

Sevilla, 2016



*Departamento de Biología Molecular  
e Ingeniería Bioquímica*



*Departamento de Terapia Celular y  
Medicina Regenerativa*

# TERAPIA CELULAR DE LA DIABETES MELLITUS:

## Optimización de los Procedimientos de Diferenciación e Inducción de Tolerancia

**Autora:**

**Carmen Salguero Aranda**

**Directores:**

**Dr. Francisco Bedoya Bergua**

**Dr. Bernat Soria Escoms**



*La imagen de la portada muestra células madre embrionarias de ratón de la línea celular R1/E tras ser expuestas a 500  $\mu$ M de DETA-NO durante 19 horas y analizadas mediante inmunofluorescencia para el marcaje de PDX1 (rojo) y  $\alpha$ -TUBULINA(verde).*



Sevilla, 2016



*Departamento de Biología Molecular  
e Ingeniería Bioquímica*



*Departamento de Terapia Celular y  
Medicina Regenerativa*

# **TERAPIA CELULAR DE LA DIABETES MELLITUS:**

## **Optimización de los Procedimientos de Diferenciación e Inducción de Tolerancia**

Tesis Doctoral para optar al Título de Doctor

**Autora:**

**Carmen Salguero Aranda**

**Directores:**

**Dr. Francisco Bedoya Bergua  
Dr. Bernat Soria Escoms**





Dr. **Francisco Bedoya Bergua**, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Pablo de Olavide, y Dr. **Bernat Soria Escoms**, Catedrático Extraordinario de Medicina Regenerativa de la Universidad Pablo de Olavide

**CERTIFICAN QUE:**

El trabajo de investigación presentado por **Carmen Salguero Aranda** titulado: **“Terapia Celular de la Diabetes Mellitus: optimización de los procesos de diferenciación e inducción de tolerancia”** ha sido realizado bajo su supervisión y dirección, y reúne los requisitos de originalidad y calidad científica necesarios para constituir una Tesis Doctoral y optar al grado de Doctor con Mención Internacional por la Universidad Pablo de Olavide.

Y para que así conste y a efectos oportunos, firman el presente informe.

VºBº de los directores del trabajo.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'F. Bedoya'.

Fdo. Dr. Francisco Bedoya Bergua

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'B. Soria'.

Fdo. Dr. Bernat Soria Escoms





# *Índice*



# Índice

<b>Agradecimientos .....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>Trabajos derivados de la Tesis .....</b>	<b>- 5 -</b>
<b>Acrónimos y Abreviaturas.....</b>	<b>- 7 -</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>- 13 -</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>- 15 -</b>
1.1. Diabetes Mellitus .....	- 17 -
1.1.1 Concepto e historia de la Diabetes .....	- 17 -
1.1.2 Clasificación de la Diabetes Mellitus.....	- 18 -
1.1.3 Prevalencia de la Diabetes Mellitus .....	- 20 -
1.1.4 Fisiología y desarrollo del páncreas .....	- 21 -
1.1.5 Terapia Celular de la Diabetes Mellitus.....	- 30 -
1.2. Células Madre .....	- 35 -
1.2.1 Concepto y Definición .....	- 35 -
1.2.2 Clasificación de las Células Madre .....	- 35 -
1.2.3 Las Células Madre Embrionarias .....	- 37 -
1.2.4 Células Madre de Pluripotencia Inducida .....	- 38 -
1.2.5 Mantenimiento de la Pluripotencia .....	- 39 -
1.2.6 Diferenciación y remodelación de la cromatina.....	- 41 -
1.2.7 Óxido Nítrico y diferenciación.....	- 49 -
1.2.8 Diferenciación de Células Madre Pluripotentes hacia células productoras de insulina .....	- 53 -
1.3. Células T reguladoras .....	- 57 -
1.3.1 Concepto y Definición .....	- 57 -
1.3.2 Otros tipos de células reguladoras.....	- 58 -
1.3.4 Subpoblaciones de Células T CD4 <sup>+</sup> .....	- 63 -
1.3.5 Subpoblaciones de Células T reguladoras.....	- 65 -
1.3.6 Fuentes de Células T reguladoras.....	- 67 -
1.3.6 Mecanismos de acción de las Células T reguladoras .....	- 67 -
1.3.7 Células T reguladoras y Diabetes.....	- 70 -
<b>2. Hipótesis y Objetivos.....</b>	<b>- 75 -</b>

<b>3. Materiales y Métodos .....</b>	<b>- 79 -</b>
3.1. Líneas celulares y cultivo celular.....	- 81 -
3.1.1 Células Madre Embrionarias de ratón.....	- 81 -
3.1.2 Células Madre Embrionarias y de Pluripotencia Inducida humanas.....	- 82 -
3.1.3 Células de insulinoma .....	- 85 -
3.1.4 Células T reguladoras.....	- 85 -
3.2. Técnicas de Biología Molecular .....	- 90 -
3.2.1 Medida de la expresión génica.....	- 90 -
3.2.2 Western Blot.....	- 95 -
3.2.3 Inmunofluorescencia .....	- 97 -
3.2.4 Citometría de flujo .....	- 99 -
3.2.5 Secuenciación por PCR dependiente de bisulfito (BSP).....	- 102 -
3.2.6 Pirosecuenciación de bisulfito.....	- 103 -
3.2.7 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) .....	- 104 -
3.2.8 Coimmunoprecipitación .....	- 106 -
3.2.9 Transfección con pCGEgr1-HA y shEgr1 .....	- 107 -
3.3 Estudios Funcionales .....	- 108 -
3.3.1 Secreción de insulina estimulada por glucosa.....	- 108 -
3.3.2 Liberación de citocinas por las células T reguladoras.....	- 108 -
3.4 Análisis Estadístico.....	- 110 -
<b>4. Resultados .....</b>	<b>111</b>
4.1 Estudio de la Regulación de la Expresión de <i>Pdx1</i> por Altas Concentraciones de Óxido Nítrico .....	- 113 -
4.1.1 Altas dosis de Óxido Nítrico inducen la expresión de <i>Pdx1</i> .....	- 113 -
4.1.2 El patrón de metilación del promotor de <i>Pdx1</i> se ve alterado tras el tratamiento con DETA-NO .....	- 116 -
4.1.3 El tratamiento con DETA-NO modifica la expresión de las Metilasas de ADN .....	- 120 -
4.1.4 El DETA-NO induce cambios en las modificaciones postraduccionales de histonas del promotor de <i>Pdx1</i> .....	- 122 -
4.1.5 El Complejo Represor Polycomb 2 (PRC2) y la Histona Acetiltransferasa P300 regulan la expresión de <i>Pdx1</i> .....	- 123 -
4.1.6 El factor de transcripción Egr-1 tiene un papel represor en la regulación génica del gen <i>Pdx1</i> en CMER.....	- 127 -

4.2 Desarrollo de un protocolo de diferenciación de células madre hacia células productoras de insulina .....	133 -
4.2.1 Desarrollo de un protocolo de diferenciación de células madre embrionarias de ratón hacia células productoras de insulina .....	133 -
4.2.2 Desarrollo de un protocolo de diferenciación de células embrionarias humanas hacia células productoras de insulina.....	140 -
4.2.3 Desarrollo de un protocolo de diferenciación de células de pluripotencia inducida humanas hacia células productoras de insulina .....	145 -
4.2.4 Proceso de maduración hacia células productoras de insulina en la línea celular HS181 .....	147 -
4.3 Estudio de las Células T reguladoras de Cordón Umbilical y Sangre Periférica de adulto .....	151 -
4.3.1 Aislamiento de células T reguladoras .....	151 -
4.3.2 Análisis de la proliferación de las células T reguladoras .....	156 -
4.3.3 Análisis de la capacidad de activación de las células T reguladoras .....	158 -
4.3.4 Análisis de liberación de citocinas .....	167 -
<b>5. Discusión.....</b>	<b>171 -</b>
5.1 Estudio de la Regulación de la Expresión de Pdx1 por Altas Concentraciones de Óxido Nítrico .....	173 -
5.2 Desarrollo de un protocolo de diferenciación de células madre hacia células productoras de insulina .....	187 -
5.3 Estudio de las Células T reguladoras de Sangre de Cordón Umbilical y Sangre Periférica de adulto .....	195 -
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>209 -</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>215 -</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>241 -</b>
ANEXO 1. Estimaciones de la Federación Internacional de Diabetes (FID) en 2015 y en 2040. ....	243 -
ANEXO 2. Diferencia temporal y de expresión génica entre el desarrollo pancreático murino y humano. ....	244 -
ANEXO 3. Principales protocolos de diferenciación, y estrategias y mecanismos implicados en el proceso de diferenciación.....	245 -
ANEXO 4. Listado de proteínas de membrana, genes y citocinas referidos a las células T reguladoras.....	247 -



# *Agradecimientos*

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores de tesis, Francisco Bedoya y Bernat Soria la oportunidad que me brindaron al abrirme las puertas de su laboratorio para comenzar esta aventura y la formación predoctoral que he recibido bajo su supervisión y dirección. Además, agradecer especialmente a Juan Tejedo, por creer en mí desde el principio y sus enseñanzas. Muchas gracias por vuestra confianza y apoyo, y por hacer el camino más fácil y enriquecedor.

Mi más sincero agradecimiento a mis compañeros de laboratorio, sin los que indudablemente esto no hubiera sido lo mismo. Durante este tiempo que hemos compartido, ya más que compañeros somos amigos y más que amigos somos familia, nuestra imperecedera “MR2 *family*”. A Rafael Tapia, por compartir conmigo sus amplios y valiosos conocimientos sobre pluripotencia y diferenciación, y por los numerosos debates sobre ciencia que he tenido la suerte de disfrutar con él. Mil gracias, y es poco, a los dos pilares fundamentales del laboratorio, Ana B. Hitos e Irene Díaz, tanto por su magnífica ayuda técnica como por hacerme disfrutar de incalculables buenos momentos fuera y dentro del laboratorio. A Estefanía Caballanos y Amparo Beltrán, mis compañeras de aventura y amigas, y a las que agradezco enormemente su ayuda y, en general, los apoyos mutuos que nos hemos dedicado. Muchas gracias compañeros por todo lo que me habéis enseñado, por vuestro apoyo y sobre todo, por haberme dejado formar parte de vosotros.

Especial mención merecen todas las personas que forman parte de las unidades de apoyo y que, con su trabajo diario, hacen que trabajar en CABIMER sea un placer. A Mercedes, por su excelente trabajo en las salas de cultivo y por animarme cada vez que he tenido problemas con los cultivos; a M<sup>a</sup> José, por su ayuda múltiple con el citómetro de flujo; a Paloma, por su ayuda técnica con los microscopios de fluorescencia; a Cindy, por su gran trabajo con los cortes de mis agregados, incluso cuando eran muy pequeñitos y escasos; a Cristina, por proporcionarme soluciones, tampones o placas, aun cuando se los pedía a última hora; a Juan Carlos, por su excelente labor en la gestión y control de la eliminación de los residuos; a Arturo y el equipo de informática, por resolverme las dudas y los problemas informáticos durante estos años; y a M<sup>a</sup> José y

Dolores, por el gran servicio que realizan en cocina. Muchas gracias por hacer que trabajar en CABIMER sea un auténtico lujo.

Quisiera agradecer también a Karim Hmadcha, Anabel Rojas, Franz Martín y Benoit Gauthier, y a quienes forman o han formado parte de sus grupos, como Daniela, Javier, Nuria, Yolanda, Manu, Irene, Petri, Carmen, entre otros, que de una forma u otra me han tendido la mano cuando lo he necesitado. Agradecer también a Marcela, quien además de compartir conmigo sus conocimientos y protocolos, alegraba el laboratorio nada más asomarse por la puerta. Son tantas las personas a las que les debo las gracias y de las me llevo un grato recuerdo, que agradezco de forma general a todos los “*Cabiméricos*” que, en mayor o menor medida, he tenido el placer de conocer en este tiempo. Muchas gracias por vuestra ayuda, charlas y apoyo, es un placer trabajar rodeada de gente como vosotros.

Una parte de este trabajo se ha realizado en el Instituto de Investigación Anthony Nolan de Londres, por lo que a ellos dedico estas merecidas palabras:

I would like to thank infinitely all staff of Anthony Nolan Research Institute, especially to the Immunotherapy Group, for making me feel at home during the time I had the pleasure to be with them. First of all, I would like to express my deepest and sincere gratitude to Prof Alejandro Madrigal for opening the doors of Anthony Nolan for me, making me feel supported and those pleasant Spanish conversations that rejoiced my days. My sincere thanks to Dr Aurore Saudemont for her valuable guidance during the planning of my research work, her continued support and giving me her time so generously. Special thanks to Pauline Dodi for helping me with the documents and making my stay easier, and to Hazel Forde for her superb management of the safety, and control of the application of good laboratory practice. I would also like to thank Dr Richard Duggleby and Dr Divya K. Shah for their incredible support on the technical aspects and their advices on regulatory T cells. I also thank Dr Steve T Cox, Anna Domogala and Vikesh Devlia for their help in the resolutions of several scientific questions. In particular, I give Dr Anushruti Sarvaria, Hayley Pearson and Raquel Laza my love and thanks for their support, the good time we shared and the friendship during this time. Thanks for being part of this journey.

Finalmente, me gustaría agradecer a mi familia todo el apoyo que me ha dado a lo largo de este largo camino. A mi madre, por su ayuda incondicional, su cariño, sus



palabras y por estar a mi lado en todo momento. A mi padre, por sus sabios consejos, sin los que estoy segura no hubiera llegado hasta aquí. Gracias por ayudarme a formarme tanto personal como profesionalmente, a vosotros os debo este logro y todo en mi vida. A mi hermano, por estar a mi lado y haberme dado a mis dos sobrinos que quiero con locura. A mis abuelos y a mis tíos, a los que están conmigo y a los que ya se fueron, por haber confiado siempre en mí, espero que allí donde estén se sientan orgullosos. Y a Rubén, mi pareja, amigo y compañero en la vida, por caminar a mi lado, por compartir conmigo cada minuto y por saberme llevar en los buenos y malos momentos. Sé que sin ti tampoco lo habría conseguido. A cada uno de vosotros agradezco compartir mi vida a vuestro lado y os dedico esta tesis.



# *Trabajos derivados de la Tesis*

## **Publicaciones**

1. Salguero-Aranda C, *Tapia-Limonchi R, Cahuana GM, Hitos AB, Diaz I, Hmadcha A, Fraga M, Martín F, Soria B, Tejedo JR, Bedoya FJ\**. Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells Towards Functional Pancreatic Beta-Cell Surrogates through Epigenetic Regulation of Pdx-1 by Nitric Oxide. *Cell Transplant*. 2016 Mar 14.

2. *Tapia-Limonchi R, Cahuana GM, Caballano-Infantes E, Salguero-Aranda C, Beltran-Povea A, Hitos AB, Hmadcha A, Martin F, Soria B, Bedoya FJ, Tejedo JR*. Nitric Oxide Prevents Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation through Regulation of Gene Expression, Cell Signaling and Control of Cell Proliferation. *J. Cell Biochem*. 2016 Feb 8. doi: 10.1002/jcb.25513.

3. *Beltran-Povea A, Caballano-Infantes E, Salguero-Aranda C, Martín F, Soria B, Bedoya FJ, Tejedo JR, Cahuana GM*. Role of nitric oxide in the maintenance of pluripotency and regulation of the hypoxia response in stem cells. *World J Stem Cells*. 2015 Apr 26;7(3): 605-17. doi: 10.4252/wjsc.v7.i3.605.

4. *Horrillo A, Pezzolla D, Fraga MF, Aguilera Y, Salguero-Aranda C, Tejedo JR, Martin F, Bedoya FJ, Soria B, Hmadcha A*. Zebularine regulates early stages of mESC differentiation: effect on cardiac commitment. *Cell Death Dis*. 2013 Apr 4;4:e570. doi: 10.1038/cddis.2013.88.

5. *Bedoya FJ, Salguero-Aranda C, Cahuana GM, Tapia-Limonchi R, Soria B, Tejedo JR*. Regulation of pancreatic  $\beta$ -cell survival by nitric oxide: clinical relevance. *Islets*. 2012 Mar-Apr;4(2):108-18. doi: 10.4161/isl.19822.

## **Patente**

*Soria B, Salguero-Aranda C, Hmadcha A, Bedoya FJ, Tejedo JR, Martín F, Tapia-Limonchi R*. Method for obtaining pancreatic beta cell surrogates by increasing pancreatic and duodenal homeobox (Pdx-1) expression. PCT/EP2015/070501

## Presentaciones en Congresos

1. Reunión Anual de la Red de Terapia Celular. “Pdx-1 Regulation by Nitric Oxide Enables Differentiation of Embryonic Stem Cells Towards Functional Pancreatic Beta-Cell”. *Salguero-Aranda C, Tapia-Limonchi R, Cahuana GM, Hitos AB, Diaz I, Hmadcha A, Fraga M, Martín F, Soria B, Tejedo JR, Bedoya FJ*. Sevilla, 26 y 27 de Noviembre de 2015. Formato Póster.

2. Reunión Anual de la Sociedad Española de Diabetes. Grupo de islotes Pancreáticos. “Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells Towards Pancreatic Beta-Cell Surrogates Through Regulation of Pdx-1 by Nitric Oxide”. *Salguero-Aranda C, Tapia-Limonchi R, Cahuana GM, Hitos AB, Diaz I, Hmadcha A, Fraga M, Martín F, Soria B, Tejedo JR, Bedoya FJ*. Madrid, Octubre de 2014. Presentación Oral.

3. XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. “Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells Towards Pancreatic Beta-Cell Surrogates Through Regulation of Pdx-1 by Nitric Oxide”. *Salguero-Aranda C, Tapia-Limonchi R, Cahuana GM, Hitos AB, Diaz I, Hmadcha A, Fraga M, Martín F, Soria B, Tejedo JR, Bedoya FJ*. Granada, 10, 11 y 12 de 2014. Presentación en formato Póster y Oral.

4. Reunión Anual de la Sociedad Española de Diabetes. Grupo de islotes Pancreáticos. Regulación de la Expresión del Factor de Transcripción Pdx1 y diferenciación de mESC hacia células productoras de insulina. *Salguero-Aranda C, Tapia-Limonchi R, Cahuana GM, Hitos AB, Diaz I, Hmadcha A, Fraga M, Martín F, Soria B, Tejedo JR, Bedoya FJ*. Sevilla, 2013. Presentación Oral.

5. Reunión Anual de la Sociedad Española de Diabetes. Grupo de islotes Pancreáticos. Regulación de la Expresión del Factor de Transcripción Pdx1 por Óxido Nítrico en Células Madre Embrionarias de ratón (mESC). *Salguero-Aranda C, Tapia-Limonchi R, Cahuana GM, Hitos AB, Diaz I, Hmadcha A, Fraga M, Martín F, Soria B, Tejedo JR, Bedoya FJ*. Vigo, 2012. Presentación Oral.

# *Acrónimos y Abreviaturas*

Abreviatura	Inglés	
5-mC	5-Metil-Citosina	
ADN	Ácido Desoxirribonucleico	
ADNc	ADN complementario	
ADP	Adenosín difosfato	<i>Adenosine diphosphate</i>
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico	
APC	Célula Presentadora de Antígeno	<i>Antigen Presenting Cell</i>
APS	Persulfato amónico	<i>Ammonium Persulfate</i>
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero	
ATP	Adenosín trifosfato	<i>Adenosine triphosphate</i>
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BMP	Proteína Morfogénica de hueso	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
Breg	Célula B reguladora	<i>Regulatory B cell</i>
CB	Sangre de Cordón Umbilical	<i>Umbilical Cord Blood</i>
CBMC	Células Mononucleares de Sangre de Cordón Umbilical	<i>Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells</i>
cGMP	Guanosín Monofosfato cíclico	<i>cyclic Guanosine Monophosphate</i>
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina	<i>Chromatin Immunoprecipitation</i>
CM / CT	Célula Madre / Célula Troncal	
CME	Células Madre Embrionaria	
CMEr/h	CME murina / humana	
CpG	Citosina-(fosfato)-Guanina	
DAPI	4', 6-diamino-2-phenilindol	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DC	Célula Dendrítica	<i>Dendritic Cell</i>
DETA-NO		<i>Diethylenetriamine/nitric oxide adduct</i>
DG	Diabetes Gestacional	
DM	Diabetes Mellitus	
dNTP		<i>Deoxynucleotide triphosphate</i>
E	Día Embrionario	
ECV	Enfermedades Cardiovasculares	
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FGF	Factor de crecimiento de fibroblasto	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FID	Federación Internacional de Diabetes	
FIV	Fecundación <i>In Vitro</i>	
G-d	Día de gestación	<i>Gestation Day</i>
GSIS	Secreción de insulina estimulada por glucosa	<i>Glucose Stimulate Insulin Secretion</i>

GvHD	Enfermedad de injerto contra huésped	<i>Graft-Versus-Host-Disease</i>
G-w	Semana de gestación	<i>Gestation Week</i>
hESC	Célula Madre Embrionaria humana	<i>Human Embryonic Stem Cell</i>
HGF	Factor de crecimiento de hepatocito	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HLA	Antígeno Leucocitario Humano	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HSC	Célula Madre Hematopoyética	<i>Hematopoietic stem cell</i>
HSCT	Trasplante de Células Madre Hematopoyéticas	<i>Hematopoietic Stem Cell Transplantation</i>
iNKT	Células T Asesina Natural invariable	<i>Invariant Natural Killer T cell</i>
iPSC	Célula Madre de Pluripotencia Inducida	<i>Induced Pluripotent Stem Cell</i>
ITS	Insulina-Transferrina-Selenio	<i>Insulin-Transferrin-Selenium</i>
KGF	Factor de crecimiento de queratinocito	<i>Keratinocyte Growth Factor</i>
KSR	Sustituto de Suero <i>Knockout</i> <sup>TM</sup>	<i>Knockout<sup>TM</sup> Serum Replacement</i>
LADA	Diabetes Autoinmune Latente del adulto	<i>Latent Autoimmune Diabetes of Adults</i>
LIF	Factor Inhibidor de Leucemia	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
MCI	Masa Celular Interna	<i>Inner Cell Mass (ICM)</i>
MEF	Fibroblasto Embrionario Murino	<i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>
mESC	Célula Madre Embrionaria de ratón	<i>Mouse Embryonic Stem Cell</i>
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MODY	Diabetes juvenil de aparición en la madurez	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>
MPC	Célula Progenitora Multipotente	<i>Multipotent Progenitor Cell</i>
Mreg	Macrófago Regulador	<i>Regulatory Macrophage</i>
MSC	Célula Madre Mesenquimal	<i>Mesenchymal Stem cell</i>
NC	Nicotinamida	
NK	Célula Asesina Natural	<i>Natural Killer cell</i>
NKT	Célula T Asesina Natural	<i>Natural Killer T cell</i>
NO	Óxido Nítrico	<i>Nitric Oxide</i>
P300i	Inhibidor de P300	<i>Inhibitor of P300</i>
pb	Pares de bases	<i>Base pairs</i>
PB	Sangre Periférica	<i>Peripheral Blood</i>
PBMC	Células Mononucleares de Sangre Periférica	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	Tampón Fosfato Salino	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PcG	Proteínas del Grupo Polycomb	<i>Polycomb-group proteins</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRC2	Complejo Represor Polycomb 2	<i>Polycomb Repressive Complex 2</i>
pTreg/iTreg	Célula T reguladora derivada de la periferia o inducida	<i>Peripherally derived Treg cell</i>
PVDF	Difluoruro de polivinilideno	<i>Polyvinylidene Difluoride</i>
RA	Ácido Retinoico	<i>Retinoic Acid</i>

ROS	Especies Reactivas de Oxígeno	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Revoluciones por minuto	<i>Revolutions per minute</i>
RV	Resveratrol	Resveratrol
SAM	S-Adenosil metionina	<i>S-Adenosyl Methionine</i>
SDS	Dodecilsulfato Sódico	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-gel de electroforesis de poliacrilamida	<i>SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TA	Temperatura Ambiente	
TAE	Tampón Tris, Acetato y EDTA	
Tcit / CTL	Linfocitos T citotóxicos	<i>Cytotoxic T cell</i>
TCR	Receptor de Linfocitos T	<i>T Cell Receptor</i>
Teff	Linfocitos T efectores	<i>effector T lymphocytes</i>
TEMED		<i>Tetramethylethylenediamine</i>
Tfh	Célula T colaboradora folicular	<i>T follicular helper cell</i>
Th	Célula T colaboradora	<i>T helper cells</i>
TNC	Células Totales Nucleadas	<i>Total Nucleated Cells</i>
Treg	Célula T reguladora	<i>Regulatory T cell</i>
tTreg/nTreg	Célula T reguladora derivada del timo o natural	<i>Thymus-derived Treg cell</i>
VA	Ácido Valproico	<i>Valproic Acid</i>

<b>PROTEÍNAS</b>	<b><i>del Inglés</i></b>
AKT	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>
ALK5	<i>Activin receptor-like kinase 5</i>
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
ARX	<i>Aristaless related homeobox</i>
BAX	<i>Bcl2-associated X protein</i>
B-CAT	<i>Catenin beta</i>
BCL	<i>B cell leukemia/lymphoma</i>
BIRC6	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 6</i>
CASP	<i>Caspase</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD1D	<i>Antigen-presenting glycoprotein CD1d</i>
CD103	<i>Integrin alpha-E</i>
CD122	<i>Interleukin 2 receptor subunit beta (IL2RB)</i>
CD127	<i>Interleukin 7 receptor (IL7R)</i>
CD132	<i>Interleukin 2 receptor subunit gamma (IL2RG)</i>
CD161	<i>Killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1</i>
CD25	<i>Interleukin 2 receptor subunit alpha (IL2RA)</i>
CD28	<i>T-cell-specific surface glycoprotein CD28</i>
CD3	<i>T-cell surface glycoprotein CD3</i>
CD39	<i>Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1</i>
CD4	<i>T-cell surface glycoprotein CD4</i>

CD45	<i>Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C</i>
CD69	<i>Early activation antigen CD69</i>
CD8	<i>T-cell surface glycoprotein CD8</i>
CD80	<i>T-lymphocyte activation antigen CD80</i>
CD86	<i>T-lymphocyte activation antigen CD86</i>
CD95	<i>Fas cell surface death receptor (Also known as: FAS, APO-1)</i>
CDX	<i>Caudal type homeobox</i>
c-MYB	<i>v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog</i>
c-MYC	<i>V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
CPA1	<i>Carboxypeptidase A1, pancreatic</i>
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated-4</i>
CXCR	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor</i>
DNMT	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase</i>
EED	<i>Embryonic ectoderm development</i>
EOMES	<i>Eomesodermin</i>
ERG-1	<i>Early growth response 1</i>
ERK	<i>Extracellular Regulated MAP kinase</i>
EZH2	<i>Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit</i>
FAS	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 (CD95, APO-1)</i>
FGL-2	<i>Fibrinogen-like protein 2</i>
FOXA	<i>Forkhead box A</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
GAD65	<i>Glutamic Acid Decarboxylase 65</i>
GARP	<i>Glycoprotein A repetitions predominant</i>
GATA	<i>GATA binding protein</i>
GCG	<i>Glucagon</i>
GHRL	<i>Ghrelin</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor</i>
GCK	<i>Glucokinase</i>
GLUT2	<i>Glucose Transporter, member 2</i>
GSK3-B	<i>Glycogen Synthase Kinase 3 beta</i>
HAT	<i>Histone Acetyltransferase</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
HES1	<i>Hes family bHLH transcription factor 1</i>
HHEX	<i>Hematopoietically-expressed homeobox</i>
HMOX	<i>Heme oxygenase 1 (Hsp32)</i>
HMT	<i>Histone methyltransferase</i>
HNF	<i>Hepatocyte Nuclear Factor</i>
HSP70	<i>Heat shock protein 1B</i>
IA	<i>Tyrosine phosphatase</i>
IGF-1	<i>Insulin like growth factor 1</i>
IL	<i>Interleukin</i>



INF-G	<i>Interferon, gamma</i>
INS	<i>Insulin</i>
ISLET1	<i>Islet 1</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
JARID-2	<i>Jumonji, AT rich interactive domain 2</i>
KIR6.2	<i>Inward-rectifier potassium ion channel</i>
KLF4	<i>Kruppel-like factor 4</i>
LAG-3	<i>Lymphocyte activation gene-3</i>
LAP	<i>Latency associated peptide</i>
LCK	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LIN28	<i>Lin-28 homolog A (C. elegans)</i>
MAF	<i>V-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
NAB	<i>NGFI-A binding protein</i>
NANOG	<i>Nanog homeobox</i>
NEUROD	<i>Neurogenic Differentiation Factor</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear factor NF-kappa-B</i>
NGN3	<i>Neurogenin 3</i>
NK1.1	<i>Killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1C</i>
NKX2.2	<i>NK2 homeobox 2</i>
NKX6.1	<i>NK6 homeobox 1</i>
NOS1/nNOS	<i>Nitric oxide synthase 1, neuronal</i>
NOS2/iNOS	<i>Nitric oxide synthase 2, inducible</i>
NOS3/eNOS	<i>Nitric oxide synthase 3, endothelial</i>
NOTCH	<i>Neurogenic locus notch homolog protein</i>
NRP-1	<i>Neuropilin-1</i>
OCT3/4	<i>Octamer-Binding Protein 3/4</i>
P300	<i>Histone acetyltransferase p3000</i>
P53	<i>Tumor protein p53</i>
PAX	<i>Paired box</i>
PC	<i>Prohormone convertase</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PDX1	<i>Pancreatic and Duodenal homeobox 1</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase</i>
PPY	<i>Pancreatic Polypeptide</i>
PRMT	<i>Arginine Methyltransferase</i>
PTF1A	<i>Pancreas-specific Transcription Factor 1a</i>
RBAP46/48	<i>Chromatin assembly factor 1, p55 subunit (NURF55, CAF-1)</i>
RORC	<i>Retinoic acid orphan receptor</i>
SGC	<i>soluble Guanylyl Cyclase</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
SIRT1	<i>Sirtuin 1</i>
SMAD	<i>SMAD family member</i>

SOX	<i>SRY (sex determining region Y)-box</i>
SP-1	<i>Sp1 transcription factor</i>
SST	<i>Somatostatin</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SUZ12	<i>SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit</i>
T-BET	<i>T-cell-specific T-box transcription factor (T-BOX)</i>
TGF-B	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
QA-1	<i>Nonclassical MHC class I</i>

# *Abstract*

Diabetes Mellitus is a chronic metabolic disorder characterized by the presence of elevated blood glucose levels as a result of a failure in insulin production by the pancreas and/or its inefficient use by the body. Pancreas transplantation is limited by the number of donors, as it happens with other organ transplantations. However, the high prevalence of diabetes all over the world and the increase that is expected to be achieved in the coming years make the problem even more serious. Therefore, scientists worldwide try to find alternative sources for the cell therapy of diabetes, which can be approached from two different perspectives. On the one hand, the replacement of the damaged pancreatic beta cells, an area in which the stem cells (CM) have been deeply studied in the recent decades because of their ability to proliferate and differentiate into different lineages. On the other hand, the detection of the beta cells destruction by controlling the immune system. In this regard, the role of regulatory T cells (Treg) seems to be critical due to its ability to mediate the balance between tolerance and autoimmunity.

This work has been focused on the study of the regulation of Pdx1 transcription factor in mouse embryonic stem cells (CMEr), due to their involvement in the pancreas development and its significance for the proper embryogenesis and pancreatic function. Epigenetic and transcription factor binding study on *Pdx1* promoter have allowed us to develop a differentiation protocol from CMEr to insulin-producing cells with a mature phenotype. Moreover, this protocol seems to be reproducible in human stem cells, which may provide an alternative or complement to current differentiation protocols. In addition, we have also focused on the study and characterization of Treg cells from umbilical cord blood and adult peripheral blood besides comparing two different selection techniques. This study has revealed that there are significant differences depending on the source and isolation technique used what should be considered for its use in cell therapy.



# ***1. Introducción***



## 1.1. Diabetes Mellitus

### 1.1.1 Concepto e historia de la Diabetes

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por la presencia de elevados niveles de glucosa en sangre o hiperglucemia, como consecuencia de un fallo en la producción de insulina por el páncreas, por la ineficacia de su uso por el organismo o ambos. Los síntomas más comunes que definen la diabetes tipo 1 sin tratar son poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso, fatiga o cansancio y cambios en la agudeza visual. A largo plazo, la hiperglucemia daña gravemente muchos órganos y sistemas, especialmente el tejido vascular, afectando a vasos de la retina, los riñones y los nervios periféricos, siendo una de las principales causas de ceguera, amputaciones y enfermedad renal. Además, los pacientes diabéticos tienen un alto riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (ECV), tanto por la enfermedad en sí como por su asociación a otros factores de riesgo, como dislipemia e hipertensión arterial [1].

En el siglo XV antes de Cristo, en el papiro de Ebers descubierto en Egipto, ya se describen síntomas que parecen corresponder a este trastorno, pero fue Areteo de Capadocia, en el siglo II de la era cristiana, quien le dio el nombre de diabetes [2, 3]. El término diabetes significa en griego “sifón o correr a través“, y hace referencia a sus signos más llamativos, la poliuria y la polidipsia. La primera referencia en la literatura médica occidental data en 1674, por *Tomas Willis*, quien hizo una descripción magistral de la sintomatología de la diabetes [4]. Años más tarde, otro médico inglés, *John Rollo*, fue el primero que, refiriéndose al sabor dulce de la orina, le dio el nombre de diabetes mellitus (del latín, miel) diferenciando así la diabetes de otras formas de poliuria [3]. La presencia de glucosa en la orina en pacientes diabéticos fue descubierta por *Dopson* en 1775 y, en 1869, un joven médico berlinés, *Paul Langerhans*, describió la existencia de unos racimos de células pancreáticas bien diferenciadas de las demás y que podían ser separadas de los tejidos de los alrededores [5]. Sin embargo, la función del páncreas como regulador de la glucemia no se demostró hasta 1889, por *Oskar Minkowski* y *Josef von Mering*, mediante la pancreatectomía de un perro [6]. A principios del siglo XX, *Jean de Meyer* denominó "insulina" [7] a la sustancia procedente de los islotes (del latín "insula" que significa islote). El punto neurálgico del estudio se registró en 1921, cuando *Frederick Grant Banting*, médico militar, y su ayudante estudiante de medicina

*Charles Herbert Best*, y en colaboración con el profesor *John R. MacLeod*, lograron aislar la insulina y mostrar su efecto hipoglucemiante [8]. El procedimiento fue patentado y *MacLeod* y *Banting* recibieron el Premio Nobel de Medicina en 1923. Al año siguiente *Eli Lilly* lanzó al mercado la primera insulina comercial con el nombre de “Iletin”. Otro gran acontecimiento en la historia de la insulina vino a mano de *Frederick Sanger*, quién dilucidó la estructura de la molécula de insulina y el orden en el que se alinean las distintas subunidades de aminoácidos, trabajo que le llevó a recibir el premio Nobel de Medicina en 1955 [2]. En 1977, *W. Gilbert* y *Lydia Villa-Komaroff* identificaron el gen que codificaba la insulina en el genoma humano [9], y pronto la industria farmacéutica vislumbró la posibilidad de obtener insulina humana por clonación de genes en bacterias. En 1980 se llevó a cabo el primer ensayo clínico en el Guy’s Hospital de Londres y se comercializó en 1982 con el nombre comercial de “Humulin”. De esta manera la insulina humana fue el primer producto comercial de la clonación de genes. Desde entonces, la ingeniería genética ha permitido la mejora de la insulina que se produce, que a día de hoy ocupa más del 90% de la insulina que se encuentra en el mercado, un producto que lleva con nosotros más de 90 años.

