



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DEL EFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
NEURONAL (NGF) Y EL BR-AMPC, SOBRE LA
DIFERENCIACIÓN DE UNA LÍNEA TUMORAL DEL
CONDUCTO PANCREÁTICO (CAPAN-1)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

RAQUEL GENOVEVA CORTÉS RUIZ



DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA

2005



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

M340750



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Análisis del efecto del factor de crecimiento neuronal (NGF) y el BrAMPc, sobre la diferenciación de una línea tumoral del conducto pancreático (CAPAN-1)"

realizado por Raquel Genoveva Cortés Ruiz

con número de cuenta 9225661-5 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

Marcia Hiriart U.

Propietario

Dra. María Luisa Fanjul Peña

María Luisa Fanjul Peña

Propietario

Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal

Elsa Guadalupe Escamilla Chimal

Suplente

Q.F.B. María Elena Larrieta Carrasco

Suplente

Dr. Guillermo Robles Díaz

Guillermo Robles Díaz

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

Juan Manuel Rodríguez Chávez

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



*Jaya gurudeva amala avinasi
Jñanarupa antara ke vasi
Paga-paga para dete prakāsa
jaise kīrane dinakara kī.*

*"Salutaciones, divino Guru, puro, indestructible,
que habitas dentro de nosotros, en forma de conocimiento,
iluminando cada paso como los rayos del sol."*

*Jaya Gurumayi
Jaya Ediel.*

DEDICATORIAS

A mis Padres:

Por su amor, ejemplo, paciencia y apoyo. Con todo mi amor.

A mi hermano y a mis primos:

Por hacerlo más divertido.

A mi tía Vicky:

Por su paciencia y enseñanzas. Y por las clases de inglés y francés.

A las familias Ruiz y Cortés:

Por su paciencia y aliento.

A Carlitos:

Por tu apoyo, aliento y amor.

A Susanita:

Por tu gran amistad. Gracias nena.

A Sandy:

Por tantos momentos de angustia, diversión y por nuestra amistad.

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia:

Por su dirección como asesora y por su apoyo.

A mis compañeros de laboratorio:

Por su apoyo, compañía y por su tiempo.

A Elena:

Por su tiempo, apoyo y guía.

A Cris y Ma. Carmen:

Por su cariño y su guía.

A mis sinodales:

Por revisar y corregirme este trabajo.

Al personal del Instituto de Fisiología Celular:

Por proporcionarnos con su trabajo lo necesario para nuestras investigaciones.

A la Biol. María del Carmen Sánchez Soto:

Por su cotutoría en la realización de este trabajo.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Arquitectura del páncreas	1
1.2 Desarrollo del páncreas	3
1.3 Interacciones entre el mesodermo y el endodermo en el desarrollo del páncreas	4
1.4 Algunos factores que modifican la diferenciación y proliferación de las células pancreáticas	6
1.5 Células progenitoras pancreáticas	9
1.6 Efectos de algunos factores sobre la diferenciación celular en la línea tumoral (CAPAN-1)	10
1.7 Los análogos permeables del AMPc modifican la respuesta a algunos factores de crecimiento	11
1.8 Efectos funcionales del AMPc	12
1.9 Regulación de la expresión de genes	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
3. HIPÓTESIS	13
4. OBJETIVO GENERAL	13
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS	14
6.1 Cultivo y mantenimiento de la línea celular CAPAN-1	14
6.2 Obtención de una subclona de la línea celular CAPAN-1 y tratamientos con algunos factores de crecimiento	15
6.3 Inmunocitoquímica de amilasa e insulina de las células resistentes a Br-AMPc	15
6.4 Extracción y Cuantificación de RNAm	16
6.5 Análisis de datos	17
7. RESULTADOS	17
7.1 Obtención de una subclona de la línea CAPAN-1 con resistencia al Br-AMPc	17
7.2 Efecto del Br-AMPc y los factores de crecimiento sobre la expresión de insulina y amilasa en una subclona de células CAPAN-1	19
7.3 Regulación del mensajero de amilasa por Br-AMPc, NGF, FGF y TGF β	21

8. DISCUSIÓN	22
9. CONCLUSIONES	24
10. LITERATURA CITADA	24

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Arquitectura del páncreas

El páncreas de los mamíferos es una glándula de secreción mixta constituida por dos porciones: la endocrina y la exocrina. La porción endocrina del páncreas, está formada por los islotes pancreáticos (de Langerhans) que se encuentran embebidos en el tejido acinar y comprenden aproximadamente el 2 % de la masa total del páncreas (Fig. 1A) (Peters et al., 2000).

Los islotes pancreáticos están constituidos por 4 tipos celulares diferentes (Fig. 1B). Las células β (B), secretan insulina y constituyen cerca del 70% del islote. En los roedores están localizadas preferentemente al centro del islote y en menor proporción en la periferia donde hacen contacto con otros tipos celulares (Hiriart, 1997). La secreción de insulina por las células β juega un papel importante en la homeostasis de la glucosa sanguínea. Además de esta proteína, las células β también producen y secretan amilina, ácido gama amino butírico (GABA) y el factor de crecimiento neuronal (NGF) (Hiriart, 1997).

En la periferia del islote se encuentran las células α (A), secretoras de glucagon, que constituyen cerca del 15% del volumen insular. El glucagon actúa principalmente sobre las células hepáticas y produce un aumento en la glucemia (Hiriart, 1997).

Los otros tipos celulares que forman los islotes pancreáticos son las células D (delta) y PP, que secretan somatostatina y polipéptido pancreático respectivamente, las células D conforman el 5 % de los islotes y las células PP conforman aproximadamente del 1 al 5 % del islote pancreático (Fig. 1B) (Hiriart, 1997).

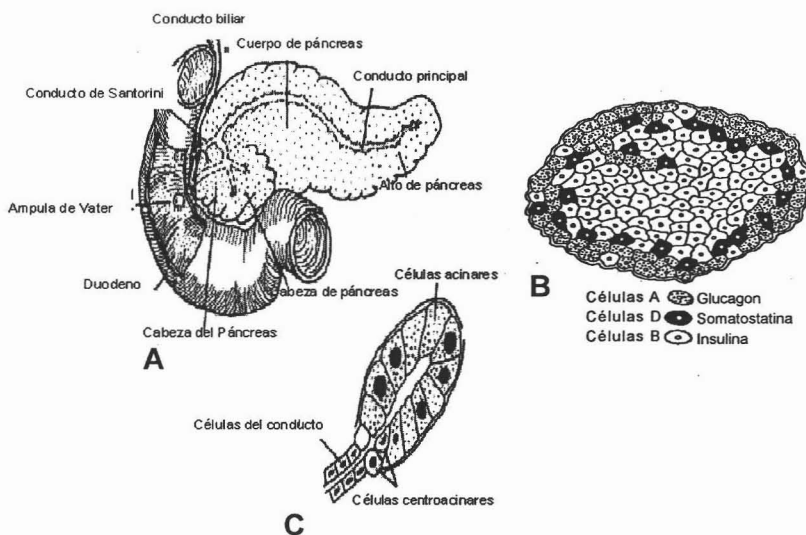


Fig.1 A. Anatomía del páncreas humano (Modificado de Githens, 1988). B. Islote pancreático de mamífero y los tipos celulares que lo conforman (Modificado de Hiriart, 1997) C. Histología de un acino pancreático (Modificado de Githens, 1988).

