamma
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina.
Igfl	Tipo factor de crecimiento similar a la insulina
IL-1	Interleucina
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
Inms	Factor asociado a insulinoma
Irs	Gen de sustrato de receptor de insulina
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular
Islet 1	<i>LIM homeobox 1</i>
ITS	Insulina-transferrina-selenio
Jag1	Gen <i>jagged 1</i>
JNK	Cinasas c-Jun N-terminal
MafB	Gen de cremallera de leucina básica
MAP/MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
Mdm2	<i>Proto-oncogen murine double minute 2</i>
MEM	Medio Mínimo Esencial
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MLK3	Linaje mixto quinasa 3
mM	Milimolar
MMTV	Virus del tumor mamario de ratón
Mnx1	<i>Motor neuron and pancreas homeobox 1</i>
MPC	Células progenitoras multipotentes
mRNA	Mensajero del Ácido Ribonucleico
mTor	Blanco en mamífero de rapamicina
NAD	Glicerol fosfato deshidrogenasa
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
NeuroD1	Gen de diferenciación neural 1
NICD	Dominio intracelular de Notch
Nkx 2.2	Gen NK2 <i>homeobox 1</i>
NO [·]	Especies reactivas de nitrógeno
O ₂ ^{·-}	Superóxidos
OCDE	Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico
OMS	Organización Mundial de la Salud
Onecut-1	<i>One cut homeobox 1</i>
p15INK4b	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p15
p19INK4d	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p19
p21cip1	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p21
p27Kip1	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p27
Pax6	<i>Paired box 6</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Pdk1	Proteína cinasa dependiente de fosfoinositido
PE	Ficoeritrina
PerCP-Cy	Proteína Clorofila Peridinina
PI	Ioduro de propidio
PI3k	Fosfatidil inositol 3 fosfato
PPAR γ	Receptor Activado por Proliferadores Peroxisomales gamma
Prox1	Prospero homeobox 1
Ptf1a	Factor de transcripción asociado al páncreas 1a
RA	Ácido retinoico
RAR-RXR	Receptor de ácido retinoico-Receptor retinoide X
Rbpj	Proteína de Unión a la Señal Recombinante J de las Inmunoglobulinas
Rfx6	Factor regulatorio X6
Rheb	Homólogo de Ras enriquecido en el cerebro
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	Medio del Instituto <i>Roswell Park Memorial</i>
RT-PCR	Retro Transcripción- Reacción en Cadena de la Polimerasa
SCs	<i>Stem cells</i> (Células troncales)
SFB	Suero bovino fetal
SLC30A8	Transportador de zinc
Sox7	SRY- <i>box</i> 7
Sox9	SRY- <i>box</i> 9
SRY	Región Y determinante de sexo
TCF2	Factor de transcripción 2 (Conocido como HNF1B)
TGF	Factor de crecimiento tumoral
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral β
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TO	Naranja de tiazol
TXNIP	Proteína tioredoxina de interacción
Wnt3a	Miembro 3 de la familia de sitio de integración MMTV sin alas.
XIAP	Inhibidor ligado a X de la proteína de la apoptosis
μ M	Micromolar

1. ANTECEDENTES

1.1. Diabetes Mellitus (DM)

1.1.1. Definición

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica definida como un trastorno metabólico de etiología multifactorial causada por la deficiencia hereditaria y/o adquirida en la producción de insulina por el páncreas, o por la ineficacia de la misma. Tal deficiencia resulta en concentraciones crecientes de glucosa en la sangre, que a su vez dañan los sistemas del cuerpo, en particular los vasos sanguíneos, los nervios, alterando también el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Guzmán-flores & López-Briones, 2012; WHO, 2010).

El cuidado de esta enfermedad, actualmente incurable, se fundamenta en terapias paliativas que retrasen la degeneración y la pérdida de la integridad de sistemas como el vascular, cardíaco, renal entre otros y así reducir el riesgo de complicaciones a largo plazo. Actualmente el tratamiento para la DM más utilizado es a base de insulina exógena; sin embargo, la gravedad de la enfermedad avanza puesto que la liberación precisa de la insulina por parte de las células β naturalmente no se ha podido suplir y es por ello que se desencadenan severas complicaciones orgánicas. Actualmente se han propuesto alternativas para la obtención de células β a partir de células troncales como una estrategia para sustituir la escasez y funcionalidad de este linaje celular y así reducir el avance de esta enfermedad (Greggio, De Franceschi, & Grapin-Botton, 2015).

1.1.2. Clasificación y tipos de DM

La DM se ha clasificado principalmente en dos tipos:

Tipo 1; se presenta cuando el cuerpo no puede producir suficiente insulina, de manera que se produce una glucotoxicidad. Esta falta de insulina se debe al ataque del sistema inmune hacia las células β , probablemente debido la sobreexpresión del MHC-1 y a otras moléculas como Fas, su ligando, insulina, descarboxilasa de ácido glutámico (GAD), ICAM y un transportador de zinc específico de la célula β las cuales detecta como extraños. Se cree que el ataque autoinmune inicia dirigido

hacia una sola molécula de la célula β y se propaga hacia otras, mientras se destruyen células β adyacentes y se crea una serie de autoantígenos secundarios, en donde las células T (CD4+ y CD8+) y los macrófagos se infiltran en los islotes de Langerhans y secretan citocinas como IL-1, IL-6, IFN- γ y TNF- α . El daño inicia con una hiperplasia de las células pancreáticas, posteriormente se pierde la capacidad para secretar insulina, llevando a un estado de glucotoxicidad; esta destrucción inducida por citocinas puede estar mediada por los intermediarios de las especies reactivas de oxígeno como el O_2^- , $H_2O_2^-$ y HO^- , y por parte de las especies reactivas de nitrógeno se encuentra el NO^- , en conjunto, llevan a la célula a un estado oxidativo. Esta alteración provoca que la célula β cambie su fenotipo por alteraciones en la expresión de proteínas como la del transportador GLUT2, la enzima glicerol fosfato deshidrogenasa (NAD) y la piruvato descarboxilasa, que se encargan de mantener el grado de especialización de las células β . Estos procesos estimulan la activación de genes apoptóticos y proapoptóticos, de esta forma se autodestruyen las células β del individuo y es posible que se desarrolle DM tipo 1 (Olvera-Granados, Leo-Amador, & Hernández-Montiel, 2008).

Por otra parte la DM tipo 2 es el tipo más frecuente, el 90-95% de diabéticos es de este tipo, se caracteriza por la presencia de resistencia a la acción periférica de la insulina, secreción de insulina insuficiente o ambas, es de etiología multifactorial con ausencia de destrucción autoinmune de células β , se han encontrado algunos factores genéticamente involucrados con el desarrollo de esta enfermedad, como la obesidad y síndromes metabólicos de compuestos hidrocarbonados (Olvera-Granados et al., 2008).

Algunas de las complicaciones de este padecimiento crónico son; hipertensión arterial, arterosclerosis, miocardiopatías, amputación de extremidades, ceguera, falla renal, entre otras. Se estima que esta enfermedad reduce entre 5 y 10 años la esperanza de vida de la población, además representa un serio gasto en las instituciones de salud públicas ya que éstas invierten hasta 15% de sus recursos en atención a la diabetes, esto es, aproximadamente 318 millones de dólares al año (Comité de la 8va edición de Diabetes Atlas, 2017; INEGI, 2013).

1.1.3. Epidemiología

La DM es una enfermedad que encabeza la lista de trastornos metabólicos con una creciente mortalidad, morbilidad y afecciones secundarias que disminuyen la calidad de vida de las personas que la padecen. En el año 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en el mundo hay aproximadamente 108 millones de personas con diabetes; mientras la Federación Internacional de Diabetes (IDF) calculó para el año 2017, 451 millones de personas mayores de 18 años, y si continua con esta tendencia la misma IDF calcula que para el 2045 aumentarían a 693 millones de personas con esta enfermedad a nivel mundial. En México, representa la primera causa de muerte con un aumento lineal desde 1990, con 20,000 defunciones anuales, que para el 2016 serían aproximadamente 100,000 defunciones. Por lo que se ha convertido en un objetivo claro de instituciones de salud en México y alrededor del mundo (Comité de la 8va edición de Diabetes Atlas, 2017; Escobar Jiménez & Tébar Massó, 2009; Mathers & Loncar, 2006).

Recientemente, se implementó un estudio representativo de la Ciudad de México (2015) en el cual encontró que 13.9 % de la población adulta tiene diabetes. Nuestro país ocupa el 6° lugar a nivel mundial en número de personas con diabetes, el 1er lugar en mortalidad en América Latina y el 3° lugar en el mundo. Además presenta una tasa de mortalidad por cada 100,000 mil habitantes mayor al doble que en Brasil, al triple que en Chile y 14 veces más que Reino Unido (figura 1) (López Arredondo *et al.*, 2016).

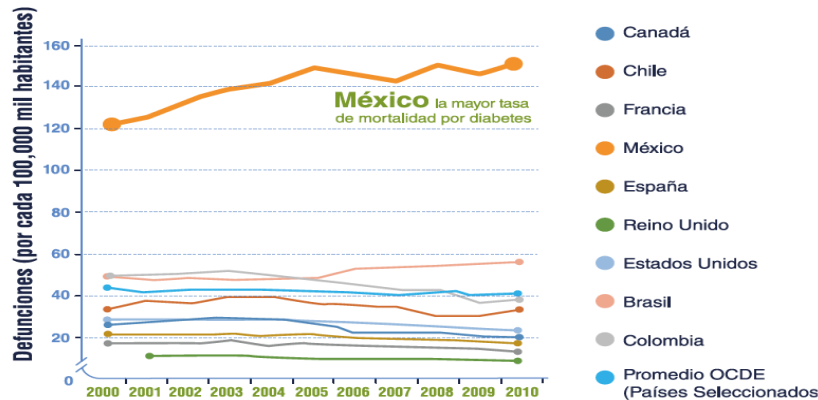


Figura 1. Crecimiento de mortalidad por DM por cada 100,000 habitantes. Tomado de (López Arredondo *et al.*, 2016). México (línea naranja) presenta de las mayores tasas de defunciones por cada 100,000 habitantes a nivel mundial.

ANTECEDENTES

La OMS prevé que esta enfermedad se convierta en la séptima causa mundial de muerte para el año 2030, está situada dentro de las principales causas de hospitalización y enfermedad que consume el mayor porcentaje del gasto de las instituciones públicas, siendo a nivel mundial de aproximadamente de 376 mil millones de dólares. Para el año 2030 este número ascenderá a los 490 mil millones de dólares. Por tal es considerada una enfermedad prioritaria en el Plan Nacional de Salud. La prevalencia de Diabetes además se asocia al sobrepeso y obesidad que en México son factores comunes (entre 69-74%) de su población por lo que aumenta el riesgo de padecer la enfermedad como lo muestra la figura 2 (INEGI, 2013; Secretaria de Salud México, 2013).



Figura 2. Prevalencia de DM en nuestro país. El sobrepeso y obesidad se relacionan con la DM. Tomado de <http://fmdiabetes.org/la-diabetes-mexico/> junio 2018.

De mantenerse constante la tasa de crecimiento de defunciones, en el año 2020 habrá aproximadamente 126,000 mil muertes por diabetes mellitus, cifra cinco veces mayor que la registrada en 1990 como lo muestra la figura 3 (López Arredondo et al., 2016).

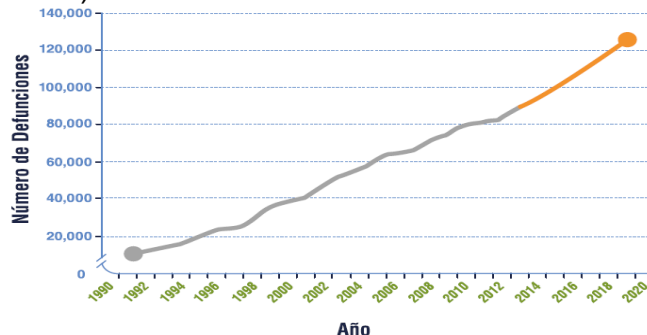


Figura 3. Prospectiva de defunciones por DM en México (1992-2020). Tomado de López Arredondo et al., 2016.

1.1.4. Resistencia a la insulina y disfunción de las células β .

La insulina es una de las hormonas esenciales para el mantenimiento de la homeostasis en el organismo; esta hormona activa la cascada de señalización para que la glucosa proporcione energía a los diversos órganos del cuerpo, permitiendo que el cuerpo almacene moléculas energéticas en forma de carbohidratos como para un uso posterior en la síntesis de diversas biomoléculas (Pagliuca et al., 2014).

Cuando se presenta una falta de insulina o una deficiencia de su reconocimiento por parte del organismo, se presentan elevados niveles de glucosa en plasma que fluye por todo el sistema circulatorio, ocasionando DM, que cuando se detecta de forma tardía y no se trata adecuadamente ocasiona complicaciones de salud graves como infarto del corazón, ceguera, falla renal, problemas vasculares que lleven a neuropatías e incluso amputación de las extremidades inferiores y muerte prematura debido a la glucotoxicidad por los niveles elevados de glucosa en sangre debido a la estimulación de la peroxidación lipídica y la generación de especies reactivas de oxígeno (Hernández Ávila et al., 2013; Sastre et al., 2005).

Las personas con diabetes pueden clasificarse en diferentes grupo pero principalmente se agrupan en tipo 1, las cuales requieren insulina (insulinodependientes), mediante inyección, bomba o inhalador; mientras otras se agrupan en tipo 2, quienes tienen un defecto en la síntesis o funcionalidad de la insulina y también pueden requerir insulina exógena para ayudar a reducir los niveles de azúcar en la sangre (Pagliuca et al., 2014).

Los daños a las células β incluyen inflamación inducida por citocinas, la resistencia a la insulina por sus receptores, así como el consumo excesivo de grasas saturadas y ácidos grasos libres (AGL). Estos factores provocan una disminución progresiva de la función de la célula, hasta llegar a su estado atrófico. La disfunción de las células β es un factor fundamental para el desarrollo de ambos tipos de diabetes (Cerf, 2013).

La arquitectura genética de las células β y el desarrollo de resistencia a la insulina difieren en cada individuo, dependiendo de sus parámetros bioquímicos, resistencia, etc. La obesidad es un factor crítico determinante de la resistencia a la

insulina, la adiposidad puede modular determinantes genéticos de la resistencia a la insulina y contribuir a la heterogeneidad de la diabetes tipo 2. En adición, las hormonas adipocinas y las citocinas proinflamatorias que son producidas por el tejido adiposo pueden influir en la señalización de la insulina a través de diversos mecanismos, estos procesos pueden interactuar con variantes genéticas que influyen sobre vías de resistencia a la insulina (Dupuis et al., 2010).

La obesidad unida a la resistencia a la insulina aumenta la demanda por células β que aumentan la carga y aceleran su disfunción. La patogenia de las células β , en cierta medida puede imitar la esteatosis hepática, es decir, pueden formarse depósitos de grasa que inducen la inflamación y desencadena muerte celular y disfunción intra-islole, en particular intra- β celular, por lo tanto, la grasa podría alterar la señalización de la insulina en los islotes. Esto probablemente representa un mecanismo para la disfunción de las células β y reducción de su compensación, de esta forma la señalización de la insulina es deficiente y, en consecuencia, la absorción de glucosa en los tejidos receptores desencadena la resistencia a esta hormona (Cerf, 2013) .

1.1.5. Terapias para la DM.

Las terapias actuales para la DM no son generalizadas, sino que para obtener mejores resultados es necesario analizar las necesidades particulares de cada paciente. Aunque disminuir la glucosa puede reducir sus complicaciones, se necesitan muchos años de tratamiento para darse cuenta de estos beneficios. De los medicamentos más utilizados ha sido la metformina, además de sulfonilureas entre otros. A pesar de que todos los agentes más recientes confieren un menor riesgo de hipoglucemia y la mayoría, con excepción de las tiazolidinedionas, ayudan a perder peso e incluso disminuyen la presión arterial, sin embargo, al día de hoy, el gasto es mayor y existe incertidumbre sobre sus efectos secundarios a largo plazo. Por otra parte, no hay certeza de que alguna de las terapias existentes revierta o detenga la insuficiencia de las células β del páncreas o que proporcione un control glucémico más duradero. En última instancia, cada persona presenta un conjunto singular de circunstancias que se prestan a diferentes métodos

terapéuticos, y con un número creciente de distintos fármacos disponibles se puede diseñar un plan centrado en el paciente (Inzucchi & Majumdar, 2016).

En la búsqueda del mejor tratamiento contra esta enfermedad se han desarrollado múltiples terapias que solo han logrado paliar la enfermedad, pero no se ha encontrado una terapia capaz de curarla, incluso se han realizado trasplantes de páncreas total, así como en conjunto con riñón, teniendo éxito en controlar la glucosa y la permanencia de los órganos trasplantados en adultos en un 91% por un año y del 75% por hasta 5 años según la fundación nacional del riñón de los Estados Unidos de América. Sin embargo, en las últimas décadas, con el avance en el conocimiento de la biología, genética y otras áreas biotecnológicas, se ha buscado desarrollar una terapia celular. En el caso de la investigación en la DM el objetivo es encontrar células funcionales productoras de insulina capaces de reemplazar aquellas que han sido dañadas (Dominici et al., 2006; Olvera-Granados et al., 2008).

1.1.6. Terapia Celular

Se ha definido por la ISCT como la administración de productos celulares con la intención de proporcionar células efectoras en el tratamiento de la enfermedad o en el apoyo de otra terapia (ISCT, 2018) .

Su objetivo es proporcionar sustitutos celulares que suplan la función de aquellas células, tejidos u órganos que se han dañado, con la finalidad de restaurar o restablecer una función normal. El uso de células troncales representa una opción prometedora para resolver defectos orgánicos, en enfermedades renales, enfermedad cerebrovascular, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Diabetes Mellitus entre otras, en este último caso, existe el interés de incorporar al organismo células que suplan la función de las células β pancreáticas que han sido dañadas (Mata-Miranda, Sánchez-Monroy, & Vázquez-Zapién, 2014).

Por otra parte, se sabe que el uso de la terapia celular tiene ventajas sobre los procesos de trasplantes de órganos en los pacientes, puesto que gracias a las características de las células troncales como la capacidad de no activar el sistema inmune disminuyendo el problema de rechazo. Además, la aplicación de células

troncales como terapia en escenarios alogénicos o incluso xenogénicos parece factible. En un modelo xenogénico de especies cruzadas se registró el injerto y la persistencia efectiva en tejidos múltiples, así como la diferenciación en diversos tipos de células o tejidos, como condrocitos, miocitos, etc. Esta aceptación fue probablemente debida a la deficiencia del antígeno leucocitario humano 2 o HLA 2 por sus siglas en inglés. Aunque al injertar CTM humanas en caballos sanos causó el aumento de linfocitos T CD8 y reguladores en bazo, probablemente indicando citotoxicidad del injerto pero no se observó respuesta inflamatoria ni daño en el tejido (Uder, Brückner, Winkler, Tautenhahn, & Christ, 2018)

Debido a esto no se cree que pueda provocar un rechazo por el sistema inmune del paciente que las recibe para terapia, sin embargo, una vez que las células troncales han pasado por un proceso de diferenciación y han formado células de una estirpe especializada, es recomendable que los trasplantes de estas sean de tipo autólogo (Antona et al., 2014).

1.1.7. Células Troncales

Las células troncales, del inglés *Stem cells* (SCs), tienen capacidad de auto-renovación, proliferación y capacidad para diferenciarse en distintos linajes. Las células troncales se han aislado mayormente de la médula ósea, tejido adiposo, pulpa dental, cordón umbilical y líquido amniótico (Antona et al., 2014).

Se pueden clasificar según su capacidad de diferenciación en: células troncales totipotenciales, que son capaces de producir tejidos embrionarios y extraembrionarios, generando células de cualquier tejido del cuerpo. Esta capacidad solo la presenta el cigoto o las células embrionarias primarias. Las células troncales pluripotenciales tienen la capacidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias; las células troncales multipotenciales son capaces de diferenciarse a distintas estirpes celulares procedentes de la misma capa germinal, sin embargo es un tema que sigue en discusión actualmente (Gimeno, Hyon, & Argibay, 2011).

Dentro de las células troncales se encuentran células troncales adultas (CTM) o en inglés "Mesenchymal stromal/stem cells (MSC) las cuales son candidatas

prometedoras para la terapia celular. Siguiendo las directrices de ISCT, las CTM de humano pueden identificarse mediante la expresión de un panel específico de marcadores de superficie celular (CD105, CD73, CD90, CD45, entre otros) con al menos un 95% de expresión y otro panel de marcadores hematopoyéticos indicando ausencia de contaminación de esa estirpe (CD34-, CD14-, CD11b-, CD79-, CD19-, HLA -DR-, entre otros) con un máximo 2% de expresión. Además, tener el potencial de diferenciación múltiple en al menos los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico. Las CTM de humano al igual que las de otros mamíferos pueden ser aisladas de diferentes tejidos cumpliendo estos criterios. El fenotipo celular, como la expresión de marcadores específicos y el potencial de multi-diferenciación, son similares, aunque no idénticos para las CTM de diferentes tejidos y especies. De forma similar, las CTM pueden presentar características biológicas diferentes según la fuente de tejido y los procedimientos de aislamiento y cultivo. Sus versátiles cualidades biológicas que comprenden capacidades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y proregenerativas dependen en gran medida de sus capacidades migratorias y secretorias (Uder et al., 2018)

1.1.7.1. Células troncales mesenquimales de cordón umbilical (CTMCU)

Las CTMCU son uno de los tipos de células troncales más estudiados y aplicados hasta la fecha. Estas células fueron descritas por primera vez por Friedenstein; se ha reportado que estas células pueden diferenciarse en múltiples tipos tales como osteoblastos, adipocitos y condrocitos (Pham et al., 2014).

En la actualidad existen bancos de CTMCU aisladas de sangre del cordón, placenta y líquido amniótico puesto que se encuentran en abundancia y los procedimientos para su obtención no son invasivos, son alogénicas, es decir que, el trasplante de éstas no induce problemas inmunológicos en los pacientes puesto que estas células no expresan antígeno leucocitario humano de clase 2 (HLA 2) ni tampoco coestimuladores de activación de células T (Zhao, Wang, & Mazzone, 2006).

Las CTMCU se han estudiado con el objetivo de obtener una fuente de terapia celular para diversas enfermedades; pre-clínicamente se han utilizado para el

tratamiento de lesión cerebral neonatal, procesos embólicos-fibrocartilagosos, mielopatías, lesión de la médula espinal, lesión renal diabética, la regeneración ósea, necrosis hepática aguda y cirrosis; además se han trasplantado para el tratamiento de ataxia espinocerebelar hereditaria y Diabetes Mellitus por distintas vías de administración como vía intravenosa, arteria pancreática duodenal, subcutánea, cavidad abdominal de encapsulados de alginato (DIABECCELL®) y etapas de madurez tales como células mesenquimales (Prochymal®) precursores pancreáticos, islotes e incluso células diferenciadas productoras de insulina (Lu et al., 2006).

1.2. Páncreas y células β

1.2.1. Páncreas

El páncreas es una glándula mixta, compuesta por dos tipos de tejido, endocrino y exocrino; entre estos tipos de tejidos se encuentra una región acinar que tiene la función de secretar jugos digestivos hacia el duodeno; por otra parte, la unidad anatómica funcional del páncreas endocrino son los islotes de Langerhans, cuya masa corresponde al 1% del peso total del órgano. En ellos se sintetiza la insulina por las células β que representan el 70% de la población celular, el glucagón por las células α que se encuentran en un 20% y la somatostatina por las células δ que representan un 5-10% (Sastre, Sabater, & Aparisi, 2005).

Está situado, según muestra la figura 4, en la región superior y posterior izquierda del abdomen. Se localiza por detrás del estómago y por delante de la columna vertebral, estando en contacto directo también con el intestino delgado y el hígado (el estómago se ilustra con la línea punteada y el duodeno se muestra como una vista en corte longitudinal) (Shih, Wang, & Sander, 2013).

