



## P-103 - GENERACIÓN DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA A PARTIR DE FIBROBLASTOS HUMANOS

M. Fontcuberta Pi-Sunyer<sup>a</sup>, A. García<sup>a</sup>, H. Figueredo<sup>a</sup>, N. Tellez<sup>b</sup>, R. Fernández<sup>a</sup>, R. Gomis<sup>a</sup> y R. Gasá<sup>a</sup>

<sup>a</sup>IDIBAPS, Barcelona. <sup>b</sup>IDIBELL, Barcelona.

### Resumen

**Introducción y objetivos:** La generación de células beta para el trasplante es una terapia prometedora para lograr la cura de la diabetes tipo 1 (DMT1). Una estrategia posible es la transdiferenciación de células especializadas de otros linajes hacia células beta. El objetivo de nuestra investigación es convertir fibroblastos de piel humanos en células productoras de insulina mediante la introducción de factores de transcripción específicos de la célula beta ( $\beta$ -TFs), estrategia no comprobada hasta el momento. Previamente diseñamos un protocolo de reprogramación basado en la introducción de 5  $\beta$ -TFs en fibroblastos que resultaba en la activación del programa endocrino y la generación de células que expresaban y producían insulina (células fibro-beta o CFB). En este estudio hemos caracterizado la funcionalidad de las CFB tanto *in vitro* como *in vivo*.

**Material y métodos:** Como fuente celular, usamos fibroblastos de prepucio humano. El protocolo de transdiferenciación consistió en la introducción secuencial mediante adenovirus recombinantes de Pdx1+Ngn3+Mafa (PNM), Pax4 y Nkx2.2 (protocolo 5- $\beta$ -TFs). La expresión génica estudió Real time PCR. El flujo de calcio intracelular se midió con el fluorocromo Fuor4-AM. La secreción de insulina en respuesta a glucosa se estudió mediante incubaciones estáticas. En los estudios *in vivo*, trasplantamos 300 clústeres (1.000 células/clúster) en la cámara anterior de los ojos de animales inmunodeprimidos NSG y a los 10 días, 30 minutos después de una inyección de glucosa (2 g/Kg ratón), obtuvimos plasma y humor acuoso para determinar la concentración de insulina humana mediante ELISA. La viabilidad de las células trasplantadas se estudió mediante marcaje con CFDA (diacetato de carboxifluoresceína). Tras el sacrificio, se obtuvieron los ojos y se procesaron para su posterior análisis histológico mediante inmunofluorescencia.

**Resultados:** El 70% de las CFB generadas con el protocolo 5- $\beta$ -TFs presentan incremento de calcio intracelular en respuesta a la glucosa y/o a la despolarización de la membrana. Las CFB mantenidas en cultivo bidimensional exhiben secreción de insulina constitutiva ( $0,58 \pm 0,11$  uU/ $10^5$  células; n = 16). Sin embargo, la formación de estructuras tridimensionales de CFB (1.000-1.500 células/clúster) durante la etapa final de protocolo 5- $\beta$ -TFs les confiere una respuesta insulino-secretora moderada a la glucosa (2 mM glucosa:  $0,66 \pm 0,13$ ; 20 mM glucosa:  $1,15 \pm 0,16$  uU/ $10^5$  células; n = 9; p = 0,03). A los 10 días, los clústeres de CFB trasplantados en el ojo son viables y se detecta insulina humana en el humor acuoso ( $88,46 \pm 17,51$  uU/ml; n = 7) pero no en el plasma. Además, se detecta presencia de péptido C y de otros marcadores endocrinos en los clústeres de CFB trasplantados.

**Conclusiones:** Este estudio demuestra que se pueden generar células con respuesta insulino-

secretora a la glucosa a partir de fibroblastos de piel, abriendo una nueva vía para el desarrollo de terapias celulares encaminadas a la cura de la DMT1.