



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**MODELOS CELULARES PARA EL ESTUDIO Y
TRATAMIENTO DE LA DIABETES TIPO I
CELLULAR MODELS FOR THE STUDY AND
TREATMENT OF TYPE I DIABETES**

Autor: Celia Méndez Rodríguez

Tutor: María Carmen Marín Vieira

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Septiembre, 2023

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPOTESIS	2
3. OBJETIVOS.....	3
4. MÉTODO DE BUSQUEDA BIBLIOGRÁFICO.....	3
5. RESULTADOS	4
5.1. BASES MOLECULARES Y CELULARES DE LA DIABETES TIPO 1	4
5.1.1. FISIOLÓGIA DE LAS CÉLULAS β PANCREÁTICAS Y LA REGULACIÓN DE GLUCOSA.....	4
5.1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA DT1	6
5.1.2.1. FACTORES GENETICOS	6
5.1.2.2. FACTORES AMBIENTALES	7
5.1.2.3. MECANISMOS DE AUTOINMUNIDAD DE LA DT1	9
5.2. UTILIZACIÓN DE MODELOS ANIMALES	10
5.2.1. MODELOS DE ROEDORES DE DIABETES ESPONTÁNEA.....	10
5.2.2. MODELOS DE ROEDORES DE DIABETES INDUCIDA	11
5.2.3. MODELOS DE RATONES TRANSGÉNICOS	12
5.3. UTILIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES COMO MODELO DE ESTUDIO.....	14
5.3.1. GENERACIÓN, CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES HACIA CÉLULAS B-PANCREÁTICAS.....	14
5.4. UTILIZACIÓN DE ORGANOIDES PANCREÁTICOS COMO MODELO DE ESTUDIO	18
5.4.1. GENERACIÓN DE ORGANOIDES PANCREÁTICOS	19
6. CONCLUSIONES	23
7. REFERENCIAS	24

RESUMEN

La diabetes tipo 1 está experimentando un aumento constante en su incidencia y se prevé que esta tendencia continúe en el futuro. Esto hace evidente la necesidad de buscar modelos de estudio y tratamientos más efectivos para esta enfermedad. Un enfoque prometedor en esta búsqueda es la aplicación de la terapia regenerativa basada en el uso de células troncales pluripotentes y de organoides pancreáticos. Ambos métodos tienen en común la capacidad de proporcionar una fuente renovable e ilimitada de células β , que son esenciales para el tratamiento de la diabetes tipo 1 mediante trasplantes. Para evaluar la viabilidad de estas estrategias, es fundamental realizar un estudio en profundidad de las bases moleculares de la diabetes tipo 1 y las tecnologías actuales que permiten el cultivo de células pluripotentes humanas, su diferenciación en células β funcionales y la generación de organoides pancreáticos en el laboratorio. A pesar de los desafíos técnicos y científicos que aún deben superarse, estos modelos ofrecen un gran potencial en el tratamiento de la diabetes tipo 1. Este abordaje, podría representar una terapia revolucionaria que trate la enfermedad de manera más efectiva mejorando la calidad de vida de quienes la padecen y superando la limitación de la escasez de donantes de órganos.

Palabras clave: células β , diabetes tipo 1, diferenciación celular, iPSCs, organoide, terapia regenerativa.

ABSTRACT

Type 1 diabetes is experiencing a constant increase in its incidence, and this trend is expected to continue in the future. This underscores the need to explore more effective research models and treatments for this disease. One promising approach in this quest is the application of regenerative therapy based on the use of pluripotent stem cells and pancreatic organoids. Both methods share the capacity to provide a renewable and limitless source of β cells, which are essential for treating type 1 diabetes through transplants. To assess the feasibility of these strategies, it is crucial to conduct an in-depth study of the molecular foundations of type 1 diabetes and the current technologies that enable the cultivation of human pluripotent cells, their differentiation into functional β cells, and the generation of pancreatic organoids in the laboratory. Despite the technical and scientific challenges that still need to be overcome, these models offer great potential in the treatment of type 1 diabetes. This approach could represent a revolutionary therapy that effectively addresses the disease, improving the quality of life for those who suffer from it, and overcoming the limitation of organ donor shortages.

Keywords: β cells, cell differentiation, iPSCs, organoid, regenerative therapy, type 1 diabetes.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
APC	Célula presentadora de antígenos
BB	Rata Bio-Breeding
BMP	Proteína morfogénica ósea
Célula β	Célula beta pancreática
CHIR	Factor CHIR99021
CTLA-4	Proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos
DE	Endodermo definitivo
DT1	Diabetes tipo 1
DT2	Diabetes tipo 2
EB	Cuerpo embrioide
EP	Progenitor endocrino
GAD65	Descarboxilasa del ácido glutámico 65
GLUT1	Transportador de glucosa 1
GLUT2	Transportador de glucosa 2
GSIS	Secreción de insulina estimulada por glucosa
hESC	Célula troncal embrionaria humana
HLA	Antígeno leucocitario humano
IA2	Tirosina fosfatasa
IL-2	Interleucina 2
iPSC	Célula troncal pluripotente inducida
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos
LDN	Factor LDN193189
LYP	Tirosina fosfatasa específica de linfocitos

MEC	Matriz extracelular
NGN3	Neurogenina 3
NKX6-1	Homeobox 1 NK6
NOD	Ratón diabético no obeso
PDLO	Organoide similar a conducto pancreático
PDX1	Homeobox 1 del Páncreas y Duodeno
PGT	Tubo intestinal posterior
PP	Progenitor pancreático
PSC	Célula troncal pluriipotente
RA	Ácido retinoico
SC- β	Célula β derivada de células troncales
SHH	Proteína Sonic Hedgehog
STZ	Estreptozotocina
T3	Hormona tiroidea
T CD4+	Linfocito T auxiliar
T CD8+	Linfocito T citotóxico
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
XXI	Secretasa γ
ZnT8	Transportador de Zinc 8

1. INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus es un trastorno metabólico crónico que tiene como consecuencia un elevado nivel de azúcar en la sangre o hiperglucemia que, a largo plazo, puede resultar en diversas patologías, como retinopatía, neuropatía, nefropatía o enfermedades cardiovasculares, e incluso la muerte del paciente (Russo *et al.*, 2023). A nivel global, se estima que 463 millones de personas de entre 20 y 79 años padecen diabetes. Esto supone un 9,3 % del total de la población mundial y se prevé que la cifra aumente hasta casi un 11 % para 2045 (Russo *et al.*, 2023). La edad es un factor importante en la aparición de la diabetes, ya que, a partir de los 65 años la prevalencia se encuentra en torno al 15 %, a diferencia del 3,9 % en edades anteriores. Las diferencias entre sexos también son bastante notorias, siendo más probable que desarrollen los hombres la enfermedad antes que las mujeres (Russo *et al.*, 2023). Las complicaciones crónicas asociadas más frecuentes son el infarto agudo de miocardio (11 %) y el accidente cerebrovascular (8 %). Todo ello, provoca que, en el rango de edad de entre 20 y 79 años, la diabetes cause el 11,3 % de los fallecimientos de entre todas las causas de muerte posibles (Russo *et al.*, 2023).

La Diabetes Mellitus puede ser clasificada en cuatro categorías generales en función de la alteración de la regulación del azúcar en sangre que tenga el paciente: Diabetes tipo 1 (DT1), Diabetes tipo 2 (DT2), Diabetes gestacional y un grupo de diabetes inducidas por diversas causas que incluye los síndromes monogénicos, enfermedad del páncreas exocrino y las diabetes inducidas farmacológicamente (como la Diabetes post trasplante) (Harreiter y Roden, 2019). El proceso homeostático de regulación de glucosa se lleva a cabo mediante la secreción regulada de insulina por las células beta pancreáticas (células β) y, aunque la etiología de las DT1 y DT2 sea diferente, las vías de señalización celular que se ven alteradas en las células β durante la progresión de la enfermedad son comunes. En la DT2, el tipo de diabetes más frecuente y asociado a la obesidad, el principal problema estriba en que las células del hígado, del músculo y del tejido adiposo, no responden correctamente a la insulina, ejerciendo resistencia a esta hormona, y por tanto impidiendo su correcto funcionamiento para interiorizar glucosa y disminuir sus niveles en sangre (Harreiter y Roden, 2019). Por otro lado, la DT1 se trata de una enfermedad de origen autoinmune donde las células β son destruidas por el propio sistema inmune, causando una falta completa de insulina (Harreiter y Roden, 2019). La DT1 es de aparición temprana, siendo frecuente en niños y adolescentes y presentando una prevalencia del 5 al 10 %, considerándose así una de las enfermedades autoinmunes más frecuentes de los últimos años (Saberzadeh-Ardestani *et al.*, 2018). No muestra muchas diferencias entre sexos, aunque puede ser más común en hombres si aparece en

la adolescencia. Su aparición y desarrollo está condicionado tanto por factores genéticos e inmunológicos como por factores ambientales y las complicaciones cardiovasculares, neurológicas, oftalmológicas y renales son consecuencia directa de la enfermedad (Saberzadeh-Ardestani *et al.*, 2018). Como consecuencia, el paciente dependerá el resto de su vida de inyecciones o de otras formas de administración de insulina diaria para poder contrarrestar el déficit crónico de esta hormona y la hiperglucemia que conlleva la destrucción autoinmune de las células β (Rodrigues-Oliveira *et al.*, 2023).

Las células β son la única fuente de insulina en el cuerpo, por lo que las alteraciones en su desarrollo o función pueden dar lugar a cambios en la homeostasis de la glucosa, generando hiper o hipoglucemias y siendo, por tanto, la base del desarrollo de la diabetes. Es por ello por lo que el estudio de esta enfermedad requiere de modelos que recreen fielmente el desarrollo y funcionamiento de las células β humanas. La primera aproximación al estudio de esta enfermedad fue mediante el uso de animales transgénicos en los cuales se expresaba algún factor determinante de la diabetes. Sin embargo, estos modelos, aunque fiables, tienen sus limitaciones debido a la diferencia entre las especies animales utilizadas, principalmente el ratón, y el humano, impidiendo recrear todas las fases de la enfermedad (Balboa *et al.*, 2019). Para contrarrestar la falta de información fisiológica, molecular y anatómica de las células β humanas se han realizado estudios en islotes pancreáticos cadavéricos; sin embargo, el principal inconveniente de estos modelos era la escasa disponibilidad de material, así como la dificultad para mantener la funcionalidad de estas células en cultivo (Balboa *et al.*, 2019). Todo ello ha hecho evidente la urgente necesidad de nuevos sistemas de estudio que permitan el diseño de terapias efectivas para esta enfermedad.