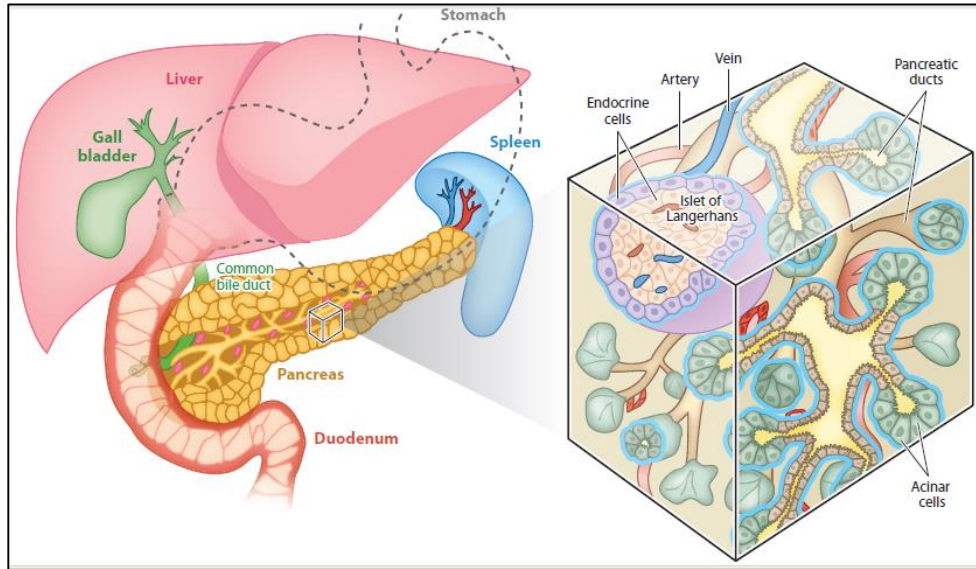


Figura 4. Ubicación del páncreas en la cavidad abdominal. Tomado de Shih, Wang, & Sander, 2013.

Los dos tipos de tejidos se agrupan formando lóbulos macroscópicamente visibles y separados entre sí por septos de tejido conjuntivo que contienen vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. Los islotes de Langerhans se encuentran alrededor de un millón distribuidos por toda la glándula y rodeados por una abundante red capilar (Sastre et al., 2005).

1.2.2. Organogénesis del páncreas: maduración de las células β (β).

El páncreas es un órgano que se deriva de los brotes endodérmico dorsal y ventral que surgen de la parte caudal del intestino anterior (Olvera-Granados et al., 2008).

La organogénesis del páncreas, al igual que cualquier órgano del cuerpo, en el desarrollo embrionario está regulada por una secuencia ordenada de señales extracelulares y de cambios en la expresión génica principalmente regulada por factores transcripcionales como PDX1, siendo uno de los factores más importantes en el desarrollo de la célula β y la producción de insulina, NGN3, NEUROD1, PAX4, NKX2.2 y NKX6.1 (Olvera-Granados et al., 2008).

La formación del brote pancreático dorsal es regulada por señales extrínsecas a partir de células endoteliales. Las yemas pancreáticas (dorsal y ventral) se desarrollan a partir de las regiones del endodermo del intestino anterior que se encuentran en contacto directo con el endotelio de la aorta dorsal y las venas,

respectivamente. Desde un punto de vista molecular, la expansión y diferenciación de los precursores endodérmicos hacia los distintos linajes pancreáticos son el resultado de una secuencia altamente regulada de señales extracelulares y de cambios en programas de expresión génica; dichos cambios son dirigidos por una cascada de factores de transcripción cuyas activaciones e inactivaciones coordinadas permiten la progresión del precursor pluripotente hacia la célula pancreática diferenciada. La identificación de estos factores y de las relaciones existentes entre ellos es indispensable para llegar a comprender los procesos que culminan en la formación de las células del islote (Barbera & Gasa, 2008).

El establecimiento y mantenimiento de la identidad del páncreas una vez que se especifican los dominios pre-pancreáticos ventral y dorsal, son otorgados por la activación de varios factores de transcripción que se expresan específicamente en las células potenciales que desarrollarán regiones pancreáticas. Entre los primeros factores de transcripción que marcan esta región son PDX1, PTF1a, SOX9, GATA4/6, FOXA1/2, tcf2, ONECUT-1/2, HES1, PROX1, y MNX1; se expresan también en el dominio pre-pancreático, pero su expresión se expande de manera más amplia en todo el intestino anterior y tejido endodérmico (Gittes, 2009; Pan & Wright, 2011; Seymour & Sander, 2011).

Son importantes las interacciones del mesénquima para el crecimiento pancreático temprano. Sin embargo, recientemente se han comenzado a entender cómo las señales mesenquimales pueden controlar el crecimiento del páncreas temprano. La vía mejor entendida que transmite las señales pro-proliferativas del mesénquima al epitelio es la señalización de la ruta FGF. Durante la transición primaria, FGF10 es altamente expresado en el mesénquima del páncreas, mientras que su receptor FGFR2 se expresa en todo el epitelio. FGF10 estimula la proliferación de células progenitoras y es necesario para el crecimiento inicial de las yemas del páncreas (Bhushan et al., 2001; Pictet, Clark, Williams, & Rutter, 1972; Seymour & Sander, 2011).

Poco después de la transición primaria, las yemas de páncreas incipientes aún, no han adquirido la morfología macroscópica y estructural característicos del órgano

maduro, ni han formado los tipos de células diferenciadas necesarias para sus funciones. En cambio, están compuestas casi en su totalidad de las células progenitoras multipotentes. La maduración de estas yemas es un proceso de varios pasos, durante este tiempo, el órgano en desarrollo continúa creciendo rápidamente. Al mismo tiempo, el epitelio pancreático sufre cambios estructurales dinámicos, lo que resulta en múltiples brotes salientes que forman los bordes. Estas estructuras, se caracterizan por la expresión de Ptf1a, c-Myc, y Cpa, que representan los dominios de la sección de la punta del páncreas; por el contrario, las células internas que representan el dominio del tronco se identifican por Nkx6.1/6.2, Sox9, TCF2, Onecut-1, Prox1, y Hes1 (Shih et al., 2013).

Cuando los genes endodérmicos como Pdx1 se expresan, la molécula de señalización extracelular Sonic hedgehog es reprimida. Mientras la expresión de Ptf1 (factor de transcripción pancreático 1) se requiere para la especificación del páncreas ventral, el factor de transcripción HLXB9, se requiere para la especificación del páncreas dorsal. Tanto células exocrinas y células endocrinas del páncreas se derivan de un puñado de células endodérmicas que expresan Pdx1 y Ptf1a así como Hes1, gen llamado protodiferenciador de progenitores pancreáticos (Desgraz & Herrera, 2009; Deutsch, Jung, Zheng, Lóra, & Zaret, 2001).

La importancia de Pdx-1 en el desarrollo pancreático ha sido confirmada en estudios de linaje celular que han demostrado que todas las células pancreáticas derivan de células positivas para Pdx-1. La expresión de Pdx-1 y Hb9 decae después del día 10.5 pero vuelve a reaparecer en las células β ya diferenciadas (Barbera & Gasa, 2008).

La expresión de estos factores de transcripción lleva a cambios morfológicos que marcan el inicio de una compleja secuencia de reordenamientos celulares resultando en la maduración de la estructura del órgano. La sección del tronco pancreático da lugar predominantemente a los linajes de células endocrinas y células ductales, mientras que las puntas están restringidas a un destino acinar (Deutsch et al., 2001; Villasenor, Chong, Henkemeyer, & Cleaver, 2010).

Los factores de transcripción NKX 6.1/6.2 y PDX1 actúan como reguladores maestros durante este proceso. Estos factores se co-expresan inicialmente en los progenitores pancreáticos, pero sus dominios de expresión se segregan totalmente durante la formación de la compartimentación de las secciones de la punta y el tronco; NKX 6.1/6.2 promueven la identidad del tronco y desvían células mesenquimales para la formación de la punta. Mecánicamente, este proceso es iniciado por represión transcripcional entre Nkx6.1/6.2 y Ptf1a o Pdx-1 (Schaffer, Freude, Nelson, & Sander, 2010; Shih et al., 2013).

Se sabe que los factores de transcripción del desarrollo pueden regular diferentes procesos dependiendo del contexto celular. Los estudios genéticos han proporcionado información sobre las vías de señalización que regulan la generación de las secciones de la cabeza y el tronco; la vía de señalización de Notch juega un papel esencial en la promoción de la identidad de las células que formarán el tronco pancreático. Mientras que las células de la punta están destinadas a convertirse en células acinares, el dominio del tronco es bipotencial y produce células ductales y células endocrinas (Afelik & Jensen, 2013; Kopinke et al., 2012; Kopp et al., 2011).

Después de que los dominios de punta y el tronco se han separado, alrededor de los 12.5 días, las células del tronco son sometidas a cambios morfogénicos para formar una red 3D de los túbulos revestidos por una sola capa de células polarizadas (Villasenor et al., 2010).

Las células epiteliales forman una red de túbulos a los cuales se refieren como los conductos primitivos o cordones progenitores y es el epitelio que da la altura de las células endocrinas pancreáticas (Kopp et al., 2011).

Las células β del páncreas se encuentran en los islotes de Langerhans dispuestas en agregados celulares endócrinos, su principal función es la secreción de la hormona insulina. Para comprender la formación de las células β , es necesario recapitular el desarrollo del páncreas, comenzando con la formación del primordio pancreático, el cual surge principalmente del endodermo definitivo mediante las señales de nodal, a través de moléculas de la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), y de la señal de MMTV el cual corresponde a la familia del

sitio de integración 3a (Wnt3a) a través de la formación de un mesodermo intermedio. Posteriormente se lleva a cabo la formación de endodermo definitivo (ED) esta etapa se representa por la expresión combinada de los factores CXCR4, FOXA2, SRY y la ausencia de SOX7 (Ang et al., 1993; Kanai-Azuma et al., 2002; McGrath, Koniski, Maltby, McGann, & Palis, 1999; Van der Meulen & Huisin, 2014).

Por otra parte, los niveles intermedios de la señalización del factor de crecimiento de fibroblástico 4 (FGF4) induce la especificación del páncreas de la parte posterior del intestino anterior, definido por la expresión de homeobox 1 pancreático y duodenal (PDX1), que es el primer marcador del progenitor pancreático. El desarrollo subsiguiente del páncreas se caracteriza a menudo por desarrollarse en tres transiciones en las cuales el páncreas experimenta cambios rápidos en su morfología y la especialización de las células β entre otras familias celulares productoras de hormonas (Dessimoz, Opoka, Kordich, Grapin-Botton, & Wells, 2006; Guz et al., 1995; Jonsson, Carlsson, Edlund, & Edlund, 1994; Pictet et al., 1972; Rutter et al., 1968).

1.2.3. Transición Primaria.

En el primordio pancreático se comienza a expresar la proteína PTF1A, la cual es específica del páncreas. En esta etapa se definen los tipos de células exocrinas, endocrinas y ductales mediante la unión y activación de promotor PDX1. Poco después de la especificación de los brotes pancreáticos, la diferenciación en el endodermo pancreático (EP) y las subsiguientes células endocrinas se inicia por la expresión de NKX2.2 y NKX6.1. Una función temprana de NKX6.1 es especificar la identidad endocrina mediante la represión de la formación de células acinares especificando la actividad de PTF1A (Van der Meulen & Huisin, 2014).

En este momento de desarrollo del EP, se expresa el gen neurogenina 3 (NGN3), su expresión define el nicho endocrino dentro del EP. Los objetivos de NGN3 son esenciales para la correcta formación de células endocrinas, como la promoción de la expresión de factores como la proteína Islet 1, el cual se expresa en todos los linajes celulares que componen los islotes de Langerhans, así como la expresión de Pax4 que se expresa en células β y delta, factor de diferenciación neuronal 1

(NEUROD1) el cual sólo se expresa en células β , así como PAX6; y ARX en células alfa (Van der Meulen & Huisling, 2014).

En ratones, las células positivas a insulina tempranas a menudo co-expresan glucagón. Además, pueden encontrarse en el desarrollo del páncreas humano, donde más de una cuarta parte la población de células insulina-glucagón positiva expresan ambas hormonas temprano en el desarrollo. Estas células doblemente positivas comparten algunas de las vías de desarrollo tanto para la estirpe alfa como para la β . Estas células están ausentes en ratones deficientes de NKX2.2, NGN3 y MAFB. Carecen de la expresión de PDX1 y NKX6.1, que son clásicos marcadores de células β , y de hecho persisten en ratones PDX1 y NKX6.1 deficientes (Van der Meulen & Huisling, 2014).

Se ha propuesto que las células de doble hormona positivas no contribuyen a las células de los islotes maduros. Sin embargo, mientras que las células insulina y glucagón doble positivo desaparecen después, existe la posibilidad de que contribuyan al conjunto de células alfa en un adulto después de perder la expresión de insulina (Van der Meulen & Huisling, 2014).

1.2.4. Transición secundaria.

Los primordios dorsal y ventral del páncreas se fusionan para convertirse en un solo órgano. Durante la transición secundaria, el páncreas experimenta un rápido crecimiento y ramificación. Se produce una segunda población de células NGN3-positivas, que se diferencia en una segunda onda de células endocrinas. Las células NGN3-positivas que aparecen hacia el final de la primera población, y durante la segunda población adquieren cada vez más la competencia para generar células β y células PP (células productoras del polipéptido pancreático), además de las células alfa. Las células NGN3 positivas también pueden diferenciarse en la producción de somatostatina delta-células que se desarrollan aún más tarde. La contribución de las células NGN3-positivas hacia el linaje de células alfa se reduce considerablemente en las células que aparecen después (Johansson et al., 2007; Rukstalis & Habener, 2009).

Durante la transición secundaria, un subconjunto de células en los cordones progenitores inician la expresión del gen *Ngn3*, que marca el inicio de la diferenciación de células endocrinas. Mientras que las células destinadas a un cause epitelial no expresan *Ngn3* y finalmente contribuyen a la formación del árbol ductal. Por lo tanto, se requiere de un control preciso de la expresión del gen *Ngn3* ya que este es el factor clave para el equilibrio de la diferenciación endocrina frente a la decisión del destino celular ductal (Beucher, Gjernes, Collin, Courtney, & Meunier, 2012; Gradwohl, Dierich, LeMeur, & Guillemot, 2000; Schwitzgebel et al., 2000).

A diferencia del desarrollo de las células ductales, la diferenciación endocrina se ha estudiado intensamente, impulsado por la esperanza de que tal conocimiento pueda ayudar a implementar una terapia celular al obtener células β de reemplazo como terapia para la diabetes.

La activación de la expresión de *Ngn3* es esencial para iniciar la diferenciación de células endocrinas. En diversos estudios se han dilucidado muchos factores de transcripción que controlan el desarrollo ductal, como *SOX9*, *TCF2*, *GLIS3*, y *ONECUT-1*, también son necesarios para la inducción de la expresión de *Ngn3*, lo que indica que las funciones de estos factores están presentes en el desarrollo de ambos linajes. Sin embargo, solamente se expresa *Ngn3* en un subconjunto de las células dentro de los conductos primitivos, lo que plantea la cuestión de que su expresión se encuentra reprimida en la mayoría de las células ductales embrionarias. La evidencia bioquímica y genética sugiere que el factor de transcripción *HES1* juega un papel importante en la represión de la transcripción de *Ngn3* y actúa evitando la activación generalizada de dicho factor de transcripción (Ahnfelt-rønne et al., 2012; Apelqvist et al., 1999; W. Jiang et al., 2011; Seymour et al., 2008).

Debido a que los conductos simultáneamente expresan reguladores positivos y negativos de *Ngn3*, sus niveles relativos pueden determinar si un progenitor será activo para *Ngn3* y adoptará la identidad endocrina. La vía de Notch desempeña un papel importante en esta decisión; la activación de la señalización de Notch previene

la activación de Ngn3 y promueve la diferenciación de células ductales (Murtaugh, Stanger, Kwan, & Melton, 2003).

En los progenitores endócrinos la señalización de Notch esta reprimida; al reducir la actividad de Notch, se promueve la expresión de Sox9, lo que permite la activación de Ngn3. De este modo, se lleva a cabo la activación selectiva de Ngn3. Los cordones progenitores adquieren diferentes niveles de actividad de Notch, este proceso sigue estudiándose (Desgraz & Herrera, 2009).

Las células que expresan NGN3, son encaminadas a formar precursores endócrinos, es decir, formarán cinco grupos de células diferentes, células β , alfa, delta, células productoras de péptido C y células productoras de grelina (Desgraz & Herrera, 2009).

Se han realizado estudios de diferenciación *in vitro* donde se ha observado que los precursores endócrinos NGN3+ pueden diferenciarse en células productoras de hormonas, es decir, precursores endócrinos y estos son sometidos a cambios dinámicos en la expresión génica, lo que resulta en la activación de la transcripción de Ngn3 dependiente de factores como: PAX4, ARX, RFX6, NEUROD1, PAX6, ISL1, y IA2 entre otros; estos genes controlan muchos aspectos del desarrollo endocrino, incluyendo la diferenciación celular, el mantenimiento de células especializadas, y controlan la identidad celular para formar islotes pancreáticos posteriormente; NeuroD1/B2 es una diana directa de Ngn3 y comparte con su activador la capacidad de promover el destino endocrino en ambientes permisivos (Barbera & Gasa, 2008; Mastracci & Sussel, 2012).

Las células β , generadas a partir de la segunda población de células positivas a NGN3, pueblan el páncreas maduro, y en común con las células alfa expresan NKX2.2, ISLET1, PAX6 y MAFB. La expresión de los genes homeobox Hb9 (Hlx9), Pdx1 y Nkx6.1 se mantienen en las células β de esta etapa, mientras que de Pax4, NeuroD1 e Islet1 se expresan en células β corriente abajo de NGN3+. De hecho, PAX4 y el factor de transcripción de células alfa ARX reprimen mutuamente su expresión, lo que sugiere que ayudan a mantener estable la identidad de las células β vs alfa. En esta etapa, NKX6.1 desempeña un papel clave, ya que es necesario y

suficiente para especificar la insulina que producen las células β mediante la represión de las células alternativas destino endocrino después de la aparición de la expresión NGN3. La expresión del MafB en células β precede a un aumento en la expresión de Pdx1, que a su vez precede a la expresión de insulina. Tras el inicio de la expresión de la insulina, las células β inician la expresión de MafA. Tanto MAFA como MAFB inducen la transcripción de insulina. En los ratones con deficiencia de MAFB, la expresión de insulina se reduce en gran medida y se retrasa hasta el inicio de la expresión de MAFA (Van der Meulen & Huising, 2014)

1.2.5. Transición terciaria.

En esta etapa las células endocrinas se caracterizan por expresar las diferentes hormonas pancreáticas. Durante la transición terciaria, se lleva a cabo la organización típica de los islotes, con las células endocrinas individuales formando grupos dentro de la masa celular exocrina.

Las células β se encuentran rodeadas por un manto de células alfa que contienen glucagón en combinación con células delta que contienen somatostatina y las células PP. En los seres humanos, los diferentes tipos de células están más entremezclados a través del islote. La transición terciaria implica la maduración de las células pancreáticas para lograr la síntesis regulada y secreción de proteínas específicas pancreáticas en respuesta a la alimentación (Van der Meulen & Huising, 2014).

Las células epiteliales forman una red de túbulos a los cuales se refieren como los conductos primitivos o cordones progenitores y es el epitelio que da la altura de las células endocrinas pancreáticas (Kopp et al., 2011).

Se sabe que en el desarrollo de cada tipo celular existe una competencia de precursores endocrinos para producir estos diferentes tipos de células y ésta competencia se controla temporalmente (figura 5) (Johansson et al., 2007).

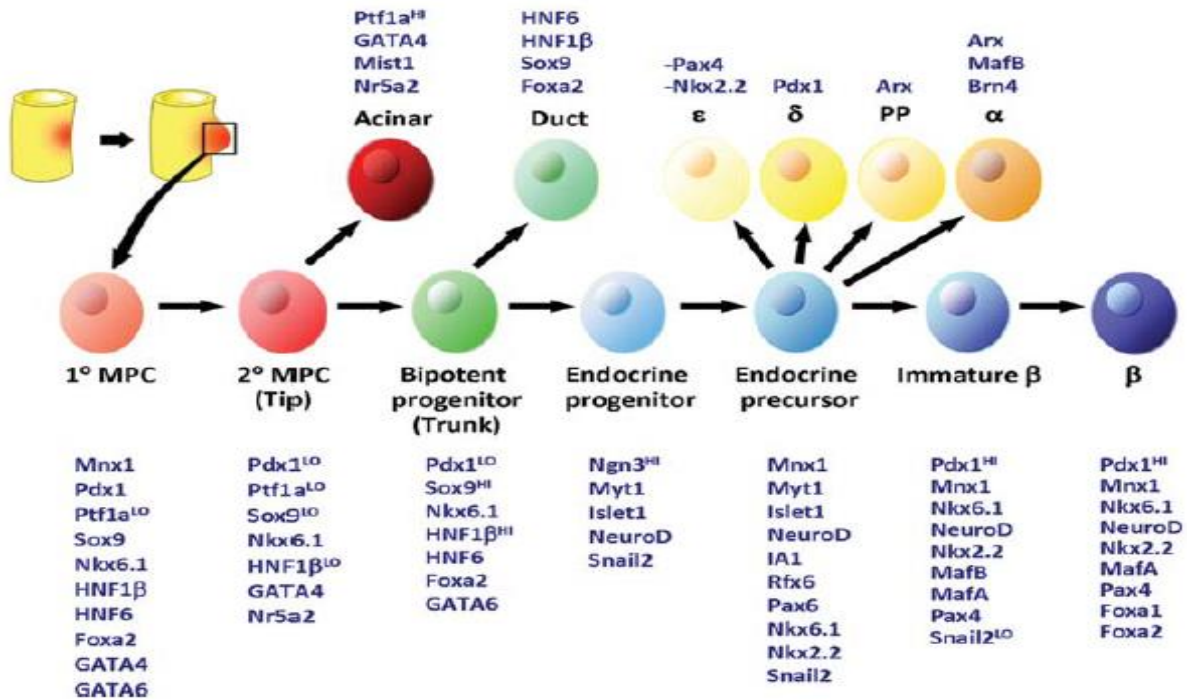


Figura 5. Factores transcripcionales importantes en el desarrollo de la célula β pancreática y otras estirpes pancreáticas (Tomado de Pan & Wright 2011). Español

También los factores NKX2.2 y NKX6.1 juegan un papel relevante en la determinación del linaje β. Animales genoanulados para Nkx2.2 no tienen células positivas para insulina, sin embargo, tienen células endocrinas con otros marcadores de células β y expresan la hormona grelina. La ausencia de Nkx6.1, por su parte, es la causa de que no se produzca neogénesis de células β durante la transición secundaria (Barbera & Gasa, 2008).

Se sabe que al igual que con los mecanismos que regulan la formación de la cabeza y cuerpo del páncreas, la distinción entre la identidad de las células α y β, puede depender de la represión mutua entre determinantes génicos del linaje celular (Pan & Wright, 2011).

El conjunto de datos disponibles hasta el momento sugiere que la decisión sobre el subtipo endocrino se toma en etapas iniciales del proceso de diferenciación y antes de la expresión de hormonas. El modelo vigente establece que la acción concertada de distintos factores de transcripción, que funcionan en paralelo con Ngn3 o por

debajo de la misma, es la responsable de determinación de linaje endocrino específico. Así, Pax4 y Arx son necesarios para la especificación de los linajes β y alfa, respectivamente. La ausencia simultánea de los dos factores resulta en la pérdida total de células β y alfa y en el aumento de células delta (Barbera & Gasa, 2008).

El desarrollo de los linajes endocrinos especializados está dado de manera altamente regulada por la expresión de factores de transcripción que otorgan la capacidad supervivencia o estimulación de la proliferación celular durante su desarrollo, esta clase de factores de transcripción también les permiten a las células ser capaces de producir una sola hormona específica a cada tipo celular, los primeros en la cascada son: NEUROD1, ISL1 INMS-1, y RFX-6; estos son blancos directos de NGN3; por otra parte los genes de la familia Nkx (6.1 y 6.2) tienen un papel importante ya que se ha estudiado que en ratones genoanulados para este factor de transcripción, se reduce la cantidad de células NGN3+, por lo cual se cree que Nkx actúa corriente arriba de Ngn3, estos estudios también proponen que los factores de transcripción NKX también promueven la especificación de cada tipo celular, se ha postulado que Nkx6.1 afecta el número de células progenitoras endócrinas (Pan & Wright, 2011).

Los factores de transcripción que se activan después son denominados, factores de asignación de linaje endócrino específico, como son NKX2.2, PAX4, ARX, y PDX1.

La expresión de Pdx1 además de su papel en la derivación inicial de las células primitivas formadoras de tejido pancreático, es también requerido para la especialización de las células β , la eliminación de este gen conduce a una disminución de la población de células β , y ayuda a promover el desarrollo en proporciones adecuadas de los distintos subtipos endócrinos (Pan & Wright, 2011).

Por último, son necesarios los denominados factores de maduración, estos controlan aspectos posteriores a la especificación fisiológica, estos genes incluyen Ins, Pdx1, Glut2, Nkx6.1, SLC30A8 y G6pc2 (glucosa-6-fosfatasa subunidad catalítica de proteínas 2) (Shih et al., 2013).

ANTECEDENTES

A continuación (tabla 1) se presentan algunas características de los genes buscados en este estudio incluyendo el gen endógeno utilizado.

Tabla 1. Principales funciones de los factores de transcripción indispensables para la formación de células β .