La porción exocrina del páncreas está conformada por el tejido acinar y el sistema de conductos, comprende aproximadamente el 98% del páncreas en el mamífero adulto. Las células exocrinas se organizan en acinos pancreáticos, donde cada célula se encuentra localizada de tal forma, que los gránulos de enzimas digestivas que producen son secretados hacia el duodeno a través del sistema de conductos pancreáticos. Este sistema es esencial para la función exocrina del páncreas y constituye el 14% del tejido exocrino en humanos y el 11% en ratas (Githens, 1988).

El sistema está formado por una red de conductos de tejido epitelial (Fig. 2) que parten de los denominados intercalados, que se convierten sucesivamente en los intralobulARES, interlobulARES y finalmente en un conducto principal que conduce las secreciones de los acinos pancreáticos hacia duodeno (Fig. 1C) (Egerbacher y Bock, 1997).

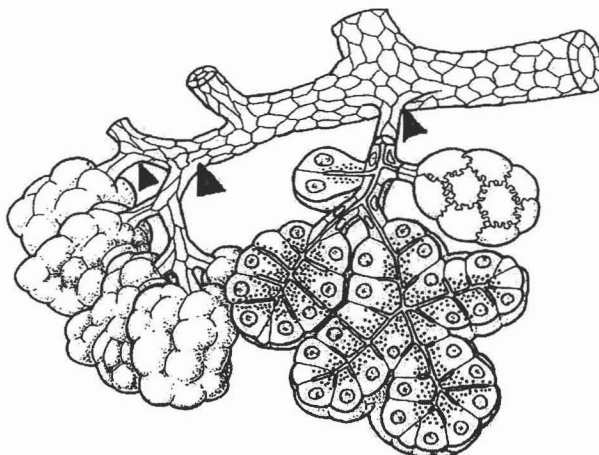


Fig. 2. Representación esquemática del sistema de conductos del páncreas de rata. Las flechas señalan los racimos de los conductos interlobulares e intralobulares que se encuentran intercalados en los acinos pancreáticos (Tomado de Githens, 1988).

Los conductos pancreáticos secretan bicarbonato de sodio que junto con las secreciones de enzimas digestivas de los acinos pancreáticos, participan en la digestión de los alimentos (Githens, 1988). Una de las principales enzimas secretadas por los acinos pancreáticos y relevante para este trabajo, es la amilasa.

La amilasa pertenece al grupo de las hidrolasas, ya que hidroliza las moléculas de almidón, es decir, rompe al azar los enlaces α -(1-4) introduciendo una molécula de H_2O hasta obtener glucosa o maltosa (Madsen et al., 1996). Otras enzimas digestivas secretadas por los acinos pancreáticos son la carboxipeptidasa y la lipasa (Githens, 1988).

1.2 Desarrollo del páncreas

El páncreas se origina del endodermo, a partir de dos yemas primordiales una dorsal y otra ventral, las cuales geman a partir del epitelio duodenal. La primera se origina directamente desde la pared duodenal hacia el día 9.5 de vida intrauterina (viu) en rata.

La ventral puede considerarse como una rama independiente de la yema hepática y se le puede distinguir a partir del día 10.5 de viú (Kim y Hebrok, 2001; Spooner et al., 1970). Posteriormente, la rotación del intestino permite la fusión de la yema ventral y el orificio hepatopancreático con la yema dorsal (Slack, 1995).

La yema ventral pancreática da lugar a la cabeza del páncreas, mientras que la yema dorsal forma al resto del órgano. El conducto ventral se fusiona con la parte distal del conducto dorsal para formar el conducto pancreático principal y la parte proximal del conducto dorsal hace un pequeño accesorio de éste. Los conductos pancreáticos están claramente diferenciados a partir del día 14.5 de viú (Slack, 1995).

1.3 Interacciones entre el mesodermo y el endodermo en el desarrollo del páncreas

Las señales entre el endodermo y el mesodermo son importantes para la diferenciación celular, la morfogénesis y el desarrollo de muchos órganos, entre ellos del hígado y el páncreas (Kim et al., 1997). Algunos estudios proponen que en este intercambio de información participan ciertos factores de crecimiento como los factores de crecimiento fibroblástico (FGF), los cuales regulan la activación de factores de transcripción específicos. En el páncreas se ha postulado que el FGF2, promueve principalmente la activación de dos vías, necesarias para el desarrollo de dicho órgano, la vía Delta y la vía de Notch, de donde se destaca la expresión de Pdx1, que es un factor de transcripción necesario para la diferenciación de las células pancreáticas y posteriormente para la maduración de las células β (Kim et al., 1997).

Además del FGF2, también se ha postulado la participación del factor de crecimiento transformante β (TGF β) y de la activina- β B. En algunos estudios se ha detectado que ambos factores son secretados por la notocorda hacia la yema dorsal del páncreas en etapas muy tempranas del desarrollo (Kim y Hebrok, 2001) (Fig. 3).

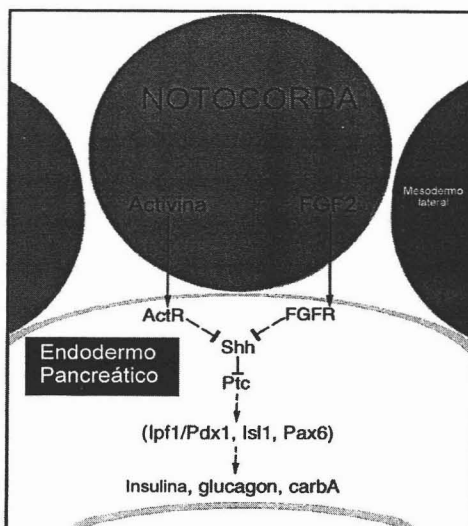


Fig. 3 Señales intracelulares durante el desarrollo del páncreas. (Modificado de Kim y Hebrok, 2001).

Por otro lado, se ha observado que el desarrollo del páncreas exocrino se lleva a cabo sólo si se activa la vía de Notch, la cual comienza con la expresión del gene Hes-1 (Hairy and Enhancer-of-split) y con éste la activación de otros genes como p48 y PTF1 (Edlund, 2001) (Fig.4).

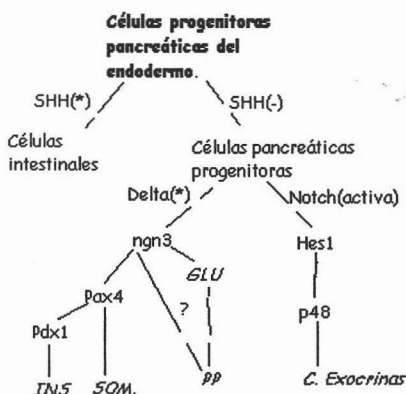


Fig. 4 Vías de señalización que se activan durante el desarrollo del páncreas. (Modificada de Edlund, 2001).

1.4 Algunos factores que modifican la diferenciación y proliferación de las células pancreáticas

Los factores de crecimiento son péptidos producidos en diversas células y órganos, que modifican numerosos aspectos celulares como, la división celular, la sobrevivencia, la diferenciación funcional y morfológica y la migración de los tipos celulares sobre los cuales actúan. Estos péptidos son hidrofílicos e interactúan con los receptores membranales en las células blanco, y desencadenan cascadas de señales dentro de las células que dependen del tipo de factor de crecimiento y del tipo celular (Rosenbaum, 1997).