Como se reflejará en este trabajo, el avance de las nuevas tecnologías de cultivo de células humanas pluripotentes (células troncales o células madre) han permitido, tanto la obtención *in vitro* de células β funcionales, como la generación de los denominados organoides pancreáticos, estructuras tridimensionales que contienen múltiples tipos celulares presentes en los islotes pancreáticos, incluyendo células β productoras de insulina; irguiéndose esta tecnología como el futuro modelo de estudio de esta enfermedad.

2. HIPOTESIS

La falta de modelos de estudio que recapitulen fielmente la fisiopatología de la DT1, ha limitado el diseño de terapias eficaces para esta enfermedad. Debido a que la DT1 se caracteriza por la destrucción de células β en los islotes pancreáticos, la terapia regenerativa propuesta como tratamiento, busca reemplazarlas estas células del paciente mediante el transplante de órganos. Sin

embargo, hasta el momento, esta técnica hace uso de islotes pancreáticos cadavéricos, por lo que se encuentra muy limitada, debido a la escasez de este material, y se requieren fuentes alternativas para obtener células β funcionales. Nuestra hipótesis de trabajo es que la obtención de células β de organoides pancreáticos generados a partir de células troncales pluripotentes podría, no solo proveer un modelo óptimo de estudio, sino además, proporcionar una fuente ilimitada de células β productoras de insulina para terapias regenerativas en pacientes con DT1.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo consiste en hacer un estudio en profundidad sobre las bases moleculares de la DT1 y las tecnologías actuales de cultivo de células pluripotentes humanas, su diferenciación y la generación de organoides pancreáticos, que nos permita proponer un sistema óptimo para la obtención de los mismos y su posible uso como terapia en pacientes con esta enfermedad. Para ello, detallamos los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar un estudio de las bases moleculares y celulares de la DT1.
2. Estudiar los métodos de obtención, cultivo y diferenciación de células pluripotentes humanas en células β pancreáticas.
3. Estudiar los métodos de generación de organoides pancreáticos.
4. Describir y compendiar los métodos de caracterización y estudio de los organoides pancreáticos y los conocimientos obtenidos a partir de ellos.

4. MÉTODO DE BUSQUEDA BIBLIOGRÁFICO

Los criterios y métodos de búsqueda bibliográfica se fijaron con el objetivo de realizar una búsqueda exhaustiva sobre el tema de investigación. Las plataformas que se utilizaron fundamentalmente fueron Google Scholar y Pubmed. Por otra parte, para elaborar la bibliografía, se utilizó el gestor bibliográfico Mendeley. Tanto las citas como el listado de referencias se redactaron conforme al estilo Harvard- Universidad de León.

En primer lugar, se desglosó el estudio de la diabetes en diferentes subapartados estableciendo conceptos clave en cada uno de ellos para una recopilación de información más concreta. De esta forma, los términos introducidos en la barra de búsqueda fueron tales como “molecular”, “model”, “transgenic”, “iPSC”, “assays”, entre otros. Se realizaron diferentes búsquedas utilizando terminos relacionados, sinónimos y los operados booleanos AND y OR.

Para obtener unos resultados más acordes a los objetivos de nuestro trabajo se aplicaron filtros como el idioma y la fecha de publicación, donde se seleccionaron artículos preferentemente en inglés y a partir del 2010.

Por otra parte, para seleccionar la bibliografía que se iba a utilizar se realizó una lectura en profundidad del resumen y las conclusiones del artículo para saber si se adaptaban a la clase de información que se desea incorporar en el trabajo y la relevancia en el tema de esta. La fecha de publicación fue otro de los criterios principales a la hora de seleccionar la bibliografía, buscando la actualidad y calidad de las publicaciones.

5. RESULTADOS

5.1. BASES MOLECULARES Y CELULARES DE LA DIABETES TIPO 1

5.1.1. FISIOLÓGIA DE LAS CÉLULAS β PANCREÁTICAS Y LA REGULACIÓN DE GLUCOSA

La regulación de los niveles de glucosa en sangre depende, fundamentalmente, de dos tipos de hormonas secretadas por las células endocrinas del páncreas ubicadas en los islotes de Langerhans: la insulina y el glucagón. Estas hormonas se sintetizan en las células β y α , respectivamente, y se liberan directamente al torrente sanguíneo para mantener la concentración de glucosa dentro del rango fisiológico, aproximadamente entre 4 y 6 mM (Röder *et al.*, 2016). Existen, además, otros tipos celulares presentes en menor medida en los islotes involucrados en este proceso de homeostasis: células γ productoras de polipéptido pancreático, células δ productoras de somatostatina y células ϵ productoras de ghrelina. Los 5 tipos celulares y las hormonas que producen colaboran para mantener la normogluceemia en la sangre, sin embargo, el papel de la insulina y glucagón es el más relevante en este proceso (Röder *et al.*, 2016).

La insulina y el glucagón son hormonas de acción opuesta y su función es disminuir y aumentar los niveles de glucosa plasmática, respectivamente. Tras la ingesta de alimentos, los niveles de glucosa exógena en la sangre aumentan y las células β sintetizan y secretan insulina. Esta hormona se une a sus receptores en tejidos como el músculo y el tejido adiposo y estimula la absorción de la glucosa, y, por tanto, su disminución en el torrente sanguíneo (Rodrigues-Oliveira *et al.*, 2023). La insulina además promueve la glucogénesis, permitiendo generar reservas de glucógeno a partir de la glucosa absorbida. Por otra parte, entre comidas o durante las horas de sueño, los niveles de glucosa descienden y las células α liberan glucagón. Esta hormona ejerce su función sobre todo a nivel hepático, promoviendo la glucogenólisis y la posterior liberación de glucosa a la sangre (Rodrigues-

Oliveira *et al.*, 2023). La acción equilibrada de estas dos hormonas en los tejidos sensibles a cada una de ellas es fundamental para el correcto mantenimiento de la homeostasis de la glucosa.

El principal estimulante de la secreción de insulina por las células β es la glucosa, pero también pueden intervenir en este proceso aminoácidos, ácidos grasos libres y diferentes hormonas (Marchetti *et al.*, 2017). Una vez en la sangre, la glucosa se une a los transportadores de glucosa 1 y 2 (GLUT1 y GLUT2) presentes en la membrana de las células, permitiendo que se interiorice en el citoplasma (Figura 1). En este punto, se incorpora al metabolismo catabólico celular gracias a la enzima glucoquinasa, que genera glucosa-6-fosfato, el primer intermediario de la glucólisis. Esta enzima se encuentra principalmente en las células β y tiene una función esencial a la hora de controlar la glucemia en la sangre (Marchetti *et al.*, 2017). Posteriormente, el piruvato obtenido de la glucólisis entra en la mitocondria y se descarboxila, dando lugar a la acetil-CoA en la matriz mitocondrial. Esta molécula inicia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos generando poder reductor en forma de NADH y FADH₂. Gracias a estas coenzimas se genera ATP en la cadena transportadora de electrones mediante la ATP sintetasa. El incremento de la relación ATP/ADP causa el cierre de los canales K⁺ sensibles a ATP que, en condiciones normales, se encuentran abiertos para mantener el potencial de reposo. Esto conlleva a la despolarización celular y provoca la apertura de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Figura 1). La acumulación de Ca²⁺ intracelular, finalmente, estimula la exocitosis desencadenando la liberación de gránulos de insulina a la sangre (Marchetti *et al.*, 2017).

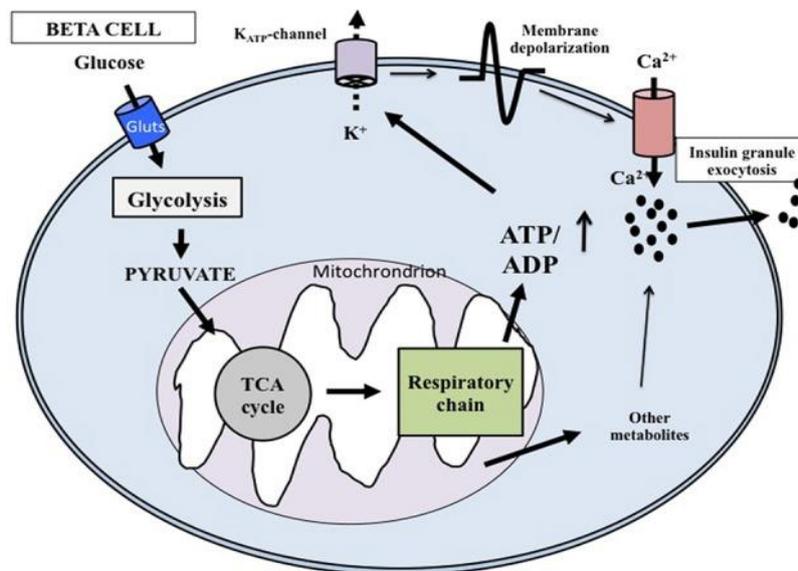


Figura 1. Secreción de insulina estimulada por glucosa. El ATP generado en el metabolismo catabólico de la glucosa induce cambios en los canales iónicos asociados a la membrana provocando, finalmente, la exocitosis y liberación de insulina al torrente sanguíneo. Imagen obtenida de Marchetti *et al.*, 2017.

La reducción de la masa de células β en los islotes pancreáticos provoca que estos mecanismos no puedan tener lugar tras la ingesta de alimentos o cuando aumentan las concentraciones de glucosa en sangre. Como consecuencia, se produce una alteración en la correcta regulación de la glucosa, ocasionando DT1.

5.1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA DT1

La DT1 es una enfermedad altamente compleja donde la interacción tanto de factores genéticos como ambientales desencadenan una respuesta inmune frente a las células β .

5.1.2.1. FACTORES GENETICOS

La DT1 es una enfermedad poligénica en la que intervienen hasta 60 loci y multitud de autoantígenos presentes en los islotes capaces de determinar la predisposición genética (Rodrigues-Oliveira *et al.*, 2018). Debido a estos factores, el riesgo de padecer DT1 para un niño con uno de los padres enfermos es del 1 al 9 %, y el riesgo entre hermanos del 6 al 9 %. Por otra parte, la concordancia entre gemelos monocigóticos es del 30 al 70 %, una cifra bastante superior a la observada en gemelos dicigóticos (DiMeglio *et al.*, 2018). La alta susceptibilidad que provocan los factores genéticos hace que la enfermedad sea principalmente diagnosticada en niños, adolescentes y jóvenes adultos.