NOMBRE	FUNCIÓN
Gapdh (endógeno)	Gen que codifica un miembro de la familia de la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. La proteína codificada es capaz de realizar distintas funciones. Cataliza un importante paso de generación de energía en el metabolismo de carbohidratos, la fosforilación oxidativa reversible de gliceraldehído-3-fosfato en presencia de fosfato inorgánico y nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). Además, tiene actividad de ADN glucosilasa de uracilo en el núcleo. Muchos pseudogenes similares a este locus están presentes en el genoma humano. El corte y empalme alternativo da como resultado múltiples variantes de transcripción.
Notch1	Este gen codifica a un miembro de la familia de proteínas NOTCH. Los miembros de esta familia de proteínas transmembrana de Tipo I comparten características estructurales que incluyen un dominio extracelular que consiste en múltiples repeticiones similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y un dominio intracelular que consiste en múltiples tipos de dominio diferentes. La señalización Notch es una vía de señalización intercelular conservada evolutivamente que regula las interacciones entre las células físicamente adyacentes a través de la unión de los receptores de la familia Notch a sus ligandos afines.
Pax4	Este gen es un miembro de la familia de factores de transcripción homeóticos (Pax). Los miembros de esta familia de genes típicamente contienen un dominio de caja homeótica, un octapéptido y un homeodominio de tipo homeótico. Estos genes desempeñan papeles críticos durante el desarrollo fetal y el crecimiento del cáncer. El gen de la caja homeótica 4 está involucrado en el desarrollo de islotes pancreáticos y los estudios con ratones han demostrado un papel para este gen en la diferenciación de las células β productoras de insulina.
Nkx 6.1	En el páncreas, se requiere NKX6.1 para el desarrollo de células β y es un potente regulador de la transcripción bifuncional que se une a secuencias ricas en AT dentro de la región promotora de los genes diana.
Pdx-1	La proteína codificada por este gen es un activador de la transcripción de varios genes, incluyendo la insulina, la somatostatina, la glucoquinasa, polipéptido amiloide de los islotes, y transportador de glucosa tipo 2. La proteína codificada en el núcleo está implicada en el desarrollo temprano del páncreas y juega un papel importante en regulación de la glucosa dependiente de la expresión de gen de la insulina. Los defectos en este gen son una causa de agenesia de páncreas, que puede conducir a la aparición temprana de diabetes insulino dependiente (DMNID).
Ngn3	La proteína codificada por este gen es un factor de transcripción hélice-bucle-hélice básico (bHLH) que participan en la neurogénesis. La proteína codificada probablemente actúa como un heterodímero con otra proteína bHLH. Los defectos en este gen son una de las causas de la malabsorción congénita 4. En el desarrollo pancreático sus niveles relativos pueden determinar si una célula progenitora adoptará la identidad endocrina.
Glut2; SLC2A2	Este gen codifica una glicoproteína de membrana integral plasmática del hígado, las células β de los islotes, el intestino, y el epitelio renal. La proteína codificada facilitó el transporte de glucosa bidireccional. Debido a su baja afinidad por la glucosa, se ha sugerido como un sensor de glucosa. Las mutaciones en este gen están asociadas con la susceptibilidad a enfermedades, incluyendo el síndrome de Fanconi-Bickel y diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM).
MafA	Factor de transcripción que se une a RIPE3b, activador conservado que regula la expresión de la transcripción del gen de insulina. Es específico de células B.

ANTECEDENTES

Ins	Después de la eliminación del precursor del péptido señal, la proinsulina se escinde después de la traducción en tres péptidos: la cadena B y A de la cadena de péptidos, que están vinculados covalentemente a través de dos enlaces disulfuro para formar la insulina y péptido C. La unión de la insulina al receptor de insulina (INSR) estimula la captación de glucosa. Una multitud de alelos mutantes con efectos fenotípicos han sido identificados. Hay un gen lectura a través, INS-IGF2, que se solapa con este gen en la región 5 'y con el gen IGF2 en la región 3'. Resultado de <i>splicing</i> alternativo en múltiples variantes de la transcripción.
------------	---

Consultado Junio 2018 de base de datos NCBI (Geer et al., 2010)

1.2.6. Células β

La célula β es el regulador por excelencia de la glucosa en sangre en todo el cuerpo a través de la secreción de insulina. La glucosa se transporta a la célula a través de transportadores de glucosa como Glut1 (Slc2a1) o Glut2 (Slc2a2), donde se fosforila por la glucocinasa (GCK) y se convierte en ATP por reacciones metabólicas posteriores. El aumento de los niveles de ATP (por ejemplo, el aumento de las relaciones ATP:ADP) desencadena el cierre de los canales de potasio (subunidades Sur1 y Kir6.2), la despolarización de la membrana y la apertura de los canales de calcio (azul figura 6). El aumento resultante en los niveles de calcio intracelular desencadena la exocitosis de los gránulos que contienen insulina y, por lo tanto, conduce a un aumento de los niveles de insulina en los vasos sanguíneos adyacentes. A continuación, en la figura 6, se muestra un esquema del sistema regulador de la glucosa de la célula β incluyendo genes que codifican los factores de transcripción (representados en el núcleo) y sus componentes principales (Pagliuca et al., 2013).

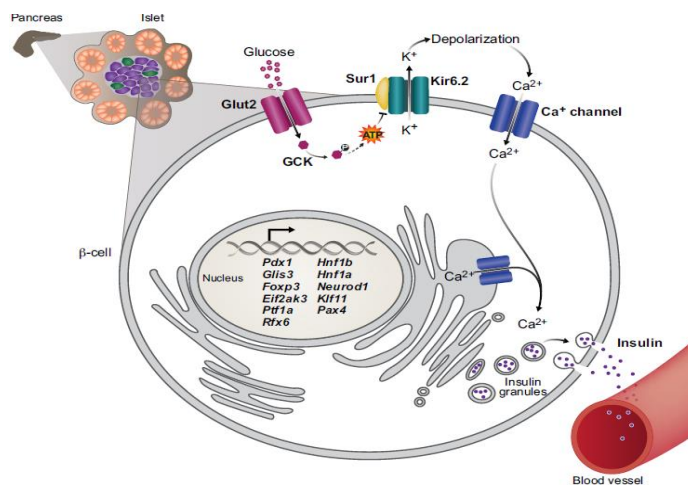


Figura 6. Esquema de la regulación de glucosa de una célula β . Tomado de Pagliuca et al., 2013

1.2.6.1. Síntesis de insulina

La insulina es la hormona liberada por las células β pancreáticas en respuesta a niveles elevados de glucosa en la sangre, de esta forma controla funciones energéticas críticas como el metabolismo de la glucosa y de lípidos. Cuando la insulina se une a su receptor de membrana (RI), éste desencadena múltiples vías de señalización que median sus acciones biológica como PI3k/Akt y MAP quinasas (Reyes Olivares & Arellano Plancarte, 2008).

El proceso de síntesis ocurre en los ribosomas en forma de pre-pro-insulina; al igual que en el caso de otras hormonas peptídicas, la molécula final activa es almacenada, tras sucesivos cambios en su recorrido a través del retículo endoplasmático, en los gránulos del aparato de Golgi (Hernandez Ávila, Gutierrez, & Reynoso Noverón, 2013).

Cuando se presentan defectos en la síntesis de la insulina, en la secreción o en la disminución del número de sus receptores, así como en su afinidad por esta hormona, se presentan elevados niveles de glucosa en plasma que fluye por todo el sistema circulatorio, ocasionando Diabetes mellitus (Mendoza et al., 2005).

1.3. Vías de señalización que participan en la diferenciación y funcionamiento de las células β

1.3.1. Vía de Notch

Una de las principales vías de señalización para la diferenciación de células embrionarias a células β es la vía de Notch (canónica) mediada por la inhibición lateral de un importante mecanismo conservado que regula la diferenciación, la proliferación y la supervivencia en las células troncales. Esta vía es necesaria para la comunicación célula-célula y la determinación del destino celular durante el desarrollo embrionario y la homeostasis de los tejidos (X. Y. Li, Zhai, & Teng, 2015).

Esta comienza por la interacción ligando-receptor entre las células adyacentes, que activa el gen Hes por un complejo que consiste en el dominio intracelular de Notch

(NICD) y la familia Rbp-Jk de proteínas nucleares (Rbp-J activador) (X. Y. Li et al., 2015).

La primera evidencia de la participación de la vía de señalización Notch en el desarrollo pancreático se centró en su función de inhibición lateral en el control de la decisión del destino pancreático. La activación de la señalización Notch en los progenitores pancreáticos impide su diferenciación en el linaje endocrino o células exocrinas. Por el contrario, el bloqueo de la vía de señalización Notch causa diferenciación prematura de las células progenitoras multipotentes (MPCs) en las células endocrinas. Una serie de estudios han puesto de manifiesto que la señalización de Notch funciona como un regulador negativo del factor pro-endocrino neurogenina3 (NGN3), y la formación de insulina que producen las células β es significativamente mejorada por la inducción de factores pro-endocrinos o la inhibición del procesamiento de Notch. Pero algunos investigadores han propuesto que la vía de Notch especifica la diferenciación de los progenitores pancreáticos hacia el linaje endocrino o de otra forma, que la inactivación de la vía Notch promueve la diferenciación celular acinar. Algunos estudios revelaron que Notch no funciona en un modo “on-off”, sino de una manera dependiente de la concentración regulando la quiescencia, la auto-renovación y la diferenciación de las células progenitoras pancreáticas durante el desarrollo del páncreas, así como en el control de la plasticidad de la diferenciación terminal de las células adultas pancreáticas (X. Y. Li et al., 2015).

Se ha demostrado que las interacciones cruzadas represivas entre NKX6 (NKX6.1/NKX6.2) y PTF1a comprometen el destino de las células progenitoras pancreáticas. NKX6 induce la determinación de células endocrinas, sin embargo, PTF1a promueve la especificación celular acinar. El interruptor cruzado antagonista entre NKX6 y PTF1a es controlado por señalización Notch (Schaffer et al., 2010).

Notch1 es el primer receptor expresado en un subconjunto de células epiteliales pancreáticas. Sigue la expresión de Notch2 restringida a las células ductales en los siguientes días. Notch3 y Notch4 se expresan en la mesénquima pancreático temprano y luego en las células endoteliales del páncreas. Dll1 (ligando de la vía

Notch) se expresa transitoriamente en el epitelio del conducto pancreático, y el ligando Jag1 durante el desarrollo medio de la gestación pancreática (X. Y. Li et al., 2015).

Durante la transición secundaria, Notch regula la diferenciación endocrina a través de un mecanismo de inhibición lateral. El modelo de inhibición lateral propone que el inicio de la expresión de Ngn3 inicia la diferenciación endocrina y activa el ligando Notch Delta. Posteriormente, Delta se une con receptores Notch en células vecinas para iniciar la cascada de señalización Notch y liberar el NICD (Dominio Intracelular de la Proteína de Notch). El NICD activado entra en el núcleo para activar el gen diana Hes1, que inhibe la expresión de Ngn3. En última instancia, la vía Notch activada evita que las células adyacentes adopten un destino endocrino (X. Y. Li et al., 2015).

La inactivación de receptores y consecuente inactivación de la señalización Notch acelera la diferenciación prematura del páncreas endocrino. La pérdida de RBP-J disminuye las células NGN3+. HES1 disminuye los progenitores pancreáticos evitando diferenciarse en células pancreáticas endocrinas (X. Y. Li et al., 2015).

DLL1 es necesario para la formación continua de precursores endocrinos Ngn3+ por lo que se infiere que Notch altamente regulado induce la expresión del gen Ngn3, el cual es activado por SOX9, que puede proporcionar más pruebas de que Notch inicia el linaje endocrino (Seymour et al., 2012).

La γ -secretasa y NOTCH2 actúan en un mecanismo no canónico para separar RBP-J de PTF1a, lo que asegura a las células progenitoras NGN3+ al destino endocrino. La señalización de Notch es necesaria para establecer la identidad endocrina a través de la activación de NKX6.1, que está unido a RBP-J. Un estudio propuso un modelo en el que la expresión alta de Notch activa Hes1 y la expresión de Sox9, lo que resulta en la generación de células del conducto pancreático, mientras que la baja expresión de Notch activa Sox9, pero no Hes1, resultando en la activación de Ngn3 y diferenciación endocrina (Afelik & Jensen, 2013; Seymour et al., 2012).

Se sabe que la hiperactivación de la señalización Notch podría convertir las MPC proliferativas a un estado quiescente, la hipoactivación de la vía Notch induce a los

MPC quiescentes al estado proliferativo, y la fuerte regulación de la señalización Notch promueve la diferenciación de los MPCs hacia las células endocrinas. Sin embargo, hay lagunas en la comprensión de la oportunidad y el alcance de las interacciones Notch ligando-receptor y cómo esto afecta el comportamiento de los MPC. Por lo tanto, puede haber aún más complejidad en la regulación mediada por Notch del desarrollo pancreático (Ninov, Borius, & Stainier, 2012).

1.3.1.1. Mantenimiento de los progenitores pancreáticos

La activación de Notch en la "transición primaria" mantiene el estado pancreático, permitiendo la coordinación del crecimiento epitelial y ayudando a los brotes pancreáticos a alcanzar el tamaño idóneo.

Ptf1a puede autorregularse para retener y expandir las células progenitoras durante el desarrollo pancreático temprano. La expresión de Pdx1 y Ptf1a también se regula por el factor de crecimiento de fibroblastos 10 (FGF10) y Notch. La señalización de FGF10 promueve la expansión de las células epiteliales pancreáticas a través de la activación de Sox9 y Hes1. Hes1 regula la elección binaria de progenitores pancreáticos, el ciclo celular o el mantenimiento de auto-renovación, mediante la supresión de p57 y p27, que son inhibidores de la cinasa dependientes de ciclina. En los progenitores pancreáticos, la inactivación de Hes1 podría aumentar la expresión del gen p57, lo que conduce a la detención del ciclo celular, la diferenciación temprana y el agotamiento de la reserva de progenitores. Además, Sox9 promueve la expansión de los progenitores pancreáticos modulando el receptor FGF (FGFR), Notch y la señal de transducción de Wnt. Las células Sox9 tienen controles de la expresión de FGFR en los progenitores pancreáticos. En clústeres epiteliales aislados de islotes humanos, la supresión de Sox9 da lugar a una disminución de pGSK3, β -catenina nuclear y el gen objetivo de la señalización Wnt, ciclina D1. La señalización Notch también regula la expresión de Sox9 en el páncreas. Notch positivamente regula la expresión de Sox9 de una manera independiente de Hes1 en las células del conducto pancreático (X. Y. Li et al., 2015; Thompson, Gésina, Scheinert, Bucher, & Grapin-Botton, 2012).

Debido a que los componentes de la vía de señalización Notch no se expresan normalmente en células pancreáticas diferenciadas terminalmente, la mayoría de las células maduras pierden su capacidad de respuesta a la señalización Notch. Los factores progenitor-intrínsecos de transcripción Pdx1, Ptf1a y Sox9, así como la señalización Notch, Wnt y FGF10, componen una red compleja para el mantenimiento de MPCs (X. Y. Li et al., 2015).

1.3.2. Vía de Fosfatidil inositol 3 cinasa/proteína cinasa B (PI3K/Akt)

El mantenimiento de la masa de células β resulta predominantemente de la proliferación de células β preexistentes y depende de la activación del complejo ciclina D / cdk4. Akt activa la proliferación de células β de una manera dependiente de cdk4 mediante la inducción de ciclina D1, D2 y p21Cip1. La regulación del ciclo celular mediante la señalización de Akt no se comprende completamente, pero los hallazgos recientes implican la señalización de FoxO1, glucógeno sintasa quinasa 3β (Gsk3 β) y TSC2 / mTOR en este proceso (Elghazi & Bernal-Mizrachi, 2009).

FoxO pertenece a una gran familia de factores de transcripción forkhead con un dominio de forkhead de unión a ADN. Akt inactiva FoxO1 por fosforilación y exclusión nuclear. La restauración de la masa de células β y la corrección de la diabetes en Irs2- y Pdk1- en un fondo heterocigoto de FoxO1, implica a este factor de transcripción en la regulación de la masa de células β . Además, la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de FoxO1 en las células β impide la hiperplasia compensadora de células β en modelos resistentes a la insulina. Estudios adicionales con derivadas de insulinomas de ratón muestran que el péptido similar al glucagón (GLP-1) y la glucosa inducen la inactivación de la transcripción mediada por FoxO1 por exclusión nuclear en un receptor PI3K y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La sobreexpresión de FoxO1 constitutivamente nuclear en células de insulinoma y ratones transgénicos demostró que FoxO1 media efectos proliferativos y pro-supervivencia del agonista de GLP-1, exendin-4 (Elghazi & Bernal-Mizrachi, 2009).

Los mecanismos responsables de la modulación del ciclo de las células β por los factores de transcripción FoxO1 no se conocen por completo, pero se ha propuesto que la retención nuclear de FoxO1 (estados de resistencia a la insulina) reduce la expresión de Pdx1 compitiendo con la unión de FoxA2 en el promotor de Pdx1. Además, la localización nuclear de FoxO1 induce la transcripción de los inhibidores del ciclo celular p27Kip1, p21cip1, p15INK4b y p19INK4d y también podría ser un componente importante en la modulación del ciclo celular mediante la señalización IRS2/Akt/FoxO1 (Kitamura et al., 2002; Yu et al., 2018).

Uno de los mecanismos implicados en la regulación del ciclo celular por Akt es la fosforilación e inhibición de GSK3 β . GSK3 es una serina/treonina quinasa expresada de manera ubicua, inicialmente identificada como un regulador de la síntesis de glucógeno. La deficiencia de GSK3 β específica de las células β mejora la hiperglucemia en ratones *Irs2*⁻, lo que indica su importancia para la adaptación de las células β a la resistencia a la insulina. Los cambios beneficiosos en la masa de células β observadas en ratones *Irs2*⁻ que carecen de un alelo de GSK3 β se explicaron, por la restauración de la expresión de Pdx1 y la disminución de los niveles de p27Kip1. Por el contrario, la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de GSK3 β en las células β indujo un deterioro de la tolerancia a la glucosa, una disminución de la masa de células β y una proliferación que se asoció con niveles disminuidos de ciclina D1 y Pdx1. Los estudios *in vitro* utilizando islotes de rata aislados tratados con pequeños inhibidores de GSK3 aumentaron la replicación de las células β en 2-3 veces con respecto a los controles, aunque los mecanismos responsables de este efecto no se evaluaron. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren un papel importante de GSK3 β en el efecto proliferativo mediado por Akt sobre las células β (figura 7) (Liu, Tanabe, Bernal-Mizrachi, & Permutt, 2008; Mussmann et al., 2007; Tanabe et al., 2008).

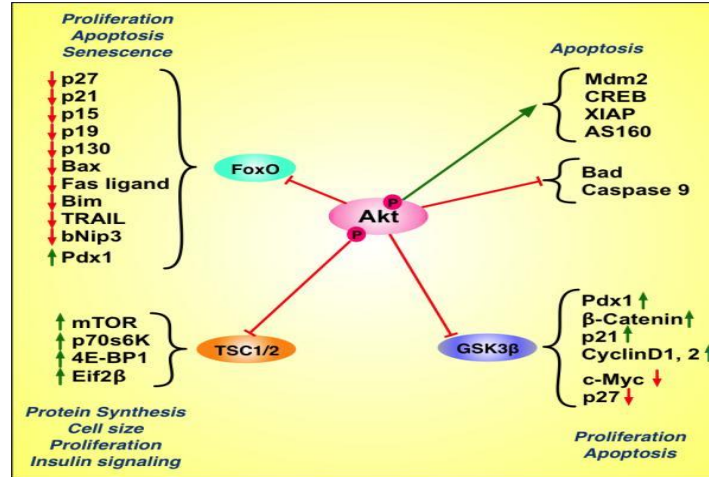


Figura 7. Esquema de varios efectos intracelulares de la vía Akt/PKB. Tomada de Elghazi & Bernal-Mizrachi, 2009.

Los mecanismos posteriores implicados en la modulación de la masa de células β y funciones por GSK3 β no se han aclarado por completo todavía. La inhibición de GSK3 β por la señalización de Akt estabiliza Pdx1 para prevenir la degradación proteosomal. La modulación del ciclo celular mediante la estabilización de ciclina Ds, p27Kip1 y c-myc también podría estar implicada. La señalización de GSK3 β también regula la transcripción de ciclina D1 en una manera dependiente de β -catenina, sugiriendo la participación de la vía Wnt/ β -catenina (vía canónica) en la regulación del ciclo de células β (Elghazi & Bernal-Mizrachi, 2009).

Además de modular los factores de transcripción y las cinasas, Akt también puede regular la proliferación mediante la fosforilación de los componentes del ciclo celular. Akt fosforila directamente p27Kip1 en T157 y anula su actividad inhibidora contra Cdk2. Esto es crítico porque la regulación positiva de p27Kip1 en los estados de señalización disminuida de Akt contribuye a la patogénesis de la diabetes tipo 2 en ratones. Los ratones que sobreexpresan Akt constitutivamente activo muestran niveles aumentados del inhibidor del ciclo celular p21Cip1. Sin embargo, en otros sistemas, Akt fosforila p21Cip1, lo que resulta en su exclusión del núcleo y la inhibición. Los efectos de la modulación de los niveles de p21Cip1 y la localización celular en la progresión del ciclo de la célula β se encuentran actualmente en estudio (Elghazi & Bernal-Mizrachi, 2009).

Akt también afecta la señalización de mTOR a través de Tsc-2 (tuberina) y Tsc1 (hamartina) y el homólogo de Ras, pequeña proteína G. La fosforilación de Akt de Tsc2 induce la señalización de mTOR desinhibiendo la actividad de la proteína Tsc2 GTPasa hacia Rheb. La importancia de esta vía en la regulación de la proliferación de células β se ha demostrado en ratones en los que la inhibición de mTORC1 por la rapamicina inhibe la proliferación de células β inducida por la activación de Akt. Este efecto antiproliferativo de la rapamicina fue causado por la alteración en la síntesis y la estabilidad de la ciclina D2, un regulador crítico del ciclo de las células β . La importancia de esta vía proviene de ratones con delección condicional de Tsc2 en células β . Estos ratones exhiben hipoglucemia, mejoran el metabolismo de la glucosa y aumentan la proliferación de células β , apoyando un papel importante de la vía de señalización de mTOR en la regulación de la masa de células β . La evidencia reciente de ratones con delección de Tsc2 demuestra que mTORC1 es un factor que regula el tamaño de las células β (Elghazi & Bernal-Mizrachi, 2009).

1.3.2.1. Akt y Apoptosis

La señalización de Akt es una de las vías críticas que regulan la supervivencia celular, y su importancia en las células β ha sido sugerida por el aumento de la apoptosis observada en diferentes modelos de ratones, incluyendo *Irs2*⁻, células específicas *Igfl*⁻ y *Pdk1*⁻. La evidencia adicional de los efectos antiapoptóticos de Akt proviene de la resistencia de las células β que sobreexpresan Akt a la apoptosis inducida por estreptozotocina. Los experimentos *in vitro* en líneas celulares de insulinoma e islotes aislados demuestran que la activación de Akt por glucosa, insulina, IGF-1 y GLP-1 es un componente principal para los efectos antiapoptóticos de estas moléculas. La activación de la señalización de Akt también se ha demostrado que media el efecto de supervivencia de la disminución de los niveles de proteína que interacciona con la tiorredoxina (TXNIP) en ratones. Del mismo modo, la regulación a la baja de la actividad de Akt por citocinas, la activación mediada por estrés oxidativo se asocia con la apoptosis. Estos datos sugieren que, además de las respuestas proliferativas, la señalización de Akt es una molécula de supervivencia importante en las células β pancreáticas mediante la regulación de un grupo diverso de factores de transcripción corriente abajo, uno de los cuales es

FOXO1. Sin embargo, los efectos de FoxO1 en la supervivencia parecen depender de condiciones experimentales y metabólicas. La fosforilación e inactivación de FOXO1 activa los genes implicados en la apoptosis como el ligando Fas, TRAIL, Bim y bNIP3. De forma similar, la expresión de FoxO1 constitutivamente activo nuclear en células β cultivadas previno las acciones antiapoptóticas de GLP-1. La señalización de Akt / FoxO1 también retransmite las señales de supervivencia de GIP mediante la supresión de Bax. Por el contrario, la exposición de las células β cultivadas al estrés oxidativo indujo la localización nuclear de FoxO1 y protegió a las células β contra el daño oxidativo. Este efecto beneficioso se asoció con una mayor expresión de NeuroD, MafA e insulina. La activación transcripcional de FoxO1 por el estrés oxidativo es autolimitada y regulada por el equilibrio entre la acetilación y la desacetilación para evitar la transcripción excesiva y prolongada dependiente de FoxO que podría dar lugar a la apoptosis. En resumen, FoxO1 puede tener efectos inhibidores sobre la expansión de la masa de las células β y los efectos de protección bajo estrés agudo (Elghazi & Bernal-Mizrachi, 2009).