Dentro de estos factores existen algunos que intervienen en la diferenciación y proliferación de las células pancreáticas como: los factores de crecimiento parecidos a insulina (IGF-I y II), la betacelulina (BTC), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la gastrina, el NGF, el FGF, y el TGF β , los tres últimos son relevantes para este proyecto por lo que son más ampliamente descritos.

El NGF es un factor trófico importante en el desarrollo, mantenimiento y sobrevivencia de neuronas sensoriales y simpáticas (Levi-Montalcini, 1987). El NGF es una proteína de 130 kDa y está formado por tres subunidades (2α , 1β , 2γ). El proNGF en la glándula submaxilar tiene esas 3 subunidades, la subunidad activa es la 1β y es la que utilizamos en este trabajo.

El NGF es el ligando de dos tipos de receptores, uno de alta afinidad denominado TrkA que tiene actividad de cinasa de tirosina, y otro de baja afinidad llamado p75 (Sutter et al., 1979). Estos receptores son importantes para el desarrollo del páncreas, ya que si se inhibe la activación de TrkA con k252a, se observa un deterioro en la morfogénesis de los islotes pancreáticos de embriones de rata. Asimismo, se ha observado la expresión de TrkA en células de los conductos pancreáticos (Kanaka-Gantenbein et al., 1995).

El NGF también actúa sobre las células β de rata adulta. En estas células, el NGF induce

cambios morfológicos y fisiológicos, como la extensión de procesos citoplasmáticos de tipo neuritas. Este efecto del NGF es potenciado por un análogo permeable del AMPc (dbAMPc) (Vidaltamayo et al., 1996). El NGF incrementa la secreción de insulina y las corrientes de sodio y calcio en las células β aisladas (Rosenbaum et al., 1996; 2001).

El NGF es producido y secretado por las células β pancreáticas. Al igual que la insulina, el NGF es liberado por las células β en respuesta a un aumento en la concentración extracelular de glucosa (Rosenbaum et al., 1998). En células β normales de humano se observó la expresión de NGF y TrkA mediante técnicas de inmunocitoquímica (Vidaltamayo et al., 2003).

Los FGFs (FGF1-18) pertenecen a una familia de al menos 19 péptidos que transmiten señales mitogénicas, angiogénicas y morfogénicas durante el desarrollo fetal y neonatal, por medio de 4 receptores de alta afinidad designados FGFR1 - FGFR4, los cuales tienen actividad de cinasa de tirosina. Se conocen alrededor de 18 tipos de FGFs (Arany y Hill, 2000).

Los FGFs regulan la proliferación de las células exocrinas y endocrinas del páncreas (Kim y Hebrok, 2001). En estudios realizados en embriones de ratones deficientes del receptor FGFR-2, se observó una reducción del número de células acinares y la pérdida de islotes pancreáticos (Celli et al., 1998).

En estudios en islotes pancreáticos aislados de rata adulta y de humano, se observó que los receptores FGFR-1 y FGFR-2 se expresan en células epiteliales del conducto pancreático y durante el desarrollo de los islotes. Asimismo, en cortes de rata, en etapa fetal, se observó una alta expresión del FGFR-4 durante el desarrollo de los islotes pancreáticos (Arany y Hill, 2000).

En las células epiteliales de los conductos pancreáticos se han localizado la expresión de FGF 1 (ácido) y FGF 2 (básico) entre los días 10-14 del desarrollo intrauterino, lo cual sugiere que estos factores están implicados en la embriogénesis del islote pancreático.

También se ha demostrado que el FGF2, induce la proliferación de células epiteliales pancreáticas durante la vida embrionaria en ratones (Le Bras et al., 1998) y que tiene efectos mitógenos sobre los islotes pancreáticos aislados de rata. En ratas de 21 días de vida se observó la expresión de dicho factor en la porción exocrina del páncreas mediante técnicas inmunohistoquímicas. En humanos existen evidencias de que el FGF2 es expresado en el páncreas durante la edad adulta (Arany y Hill, 2000).

En cuanto al FGF1, se ha observado que se expresa en el páncreas exocrino de rata y se sugiere que tiene un efecto mitógeno en los islotes pancreáticos aislados (Arany y Hill, 2000).

En nuestro laboratorio se ha demostrado que los FGF (1 y 2) inducen cambios morfológicos y fisiológicos en células β aisladas. Estos cambios se caracterizan por la extensión de prolongaciones citoplasmáticas tipo neuritas. Al igual que con el NGF, este efecto se potencia con el dbAMPc (Vidaltamayo et al., 1996).

El FGF2 aumenta la secreción de insulina de células β de rata adulta, después de 5 días en cultivo. Esto sugiere que el FGF mantiene en óptimas condiciones a las células β para la secreción de insulina (Hiriart et al., 2001).

El $TGF\beta$ se expresa de manera constitutiva en todos los tejidos. Se han identificado tres tipos de $TGF\beta$, que son: $TGF\beta_1$, β_2 y β_3 (Logsdon et al., 1992). Los $TGF\beta$ s juegan un papel importante en la regulación del crecimiento y la diferenciación de una amplia variedad de tipos celulares. Los $TGF\beta_1$ y 2 son proteínas de aproximadamente 25 kDa, las cuales actúan a través de dos tipos de receptores transmembranales heterotetraméricos: el tipo I y el tipo II, ambos tienen actividad de cinasa de serina/treonina (Filvaroff et al., 1999). El $TGF\beta_1$ es el más estudiado y se sugiere que tiene efectos tanto en la regulación positiva como en la regulación negativa del crecimiento celular (Logsdon et al., 1992).

En el páncreas se ha detectado la expresión de $TGF\beta_1$ y de su RNAm en células acinares

aisladas de ratón. Se observó que este factor es un potente inhibidor de la división celular de estas células, estimulada por citoqueratina (CCK), insulina y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Todo lo anterior sugiere que el TGF β 1 es un regulador autocrino del páncreas. Además se ha observado que el TGF β 1 es un inhibidor de la proliferación en carcinomas pancreáticos. (Logsdon et al., 1992). En humanos se ha observado la presencia de TGF β 1, β 2 y β 3, en células acinares, de los islotes y de los conductos pancreáticos (Peters et al., 2000).

En estudios realizados con ratones carentes del receptor tipo II para los TGF β 1, 2 y 3, se observó una formación anormal de las células del sistema de los conductos pancreáticos, lo cual indica que los TGF β s pueden ser inhibidores del crecimiento de las células del conducto y por lo tanto de los conductos como tales (Peters et al., 2000).

1.5 Células progenitoras pancreáticas

Como ya se mencionó, las células que dan origen al páncreas son de naturaleza endodérmica. En general se acepta que las células progenitoras de los distintos linajes pancreáticos provienen de los conductos pancreáticos (Gao et al., 2003). Recientemente se ha observado la existencia de células troncales en los islotes pancreáticos. Por lo que se propone que las células troncales residen en los conductos y en los islotes pancreáticos (Dor et al., 2004). Es posible que el origen de las células pancreáticas sea diferente en los animales en desarrollo que en el adulto.