Son muchos los genes que influyen en la predisposición, pero se ha establecido que la familia de genes que codifica para el antígeno leucocitario humano (*HLA*, del inglés *Human Leukocyte Antigen*), también llamado complejo mayor de histocompatibilidad, presenta el mayor riesgo genético a la DT1, especialmente los de clase II. Estas moléculas realizan la función de presentación antigénica en la respuesta inmunológica mediada por células T, por lo que se van a expresar en la superficie de células como macrófagos y células dendríticas y van a controlar el conjunto de antígenos que son presentados a estas células y que, por tanto, pueden generar una respuesta inmune. El locus *HLA II* es extraordinariamente polimórfico y está compuesto por varias subregiones formadas por loci específicos que codifican para distintos antígenos de superficie celular, tales como: *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DP*, *HLA-DQ*, *HLA-DR*. En particular, la DT1 se ha asociado con variantes alélicas de *HLA-DR* (*HLA-DR3* y *HLA-DR4*). La importancia de este locus se mostró por primera vez en un estudio de asociación que reveló que alrededor de 95 % de todos los pacientes con DT1 eran heterocigotos para *HLA-DR3* o *HLA-DR4* y que los heterocigotos *HLA-DR3/HLA-DR4* eran particularmente susceptibles a este tipo de diabetes. Existen haplotipos *HLA II* de susceptibilidad (*HLA-DR3* y *HLA-DR4-DQ8*) y haplotipos protectores (*HLA-DR15-DQ6*) (DiMeglio *et al.*, 2018).

Las moléculas HLA II, a su vez, se expresan en el epitelio del timo y están involucradas en el adquisición de autotolerancia por parte de las células T. En el timo y durante el desarrollo embrionario, se produce un proceso de selección negativa de aquellas células T que tienen una alta afinidad por moléculas propias del cuerpo humano. Si esta selección negativa falla, las células T que reconocen péptidos propios no serán eliminadas, desencadenando en enfermedades autoinmunes. Los haplotipos de susceptibilidad provocan una alteración en este proceso, permitiendo que las células T reactivas a la insulina u otras moléculas propias de las células β escapen de este proceso de selección negativa. A este nivel, también influyen genes que alteren la expresión de insulina y estas otras moléculas en el epitelio tímico (Saberzadeh-Ardestani *et al.*, 2018).

Existen otros genes involucrados en la predisposición genética a la diabetes, como el gen *PTPN22* que codifica para la tirosina fosfatasa específica de linfocitos (LYP, del inglés *Lymphoid Tyrosine Phosphatase*) y el gen *CTLA-4* que codifica para la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4, del inglés *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4*). LYP es un regulador negativo de los receptores de linfocitos T, lo que puede inhibir la selección negativa en el timo. CTLA-4, por otra parte, presenta una función inmunomoduladora por la cual reprime la función de las células T efectoras a partir de células T reguladoras. Las variantes de riesgo de los genes que codifican para ambas proteínas provocan alteraciones en las respuestas inmune y la autotolerancia (Saberzadeh-Ardestani *et al.*, 2018).

5.1.2.2. FACTORES AMBIENTALES

Entre los factores ambientales encontramos la dieta, el microbioma intestinal y la exposición a diferentes tipos de virus, sobre todo gastrointestinales. Como se comentó anteriormente, los datos de la concordancia entre gemelos monocigotos determinan que la DT1 no es una enfermedad exclusivamente genética. La interacción de los factores genéticos, junto a diversos factores ambientales, ha promovido no solo un aumento de la incidencia de la diabetes, si no también un adelanto en la edad en la que se desarrolla y manifiesta la enfermedad. Por ello, es imprescindible conocer los factores ambientales.

Uno de los principales factores ambientales es la infección por ciertos tipos de virus incluidos los enterovirus, los herpesvirus, los rotavirus, los retrovirus y los picornavirus (Rodríguez-Oliveira *et al.*, 2023). Existen diversos mecanismos por los cuales los virus pueden desencadenar diabetes. El primero de ellos, es una acción directa citolítica sobre las células β y, el segundo, es ocasionar una respuesta inmune sobre estas células que conduce a su destrucción. Este último mecanismo

generalmente ocurre debido a la similitud entre estructuras virales y los antígenos de las células β (Saberzadeh-Ardestani *et al.*, 2018).

De manera similar ocurre con la exposición temprana al gluten, la fruta y la leche bovina. Estos tres factores aumentan considerablemente el riesgo de autoinmunidad hacia las células β , especialmente en aquellos individuos que presenten moléculas HLA de susceptibilidad. En estos casos, la adquisición de autoinmunidad ocurre por mecanismos de reactividad cruzada, como sucede entre la insulina bovina y la insulina humana (Saberzadeh-Ardestani *et al.*, 2018). Otro factor ambiental importante en la aparición de la diabetes es la falta de vitamina D. Esto se debe a que la vitamina D, a parte de su evidente función en el metabolismo óseo y la homeostasis del calcio, presenta acción inmunomoduladora y antiinflamatoria que depende de su forma activa, el calcitriol (Infante *et al.*, 2019). Esta molécula actúa a nivel de las células presentadoras de antígenos (APC, del inglés *Antigen-Presenting Cell*), como las células dendríticas, inhibiendo su proliferación y maduración gracias a receptores nucleares. De esta forma, convierte a las células dendríticas en células más tolerogénicas. En los macrófagos, aunque promueve su activación y capacidad antimicrobiana, reduce la presentación antigénica e induce un cambio de un fenotipo proinflamatorio a uno antiinflamatorio. En general, el calcitriol, reduce la expresión de moléculas coestimuladoras en gran cantidad de células del sistema inmune y promueve la diferenciación y expresión de células T reguladoras, con actividad inmunomoduladora (Infante *et al.*, 2019). En conclusión, diversos componentes de la dieta pueden tener un papel directo en el desarrollo de la DT1, sin embargo, de manera indirecta, aquellas dietas poco saludables que conducen a la obesidad también pueden actuar como desencadenante de la enfermedad.

Otro de los factores ambientales que se describen es la microbiota intestinal. El microbioma es fundamental en los primeros años de vida para generar autotolerancia y controlar las respuestas antiinflamatorias. Si en esta etapa, la microbiota se encuentra desproporcionada y la abundancia de *Bacteroides*, *Bifidobacterias* y *E.coli* es variable (disbiosis) el individuo tiene posibilidad de padecer enfermedades autoinmunes como la DT1. Por otra parte, un microbioma intestinal reducido puede provocar la pérdida de autotolerancia y la propagación de señales proinflamatorias (Siljander *et al.*, 2019).

Por último, es importante tener en cuenta que los factores ambientales pueden cambiar la expresión génica mediante mecanismos epigenéticos, como la metilación del DNA, modificación de histonas o RNAs-no codificantes, induciendo a individuos con susceptibilidad génica a desarrollar la

enfermedad (Xie., *et al* 2014). Esto ha abierto nuevas puertas para el diseño de fármacos capaces de inhibir estos procesos, sin embargo, los mecanismos subyacentes son aún desconocidos.

5.1.2.3. MECANISMOS DE AUTOINMUNIDAD DE LA DT1

La DT1 se caracteriza por un fenómeno de infiltración masiva de células del sistema inmune en los islotes, denominado insulitis, como linfocitos T citotóxicos (T CD8+), linfocitos T auxiliares (T CD4+) y macrófagos, así como por la presencia de anticuerpos frente a antígenos de los islotes. Se han identificado varios antígenos propios de los islotes con capacidad de desencadenar respuesta inmune: insulina, la descarboxilasa del ácido glutámico 65 (GAD65, del inglés *Glutamic Acid Descarboxylase-65*), la tirosina fosfatasa (IA2, del inglés *Islet Antigen-2*) y el transportador de zinc 8 (ZnT8, del inglés *Zinc Transporter-8*), entre otros (Kahaly y Hansen, 2016). Los anticuerpos frente a estos antígenos sirven como marcadores moleculares de la DT1.

El proceso comienza cuando las APC, como las células dendríticas o los macrófagos, procesan y exponen en su superficie antígenos propios de las células β . Estos autoantígenos se presentan a linfocitos T naïve mediante las moléculas HLA de susceptibilidad a la DT1 y se generan linfocitos T CD4+ autorreactivos (Figura 2). Los linfocitos T CD4+ promueven, a su vez, la activación de linfocitos T CD8+ mediante la liberación de citoquinas. Todas las células T activadas se infiltran en los islotes y estimularán a los macrófagos y otras células T, desencadenando el fenómeno de insulitis y la destrucción de células β (Rodrigues-Oliveira *et al.*, 2023). Existe, además, una respuesta inmune de aparición tardía por la cual los linfocitos T CD4+ ayudan a la proliferación y maduración de los linfocitos B. Estas células generarán anticuerpos contra antígenos de las células β (Figura 2) promoviendo su destrucción mediante diferentes mecanismos, como la unión del sistema del complemento.