### 1.1.2 Clasificación de la Diabetes Mellitus

En 1980, se acordaron los criterios de clasificación elaborados por el “*National Diabetes Data Group*” (NDDG) [10] y el Comité de Expertos en Diabetes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [11]. Más tarde, estos criterios fueron revisados por el Comité de Expertos para el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes Mellitus de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) planteando la clasificación de la Diabetes Mellitus como la conocemos hoy en día [12, 13]. De esta manera, la DM se encuentra actualmente clasificada en cuatro categorías clínicas:

**1. Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1).** También llamada DM insulino dependiente o juvenil. Es debida a la destrucción de las células beta del páncreas productoras de la insulina, lo que conduce a un déficit absoluto de esta hormona. Por lo general se produce cetoacidosis, ya que el paciente metaboliza la grasa corporal como fuente de energía en lugar de la glucosa. En la clasificación actual, la DM1 se clasifica en dos subtipos:



- **Autoinmune:** Esta forma de diabetes representa el 5-10% del total de personas que sufren esta enfermedad. Esta mediada por una destrucción selectiva de las células beta pancreáticas por parte del sistema autoinmune adaptativo, de tal forma que se detectan autoanticuerpos contra la insulina, glutamato descarboxilasa (GAD65) o tirosinas fosfatasas pancreáticas IA-I y IA-2. Además, la DM1 autoinmune suele estar fuertemente asociada a los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) o HLA (“*Human Leukocyte Antigen*”), concretamente a HLA-DR y HLA-DQ, pudiendo tanto predisponer como proteger a padecer la enfermedad [14, 15].

- **Idiopática:** Esta forma de DM engloba a aquellos pacientes en los que no se encuentran datos de autoinmunidad ni haplotipos HLA de predisposición. Como entidad de reciente descripción se conoce poco de su etiología, evolución y pronóstico.

**2. Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2).** También llamada no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta. Es debida a un déficit progresivo de secreción de insulina sobre la base de una insulinoresistencia (reducida captación periférica de la glucosa) en los tejidos periféricos. Este tipo de DM representa el 90% de los casos y principalmente aparece en adultos y sujetos de riesgos que padecen obesidad, hipertensión y con un estilo de vida sedentario. No obstante, en la actualidad también se está manifestando en adolescentes debido al cambio en el estilo de vida, asociado al sedentarismo y a la obesidad.

Por otro lado, aproximadamente el 10% de los pacientes diagnosticados como diabéticos tipo 2 presentan autoanticuerpos frente a islotes, como el anti-glutamato descarboxilasa (GAD65) y linfocitos T autorreactivos frente a proteínas del islote al igual que sucede en los paciente diabéticos tipo 1. A estos pacientes se les engloba dentro de un nuevo formato de diabetes conocida como **diabetes autoinmune latente del adulto** (LADA, “*Latent autoimmune diabetes in adults*”) o diabetes tipo 1.5. Sin embargo, existen diferencias entre estos dos tipos de diabetes autoinmunes: diferencias de autoanticuerpos, diferencias en las proteínas reconocidas por los linfocitos T y diferencias en la resistencia a la insulina, incluso se conoce que existe una pequeña proporción de pacientes diabéticos 1.5 que manifiestan reactividad de los linfocitos T y no presentan autoanticuerpos. Estas diferencias inmunológicas entre la diabetes tipo 1 y la diabetes 1.5 sugieren que al menos parcialmente existen diferencias en el proceso de la enfermedad [16, 17].

**3. Diabetes gestacional (DG).** Se caracteriza por una insuficiente secreción de insulina y un aumento en la resistencia a esta hormona durante el embarazo. Sin embargo, la hiperglucemia consecuente no alcanza los niveles establecidos para ser considerada una diabetes. Suele desaparecer después del embarazo, pero las mujeres con diabetes gestacional corren mayor riesgo de padecer DM2 en el futuro.

**4. Otros tipos específicos de Diabetes Mellitus.** Son debidas a otras causas, existiendo mucha variabilidad en cuanto a sus orígenes. Entre ellas, podemos destacar la diabetes monogénica denominada MODY (“*Maturity Onset Diabetes in the Young*”), causada por defectos en ciertos genes necesarios para la funcionalidad de las células beta. Según el gen afectado, se distinguen 6 tipos de MODY: HNF-4 (MODY1), glucoquinasa (MODY2), HNF-1 $\alpha$  (MODY3), factor promotor de la insulina 1 (IPF-1 o Pdx1) (MODY4), HNF-1 $\beta$  (MODY5), Beta 2/Neuro D1 (MODY6). Además, la diabetes puede ser desencadenada por defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías, diabetes inducida por químicos, agentes infecciosos o fármacos, como la diabetes postrasplante, o asociada a otros síndromes genéticos.

### 1.1.3 Prevalencia de la Diabetes Mellitus

La DM ha alcanzado una gran importancia en términos de salud pública y medicina preventiva, debido a las graves complicaciones derivadas de esta enfermedad y el alto costo humano, económico y social. Hoy en día la DM es considerada una epidemia a nivel mundial. Los cálculos más recientes de la Federación Internacional de Diabetes (FID) indican que el 8,8% de los adultos con edad comprendida entre 20 y 79 años tienen diabetes, lo que equivale a 415 millones de personas en todo el mundo, una cifra que podría aumentar hasta 642 millones en el año 2040 si las últimas predicciones se cumplen. Además, la FID estima que a nivel mundial un 46,5 % de los casos no son diagnosticados, lo que representa a 193 millones de personas. Asimismo, se estima que 318 millones de adultos presentan intolerancia a la glucosa, lo que los sitúa en una posición de riesgo a padecer la enfermedad.

En Europa, según la FID, se estima actualmente que el número de personas con diabetes es de 59,8 millones, lo que representa el 9,1% de la población adulta, y podría ascender hasta el 10,7 % en 2040. Además, en la actualidad se estima que en Europa

existen 23 millones casos nos diagnosticados y que este continente presenta la prevalencia más alta de niños diabéticos tipo 1, con 140.000 casos y 21.600 nuevos casos diagnosticados cada año (Anexo 1). En España, se estima que unos 3,5 millones de personas adultas con edades comprendidas entre 20 y 79 padecen DM padecen diabetes, situando la prevalencia en un 10,4%; y se calcula que el número de casos no diagnosticados es de 1,3 millones. El gasto medio por persona diabética fue de unos 3000 dólares y las muertes relacionadas con esta enfermedad, para personas con edades comprendidas entre 20 y 79 años, fueron 22.300 en 2015. Estos valores reflejan el gran impacto de la DM en la sociedad, y el alto costo humano y económico que supone. Para poder hacer frente a esta epidemia, debemos estudiar y comprender cómo funciona el páncreas y las células beta, conocer su desarrollo embrionario y los mecanismos involucrados y causantes de esta enfermedad.

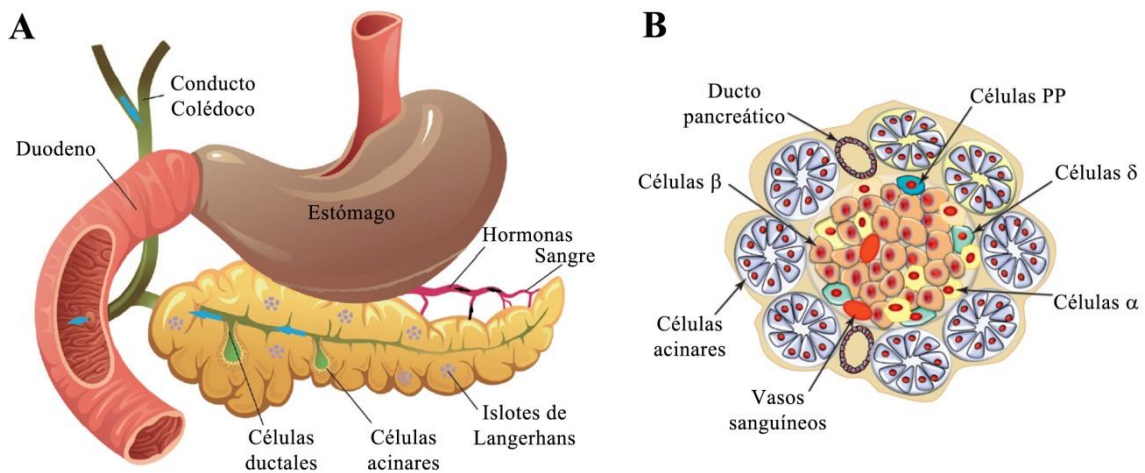
### **1.1.4 Fisiología y desarrollo del páncreas**

#### **Fisiología del páncreas**

El páncreas es un órgano alargado y con forma cónica localizado transversalmente en la parte dorsal del abdomen, detrás del estómago. La cabeza, o zona más ancha, se localiza en la parte derecha del organismo sobre la concavidad del duodeno, y el cuello y el cuerpo se extienden hacia la parte izquierda, hasta la cola, localizada cerca del bazo. El páncreas es un órgano mixto, está compuesto por células con función exocrina y por células con función endocrina (Figura 1A). En la especie humana, su longitud oscila entre 15 a 23 cm. Aproximadamente un 80-85% del volumen pancreático está compuesto por la parte exocrina, un 10-15% corresponde a la matriz extracelular y los vasos, mientras que la porción endocrina constituye sólo alrededor del 1%.

El **páncreas exocrino** está constituido por células epiteliales dispuestas en estructuras ovoides huecas llamadas acinos pancreáticos y por el sistema ductal. Las células acinosas son las responsables de la secreción de las enzimas digestivas (proteasas, lipasas y amilasas) y las células ductales, responsables de la salida de los jugos gástricos desde las células exocrinas al intestino a través del conducto pancreático principal (Conducto de Wirsung) y el accesorio (Conducto de Santorini).

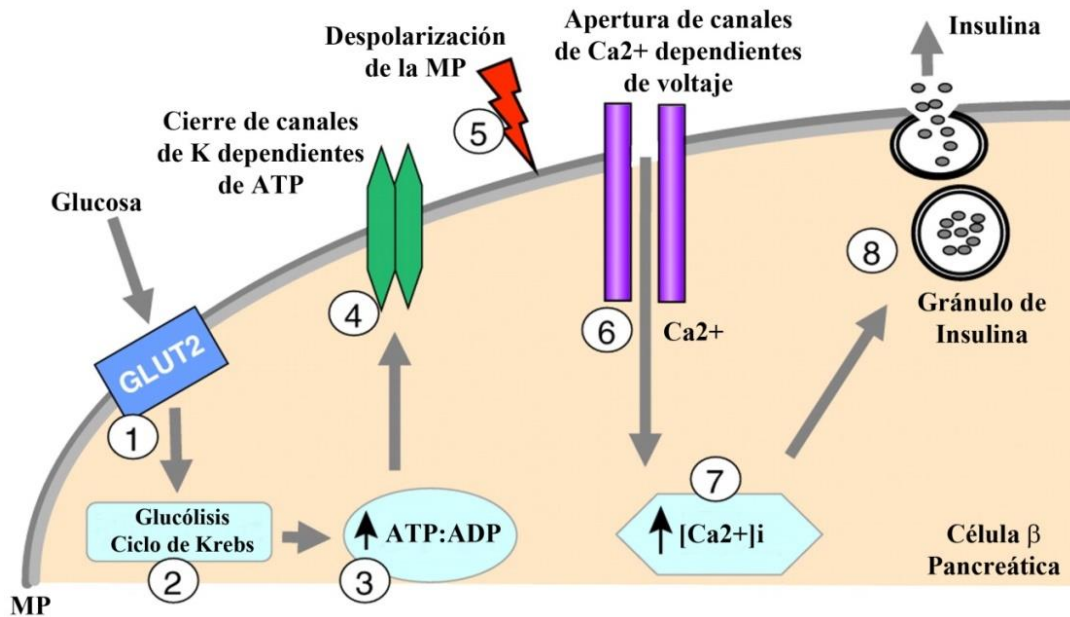
El **páncreas endocrino** se compone de aproximadamente un millón de conglomerados esféricos, de alrededor de 1.000 - 3.000 células, llamados islotes de Langerhans. Los diferentes tipos celulares que forman los islotes de Langerhans se encargan de la producción y liberación de hormonas al torrente sanguíneo (Figura 1B). Las células  $\alpha$  son las responsables de la secreción del glucagón, las células  $\beta$  secretan la insulina, las células  $\delta$  secretan la somatostatina, las células PP secretan el polipéptido pancreático (PPY) y las células  $\epsilon$  son las responsables de la secreción de grelina.



**Figura 1. Representación de la estructura del páncreas y de los islotes de Langerhans.** A) La imagen muestra la localización del páncreas respecto al estómago y duodeno, así como una representación de su estructura interna. B) Representación de un corte transversal de un islote de Langerhans, y su composición de células endocrinas y parte del páncreas exocrino, células acinares y ducto pancreático. Imágenes tomadas y modificadas de A) *Taylor Francis* y colaboradores [18] y B) *Shimon Efrat* y colaboradores [19].

En DM, las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans son las que se encuentran comprometidas. Su función es liberar insulina en respuesta a glucosa, funcionando así como sensor de glucosa en la sangre. Cuando la concentración de glucosa es superior a 5 mM la célula  $\beta$  activa un mecanismo de secreción de insulina altamente controlado.

Un riguroso control de este mecanismo permite que la célula  $\beta$  responda a los cambios de glucosa en sangre y mantenga la homeostasis (Figura 2). Una falta de respuesta adecuada generará hiperglucemia, pudiendo desencadenar a largo plazo diabetes. Por tanto, el correcto desarrollo embrionario del páncreas, así como, el mantenimiento de su buen funcionamiento durante la vida del individuo son necesarios.

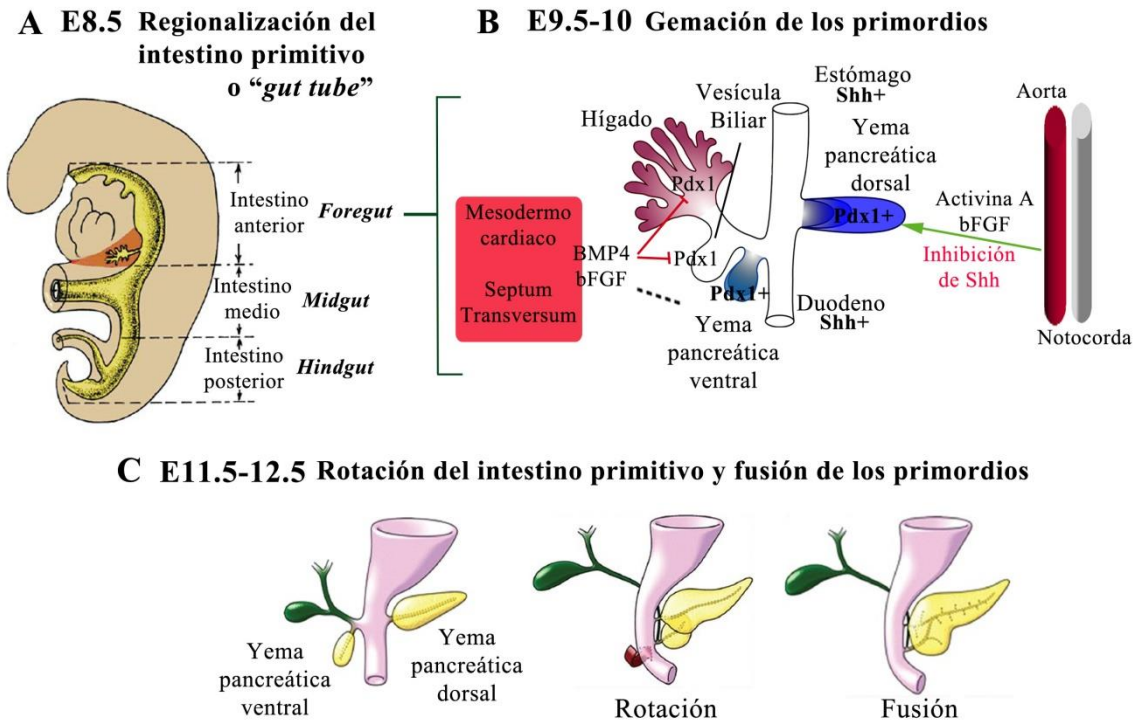


**Figura 2. Mecanismo de liberación de insulina dependiente de glucosa.** La glucosa entra en la célula a través del transportador de membrana GLUT2 (1) y pasa a la vía glucolítica, para ser fosforilada por la glucoquinasa (GCK) y al ciclo de Krebs (2), incrementado el nivel de ATP intracelular y con ello, el ratio ATP: ADP (3) lo que conlleva a un cierre de las canales de  $K_{ATP}$  (4) y a una despolarización de la membrana plasmática (5). La despolarización origina la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (6) creando un influjo de calcio hacia el interior de la célula  $\beta$  y aumentando la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (7), lo que induce la fusión de los gránulos de insulina con la membrana plasmática y la insulina es liberada de la célula (8). Además, el  $Ca^{2+}$  actúa a nivel de transcripción promoviendo la expresión del gen de la insulina y la síntesis de nueva pre-pro-insulina. La maduración de la insulina se produce en el aparato de Golgi mediante la acción de las proconvertasas PC1/3 y PC2 [20] que escinden la pro-insulina en Insulina y Péptido-C. MP: membrana plasmática. Imagen tomada y modificada de Zhanxiang Wang y colaboradores [21].