Las células troncales son células pluripotenciales que se han identificado en varios tejidos adultos y se caracterizan por expresar nestina, una proteína de filamentos intermedios. La nestina se expresa en el tubo neural de la rata en desarrollo en el día embrionario 11 (E11). Se ha visto que sus niveles de máxima expresión los alcanza en la corteza cerebral en E16 y estos niveles disminuyen en la edad adulta (Zulewski et al., 2001).

En el páncreas se han observado células que expresan nestina, tanto en los islotes, como en células exocrinas y en regiones de los conductos pancreáticos. Estas últimas son

capaces de proliferar *in vitro* y tienen propiedades de células troncales porque pueden dar origen a fenotipos de células de hígado, de células endocrinas pancreáticas y de células exocrinas del conducto pancreático (Zulewski et al., 2001).

1.6 Efectos de algunos factores sobre la diferenciación celular en la línea tumoral (CAPAN-1)

Las líneas tumorales del páncreas provienen de tumores en metástasis, los cuales pueden sobre expresar algunos factores de crecimiento y sus receptores, como FGF, VEGF, TGF β , EGF. La sobre expresión de estos factores y la ausencia de factores inhibitorios del crecimiento, promueven la proliferación celular de estos tumores y su migración hacia otros órganos como el hígado (Li et al., 2004). En líneas celulares carcinoides como la línea BON de páncreas de humano se observó que el NGF actúa como un mitogeno. Lo cual sugiere que el NGF puede jugar un papel importante en el desarrollo de tumores carcinoides (Bold et al., 1995).

Las líneas tumorales del páncreas nos ofrecen un modelo interesante para entender el desarrollo de los distintos linajes pancreáticos. Por ejemplo, las líneas celulares del conducto pancreático, BxPC, HPAF-II, HPAC, CFPAC-1, PL45, y las CAPAN-1 y 2 expresan receptores a distintos factores de crecimiento, los cuales modifican su crecimiento y desarrollo.

Las células CAPAN-1 se derivan de un adenocarcinoma de páncreas de humano, que por metástasis migraron al hígado de donde fueron extraídas en 1974. En estas células se ha identificado la expresión de proteínas marcadoras de células del conducto pancreático como las citoqueratinas 7, 8 y 18, por medio de la técnica de inmunocitoquímica (American Type Culture Collection, ATCC).

En este trabajo utilizamos la línea tumoral CAPAN-1. Durante nuestro trabajo experimental, Zhu y colaboradores (2001) describieron que estas células expresan los RNAm y las proteínas NGF, TrkA y p75 (Zhu et al., 2001). Asimismo, se ha descrito que

un análogo del péptido parecido al glucagon (GLP-1), denominado exendina-4, promueve la diferenciación de estas células hacia un fenotipo endocrino (Zhou et al., 2002).

1.7 Los análogos permeables del AMPc modifican la respuesta a algunos factores de crecimiento

El AMPc, es un segundo mensajero intracelular, que juega un papel importante en la señalización hormonal que puede inducir proliferación, diferenciación y en algunos casos la inhibición del crecimiento celular en varios tipos celulares (Alberts et al., 2002). Existen análogos permeables del AMPc que pueden entrar a las células y activar cascadas de señales. Algunos de estos análogos son: Ci-AMPc, N6-monobutiril-AMPc y el Br-AMPc, este último fue utilizado en este trabajo.

El AMPc se forma a partir de una molécula de trifosfato de adenosina (ATP), por la actividad de la adenilato ciclasa, la cual es activada por la vía de señalización de una proteína G. Cuando un receptor membranal acoplado a una proteína G es activado por uno de sus agonistas (hormonas o neurotransmisores), se induce la separación del complejo $\beta\gamma$ de la subunidad α que se encuentra unida a una molécula de difosfato de guanosina (GDP). Al separarse esta última hay un cambio de GDP por una molécula de trifosfato de guanosina (GTP) del medio intracelular. Una vez incorporado el GTP a la subunidad α , ésta se une a la adenilato ciclasa que se encuentra en la membrana celular, la cual forma AMPc a partir de ATP. La concentración intracelular del AMPc en la célula es igual o menor de 100 nM (10^{-7} M). Una vez formado, el AMPc es rápidamente y continuamente destruido por una o más fosfodiesterasas de AMPc, mismas que lo convierten a 5'-monofosfato de adenosina (5-AMP), como se observa en la figura 5 (Soria y Arias, 1997).

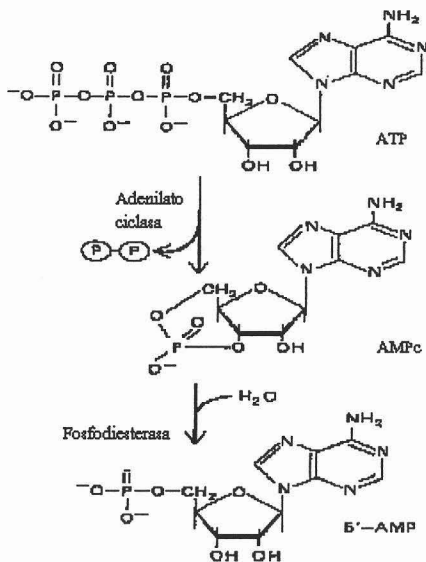


Fig. 5. Síntesis y degradación de AMPc (Modificado de Alberts et al., 2002).

1.8 Efectos funcionales del AMPc

La gran mayoría de los efectos funcionales del AMPc no se deben al nucleótido en sí, sino a la activación de una cinasa de proteínas que se encuentra en todas las células animales y que es estimulada por AMPc, por lo que se denomina PKA (cinasa de proteína activada por AMPc). Esta enzima cataliza la transferencia de grupos fosfato del ATP a residuos específicos de serina o de treonina de ciertas proteínas (Soria y Arias, 1997).

1.9 Regulación de la expresión de genes

Las subunidades catalíticas de la PKA pueden translocarse al núcleo donde fosforilan a una proteína nuclear llamada CREB. La fosforilación de CREB estimula la transcripción de un número importante de genes, incluyendo aquellos que codifican la síntesis de ciertos

Análisis del efecto del factor de crecimiento neuronal (NGF) y el BrAMPc, sobre la diferenciación de una línea tumoral del conducto pancreático (CAPAN-1)

neuropéptidos. Ciertos genes de respuesta temprana como c-fos y Zif/268 son también activados por procesos que dependen de AMPc. Estos genes codifican factores de transcripción que a su vez regulan la expresión de otros genes de respuesta tardía (Soria y Aria, 1997).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen evidencias de que los diferentes tipos celulares del páncreas provienen de células troncales localizadas en los conductos pancreáticos. Sin embargo, no se conocen los diferentes factores que podrían participar en la diferenciación de estas células hacia los diferentes linajes pancreáticos.