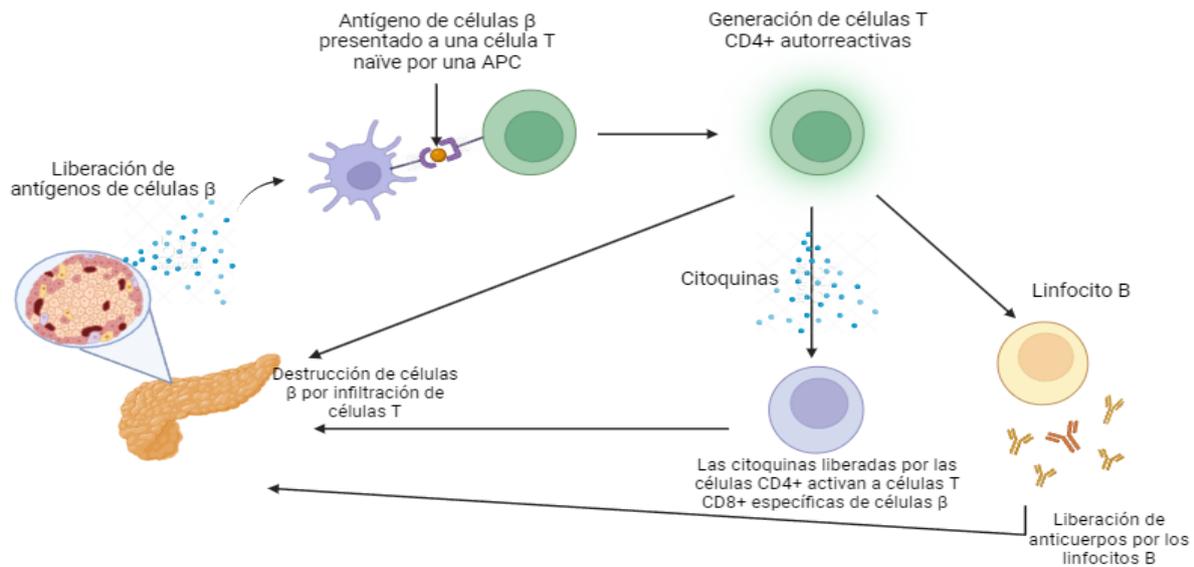


Figura 2. Mecanismos de autoinmunidad de la DT1. Las APC, linfocitos T CD4+ y CD8+ y linfocitos B cooperan para generar una respuesta inmune destructiva que reduce la masa de células β en los islotes. Imagen obtenida de Rodrigues-Oliveira *et al.*, 2023.

En conclusión, la gran cantidad de factores tanto genéticos como ambientales que participan en el desarrollo de la respuesta inmune provocan una manifestación muy heterogénea del momento de aparición, progresión y síntomas de la enfermedad lo que dificulta, aun más, el desarrollo de modelos de estudio válidos.

5.2. UTILIZACIÓN DE MODELOS ANIMALES

Los modelos con animales han sido de gran utilidad para conocer el desarrollo, la evolución y la patogenia de las enfermedades así como para realizar ensayos que ayuden a descubrir nuevas terapias eficaces para su tratamiento. Los modelos preclínicos de DT1 han sido fundamentales para entender esta enfermedad y diseñar tratamientos apropiados. Los roedores, ratas y ratones, son el modelo animal por excelencia para el estudio de diversas patologías debido, en gran medida, a la facilidad con la que se puede manipular su fondo genético y los factores ambientales que pueden influir en ellos. La manifestación de la DT1 en roedores se ha podido alcanzar de diferentes formas con éxito, siendo los modelos de roedores de diabetes espontánea e inducida, junto a los ratones transgénicos, los más utilizados en este campo.

5.2.1. MODELOS DE ROEDORES DE DIABETES ESPONTÁNEA

Existen ciertas cepas de roedores que desarrollan diabetes de manera espontánea. Su obtención se ha logrado mediante un proceso de selección de aquellos individuos con predisposición genética a la DT1 durante varias generaciones. De esta forma, se consigue obtener cepas cosanguíneas con un fondo genético enriquecido en genes de susceptibilidad a la diabetes que manifiestan la enfermedad

en algún momento de su vida. Las dos cepas de diabetes espontánea más utilizadas son el ratón diabético no obeso (NOD) y las ratas Bio-Breeding (BB) (Acharjee *et al.*, 2013).

Los ratones NOD son uno de los modelos animales más utilizados para el estudio de la DT1 debido a las similitudes con la fisiopatología humana. De igual manera que ocurría en humanos, los genes relacionados con el complejo mayor de histocompatibilidad son el principal componente de predisposición genética a la enfermedad en estos ratones (Kottaisamy *et al.*, 2021). En este caso, es el gen *I-Ag7*, el cual presenta homología con el haplotipo de susceptibilidad humano, *HLA-DQ8*, el responsable de una función inmunológica alterada. Por otra parte, los antígenos, como la insulina, con capacidad de desencadenar respuesta inmune en humanos, también se han identificado en estos ratones, y las células y mecanismos que intervienen, como la infiltración de células T y macrófagos en los islotes, es similar en ambas especies (Houeiss *et al.*, 2022). Por lo tanto, la cepa NOD, comparte tantos rasgos genéticos, como inmunológicos con la forma de diabetes humana, además de los síntomas clínicos típicos, lo que ha permitido el estudio e identificación de marcadores moleculares y dianas terapéuticas. Sin embargo, a pesar de las grandes coincidencias que presenta, este modelo no puede recrear fielmente la complejidad y heterogeneidad de la DT1 humana, haciendo imposible extrapolar los tratamientos curativos en ambas especies debido, principalmente, a las grandes diferencias que se originan en los pacientes durante la progresión de la enfermedad y en respuesta al tratamiento, y que no se pueden estudiar en profundidad con estos modelos (Houeiss *et al.*, 2022).

Otro modelo murino de diabetes espontánea de gran utilidad son las ratas BB, ocasionado por una mutación que afecta al complejo mayor de histocompatibilidad en la rata Wistar, una de las especies más utilizadas en investigación. Aproximadamente, el 90 % de las ratas BB desarrollan DT1 entre las 8 y 16 semanas de edad, en la etapa posterior a la pubertad, y se manifiesta con rasgos típicos de la enfermedad como hiperglucemia, hipoinsulinemia, pérdida de peso y la presencia de cuerpos cetónicos en la orina (cetonuria) (Kottaisamy *et al.*, 2021). Sin embargo, este modelo presenta una desventaja, pues, durante la etapa de infiltración de células del sistema inmune o insulinitis, se origina una linfopenia severa en linfocitos T CD4+ y una ausencia casi total de linfocitos T CD8+, un hecho que no ocurre en humanos, lo que lo convierte en un modelo cuestionado (Pandey y Dvorakova, 2020).

5.2.2. MODELOS DE ROEDORES DE DIABETES INDUCIDA

Además de los modelos espontáneos, se han utilizado modelos murinos diabéticos sin una predisposición genética de partida. Este método consiste en la inducción de la diabetes en los

animales mediante diferentes técnicas entre las que destaca, principalmente, la inducción farmacológica y, en menor medida, la inducción por exposición a virus, por dieta o inducción quirúrgica.

Algunos fármacos presentan la capacidad de inducir diabetes en modelos animales gracias a la destrucción específica de las células β de los islotes de Langerhans. Estos compuestos químicos se conocen como agentes diabetogénicos y los más empleados, a nivel global, son el aloxano y la estreptozotocina (STZ). La capacidad de inducción de la diabetes de estos agentes está determinada, en gran parte, por su estructura química, debido a que son análogos citotóxicos de la glucosa y se unen selectivamente a los transportadores GLUT2, ejerciendo un daño irreversible que conlleva a la destrucción y necrosis de las células β . Los mecanismos de acción del aloxano y STZ son ligeramente diferentes y en función de la dosis, la vía de administración y el tiempo de inducción es posible desencadenar tanto DT1 como DT2 (Martín-Carro *et al.*, 2023). Ambos fármacos son métodos no del todo seguros, pues, el transportador de membrana GLUT2 que utilizan se encuentran en otras células del organismo como en los túbulos renales y en el hígado, pudiendo generar insuficiente hepática y renal en el animal modelo de estudio (Martín-Carro *et al.*, 2023)

Uno de los factores de riesgo ambiental de la diabetes que se ha utilizado también para generar modelos animales de DT1 inducida, es la exposición a cierta clase de virus. En este caso, la destrucción de las células β se produce tanto por una infección directa de las mismas o mediante el inicio de una respuesta autoinmune contra estas células. Los virus que más se han empleado son el virus Coxsackie B, el virus de la encefalomiocarditis y el virus Kilham de las ratas (Pandey y Dvorakova, 2020).

5.2.3. MODELOS DE RATONES TRANSGÉNICOS

Aunque los modelos mencionados anteriormente manifiestan una enfermedad autoinmune similar a la de los humanos, las diferencias fisiológicas entre ambas especies hacen necesario afinar un modelo que represente de manera más fiel a la bioquímica de la enfermedad humana. Por este motivo, surgen los ratones diabéticos transgénicos o también llamados ratones “humanizados”. El empleo de estos modelos permitirá reproducir las características de la enfermedad humana en ratones y ratas y el estudio *in vivo* de los mecanismos moleculares que intervienen, así como el ensayo de terapias y fármacos que puedan emplearse para tratar a pacientes en el ámbito clínico.

La primera aproximación se basó en incluir en el genoma de los ratones genes que determinan la susceptibilidad genética en humanos. Como se indicó anteriormente, las moléculas HLA II y HLA I están implicadas tanto en el inicio de la respuesta inmune como en la progresión de la enfermedad,

respectivamente, y los diferentes alelos y sus combinaciones pueden involucrarse de diferente forma en este proceso. La expresión de todas las variantes posibles de estas moléculas en ratones ha permitido el estudio del papel y la función de cada alelo HLA en la DT1, determinando aquellos haplotipos que confieren protección y aquellos que dotan a los individuos de una predisposición genética a esta patología. De esta forma, se identificó el haplotipo *HLA-DQ6* como protector de la enfermedad, mientras que la expresión conjunta del haplotipo *HLA-DQ8* y la molécula co-estimuladora humana B7.1, generaba el mayor grado de incidencia de DT1 en ratones transgénicos (Houeiss *et al.*, 2022).

Además, la tecnología transgénica ha permitido reconocer cuales son los epítomos de los antígenos que se presentan en la superficie de estas moléculas HLA y que son reconocidos por las células T. Esto se ha conseguido generando ratones transgénicos HLA que, a su vez, expresan antígenos humanos, como la insulina humana o GAD65 humano (Houeiss *et al.*, 2022). La información obtenida, se ha empleado en tratamientos de inmunoterapia antígeno específica, con el fin de restaurar la autotolerancia en el individuo. La importancia de estos modelos radica en que se han observado diferencias en los epítomos que son reconocidos por las células T en función de si los ratones expresan insulina humana o insulina murina debido, principalmente, a diferencias estructurales entre ambas proteínas. De esta forma, las dianas terapéuticas utilizadas en la inmunoterapia son diferentes en ambos casos (Houeiss *et al.*, 2022).