Además de su importante papel en la proliferación, la inhibición de Akt de la actividad de GSK3 β también puede relacionar las señales de supervivencia. Los experimentos *in vitro* en células de insulinoma demostraron que la inhibición de la señalización de GSK3 β reduce la apoptosis inducida por estrés de ER, glucosa o palmitato. Este efecto protector de la señalización Akt/GSK3 β podría estar mediado por la localización subcelular y la estabilidad de Pdx1. En otros sistemas, se ha sugerido que GSK3 β y quizás Akt contribuyen a la muerte celular al modular MLK3 / JNK y al fosforilar factores de transcripción como c-Myc y CREB (Elghazi & Bernal-Mizrachi, 2009).

Akt también podría afectar la supervivencia por fosforilación directa de Bad, un miembro de la familia Bcl-2. La caspasa 9, otra proteína pro-apoptótica, también es inhibida por Akt en tejidos humanos. CREB es también un importante mediador de la supervivencia inducida por Akt. La activación de Mdm2 por la fosforilación de Akt bloquea p53 y protege de la apoptosis en otros sistemas. La fosforilación de Akt de XIAP inhibe la apoptosis inducida por la apoptosis mediada por citoquinas y prolonga la supervivencia durante el trasplante de islotes. Estos mecanismos

antiapoptóticos inducidos por Akt se han evaluado en otros sistemas, y se necesitan trabajos adicionales para determinar las principales señales antiapoptóticas de Akt en las células β (Elghazi & Bernal-Mizrachi, 2009).

1.4. Hesperidina: molécula a evaluar como inductora en la diferenciación de células β .

La hesperidina (30,5,9-dihidroxi-40-metoxi-7-Orutinosil flavonona) es un glucósido-flavonona, que consta de una aglicona y un disacárido de rutinosa (figura 7). Se encuentra de manera abundante en frutos cítricos (familia Rutaceae) y también se ha encontrado en plantas, como en los géneros Fabaceae, Betulaceae, Laminaseae y papilionáceas (Majumdar & Srirangam, 2009).

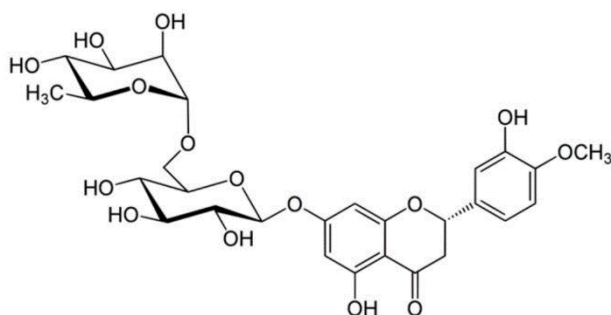


Figura 8. Molécula de hesperidina. Tomado de Lee, Lee, Chang, & Lee, 2015.

Es un subproducto abundante de desecho de los procesos industriales del cultivo de naranjas, cítricos y producción de jugos de fruta, por lo cual su aislamiento es barato y se obtiene principalmente de la naranja ordinaria aurantium y otras especies del género citrus-Rutaceae (Nakajima, Madeira, Macedo, & Macedo, 2016).

Se ha reportado en estudios *in vitro* e *in vivo* que la hesperidina tiene efectos antialérgicos, inmunomoduladores, anti-hipertensivos, antiinflamatorios y antioxidantes disminuyendo el estrés en los órganos ya que ejerce protección contra los radicales libres durante enfermedades crónicas como la diabetes en modelos animales (Agrawal et al., 2014).

Esta característica antioxidante se debe a su composición polifenólica, donde sus grupos oxhidrilo (OH^-) del núcleo flavonoide dona un electrón a los radicales libres con los que tiene contacto fungiendo como un “secuestrador de radicales libres”.

Además se ha encontrado que reduce la superoxidación por la transferencia de electrones, a través de mediar el intercambio de protones *in vitro* (Lee, Lee, Chang, & Lee, 2015).

Se ha demostrado también que su efecto protector se debe a que disminuye la infiltración de las células proinflamatorias y disminuye los niveles de marcadores proinflamatorios como TNF- α e interleucina 6 en modelos de inflamación murina (X. Li et al., 2016).

Se ha reportado que los flavonoides y sus metabolitos además se han visto implicados en algunas vías de señalización como la ruta de la fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI3K), la proteína cinasa Akt activada por mitógenos y ruta de las MAP cinasas, así como las vías de señalización de Wnt/ β -catenina, demostrando incluso que algunos de sus metabolitos pueden interferir también en vías de señalización, como la hesperitina, principal metabolito de la hesperidina, reportado como activador de la vía de la PI3K además interviene en la vía de MAP cinasas, probablemente debido a su efecto antioxidante, mediante la activación de ERK 1/2 y AKT (Huang, Tsai, Lin, Wu, & Yen, 2012; Kim et al., 2013; Lee et al., 2015; X. Li et al., 2016; Nones, De Sampaio e Spohr, & Gomes, 2011).

Por otra parte, estas vías, entre otras funciones, participan en el proceso de la captación de la insulina por sus receptores, transcripción de factores importantes para el desarrollo de las células β , entre otras. Aunque no existen reportes de hesperidina sobre la vía PI3K en función de la diferenciación hacia células β , se cree que por su potencial antioxidante, como cualquier flavonoide, pueden inducir protección a las células, ya que el estrés oxidativo genera una activación de esta vía para promover la supervivencia celular en el proceso de diferenciación en el caso de los ensayos *in vitro*; además se ha reportado que la hesperidina actúa previniendo la muerte celular causada por estrés oxidativo en células neuronales. La inhibición o la estimulación de estas vías pueden modular algunas funciones celulares en la diferenciación, así como al favorecimiento de la expresión de algunos genes que favorecen la misma como PDX1 entre otros (Elghazi & Bernal-Mizrachi, 2009; Huang et al., 2012; Kim et al., 2013; Nones et al., 2011).

1.5. Moléculas de diferenciación en modelos *in vitro* para la formación de células β .

Existen moléculas que juegan un papel importante en cada etapa de diferenciación de las células β ; se han utilizado en diversos protocolos para provocar la diferenciación dirigida de células pluripotentes a células que sean capaces de suplir la necesidad de la producción de insulina (Shih et al., 2013).

Se sabe que las células troncales mesenquimales pueden transdiferenciarse hacia células β , utilizando diversas proteínas, moléculas y factores de crecimiento entre otros, por ejemplo, pequeñas moléculas como CHIR99021 y grandes moléculas como Activina A, EGF, FGF etc. El estudio para comprender las funciones específicas de cada una de estas moléculas tienen por objetivo el obtener protocolos eficientes en la diferenciación celular; con ellos se puede lograr una diferenciación por etapas en el orden siguiente: endodermo pancreático definitivo, desarrollo de progenitores pancreáticos o endocrinos y el desarrollo de las células β maduras, cada etapa se caracteriza por la expresión de diversos factores de transcripción, apegándose al desarrollo pancreático embrionario natural (Shih et al., 2013) .

1.5.1. Activina A

Es una citocina no glicosilada que pertenece a la familia TGF β y esta activamente involucrada en varios procesos biológicos, incluyendo la reparación de heridas, la hematopoyesis y diferenciación (Woodruff & Mather, 1995).

Debido a sus propiedades únicas, activina A juega importantes roles funcionales en diversos sistemas biológicos; estas funciones incluyen la diferenciación pancreática, mesodérmica, neuronal, eritroide y de células de la pituitaria. Se ha considerado el uso sistémico de activina A para el desarrollo pancreático, lo que implica específicamente la formación de endodermo definitivo (Bilezikjian, Corrigan, & Vale, 1990; Totsuka, Tabuchi, Kojima, Shibai, & Ogata, 1988).

Activina A es un homodímero de dos subunidades β y alfa que normalmente no se expresa en la fase de gastrulación del embrión. La función específica de la activina

A se muestra en su especificación de la línea primitiva de la región anterior del meso-endodermo en una etapa inicial, cuando las células son cultivadas en presencia de Wnt3a y FGF2 (Rezania et al., 2011).

La activina induce la expresión de señales a través del mismo complejo receptor que nodal, ésta es una proteína morfogénica ósea que se expresa en altos niveles en el nodo. Varios investigadores trataron de mejorar la producción de insulina usando activina A junto con Wnt3a, añadiendo ambas al medio de cultivo de hESCs (células troncales embrionarias humanas) y encontraron una mejor formación del estado meso-endodérmico durante la primera etapa de la diferenciación del páncreas (D'Amour et al., 2006).

La función de la activina A en el protocolo de diferenciación que se llevó a cabo es promover la señalización requerida para la formación de células meso-endodérmicas (D'Amour et al., 2006).

Las moléculas que aumentan la producción de insulina se buscan mediante un continuo tamizado de moléculas que puedan constituir un complemento de activina A durante la inducción de endodermo. Por otra parte, se sabe que activina A, junto con la adición de ácido retinoico, promueve la expresión del gen PDX1 en más del 70% de las células en cultivo. Otro punto de interés en esta molécula es en el desarrollo de protocolos que se han centrado en la inducción de endodermo (Cai et al., 2010; Jiang et al., 2007).

El foco de la investigación se ha desplazado en gran medida al desarrollo de un protocolo altamente eficiente y escalonado para dirigir la diferenciación de páncreas utilizando una combinación de activina A y algunas otras moléculas para inducir la formación endodermo definitivo. La exposición sostenida de las SC a altos niveles de activina A induce la formación endodermo (Zhang et al., 2009).

1.5.2. Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

FGF regula la diferenciación, la migración y la promoción de la proliferación durante el desarrollo embrionario. La concentración óptima de FGF, combinada con la de otras moléculas, no sólo conduce a la diferenciación, también aumenta el número

de células troncales que se diferencian a células β (Böttcher & Niehrs, 2005; Ornitz et al., 1996).

FGF promueve una relación estrecha entre el desarrollo del páncreas y otros órganos, como el hígado, tiroides y pulmón. Las señales de FGF desde el mesodermo cardíaco a la raíz ventral promueven el crecimiento del hígado, mientras que para la activación del destino pancreático en etapas posteriores a la formación de células meso endodérmicas pancreáticas es necesario la ausencia de FGF-2. Para lograr la especialización de los progenitores pre pancreáticos, el efecto de FGF sólo es insuficiente, pero la adición de una concentración óptima de FGF junto con un inhibidor del desarrollo hepático puede ofrecer resultados en la diferenciación del páncreas. Sin embargo, aunque FGF juega un papel vital en la formación de páncreas, la función de la vía de señalización no se entiende completamente. Existen dieciocho FGFs diferentes que se expresan e influyen los diversos factores de crecimiento implicados en la regulación del crecimiento de la célula pancreática (Hart, Papadopoulou, & Edlund, 2003; Yamaoka et al., 2002).

La falta de FGFs en el medio de cultivo afecta fuertemente la diferenciación en el tejido pancreático de las células troncales. La expresión del factor de transcripción PDX1 disminuye cuando las vías de señalización de FGFR y MAPK son inhibidas (Apelqvist et al., 1999; Hart et al., 2003).

FGF2 regula la especificación de células pluripotentes embrionarias derivadas de diferentes linajes del intestino anterior en una concentración dependiente de la expresión de esta molécula y de forma temporal. La especificación del endodermo del intestino medio se completa durante la diferenciación de órganos en niveles altos de FGF2. A bajas concentraciones de FGF2, la formación del hígado se promueve, mientras que, a concentraciones más altas, FGF2 reprime la expresión PDX1 y promueve la formación de pulmón. Por otro lado, la diferenciación de páncreas es promovida sólo por la adición de niveles óptimos de FGF. En ausencia de la señalización de FGFR, la expresión de PDX1 es drásticamente afectada (Arman, Haffner-Krausz, Chen, Heath, & Lonai, 1998).

Los niveles intermedios de FGF pueden impulsar la expresión del factor de transcripción tales como PDX1 y Nkx6.1 (Chiang & Melton, 2003).

El FGF10 tiene un efecto significativo sobre la diferenciación de las MSC en páncreas. Por lo que se ha concluido que las células deben exponerse a concentraciones adecuadas de FGF para obtener buenos resultados en la diferenciación (Nakanishi, Hamazaki, Komazaki, Okochi, & Asashima, 2007; Norgaard, Jensen, & Jensen, 2003).

1.5.3. Nicotinamida

Los efectos de la nicotinamida a diferentes dosis se han estudiado en células pancreáticas endócrinas de feto humano y de adulto, se ha reportado que el tratamiento con nicotinamida a 10 mM da lugar a generar una carga al triple del contenido de insulina contenida en las células. Esto se asoció con el desarrollo de células ft-1 positivas, es decir, células en diferenciación destinadas a la formación de células de tipo endócrinas (Otonkoski, Beattie, Mally, Ricordi, & Hayek, 1993).

Se ha informado que las dosis medias-máximas con efectos mitogénicos son de 5 a 10 mM, respectivamente. Se han tratado con nicotinamida células en diferenciación para la formación de Islotes y se ha observado que las células responden a la estimulación con glucosa en un aumento bifásico de la liberación de insulina mientras que las células control no respondían a la glucosa. Estos reportes indican que la nicotinamida induce la diferenciación y maduración de las células de los islotes pancreáticos fetales (Otonkoski et al., 1993; Schwitzgebel et al., 2000).

Por otra parte, se sabe que el tratamiento *in vivo* con nicotinamida previene el desarrollo de diabetes en animales de experimentación después de la administración de estreptozotocina y aloxano. Este efecto se atribuye a la inhibición de la enzima nuclear Poli (ADP-ribosa) sintetasa que, si se activa durante la reparación del ADN, podría conducir a una disminución crítica en el nivel de NAD de las células; sin embargo, otros mecanismos que también propicia la nicotinamida son: la eliminación de radicales de oxígeno libres y la inhibición de la expresión de antígeno de clase II de MHC en las células de los islotes (Otonkoski et al., 1993).

Se ha sugerido también que la nicotinamida posee un efecto estimulador sobre la regeneración de los islotes. Estas observaciones han promovido estudios clínicos prospectivos que están actualmente en curso (Huotari, Palgi, & Otonkoski, 1998).

1.5.4. Ácido retinoico (AR)

Los retinoides juegan un importante papel como reguladores fisiológicos de un gran número de procesos biológicos, como desarrollo embrionario, visión, reproducción, diferenciación, proliferación y apoptosis.

El RA produce una parada de la proliferación en la fase G1 del ciclo celular. La detención del crecimiento es debida a un incremento de los niveles de p27 y una inhibición de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (Lane & Bailey, 2005).

Los heterómeros RAR-RXR en presencia de ácido retinoico, parece que reprimen la actividad de AP-1 (Jun/Fos) Fos y Jun son proteínas del componente AP-1 que a niveles elevados regulan negativamente la señal de los retinoides, esto implica que las células activen cambios de fenotipo y así comiencen un proceso de diferenciación. AP-1 regula gran cantidad de genes que aumentan la proliferación celular. Por el contrario, los retinoides generalmente inhiben la proliferación celular e inducen la diferenciación. Por tanto, se piensa que la interacción entre AP-1 y RAR-RXR provoca en las células un cambio de fenotipo proliferativo a diferenciado (Altucci & Gronemeyer, 2001).

Otra conexión entre receptores nucleares y otras rutas de señalización se produce por la fosforilación de los propios receptores. De este modo múltiples cinasas activadas por señales extracelulares como las MAPKs, afectan la actividad de ciertos receptores nucleares y se desencadenan cascadas de señalización que beneficie la diferenciación celular (Masiá Adalid, 2006).

1.5.5. GLP-1.

Factores importantes utilizado en el medio de diferenciación de células β . Se sabe que promueve significativamente la expansión de progenitores pancreáticos aumentando el número de células positivas a PDX1 hasta tres veces más.

Algunos investigadores optan por utilizar combinaciones de factores de crecimiento; por ejemplo, HGF o EGF sólo, otros casos usan EGF más IGF, y IGF con HGF; puesto que estos factores estimulan o promueven la diferenciación de células β durante la formación de progenitores pancreáticos (Kumar et al., 2014).

1.5.6. B27

B-27 es un suplemento sin suero que proporciona supervivencia *in vitro* originalmente de neuronas y después utilizadas en otras líneas celulares como las mesenquimales humanas. Este suplemento se puede utilizar en combinación con ITS o N2 permitiendo una mayor tasa de supervivencia de las células, y en el caso de las neuronas, una actividad electrofisiológica mejorada y una madurez funcional en medios con bajo o nulo SFB (Suero fetal bovino) (Fisher Scientific, 2014).

1.5.7. ITS

La insulina-transferrina-selenio (ITS) se utiliza como suplemento de medio basal a fin de reducir la cantidad de suero fetal bovino (SFB) necesaria para cultivos celulares. La solución de ITS-G, empleada originalmente con RPMI 1640 y medio esencial mínimo (MEM), se usa ahora rutinariamente con otro medio basal para admitir una amplia variedad de tipos celulares en presencia de entre un 2 y un 4 % de SFB. La insulina promueve la absorción de la glucosa y los aminoácidos, la lipogénesis, el transporte intracelular y la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. La transferrina es un portador de hierro y también puede ayudar a reducir los niveles tóxicos de radicales de oxígeno y peróxido. El selenio, como el sodio selenita, es un cofactor de la glutatión peroxidasa y otras proteínas, y se utiliza como un antioxidante en el medio (Gibco, 2014).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Organización Mundial de la Salud prevé que la DM se convierta en la séptima causa mundial de muerte para el año 2030, está situada dentro de las principales causas de hospitalización, siendo una enfermedad que consume el mayor porcentaje del gasto de nuestras instituciones públicas, por tal es considerada una enfermedad prioritaria en el Plan Nacional de Salud.

Se han planteado terapias alternativas para controlar la enfermedad a la administración de insulina exógena (terapia más común en la DM tipo1) como el trasplante total de páncreas en conjunto con el de riñón sin embargo se ven limitadas ya que se requiere de donadores compatibles, cirugía mayor y hospitalización prolongada del paciente. Es por ello que se ha generado gran interés en la terapia celular para la búsqueda de substitutos funcionales de las células productoras de insulina defectuosas, sin embargo, no se han encontrado protocolos *in vitro* que proporcionen células de reemplazo en biomasa y funcionalidad suficiente para un trasplante efectivo, por lo que el análisis de moléculas que permitan optimizar estos protocolos es de relevancia. Biomoléculas con actividad antioxidante se visualizan con este potencial, en específico la hesperidina, la cual es un subproducto abundante de desecho de los procesos industriales del cultivo, procesamiento y producción de cítricos, que puede aprovecharse, promete ser una molécula que puede optimizar la producción de estas células β debido a sus múltiples propiedades biológicas atribuidas como los efectos protectores de las células β pancreáticas contra los niveles altos de glucosa en el organismo y aumento a la respuesta para la producción de insulina, así mismo se ha visto implicada en la regulación de vías de señalización importantes para el desarrollo de las células β como la vía PI3k/Akt la cual favorece la expresión de algunos genes como Pdx1, relevante para la diferenciación y mantenimiento de las células β .

Por todo lo descrito anteriormente, el análisis de los efectos de esta molécula repercute en el diseño de protocolos que ofrezcan una eficiente producción del número de CPI obtenidas por diferenciación de CTMCU, así como el índice de producción de insulina de estas, bajo el objetivo de obtener células funcionales

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

sustitutas de las células β pancreáticas dañadas, con perspectivas de aplicación en medicina traslacional para el tratamiento de la DM.

3. JUSTIFICACIÓN

La incidencia de DM a nivel mundial y en nuestro país sigue en constante crecimiento. En la búsqueda de terapias que no solo sean paliativas se ha gestado interés en la terapia celular, es decir, en obtener una fuente de CPI que puedan ser utilizadas para el reemplazo de células dañadas. Actualmente en gran parte de los protocolos *in vitro* que estudian la diferenciación para obtener este tipo de células, el objetivo principal es encontrar las condiciones adecuadas de cultivo que induzcan el aumento de la masa y la viabilidad de estas así como aumentar la eficiencia funcional de las mismas, analizando el uso de diversas moléculas, ya que hasta el momento los protocolos *in vitro* no han podido alcanzar esta meta.

Debido a ello, se llevó a cabo el estudio del efecto de la hesperidina, que es un flavonoide abundante en cítricos, con efectos terapéuticos neuroprotectores, inductor de factores de transcripción para diferenciación, efectos regulatorios en rutas como PI3K y MAP cinasas, antioxidante, inmunomodulador. Por lo anterior, se probó el efecto de la hesperidina *in vitro* en la diferenciación de CTMCU a CPI esperando obtener células en la biomasa suficiente, ya que se estima que se necesitan 700,000 islotes equivalente a 900 millones de células β funcionales, para la reversión total de la diabetes, es decir, capaces de responder a un estímulo de glucosa liberando insulina, para ofrecer una posible fuente terapéutica celular.

4. HIPÓTESIS

La Hesperidina favorece la obtención de CPI en un protocolo de diferenciación a partir de CTMCU .

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar *in vitro* el efecto de hesperidina en un protocolo de diferenciación de CTMCU para la obtención de células pancreáticas productoras de insulina.

5.1.1. Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad citotóxica de la hesperidina en CTMCU mediante citometría de flujo.
2. Analizar el efecto de la hesperidina sobre los marcadores mesenquimales de membrana de CTMCU.
3. Analizar el efecto inductor de la hesperidina en un protocolo de diferenciación de CTMCU hacia células productoras de insulina.
4. Verificar las características de expresión génica similares al desarrollo de una célula β .
5. Identificar la funcionalidad de las células diferenciadas, mediante ELISA y citometría de flujo.

6. METODOLOGÍA

6.1. Diseño experimental

I. Tipo de estudio

Experimental

II. Universo de estudio

Células troncales mesenquimales de cordón umbilical diferenciadas a células productoras de insulina.

III. Variables

Independientes:

- Tratamiento con las moléculas de diferenciación 2% SBF y 0 μM de hesperidina (Tx1).
- Tratamiento con las moléculas de diferenciación 10% SBF y 0 μM de hesperidina (Tx2).
- Tratamiento con las moléculas de diferenciación 2% SBF y 10 μM de hesperidina (Tx3).
- Tratamiento con las moléculas de diferenciación 10% SBF y 0 μM de hesperidina (Tx4).

Dependientes:

- Expresión de los genes característicos de cada etapa.
- Producción de insulina intracelular.
- Excreción de insulina al medio.

IV. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas inter e intra grupos se determinaron mediante un análisis t de student para las poblaciones celulares analizadas para insulina intracelular y excretada. Se consideró una diferencia estadística cuando el valor de p fue > 0.05 .

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Células de cordón umbilical (CTMCU)

Se utilizaron células troncales mesenquimales provenientes de cordón umbilical de la gelatina de Wharton de la casa ATCC® (PCS-500-010™ Lot. 63216949) correspondientes a un masculino caucásico. Su morfología es similar a la de los fibroblastos y son células adherentes al plástico, el certificado de calidad de análisis de marcadores característicos está garantizado hasta el pase 10.

7.1.1. Cultivo y propagación

Se partió de un vial de células de cordón umbilical congeladas. Las células se sembraron en frascos de cultivo con medio recomendado por la misma casa comercial, medio basal para células troncales mesenquimales (ATCC® PCS-500-030™) suplementado con el kit de crecimiento para células troncales mesenquimales (ATCC® PCS-500-040™). El cultivo se incubó a una temperatura constante de 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% con 95% de humedad relativa. Cuando el cultivo llegó a una confluencia entre el 70 a 80%, las células se desprendieron con Tripsina-EDTA al 0.05% (ATCC® PCS-999-003™) y se resembraron en nuevas botellas 5,000 células por cm², hasta lograr una expansión hasta el pase 5.

Las células se criopreservaron con medio basal recomendado con 5% DMSO (ATCC® 4-X™) y se almacenaron en tanque con vapor de nitrógeno líquido.

7.2. Curva de viabilidad de hesperidina por citometría de flujo

Para identificar la integridad de las células ante la exposición con la hesperidina, se determinó realizar una curva de viabilidad.

Se cultivaron a una densidad de 1x10⁶ células por pozo en placas de seis pozos con distintas concentraciones de hesperidina (0, 0.1, 10, 100 y 1000 µM) se incubaron a 37°C, 95% humedad relativa y 5% CO₂ por 72h. Después se obtuvieron las células con 1 mL de tripsina 0.05%, la cual se colocó después de recolectar el medio de cultivo. Se incubaron aproximadamente 3 minutos a las mismas condiciones y después se neutralizó la tripsina con 1 mL de medio antes recolectado

una vez que se despegaron las células. Posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en PBS 1X (PBS 10x Sigma D1408) en un microtubo de 1.5 mL para su posterior análisis según el kit de viabilidad BD™ (No. de catálogo 349480).

Para la tinción se agregaron 2.0 μL de naranja de tiazol (TO) y 1.0 μL de yoduro de propidio (PI) a 1 mL de la suspensión celular. La concentración final de los colorantes es 84 nmol/L para TO y 4.3 $\mu\text{mol/L}$ para PI. Los microtubos se agitaron en vortex y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente, protegidos de la luz.