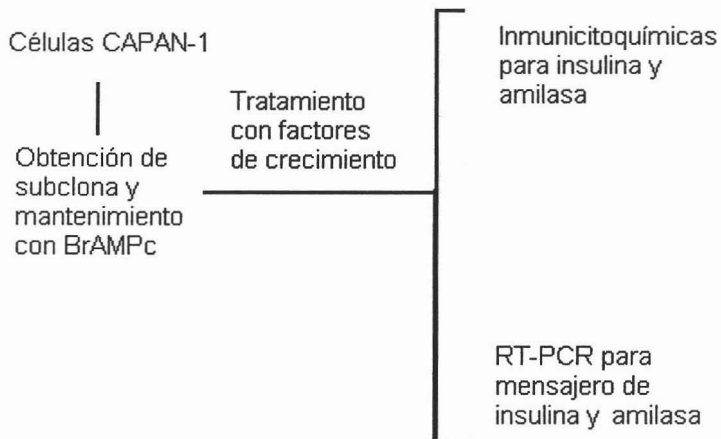
3. HIPÓTESIS

Los factores de crecimiento son importantes para el desarrollo y la diferenciación de las células del páncreas. El tratamiento de la línea celular CAPAN-1, derivadas del conducto pancreático, con NGF, FGF, TGF β y Br-AMPC, podrían inducir la diferenciación de las células en el cultivo hacia alguno de los fenotipos pancreáticos.

4. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto del NGF, FGF 1, 2, TGF β y Br-AMPC, sobre la morfología y diferenciación de las células CAPAN-1.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL



6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cultivo y mantenimiento de la línea celular CAPAN-1

La línea celular derivada de adenocarcinoma de conductos pancreáticos CAPAN-1, fue donada por el Dr. Guillermo Robles del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán. La línea celular fue mantenida en medio RPMI 1640 de GIBCO que contenía 10 % de suero bovino fetal (SBF), 100 µg/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomicina.

Se utilizaron células CAPAN-1 se encontraban entre los pasos 25 a 37, que una vez que llegaban a confluencia eran despegadas de la caja de cultivo con tripsina EDTA (0.53 mM) durante 10 minutos, colectadas en tubos de centrifuga, dispersadas y lavadas con el medio de cultivo antes mencionado, al menos 2 veces por 10 minutos a 1200 rpm.

6.2 Obtención de una subclona de la línea celular CAPAN-1 y tratamientos con algunos factores de crecimiento

Las células CAPAN-1 mantenidas con medio ya mencionado, fueron levantadas y se sembraron aproximadamente 500,000 células en condiciones control y tratadas con Br-AMPc (5 mM) durante 5 días en medio definido que contenía insulina (1 mg/ml), selenita de sodio (0.67 μ g/ml), transferrina (0.55 mg/ml), putrescina (100 μ M) y progesterona (20 nM). Después de lo cual, las células fueron colectadas y cuantificadas por el método de exclusión de azul tripano para evaluar viabilidad.

Las células sobrevivientes, a las cuales les llamamos subclona, se sembraron en cajas de 12 pozos, aproximadamente 20,000 células por tratamiento en las siguientes condiciones: control con Br-AMPc, y Br-AMPc con NGF, con FGF1, con FGF2 y Br-AMPc y TGF β en medio definido y cultivadas durante 5 días.

6.3 Inmunocitoquímica de amilasa e insulina de las células resistentes a Br-AMPc

Después de 5 días de cultivo, las células tratadas con los diferentes factores de crecimiento fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % preparado en una solución de PBS (0.1 M pH 7.4), posteriormente las células fueron lavadas 3 veces con PBS y 3 veces con una solución de TBS (0.1 M pH 7.4) e incubadas en TBS con 0.3 % de tritón y 3 % suero normal de cabra (SNC).

Las células fueron incubadas durante dos noches en presencia de anticuerpo contra insulina levantado en cobayo de ICN o contra amilasa levantado en conejo de Rockland, diluidos a una concentración 1: 1000 en TBS y 1 % SNC.

Después de lavar 3 veces con TBS, las células se incubaron con los anticuerpos biotinilados de VECTOR contra IgG de cobayo (para insulina) y conejo (para amilasa) durante una hora. Posteriormente fueron incubados con un complejo estreptavidina-peroxidasa durante una hora. Finalmente la expresión de insulina y amilasa se reveló por

la formación de un precipitado café al adicionar 3,3'-diaminobencidina que es un sustrato de la peroxidasa.

Posterior a la inmunocitoquímica, se realizó una contratincción con hematoxilina-eosina para distinguir los núcleos y cuantificar el porcentaje de células positivas a insulina o amilasa.

6.4 Extracción y Cuantificación de RNAm

Se sembraron y cultivaron 500,000 células resistentes a Br-AMPc durante 24 horas con, los tratamientos antes mencionados. Se extrajo el RNA total de cada cultivo utilizando TRIzol (Gibco) y posteriormente fue cuantificado por espectrofotometría.

Las reacciones en cadena de la polimerasa acoplados a la transcriptasa reversa (RT-PCR) fueron realizadas de acuerdo al protocolo sugerido por el proveedor del Kit para RT-PCR de (Applied Biosystems). Para la síntesis de DNAc se usó el oligo-DT y en la RT se adicionaron 100 ng/ μ l de RNA total, se amplificaron los fragmentos de nuestro interés a 30 ciclos, para evitar llegar a una meseta de saturación y mantener la reacción en la fase lineal. Para la determinación semicuantitativa, se hicieron amplificaciones paralelas del gene constitutivo glicelaldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del DNAc, fueron diseñados de acuerdo a datos previamente publicados por (Mocharla et al., 1990) para el gene de amilasa, y para el gene de insulina fue diseñado en el programa, Oligos (http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare1_html/download.htm), ambos genes para humano. En la detección para el gene de amilasa la secuencia sentido fue: 5' cagcagtcacatattctggatgg y la antisentido 3' tgagctccaagcacatgtggc, para el gene de insulina la secuencia sentido fue: 5' gcatcagaagaggccatcaagc y la antisentido 3' gcaccgagagatggaataaag. En el caso del gene de GAPDH utilizamos la secuencia sentido 5' gccccatgtttgtgat 3' y antisentido 5' gccccagcatcaaaggt 3'. Las amplificaciones se realizaron a una temperatura de alineación de 61.5 ° C en el caso de la amilasa y en el

Análisis del efecto del factor de crecimiento neuronal (NGF) y el BrAMPc, sobre la diferenciación de una línea tumoral del conducto pancreático (CAPAN-1)

caso de la insulina de 61 ° C.

Los productos de la reacción tuvieron un 100 % de identidad con las secuencias para los genes de amilasa, insulina y GAPDH. El material de amplificación fue visualizado por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% con una marca de bromuro de etidio. La cuantificación de los productos fue determinada por densitometría y analizada con Imagequant versión 5.1 de Molecular Dynamics.

6.5 Análisis de datos

Todos los datos son expresados como el promedio \pm ES; la n denota el número de experimentos realizados. La significancia estadística fue obtenida con ANOVA de una sola vía, seguida de la prueba múltiple de Fisher utilizando el Number Cruncher Statistical System (NCSS 4.2; Dr. L. Hintze, Kaysville, UT).

7. RESULTADOS

7.1 Obtención de una subclona de la línea CAPAN-1 con resistencia al Br-AMPc

En estudios anteriores realizados en el laboratorio se observó que el tratamiento con análogos permeables del AMPc, el db-AMPc y el Br-AMPc, inducía muerte celular de un porcentaje elevado de las células de la línea tumoral de células del conducto pancreático CAPAN-1 (datos no publicados).