A pesar de los avances que se lograron con estos modelos transgénicos, las diferencias entre el sistema inmune del ratón y los humanos sigue suponiendo un impedimento considerable a la hora de generar y evaluar tratamientos eficaces. Debido a esto, surgió el modelo del ratón NOD inmunodeficiente humanizado. El modelo se consiguió, en primer lugar, generando mutaciones en el gen *IL2RG* que codifica para la subunidad gamma del receptor de la interleucina (IL-2). La IL-2 es una citoquina fundamental para la proliferación de células T, por lo que si se altera su receptor en estas células se obtiene un individuo sin un sistema inmune funcional. Posteriormente, se injertan células y tejidos inmunitarios humanos para dotar al ratón NOD de un sistema inmunitario humanizado (Chen *et al.*, 2022). Este modelo fue de especial interés para evaluar los rechazos que se podían generar con un aloinjerto de islotes humanos en el tratamiento para la diabetes, así como para evaluar la proliferación *in vivo* de células β procedentes de células troncales, un tratamiento prometedor para combatir la escasez de los islotes humanos (Houeiss *et al.*, 2022).

Estos modelos animales, ofrecen la oportunidad de estudiar de manera sistémica todos los acontecimientos, interacciones y cambios bioquímicos que ocurren en un proceso patológico.

Además, presentan una fisiología comparable con los humanos y un pequeño tamaño que permite su fácil manipulación. A pesar de las ventajas, el coste y el tiempo de obtención junto a las limitaciones en cuanto a la equivalencia con la biología humana los convierte en modelos cuestionados (Corsini y Knoblich, 2022).

5.3. UTILIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES COMO MODELO DE ESTUDIO

A pesar de los avances obtenidos con los modelos antes mencionados, el estudio de esta enfermedad sigue requiriendo de modelos que recreen el desarrollo y funcionamiento de las células β humanas. Para ello, ha sido necesario desarrollar métodos que permitan la obtención y mantenimiento de dichas células en cultivo a largo plazo. En este sentido, las nuevas tecnologías de cultivo celular han permitido un nuevo enfoque de modelado de la diabetes basado en la generación de células β productoras de insulina a partir de células troncales pluripotentes (PSC, del inglés *Pluripotent Stem Cells*). Existen diferentes tipos de células pluripotentes en función de su origen que se han utilizado en protocolos de diferenciación. El primero de ellos son las células troncales embrionarias humanas (hESC, del inglés *human Embryonic Stem Cells*), derivadas de la masa interna del blastocisto y capaces de diferenciarse a cualquier tipo celular de las tres hojas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) (Liu *et al.*, 2020). Sin embargo, este tipo celular tiene alguna contraposición ética causada por la necesidad de ser obtenidas a partir de embriones, generalmente provenientes de clínicas de fertilidad. Las células troncales pluripotentes inducidas (iPSC, del inglés *induced Pluripotent Stem Cells*), generadas mediante la reprogramación de células somáticas adultas (Liu *et al.*, 2020), suponen una alternativa socialmente más aceptada.

5.3.1. GENERACIÓN, CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES HACIA CÉLULAS B-PANCREÁTICAS

Las iPSC se derivan a partir de células somáticas adultas mediante un proceso de reprogramación celular en el que, mediante una serie de factores de transcripción que controlan la identidad celular, se consigue borrar la especialización de las células adultas y revertirlas a un estado indiferenciado con capacidad de auto-renovación ilimitada (*self-renewal*) y pluripotencia similar a la de las hESC. El método original publicado por el grupo de Yamanaka en 2006 (Takahashi y Yamanaka, 2006), utilizó la transducción retroviral para expresar cuatro factores de transcripción denominados desde entonces “Factores Yamanaka” (Oct4, Sox2, Klf4, y c-Myc) en fibroblastos embrionarios de ratón. Un año más tarde, el mismo grupo reportó la reprogramación de fibroblastos dermales de humano adulto, con una eficiencia del 0,02%, utilizando la misma metodología (Takahashi *et al.*, 2007). Tras este descubrimiento inicial, el campo de la reprogramación celular ha avanzado rápidamente,

mejorando los sistemas de introducción de los factores en las células, incrementando la eficiencia y minimizando o eliminando la integración de los factores exógenos expresados, tras la reprogramación (Zakrzewski *et al.*, 2019).

En lo referido al mantenimiento en cultivo de las iPSC, ha sido necesario diseñar medios de cultivo que nos permitan mantener el estado de pluripotencia y autorrenovación durante el subcultivo. Paralelamente, se han desarrollado diversos métodos de cultivo, pero nos centramos en los dos más utilizados: los basados en células alimentadoras (“*feeder cells*” en inglés) y aquellos libres de estas células, donde los factores de crecimiento y proteínas necesarias se añaden mediante suplementos adicionales (Kimura *et al.*, 2018).

Antes de la utilización de estas células, es necesario caracterizarlas con el fin de asegurar que mantiene las propiedades de las células pluripotentes. Para ello, se realiza tanto una evaluación fenotípica como un análisis del perfil de la expresión génica para confirmar la presencia de marcadores moleculares de pluripotencia (Figura 3). Morfológicamente, las células troncales presentan una relación núcleo/citoplasma bastante alto. Además, forman unas colonias planas y con bordes definidos, que permite diferenciarlas de manera visual de las células diferenciadas. El análisis de las marcas epigenéticas son otra forma de evaluar la pluripotencia, ya que, generalmente, la metilación del DNA conduce al silenciamiento de genes de pluripotencia, lo que reduce la capacidad de diferenciación. También, se pueden realizar diversas pruebas enzimáticas como el de la fosfatasa alcalina, una enzima sobreexpresada en PSCs. Para demostrar la pluripotencia de estas células *in vitro*, se las puede someter a un protocolo de diferenciación mediante la formación de agregados celulares formados en cultivos en suspensión en ausencia de factores de mantenimiento de pluripotencia, denominados cuerpos embrioides (EBs, del inglés *embryoid bodies*). Estos EB, que asemejan los estadios iniciales del desarrollo humano, generaran células de los tres linajes embrionarios. Finalmente, el ensayo de generación de teratomas en ratón permite confirmar la capacidad de autorrenovación y pluripotencia *in vivo* (Zakrzewski *et al.*, 2019).

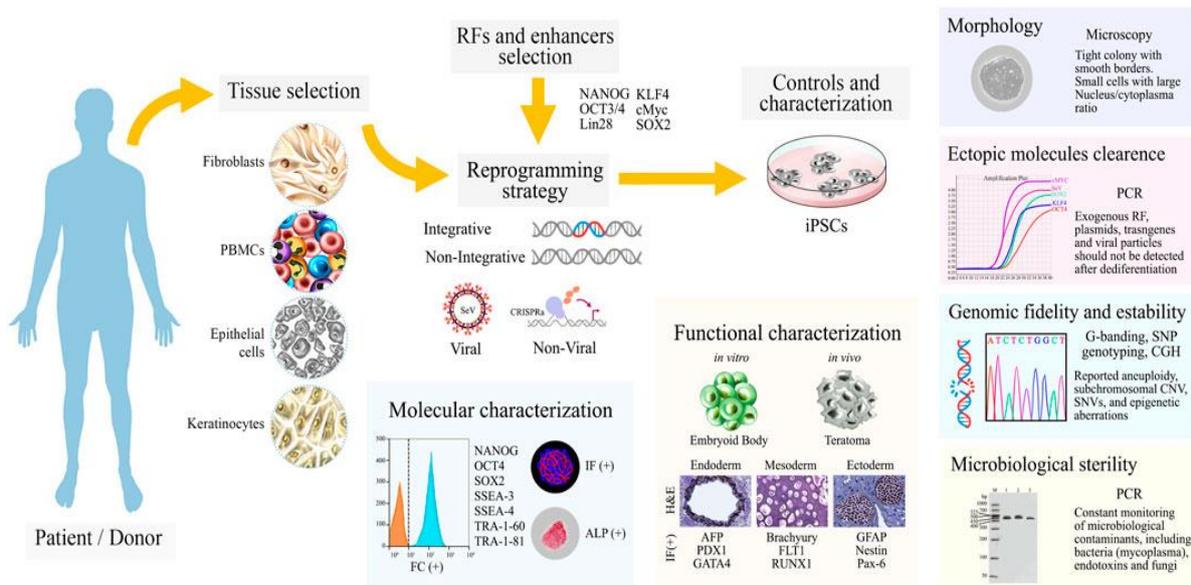


Figura 3. Descripción esquemática de la obtención de iPSC y los métodos de caracterización. Imagen obtenida de Amorós *et al.*, 2022.

De esta manera, la generación de iPSC nos permite trabajar con las células propias del paciente evitando rechazos y terapias inmunosupresoras y aportando el fondo genético del propio paciente (Bourgeois *et al.*, 2021). Además, la importancia de las iPSC radica, en que proporcionarían una nueva fuente de células β constante y uniforme, ya que son un material idóneo para la generación de biobancos de células vivas, existiendo en estos momentos varios Biobancos de iPSC en Europa (Balboa *et al.*, 2019) (<https://www.ebisc.org>, www.hipsci.org).

La generación de un protocolo eficiente para obtener células β derivadas de células troncales (SC- β , del inglés *stem-derived pancreatic β -cells*) se ha basado en el conocimiento del desarrollo pancreático en modelos animales. Las diferentes etapas del proceso de diferenciación se acompañan de factores de transcripción y de crecimiento y otras moléculas que tratan de imitar las señales del desarrollo, con el fin de obtener SC- β maduras y funcionales de forma similar a como ocurriría *in vivo* (Balboa *et al.*, 2019).

Las características fundamentales de las SC- β maduras que se buscan con estos protocolos son tres: células mono-hormonales y productoras de insulina, sensibles a glucosa y que expresen los marcadores apropiados de las células β (Memon y Abdelalim, 2020). Los marcadores moleculares son clave para asegurar que la diferenciación hacia el linaje pancreático se está realizando con éxito, especialmente, se ha determinado que la expresión de los factores de transcripción Homeobox 1 del Páncreas y Duodeno (PDX1) y Homeobox 1 NK6 (NKX6-1), esenciales en la etapa de progenitores pancreáticos, es fundamental para evitar fenotipos SC- β inmaduros y poli-hormonales, esto es, que

además de insulina, coexpresen otras hormonas como glucagón y somatostatina (Hogrebe *et al.*, 2021).

Los avances en el conocimiento de las rutas de señalización que intervienen, los factores de transcripción que los modulan y los marcadores moleculares que han de expresarse en cada etapa, han permitido establecer un protocolo de diferenciación *in vitro* de SC- β en 6 etapas (Figura 3). Durante este proceso, las iPSC se irán diferenciando en diferentes tipos celulares de manera similar a como ocurre durante la organogénesis del páncreas: células del endodermo definitivo, células del tubo intestinal posterior, progenitores pancreáticos, células endocrinas y finalmente, SC- β (Hogrebe *et al.*, 2021).