### Desarrollo embrionario y la diferenciación del páncreas.

Una multitud de procesos celulares y vías de señalización coordinan la embriogénesis del páncreas. En ratones, a día embrionario (E) 6.5, durante la gastrulación, el endodermo se organiza para formar el intestino primitivo o “gut tube” a través de movimientos morfogénicos y señales extrínsecas provenientes de la notocorda. La regionalización del intestino primitivo tiene lugar en el día E8.5, a lo largo de los ejes antero-posterior y dorso-ventral, dividiéndose en tres zonas con expresión génica característica: intestino anterior o “foregut”, donde se expresan los genes *Sox*, *Hhex* y *Pdx1*, intestino medio o “midgut”, se encuentra expresión de *Pdx1* y

*Cdx2* y el intestino posterior o “*hindgut*”, con expresión génica de *Cdx2* y *Cdx1* (Figura 3A). El primordio pancreático dorsal aparece a día E9.5, localizándose en la parte más posterior del “*foregut*”. El brote del primordio dorsal tiene lugar gracias a señales provenientes de la notocorda y la aorta (Activina A y el factor básico de crecimiento de fibroblastos, bFGF), que permiten la expresión del factor de transcripción Pdx1 (*Pancreatic and duodenal homeobox 1*) en esta región a través de la inhibición la expresión de Sonic Hedgehog (*Shh*), proteína necesaria para la formación del estómago y del duodeno, pero bloquea el desarrollo del páncreas [22, 23]. Al igual que sucede en el estómago y el duodeno, para inducir el desarrollo del hígado y del sistema biliar es necesario inhibir la expresión de Pdx1 en esta región. Pero en este caso, las señales que reprimen Pdx1 son enviadas desde el mesodermo cardíaco y *septum transversum* (bFGF y el BMP4) [24]. El primordio pancreático ventral aparece en el día E10, y presenta expresión del gen *Pdx1*, al igual que la región dorsal (Figura 3B). Durante estos días existe una continua expansión epitelial y, entre el día E11.5 y E12.5, el intestino primitivo rota llevando el primordio pancreático ventral a la región dorsal y fusionarse en un único órgano (Figura 3C). Más adelante en el desarrollo, la yema ventral formará la parte posterior de la cabeza, y la yema dorsal dará lugar principalmente a la cola y cuerpo del páncreas. En esta primera fase del desarrollo pancreático, denominada primera transición (E9.5-E12.5), el epitelio pancreático se compone principalmente de células progenitoras pancreáticas multipotentes (MPC) y además, se pueden detectar las primeras células endocrinas diferenciadas, principalmente células  $\alpha$  y algunas células insulina<sup>+</sup> o glucagón<sup>+</sup>/insulina<sup>+</sup> [25]. En el inicio de la maduración morfogénica, en torno al día E12, el epitelio pancreático se divide en dominios “*tip*” y “*trunk*”, con posición apical y troncal, respectivamente, en las ramificaciones pancreáticas. En los dominios “*tip*” se encuentran las células MPC caracterizadas como Pdx1<sup>+</sup> Ptf1a<sup>+</sup> c-Myc<sup>high</sup> Cpa1<sup>+</sup>, las cuales presentan capacidad proliferativa y diferenciadora hacia células de los tres linajes pancreáticos: el acinar, el ductal y el endocrino, durante la transición secundaria (E13.5-E15.5) [26]. Las células MPC se diferencian en los dominios “*tip*” hacia células acinares, características por la expresión de *Ptf1a*. Los dominios “*trunk*” se componen de progenitores bi-potentes responsables de la diferenciación endocrina y ductal y característicos por la expresión de *Sox9*, *Hnf1b* y *Nkx6.1* [27]. El equilibrio entre la diferenciación acinar y endocrina requerida para el desarrollo normal del páncreas se mantiene por el antagonismo entre *Ptf1a* y *Nkx6.1* en los progenitores multipotentes [28].



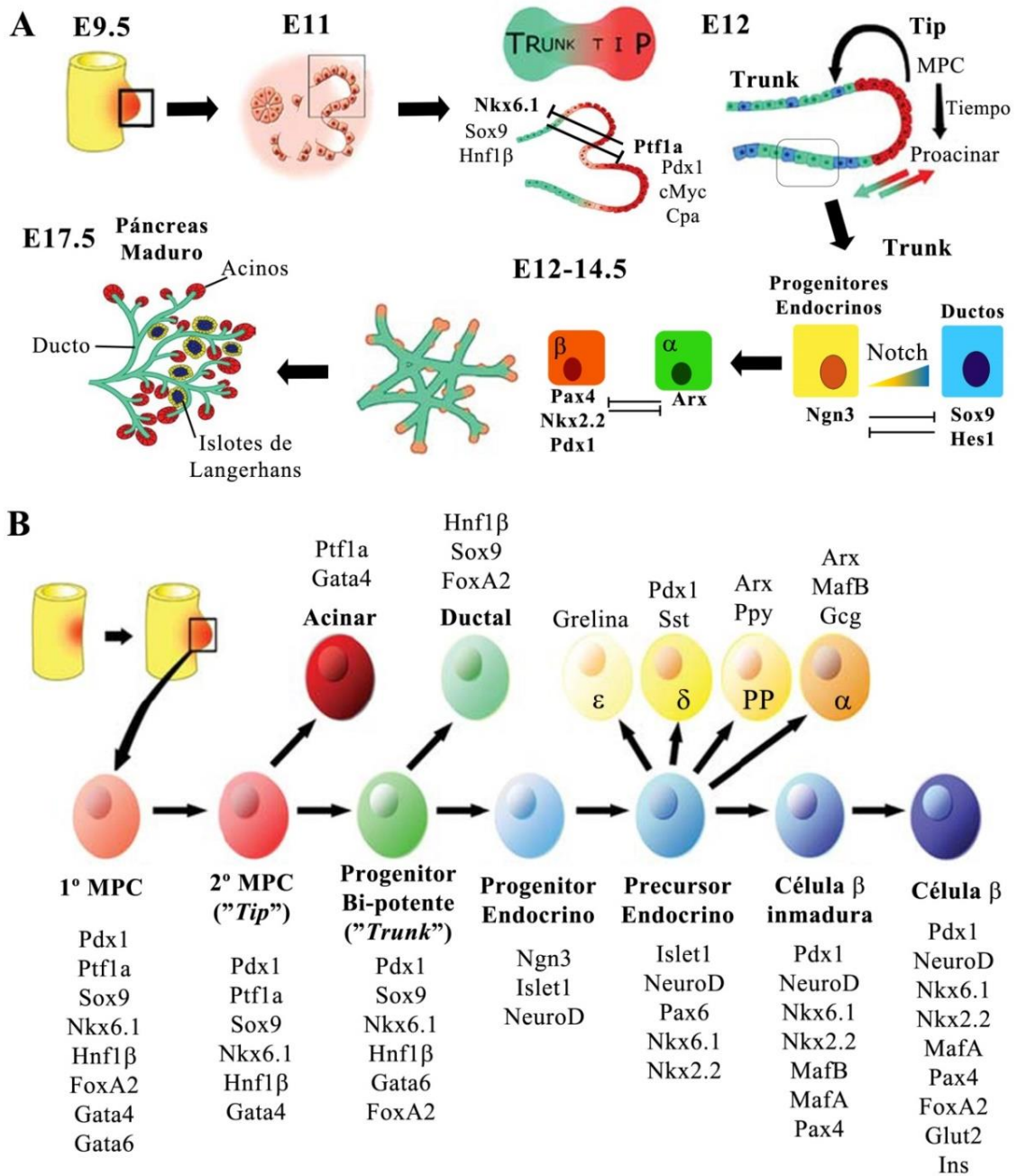
**Figura 3. Representación de la regionalización del intestino primitivo o “gut tube” y la primera transición del desarrollo pancreático (E9.5-12.5).** **A)** Representa un corte sagital y la regionalización del intestino primitivo en tres partes: intestino anterior o “foregut”, intestino medio o “midgut” e intestino posterior o “hindgut” a día embrionario E8.5. **B)** Muestra las señales que tienen lugar en la aparición del primordio pancreático dorsal (E.9.5) y ventral (E10). Las señales enviadas por la aorta y la notocorda (Activina A y bFGF), permiten la expresión de Pdx1 en el primordio pancreático dorsal mediante la inhibición de la expresión de Shh. El primordio pancreático ventral también presenta expresión de Pdx1, escapando de las señales represoras que son enviadas desde el mesodermo cardíaco y el *septum transversum* (BMP4 y bFGF). **C)** Ilustra la rotación del primordio ventral y la fusión entre el primordio ventral y dorsal durante el desarrollo embrionario del páncreas (E11.5-12.5). Imágenes tomadas y modificadas de *Thakur. S* y colaboradores [29].

Por otro lado, la expresión del factor de transcripción *Ngn3* es necesaria para la distinción de los precursores endocrinos de los ductales. Se ha descrito que la vía de señalización celular de Notch tiene un papel relevante en la especificación de los linajes pancreáticos [30]. Cuando la vía Notch se encuentra altamente activada se induce la expresión de los genes *Sox9* y *Hes1*, favoreciéndose la formación del páncreas exocrino. La expresión de *Hes1* a su vez, inhibe la expresión de *Ngn3*, lo que favorece la diferenciación ductal. Por el contrario, si la vía de señalización de Notch presenta una activación intermedia, se induce la expresión de *Sox9* pero no *Hes1*, por lo que *Ngn3* se

expresa y se favorece la diferenciación endocrina. Se ha propuesto un modelo basado en la producción de Notch por parte de los precursores endocrinos para inhibir de esta manera la expresión de *Ngn3* en las células vecinas [31, 32]. Los linajes endocrinos derivarán así de un precursor común que expresa *Ngn3* [33], aunque aún queda por estudiar con mayor profundidad cuáles son los mecanismos que favorecen la formación de cada tipo celular que compone el islote de Langerhans. Según se ha descrito, la sincronización de la activación de *Ngn3* [34] junto con un conjunto de factores de transcripción parece ser el mecanismo clave. Los factores de transcripción que tienen un papel conocido hasta ahora son *Nkx2.2*, *Pax4* y *Arx*. Se conoce que para la formación de las células  $\beta$  es necesario la expresión de *Nkx2.2*; siendo por otro lado inhibitoria para la formación de las células  $\epsilon$ . Además, se ha descrito que su interacción con *Arx* afecta a la formación de las células PP, disminuyendo la población de células PP en células carentes de expresión de *Nkx2.2*, pero la población se restablece si ambos genes son silenciados [35]. Por otro lado, se conoce la función antagónica entre *Pax4* y *Arx*, que inducen la formación de células  $\beta$  o  $\alpha$ , respectivamente [36] (Figura 4A). De esta manera, la expresión de factores de transcripción dirigen la diferenciación de los tres linajes pancreáticos, desde la expresión en las células multipotentes de los dominios “tip” y las bi-potentes de los dominios “trunk”, hasta la especificación del linaje endocrino y en particular de la células  $\beta$ , siendo ésta última caracterizada por la expresión de *Pdx1*, *MafA*, *Nkx6.1*, *FoxA2*, *Pax4*, *Glut2*, *Ins*, entre otros, necesarios tanto para la correcta diferenciación como funcionamiento de la célula  $\beta$  madura (Figura 4B).

El desarrollo pancreático descrito anteriormente hace referencia al desarrollo del páncreas en ratón pero, aunque el proceso se encuentra bastante conservado en humanos, existen algunas variantes entre ambos. El páncreas humano surge de los primordios dorsal y ventral, originados en el día de gestación (G-d) 26 y 32 (G26d y G32d), respectivamente, y la fusión entre ellos en la semana de gestación 6 (G6w). La segunda transición, con aparición de células endocrinas  $\alpha$  y  $\beta$  tiene lugar en G8w y la diferenciación acinar ocurre en G11w. La formación de los islotes en el desarrollo murino son formados en un estadio cercano al nacimiento y la capacidad de responder a la glucosa (islotes maduros o GSIS) aparece tras el nacimiento, mientras que en el desarrollo pancreático humano la estructura de los islotes aparece en G17-19w y son maduros a partir de la semana 20 de gestación [27, 37, 38] (Anexo 2A).





**Figura 4. Representación de las señales y factores de transcripción involucrados en la diferenciación pancreática.** **A)** División del epitelio pancreático en dominios “tip”, donde se encuentran las células pancreáticas multipotentes (MPC) que se diferencian en células acinares, y dominios “trunk”, donde se hallan progenitores bi-potentes responsables de la diferenciación endocrina y ductal. El equilibrio entre la diferenciación acinar y endocrina se mantiene por el antagonismo entre *Ptf1a* y *Nkx6.1*. La vía de señalización celular Notch tiene un papel relevante en la especificación de los linajes pancreáticos. Los factores de transcripción Pax4 y Arx inducen la formación de células β o α, respectivamente, con función antagónica entre ellos. **B)** Representación de los principales factores de transcripción que tienen un papel importante en cada estadio de la diferenciación pancreática. Imágenes tomadas y modificadas de *Pan, F. C* y *Wright, C.* [27]

Respecto a la expresión de los factores de transcripción implicados en el desarrollo pancreático de ambas especies también se han encontrado algunas diferencias: la expresión de *Pdx1* y *Gata 4* en el desarrollo murino se presenta durante el brote de los primordios ventral y dorsal, mientras que su expresión es más tardía en humanos; *Sox17* se expresa sólo en el primordio ventral en ratón, mientras que en humanos está presente en ambos; *Nkx2.2* se expresa en las células multipotentes pancreáticas en ratón, mientras que en humanos se encuentra presente después de la especificación endocrina; *Nkx6.1* se expresa en el dominio “*tip*” hasta el día E14 en ratón, mientras su expresión es más duradera en humanos en este dominio, la expresión de *Ngn3* es más duradera en humano y las células  $\beta$  murinas carecen de la expresión de *MafB* [37, 39] (Anexo 2B).

La arquitectura y la composición celular de los islotes también exhiben diferencias entre ambas especies. En los islotes murinos, las células  $\beta$  se sitúan en la zona central del islote, y constituyen el 77% de las células que lo componen, mientras que el islote humano presenta en torno al 60% de células  $\beta$  distribuidas entre las demás células endocrinas [40, 41].

### **Pdx1 y diferenciación pancreática**

*Pdx1* fue el primer gen descubierto en tener un papel importante en el desarrollo del páncreas de ratón y humano [42-44] y puede ser considerado uno de los más importantes en el control de la red transcripcional de los factores de transcripción que controlan la proliferación, derivación y diferenciación del páncreas. *Pdx1*, como se ha descrito en el apartado anterior, se expresa el E8.5 durante la regionalización del intestino primitivo, concretamente en el intestino anterior o “*foregut*”, y en los primordios pancreáticos ventral y dorsal entorno al día E9.5-10, y su expresión se mantiene elevada hasta el E13.5. En este momento, cuando produce la determinación endocrina mediante la acción de *Ngn3* y la vía Notch, la expresión de *Pdx1* se ve disminuida, y la expresión se recupera en las células endocrinas que van a ser destinadas a diferenciarse en célula  $\beta$ . La correcta expresión y función de este gen es estrictamente necesario para el correcto desarrollo del páncreas, ya que mutaciones de *Pdx1* causan diversas malformaciones durante la diferenciación, como defectos de la región “*foregut*” posterior y en la formación de los primordios [45, 46]. Además, mutaciones

en el gen *Pdx1* se han relacionado con causar diabetes tipo MODY4 [47]. Por otro lado, se ha descrito que los progenitores pancreáticos que expresan *Pdx1* producen células acinares, ductos y células endocrinas en el páncreas maduro [48]. Sin embargo, hay células endocrinas que pueden ser formadas en mutantes de *Pdx1*, lo que sugiere que al menos algunas de ellas pueden ser formadas por un programa independiente [46, 49].

Para el desarrollo normal del tubo digestivo o estómago y la diferenciación hacia células acinares es necesario una baja expresión de *Pdx1* [50-53], mientras que para la especificación hacia células endocrinas es necesario una expresión significativa. La precisa regulación de *Pdx1* en los diversos tipos de células pancreáticas y en los diferentes estados de especificación y diferenciación está mediada por la regulación de un gran abanico de factores de transcripción que se unen a 50 elementos reguladores en “*cis*” conservados en su promotor. Concretamente, existen cuatro regiones del promotor de *Pdx1* altamente conservadas, denominadas Área I, II y III, localizadas entre -2800 y -1600 pb [54, 55] y un área más aguas arriba del promotor, Área IV (-6200 a -5670 bp) [55]. Las Áreas I-II están involucradas en la regulación de la expresión de *Pdx1* en el islote, mientras que el Área III confiere expresión específica en la célula  $\beta$  [56]. Las Áreas I-II-III presentan sitios de unión consenso de varios factores de transcripción tales como Pdx1 [57], Foxa2 [54, 58], Pax6 [58], Hnf6 [59], Ptf1a [60] y MafA [61]. La regulación de *Pdx1* mediada por el Área IV es menos conocida. Existen evidencias de que FoxA1 y FoxA2 regulan la expresión de *Pdx1* a través de su unión al conservada Área IV, aunque FoxA2 también es descrito que se une al Área III. Se considera que el sitio donde se une FoxA2 depende de la fase del desarrollo; el Área IV es ocupada en un estadio temprano de la diferenciación pancreática, mientras que el Área III es ocupada en un estadio tardío del desarrollo y maduración de la célula  $\beta$  [62].

