

TERAPIA CELULAR EN DIABETES: NUEVAS ESTRATEGIAS PARA GENERAR CÉLULAS BETA SUSTITUTAS

1. Objetivo del proyecto

En la diabetes tipo 1 (DT1) hay una pérdida de más del 80% de las células beta pancreáticas que producen insulina. Una de las apuestas de futuro más atractivas para lograr la curación de la DT1 es la restitución de la producción de insulina endógena mediante el reemplazo de las células beta perdidas por células beta sustitutas generadas en el laboratorio.

Nuestro proyecto de investigación trata de generar células beta sustitutas a partir de células de la piel (fibroblastos) mediante un proceso conocido como reprogramación directa o transdiferenciación. Los fibroblastos de piel se pueden obtener a partir de una pequeña biopsia de piel del paciente y, una vez reprogramados hacia células productoras de insulina, pueden ser implantados en el mismo paciente. Una ventaja evidente de esta estrategia es que no requiere tratamiento inmunosupresor pos trasplante, ya que al tratarse de células procedentes del mismo paciente no habrá rechazo.

2. Resultados obtenidos

Hemos diseñado un protocolo para reprogramar fibroblastos humanos hacia células productoras de insulina (denominadas células fibro-beta o CFB) basado en la introducción de cinco proteínas que participan en la formación de las células beta durante el desarrollo embrionario. A los diez días del inicio del protocolo, observamos que las células CFB producen insulina (Figura 1).

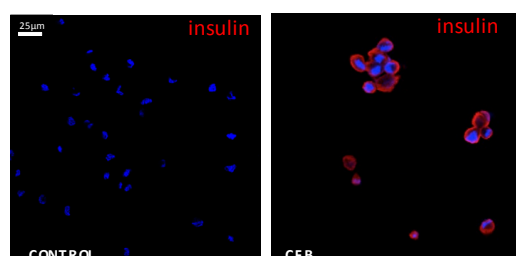


Figura 1: Detección de insulina (marcada en rojo). A la izquierda, fibroblastos control no reprogramados. A la derecha, células CFB. En azul, los núcleos celulares que permiten localizar las células en las imágenes.

Hemos caracterizado las células CFB a nivel molecular (expresión de genes característicos de célula beta además de la insulina) y funcional (secreción de insulina en respuesta a glucosa, flujos de calcio). (Figura 2)

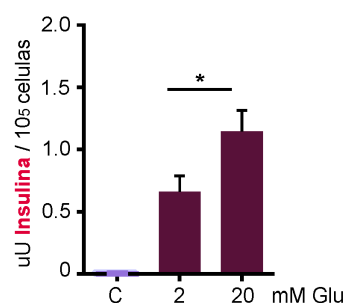


Figura 2: Secreción de insulina *in vitro* de células CFB agregadas en formas de esferoides. C son fibroblastos control no reprogramados (no secretan insulina). La secreción de insulina se ha determinado a dos concentraciones de glucosa: 2mM (basal) y 20mM (estimuladora).

3. Experimentos en curso

En la actualidad estamos centrando nuestros esfuerzos en estudiar la supervivencia, el mantenimiento de la reprogramación y la funcionalidad de las células CFB una vez trasplantadas en animales de experimentación. Estos son experimentos primordiales y necesarios para validar el potencial clínico de nuestra estrategia.

Los experimentos concretos se describen a continuación:

1. Caracterización de la supervivencia y estado de la reprogramación de las células CFB trasplantadas en ratones sanos

Trasplante de esferoides de células CFB en la cámara anterior del ojo (300 esferoides/ojo) de ratones adultos inmunodeprimidos de la cepa NOD *scid* gamma (NSG). Se hará seguimiento de los trasplantes durante dos meses. Se estudiará la supervivencia y el estado de reprogramación de las células trasplantadas a diferentes tiempos postrasplante (día 10, 30, 60). Para ello, se recuperará el injerto celular y se caracterizará mediante inmunotinción con anticuerpos específicos para células humanas (HLA) y para marcadores de células beta (insulina, péptido C, PDX1, NKX6-1, NKX2-2, MAFB, MAFA, etc.). Se comparará el porcentaje de células doblemente positivas para HLA y insulina/péptido C a los diferentes tiempos. Se determinará la viabilidad mediante el marcador vital CFDA y la muerte celular mediante ensayos TUNEL.

2. Determinación de niveles de insulina humana circulantes en ratones sanos trasplantados con células CFB.

Trasplante de esferoides de células CFB bajo la cápsula renal (2000-5000 esferoides) de ratones adultos NSG sanos. Se determinará la presencia de insulina humana en el plasma de los animales trasplantados los días 10, 30, 60 y 90 postrasplante. Se determinará la secreción de insulina humana en respuesta a una inyección intraperitoneal de glucosa a días 30 y 90 postrasplante. Se recuperarán los injertos al final del periodo de seguimiento para su caracterización tal como se detalla en el experimento 1.

Nota: El trasplante bajo la cápsula renal es más complicado que en el ojo (experimento 1) pero permite tamaños de injerto superiores necesarios para poder detectar insulina circulante.

3 Capacidad de las células CFB de revertir la hiperglicemia en ratones diabéticos.

Trasplante de esferoides de células CFB bajo la cápsula renal (2000-5000 esferoides) de ratones NSG diabéticos. Los ratones se hacen diabéticos mediante una única inyección de la toxina estreptozocina, la cual induce la muerte de las células beta pancreáticas endógenas y provoca la aparición de hiperglicemia. Los niveles de glucosa en sangre se controlarán cada 3 días y se hará un seguimiento de 30 días. Se determinará la presencia de insulina humana en el plasma de los animales trasplantados los días 10 y 30. Si se consigue la normalización de la glicemia, se ampliará el periodo de seguimiento hasta tres meses. Se determinará la secreción de insulina humana en respuesta a una inyección intraperitoneal de glucosa a los días 30 y 90 postrasplante. Se recuperarán los injertos al final del periodo de seguimiento para su caracterización tal como se detalla en el experimento 1.

4. Presupuesto

TOTAL: 997,40 €

- 2 kits ELISA para la determinación de insulina humana en plasma (<http://www.crystalchem.com/insulin-elisa-kit.html>). 320€ x 2= **620€**
- 24 placas de cultivo para formación de esferoides (MW 96U Nunclon Sphera Packed 1/8) 125,80€ x 3 = **377,40€**

5. Equipo de investigación

Marta Fontcuberta-PiSunyer (investigadora posdoctoral)

Ainhoa García (investigadora predoctoral)

Rebeca Fernández (investigador posdoctoral)

Rosa Gasa (investigadora principal)

6. Centro de investigación

Laboratorio de Diabetes

Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer-IDIBAPS

Barcelona