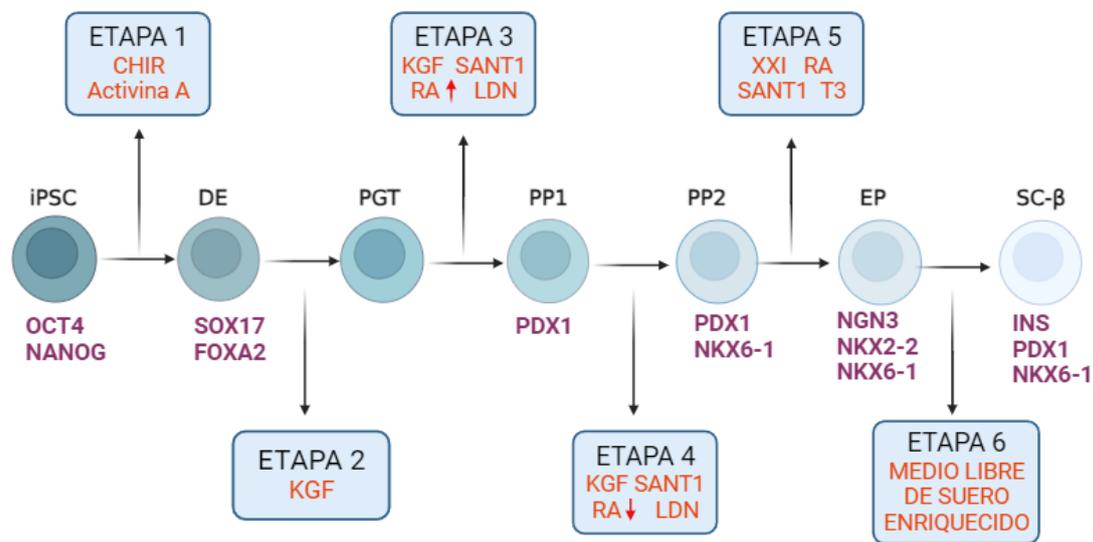


Figura 4. Etapas de la diferenciación secuencial de las iPSC hacia: endodermo definitivo (DE), tubo intestinal posterior (PGT), progenitores pancreáticos 1 y 2 (PP1 y PP2), precursores endocrinos (EP) y SC- β . En rojo se muestran los factores que se han de añadir en cada fase y en morado los marcadores moleculares de cada tipo celular. Imagen obtenida y modificado de Hogrebe *et al.*, 2021.

En primer lugar, mediante el tratamiento de las iPSC con Activina A y el agonista de la vía Wnt, CHIR99021 (CHIR), se obtiene células del endodermo definitivo adecuadas para la especificación posterior al linaje pancreático (Figura 3, células DE) (Hogrebe *et al.*, 2021). Posteriormente, y debido a que el páncreas proviene de la región posterior del tubo intestinal, se aplica el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF, del inglés *Keratinocyte Growth Factor*), el cual ayuda a generar células propias de esta estructura (Figura 3, células PGT) (Hogrebe *et al.*, 2021).

Una vez las células PGT se han obtenido correctamente, el siguiente paso es generar progenitores pancreáticos (PP1/2) que expresen PDX1 y NKX6-1. Del tubo intestinal primitivo, además de células pancreáticas, se van a derivar otros tipos celulares propios de otros órganos, como el

estómago y el hígado, por lo que es necesario inhibir las rutas que conllevan a una diferenciación no pancreática. El factor LDN193189 (LDN) inhibe la síntesis de la proteína morfogénica ósea (BMP, del inglés *Bone Morphogenetic Proteins*), que estimula el desarrollo hepático, y el factor SANTI reprime la señalización de la proteína Sonic Hedgehog (SHH), que conlleva a la formación del estómago y el duodeno. Estas moléculas, junto a KGF y ácido retinoico (RA), van a permitir la obtención de progenitores pancreáticos que expresen PDX1 (Figura 3, células PP1). Para que, además, se exprese el marcador NKX6-1, el cóctel de factores será el mismo, pero disminuyendo las concentraciones de RA (Figura 3, células PP2) (Hogrebe *et al.*, 2021).

La decisión de las células PP entre el camino exocrino o endocrino proviene, fundamentalmente, de cómo se regule la vía de señalización Notch. La inhibición de esta vía es fundamental para que el compromiso endocrino comience, lo que se manifiesta en las células precursoras endocrinas (EP) con la expresión del marcador Neurogenina3 (NGN3) (Figura 3, células EP) (Memon y Abdelalim, 2020). La inhibición de la vía Notch se logra añadiendo factores como el inhibidor de la secretasa γ (XXI), hormona tiroidea (T3), SANTI y RA, entre otros. Para asegurar la correcta diferenciación en este punto, es crucial comprobar la presencia del marcador NGN3 (Hogrebe *et al.*, 2021). Finalmente, de las células EP obtendremos las células SC- β maduras y funcionales. Estas células pueden ser utilizadas para su injerto en pacientes con DT1 y así ayudar a restablecer la normoglucemia gracias a la liberación de insulina.

Estos modelos basados en cultivos de células bidimensionales (2D) presentan facilidad en su manipulación y análisis. Sin embargo, este sistema puede no presentar todas las características de una enfermedad, generando modelos de estudio incompletos donde se obvian interacciones celulares y rutas de señalización que pueden intervenir en gran medida en la enfermedad. Como alternativa, surgen los cultivos celulares tridimensionales (3D), cuyo enfoque más reciente se basa en la generación de organoides.

5.4. UTILIZACIÓN DE ORGANOIDES PANCREÁTICOS COMO MODELO DE ESTUDIO

Un organoide es una estructura 3D creada a partir de células troncales o progenitores que, mediante procesos de autoorganización, reproducen parcialmente la arquitectura y función de un órgano o tejido específico, lo que permite estudiar su función y comportamiento y utilizarse para su trasplante en el tratamiento de diferentes patologías (Corsini y Knoblich, 2022). En este caso, se estudian los métodos de obtención de organoides pancreáticos a partir de PSCs y se detallan los conocimientos obtenidos a partir de ellos.

5.4.1. GENERACIÓN DE ORGANOIDES PANCREÁTICOS

Para generar organoides pancreáticos es necesario, en primer lugar, determinar todos los tipos celulares y componentes que, de manera natural, forman parte de este órgano o de los diferentes tejidos que lo conforman. Además, es importante determinar las diferentes etapas y estrategias de cultivo que se pueden emplear para la obtención de la estructura 3D de los organoides (Akolpoglu *et al.*, 2021).

En el caso de los islotes, la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS, del inglés *Glucose-Stimulated Insulin Secretion*) es un proceso que no depende exclusivamente de las células β , ya que requiere de interacciones con otros tipos celulares durante su proliferación (Karimova *et al.*, 2022). En los islotes, el tipo celular más predominante y el cual se encarga de realizar la principal función de este órgano, son las células endocrinas. Los organoides de islotes pancreáticos deben contener, por tanto, los cinco tipos de células endocrinas: α , β , γ , δ y ϵ . La señalización paracrina que ejercen las hormonas liberadas por estas células es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en la sangre y, por tanto, para el correcto funcionamiento de los organoides (Karimova *et al.*, 2022). El empleo de iPSC para generar las diversas células endocrinas sigue protocolos parecidos a los utilizados para la obtención de SC- β , y la optimización de este proceso de diferenciación para generar fenotipos más maduros contribuye a la mejora en la eficacia de los organoides (Zhang *et al.*, 2022).

Los islotes son órganos muy vascularizados y es por ello por lo que la incorporación de células endoteliales y pericitos pancreáticos es un paso clave en la generación de organoides pancreáticos (Karimova *et al.*, 2022). La incorporación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un potente inductor de la formación de vasos sanguíneos ha conseguido mejorar la vascularización de estas estructuras (Akolpoglu *et al.*, 2021). Por otra parte, la inervación mediante nervios simpáticos y parasimpáticos del sistema nervioso autónomo es otro proceso a tener en cuenta, ya que, mediante la liberación de neurotransmisores se puede reprimir o estimular la respuesta GSIS. Cuando se estimula el nervio simpático se libera noradrenalina, lo que inhibe la liberación de insulina, sin embargo, cuando se secretan neuropéptidos parasimpáticos como la acetilcolina se promueve la liberación de insulina por la activación de los receptores muscarínicos de las células SC- β (Akolpoglu *et al.*, 2021). Por lo tanto, la incorporación de células nerviosas que liberen estos neurotransmisores en los organoides es necesaria para que se integren todos los mecanismos posibles de regulación de la glucosa tal y como ocurriría en los islotes nativos.

Otro tipo celular que debe estar presente en los organoides de islotes pancreáticos son los macrófagos ya que, en condiciones normales, pueden participar en la regulación de la homeostasis y proliferación de las SC- β (Karimova *et al.*, 2022). Por último, los componentes de la matriz extracelular (MEC) son imprescindibles para realizar funciones como el anclaje celular, soporte del tejido, comunicación célula-célula, transmisión de señales y reserva de nutrientes y factores de crecimiento (Akolpoglu *et al.*, 2021).

Una vez definidos todos los tipos celulares y componentes que debe contener, es importante establecer un protocolo que nos permita obtener un organoide con las características deseadas. Existen múltiples protocolos para la generación de organoides pancreáticos, pero todos ellos implican una serie de etapas secuenciales que dirigen la diferenciación *in vitro* de PSCs, incluyendo iPSC, hacia la formación de organoides pancreáticos garantizando funcionalidad y la semejanza con el órgano nativo. A continuación, describimos como ejemplo uno de estos protocolos, el cual imita el desarrollo de los conductos pancreáticos y fue utilizado con éxito para modelar ciertas enfermedades de este órgano (Breunig *et al.*, 2021; Breunig *et al.*, 2021).

El éxito de este protocolo estriba en el correcto cultivo y mantenimiento de las PSCs de inicio. Las PSCs se han de mantener al menos una semana en cultivo antes de iniciar el protocolo de diferenciación. La primera etapa de la generación de organoides consiste en la diferenciación de las células pluripotentes hacia progenitores pancreáticos (PP) (Figura 5, “Step I”). Como se explicó anteriormente, los PP son células multipotentes capaces de generar células acinares, ductales y endocrinas. Este proceso de doce días comienza con la siembra de las PSCs en un cultivo bidimensional (2D), sobre Matrigel (Figuras 5 y 6, día 0). A continuación, se irá cambiando secuencialmente los medios de cultivo, los cuales contienen los distintos factores necesarios para dirigir la diferenciación celular (Figure 6, azul). Al final de esta etapa, es necesario confirmar la presencia de PP mediante el análisis de la expresión de los marcadores que las definen como explicamos anteriormente.