Estos datos hacen constar como la expresión espacio-temporal y la regulación de *Pdx1* a través de la unión a su promotor de complejos activadores y represores, es muy relevante para el correcto desarrollo y diferenciación pancreática, así como para la funcionalidad del páncreas maduro. Por este motivo, dedicaremos el primer bloque de la tesis al estudio de los mecanismos que controlan la expresión de *Pdx1* en células pluripotentes.

### 1.1.5 Terapia Celular de la Diabetes Mellitus

El descubrimiento de la insulina en 1922 [8] y el desarrollo de nuevas formulaciones para mejorar su eficacia farmacocinética y farmacodinámica, ha evolucionado hasta nuestros días y ha permitido el control de la glucemia de los pacientes diabéticos a través de la administración de insulina exógena. Por otro lado, también han mejorado los sistemas de monitorización de la glucosa y administración de insulina. Sin embargo, este sistema no siempre consigue la estabilización de la glucosa en sangre, produciéndose casos de hipoglucemia o hiperglucemia.

La estabilización de la glucemia en sangre de forma más permanente se ha conseguido a través del trasplante de páncreas o de islotes pancreáticos. En 1966, tuvo lugar el primer trasplante de páncreas de donante cadavérico [63]. Desde entonces, la técnica quirúrgica y las terapias inmunosupresoras han avanzado considerablemente, lo que ha permitido un aumento de la supervivencia del trasplante, asociado en la mayoría de los casos a un trasplante de riñón. El trasplante de islotes, es una técnica menos invasiva para el paciente, ya que la operación requiere menos tiempo y sólo anestesia local. El primer trasplante de islotes de donante cadavérico tuvo lugar en 1974, sin embargo el procedimiento fracasó debido a los efectos de las drogas inmunosupresoras [64]. En 1989, *Ricordi* y colaboradores, desarrollaron un método automatizado eficaz para la selección de islotes de páncreas de donantes cadavéricos [65], y fue en 1990, cuando se consiguió realizar con éxito los primeros trasplantes [66, 67]. Más tarde, en el año 2000, *James Shapiro* y colaboradores lograron mantener la glucemia en 7 pacientes diabéticos mediante el trasplante de un elevado número de islotes y un protocolo libre de esteroides, conocido hoy en día como protocolo de Edmonton [68]. Desde entonces, este protocolo ha incrementado de forma significativa el éxito en los trasplantes y se ha adoptado por los centros dedicados a este tipo de trasplantes.

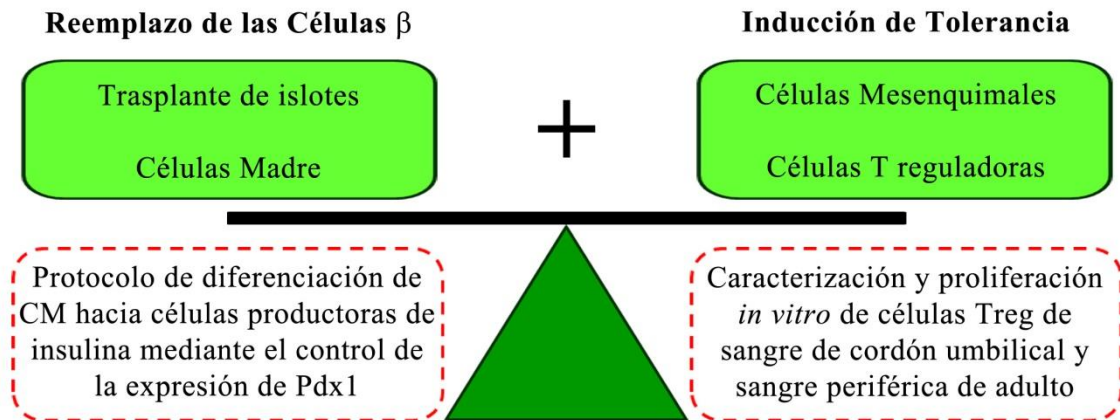
No obstante, como sucede en cualquier trasplante de órganos, el trasplante de páncreas o islotes pancreáticos está sometido a la escasez de donantes, rechazo inmunológico, efectos de la terapia inmunosupresora y duración del trasplante, entre otros problemas. Teniendo en cuenta el aumento en la prevalencia de la diabetes a nivel mundial, y que se estima que este porcentaje se incremente de forma significativa en el futuro, la escasez de donantes es el principal problema al que se enfrenta la terapia celular de esta enfermedad. De esta manera, científicos de todo el mundo trabajan en la búsqueda de nuevos tratamientos para combatir la diabetes.

En la actualidad, la terapia celular de la DM puede ser enfocada desde dos perspectivas distintas. Por un lado, es necesario el reemplazo de las células  $\beta$  dañadas. En este campo se incluye el trasplante de islotes pancreáticos, lo cual conlleva el problema de la escasez de donantes. En este sentido, las células madre (CM) se presentan como una alternativa muy prometedora, ya que constituyen una fuente ilimitada de células que pueden ser utilizadas para la sustitución del tejido dañado. Para la utilización de las CM en la terapia celular de la diabetes, es necesaria su diferenciación *in vitro* hacia el linaje pancreático y en concreto, hacia células  $\beta$ , un procedimiento complejo, ya que requiere mimetizar el desarrollo embrionario del páncreas. Además, los protocolos deben ser reproducibles y eficaces, y conseguir finalmente células con capacidad de liberar insulina en respuesta a la glucosa del medio. Sin embargo, el tratamiento de la diabetes no solamente debe buscar la recuperación de la capacidad de controlar la glucemia, sino también detener el proceso autoinmune que sucede en la DM1. Asimismo, el trasplante de islotes y el trasplante de células  $\beta$  diferenciadas *in vitro* están sometidos al rechazo inmunológico. Para combatir este problema, los primeros ensayos clínicos utilizaron inmunosupresores inespecíficos, y aunque se observó la disminución de la necesidad de insulina, los efectos secundarios que ocasionaron hicieron que se abandonase esta estrategia [69, 70]. Más recientemente, se desarrollaron anticuerpos monoclonales humanizados para bloquear la acción de los linfocitos, observándose efectos beneficiosos sobre la acción del sistema inmunitario, pero efectos secundarios negativos e ineficacia en detener y/o retrasar la DM1 en ausencia de efectos adversos [71-73]. Sin embargo, esta aproximación se utiliza como tratamiento de indicación en otras enfermedades autoinmunes. Una posible explicación de la ausencia de éxito en la inmunoterapia de la DM1 puede estar en las diferencias existentes entre este trastorno y otras enfermedades autoinmunes, como la existencia de procesos subyacentes que no son bloqueados por estos inmunosupresores, presentación de autoantígenos específicos de célula  $\beta$  pancreática como la insulina y otros como el GAD [74], inflamación de los islotes de Langerhans con infiltración de monocitos/macrófagos [75] y la variedad de genes implicados. En este contexto, las células T reguladoras (Treg) han adquirido una gran relevancia en las últimas décadas, y se consideran una nueva herramienta para frenar el ataque inmunológico, debido a su capacidad de supresión del sistema inmune. El uso de células Treg para la terapia celular de la diabetes ya se ha probado con éxito en modelos murinos diabéticos [307-

309]. Recientemente, el grupo de *Bluestone* y colaboradores ha publicado el primer ensayo clínico con células Treg en fase I con pacientes diabéticos, obteniendo resultados prometedores [76]. Igualmente, se ha planteado el uso de células madre mesenquimales (MSC) en la terapia celular de la DM por sus propiedades anti-inflamatorias, inmunomoduladoras y tróficas, para combatir el proceso inflamatorio que parece preceder al ataque autoinmune. Nuestro grupo ha demostrado que las células mesenquimales de origen autólogo pueden presentar modificaciones epigenéticas que, al contrario de pacientes sanos, promueven la microtrombosis [77]. Además, en esta y otras patologías la frecuencia de mosaicismo en las células expandidas desaconseja su uso. De ahí la búsqueda de fuentes alogénicas. En este sentido, el estudio de las células mesenquimales y las células T reguladoras procedentes de cordón umbilical (CB MSC y CB Treg) ha centrado la atención de numerosos grupos de investigación. En 2013, *Hu* y colaboradores han publicado los resultados de la infusión de CB MSC en pacientes con DM1, mostrando la efectividad del tratamiento con la reducción de la hiperglucemia y los requerimientos diarios de insulina [78]. Por otro lado, *Brunstein* y colaboradores publicaron, en 2011 el primer ensayo en fase I utilizando células CB Treg expandidas *in vitro*, en pacientes trasplantados con HSH para tratar la enfermedad injerto contra huésped (GvHD), demostrando la seguridad del uso de células CB Treg en la clínica [79]. De esta manera, la sangre de cordón umbilical parece ser una fuente prometedora de células Treg y MSC autólogas para el tratamiento de la DM1, por su facilidad de aislamiento, por ser una fuente ilimitada y por el estado *naïve* de las células Treg. No obstante, existen en la actualidad muchos estudios dedicados a su caracterización, funcionalidad y estabilidad, para optimizar su uso en terapia.

Como resumen, podemos destacar los dos abordajes que se plantean hoy en día para la terapia celular de la DM, la sustitución de las células  $\beta$  dañadas, mediante el uso de CM diferenciadas *in vitro*, y la inducción de la tolerancia inmunológica y la reducción de la inflamación, mediante el trasplante con células Treg y MSC. En este contexto, este trabajo se ha centrado en optimizar los procesos de diferenciación *in vitro* de células madre hacia células productoras de insulina, mediante el control de la expresión del factor de transcripción Pdx1, y a la caracterización, activación y expansión de las células CB Treg, con el objetivo de hallar una terapia combinada eficaz para tratar la DM (Figura 5).

## TERAPIA CELULAR DE LA DIABETES MELLITUS



**Figura 5. Abordajes para la Terapia Celular de la Diabetes Mellitus.** Esta imagen representa una propuesta para el tratamiento de la DM basada en la terapia combinada de sustitución de las células  $\beta$  dañadas y la inducción de la tolerancia. La terapia celular para el reemplazo de las células  $\beta$  implica el trasplante de páncreas o islotes, o la utilización de células madre mediante su previa diferenciación *in vitro* hacia células productoras de insulina. Por otro lado, se propone el uso de células madre mesenquimales, por sus propiedades anti-inflamatorias, inmunomoduladoras y tróficas, y de células T reguladoras, por su capacidad de suprimir el sistema inmune, para frenar el ataque autoinmune de las células  $\beta$  e inducir tolerancia inmunológica. Los rectángulos rojos punteados hacen referencia a las aportaciones que se han realizado en este trabajo: el diseño de un protocolo de diferenciación de CM hacia células productoras de insulina, mediante el control de la expresión del factor de transcripción Pdx1, y el estudio de la caracterización, activación y proliferación *in vitro* de células Treg procedentes de sangre periférica de adulto (PB Treg) y sangre de cordón umbilical (CB Treg).

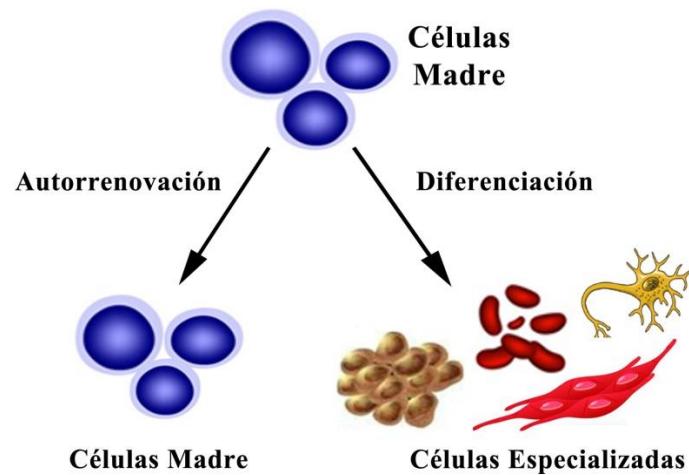




## 1.2. Células Madre

### 1.2.1 Concepto y Definición

Las células madre (CM) o células troncales (CT) son células no especializadas que se caracterizan por su capacidad ilimitada de *autorrenovación* mediante división celular y por el mantenimiento del *potencial de diferenciación* hacia otros tipos celulares, bajo ciertos estímulos o condiciones fisiológicas (Figura 6). De esta manera, estas células son capaces de dividirse de manera ilimitada manteniendo sus propiedades, y al mismo tiempo, pueden responder a estímulos para generar células especializadas de un tejido concreto mediante su diferenciación. Estas células son conservadas en nichos específicos, y mediante su división regulan su número y la homeostasis celular.



**Figura 6. Características de las Células Madre.** La capacidad de autorrenovación y de diferenciación hacia células especializadas distingue a las células madre del resto de tipos celulares.

### 1.2.2 Clasificación de las Células Madre

La clasificación de las CM suele atender a dos características, el origen y el potencial de diferenciación. La clasificación de las CM según su **origen** tiene en cuenta el tejido del cual las células se han aislado. Según esta característica, se pueden distinguir: Células Madre Embrionarias (CME), Células Madre Fetales y Células Madre Adultas. La clasificación de las CM según su **potencial de diferenciación**, categoriza a las células según su capacidad de generar tipos de células diferentes (Figura 7). La célula con mayor potencial de diferenciación es aquella que puede generar mayor variedad de tipos celulares.

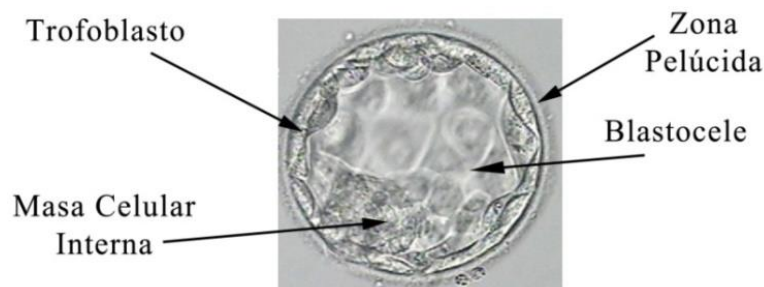


**Figura 7. Clasificación de las Células Madre según su Potencial de Diferenciación.**

*Totipotente*: células con capacidad de autorrenovación indefinida, manteniendo su estado no diferenciado y capaces de originar un organismo completo (Cigoto); *Pluripotente*: células capaces de autorrenovarse indefinidamente manteniendo su estado no diferenciado y originar cualquier tipo celular encontrado en las tres capas germinales; *Multipotente*: células capaces de autorrenovarse de forma no indefinida y generar más de un tipo de célula especializada; *Unipotente*: células que solo pueden derivar en un tipo celular. *Célula Especializada*: células diferenciada con una función específica en el organismo.

### 1.2.3 Las Células Madre Embrionarias

Las Células Madre Embrionarias (CME) o Células Troncales Embrionarias (CTE) son células pluripotentes derivadas de la masa celular interna (MCI) del blastocisto, una fase temprana del desarrollo embrionario previa a la implantación en el útero. La MCI está compuesta por grupo reducido de células, a las cuales rodea una capa esférica de células denominada trofoblasto o trofoectodermo. Esta capa a su vez está recubierta por la zona pelúcida y ambas generan una cavidad rellena de líquido denominada blastocele (Figura 8).



**Figura 8. Blastocisto humano.** En la imagen se puede observar la MCI, el trofoectodermo o trofoblasto, la zona pelúcida y el blastocele. Imagen tomada y modificada de *Fertility Solutions* (<http://www.fssc.com.au/cleavage-versus-blastocyst-transfer-which-is-for-you/>).

El aislamiento de CME murinas (CMEr) fue descrito por primera vez en 1981 [80] y diversos grupos reprodujeron estos aislamiento dando lugar a distintas líneas de CME. En cuanto a las células madre embrionarias humanas (CMEh), no fue hasta 1998 cuando *Thomson* y colaboradores [81] consiguieron derivar y mantener en cultivo CMEh derivadas de masa celular interna de un blastocisto obtenido mediante fecundación *in vitro* (FIV). Este retraso fue debido a la dificultad de mantener vivo el embrión de una sola célula el tiempo necesario para obtener un blastocisto y a las diferencias especie-específicas entre humano y ratón. Los embriones utilizados para obtener las CMEh son, por lo general embriones sobrantes, generados mediante FIV y son cedidos a la investigación bajo consentimiento informado del donante.

Los mecanismos de aislamiento de las CME de la MCI son varios, entre los que destacan: el aislamiento inmuno-quirúrgico [81, 82], el aislamiento mecánico [83] y el cultivo directo del embrión completo [84].

### 1.2.4 Células Madre de Pluripotencia Inducida

Las células madre embrionarias humanas pueden ser usadas en el tratamientos de diversas enfermedades; sin embargo, existen dificultades éticas con respecto el uso de embriones humanos, además del problema del rechazo en los trasplantes. Una manera de bordear estos problemas es la generación de células pluripotentes directamente de las células de los pacientes.

Desde la obtención de las CMER en 1981 [80], muchos científicos centraron su atención en los estudios con células pluripotentes de origen embrionario. Años más tarde, los intentos de reprogramación del núcleo de una célula somática mediante transferencia a un oocito [85] o por fusión con células embrionarias murinas y humanas [86, 87] indicaban que el oocito y las células embrionarias contenían factores que podían proporcionar totipotencia o pluripotencia a la células somática. El momento cumbre sobre reprogramación se produjo en 2006, a mano del grupo de *Yamanaka*, los cuales hipotetizaron que los factores que tenían un papel importante en el mantenimiento de la pluripotencia también podrían inducir la pluripotencia en células somáticas. De 24 candidatos seleccionados para sus experimentos, fueron cuatro los factores de transcripción necesarios para inducir la reprogramación: Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4 [88]. Sin embargo, como ellos intuyeron, la utilización de c-Myc para la reprogramación celular no hacía segura la utilización de estas células en terapia, observándose la formación de tumores en ratones trasplantados con las células generadas [89]. En 2007, *Thomson* y colaboradores mostraron que los factores Oct4, Sox2, Nanog y Lin28 son suficientes para la reprogramación de células somáticas humanas y obtención de células pluripotentes con características similares a las células embrionarias [90].