Las células de la línea CAPAN-1, tienen una morfología redondeada y sólo algunas de estas células tienden a estar aplanadas. Después de una semana de cultivo se puede observar la formación de una monocapa celular, como se muestra en la figura 6.

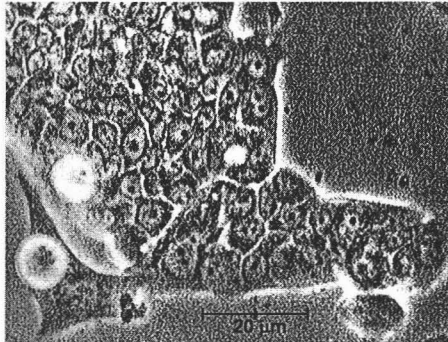


Fig. 6. Microfotografía de células CAPAN-1.

Como se muestra en la figura 7, cerca del 60 % de las células de la línea CAPAN-1 sobreviven al tratamiento en cultivo con Br-AMPc, comparado con las células cultivadas en condiciones control. La mayoría de las células que sobreviven al tratamiento conservaron una morfología redonda y algunas de las células extendieron procesos citoplásmicos parecidos a neuritas. Además en el centro de los agrupamientos celulares se observaron células muertas y en etapas posteriores del cultivo se observaron espacios vacíos.

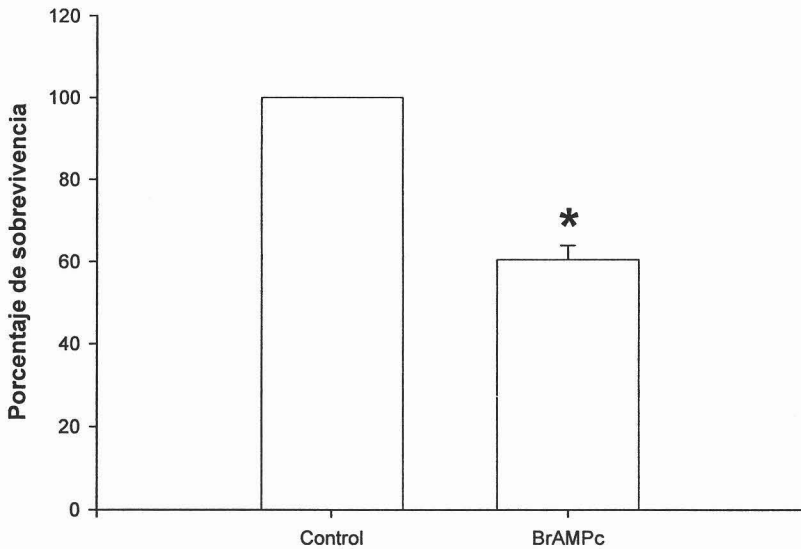


Fig. 7. El tratamiento con Br-AMPc durante 5 días mantiene un 60 % de células sobrevivientes, con respecto a las células control (* $p < 0.0001$, $n = 5$)

7.2 Efecto del Br-AMPc y los factores de crecimiento sobre la expresión de insulina y amilasa en una subclona de células CAPAN-1

Dado que las células derivadas del conducto se han postulado como probables progenitoras de las células pancreáticas y que durante el desarrollo y posiblemente en la diferenciación de éstas participan factores de crecimiento, decidimos evaluar el efecto de NGF, FGF1, FGF2 y TGF β en la diferenciación de la subclona CAPAN-1 resistente a Br-AMPc.

Una manera indirecta de evaluar la diferenciación de estas células es analizando la expresión y/o ausencia de dos proteínas características del páncreas endocrino y exocrino, insulina y amilasa, respectivamente. La expresión de estas proteínas fue analizada por la técnica de inmunocitoquímica, en células de la subclona en presencia de

Br-AMPc y los factores de crecimiento antes mencionados.

La línea celular CAPAN-1 no expresa insulina, tampoco la subclona CAPAN-1 resistente a Br-AMPc en condiciones control, ni en respuesta a los tratamientos con los factores de crecimiento.

En condiciones control, el porcentaje de células positivas a amilasa fue del 10.2 %, este porcentaje no se modificó en la subclona tratada con Br-AMPc.

La figura 8 muestra que cuando la subclona resistente a Br-AMPc es tratada durante 5 días con Br-AMPc y NGF el porcentaje de células positivas a amilasa disminuye en 48.6 %, con respecto a su control.

De manera similar, cuando las células de la subclona son tratadas FGF1 ó 2 o TGF- β , se observa una disminución de las células positivas a amilasa hasta de un 50.7, 53.1 y 52.3 % respectivamente, comparadas con las células control.

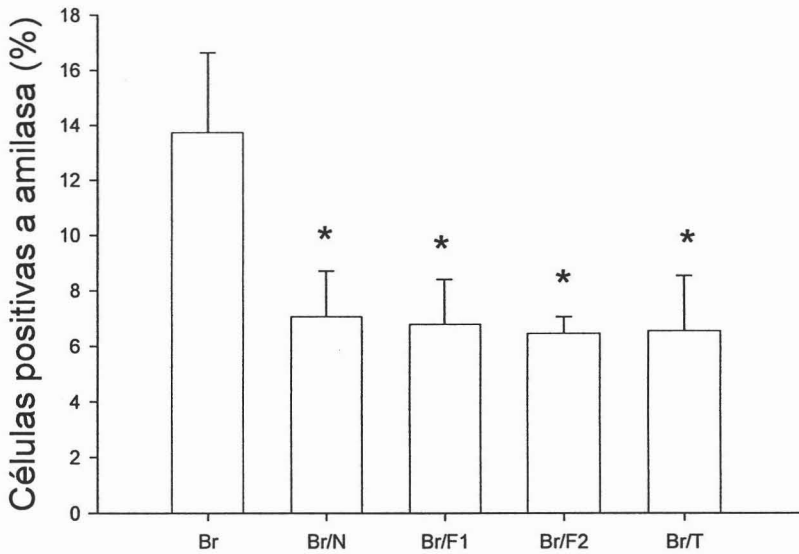


Fig. 8. Porcentaje de células positivas a amilasa detectada por inmunocitoquímica. Las abreviaturas se refieren a los tratamientos utilizados: Br (Br-AMPc, 5 mM), Br/N (Br-AMPc y NGF, 10 ng/ml), Br/F1 (Br-AMPc y FGF1 30 ng/ml), Br/F2 (Br-AMPc y FGF 2 10 ng/ml) Br/T (Br-AMPc y TGF β 5 ng/ml), las células fueron cultivadas durante 5 días (* p < 0.04 n= 4 experimentos).

7.3 Regulación del mensajero de amilasa por Br-AMPc, NGF, FGF y TGF β

Evaluamos el efecto de los factores de crecimiento sobre el RNAm de amilasa en las células resistentes a Br-AMPc. Observamos que el tratamiento con Br-AMPc incrementa en un 52 % la expresión del mensajero para amilasa con respecto de las células control.

El efecto del tratamiento de la subclona resistente a Br-AMPc con los factores de crecimiento se muestra en la figura 9. Cuando las células son tratadas con Br-AMPc y los factores de crecimiento, el mensajero para amilasa disminuye en un 35, 44 y 41, y 51 % en las diferentes condiciones experimentales, comparados con las células tratadas sólo con Br-AMPc.