La muestra se leyó en el citómetro BD AccuriC6™ a una longitud de excitación del láser de 488 nm y se analizaron con el software BD CellQuest™. El TO emite fluorescencia a 512 nm y se detecta principalmente en los canales FL1 y FL2; el PI emite fluorescencia a 617 nm y se detecta principalmente en el canal FL3. Por lo tanto, la mejor discriminación entre población viva y muerta se encuentra al relacionar en la gráfica los canales FL1 vs FL3.

7.3. Análisis de marcadores característicos de células mesenquimales.

Se realizó un análisis por citometría de flujo para identificar los siguientes marcadores de membrana: CD73, CD90, CD105 y adicionalmente CD44 (Becton Dickinson Human Mesenchymal Stem Cells (hMSC) analysis kit cat. 562245), así como la ausencia de marcadores de tipo hematopoyético. Este análisis tuvo la finalidad de verificar la expresión de marcadores antes y después de agregar la hesperidina en CTMCU y observar cambios del fenotipo después del mismo.

Se retiraron las células de la botella de cultivo con tripsina 0.05%, se contaron en cámara de Neubauer y se colocaron 500,000 células en 300 μL de PBS/BSA 0.1%, se prepararon 9 microtubos de 1.5 mL con las mismas proporciones. Se fijaron con paraformaldehído frío al 4%. Posteriormente se prosiguió con el marcaje con los anticuerpos. Se colocaron 5 μL de los anticuerpos individuales a cada tubo correspondiente y 10 μL para los controles de isotipo, así como para el cocktail positivo y negativo, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, protegidos de la luz y en agitación constante a 90 rpm. Se realizó un lavado para retirar el exceso de anticuerpo, agregó 500 μL de PBS/BSA 0.1% y centrifugaron a 1500 rpm

MATERIAL Y MÉTODOS

durante 2 min, se retiró el sobrenadante y resuspendieron en 300µL de PBS/BSA 0.1%, y por último se analizaron en el citómetro Accuri C6 BD. Los grupos se analizaron según la tabla 2.

Tabla 2. Grupos para citometría para viabilidad.

Número de tubo y anticuerpos correspondientes.	Descripción
1. Células sin marca	
2. Células con CD44	PE-Mouse anti-human
3. Células con CD73	APC-Mouse anti-human
4. Células con CD90	FITC-Mouse anti-human
5. Células con CD105	PerCP-Cy Mouse anti-human
6. Células marcadas con el <i>cocktail</i> de marcadores hMSC.	CD90-FITC, CD105-PerCP-Cy, CD73-APC.
7. Control isotipo de <i>cocktail</i> hMSC	mIgG1,κ- FITC, PERCP-Cy, APC
8. Células marcadas con el <i>cocktail</i> de marcadores de tipo hematopoyético.	CD34-PE, CD11b-PE, CD19-PE, CD45PE, HLA-DR PE.
9. Control de isotipo de marcadores de tipo hematopoyético.	mIgG1, κ- PE y mIgG2a κ-PE

PE (Ficoeritrina); APC (Alofocianina); FITC (Fluoresceína); PerCP (Peridina clorofila-cianina); κ (fracción capa).

7.4. Diferenciación *in vitro* hacia células productoras de insulina (CPI)

Para tener un acercamiento al mejor tratamiento (tratamiento en cual las células obtenidas ofrezcan un mayor rendimiento en la producción de insulina respecto al protocolo modificado de Samani et al. 2015) se elaboró un diseño estadístico 2² teniendo como factores la concentración de SBF 2% y 10% (a) y hesperidina 0µM y 10µM (b) como se observa en la tabla 3, resultando en 4 tratamientos o grupos (Tx). Además, se probó una concentración menor de SBF debido a que en la actualidad se busca reducir el uso de este suplemento por no estar estandarizado del todo en su formulación variando entre lotes y también por el costo del mismo.

Tabla 3. Diseño de experimento

No.	a	b	Código	Tratamiento
Tx1	-	-	1	2% SBF y 0 µM de hesperidina
Tx2	+	-	a	10% SBF y 0 µM de hesperidina
Tx3	-	+	b	2% SBF y 10 µM de hesperidina
Tx4	+	+	ab	10% SBF y 10 µM de hesperidina

La hesperidina (Sigma 50162) se probó en todas las etapas de los Tx3 y Tx4.

MATERIAL Y MÉTODOS

Posteriormente se hicieron repeticiones del tratamiento control, es decir el modificado de (Samani & Ebrahimi, 2015) (Tx2), y del mejor tratamiento con hesperidina el cual fue el Tratamiento 3 (Tx3).

El primer proceso de diferenciación se llevó a cabo en placas de 6 pozos con 1×10^6 de CTMCU, en incubación a 37°C, 95% humedad relativa y 5% de CO₂. El proceso se realizó en tres etapas o transiciones como lo menciona Samani & Ebrahimi 2015 modificado describiéndolo a continuación:

- Etapa 1: Obtención de células endodérmicas

Se colocó por pozo 1 mL de medio DMEM Hg, se adicionó Activina A (SRP3003-1.-Sigma Aldrich) 100ng/mL por 1 día, después se cambió el medio por DMEM Hg (Sigma D7777) dejándolo incubar por 1 día y por último se cambió el medio por DMEM Hg adicionado con ácido retinoico (R2625-Sigma Aldrich) 1 μ M incubando 1 día más.

- Etapa 2: Obtención de progenitores endócrinos.

Se realizó cambio de medio por DMEM Hg, adicionado con bFGF (F0291-Sigma Aldrich) 10 ng/mL incubándolo por 5 días.

- Etapa 3: Obtención de CPI.

Se realizó cambio de medio a la placa por DMEM-F12 adicionado con nicotinamida 10mM (N0636-Sigma Aldrich), GLP-1 1ng/mL (G3265-Sigma Aldrich), suplemento B27 al 1% (Gibco 17504044), ITS 1X (Sigma I3146) y bFGF 10 ng/mL. Se incubaron por 5 días.

Al término de cada etapa se colectaron sobrenadantes y las células para su análisis.

Una vez obtenidos los resultados exploratorios se procedió a realizar el mismo proceso de diferenciación, pero en placas de 12 pozos para obtener al menos dos datos más para un análisis estadístico adecuado en cuanto a la producción de insulina colocando por pozo 600 μ L.

7.5. Identificación y caracterización de las células obtenidas

7.5.1. Búsqueda y selección de iniciadores

Para esta búsqueda se utilizó la base de datos de NCBI, su herramienta de iniciadores “Primerblast” entre otros softwares como “primer3”, “E-pcr”.

1. Una vez seleccionados los genes de interés se buscó el número de referencia de la secuencia del mRNA en la base de datos de NCBI.

2. Luego en los programas de elaboración de iniciadores, como el primerblast, se colocó el número de referencia y ajustaron las propiedades deseadas de los oligos o iniciadores las cuales fueron: oligos entre 15-30 nucleótidos, T_m (temperatura de fusión) entre 51-61 °C, fragmentos de amplificación entre 100-1000 pb, contenido de GC entre 40-60%, alta especificidad con el gen de interés y nula o baja afinidad entre los iniciadores F y R (*Forward*, *Reverse* por sus nombres en inglés) y entre ellos mismos para no generar estructuras secundarias indeseadas.

Una vez que el programa mostró opciones se eligieron los iniciadores que cumplieron los parámetros antes mencionados para su obtención en la empresa OligoT4.

7.5.2. Análisis de la expresión génica.

Se llevó a cabo un muestreo de las células en las diferentes etapas de la diferenciación con la finalidad de realizar una extracción de RNA para analizarlas por RT-PCR para verificar la presencia de genes como Pdx1, Pax4, Ngn3, Nkx6.1, Insulina, Pax6, MafA y Glut-2 además de la vía de Notch como Notch1; puesto que son representativos del proceso de formación y maduración de las células β pancreáticas productoras de insulina.

7.5.2.1. Extracción de RNA total.

Al término de cada etapa de diferenciación se colectaron las células para realizar un análisis por RT-PCR para rastrear la expresión de genes característicos del proceso.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las células correspondientes a cada etapa fueron colectadas por medio del uso de tripsina para separarlas de la superficie plástica donde crecían y posterior inactivación con medio suplementado con SBF, colocándolas en un crio vial que contenía 1mL.

La extracción de RNA se realizó utilizando un kit (ReliaPrep™ RNA *Miniprep Systems* cat. Z6012). Se utilizaron 1×10^6 células aproximadamente, se colocaron en microtubos de 1.5 mL centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos para retirar el medio de cultivo, se añadieron 250 μ L de buffer BL+TG y pipeteó de 7-10 veces para disgregar el material genómico, se agregaron 85 μ L de isopropanol grado biología molecular al 100% y agitó en vórtex por 5 s. Se pasó la mezcla a una columna de extracción ensamblada a un tubo de recolección, se centrifugó durante 30s a 13000g.

Posteriormente se descartó el fluido del tubo de recolección, se añadió sobre la membrana de la columna 500 μ L de buffer lavado de RNA, se centrifugó durante 30s a 13000g, se descartó el fluido de la columna, después se añadió un volumen de 30 μ L del mix DNAsa I y se incubó 15 min a 20-25°C. Después se adicionó 200 μ L de buffer lavado de columna y nuevamente se centrifugó 15s a 13000g descartando el fluido del tubo recolector. Se añadieron 500 μ L de buffer lavado de RNA y centrifugó 30s a 13000g descartando el fluido del tubo de recolección. Nuevamente se agregaron 300 μ L de buffer lavado de RNA y centrifugó por 2 min a 13000g. posteriormente se reemplazó el tubo de colección por uno nuevo y finalmente se colocó sobre la membrana 30 μ L de agua grado biología molecular, se centrifugó durante 1 min a 13000g para eluir el RNA de la columna.

Tabla 4. Preparación de soluciones.

Solución	Reactivos
Buffer de lisis BL+TG	1500 μ L TG+ 150mL BL
Buffer lavado de RNA	350 mL etanol 95% + 206mL RWA
Buffer lavado de columna	36 mL etanol 95% + 24mL CWE
DNAsa I mix (por reacción)	24 μ L <i>Yellow core Buffer</i> + 3 μ L $MgCl_2$ 0.09M + 3 μ L DNAsa I

BL (Buffer de lisis); TG (Tioglicerol); RWA (Buffer de lavado de RNA); CWE (Buffer de lavado de columna).

7.5.2.2. Cuantificación de RNA

Para determinar la concentración de las muestras se utilizaron dos métodos; cuantificación en el fluorómetro Qubit™ 3.0, para esto se realizó una curva de

MATERIAL Y MÉTODOS

solución de trabajo con los estándares provistos por el *kit RNA Assay Qubit™* Cat. 032852, posteriormente se tomó una muestra del extracto de RNA de 1-10µL y se colocó en solución de trabajo suficiente para aforar a 200µL, se tomó la lectura. Además de la cuantificación por Nanodrop™ 2000/2000C colocando 2 µL de agua grado BM como blanco y 2 µL de cada muestra. Se procedió a realizar los cálculos correspondientes para tomar 50ng de RNA para la síntesis de cDNA.

Tabla 5. Preparación de soluciones Qubit™.

Solución	Reactivos
Solución de trabajo	1µL fluorocromo + 199µL buffer
Estándares	10µL estándar “bajo” o “alto” + 190µL de solución de trabajo.
Muestra	1 a 10µL muestra + aforar a 200 µL con solución de trabajo.

7.5.2.3. Síntesis de cDNA

Una vez cuantificado el RNA, se realizaron los cálculos necesarios para tener 50 ng de RNA para la síntesis de cDNA. Se utilizaron los componentes del *kit Go script reverse transcription system* cat. A5001.

Se colocaron los microlitros necesarios para 50ng de RNA experimental con 1µL de *random primer*, 1µL de oligo dT y agua libre de nucleasas para aforar a 5µL, la mezcla se incubó a 70°C durante 5 min, después se colocó en hielo por 5 min y se centrifugó en spin 10 s.

Se preparó el mix de reacción conforme a la tabla 6, a esta mezcla se le adicionó el mix de la muestra con el RNA experimental dejando el volumen total fue de 20 µL. Se incubó a 25°C durante 5 min (alineación), y luego a 42°C durante 1h (extensión), finalmente para inactivar la enzima se incubó a 70°C durante 15 min. La tabla 7 muestra las condiciones que fueron programadas para la síntesis del cDNA en el termociclador marca *Applied Biosystems, Veriti 96 well Thermal Cycler*.

Tabla 6. Preparación de soluciones para RT.

Reactivos	Cantidad
Mix muestra	
Muestra	X µL
Random primers	1 µL
Oligo dT	1 µL
Agua libre de nucleasas	Aforar a 5 µL
Mix de reacción	

MATERIAL Y MÉTODOS

Buffer	4 μ L
MgCl ₂	2.5 μ L
dNTPs	1 μ L
Taq	1 μ L
Agua	Aforar a 20 μ L
RNArecombinasa (opcional)	1 μ L

Tabla 7. Condiciones de retrotranscripción para la síntesis de cDNA.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Alineación	25 °C	5 minutos
Extensión	42 °C	60 minutos
Inactivación de la enzima	70 °C	15 minutos
Enfriamiento	4 °C	∞

7.5.2.4. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Se partió del cDNA sintetizado y se utilizó el termociclador marca *Applied Biosystems, Veriti 96 well Thermal Cycler*.

Se utilizó el *kit Promega Go Taq G2 Flexi DNA Polymerase* cat. M7806. Se realizó la mezcla de reacción contemplando volúmenes totales de 12.5 μ L por reacción.

En la tabla 8 se muestran las proporciones de los componentes del mix por reacción individual.

Tabla 8. Mix de PCR para una reacción.

Componente	Volumen (μ L)
5xBuffer Green	2.5
MgCl ₂	1.5
dNTP's	0.25
Taq Polimerasa	0.0625
Iniciador F	0.5
Iniciador R	0.5
Muestra /Agua	1
Agua libre de nucleasas	6.1875

En la tabla 9 se muestran las condiciones de la PCR para el análisis de los genes de interés.

Tabla 9. Condiciones de la PCR para el análisis de los genes de interés.

Etapa	Condiciones	
Desnaturalización inicial	95°C/2min.	
37 ciclos	Desnaturalización	95°C/30s.
	Alineación	TM de iniciadores por 30s
	Extensión	72°C 1 min
Extensión final	72°C 5min	
Enfriamiento	4°C	

7.5.2.5. Análisis de expresión génica por densitometría

Para este análisis se tomaron fotos de los geles de agarosa de las reacciones producto de las PCRs en el fotodocumentador Gel Doc™ XR+ de *BioRad* y se analizaron con el software *ImageLab*™ 6.0 siguiendo los siguientes pasos.

1. Se seleccionó el archivo de la foto y una vez abierto se colocaron los carriles y bandas de los geles en el apartado de “*Lane and bands*”.
2. Después en “*Quantity tools*” se seleccionó la pestaña de “*relative*” y después señaló la banda de referencia la cual fue la del gen endógeno GAPDH.
3. Por último, se presiona “*Analysis table*” y se exportan los datos de la densidad relativa de todas las bandas de los genes amplificados de la PCR a una tabla en Excel para poder graficarlos.

7.5.3. Análisis de insulina intracelular

Al término de la tercera etapa de diferenciación, se trabajó con varios grupos de las células obtenidas:

- Tratamiento 1 (Tx1): células con 2% de SBF y sin hesperidina.
- Tratamiento 2 (Tx2): células con 10% de SBF y sin hesperidina. Protocolo modificado de Samani et al 2015.
- Tratamiento 3 (Tx3): células con 2% de SBF y con 10 μ M hesperidina.
- Tratamiento 4 (Tx4): células con 10% de SBF y con 10 μ M hesperidina.
- CTMCU como control negativo.

Las células se colocaron en microtubos de 1.5 mL, se fijaron y permeabilizaron con una solución 1:1 de metanol: acetona. Para ello las células se centrifugaron por 3 min a 2500 rpm y se les retiró el sobrenadante, después se les colocó 100 μ L de solución 1:1 de metanol-acetona, durante 50s y pipeteó 5-10 veces, posteriormente añadieron 450 μ L de PBS y centrifugaron inmediatamente a 2500rpm durante 3 min, se resuspendieron y volvieron a centrifugar 3 min a 2500 rpm luego se retiró el sobrenadante (Nota: con cuidado de no tocar las paredes pues las células permeabilizadas quedan alrededor del microtubo y no forman botón definido en el fondo) y las células se incubaron con 200 μ L de solución de anticuerpo anti-insulina (Alexa Fluor 647 Mouse), la solución de anticuerpo se preparó colocando 4 μ L del

anticuerpo en 1 mL de PBS, durante 1h protegidos de la luz en agitación constante a 90 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un lavado colocando 400µL de PBS, se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 min, se desechó el sobrenadante y resuspendió el botón celular en 300µL de PBS. Las muestras se leyeron en el citómetro Accuri C6 BD en el canal FL-4 (el rango del canal de este canal es de 540-700nm) tomando como control negativo las células indiferenciadas de CU marcadas con *anti-insulin* (CTMCU).

7.5.4. Análisis de insulina liberada al medio

Los sobrenadantes colectados después del proceso de diferenciación se analizaron mediante una prueba ELISA, se utilizó el kit Invitrogen Cat. KAQ1251.

Se estandarizó la prueba puesto que se observó que el PBS, en donde se diluyó la glucosa a 23 mM para retar a las células diferenciadas, provocaba interferencia con los componentes del kit propiciando que se observaran densidades ópticas fuera del rango estimado de la curva estándar por la interacción inespecífica con otros reactivos del kit.

Por ello se determinó cambiar la solución amortiguadora de las muestras por TBS-BSA 5% utilizando mini columnas centrífugas 3K (*Amicon Millipore*), se colocó en cada columna 100µL de muestra (sobrenadantes de las células diferenciadas) con 400µL de TBS-BSA 5%, se centrifugó durante 30 min a 14,000-xg, se descartó el filtrado y se colocaron 500µL de TBS-BSA 5%, se resuspendió con micropipeta y se centrifugó 30 min a 14,000-xg, se descartó nuevamente el flujo y nuevamente se colocaron 500µL de TBS-BSA 5%, se llevó a la centrifuga bajo las mismas condiciones, finalmente se descartó el filtrado y se resuspendió la muestra en 250µL al final la muestra quedó diluida en buffer TBS-BSA 5% en dilución de 1:2.5 y 1:5, después del cambio de buffer, las muestras se procesaron en el inmunoensayo y se confirmó que desapareció la interferencia.

El inmunoensayo de tipo ELISA sándwich constó de una microplaca de 96 pozos recubierta con un anticuerpo monoclonal específico para la insulina. Se colocaron 400µL de solución comercial bloqueadora de ELISA (*Thermo-Invitrogen*) durante

MATERIAL Y MÉTODOS

2h, posteriormente se decantó el contenido de los pozos y se secó la placa colocándola sobre papel absorbente.

Se colocaron 50µL de cada estándar y controles provistos por el kit de ensayo en los pozos, éstos constan de concentración conocida ya que son sueros humanos liofilizados que son resuspendidos en agua, además se colocaron 50µL de las muestras en sus pocillos respectivos, después se añadieron 50µL de anticuerpo de detección en cada pocillo, se cubrió la placa con un sellador de placas y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se retiró el contenido de los pozos con micropipeta y se lavó la microplaca 4 veces con 400µL de solución de lavado (IDvet) por pocillo, esperando 30s antes de retirar la solución entre cada lavado, después del lavado final, se añadieron 100µL de cromógeno y se incubó en oscuridad durante 15 min, posteriormente se añadieron 100µL de solución de paro y se dejó reposar durante 5 min, después se leyó a 450nm (longitud de onda determinada para el fluorocromo acoplado al anticuerpo de detección) en el espectrofotómetro de placas *Xmark* marca Biorad.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Stock de trabajo de células troncales mesenquimales de cordón umbilical (CTMCU) ATCC.

Se realizó un stock celular de CTMCU de la casa comercial ATCC lote: PCS-500-010™ 63216949, aisladas a partir del tejido “Wharton’s jelly”, hasta el pase número 5 bajo las condiciones de cultivo estándar. Se muestran fotografías representativas del cultivo celular en la figura 9.

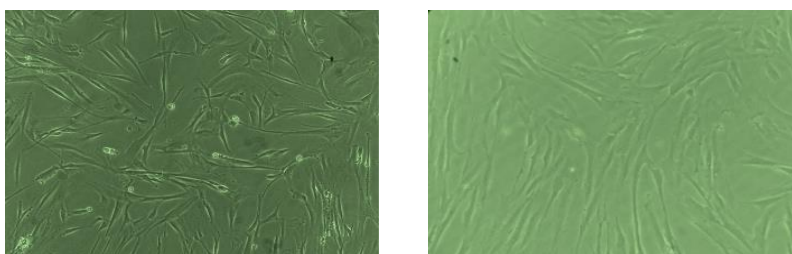


Figura 9. Células troncales mesenquimales de cordón umbilical.

8.1.1. Análisis de viabilidad con hesperidina

No se observaron efectos citotóxicos ni proliferativos notorios a ninguna de las dosis probadas.

La figura 10 muestra fotografías del crecimiento de las células bajo las distintas dosis. La morfología celular no presenta cambios representativos.

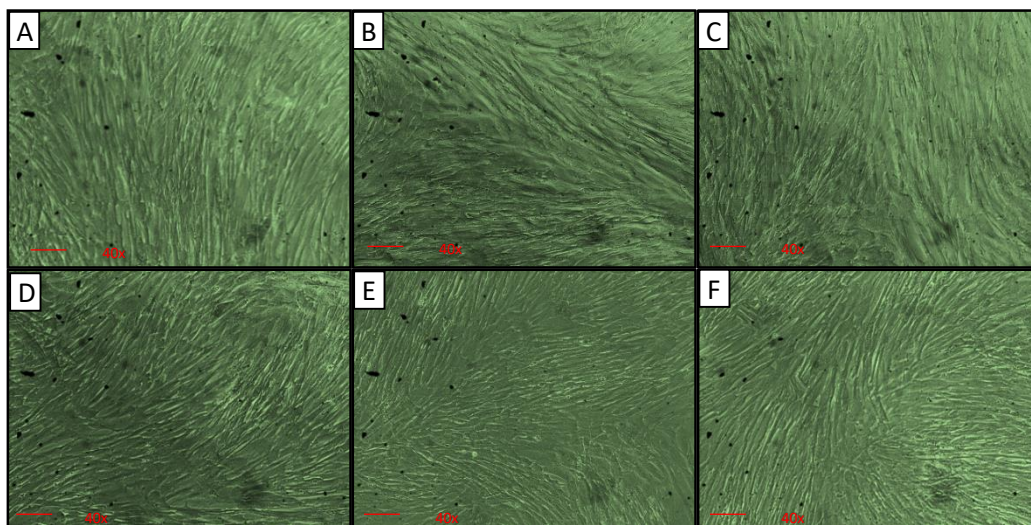


Figura 10. Curva de viabilidad de hesperidina en células MSC de cordón umbilical. A) Células control sin hesperidina; B) Células con hesperidina 0.1 μ M; C) Células con hesperidina 1.0 μ M; D) Células con hesperidina 10 μ M; E) Células con hesperidina 100 μ M; F) Células con hesperidina 1000 μ M.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los gráficos de citometría (figura 11) muestran que a distintas dosis no se observan diferencias entre las poblaciones celulares vivas y muertas, puesto que se mantiene un porcentaje estable de células vivas del 97-98% en las diferentes concentraciones (Figura 12).

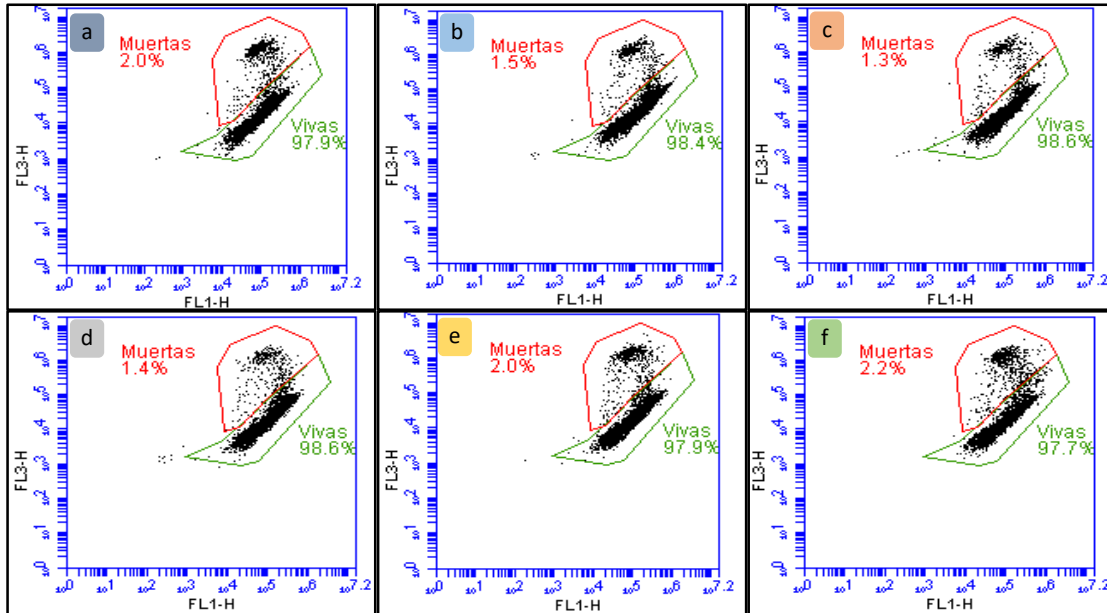


Figura 11. Análisis por citometría de curva de viabilidad de hesperidina en células MSC de cordón umbilical. A) Células control sin hesperidina; B) Células con hesperidina 0.1 μM ; C) Células con hesperidina 1.0 μM ; D) Células con hesperidina 10 μM ; E) Células con hesperidina 100 μM ; F) Células con hesperidina 1000 μM .