De esta manera se han establecido diversas líneas de células madre de pluripotencia inducida (iPSC), con características similares a las células madre embrionarias, y con un método y medio de cultivo común. Sin embargo, las iPSC presentan características que las hacen diferenciarse de las células embrionarias, como la plasticidad y los perfiles génicos y epigenéticos [91-93], posiblemente debido a la eficiencia de reprogramación y a las técnicas utilizadas para su derivación. No obstante, las iPSC prometen ser una herramienta muy útil en el estudio de enfermedades, procesos patológicos y prueba de fármacos.

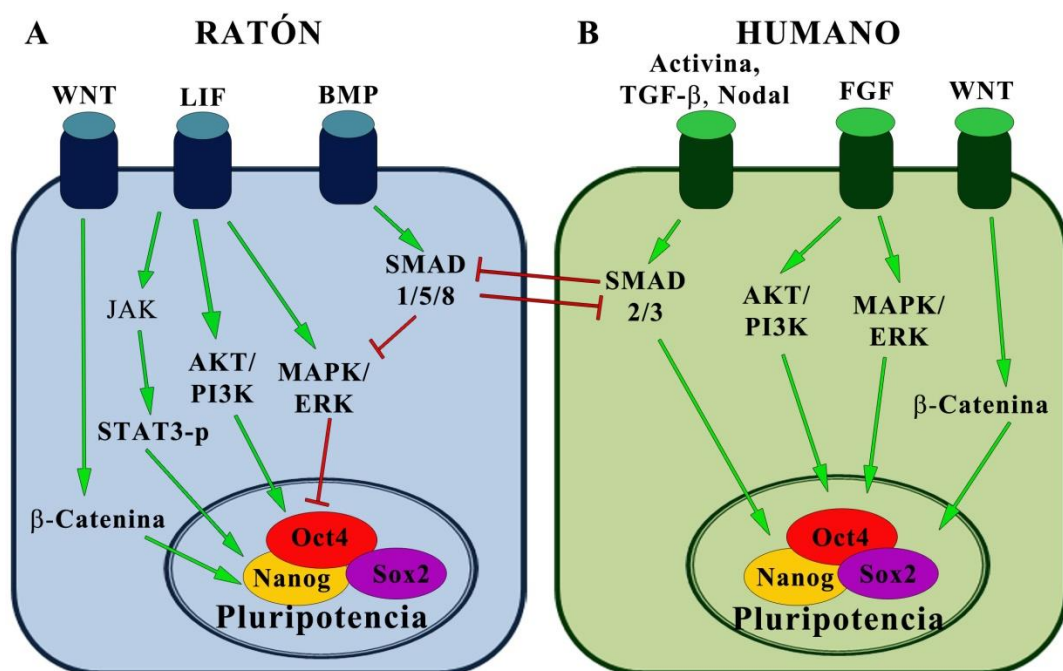
### 1.2.5 Mantenimiento de la Pluripotencia

El entendimiento de los mecanismos moleculares que controlan la pluripotencia es esencial para el empleo de las CM en terapia celular. Existen multitud de estudios centrados en la optimización de las condiciones de cultivo que mantengan esta propiedad y en el estudio de las vías de señalización implicadas en este proceso.

Desde el aislamiento de las CME murinas, en 1981, la expansión y el mantenimiento de la pluripotencia fue llevada a cabo mediante su co-cultivo con fibroblastos embrionarios murinos (MEF) inactivos [80]. Años más tarde, se descubrió que los fibroblastos liberaban al medio de cultivo el Factor Inhibitorio de Leucemia (LIF), y que éste era el responsable del mantenimiento de la capacidad de autorrenovación de las CMer [94]. La vía de señalización de LIF implica la activación de STAT3 [95], mediante fosforilación por una tirosina quinasa (JAK), la cual es suficiente para inhibir la diferenciación en presencia de suero [96]. Cuando STAT3 es fosforilada, se transloca al núcleo y se une a los promotores de sus genes diana. Asimismo, LIF puede activar la vía de señalización PI3K/AKT [97], la cual es importante para la proliferación, supervivencia y mantenimiento de la pluripotencia de las CMer; y estimular la activación de la vía de señalización MAPK/ERK, cuya activación promueve diferenciación. Se ha demostrado que la inhibición de MAPK/ERK, a través de la vía BMP4, un miembro de la familia de TGF- $\beta$ , favorece el mantenimiento de la pluripotencia [98], y la adición de BMP4 al medio de cultivo permite el mantenimiento de la pluripotencia de las CMer en presencia de LIF y ausencia de suero [99]. De esta manera, las CMer mantienen su estado pluripotente a través del equilibrio entre la activación de STAT3 y MAPK/ERK (Figura 9A).

Por el contrario, la vía de señalización de LIF no es suficiente para mantener la pluripotencia de las células pluripotentes de origen humano, las cuales presentan en su estado indiferenciado una alta actividad de la vía MEK/ERK, gracias a la señalización por bFGF [100]. Por otro lado, la señalización por bFGF también activa la vía AKT/PI3K, importante en el mantenimiento de la pluripotencia y supervivencia de las células madre humanas, y parece estar relacionada con la activación de MAPK/ERK [101, 102]. Así, la señalización por bFGF es central y significativa en el control de la pluripotencia y autorrenovación de las células pluripotentes humanas. Además, las vías de señalización activadas por TGF- $\beta$ , Activina y Nodal presentan un papel importante

en el mantenimiento del estado indiferenciado. La activación de esta vía funciona a través de los factores de transcripción SMAD2/3, los cuales inhiben la actividad de SMAD1/5, que actúan aguas debajo de la señalización de BMP4 [103]. Otra vía de señalización implicada en el mantenimiento de la pluripotencia es WNT, la cual parece funcionar de la misma manera en las células madre murinas y humanas. Esta vía se encuentra altamente activa en células indiferenciadas, mientras que la diferenciación induce su represión, y su acción esta mediada por la inhibición de GSK3- $\beta$  y la consecuente translocación de  $\beta$ -Catenina al núcleo, además de incrementar la expresión de STAT3 [104, 105] (Figura 9B).



**Figura 9. Vías de señalización implicadas en el control de la pluripotencia en células pluripotentes murinas y humanas.** **A)** Principales vías de señalización que controlan la pluripotencia en células de ratón. *WNT*: su activación favorece la translocación de  $\beta$ -Catenina al núcleo celular; *LIF*: induce la fosforilación y translocación al núcleo de STAT3, y activa la vías de señalización AKT/PI3K y MAPK/ERK; *BMP*: reprime la vía de señalización MAPK/ERK, la cual controla de forma negativa la pluripotencia, a través de la actuación de SMAD1/5/8. **B)** Principales vías de señalización que controlan la pluripotencia en células humanas. *WNT*: funciona de manera similar que en células de ratón, a través de  $\beta$ -Catenina, *FGF*: activa las vía de señalización AKT/PI3K y MAPK/ERK, las cuales favorecen el mantenimiento de la pluripotencia; *Activina*, *TGF- $\beta$* , *Nodal*: Favorecen la pluripotencia a través de la acción de SMAD2/3. Las vías de señalización de BMP y Activina, TGF- $\beta$  y Nodal, presentan efectos antagónicos en ambas líneas celulares, así como la vía MAPK/ERK.

A pesar de que las vías de señalización que controlan la pluripotencia en las células pluripotentes de origen murino y humano son diferentes, ambas líneas celulares presentan un perfil de expresión bastante similar y los factores de transcripción claves para el mantenimiento de la pluripotencia y cómo interactúan entre ellos está conservado entre ambas especies. Entre los factores de transcripción responsables del control de mantenimiento del estado indiferenciado y la diferenciación celular se puede destacar Oct4, Sox2 y Nanog, los cuales se expresan o inhiben en función de las señales extracelulares descritas anteriormente, y por ellos mismos.

Como se puede comprobar, las CME murinas y humanas requieren distintas vías de señalización para el mantenimiento de su estado indiferenciado. Por este motivo, los medios usados para el crecimiento y mantenimiento de la pluripotencia de las CMEr y CMEh son distintos: las células murinas son crecidas en un medio suplementado con suero y LIF; mientras que el cultivo de las células humanas se mantienen sobre una capa celular “*feeder layer*” de fibroblastos humanos inactivos o utilizando matrices sintéticas, como Matrigel o Laminina [106] y medio de cultivo previamente condicionado por fibroblastos, en ambos caso suplementado con bFGF. Por otro lado, el suero de origen animal presente en los medios de cultivo imposibilita el uso de éstas células en terapia celular, por lo que numerosos investigadores han centrado su estudio en la búsqueda de sustitutos de suero para mantener las células en estado indiferenciados y favorecer su crecimiento. Este es el caso del sustituto de suero “*Knockout™ Serum Replacement*” (KSR), una formulación definida libre de suero que consigue este objetivo con éxito, y se usa actualmente para reemplazar el suero del medio de cultivo de las células humanas posibilitando su uso en terapia celular.

### **1.2.6 Diferenciación y remodelación de la cromatina**

El genoma de las CME pluripotentes es altamente “plástico”, de manera que le permiten entrar rápidamente en proceso de autorrenovación o diferenciación en función de las señales extracelulares que reciben. Una vez que cesan las señales que favorecen la pluripotencia y predominan aquellas que inducen diferenciación, comienza un proceso de especificación celular mediante la implementación de programas genómicos de expresión, confiriendo a cada célula un papel transcripcional único. En este balance entre pluripotencia y diferenciación es importante la estructura de la cromatina.

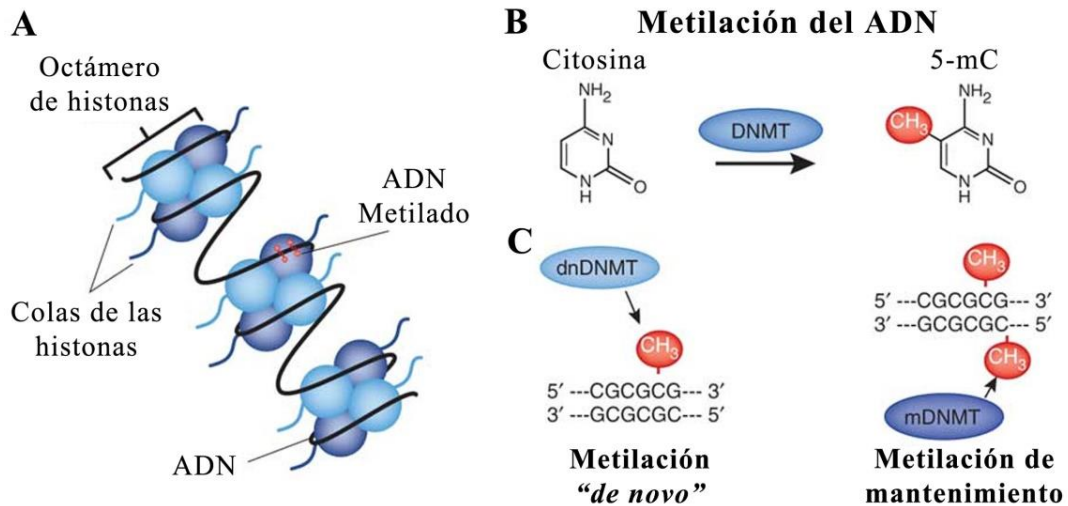
Mientras las CM pluripotentes se caracterizan por tener una organización general de la cromatina “descondensada”, las células que entran en el programa de diferenciación incrementan la condensación su cromatina y presentan mayor número de regiones transcripcionalmente inactivas. En este control de la estructura de la cromatina y en el estado transcripcional de los genes juegan un papel importante la metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales de las histonas.

### **Metilación de ADN**

La metilación del ADN es un proceso por el cual grupos metilos (-CH<sub>3</sub>) son incorporados a nucleótidos de citosina o adenina. El proceso de metilación de ADN más ampliamente caracterizado es la unión covalente del grupo metilo al carbono 5 del anillo de la citosina, resultando en 5-metilCitosina (5-mC). En las células somáticas, la 5-mC se encuentra casi exclusivamente en sitios CpG, en los cuales un nucleótido de citosina es localizado junto a un nucleótido de guanina, ambos enlazados por un fosfato (p). Sin embargo, en células embrionarias se encuentra una gran proporción de 5-mC situadas en sitios CpA, CpT, CHG o CHH, donde H representa A, C o T [107-109]. La mayoría de los sitios CpG susceptibles a metilación se encuentran en zonas con altas densidad de sitios CpG, denominadas islas CpG. La definición formal de una isla CpG es una región de tamaño igual o superior a 500 pb, con un porcentaje de CpG mayor del 50% y con un promedio de CpG observado/esperado mayor de 0,6.

En el desarrollo embrionario, la metilación del ADN tiene un papel relevante [110]. Durante los primeros estadios del desarrollo eucariota, el genoma se encuentra relativamente desmetilado, y en los estadios de mórula y blástula tienen lugar eventos de metilación “*de novo*”, introduciéndose nueva información al ADN [111, 112]. Durante las siguientes divisiones celulares y durante la vida del organismo, también tienen lugar metilaciones de ADN en lugares opuestos a los metilados en la cadena madre, así las células resultantes mantienen el patrón de metilación después de la división celular. En este proceso intervienen las enzimas ADN metiltransferasas (DNMT) “*de novo*” y de mantenimiento, respectivamente, las cuales catalizan la transferencia del grupo metilo al ADN usando como sustrato S-Adenosil Metionina (SAM) (Figura 10).





**Figura 10. Representación de la metilación del ADN mediante las metilasas “de novo” y de mantenimiento.** A) Dentro de un núcleo de la célula, el ADN se envuelve alrededor de un octámero de proteínas básicas, denominadas histonas, para formar la cromatina. Las modificaciones epigenéticas de la cromatina pueden ocurrir en las colas de las histonas (modificaciones postraduccionales de las histonas) o directamente en el ADN a través de su metilación. B) La metilación de ADN tiene lugar por la incorporación de un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) al carbono 5 del anillo de la citosina, convirtiéndose la citosina en 5-metilCitosina (5-mC), mediante la actividad de las ADN metiltransferasas (DNMT). C) La metilación del ADN puede ser llevada a cabo por las metilasas “de novo” (dnDNMT), por el cual una citosina es metilada por primera vez y ofrece una nueva información al ADN; o por las metilasas de mantenimiento (mDNMT), las cuales metilan una citosina situada en un sitio CpG en la hebra complementaria del ADN a un sitio CpG previamente metilado. Imagen tomada y modificada de *Jeremy J Day and J David Sweatt* [113].

Entre las ADN metiltransferasas existentes podemos destacar las siguientes:

**DNMT1.** Es la ADN metiltransferasa más abundante en células de mamífero y es considerada clave en el mantenimiento de la metilación del ADN. La actividad metilante de esta enzima es muy superior en sitios del ADN hemimetilados, aunque también puede metilar sitios desmetilados, solapándose de este modo la actividad de las metilasas de mantenimiento y “de novo” [114, 115]. En este mismo contexto, se ha descrito en células cancerígenas humanas que DNMT1 es responsable tanto de la metilación “de novo” como la de mantenimiento en genes supresores de tumores [116, 117].

**DNMT3.** Es una familia de ADN metiltransferasas que tienen como función predominante la metilación “*de novo*” del ADN. Dentro de esta familia de proteínas se encuentran DNMT3a, DNMT3b y DNMT3l. DNMT3a y DNMT3b están altamente expresadas en CME pluripotentes [118], tienen una función importante en la metilación “*de novo*” y son esenciales durante el desarrollo embrionario [119]. Por otro lado, DNMT3l es catalíticamente inactiva, pero favorece la formación de complejos con actividad ADN metiltransferasa e incrementa la unión al sustrato SAM [120].

Normalmente, la metilación del ADN está asociada a la represión génica ya que, en la mayoría de los casos, la citosina en las islas CpG están desmetilados si los genes están expresándose. De esta manera, la metilación del ADN puede establemente alterar la expresión génica. Durante la embriogénesis, la metilación normalmente es permanente y unidireccional, previniendo que una célula revierta su estado de diferenciación o se convierta en otro tipo celular. Sin embargo, la metilación del ADN puede ser revertida de una manera pasiva, por divisiones sucesivas de las células sin que la metilación sea mantenida en cada división, o de una forma activa, mediante la hidroxilación de los grupos metilos [121, 122].

### **Modificaciones postraduccionales de las histonas**

Desde el descubrimiento de los principios básicos de la organización de la cromatina, se hizo aparente que las interacciones entre las histonas y el ADN, así como interacciones entre nucleosomas vecinos e interacciones con proteínas no histonas podrían explicar la lectura del ADN. La mayoría de estas interacciones implican las colas N-terminales de las histonas. Las colas de las histonas H3 y H4, de 19 y 26 aminoácidos respectivamente, presentan una secuencia altamente conservada en eucariotas. Las modificaciones postraduccionales de los aminoácidos que componen estas colas, como la fosforilación, metilación, acetilación y ubiquitinación, influyen en la estructura y estado funcional de la cromatina [123, 124].