Análisis del efecto del factor de crecimiento neuronal (NGF) y el BrAMPc, sobre la diferenciación de una línea tumoral del conducto pancreático (CAPAN-1)

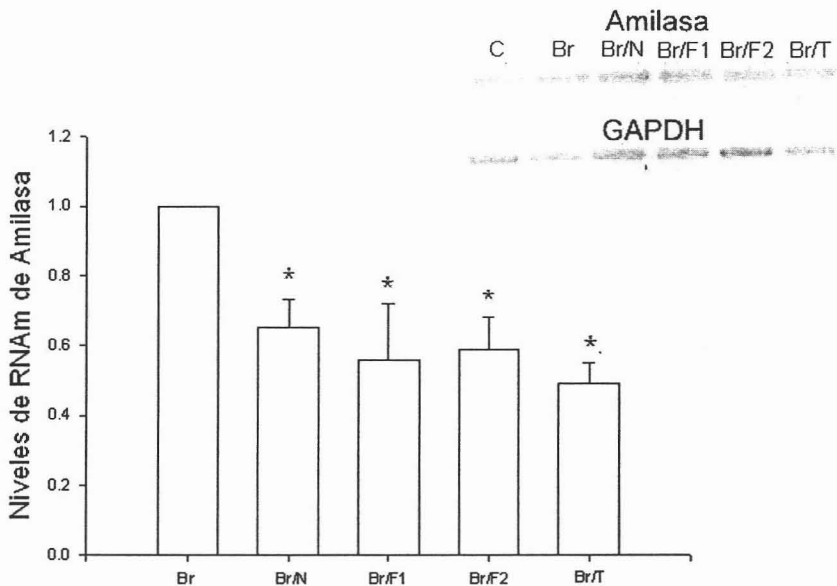


Fig. 9 Niveles de RNAm de amilasa en células CAPAN-1 sembradas 24 h con (Br) Br-AMPc 5 mM, Br-AMPc y NGF 50 ng/ml (B/N), Br-AMPc y FGF1 30 ng/ml (B/F1), Br-AMPc y FGF2 10 ng/ml (B/F2), Br-AMPc y TGF β 5 ng/ml (B/T) normalizados con respecto a GAPDH, como control interno en la gráfica y en la figura se muestra la fotografía del gel de agarosa donde se revelan las señales de amilasa y GAPDH (* $p < 0.05$ n = 3 experimentos).

8. DISCUSIÓN

En este estudio se observó que el tratamiento de las células CAPAN-1 durante 5 días en cultivo con Br-AMPC, elimina al 40 % de las células, seleccionando a una población resistente al tratamiento, que nosotros denominamos subclona.

Este efecto es similar al observado en las líneas celulares L (fibroblastos de ratón) y HeLa (epiteliales de humano), en donde el AMPc (5 mM) inhibe su crecimiento en comparación con las células tratadas con 5'AMP (Ryan y Heidrick, 1968). En estudios posteriores con análogos permeables del AMPc, dibutiril AMPc (5 mM) y Br-AMPC (5 mM), se observó que éstos inhibieron el crecimiento de las células L hasta un 58 %. Los resultados muestran

que solamente las moléculas cíclicas de AMP, inhiben el crecimiento celular, inducido por la citotoxicidad por altas concentraciones del nucleótido cíclico exógeno en el medio intracelular (Martin y Kowalchyk, 1981). En este mismo estudio se evaluó el papel del AMPc endógeno inhibiendo la actividad de la fosfodiesterasa con teofilina, y se obtuvo el mismo efecto de inhibición del crecimiento sobre las células HeLa y BHK (células de riñón de humano) (Martin y Kowalchyk, 1981).

Para evaluar los efectos del Br-AMPc y los factores de crecimiento sobre la diferenciación de la subclona resistente a Br-AMPc, hacia un fenotipo exocrino o endocrino, a los 5 días de cultivo, analizamos la expresión de las proteínas y de los RNAm de amilasa y de insulina. Observamos que las células CAPAN-1 no expresaron insulina, y ningún tratamiento indujo la expresión de esta proteína.

El porcentaje de células CAPAN-1 que expresan amilasa fue del 10.2 %, en condiciones control, este porcentaje no se modifica con el tratamiento con Br-AMPc. El tratamiento con los factores de crecimiento, NGF, FGF1, 2 y TGF β , disminuyen la expresión de amilasa. Esta disminución es de cerca del 50 % en todos los casos.

Evaluamos los niveles del RNAm de amilasa en la subclona resistente a Br-AMPc, a las 24 horas de cultivo. Observamos que los niveles de RNAm aumentaron hasta un 52 % con respecto a las células control. Este aumento en la expresión del RNAm de amilasa, podría deberse a la activación de factores de transcripción que intervienen en la expresión del gene de amilasa. Se ha observado que el tratamiento con glucocorticoides induce la expresión del gene de amilasa, en páncreas de rata, pollo y en la línea tumoral de células acinares ARJ42 de rata (Logsdon et al., 1987). En la vía de los glucocorticoides hay producción de AMPc. El AMPc induce la expresión génica, mediante la activación de factores de transcripción específicos como CREB (Soria y Arias, 1997). Aunque no conocemos cual es el factor de transcripción específico, que induce la expresión del gene de amilasa, nuestros resultados sugieren que alguno de los factores de transcripción activados por AMPc, interviene en la expresión de este gene.

Análisis del efecto del factor de crecimiento neuronal (NGF) y el BrAMPc, sobre la diferenciación de una línea tumoral del conducto pancreático (CAPAN-1)

De manera interesante, los factores de crecimiento abatió el efecto de inducción de la expresión del mensajero de amilasa del Br-AMPc sobre la subclona resistente. Con lo cual podríamos sugerir que estos factores de crecimiento no favorecen la diferenciación de esta línea celular hacia un fenotipo exocrino.

Se ha observado la expresión de las proteínas y los mensajeros de NGF, TrkA y de p75, en las células CAPAN-1 (Zhu et al., 2001). En otras líneas tumorales de páncreas de humano como, PANC-1, T3M4, ASPC-1 CAPAN-1 se ha visto la expresión de algunos factores de crecimiento como: NGF, FGF, TGF β , y sus receptores, los cuales han sido involucrados en la sobrevivencia y proliferación de estas células. Por otro lado se han observado niveles altos de expresión de estos factores de crecimiento, en cáncer de páncreas, promoviendo la metástasis en estas células (Ozawa et al., 2001).

9. CONCLUSIONES

Con todo lo anterior, podemos concluir que los factores de crecimiento (NGF, FGF1, 2 y TGF β) utilizados en este trabajo no indujeron la diferenciación, de la línea tumoral del conducto pancreático CAPAN-1, hacia ninguno de los fenotipos pancreáticos (exocrino y/o endocrino). Por otro lado el Br-AMPc indujo un aumento de la expresión del mensajero de amilasa en las células CAPAN-1. Será interesante estudiar el efecto del Br-AMPc en cultivos primarios de células del conducto pancreático.

10. LITERATURA CITADA

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular biology of the cell. Ed. Garland Publishing. Inc. 4a. Ed 2002. U.S.A. p.p. 735-738.

Arany E y Hill DJ. 2000. *Ontogeny of fibroblast growth factors in the early development of the rat endocrine pancreas*. *Pediatric Res* **48**: 389-403.