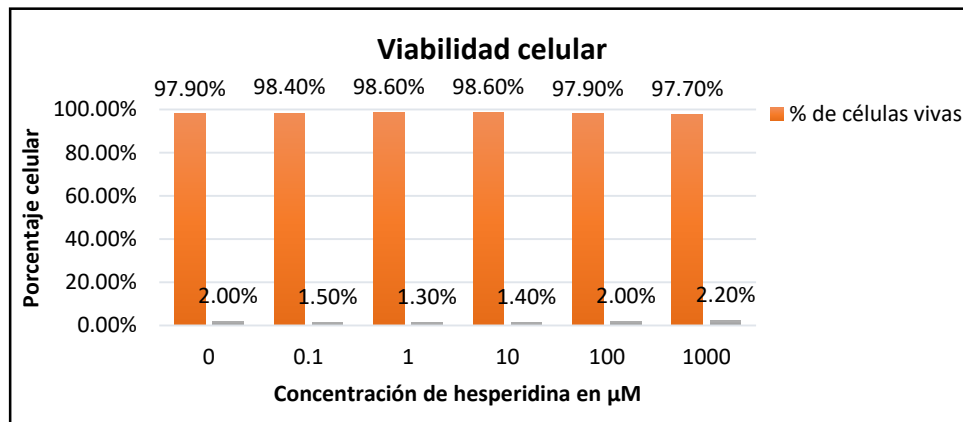


Figura 12. Porcentaje de viabilidad celular.

8.2. Identificación y caracterización de las células obtenidas

8.2.1. Búsqueda y selección de iniciadores

Los resultados de la búsqueda en la base de datos primerblast de NCBI de los iniciadores elegidos se muestran en la tabla 10.

Gen	Referencia de mRNA NCBI	Secuencias		Amplicón	% GC		Tm prom.
		F	R				
Ngn3	NM_020999	TGTGGGTGCTAAGGGTAAGG	GGCCTAAAATGAGCGCACTT	240	55	50	59
Pax4	NM_006193	CCCACCTAAAGCCTGTCTCA	AGGACGGTAAGGACAATGGG	243	55	55	59
Notch1	NM_017617.4	CTACCTGTCAGACGTGGCCT	CGCAGAGGGTTGTATTGGTT	357	60	50	60
MafA	NM_201589	CTTCAGCAAGGAGGAGGTCA	TTGTACAGGTCCCGCTCTTT	195	55	50	59
Nkx 6.1	NM_006168	CTGGAGAAGACTTTCGAACAA	AGAGGCTTATTGTAGTCGTCG	239	43	48	57
Pax6	NM_000280	GTCAGGCTTCGCTAATGGGC	CAAAGACACCACCGAGCTGA	460	60	55	61
Insulin	NM_000207	AGCCTTTGTGAACCAACACC	GCTGGTAGAGGGAGCAGATG	245	50	60	59
Pdx1	NM_000209	TCCTACAGCACTCCACCTTG	ACTGGCATCAATTTACGGG	227	55	50	59
Glut2	NM_000340	GGTTTGTAACTTATGCCTAAG	GCCTAGTTATGCATTGCAG	211	38	47	53
Gapdh	NM_001256799.2	AGAAGGCTGGGGCTCATT	AGGGGCCATCCACAGTCT	258	56	61	59

Tabla 10. Características de iniciadores seleccionados.

8.2.2. Estandarización de condiciones de la PCR para los iniciadores

Se realizaron las PCR con los iniciadores seleccionados a partir de muestras de DNA genómico (DNAg) de células de CU, además de RNA total de páncreas humano (RNAh) a diferentes Tm. Se corrieron las reacciones en un gel de agarosa al 2% con voltaje de 70v por 70 minutos. En la tabla 11 se muestran las Tm óptimas de los genes de interés.

Tabla 11. Tm óptimas de los iniciadores

Genes	DNAg	RNAh
MafA	57	57
Nkx 6.1	57	59
Insulin	55	59
Pdx1	57	59
Glut2	55	59
Ngn3	57	57
Pax4	57	57
Notch1	57	59
GAPDH	55	57

8.2.3. Análisis de marcadores de tipo mesenquimal de CTMCU expuestas a hesperidina.

El análisis inicial de las células de CTMCU en fase 5 arrojaron los siguientes resultados: para CD90 un 91.3%, para CD44 94.5%, CD105 83.5 % y para CD73 88.2% (Figura 13 A, B, C y D); mientras tanto, las células expuestas a un periodo de tiempo de 13 días solo a la hesperidina, pierden significativamente los marcadores de tipo mesenquimal, presentando sólo un 12% para CD90, 14.5% para CD105 y aproximadamente un 1.2 % para CD73 (Figura 13 E y F).

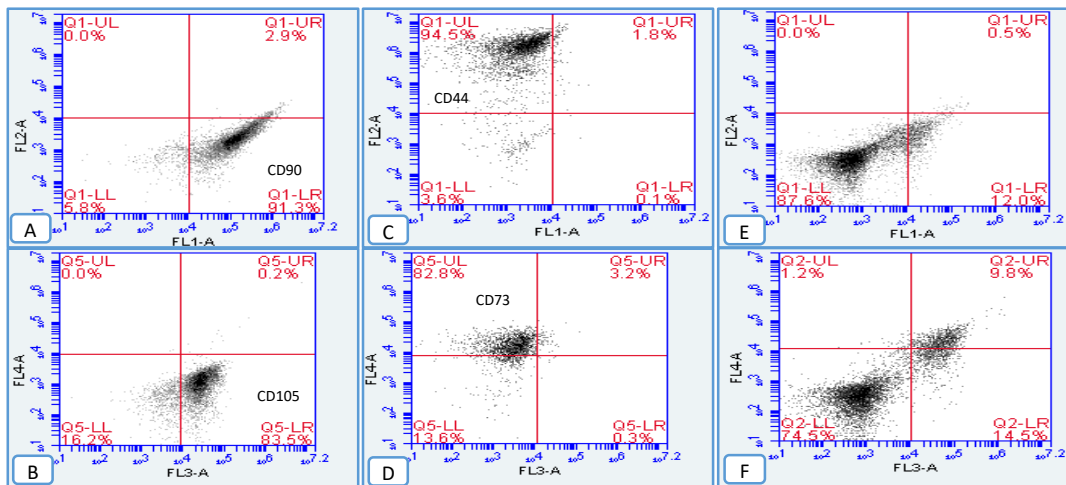


Figura 13. Marcadores característicos de MSC. FL1=CD90, FL2=CD44, FL3=CD105 y FL4=CD73. A), B), C) y D) células de CU antes de la exposición a hesperidina A) CD90; B) CD 105; C) CD44 y D) CD73. Células de CU después de la exposición a hesperidina después del tratamiento con la hesperidina en células de CU C) y D) Cocktail de Marcadores MSC CD73, CD90 y CD105.

8.2.4. Análisis de insulina intracelular

Después del proceso de diferenciación, se realizó un análisis para verificar la presencia de insulina intracelular y analizar la influencia de la hesperidina sobre dicho proceso.

Los resultados más relevantes se presentan en la figura 14. Se analizaron los distintos tratamientos para elegir el mejor y así realizar un análisis comparativo respecto con el protocolo modificado de Samani et al 2015 (tratamiento 2).

En la figura 14 se observa en el histograma A el control negativo, el cual tiene la función de ofrecer información sobre la auto-fluorescencia celular y posibles interferencias inespecíficas, con base en este control se delimita el punto de partida

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

para verificar el desplazamiento hacia la derecha de los histogramas, de tal forma que nos indique el porcentaje de población celular positiva para insulina. Los siguientes histogramas, muestran la positividad para insulina de las células sometidas al proceso de diferenciación con los diferentes tratamientos resaltando el tratamiento 3 (histograma D) como mejor tratamiento para la producción de insulina intracelular respecto al tratamiento 2 o protocolo modificado de Samani et al 2015, resumiendo los resultados en la tabla 12.

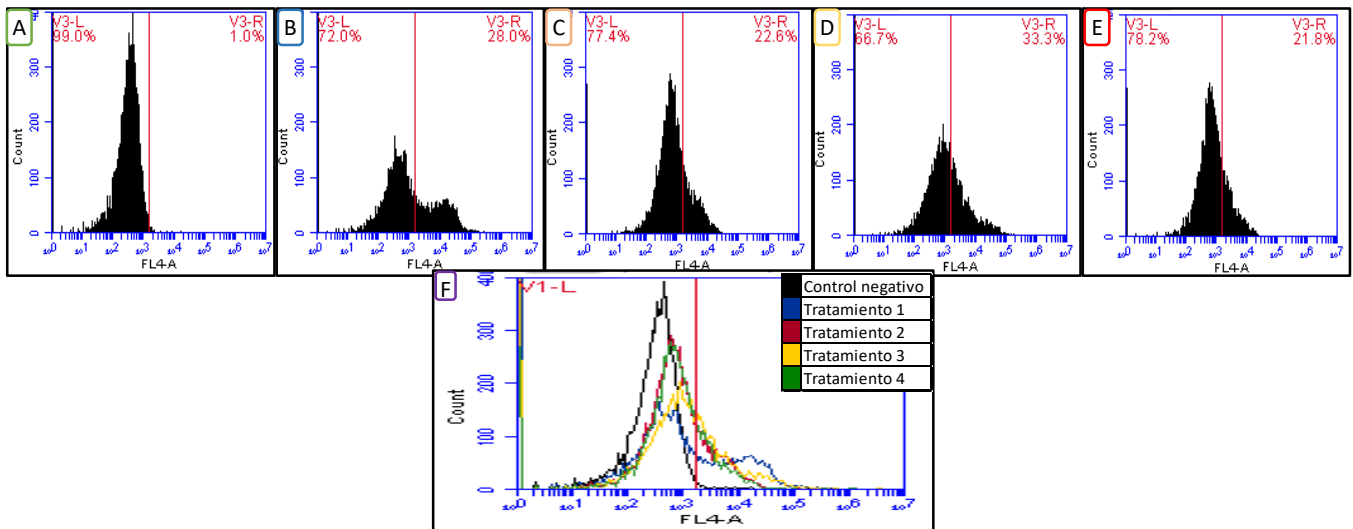


Figura 14. 1° Análisis de insulina intracelular por tratamiento. A) Células indiferencias (CTMCU); B) Tratamiento 1; C) Tratamiento 2; D) Tratamiento 3; E) Tratamiento 4; F) Comparación de los distintos tratamientos vs control negativo.

Tabla 12. Análisis preliminar de insulina intracelular.

Tratamientos	Intensidad fluorescencia				
	CTMCU	Tx1	Tx2	Tx3	Tx4
Experimento preliminar	1.0%	28.0%	22.6%	33.3%	21.8%

Se decidió hacer una segunda diferenciación del tratamiento que mostró el mayor índice insulina intracelular (Tx3) para aumentar el número de réplicas al igual que el protocolo modificado de Samani et al 2015 (Tx2). Los resultados se muestran a continuación en la figura 15 y tabla 13.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

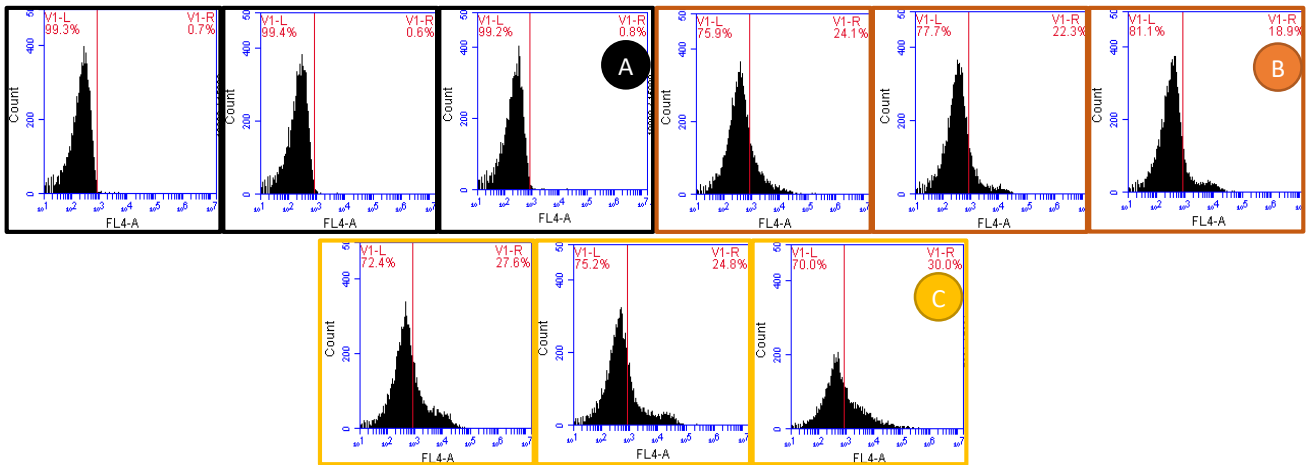


Figura 15. 2° Análisis de insulina intracelular por tratamiento con 3 réplicas. A) Células indiferencias control negativo (CTMCU); B) Tratamiento 2; C) Tratamiento 3.

Tabla 13. 2° Análisis de insulina intracelular con 3 réplicas: Tratamiento control (Tx2) vs Mejor tratamiento con hesperidina (Tx3).

Tratamientos Réplicas	Intensidad fluorescencia		
	CTMCU control negativo	Tx2 tratamiento control	Tx3 tratamiento con hesperidina
1 (preliminar)	1.0%	22.6%	33.3%
2	0.39 %	21.19 %	22.01 %
3	0.22 %	20.15 %	19.93 %
4	0.35 %	16.66 %	26.41 %

Se realizó un análisis estadístico *t* de student con un valor de $p= 0.152875$ determinando que no había diferencias significativas entre el grupo control y el de hesperidina, aunque existe la tendencia a aumentar la producción de insulina intracelular al agregar la hesperidina.

8.2.5. Análisis de expresión de mRNA por densidad relativa.

Se muestran los resultados de la densidad relativa de los mRNA expresados tanto del protocolo modificado de Samani et al 2015 (Tx2) y del mejor protocolo con hesperidina (Tx3), respecto a la producción de insulina intracelular, por etapas en la tabla 14.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 14. Densidad relativa de mRNA.

Etapa	mRNA	Densidad relativa	Etapa	mRNA	Densidad relativa	Etapa	mRNA	Densidad relativa
PCet1	GAPDH	1.000	PCet1	MafA	0.669	PCet1	Nkx6.1	0.000
PCet2	GAPDH	1.000	PCet2	MafA	0.000	PCet2	Nkx6.1	0.706
PCet3	GAPDH	1.000	PCet3	MafA	0.304	PCet3	Nkx6.1	0.000
PHet1	GAPDH	1.000	PHet1	MafA	0.000	PHet1	Nkx6.1	0.000
PHet2	GAPDH	1.000	PHet2	MafA	0.000	PHet2	Nkx6.1	0.000
PHet3	GAPDH	1.000	PHet3	MafA	1.304	PHet3	Nkx6.1	0.781
PCet1	Glut2	1.331	PCet1	Pdx1	1.354	PCet1	Notch1	0.759
PCet2	Glut2	0.000	PCet2	Pdx1	0.723	PCet2	Notch1	0.863
PCet3	Glut2	0.224	PCet3	Pdx1	0.447	PCet3	Notch1	0.362
PHet1	Glut2	1.414	PHet1	Pdx1	2.650	PHet1	Notch1	0.913
PHet2	Glut2	0.599	PHet2	Pdx1	2.235	PHet2	Notch1	1.234
PHet3	Glut2	0.000	PHet3	Pdx1	1.472	PHet3	Notch1	0.663
PCet1	Ins	0.746	PCet1	Ngn3	0.741	PCet1	Pax4	0.000
PCet2	Ins	1.771	PCet2	Ngn3	1.012	PCet2	Pax4	0.486
PCet3	Ins	2.000	PCet3	Ngn3	0.318	PCet3	Pax4	0.373
PHet1	Ins	0.971	PHet1	Ngn3	0.648	PHet1	Pax4	0.000
PHet2	Ins	1.129	PHet2	Ngn3	0.000	PHet2	Pax4	0.465
PHet3	Ins	0.695	PHet3	Ngn3	0.859	PHet3	Pax4	0.000

PCet1 (Tx2 etapa 1); PCet2 (Tx2 etapa 2); PCet3(Tx2 etapa 3); PHet1 (Tx3 etapa1) PHet2 (Tx3 etapa 2); PHet3 (Tx3 etapa 3).

Se muestra a continuación la expresión de los mRNA, en las figuras 16-21, por etapas del protocolo modificado de Samani et al 2015 y del tratamiento 3, así como el análisis comparativo durante el proceso de diferenciación figuras 22-24.

Protocolo modificado de Samani et al 2015 (Tx2).

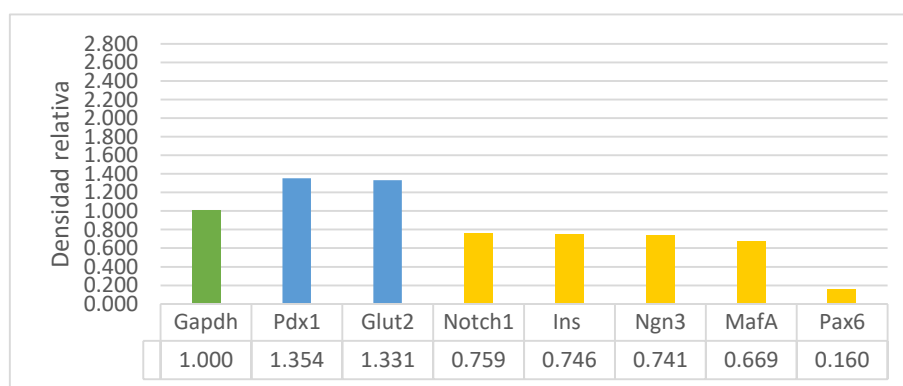


Figura 16. Densidad relativa de mRNA de etapa 1 (Tx2). Verde=endógeno; azul=mayor que endógeno; amarillo=menor que endógeno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

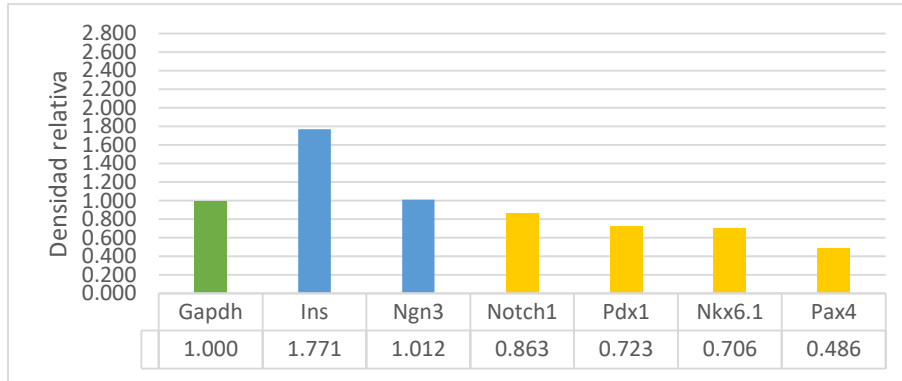


Figura 17. Densidad relativa de mRNA de etapa 2 (Tx2). Verde=endógeno; azul=mayor que endógeno; amarillo=menor que endógeno.

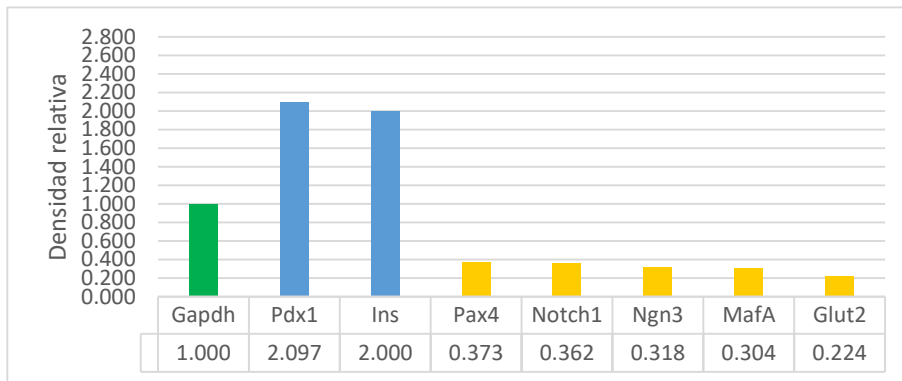


Figura 18. Densidad relativa de mRNA de etapa 3 (Tx2). Verde=endógeno; azul=mayor que endógeno; amarillo=menor que endógeno.

Tratamiento 3 (Protocolo con hesperidina 10 μ M y 2% SBF).

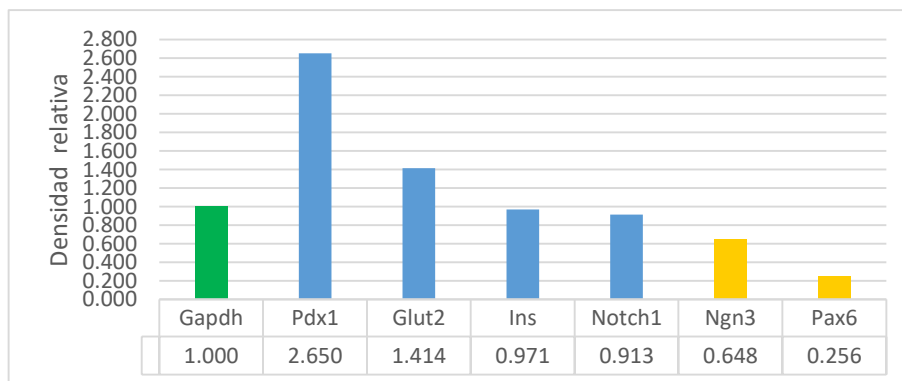


Figura 19. Densidad relativa de mRNA de etapa 1 (Tx3). Verde=endógeno; azul=mayor que endógeno; amarillo=menor que endógeno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

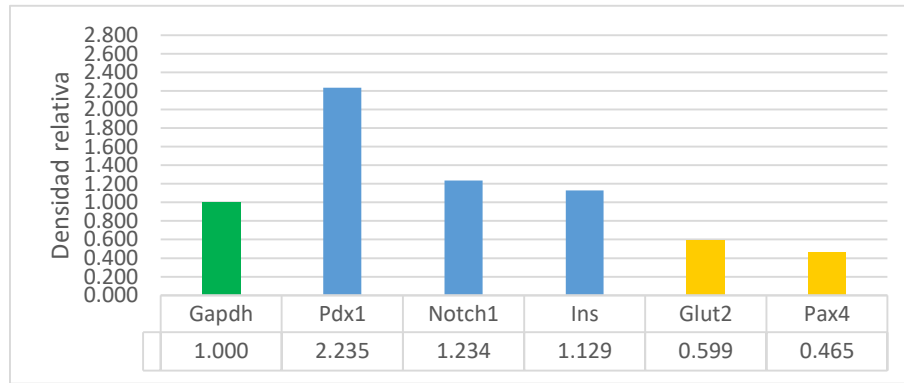


Figura 20. Densidad relativa de mRNA de etapa 2 (Tx3). Verde=endógeno; azul=mayor que endógeno; amarillo=menor que endógeno

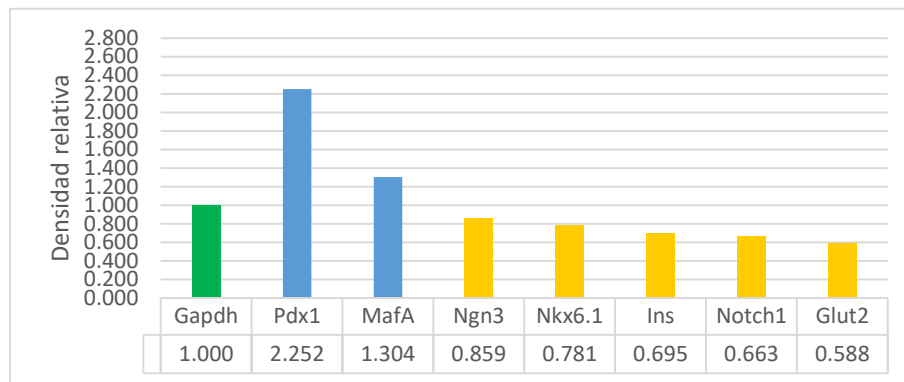


Figura 21. Densidad relativa de mRNA de etapa 3 (Tx3). Verde=endógeno; azul=mayor que endógeno; amarillo=menor que endógeno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis comparativo por etapas: Control vs Hesperidina.