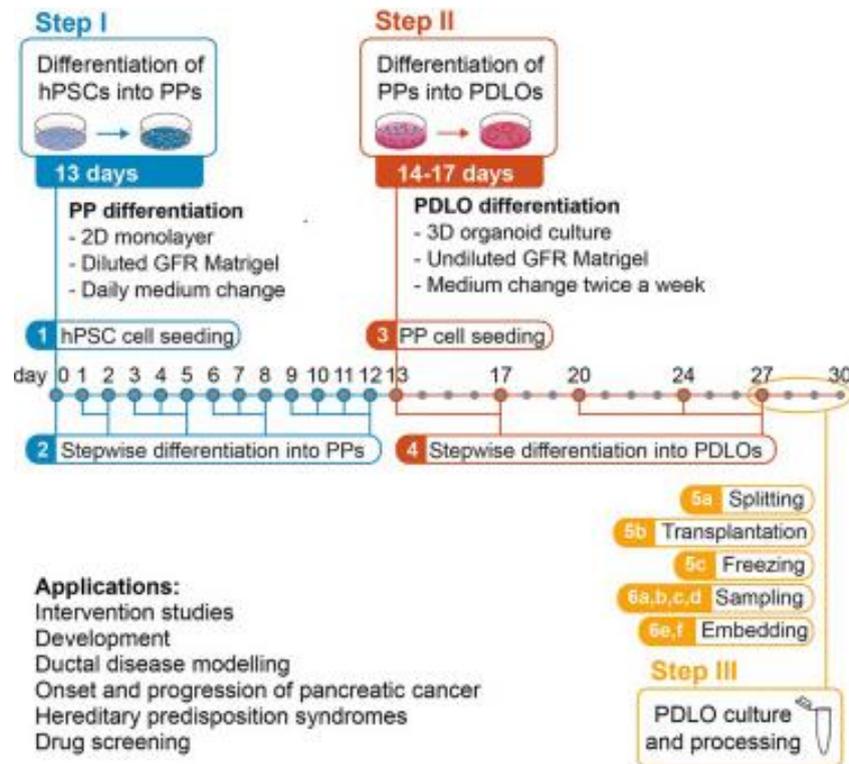


Figura 5. Protocolo de generación de organoides de islotes pancreáticos con un paso intermedio de obtención y expansión de progenitores pancreáticos. Imagen obtenida Breunig *et al.*, 2021.

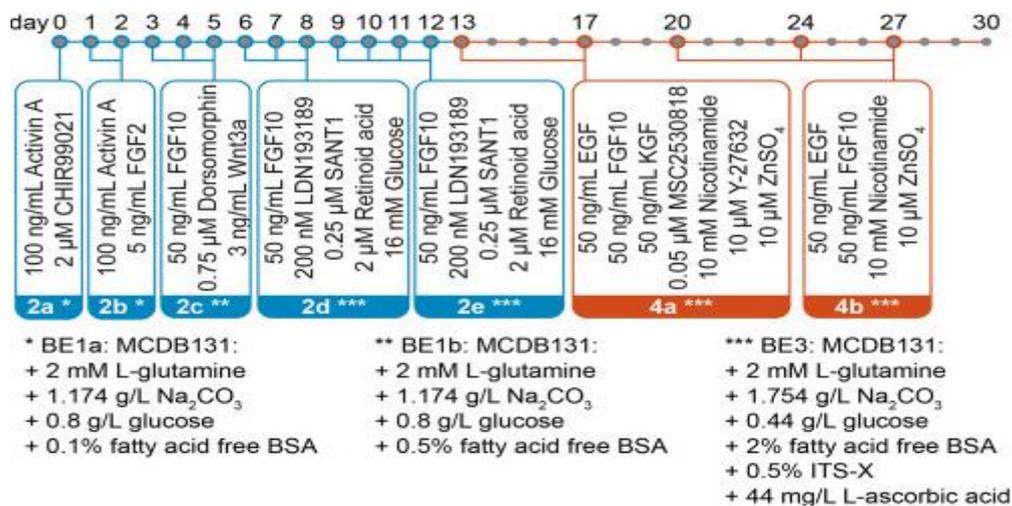


Figura 6. Composición de los medios de diferenciación utilizados en las etapas I (azul) y II (naranja) del proceso de obtención de organoides pancreáticos. Imagen obtenida de Breunig *et al.*, 2021.

Posteriormente, comienza el proceso de obtención de los organoides similares a conductos pancreáticos (PDLO, del inglés *Pancreatic Duct-Like Organoids*) (Figura 5, “Step II”). Mientras que la etapa I se realiza en cultivos 2D, la formación del PDLO requiere cultivos 3D. Para ello, el día 13, los PPs se disocian para obtener células independientes, y se siembran embebidas en

Matrigel, el cual actúa como un soporte estructural, proporcionando un ambiente adecuado para el crecimiento y la organización 3D de las células. Este entorno favorecerá la agregación y la formación de estructuras similares a los islotes. Como en la etapa anterior, el cambio secuencial de medios de cultivo, conteniendo los factores adecuados, inducirá la diferenciación a los distintos tipos celulares que componen el PDLO y el autoensamblaje de estas, con el fin de obtener una estructura lo más parecida posible al órgano nativo (Figura 6, naranja). Tras un periodo entre 14 y 17 días los PDLOs se recogen, se congelan y se almacenan para su futura utilización.

Antes de utilizar los organoides generados han de someterse a una caracterización que permita asegurar que estos han adquirido una madurez y funcionalidad adecuada para su estudio o trasplante. Esta caracterización debe incluir análisis morfológicos y funcionales, así como estudios de transcriptómica y metabolómica (Breunig *et al.*, 2021). En el caso de organoides de islotes pancreáticos, los perfiles metabólicos tienen que reflejar una producción y secreción de insulina proporcional a los niveles de glucosa. Además, mediante el perfil transcriptómico de las células, se puede valorar la presencia de marcadores de madurez esenciales para asegurar la función y producción de insulina adecuada (Balboa *et al.*, 2022).

Por una parte, análisis transcriptómicos realizados en organoides de islotes mostraron la presencia de marcadores de madurez propios de células β , donde destaca principalmente la insulina. Igualmente, genes implicados en el metabolismo de la glucosa y la exocitosis de insulina estaban regulados al alza, lo que puede contribuir a una respuesta GSIS óptima. Por otra parte, los estudios metabólicos indicaron un metabolismo oxidativo y una respiración mitocondrial inducida por glucosa disminuida frente a los islotes nativos, lo que se traduce un metabolismo de la glucosa aún inmaduro (Balboa *et al.*, 2022).

Son amplios los conocimientos que se han obtenido con los organoides pancreáticos pues, han demostrado su utilidad como modelos para comprender tanto la embriogénesis del páncreas como para analizar la DT1 y los mecanismos de autodestrucción celular asociados, además de otras enfermedades propias de este órgano. Esto se debe a la marcada homología estructural y funcional que presentan con los tejidos pancreáticos nativos (Bittenglova *et al.*, 2021). Además, estos modelos en laboratorio han servido para la identificación de marcadores tempranos de DT1 y el ensayo de tratamientos farmacológicos. Asimismo, a medida que avanza la investigación, los organoides pancreáticos también abren las puertas a la medicina regenerativa para la terapia de remplazo en pacientes con DT1. Esto es debido a que los organoides, pueden replicar funciones endocrinas, como la producción de insulina, y ofrecen un suministro sostenible de células SC- β . Sin

embargo, aún se enfrentan desafíos clave que hay que superar para que esta tecnología sea una solución clínica completamente efectiva y segura en el futuro. Entre estos desafíos, se encuentra la prevención del rechazo inmunológico, la vascularización, la optimización del metabolismo de glucosa y la seguridad y funcionamiento a largo plazo (Bittenglova *et al.*, 2021).

6. CONCLUSIONES

Los modelos de estudio en la investigación de la DT1 abarcan tanto modelos animales como PSCs y organoides. Cada uno de estos modelos ofrece una perspectiva diferente sobre la enfermedad. Los modelos animales, como ratones transgénicos, han permitido obtener una visión sistémica de la enfermedad y conocer los mecanismos inmunológicos y metabólicos subyacentes. Por otro lado, las PSCs, mediante su diferenciación y cultivo, pretenden generar una fuente renovable e ilimitada de SC- β . Los organoides, por otra parte, proporcionan un enfoque tridimensional para estudiar la enfermedad y probar terapias.

Cada uno de estos métodos presenta áreas para mejoras y avances futuros. En modelos animales, la tecnología transgénica podría mejorarse para reflejar con mayor precisión la respuesta humana a las terapias. En cuanto a las PSCs, una optimización de los protocolos de diferenciación y técnicas de cultivo de SC- β aceleraría la terapia regenerativa. La tecnología de los organoides presenta, también, varias posibilidades de mejora como la creación de un microambiente de cultivo más similar al entorno nativo, la eficiencia en la generación y la viabilidad a largo plazo de estas estructuras. Estos modelos de estudio no son excluyentes, sino complementarios. Juntos, han contribuido significativamente a nuestra comprensión de la DT1 y al desarrollo de tratamientos más precisos. En particular, la terapia regenerativa basada en PSCs y organoides pancreáticos podría suponer un tratamiento revolucionario al permitir restaurar las funciones pancreáticas encargadas de regular la glucemia en la sangre y así mejorar la calidad de vida de quienes padecen DT1 e incluso llegar a obtener una cura definitiva a la enfermedad. La tecnología en este campo está avanzando rápidamente. En la actualidad, se está combinando el cultivo conjunto de diferentes organoides que modelan los diferentes órganos humanos afectados por una enfermedad concreta. De esta forma, se podrá recapitular la patología una manera integral. Sin embargo, estos estudios están aún en sus albores y requerirán mayor desarrollo antes de una posible aplicación biomédica.