Bold R.J, Ishizuka J, Rajaraman S, Perez-Polo R, Townsend C.M Jr, y Thompson J.C. 1995. *Nerve growth factor as a mitogen for a pancreatic carcinoid cell line*. *J. Neurochem.* **64**: 2622-2628.

Celli G, LaRochelle WJ, Mackem S, Sharp R y Merlino G. 1998. *Soluble dominant-*

negative receptor uncovers essential roles for fibroblast growth factors in multi-organ induction and patterning. EMBO J. **6**: 1642-1655.

Dor Y, Brown J, Martínez OI y Melton DA. 2004. *Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation.* Nature **129**: 41-46.

Edlund H. 2001. *Development biology of the pancreas.* Diabetes **50** S1: S5-S9.

Egerbacher M y Bock P. 1997. *Morphology of the pancreatic duct system in mammals.* Microscopy research and technique **37**: 407-417.

Filvaroff E, Erlebacher A, Ye JQ, Gitelman SE, Lotz J, Heilman M y Derynck R. 1999. *Inhibition of TGF- β receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass.* Development **126**: 4267-4279.

Gao R, Ustinov J, Pulkkinen MA, Lundin K, Korsgren O y Otonkoski T. 2003. *Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture.* Diabetes **52**: 2007-2015.

Githens S. 1988. *The pancreatic duct cell: proliferative capabilities, specific characteristics, metaplasia, isolation, and culture.* Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition **7**:486-506.

Hiriart M. El páncreas endocrino. En Curso Internacional precongreso, Actualización en fisiología. Ed. XL Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C. Morelia Michoacán. Septiembre, 1997. p.p. 305-318.

Hiriart M, Vidaltamayo R y Sánchez-Soto C. 2001. *Nerve and fibroblast growth factors as modulators of pancreatic β cell plasticity and insulin secretion.* IMAJ **3**: 114-116.

Kanaka-Gantenbein C, Dicou E, Czernichow P y Schafmann R. 1995. *Presence of nerve growth factor and its receptors in an in vitro model of islet cell development: implication in normal islet morphogenesis.* Endocrinology **136**: 3154-3162.

Kim SK, Hebrok M y Melton DA. 1997. *Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development.* Development **124**: 4243-4252.

Kim SK y Hebrok M. 2001. *Intercellular signals regulating pancreas development and function.* Genes and Development **15**:111-127.

Le Bras S, Miralles F, Basmaciogullari A, Czernichow P, y Scharfmann R. 1998. *Fibroblast growth factor 2 promotes pancreatic epithelial cell proliferation via functional fibroblast growth factor receptors during Embryonic Life.* Diabetes **47**: 1236-1242.

Levi-Montalcini R. 1987. *The nerve growth factor: thirty-five years later.* EMBO J **6**: 1145-1154

Li D, Xie K, Wolf R, y Abbruzzese JL. 2004. *Pancreatic cancer*. The Lancet. **363**: 1049-1057.

Logsdon CD, Keyes L y Beauchamp RD. 1992. *Transforming growth factor- β (TGF- β 1) inhibits pancreatic acinar cell growth*. Am J Physiol **262**: G364-8.

Logsdon CD, Perot KJ y McDonald AR. 1987. *Mechanism of glucocorticoid-induced increase in pancreatic amylase gene transcription*. J Biol Chem **262**: 15765-15769.

Madsen D, Jensen J, Blume N, Petersen HV, Lund K, Karlsen C, Andersen HG, Jensen PB, Larsson LI y Serup P. 1996. *Pancreatic development and maturation of the islet B cells. Studies of pluripotent islet cultures*. Eur J Biochem **242**: 435-445.

Martin TFJ y Kowalchuk JA. 1981. *Growth inhibition by adenosine 3',5'-monophosphate derivatives does not require 3',5'-phosphodiester linkage*. Science **213**: 1120-1122

Mocharla H, Mocharla R y Hodes ME. 1990. *Coupled reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) as a sensitive and rapid method isozyme genotyping*. Gene **91**: 271-275.

Ozawa F, Friess H, Tempia-Caliera A, Kleeff J y Buchler MW. 2001. *Growth factors and their receptors in pancreatic cancer*. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis **21**: 27-44.

Peters J, Jürgensen A y Klöppel G. 2000. *Ontogeny differentiation and growth of the endocrine pancreas*. Virchows Arch **436**: 527-538.

Ryan WL y Heidrick ML. 1968. *Inhibition of cell growth in vitro by adenosine 3',5'-monophosphate*. Science **162**: 1484-1485.

Rosenbaum T, Vidaltamayo R, Sánchez-Soto MC, Zentella A e Hiriart M. 1998. *Pancreatic β cells synthesize and secrete nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci **95**: 7784-7788.

Rosenbaum T. Los factores de crecimiento: ¿qué son, qué hacen y cómo lo hacen?. En Curso Internacional precongreso, Actualización en fisiología. Ed. XL Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C. Morelia Michoacán septiembre, 1997.p.p. 281-293.

Rosenbaum T, Vidaltamayo R, Sánchez-Herrera D e Hiriart M. 1996. *Nerve growth factor increases sodium current in pancreatic β Cells*. J Membrane Biol **153**: 53-58.

Rosenbaum T, Sánchez-Soto MC e Hiriart M. 2001. *Nerve growth factor increases insulin secretion and barium current in pancreatic β -cells*. Diabetes **50**: 1755-1762.

Slack JMW. 1995. *Developmental biology of pancreas*. Development **121**:1569-1580

Soria JLE y Arias MJA. Señalización celular por segundos mensajeros. En Curso Internacional precongreso, Actualización en fisiología. Ed. XL Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C. Morelia Michoacán. Septiembre. 1997.p.p. 91-93.

Spooner SB, Bernt T, Walther, y Rutter JW. 1970. *The Development of the dorsal and ventral mammalian pancreas in vivo and in vitro*. J Cell Biol **47**: 235-246

Sutter A, Riopelle RJ, Harris Warrick RM y Shooter EM. 1979. *Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells*. J. Biol. Chem **254**: 5972-5982.

Vidaltamyo R, Sánchez-Soto MC, Rosenbaum T, Martínez-Merlos T e Hiriart M. 1996. *Neuron-like phenotypic changes in pancreatic β -cells induced by NGF, FGF, and dbcAMP*. Endocrine **4**: 19-25.

Vidaltamayo R, Mery C, Ángeles-Ángeles A, Robles-Díaz G e Hiriart M. 2003. *Expression of nerve growth factor in human pancreatic β cells*. Growth Factors **21**: 103-107.

Zhou J, Pyneiro MA, Wang X, Doyle ME y Egan JM. 2002. *Exendin-4 differentiation of a human pancreatic duct cell line into endocrine cells: involvement of PDX-1 and HNF3b transcription factors*. J Cell Physiol **192**:304–314

Zhu ZW, Fries H, Wang L, Bogardus T, Korc M, Kleeff J y Buchler MW. 2001. *Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells*. Clin Cancer Res **1**: 105-112.

Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Müller B, Vallejo M, Thomas MK y Habener JF. 2001 *Multipotent nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine and hepatic phenotypes*. Diabetes. **50**: 621-633.

(http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare1_html/download.htm.)