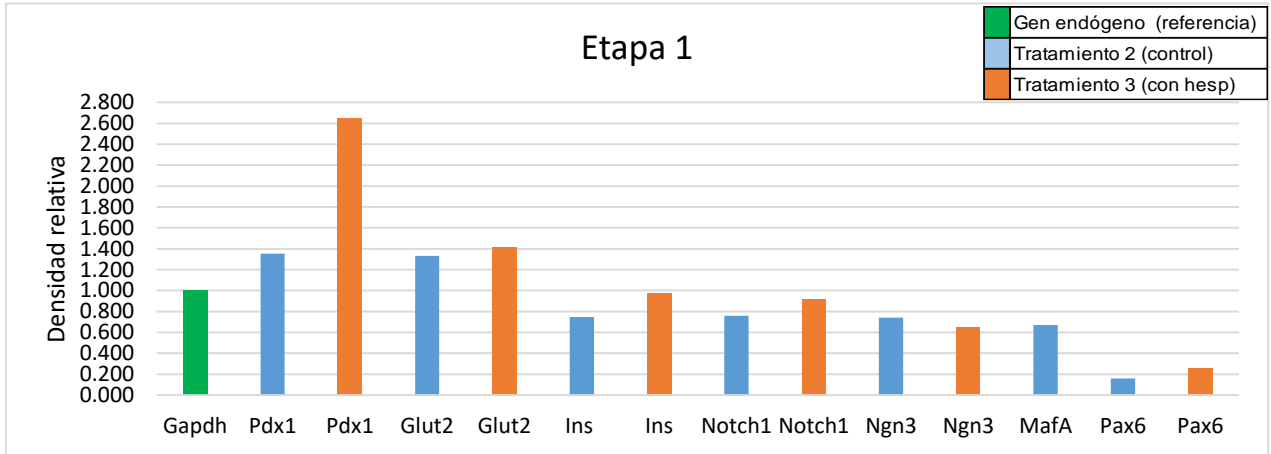


Figura 22. Densidad relativa de genes de etapa 1 Tx2 vs Tx3.

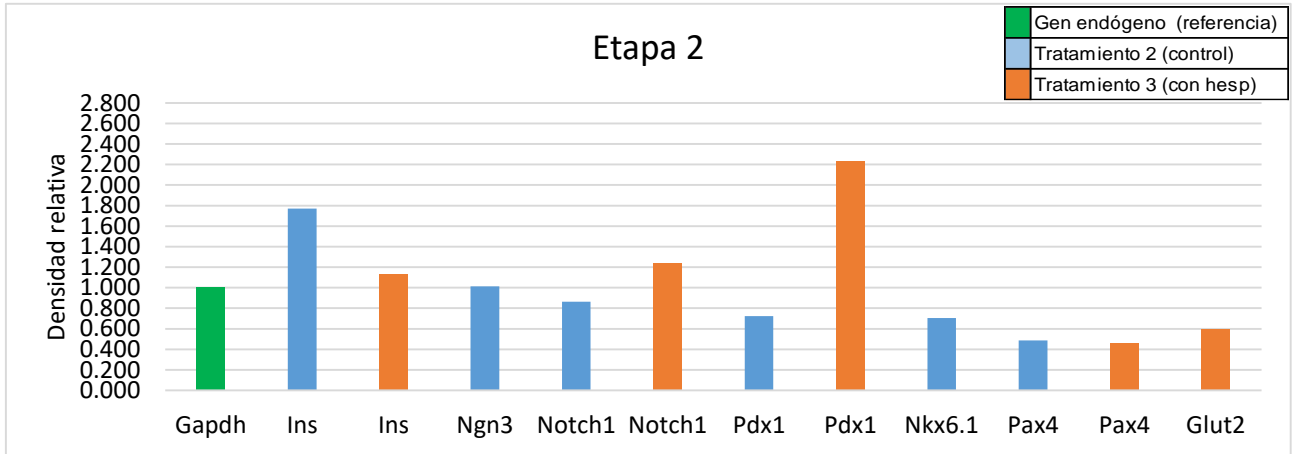


Figura 23. Densidad relativa de genes de etapa 2 Tx2 vs Tx3.

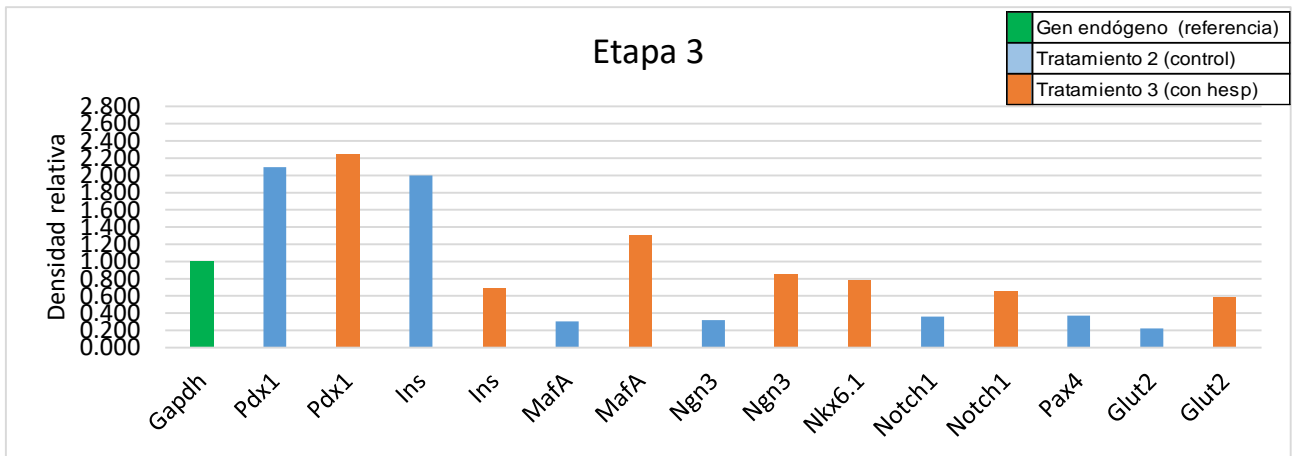


Figura 24. Densidad relativa de genes de etapa 3 Tx2 vs Tx3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.2.6. Análisis de insulina excretada al medio

Se realizó un análisis del sobrenadante de la última etapa de los tratamientos control (Tx2), del tratamiento con hesperidina (Tx3), de CMTCU con hesperidina y de CTMCU con su medio basal comercial (control negativo); efectuado con un aproximado de 5×10^5 células mediante una prueba de ELISA estandarizada (al menos tres réplicas). La curva de calibración tuvo un R^2 de 0.9911 y los datos se muestra a continuación en $\mu\text{UI}/\text{mL}$. El control negativo no se muestra en la tabla puesto que mostró un resultado de 0 similar al de las CTMCU con hesperidina.

Se realizó un análisis estadístico *t* de student y determino con un valor de $p=0.0422863$ que son diferentes los grupos diferenciados con y sin hesperidina, mostrando una mejor excreción al agrega la hesperidina.

Tabla 15. Insulina extracelular

Grupo		Insulina $\mu\text{UI}/\text{mL}$	Promedio	DE
CTMCU con hesperidina	sin glucosa	0.00	0.00	0.00
	sin glucosa	0.00		
	sin glucosa	0.00		
	con glucosa	0.00	0.00	0.00
	con glucosa	0.00		
	con glucosa	0.00		
Protocolo modificado de Samani et al 2015 (sin hesperidina)	Tx2 sin glucosa	94.43	86.10	24.49
	Tx2 sin glucosa	99.55		
	Tx2 sin glucosa	100.8		
	Tx2 con glucosa	125.2	137.98	20.31
	Tx2 con glucosa	154.6		
	Tx2 con glucosa	155.9		
Protocolo con hesperidina	Tx3 Sin glucosa	411.8	322.06	86.02
	Tx3 Sin glucosa	240.1		
	Tx3 Sin glucosa	314.4		
	Tx3 Con glucosa	985.6	651.69	297.62
	Tx3 Con glucosa	414.3		
	Tx3 Con glucosa	555.2		

DISCUSIÓN

En los últimos años, las terapias de reemplazo celular para la DM, especialmente para la DM tipo 1, han recibido mayor atención, surgiendo terapias como el trasplante de islotes, puesto que se ha discutido que podría librar a muchos pacientes de utilizar inyecciones de insulina y de someterse a otras terapias convencionales, sin embargo no existen suficientes donadores para obtener de ellos los islotes correspondientes, además el paciente puede correr el riesgo de rechazar el trasplante, aunque cabe mencionar que con ciertas inmunoterapias se ha logrado independencia de insulina exógena en al menos 5 años (Bellin et al., 2012). Recientemente la "terapia celular" se ha caracterizado por utilizar injertos de células o tejidos para tratar enfermedades o lesiones. Los objetivos de las terapias con células troncales suelen centrarse en el reemplazo celular, es decir, la sustitución de las células dañadas por células nuevas y funcionales obtenidas *in vitro* o bien, mediante el enriquecimiento ambiental, con la finalidad de apoyar la regeneración de algún órgano o tejido dañado.

El potencial de diferenciación de CTMCU del tejido de gelatina de Wharton, le otorgan el fácil acceso u obtención, mayor proporción de células mesenquimales en comparación a la sangre del cordón las hace eficientes candidatas para ser utilizadas en la diferenciación de células productoras de insulina. En este trabajo, sometimos a las CTMCU a un proceso de diferenciación en el que se incluyó la molécula hesperidina, con el fin de obtener células productoras de insulina.

Para la diferenciación celular se implementó el protocolo de diferenciación reportado por Samani & Ebrahimi 2015; este protocolo fue modificado para adaptarlo a las moléculas que contaba el equipo de trabajo siendo los cambios N2 y laminina por ITS y GLP1, añadiendo al proceso la molécula hesperidina. Previamente se realizó una búsqueda de protocolos de diferenciación reportados por autores como Feng Gao; Kevin Lynch; Mehdi Kadvar entre otros; sin embargo los puntos de referencia para para la selección del protocolo se basaron en los reportes de la producción de insulina de dichos autores ya que, tratamos de optimizar el proceso de obtención de la hormona verificando el efecto inductor de la hesperidina en la diferenciación, por

lo que se seleccionó como base el protocolo de Samani & Ebrahimi, 2015 ya que reporta una producción de insulina de 660 $\mu\text{UI}/\text{mL}$ de las CPI, mayor reportada en contraste con otros autores, contaba además con una menor cantidad de moléculas de diferenciación y de días para el proceso (13 días de diferenciación) por ello se tomó este protocolo como base.

La hesperidina, molécula que se incluyó en el protocolo de diferenciación, es un glucósido-flavonona, que está formado por una aglicona y un disacárido de rutinosa, entre sus efectos reportados se encuentra su potencial antioxidante, ya que ejerce protección contra los radicales libres en distintos órganos como lo menciona Yogeeta O. *et al.* 2014 por consecuente protegería a las células β de daño tanto en su membrana como sus componentes intracelulares debido a los radicales libres generados por procesos metabólicos propios de la célula. Otra de las características que nos llevó a incluir esta molécula en la diferenciación, fue porque los flavonoides y sus metabolitos tienen la capacidad de intervenir en la ruta de la fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI3K), la proteína cinasa Akt activada por mitógenos y ruta de las MAP cinasas, así como las vías de señalización de Wnt/ β -catenina, estas vías interactúan en las transiciones secundaria y terciaria de la maduración de las células β pancreáticas, de acuerdo con autores como Nones *et al.* en el 2011.

Antes de someter a las células al proceso de diferenciación, se colocaron en cultivo expuestas solamente a la hesperidina por un período de 13 días, este experimento se realizó con el objetivo de conocer si las células sufrían daño que impidiera su sobrevivencia por la adición de la hesperidina durante el tiempo que duraría el protocolo de diferenciación. Además, se probaron diferentes dosis de la hesperidina desde 0.1 μM hasta 1000 μM , dentro de las cuales está la reportada como inductor y utilizada en el proyecto (10 μM), se observó que se mantuvo un porcentaje estable del 97-98% de células vivas. Por lo que concluimos que la hesperidina, a las concentraciones evaluadas, no causa daño ni propicia la muerte de las células. Según Zhang J, y col. en el 2007, el potencial antioxidante de la hesperidina protege a las células del estrés causado por especies reactivas de oxígeno, prolongando así su viabilidad.

Después de la exposición a la hesperidina y adicional al análisis de la viabilidad celular, se realizó un análisis por citometría de flujo con el fin de estudiar si la molécula *per se* ocasionaba un cambio en la morfología celular, así como también verificar cambios fenotípicos respecto de los marcadores típicos de las CTMCU. Se observó que las células mantuvieron su morfología original, sin embargo, los porcentajes de expresión de los marcadores de tipo mesenquimal disminuyeron aproximadamente un 80% , por lo que concluimos que la hesperidina por si sola induce cambios en la población celular respecto a cambios fenotípicos celulares, por lo que es posible que este efecto sea favorable debido a que en conjunto con las moléculas de diferenciación utilizadas para guiar a las células hacia células tipo β pancreáticas, podríamos esperar que incremente la cantidad de células inducidas hacia la madurez como productoras de insulina. So Yeon Kim y colaboradores en el 2013, reportaron que células troncales mesenquimales del ligamento periodontal expuestas a la hesperitina y un cocktail de moléculas pertinentes inducía fuertemente a las células a formar linajes osteoblásticos, la hesperitina orilló a responder a factores de crecimiento exógenos ante altas concentraciones de glucosa en el medio. Debido a los resultados obtenidos en nuestro estudio y a estos antecedentes podríamos deducir que la hesperidina podría actuar como un inductor de la pérdida de algunos marcadores mesenquimales de membrana.

El proceso de diferenciación se llevó a cabo en tres etapas con medios especialmente formulados para la inducción de las células según el protocolo referencia modificado de Samani & Ebrahimi 2015, en cada una de ellas se colocó la hesperidina en una dosis de $10\mu\text{M}$, ya que previamente So Yeon Kim y colaboradores en el 2013, reportaron que a esta dosis la hesperitina (metabolito de la hesperidina) actuaba como inductor de la diferenciación osteoblástica.

El análisis para verificar la presencia de insulina intracelular y analizar la influencia de la hesperidina sobre dicho proceso, así como elegir un tratamiento repetible para el análisis molecular posterior. Con el objetivo de limitar la concentración de SBF utilizado en el protocolo, tomando en cuenta lo reportado por algunos autores en diversos protocolos como D'Amour *et al*; 2006 y Suresh K. 2014 un aspecto importante para optimizar la obtención de células productoras de insulina es limitar

la inclusión de moléculas ajenas a factores provenientes de origen humano, es por ello que para nuestro estudio se formaron cuatro grupos, (Tx1, Tx2, Tx3 y Tx4) en donde las diferencias entre los grupos se basó en variaciones enfocadas a la concentración de SBF y la presencia de hesperidina tal como se describe en el apartado de metodología y resultados; concluimos que el Tx3, arrojó una concentración de insulina intracelular mayor a los demás grupos, pero no significativamente diferentes respecto al análisis estadístico con un valor de $p < 0.05$; del Tx3, (grupo de células con 2% de SBF y con 10 μM hesperidina) podemos concluir que disminuir la concentración de SBF beneficia el desarrollo de las células, por otra parte la presencia de hesperidina respecto al protocolo modificado de Samani et al 2015 sugiere que aumenta la producción de insulina intracelular, por ello se decidió implementar réplicas de este tratamiento para compararlo con el protocolo modificado de Samani et al 2015 o referencia. Inferimos que la hesperidina actuó protegiendo a las células del estrés oxidativo causado por la inducción de la diferenciación con el cocktail de moléculas que conforman el medio de diferenciación para la obtención de células productoras de insulina. Este hallazgo propiciará el estudio de la hesperidina sobre la proliferación y las vías de señalización con las que pudiese estar interactuando durante el proceso de obtención de células tipo pancreáticas, ya que hasta hoy no se han encontrado reportes que sugieran un posible mecanismo.

Posteriormente realizamos el análisis molecular del proceso de diferenciación en cada etapa mostró la expresión de genes característicos de cada una de las etapas. El análisis molecular para las células sometidas al protocolo modificado de Samani et al 2015 (referencia sin hesperidina) mostró lo siguiente:

En la primera etapa de la diferenciación, se observó una expresión de genes como Pdx-1, Glut2, Notch1, Ins, Ngn3, MafA, y Pax6, donde, respecto al gen endógeno, en este caso Gapdh, se observó una mayor expresión principalmente de Pdx-1 y Glut2. Se sabe que Pdx-1 es indispensable en la formación de mesoendodermo pancreático por lo que podríamos deducir que la diferenciación en esta etapa se llevó a cabo de manera correcta según los reportes de Maria E. Wilson y colaboradores en el 2003, ya que cuando se activa Pdx-1, regula junto con el factor

de crecimiento fibroblástico la sensibilidad a la glucosa, expresando el transportador Glut2 y los procesos de conversión de la proinsulina para etapas de madurez posteriores según lo reportado por Takeuchi H. en el 2014.

En la segunda etapa de la diferenciación, se observó una expresión de genes como Ins, Ngn3, Notch1, Pdx-1, Nkx6.1 y Pax4, donde, respecto al gen endógeno, se observó una mayor expresión principalmente de Ins y Ngn3.

Las células que expresan Ngn3, son encaminadas a formar precursores endócrinos, de acuerdo con hallazgos de Desgraz y Herrera en el 2009, bajo este panorama observamos que estos reportes coinciden con nuestros resultados en el proceso. Se sabe que en el desarrollo de cada tipo celular existe una competencia de precursores endócrinos para producir diferentes tipos de células endócrinas según Jiang J. y colaboradores en el 2007, quienes describieron dicho proceso. Se han realizado estudios de diferenciación *in vitro* donde se ha observado que los precursores endócrinos Ngn3+ pueden diferenciarse en células productoras de hormonas, debido a ello podemos decir que las células en esta segunda etapa posiblemente formen eficazmente precursores endócrinos.

En la tercera etapa de la diferenciación, se observó una expresión de genes como Pdx-1, Ins, Pax4, Notch1, Ngn3, MafA y Glut2, donde, respecto al gen endógeno, se observó una mayor expresión principalmente de Pdx-1 e Ins. Según lo reportado por Pan y Wright en el 2011, estos factores de transcripción se activan para la madurez de la célula y son denominados factores de asignación de linaje endócrino específico como célula productora de insulina.

La expresión de Pdx-1 además de su papel en la derivación inicial de las células primitivas formadoras de tejido pancreático, es también requerida para la especialización de las células productoras de insulina, por lo que podemos inferir que la diferenciación de las células de cordón hacia productoras de insulina se llevó de forma correcta.

Respecto al tratamiento experimental con hesperidina podemos observar que existen diferencias en cada una de las etapas contra el protocolo modificado de Samani et al 2015 (referencia sin hesperidina) respecto a la expresión semi-

cuantitativa que arroja el análisis por densidad relativa, es decir, en la primera etapa donde respecto al gen endógeno, se observó una mayor expresión principalmente de Pdx-1, Glut2 e Ins. La expresión del gen de insulina en la primera etapa, cuando se coloca la hesperidina podría obedecer a que esta molécula estimula la activación de vías de señalización implicadas en este desarrollo, como lo reporta So Yeon Kim y colaboradores 2013, ya que ellos han sugerido la participación de la vía Wnt / β -catenina (vía canónica) además de la PI3k/Akt, en la regulación del desarrollo de las células β .

Por otra parte, en la segunda etapa del proceso de diferenciación, observamos que en el protocolo con hesperidina, además de mostrar una mayor expresión del gen de Ins, se observa también Pdx-1 y Notch. Según lo reportado por Xu-Yan Li y colaboradores en el 2015, el bloqueo de la vía de señalización Notch causa diferenciación prematura de las células progenitoras multipotentes (MPCs) en las células endocrinas, en este caso al observar la expresión de Notch podríamos inferir que las células han progresado hacia la segunda etapa, sin embargo la hesperidina podría impedir el bloqueo lateral de la vía de señalización Notch, puesto que una serie de estudios han puesto de manifiesto que la señalización de Notch funciona como un regulador negativo del factor pro-endocrino neurogenina3 (Ngn3), del cual en este tratamiento y en esta etapa ya no se observa expresión.

Para la tercera etapa en el tratamiento con hesperidina observamos una mayor expresión de Pdx-1 y MafA. Diversos autores como Pan y Wright en el 2011 reportan que el gen Pdx1 es requerido para la especialización de las células productoras de insulina, por otra parte, el gen MafA induce la transcripción de insulina en las células que han alcanzado la madurez, según Van Der Meulen y colaboradores en el 2014. Sin embargo, en este tratamiento a diferencia del protocolo modificado de Samani et al 2015 o de referencia, no nos fue posible captar el mensajero de Ins, inferimos que las células “maduras” podrían requerir un estímulo externo para la activación de la producción de insulina para hacer evidente la observación de este gen puesto que ya han generado vesículas de insulina.

Respecto al último análisis sobre la excreción de insulina pudimos observar un aumento de la misma en el protocolo con hesperidina en comparación al protocolo referencia modificado de Samani 2015, de casi 5 veces mayor y muy similar a lo reportado por Samani & Ebrahimi, 2015, probablemente debido a que la hesperidina pudo haber actuado de distintas formas para proteger y coadyuvar a madurar a las células para una producción de insulina mayor; podríamos inferir, respecto a lo reportado por varios investigadores (Garg, Garg, Zaneveld, & Singla, 2001; Huang et al., 2012) que primeramente al ser un polifenol, es un excelente antioxidante que protege a las células de las especies reactivas de oxígeno generadas por el estrés del medio y del propio metabolismo celular como OH_2 , NO, OH $^-$; en segundo lugar, la hesperidina y su principal metabolito (Hesperetina) se han visto implicados en varias vías de señalización que protegen a la célula en ambientes de estrés como la activación de PI3k/Akt, por ejemplo en isquemias de varios tejidos (Rong et al., 2013) y de daño neuronal en receptores de insulina (IRS) y de transportadores de glucosa (GLUTs) (Huang et al., 2012), vía que también activan la laminina y fibronectina mediante la fosforilación de dominios de unión al IRS, éstas moléculas son usadas también para la diferenciación a células productoras de insulina (Lin et al., 2010). Cabe resaltar que al igual que otros trabajos de producción de estas células tipo β faltaría analizar por qué expulsan la insulina en medios sin glucosa, (Elghazi & Bernal-Mizrachi, 2009) casi de forma similar al que contiene glucosa, es decir, observamos que a pesar de la presencia de este factor o en su ausencia, las células obtenidas expulsan insulina, por lo que probablemente deberíamos probar diferentes vehículos para diluir la glucosa con la que se estimulan las células ya diferenciadas debido a que la liberación de la insulina, además del principal control (glucosa en sangre), puede ser sensible a otros compuestos como aminoácidos o ácidos grasos debido a la influencia de algunos iones como Na, Ca, K etc., sin embargo, hasta este punto podemos inferir que la principal causa de este fenómeno podría deberse a la falta de “madurez” en las células diferenciadas para que sea capaz de sensar la glucosa, es decir, que a determinada concentración de insulina extracelular, la célula cuente con la capacidad de responder proporcionalmente desencadenando una respuesta de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

liberación de insulina necesaria para el metabolismo de la glucosa en diversos órganos; así como un microambiente propicio de regulación para verificar la respuesta hacia un estímulo propicio para la respuesta de los receptores de insulina.

9. CONCLUSIONES

La hesperidina en contacto con las células provoca que éstas pierdan marcadores de superficie característicos de células mesenquimales, lo que se sugiere que esta molécula promueve cambios fenotípicos celulares de las mismas y en conjunto con las moléculas de diferenciación se podría inducir una mayor tasa de células diferenciadas, sin embargo, es necesario estudiar a nivel molecular los cambios que la hesperidina propicia en el contacto con las células tanto indiferenciadas como diferenciadas para discernir el efecto exacto que ésta induce.

La hesperidina mostro la expresión de genes como Pdx1, Nkx6.1 y MafA; por lo que concluimos que estos genes esenciales para la diferenciación de células endócrinas y que son indicadores de madurez y funcionalidad de la célula productora de insulina podrían ser inducidos por la exposición de las células a la hesperidina.

La hesperidina podría actuar como un factor estimulante para propiciar en el protocolo de diferenciación un aumento de los niveles de insulina intracelular y la insulina excretada ante un estímulo de glucosa respecto al protocolo modificado de Samani et al. 2015.

Como conclusión general se obtuvo que la hesperidina favoreció la producción de insulina de las CPI obtenidas cumpliendo así la hipótesis del proyecto.