La acetilación de las histonas está generalmente asociada a activación transcripcional y el proceso tiene lugar gracias a la acción de las histonas acetiltransferasas (HAT). Las HAT son enzimas que acetilan residuos conservados de lisina (K) en las histonas por transferencia de un grupo acetilo desde una molécula de acetil-CoA, para formar  $\epsilon$ -N-acetil lisina [125] (Figura 11). Las HAT son

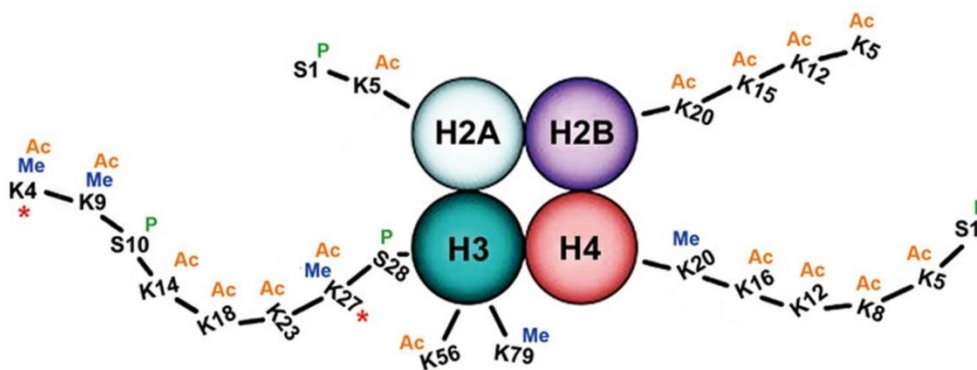
tradicionalmente divididas en dos grupos en base a su localización [126]. Las HAT tipo A, se encuentran localizadas en el núcleo celular y están envueltas en la regulación de la expresión génica a través de la acetilación de las histonas y contienen un bromodominio, el cual les ayuda a reconocer y a unirse a residuos de lisina acetilados. Las HAT tipo B, se localizan en el citoplasma y son las responsables de acetilar a las histonas que se han sintetizado nuevamente antes de ensamblarse y formar los nucleosomas. Este tipo de HAT carece de bromodominios, ya que su función es reconocer histonas recién sintetizadas, las cuales están desacetiladas. Por el contrario, las histonas desacetilasas (HDAC) son las encargadas de revertir la acetilación de las histonas, y así los efectos que éstas provocan en la estructura de la cromatina [127]. De este modo, el juego entre HAT y HDAC resulta en una transición dinámica en la estructura de la cromatina y por tanto, de la actividad transcripcional. Por otro lado, las CMER parecen tener un mayor nivel de acetilación global de histonas comparado con células ya diferenciadas. Estas observaciones no sólo muestran la importancia de la acetilación de histonas en el control del estado celular y en la capacidad de diferenciación, sino que además conduce a la posibilidad de realizar tratamientos específicos sobre las HAT y las HDAC para direccionar ese potencial.

La histona acetiltransferasa P300 y CBP, comúnmente referidos como P300/CBP debido a que se consideran homólogos estructurales y funcionales, son ejemplos de HAT [128]. Ambas proteínas son expresadas de forma ubicua y funcionan como coactivadores de la transcripción con un papel crítico en una amplia variedad de procesos celulares como el control del ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis [129, 130]. Mutaciones en P300 y CBP se han asociado con ciertos tipos de cáncer y otras enfermedades [131]. A nivel molecular, P300/CBP estimula la transcripción específica de genes por interacción directa o indirecta a numerosos factores de transcripción de unión al ADN, tales como CREB o c-Myb entre otros [132]. Uno de los aspectos más interesantes de P300/CBP es que son HAT muy versátiles y potentes, pudiendo acetilar tanto proteínas histonas como proteínas no histonas [132].

La metilación de la cola de las histonas, al igual que la acetilación, también tiene un papel relevante en el control de la estructura de la cromatina. La metilación es un proceso por el cual grupos metilos son transferidos a los aminoácidos de las colas de las histonas usando como sustrato S-Metil Metionina (SAM), lo que supone el reemplazo

de sus grupos aminos. En función del residuo que se metile o cuántos grupos metilos son unidos, la transcripción génica se ve favorecida o reprimida. Los residuos susceptibles de ser metilados son lisina (K) y arginina (R), siendo más común la metilación en los residuos de lisina de las colas de las histonas H3 y H4 (Figura 11). La lisina puede ser mono-, di- o trimetilada, mientras que la arginina puede ser mono- o dimetilada. Cada adicción de un grupo metilo requiere la participación de una enzima y varios sustratos y cofactores. Generalmente, la metilación del residuo de arginina requiere a la proteína arginina metiltransferasa (PRMT), mientras que los residuos de lisina son comúnmente metilados por específicas histonas metiltransferasas (HMT) que contienen dominios SET conservados [133]. Los sitios de metilación más comunes asociados a la activación génica incluyen H3K4 (H3K4me<sub>2/3</sub>) y H3K79 (H3K79me<sub>3</sub>); mientras que la metilación de los sitios H3K9 (H3K9me<sub>2/3</sub>) y H3K27 (H3K27me<sub>2/3</sub>) son comúnmente relacionadas con represión transcripcional [134]. Además, existen estudios que han relacionado la metilación de los diferentes residuos de las colas de las histonas con la unión de proteínas o complejos que regulan la expresión.

Debido al impacto que tiene la metilación de la cola de las histonas sobre la transcripción, es de esperar que también juegue un papel relevante en la regulación de la pluripotencia. De hecho, hay varios estudios que describen que el patrón de metilación de los residuos de H3K4 y H3K27 en CMEh están asociados con el nivel de expresión de los factores que controlan la pluripotencia y la diferenciación [135, 136]. H3K4me<sub>3</sub> y H3K27me<sub>3</sub> conforman las marcas bivalentes de la cromatina encontradas en el inicio de la transcripción de muchos genes implicados en diferenciación y desarrollo de las células pluripotentes. La mayoría de estas marcas bivalentes se resuelven en H3K4me<sub>3</sub> o H3K27me<sub>3</sub> según cada caso particular durante la diferenciación celular. En general, los genes inducidos durante la diferenciación mantienen la marca H3K4me<sub>3</sub>, y los genes silenciados durante la diferenciación conservan la marca H3K27me<sub>3</sub>. Además, la fosforilación de los residuos adyacentes a estas lisinas podría influenciar el balance entre su acetilación y metilación [137]. Otros estudios recientes han correlacionado la expresión génica con el estado de metilación de H3K4 y H3K27 durante la diferenciación específica de las CMEh y en iPSCs humanas reprogramadas de células somáticas [138-140]. Estos estudios sugieren que la metilación de histonas y la remodelación de la cromatina es crítica para la diferenciación cardíaca y pancreática y son bastantes similares entre CME e iPSC humanas.



**Figura 11. Imagen representativa de las modificaciones postraduccionales de las histonas.** Esta imagen representa las modificaciones postraduccionales que tienen lugar en la cola de las histonas. Ac: acetilación; P: fosforilación; Me: metilación; K: lisina; S: serina. (\*) Hace referencia a las marcas bivalentes de las histonas, H3K4me3 y H3K27me3. Imagen tomada y modificada de *Yu-Chieh Wang* y colaboradores [137].

Uno de los grupos de proteínas que tiene especial relevancia en el control de la estructura de la cromatina, son las proteínas del Grupo Polycomb (PcG). Dentro de este grupo de proteínas se encuentra el Complejo Polycomb Represor 2 (PRC2), compuesto por cuatro subunidades: Ezh2, Eed, Suz12 y RbAp46/48. EZH2 cataliza la di- y trimetilación del residuo de lisina (K) 27 de la histona H3 (H3K27me<sub>2/3</sub>), y esta actividad requiere la presencia de EZH2 en el complejo junto los demás componentes [141-143]. H3K27me<sub>3</sub> se asocia con un estado de represión transcripcional [144-147] y estudios de genoma completo han revelado que esta marca epigenética está ampliamente distribuida entre los genes que controlan el desarrollo [146-148]. Aunque H3K27me<sub>3</sub> se encuentra ocupando hasta el 10% de los genes en las CME [147], solo una pequeña parte de ellos se expresan después de la liberación de PRC2. En este mismo estudio se reveló que PRC2 es dispensable para el mantenimiento de la pluripotencia [149]; sin embargo, CMER mutantes de Eed son más propensos a diferenciar [146]. Después de muchos estudios, el mecanismo por el cual el complejo PRC2 se une a su secuencia diana en mamíferos aún no está claramente definido. Se ha descrito que EED reconoce varias marcas de histonas, las cuales contienen lisinas trimetiladas y están asociadas a represión génica, entre las que se incluye H3K27me<sub>3</sub>. Esta capacidad de EED de reconocer lisinas trimetiladas es importante para la transmisión de estas marcas [150].

Otras de las proteínas claves para la unión del complejo PRC2 al ADN es JARID-2, la cual contiene un dominio de unión al ADN rico en AT (ARID), un dominio *zinc finger*, un dominio jumonji N (JmjN) y un dominio JmjC [151, 152]. Al contrario que otros miembros de la familia de las proteínas JARID con dominio JmjC que se han mostrado tener capacidad de desmetilar residuos de lisina, JARID-2 no conserva dentro de su dominio JmjC los residuos requeridos para la unión de hierro y ascorbato necesarios para llevar a cabo esta reacción. Además, se ha descrito que JARID-2 interacciona con PRC2, tiene capacidad de unión al ADN no sólo dependiente de su dominio ARID, estimula la actividad metilante de EZH2 sobre H3K27 y facilita el reclutamiento de PRC2 a sus genes diana. Al mismo tiempo, JARID-2 es requerido para la actividad represora de PRC2 en CME, como se evidenció por una diferenciación alterada en su ausencia [153].

### **El factor de transcripción Egr-1**

La estructura de la cromatina es un mecanismo clave que controla la expresión génica y de ella depende la ocupación de los promotores por factores de transcripción que inducen o reprimen la expresión. Existen multitud de factores de transcripción que controlan la red transcripcional, que se inducen mediante respuesta a señales extracelulares y que favorecen específicamente la diferenciación hacia un tipo celular concreto.

Uno de estos factores de transcripción que responden a las señales del ambiente es EGR-1 (*Early growth response protein 1*), el cual controla la expresión de numerosos genes implicados en la diferenciación y el crecimiento en respuesta a señales ambientales, como factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores, estrés celular, daño, mitógenos y citocinas [154, 155]. Asimismo, EGR-1 es inducido en respuesta a hipoxia, hiperoxia, señalización mediada por ROS e inflamación [156-158].

Es conocido que la actividad de EGR-1 es regulada, en parte, a través de los co-represores NAB1 y NAB2; a la vez que EGR-1 induce la expresión de éstos previniendo una transactivación permanente de sus genes diana [159]. Por otro lado, se ha descrito que EGR-1 contiene un dominio *zinc finger*, tipo Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>, con capacidad de unión al ADN y presenta secuencias nucleotídicas por las que exhibe más afinidad (5'-GCGTGGGCG-3' o 5'-GCGGGGGCG-3'). Estas secuencias consenso son ricas en sitios

CpG, los cuales son susceptibles de ser metilados, como vimos anteriormente, y esta metilación afecta a la capacidad de unión de EGR-1. En este sentido, se ha descrito que en cáncer de próstata hay una expresión incrementada del gen heparanasa, asociada a la hipometilación de su promotor, especialmente en el sitio de unión de EGR-1 [160]. Además, en algunos casos EGR-1 compite con SP-1 por la unión al ADN [161, 162] y favorece la expresión génica de un mismo gen [163]. Por otro lado, se ha descrito que EGR-1 interacciona con P300/CBP, sugiriéndose que P300 y CBP actúan como activadores transcripcionales de la expresión génica mediada por EGR-1 [164].

Todos estos datos apuntan a que EGR-1 es un factor de transcripción importante en la regulación transcripcional, cuya actividad podría verse afectada tras el tratamiento de altas dosis de óxido nítrico, el cual hemos empleado para la inducción de la expresión del gene *Pdx1* en CME murinas, y hace interesante su estudio.

### **1.2.7 Óxido Nítrico y diferenciación**

El óxido nítrico (NO) es un radical libre de vida corta sintetizado en la vía de conversión de L-arginina en L-citrulina, la cual es mediada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), NOS1 (NOS neuronal), NOS2 (NOS inducible) y NOS3 (NOS endotelial) [165]. El NO reacciona con moléculas como el oxígeno, superóxido o metales, ácidos nucleicos y proteínas, y es rápidamente oxidado en nitrato y nitrito [166]. El NO forma parte de la respuesta inflamatoria del sistema inmune y funciona como neurotransmisor en el sistema nervioso central, actúa como segundo mensajero y tiene multitud de efectos biológicos implicados en funciones fisiológicas en mamíferos tales como regulación de la presión sanguínea o inhibición de la agregación plaquetaria [167]. En los últimos años, se ha demostrado que el NO afecta a las cascadas de señalización que controlan la proliferación y la diferenciación, pero sus efectos varían ampliamente entre los diversos tipos celulares. Por ejemplo, el NO modula la proliferación y diferenciación de las células de la piel humanas [168] y causa inhibición del crecimiento y diferenciación de queratinocitos orales humanos inmortalizados [169]. Además, generalmente es considerado como un inductor de la apoptosis, pero también se ha descrito su papel como protector en ciertos tipos celulares [170-173]. Este efecto dual del NO parece ser dependiente de la dosis, ya que a bajas concentraciones previene

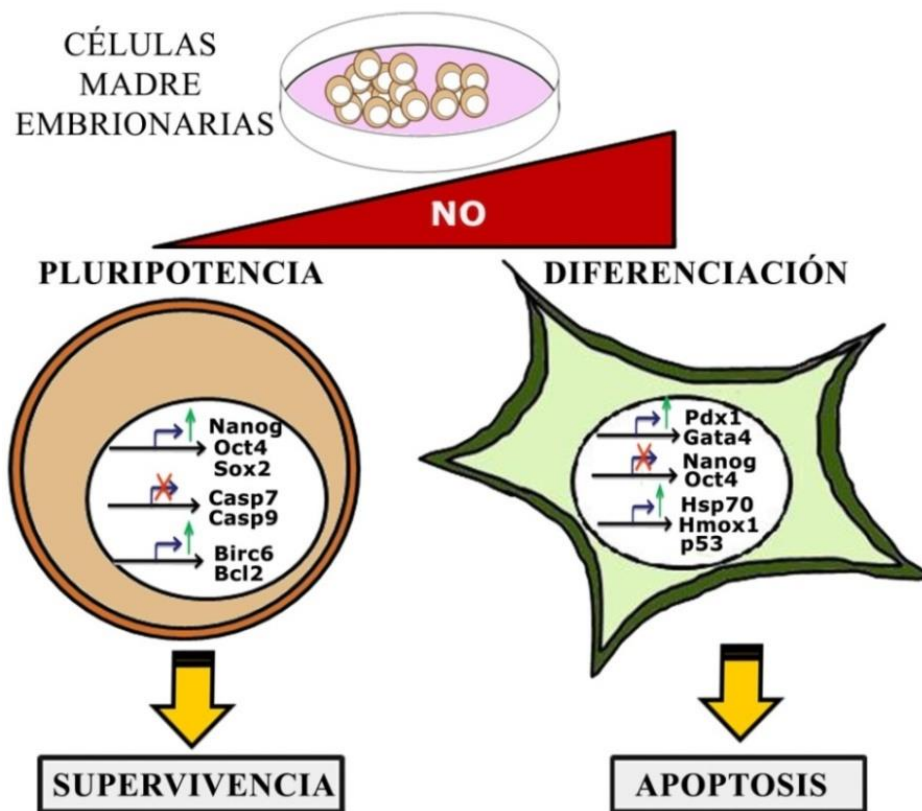
de la apoptosis y favorece la supervivencia y la autorrenovación, mientras que altas dosis inducen apoptosis y diferenciación celular.

Se ha descrito que el NO a bajas concentraciones tiene un efecto protector frente a la hepatotoxicidad inducida por el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TFN- $\alpha$ ) [174], inhibe la apoptosis inducida por CD95 en linfocitos B [175] y en linfocitos T [176], y protege a las células estromales de la médula ósea de ratón de la apoptosis espontánea [177]. Varios estudios han demostrado que el NO disminuye la respuesta pro-apoptótica a través de la regulación de las proteínas de la familia de Bcl-2 [173]. En concreto, en CMEr, se ha descrito que la sobreexpresión de *Bcl-2* ayuda a mantener el estado indiferenciado [178]. En este mismo sentido, nuestro grupo ha descrito que bajas dosis del donador de NO, DETA-NO, contribuye a la supervivencia de la célula  $\beta$  pancreática a través de la activación de IGF-1 [179]. Además, hemos demostrado que la exposición de las CME a bajas concentraciones de NO protegen de la apoptosis a través de la disminución de la actividad de CASP3, disminución de la expresión de genes pro-apoptóticos como *Casp7*, *Casp9* y *Bax*, entre otros, e incremento de la expresión de genes anti-apoptóticos como *Bcl-2* y *Birc6*. Esta exposición a bajas dosis de NO al mismo tiempo previene de la pérdida de expresión de los genes que controlan la autorrenovación (*Oct3/4*, *Sox2* y *Nanog*) retrasando la diferenciación de células madre embrionarias murinas y humanas [180] (Figura 12).