7. REFERENCIAS

- Acharjee, S., Ghosh, B., Al-Dhubiab, B. E. y Nair, A. B. (2013) "Understanding type 1 diabetes: Etiology and models", *Canadian Journal of Diabetes*, 37(4), pp. 269-276. doi:10.1016/j.jcjd.2013.05.001.
- Akolpoglu, M. B., Inceoglu, Y., Bozuyuk, U., Sousa, A. R., Oliveira, M. B., Mano, J. F. y Kizilel, S. (2021) "Recent advances in the design of implantable insulin secreting heterocellular islet organoids", *Biomaterials*, 269:120627. doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120627.
- Amorós, M. A., Choi, E. S., Cofré, A. R., Dokholyan, N. V. y Duzzioni, M. (2022) "Motor neuron-derived induced pluripotent stem cells as a drug screening platform for amyotrophic lateral sclerosis", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10:962881. doi:10.3389/fcell.2022.962881.
- Balboa, D., Barsby, T., Lithovius, V., Saarimäki-Vire, J., Omar-Hmeadi, M., Dyachok, O., Montaser, H., Lund, P. E., Yang, M., Ibrahim, H., Näätänen, A., Chandra, V., Vihinen, H., Jokitalo, E., Kvist, J., Ustinov, J., Nieminen, A. I., Kuuluvainen, E., Hietakangas, V., Katajisto, P., Lau, J., Carlsson, P. O., Barg, S., Tengholm, A. y Otonkoski, T. (2022) "Functional, metabolic and transcriptional maturation of human pancreatic islets derived from stem cells", *Nature Biotechnology*, 40(7), pp. 1042-1055. doi:10.1038/s41587-022-01219-z.
- Balboa, D., Saarimäki-Vire, J. y Otonkoski, T. (2019) "Concise Review: Human Pluripotent Stem Cells for the Modeling of Pancreatic β -Cell Pathology", *Stem Cells*, 37(1), pp. 33-41. doi:10.1002/stem.2913.
- Bittenglova, K., Habart, D., Saudek, F. y Koblas, T. (2021) "The Potential of Pancreatic Organoids for Diabetes Research and Therapy", *Islets*, 13(5-6), pp. 85-105. doi:10.1080/19382014.2021.1941555.
- Bourgeois, S., Sawatani, T., Van Mulders, A., De Leu, N., Heremans, Y., Heimberg, H., Cnop, M. y Staels, W. (2021) "Towards a functional cure for diabetes using stem cell- derived beta cells: Are we there yet?", *Cells*, 10(1), p.191. doi:10.3390/cells10010191.
- Breunig, M., Merkle, J., Melzer, M. K., Heller, S., Seufferlein, T., Meier, M., Hohwieler, M. y Kleger, A. (2021) "Differentiation of human pluripotent stem cells into pancreatic duct-like organoids", *STAR Protocols*, 2(4), p. 100913. doi:10.1016/j.xpro.2021.100913.
- Breunig, M., Merkle, J., Wagner, M., Melzer, M. K., Barth, T. F. E., Engleitner, T., Krumm, J., Wiedenmann, S., Cohrs, C. M., Perkhofer, L., Jain, G., Krüger, J., Hermann, P. C., Schmid, M., Madácsy, T., Varga, Á., Griger, J., Azoitei, N., Müller, M., Wessely, O., Robey, P. G., Heller, S., Dantes, Z., Reichert, M., Günes, C., Bolenz, C., Kuhn, F., Maléth, J., Speier, S., Liebau, S., Sipos, B., Kuster, B., Seufferlein, T., Rad, R., Meier, M., Hohwieler, M. y Kleger, A. (2021) "Modeling plasticity and dysplasia of pancreatic ductal organoids derived from human pluripotent stem cells", *Cell Stem Cell*, 28(6), pp. 1105-1124.e19. doi:10.1016/j.stem.2021.03.005.
- Chen, J., Liao, S., Xiao, Z., Pan, Quanren, Wang, X., Shen, K., Wang, S., Yang, L., Guo, F., Liu, H. F. y Pan, Qingjun (2022) "The development and improvement of immunodeficient mice and humanized immune system mouse models", *Frontiers in Immunology*, 13:1007579. doi:10.3389/fimmu.2022.1007579.
- Corsini, N. S. y Knoblich, J. A. (2022) "Human organoids: New strategies and methods for analyzing human development and disease", *Cell*, 185(15), pp. 2756-2769. doi:10.1016/j.cell.2022.06.051.
- DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C. y Oram, R. A. (2018) "Type 1 diabetes", *The Lancet*, 391(10138), pp. 2449-2462. doi:10.1016/S0140-6736(18)31320-5.

- Harreiter, J. y Roden, M. (2019) "Diabetes mellitus—Definition, classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2019)", *Wiener Klinische Wochenschrift*, 131, pp. 6-15. doi:10.1007/s00508-019-1450-4.
- Högberg, N. J., Maxwell, K. G., Augsornworawat, P. y Millman, J. R. (2021) "Generation of insulin-producing pancreatic β cells from multiple human stem cell lines", *Nature Protocols*, 16(9), pp. 4109-4143. doi:10.1038/s41596-021-00560-y.
- Houeiss, P., Boitard, C. y Luce, S. (2022) "Preclinical Models to Evaluate the Human Response to Autoantigen and Antigen-Specific Immunotherapy in Human Type 1 Diabetes", *Frontiers in Endocrinology*, 13:883000. doi:10.3389/fendo.2022.883000.
- Infante, M., Ricordi, C., Sanchez, J., Clare-Salzler, M. J., Padilla, N., Fuenmayor, V., Chavez, C., Alvarez, A., Baidal, D., Alejandro, R., Caprio, M. y Fabbri, A. (2019) "Influence of Vitamin D on Islet Autoimmunity and Beta-Cell Function in Type 1 Diabetes", *Nutrients*, 11(9), p.2185. doi:10.3390/nu11092185.
- Kahaly, G. J. y Hansen, M. P. (2016) "Type 1 diabetes associated autoimmunity", *Autoimmunity Reviews*, 15(7), pp. 644-648. doi:10.1016/j.autrev.2016.02.017.
- Karimova, M. V., Gvazava, I. G. y Vorotelyak, E. A. (2022) "Overcoming the Limitations of Stem Cell-Derived Beta Cells", *Biomolecules*, 12(6), p.810. doi:10.3390/biom12060810.
- Kimura, Y., Kasai, K. y Miyata, S. (2018) "Feeder-free culture for mouse induced pluripotent stem cells by using UV/ozone surface-modified substrates", *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*, 92, pp. 280-286. doi:10.1016/j.msec.2018.06.053.
- Kottaisamy, C. P. D., Raj, D. S., Prasanth Kumar, V. y Sankaran, U. (2021) "Experimental animal models for diabetes and its related complications—a review", *Laboratory Animal Research*, 37(1), p.23. doi:10.1186/s42826-021-00101-4.
- Liu, G., David, B. T., Trawczynski, M. y Fessler, R. G. (2020) "Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications", *Stem Cell Reviews and Reports*, 16(1), pp. 3-32. doi:10.1007/s12015-019-09935-x.
- Marchetti, P., Bugliani, M., De Tata, V. D., Suleiman, M. y Marselli, L. (2017) "Pancreatic beta cell identity in humans and the role of type 2 diabetes", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5:55. doi:10.3389/fcell.2017.00055.
- Martín-Carro, B., Donate-Correa, J., Fernández-Villabrille, S., Martín-Vírgala, J., Panizo, S., Carrillo-López, N., Martínez-Arias, L., Navarro-González, J. F., Naves-Díaz, M., Fernández-Martín, J. L., Alonso-Montes, C. y Cannata-Andía, J. B. (2023) "Experimental Models to Study Diabetes Mellitus and Its Complications: Limitations and New Opportunities", *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), p.10309. doi:10.3390/ijms241210309.
- Memon, B. y Abdelalim, E. M. (2020) "Stem Cell Therapy for Diabetes: Beta Cells versus Pancreatic Progenitors", *Cells*, 9(2), p.283. doi:10.3390/cells9020283.
- Pandey, S. y Dvorakova, M. C. (2020) "Future Perspective of Diabetic Animal Models", *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 20(1), pp. 25-38. doi:10.2174/1871530319666190626143832.
- Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y. y Han, W. (2016) "Pancreatic regulation of glucose homeostasis", *Experimental & molecular medicine*, 11(48), p. e219. doi:10.1038/emm.2016.6.

- Rodrigues Oliveira, S. M., Rebocho, A., Ahmadpour, E., Nissapatorn, V. y de Lourdes Pereira, M. (2023) "Type 1 Diabetes Mellitus: A Review on Advances and Challenges in Creating Insulin Producing Devices", *Micromachines*, 14(1), p. 151. doi:10.3390/mi14010151.
- Russo, M. P., Grande-Ratti, M. F., Burgos, M. A., Molaro, A. A. y Bonella, M. B. (2023) "Prevalence of diabetes, epidemiological characteristics and vascular complications", *Archivos de Cardiologia de Mexico*, 93(1), pp. 30-36. doi:10.24875/ACM.21000410.
- Saberzadeh-Ardestani, B., Karamzadeh, R., Basiri, M., Hajizadeh-Saffar, E., Farhadi, A., Shapiro, A. M. J., Tahamtani, Y. y Baharvand, H. (2018) "Type 1 diabetes mellitus: Cellular and molecular pathophysiology at a glance", *Cell Journal*, 20(3), pp. 294-301. doi:10.22074/cellj.2018.5513.
- Siljander, H., Honkanen, J. y Knip, M. (2019) "Microbiome and type 1 diabetes", *EBioMedicine*, 46, pp. 512-521. doi:10.1016/j.ebiom.2019.06.031.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. y Yamanaka, S. (2007) "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors", *Cell*, 131(5), pp. 861-872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Takahashi, K. y Yamanaka, S. (2006) "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors", *Cell*, 126(4), pp. 663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Xie, Z., Chang, C. y Zhou, Z. (2014) "Molecular Mechanisms in Autoimmune Type 1 Diabetes: a Critical Review", *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 47(2), pp. 174-192. doi:10.1007/s12016-014-8422-2.
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M. y Rybak, Z. (2019) "Stem cells: Past, present, and future", *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1), p.68. doi:10.1186/s13287-019-1165-5.
- Zhang, X., Ma, Z., Song, E. y Xu, T. (2022) "Islet organoid as a promising model for diabetes", *Protein and Cell*, 13(4), pp. 239-257. doi:10.1007/s13238-021-00831-0.