10. PERSPECTIVAS

- Verificar el grado de madurez de las células productoras de insulina obtenidas (genes de funcionalidad, vesículas de insulina cristalizada, verificar potencial de membrana, etc.)
- Realizar repeticiones del ensayo de ELISA de las CPI con estímulo de glucosa.
- Realizar reto de glucosa a diferentes concentraciones para corroborar su capacidad de regulación.
- Retarlas frente a células β primarias (biopsias).
- Probar las CPI obtenidas en un microambiente 3D o modelos *in vivo*.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Afelik, S., & Jensen, J. (2013). Notch signaling in the pancreas: Patterning and cell fate specification. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 2(4), 531–544. <https://doi.org/10.1002/wdev.99>
- Agrawal, Y. O., Sharma, P. K., Shrivastava, B., Ojha, S., Upadhya, H. M., Arya, D. S., & Goyal, S. N. (2014). Hesperidin Produces Cardioprotective Activity via PPAR- γ Pathway in Ischemic Heart Disease Model in Diabetic Rats. *PLoS ONE*, 9(11), e111212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111212>
- Altucci, L., & Gronemeyer, H. (2001). The promise of retinoids to fight against cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 1(3), 181–193. <https://doi.org/10.1038/35106036>
- Ang, S. L., Wierda, a, Wong, D., Stevens, K. a, Cascio, S., Rossant, J., & Zaret, K. S. (1993). The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins. *Development (Cambridge, England)*, 119(4), 1301–1315. <https://doi.org/8306889>
- Antona, B. L., Cenador, G. M., Ledesma, S. M., López, R. R., Olave, M. S., Fernández, C. F., ... Centeno, L.-V. A. (2014). Regeneración ósea por medio de células madre en combinación con β -fosfato tricálcico Bone regeneration using stem cells in combination with β -tricalcium phosphate carrier, 25(4), 237–244. Retrieved from <https://www.mapfre.com/fundacion/html/revistas/trauma/v25n4/docs/Articulo9.pdf>
- Apelqvist, a, Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D. J., Honjo, T., ... Edlund, H. (1999). Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature*, 400(6747), 877–881. <https://doi.org/10.1038/23716>
- Arman, E., Haffner-Krausz, R., Chen, Y., Heath, J. K., & Lonai, P. (1998). *Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. Developmental Biology* (Vol. 95). Retrieved from www.pnas.org.
- Barbera, A., & Gasa, R. (2008). Desarrollo embrionario del páncreas y regeneración en el páncreas adulto. In *El Islote Pancreático en el Desarrollo y Tratamiento de la Diabetes* (pp. 125–137).
- Bellin, M. D., Barton, F. B., Heitman, A., Harmon, J. V., Kandaswamy, R., Balamurugan, A. N., ... Hering, B. J. (2012). Potent Induction Immunotherapy Promotes Long-Term Insulin Independence After Islet Transplantation in Type 1 Diabetes. *American Journal of Transplantation*, 12(6), 1576–1583. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03977.x>
- Bhushan, A., Itoh, N., Kato, S., Thiery, J. P., Czernichow, P., Bellusci, S., & Scharfmann, R. (2001). Fgf10 is essential for maintaining the proliferative

- capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development*, (128/24). Retrieved from <http://paperity.org/p/44991818/fgf10-is-essential-for-maintaining-the-proliferative-capacity-of-epithelial-progenitor>
- Bilezikjian, L. M., Corrigan, A. Z., & Vale, W. (1990). Activin-a modulates growth hormone secretion from cultures of rat anterior pituitary cells. *Endocrinology*, 126(5), 2369–2376. <https://doi.org/10.1210/endo-126-5-2369>
- Böttcher, R. T., & Niehrs, C. (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocrine Reviews*, 26(1), 63–77. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0040>
- Cai, J., Yu, C., Liu, Y., Chen, S., Guo, Y., Yong, J., ... Deng, H. (2010). Generation of homogeneous PDX1+ pancreatic progenitors from human ES cell-derived endoderm cells. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2(1), 50–60. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjp037>
- Cerf, M. E. (2013). B cell dysfunction and insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology*, 4(MAR). <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00037>
- Chiang, M. K., & Melton, D. A. (2003). Single-cell transcript analysis of pancreas development. *Developmental Cell*, 4(3), 383–393. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00035-2)
- Comité de la 8va edición de Diabetes Atlas. (2017). *Diabetes Atlas. Federación Internacional de Diabetes* (Vol. 8). <https://doi.org/2-930229-80-2>
- D'Amour, K. A., Bang, A. G., Eliazzer, S., Kelly, O. G., Agulnick, A. D., Smart, N. G., ... Baetge, E. E. (2006). Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 24(11), 1392–1401. <https://doi.org/10.1038/nbt1259>
- Desgraz, R., & Herrera, P. L. (2009). Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors, 3574, 3567–3574. <https://doi.org/10.1242/dev.039214>
- Dessimoz, J., Opoka, R., Kordich, J. J., Grapin-Botton, A., & Wells, J. M. (2006). FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis *in vivo*. *Mechanisms of Development*, 123(1), 42–55. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2005.10.001>
- Deutsch, G., Jung, J., Zheng, M., Lóra, J., & Zaret, K. S. (2001). A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development (Cambridge, England)*, 128(6), 871–881.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

BIBLIOGRAFÍA

- Dupuis, J., Langenberg, C., Prokopenko, I., Saxena, R., Soranzo, N., Jackson, A. U., ... Barroso, I. (2010). New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nature Genetics*, *42*(2), 105–116. <https://doi.org/10.1038/ng.520>
- Elghazi, L., & Bernal-Mizrachi, E. (2009). Akt/PTEN: β -cell mass and pancreas plasticity. *Trends Endocrinol Metab*, *20*(5), 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.03.002>
- Escobar Jiménez, L. F., & Tébar Massó, F. J. (2009). *La Diabetes en la Práctica Clínica (eBook)*. (S. A. Editorial Médica Panamericana, Ed.) (1st ed.). Madrid.
- Fisher Scientific, T. (2014). Publication Number MAN0007313 B-27 © Supplement (50X). Retrieved from www.lifetechnologies.com
- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L. J. D., & Singla, A. K. (2001). Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*, *15*(8), 655–669. <https://doi.org/10.1002/ptr.1074>
- Geer, L. Y., Marchler-Bauer, A., Geer, R. C., Han, L., He, J., He, S., ... Bryant, S. H. (2010). The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Research*, *38*(suppl_1), D492–D496. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp858>
- Gibco. (2014). Insulin-Transferrin-Selenium Supplement (100X) Insulin-Transferrin-Selenium-A Supplement (100X) Insulin-Transferrin-Selenium-X Supplement (100X). *Life Technologies*. Retrieved from www.lifetechnologies.com/support
- Gimeno, M. L., Hyon, S. H. O., & Argibay, P. F. (2011). ARTICULO ESPECIAL TERAPIA CELULAR PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES : Plasticidad de las células madre Células madre mesenquimales, *1*, 267–273.
- Gittes, G. K. (2009). Developmental biology of the pancreas: A comprehensive review. *Developmental Biology*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.024>
- Greggio, C., De Franceschi, F., & Grapin-Botton, A. (2015). Concise Reviews: *In vitro*-Produced Pancreas Organogenesis Models in Three Dimensions: Self-Organization From Few Stem Cells or Progenitors. *STEM CELLS*, *33*(1), 8–14. <https://doi.org/10.1002/stem.1828>
- Guz, Y., Montminy, M. R., Stein, R., Leonard, J., Gamer, L. W., Wright, C. V., & Teitelman, G. (1995). Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in β cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development (Cambridge, England)*, *121*(1), 11–18.
- Guzmán-flores, J. M., & López-Briones, S. (2012). Células de la inmunidad innata y adaptativa en la diabetes mellitus tipo 2 y obesidad I introducción, 3–7. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2012/gm124f.pdf>
- Hart, A., Papadopoulou, S., & Edlund, H. (2003). Fgf10 maintains notch activation,

BIBLIOGRAFÍA

- stimulates proliferation, and blocks differentiation of pancreatic epithelial cells. *Developmental Dynamics*, 228(2), 185–193.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.10368>
- Hernandez Ávila, M., Gutierrez, J. P., & Reynoso Noverón, N. (2013). Diabetes mellitus en México: El estado de la epidemia. *Salud Pública de México*, 55(1), s129–s136. Retrieved from
http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342013000800009&nrm=iso
- Huang, S. M., Tsai, S. Y., Lin, J. A., Wu, C. H., & Yen, G. C. (2012). Cytoprotective effects of hesperetin and hesperidin against amyloid β -induced impairment of glucose transport through downregulation of neuronal autophagy. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56(4), 601–609.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201100682>
- Huotari, M. a, Palgi, J., & Otonkoski, T. (1998). Growth factor-mediated proliferation and differentiation of insulin-producing INS-1 and RINm5F cells: identification of β cellulin as a novel β -cell mitogen. *Endocrinology*, 139(4), 1494–9. <https://doi.org/10.1210/endo.139.4.5882>
- INEGI. (2013). Estadística a Propósito del Día Mundial de la Diabetes. *Día Mundial de La Diabetes.*, 18. Retrieved from <http://fmdiaabetes.org/wp-content/uploads/2014/11/diabetes2013INEGI.pdf>
- Inzucchi, S. E., & Majumdar, S. K. (2016). Current therapies for the medical management of diabetes. *Obstetrics and Gynecology*, 127(4), 780–794.
<https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001332>
- ISCT. (2018). ISCT Glossary - ISCT. Retrieved July 24, 2018, from <https://www.celltherapysociety.org/page/Glossary?&hhsearchterms=%22cellular+and+therapy%22#C>
- Jiang, J., Au, M., Lu, K., Eshpeter, A., Korbitt, G., Fisk, G., & Majumdar, A. S. (2007). Generation of Insulin-Producing Islet-Like Clusters from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 25(8), 1940–1953.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0761>
- Johansson, K. A., Dursun, U., Jordan, N., Gu, G., Beermann, F., Gradwohl, G., & Grapin-Botton, A. (2007). Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types. *Developmental Cell*, 12(3), 457–65.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.02.010>
- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., & Edlund, H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*, 371(6498), 606–609. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/371606a0>
- Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Gad, J. M., Tajima, Y., Taya, C., Kurohmaru, M., ... Hayashi, Y. (2002). Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development (Cambridge, England)*, 129(10), 2367–79. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11973269>

- Kim, S. Y., Lee, J.-Y., Park, Y.-D., Kang, K. L., Lee, J.-C., & Heo, J. S. (2013). Hesperetin Alleviates the Inhibitory Effects of High Glucose on the Osteoblastic Differentiation of Periodontal Ligament Stem Cells. *PLoS ONE*, 8(6), e67504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067504>
- Kitamura, T., Nakae, J., Kitamura, Y., Kido, Y., Biggs, W. H., Wright, C. V. E., ... Accili, D. (2002). The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic β cell growth. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(12), 1839—1847. <https://doi.org/10.1172/jci200216857>
- Kopinke, D., Brailsford, M., Pan, F. C., Magnuson, M. A., Wright, C. V. E., & Murtaugh, L. C. (2012). Ongoing Notch signaling maintains phenotypic fidelity in the adult exocrine pancreas. *Developmental Biology*, 362(1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2011.11.010>
- Kopp, J. L., Dubois, C. L., Schaffer, A. E., Hao, E., Shih, H. P., Seymour, P. A., ... Sander, M. (2011). Sox9+ ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas. *Development*, 138(4), 653–665. <https://doi.org/10.1242/dev.056499>
- Kumar, S., Alarfaj, A., Munusamy, M., Singh, A., Peng, I.-C., Priya, S., ... Higuchi, A. (2014). Recent Developments in β -Cell Differentiation of Pluripotent Stem Cells Induced by Small and Large Molecules. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 23418–23447. <https://doi.org/10.3390/ijms151223418>
- Lane, M. A., & Bailey, S. J. (2005). Role of retinoid signalling in the adult brain. *Progress in Neurobiology*, 75(4), 275–293. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.03.002>
- Lee, H. J., Lee, W. J., Chang, S. E., & Lee, G. Y. (2015). Hesperidin, a popular antioxidant inhibits melanogenesis via Erk1/2 mediated MITF degradation. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 18384–18395. <https://doi.org/10.3390/ijms160818384>
- Li, X., Hu, X., Wang, J., Xu, W., Yi, C., Ma, R., & Jiang, H. (2016). Short-Term Hesperidin Pretreatment Attenuates Rat Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Inhibiting High Mobility Group Box 1 Protein Expression via the PI3K/Akt Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(5), 1850–1862. <https://doi.org/10.1159/000447884>
- Li, X. Y., Zhai, W. J., & Teng, C. B. (2015). Notch signaling in pancreatic development. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms17010048>
- Lin, H.-Y., Tsai, C.-C., Chen, L.-L., Chiou, S.-H., Wang, Y.-J., & Hung, S.-C. (2010). Fibronectin and laminin promote differentiation of human mesenchymal stem cells into insulin producing cells through activating Akt and

-
-
- ERK. *Journal of Biomedical Science*, 17(1), 56. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-56>
- Liu, Z., Tanabe, K., Bernal-Mizrachi, E., & Permutt, M. A. (2008). Mice with β cell overexpression of glycogen synthase kinase-3 β have reduced β cell mass and proliferation. *Diabetologia*, 51(4), 623–31. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0914-7>
- López Arredondo, A. A., Barquera Cervera, S., González Cisneros, N., Montiel Ascencio, I. de J., Cruz Encarnación, L. M., Flota Larrañaga, A. M., & Morloy Sakkal, G. (2016). Asumiendo el control de la diabetes. México. *Fundación Mídete*, 1–56. Retrieved from http://oment.uanl.mx/wp-content/uploads/2016/11/FMidete_Asumiendo-Control-Diabetes-2016.pdf%0Axd
- Lu, L., Zhao, Q., Wang, X., Xu, Z., Lu, Y., Chen, Z., & Liu, Y. (2006). Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials, 91(8).
- Majumdar, S., & Srirangam, R. (2009). Solubility, Stability, Physicochemical Characteristics and *In vitro* Ocular Tissue Permeability of Hesperidin: A Natural Bioflavonoid. *Pharmaceutical Research*, 26(5), 1217–1225. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9729-6>
- Masiá Adalid, S. (2006). *Acciones del ácido retinóico en la diferenciación de células de neuroblastoma humano*. Servei de Publicacions Universitat de Valencia. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Mata-Miranda, M. M., Sánchez-Monroy, V., & Vázquez-Zapién, G. J. (2014). Investigación básica con células madre pluripotentes en la Escuela Médico Militar. *Basic Research with Pluripotent Stem Cells in the Military Medical School.*, 68(4), 233–237. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=97885275&lang=es&site=ehost-live>
- Mathers, C. D., & Loncar, D. (2006). Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*, 3(11), e442. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442>
- McGrath, K. E., Koniski, A. D., Maltby, K. M., McGann, J. K., & Palis, J. (1999). Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Developmental Biology*, 213(2), 442–456. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9405>
- Mendoza, K., Márquez, R., Donado, A., Echenique, O., Mendoza, D., Pérez, M., & Macias, V. (2005). Fundamentos biomoleculares de la diabetes mellitus. *Revista de La Facultad de Ciencias de Salud*, 2, 135–142.
- Musmann, R., Geese, M., Harder, F., Kegel, S., Andag, U., Lomow, A., ... Austen, M. (2007). Inhibition of GSK3 promotes replication and survival of pancreatic β cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(16), 12030–7.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M609637200>

- Nakajima, V. M., Madeira, J. V. J., Macedo, G. A., & Macedo, J. A. (2016). Biotransformation effects on anti lipogenic activity of citrus extracts. *Food Chemistry*, *197 Pt B*, 1046–1053. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.109>
- Nakanishi, M., Hamazaki, T. S., Komazaki, S., Okochi, H., & Asashima, M. (2007). Pancreatic tissue formation from murine embryonic stem cells *in vitro*. *Differentiation*, *75*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00109.x>
- Ninov, N., Borius, M., & Stainier, D. Y. R. (2012). Different levels of Notch signaling regulate quiescence, renewal and differentiation in pancreatic endocrine progenitors. *Development*, *139*(9), 1557–1567. <https://doi.org/10.1242/dev.076000>
- Nones, J., De Sampaio e Spohr, T. C. L., & Gomes, F. C. A. (2011). Hesperidin, a flavone glycoside, as mediator of neuronal survival. *Neurochemical Research*, *36*(10), 1776–1784. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0493-3>
- Norgaard, G. A., Jensen, J. N., & Jensen, J. (2003). FGF10 signaling maintains the pancreatic progenitor cell state revealing a novel role of Notch in organ development. *Developmental Biology*, *264*(2), 323–338. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.08.013>
- Olvera-Granados, C. P., Leo-Amador, G. E., & Hernández-Montiel, H. L. (2008). Páncreas y células β : mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina. ¿Regeneración? *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, *65*(4), 306–324.
- Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G., Macarthur, C. A., Coulier, F., ... Goldfarb, M. (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J.Biol.Chem.*, *271*(25), 15292–15297.
- Otonkoski, T., Beattie, G. M., Mally, M. I., Ricordi, C., & Hayek, A. (1993). Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells. *Journal of Clinical Investigation*, *92*(3), 1459–1466. <https://doi.org/10.1172/JCI116723>
- Pagliuca, F. W., Melton, D. A., Kato, S., Thiery, J. P., Czernichow, P., Bellusci, S., & Scharfmann, R. (2013). How to make a functional β -cell. *Development (Cambridge, England)*, *140*(12), 2472–83. <https://doi.org/10.1242/dev.093187>
- Pagliuca, F. W., Millman, J. R., Gürtler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J. H., ... Melton, D. A. (2014). Generation of functional human pancreatic β cells *in vitro*. *Cell*, *159*(2), 428–439. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.040>
- Pan, F. C., & Wright, C. (2011). Pancreas organogenesis: From bud to plexus to gland. *Developmental Dynamics*. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22584>
- Pham, P. Van, Vu, N. B., Pham, V. M., Truong, N. H., Pham, T. L.-B., Dang, L. T.-

- T., ... Phan, N. K. (2014). Good manufacturing practice-compliant isolation and culture of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 56. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-56>
- Pictet, R. L., Clark, W. R., Williams, R. H., & Rutter, W. J. (1972). An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Developmental Biology*, 29(4), 436–467. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(72\)90083-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(72)90083-8)
- Reyes Olivares, J. A., & Arellano Plancarte, A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(2), 9–18. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2008/reb081c.pdf>
- Rezania, A., Riedel, M. J., Wideman, R. D., Karanu, F., Ao, Z., Warnock, G. L., & Kieffer, T. J. (2011). Production of Functional Glucagon-Secreting [alpha]-Cells From Human Embryonic Stem Cells. *Diabetes*, 60(1), 239–47. <https://doi.org/10.2337/db10-0573.A.R>.
- Rong, Z., Pan, R., Xu, Y., Zhang, C., Cao, Y., & Liu, D. (2013). Hesperidin pretreatment protects hypoxia-ischemic brain injury in neonatal rat. *Neuroscience*, 255, 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.030>
- Rukstalis, J. M., & Habener, J. F. (2009). Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration. *Islets*, 1(3), 177–84. <https://doi.org/10.4161/isl.1.3.9877>
- Rutter, W. J., Kemp, J. D., Bradshaw, W. S., Clark, W. R., Ronzio, R. A., & Sanders, T. G. (1968). Regulation of specific protein synthesis in cytodifferentiation. *Journal of Cellular Physiology*, 72(1 S), 1–18. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040720403>
- Samani, F., & Ebrahimi, M. (2015). *In vitro* Differentiation of Human Umbilical Cord Blood CD133+ Cells into Insulin Producing Cells in Co-Culture with Rat Pancreatic Mesenchymal Stem Cells. *Cell Journal* (... , 133(June)). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4503835/>
- Sastre, J., Sabater, L., & Aparisi, L. (2005). INSUFICIENCIA PANCREÁTICA EXOCRINA. ¿CÓMO SE PRODUCE? ¿CUÁNDO Y CÓMO DIAGNOSTICARLA? ¿CÓMO TRATARLA? Fisiología de la secreción pancreática ESTRUCTURA DEL PÁNCREAS EXOCRINO. *Gastroenterol Hepatol*, 28(2), 3–9. Retrieved from <http://www.elsevier.es>
- Schaffer, A. E., Freude, K. K., Nelson, S. B., & Sander, M. (2010). Nkx6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors. *Developmental Cell*, 18(6), 1022–1029. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.015>
- Schwitzgebel, V. M., Scheel, D. W., Conners, J. R., Kalamaras, J., Lee, J. E., Anderson, D. J., ... German, M. S. (2000). Expression of neurogenin3 reveals

- an islet cell precursor population in the pancreas. *Development*, 127(16), 3533–3542.
- Secretaria de Salud México. Programa Sectorial de Salud (2013). Retrieved from http://conadic.salud.gob.mx/pdfs/sectorial_salud.pdf
- Seymour, P. A., & Sander, M. (2011). Historical perspective: beginnings of the β -cell: current perspectives in β -cell development. *Diabetes*, 60(2), 364–76. <https://doi.org/10.2337/db10-1068>
- Seymour, P. A., Shih, H. P., Patel, N. A., Freude, K. K., Xie, R., Lim, C. J., & Sander, M. (2012). A Sox9/Fgf feed-forward loop maintains pancreatic organ identity. *Development*, 139(18), 3363–3372. <https://doi.org/10.1242/dev.078733>
- Shih, H. P., Wang, A., & Sander, M. (2013). Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29(1), 81–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122405>
- Tanabe, K., Liu, Z., Patel, S., Doble, B. W., Li, L., Cras-Méneur, C., ... Permutt, M. A. (2008). Genetic deficiency of glycogen synthase kinase-3 β corrects diabetes in mouse models of insulin resistance. *PLoS Biology*, 6(2), e37. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060037>
- Thompson, N., Gésina, E., Scheinert, P., Bucher, P., & Grapin-Botton, A. (2012). RNA profiling and chromatin immunoprecipitation-sequencing reveal that PTF1a stabilizes pancreas progenitor identity via the control of MNX1/HLXB9 and a network of other transcription factors. *Molecular and Cellular Biology*, 32(6), 1189–99. <https://doi.org/10.1128/MCB.06318-11>
- Totsuka, Y., Tabuchi, M., Kojima, I., Shibai, H., & Ogata, E. (1988). A novel action of activin a: Stimulation of insulin secretion in rat pancreatic islets. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 156(1), 335–339. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)80845-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)80845-3)
- Uder, C., Brückner, S., Winkler, S., Tautenhahn, H. M., & Christ, B. (2018). Mammalian MSC from selected species: Features and applications. *Cytometry Part A*, 93(1), 32–49. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23239>
- Van der Meulen, T., & Huising, M. O. (2014). Maturation of stem cell-derived β -cells guided by the expression of urocortin 3. *The Review of Diabetic Studies : RDS*, 11(1), 115–32. <https://doi.org/10.1900/RDS.2014.11.115>
- Villasenor, A., Chong, D. C., Henkemeyer, M., & Cleaver, O. (2010). Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis. *Development*, 137(24), 4295–4305. <https://doi.org/10.1242/dev.052993>
- WHO. (2010). WHO | Diabetes mellitus. *WHO*. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/en/>

BIBLIOGRAFÍA

- Woodruff, T. K., & Mather, J. P. (1995). FEMALE REPRODUCTIVE AXIS.
- Yamaoka, T., Matsui, T., Yamaguchi, T., Moritani, M., Itakura, M., Yoshino, K., ... Noji, S. (2002). Transgenic expression of FGF8 and FGF10 induces transdifferentiation of pancreatic islet cells into hepatocytes and exocrine cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292(1), 138–143. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6601>
- Yu, F., Wei, R., Yang, J., Liu, J., Yang, K., Wang, H., ... Hong, T. (2018). FoxO1 inhibition promotes differentiation of human embryonic stem cells into insulin producing cells. *Experimental Cell Research*, 362(1), 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.11.022>
- Zhang, D., Jiang, W., Liu, M., Sui, X., Yin, X., Chen, S., ... Deng, H. (2009). Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Research*, 19(4), 429–438. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.28>
- Zhao, Y., Wang, H., & Mazzone, T. (2006). Identification of stem cells from human umbilical cord blood with embryonic and hematopoietic characteristics. *Experimental Cell Research*, 312(13), 2454–2464. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.04.008>

12. ANEXOS

12.1. PRODUCTOS ACADÉMICOS

- Efecto de la hesperidina en la diferenciación de células troncales mesenquimales de cordón umbilical (CTMCU) a células productoras de insulina (CPI).”. Memoria en extenso congreso IBQA de la UAG 2017 con registro ISBN: 978-607-719-008-0.
- Curso “Principios y aplicaciones del cultivo celular 3D” noviembre 2017 Uniparts.
- Plática “Tecnologías en investigación biomédica” septiembre 2017 Uniparts.
- Curso “Teórico-práctico de citometría de flujo con aplicaciones en la biotecnología médica e industrial” octubre 2016 BD México.