Por otro lado, varios estudios han demostrado que el NO induce apoptosis en diferentes tipos celulares como células  $\beta$  pancreáticas [181, 182] o timocitos [183]. Además, se ha descrito que el NO puede actuar como regulador negativo de la proliferación celular durante la diferenciación y el desarrollo de órganos en *Drosophila*, y que la producción de NO es necesaria para el establecimiento de las conexiones neuronales, lo que indica que el NO juega un papel importante en la diferenciación del tejido neural [184]. Igualmente, el bloqueo de la producción de NO en células precursoras neuronales resulta en un incremento de la proliferación [185]. En CME, se ha demostrado que la generación de NO es necesaria para la cardiomiogénesis, ya que inhibidores de NOS bloquean la maduración de cardiomiocitos diferenciados terminales [186]. Asimismo, se ha descrito que las células CME en su estado indiferenciado expresan altos niveles de NOS3, y durante la diferenciación estos niveles disminuyen, mientras que NOS2 y NOS1 incrementan la expresión de forma significativa, sugiriendo que el NO podría estar implicado en procesos de diferenciación temprana



[187]. En este mismo contexto, nuestro grupo también ha aportado nuevos datos. En concreto, hemos encontrado que el tratamiento con altas dosis de DETA-NO en CME genera muerte celular en una parte significativa de la población, mientras que las células resistentes al estrés nitrosativo expresan genes citoprotectores como *Hemo-oxigenasa 1* y *Hsp70*. Estas células, a su vez, entran en un programa de diferenciación a través de la represión de los genes que controlan el mantenimiento de la pluripotencia como *Oct3/4* y *Nanog*, e incrementan la expresión de genes de diferenciación como *Pdx1* y *Gata4*. La represión de *Nanog* es dependiente de la activación de P53 mediante modificaciones postraduccionales [188] (Figura 12).



**Figura 12. Mecanismo dual del óxido nítrico sobre el control de la pluripotencia y diferenciación y el balance entre la supervivencia y la apoptosis en CME.** La exposición de CME a bajas concentraciones de NO induce la expresión de los marcadores que controlan la pluripotencia (Oct4, Sox2 y Nanog); y confiere protección frente a la apoptosis a través de la represión de genes pro-apoptóticos (Casp7 y Casp9) y sobreexpresión de genes anti-apoptóticos (Bcl-2 y Birc6). La exposición a altas dosis de NO promueve la apoptosis, a través de la actividad de la Caspasa3 e incremento de la expresión de P53. Las células resistentes al estrés nitrosativo incrementan la expresión de proteínas citoprotectoras (Hsp70 y Hmox1) y entran en un proceso de diferenciación a través de la represión de Nanog y Oct4 y expresan marcadores de diferenciación, tales como Pdx1 y Gata4. Imagen tomada y modificada de *Beltrán* y colaboradores [189].

Debido a que el NO a altas concentraciones induce la diferenciación de células madre, diversos estudios se han centrado en el uso del NO para el diseño de protocolos de diferenciación hacia distintos tipos celulares. El primer protocolo reportado que usa el NO como herramienta diferenciadora, fue descrito por *Kanno* y colaboradores en 2004. Ellos encontraron que el NO promovía la diferenciación de CMER hacia cardiomiocitos, en parte a través de sus efectos sobre la supervivencia [190]. Otros grupos revelaron que los efectos del NO estaban relacionados a la activación de la guanilato ciclasa soluble (sGC) y a la consecuente producción de guanosín monofosfato cíclico (cGMP) [191], e identificaron otras moléculas que podían regular la cardiomiogénesis temprana en CME a través de vías dependientes del NO, como la curcumina o el ácido ascórbico [192, 193]. Además, el NO tiene un papel importante en la biología de las células endoteliales [194] y en el desarrollo en fases tardías de este tejido, ya que en etapas más tempranas del desarrollo endotelial otras vías de señalización parecen tener mayor relevancia [195]. Aunque los protocolos de diferenciación de células endoteliales no incluyen pequeñas moléculas activas como el NO, la expresión de la NOS endotelial o NOS3 en estos tipos celulares se considera una característica de célula endotelial madura [196, 197]. Las células progenitoras adultas de la médula ósea pueden diferenciarse en varios tipos celulares entre los que se incluyen células endoteliales, proceso durante el cual la eNOS es dinámicamente regulada [198] y el NO a altas concentraciones favorece la diferenciación endotelial a través de un mecanismo independiente a cGMP [199]. Por otro lado, se ha descrito que la señalización vía NO/cGMP regula el compromiso hacia la diferenciación neural, contribuye al desarrollo de precursores neurales e induce la diferenciación de precursores neurales hacia neuronas funcionales [200, 201]. Se ha descrito también que el NO modula el crecimiento y la diferenciación de células de la médula ósea hacia células eritroides y mieloides [202], promueve diferenciación hacia condrocitos maduros [203], estimula la diferenciación de pre-adipocitos [204] y media la diferenciación hacia osteoblastos [205].

Nuestro laboratorio, también ha abordado el estudio en este tema con el objetivo de diseñar un protocolo de diferenciación de células madre hacia células productoras de insulina *in vitro*. Así, *Mora-Castilla* y colaboradores diseñaron en 2010, un protocolo de diferenciación hacia endodermo definitivo mediante la exposición de CMER a 0,5 mM de DETA-NO, lo cual induce eventos de diferenciación temprana, con expresión significativa del factor de transcripción Pdx1, y expresión de marcadores de endodermo

definitivo tales como *FoxA2*, *Gata4*, *Hnf1 $\beta$*  y *Sox17*, tras el tratamiento durante seis días consecutivos con ácido valproico (VA), y la disminución del suero en el medio de cultivo [188]. Este protocolo de diferenciación es pionero en el uso del NO para inducir la diferenciación hacia linajes pancreáticos.

### **1.2.8 Diferenciación de Células Madre Pluripotentes hacia células productoras de insulina**

Las células pluripotentes se presentan como una fuente prometedora para la obtención *in vitro* de células  $\beta$  para el tratamiento de la diabetes. Por ello, científicos de todo el mundo tratan de diseñar protocolos de diferenciación de células pluripotentes hacia células productoras de insulina. La mayoría de los protocolos diseñados hasta el momento, tratan de mimetizar el desarrollo del páncreas *in vitro*, lo cual, al igual que lo es la embriogénesis pancreática, es un proceso complejo.

Los primeros protocolos diseñados para dirigir a las células embrionarias hacia células productora de insulina fueron realizados en CMER. El primer protocolo de diferenciación fue descrito en el año 2000, por *Soria* y colaboradores, quienes transfectaron CMER con un vector con resistencia a un antibiótico bajo el promotor de la insulina [206] o de *Nkx6.1* [207], junto con nicotinamida o nicotinamida más ciclopamina, respectivamente, siendo capaces de normalizar la glucemia tras el trasplante con las células diferenciadas en ratones diabéticos tratados con estreptozotocina (STZ). Poco más tarde, los protocolos por etapas y adición de pequeñas moléculas al medio de cultivo fueron ganando terreno. Uno de los primeros procedimientos multi-etapas fue llevado a cabo en 2002, por *Hori* y colaboradores, quienes emplearon una serie de suplementos en el medio de cultivo para inhibir la actividad de la ruta PI3K, como nicotinamida y Ly294002 [208]. Por otro lado, los primeros protocolos de diferenciación diseñados con células humanas no fueron exitosos, debido a que la insulina detectada en las células diferenciadas procedían del medio de cultivo, y no era sintetizada *de novo* [209-211]. De esta forma la detección de la insulina a nivel de ARNm, además de la presencia de Péptido-C, es crucial para conocer el éxito del protocolo.

Un paso crítico para diferenciar eficazmente células pluripotentes hacia células productoras de insulina es la generación de endodermo definitivo, lo cual fue conseguido con gran eficacia por el grupo de *D'Amour* y colaboradores en 2005, mediante la incubación con Activina A en condiciones de suero reducidas [212]. La supresión de la actividad de la vía de señalización PI3K y la reducción de la señalización por el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) fue crítico para la eficiente formación de endodermo definitivo [213]. Además, este paso fue mejorado mediante la combinación de Activina A y Wnt3a en ausencia de suero durante el primer día, seguido por dos días en medio suplementado con Activina A y 0,2 % de suero [214]. Asimismo, se mostró que la inhibición de la vía PI3K por wormanina mejora la formación de endodermo definitivo [215] y moléculas denominadas IDE1 e IDE2 inducen la formación de endodermo definitivo con una eficacia similar a la Activina A [216].

El siguiente paso en el proceso de diferenciación consiste en la especificación del “*foregut*” hacia el endodermo pancreático y la inhibición de los demás derivados endodérmicos. Este paso está regulado *in vivo* por la liberación en gradiente de FGF, BMP, ácido retinoico (RA) y expresión de SHH. Por ejemplo, se conoce que el fenotipo pancreático es inducido por una baja concentración de FGF4 y niveles medios de bFGF [217, 218]. Además, el RA [214, 215, 219, 220] e inhibidores de la vía SHH [207], como la ciclopamina [214, 220] y SANTI1 [221, 222], son uno de los elementos comunes usados en los protocolos de diferenciación para la especificación del endodermo pancreático. Además, se ha demostrado que la inhibición de la señalización de BMP mediante Noggin, es efectiva para inhibir la diferenciación hepática y también es usado en los protocolos de diferenciación durante esta etapa [215, 223].

Como hemos visto anteriormente, la vía de señalización de Notch juega un papel clave en la formación de los progenitores pancreáticos, ya que cuando la vía se encuentra altamente activada se favorece la formación del páncreas exocrino y cuando presenta baja actividad se induce la diferenciación endocrina, con expresión de Ngn3. Así, la regulación de la ruta Notch permite controlar el momento de la formación del páncreas endocrino y previene una diferenciación endocrina prematura. De esta manera en algunos protocolos de diferenciación se induce su actividad en etapas tempranas mediante EGF y FGF10 [214, 215], mientras que en etapas tardías se inhibe [214, 224].

La última etapa de diferenciación consiste en la maduración de los precursores endocrinos hacia células productoras de insulina. Muchos investigadores están centrados en esta fase del protocolo, para la obtención de una célula  $\beta$  funcional y madura, que responda a los niveles de glucosa del medio. *D'Amour* y colaboradores [214] utilizaron en esta última etapa de maduración una mezcla de factores como IGF1, Exendina-4, HGF y B27, sin observar ninguna mejora en los procesos de diferenciación. Por otro lado, *Cho* y colaboradores [224] mostraron que la betacelulina y nicotinamida inducen la expresión de Pdx1 y fomentan la diferenciación pancreática. Sin embargo, la obtención de células  $\beta$  maduras *in vitro* no es tarea fácil, e incluso algunos investigadores han optado por trasplantar ratones diabéticos con precursores endocrinos con el objetivo de su maduración *in vivo* [220, 222, 225, 226].

Recientemente, un gran progreso fue logrado por *Rezania* y colaboradores, quienes han generado *in vitro* células productoras de insulina que revierten la hiperglucemia cuando son trasplantadas en ratones diabéticos [227]. Alternativamente, *Pagliuca* y colaboradores han publicado una estrategia de producción a gran escala de células  $\beta$  funcionales humanas a partir de células pluripotentes [221]. Para el paso de maduración en estos protocolos se han utilizado combinaciones de moléculas bioactivas tales como R428 (un inhibidor selectivo del receptor tirosina quinasa AXL), un inhibidor de Alk5 (Alk5i), N-acetil cisteína (N-Cys) y la hormona tiroidea T3 [221, 227]. En este mismo sentido, el año pasado nuestro grupo publicó que la incubación con resveratrol (RV) en la etapa final del protocolo de diferenciación favorece el proceso de maduración de las células  $\beta$  [228]. Por otro lado, como mecanismo para la maduración de las células productoras de insulina algunos grupos optan por la agregación en forma de agregados celulares en el estadio final del protocolo [219, 222, 228, 229].

Como se puede observar, el diseño de los protocolos de diferenciación de células pluripotentes a células productoras de insulina maduras es un proceso complejo, que requiere la combinación de un abanico de moléculas que controlan las vías de señalización implicadas en cada estadio del desarrollo del páncreas, para mimetizar así las fases de la embriogénesis pancreática. En el Anexo 3 se destacan los protocolos de diferenciación con mayor repercusión y las estrategias más relevantes utilizadas en cada caso.

Estos avances reflejan la magnífica situación en la que se encuentra actualmente el desarrollo de protocolos de diferenciación de células pluripotentes hacia células productoras de insulina para la terapia celular de la diabetes, aunque los protocolos de diferenciación necesitan aún ser mejorados en cuanto a su reproducibilidad y eficiencia para generar un elevado número de células  $\beta$  maduras totalmente sensibles *in vitro*.

## 1.3. Células T reguladoras

### 1.3.1 Concepto y Definición

Las células Treg están involucradas en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica y la homeostasis del sistema inmune [230]. Fueron descritas por primera vez a principios de la década de los 70, originalmente descubiertas como células derivadas del timo y capaces de suprimir células efectoras [231]. Las células Treg fueron descritas en ratones como CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2) [232, 233] y el factor de transcripción FoxP3 fue descubierto ser su regulador máster, debido a la aparición de un síndrome autoinmune letal en ratones con mutaciones o carentes del gen y su posible prevención mediante la transferencia de células Treg [246, 247]. Similarmente, en humanos, mutaciones del gen *FOXP3* fueron identificadas como causantes del síndrome de Inmunodeficiencia, Poliendocrinopatía y Enteropatía, ligado al cromosoma X (IPEX) [248], lo que conduce a graves fenómenos autoinmunes incluyendo enteropatía autoinmune, dermatitis, tiroiditis y diabetes tipo 1. Además, se encontró una correlación directa entre la expresión de FoxP3 y las células T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> [249]. Actualmente las células Treg son caracterizadas como CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> FoxP3<sup>high</sup>, pues se ha descrito que sólo las células que expresan un alto nivel de CD25 y Foxp3 presentan capacidad supresora [244, 250]. Estas células representan el 5-10% de las células CD4<sup>+</sup> en ratón y humanos, tanto en sangre periférica como en sangre de cordón umbilical [244, 251, 252]. Por otro lado, se ha demostrado que la baja expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor IL-7 (CD127) relaciona directamente con una alta expresión de FoxP3 (mayor al 90%), identificando así a las células Treg como CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD127<sup>-low</sup>, sin requerir la tinción intracelular de FoxP3 [253]. Sin embargo, estos marcadores no pueden ser usados para caracterizar células Treg activadas con capacidad supresora, ya que las células Treg no activadas también van a mostrar expresión de estos marcadores. Por tanto, otros marcadores se han utilizado para definir el fenotipo de las células Treg. Entre ellos, podemos destacar CTLA-4, GITR, CD69 y el péptido asociado a latencia (LAP) para determinar la funcionalidad y activación de las células Treg y proporcionar una caracterización más precisa (ver Anexo 4) [254]. Debido a su función supresora, las células Treg se han propuesto como terapia para reducir las reacciones producidas en la enfermedad injerto contra huésped (GvHD) después del trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) o en la terapia de enfermedades autoinmunes, como es la DM.

### 1.3.2 Otros tipos de células reguladoras

Además de las células T reguladoras  $CD4^+ CD25^{high} CD127^{-/low} FoxP3^{high}$ , también existen otras poblaciones celulares que presentan capacidad supresora, aunque su frecuencia en el organismo es bastante menor. Entre ellas podemos destacar:

- **Células T  $CD8^+$** : En el timo de humanos se han encontrado células T  $CD8^+$  que expresan marcadores clásicos de células Treg (CD25, FOXP3, GITR, CTLA-4) y que manifiestan su capacidad supresora a través de mecanismos dependientes del contacto celular. Dentro de este tipo de células reguladoras nos encontramos distintos subtipos entre los que podemos destacar:  $CD8^+CD28^-$ , la cuales son  $FoxP3^-$  y regulan la respuesta inmune mediante el contacto directo con las DC [234]; y  $CD8^+ CD122^+$  (cadena  $\beta$  del receptor de la IL-2); son  $FoxP3^-$  y fueron enmarcadas tradicionalmente dentro de las células T de memoria, descubriéndose más tarde que las células  $CD8^+ CD122^+ PD-1^+$  tienen propiedades reguladoras mediante la liberación de IL-10 [235].

- **Células  $CD3^+ CD4^- CD8^-$  (Doble negativas, DN)**: tienen capacidad de promover la tolerancia y regular la autoinmunidad, pero son pobremente supresoras en ratones *naive*. Sin embargo, adquieren una gran actividad supresora en organismos trasplantados y tiene un papel importante en la protección frente al rechazo [236, 237].

- **Células B reguladoras (Breg)**: participan en la inmunomodulación y supresión de la respuesta inmune y representan una pequeña población de células B. Existen diferentes tipos de células Breg como:  $CD19^+ CD24^{high} CD38^{high}$ , consideradas células B inmaduras que liberan IL-10, suprimen la diferenciación de células T colaboradoras o *helper* (Th) Th1 y Th17 e inducen la conversión de células T  $CD4^+$  *naive* en células Treg; y células  $CD19^+ CD24^{high} CD27^+$  o B10, las cuales liberan IL-10 y suprimen la producción de TNF- $\alpha$  por los monocitos [238]. Estos efectos están mediados no sólo a través de la liberación de citocinas como IL-10 y TGF- $\beta$ , sino también mediante del contacto celular por CD80, CD86 y FasL. Asimismo, mediante la expresión de CD1d pueden activar a las células iNKT con funciones reguladoras [237, 239].

- **Células *Natural killer* T (NKT)**: expresa el receptor de células T (TCR) y marcadores característicos de células NK (NK1.1 en ratón o CD161 en humanos). Son generadas en el timo y pueden ser  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ , DN o doble positivas (DP). A diferencia de las células T convencionales, las células NKT reconocen lípidos presentados por la



molécula CD1d, principalmente expresada por células Breg, células dendríticas (DC) y otras células presentadoras de antígenos (APC). Las células más estudiadas son las iNKT, las cuales expresan una invariante cadena  $\alpha$  del receptor TCR. Varios mecanismos median sus funciones reguladoras, como la producción de citocinas IL-4, IL10 y TGF- $\beta$ . Las células iNKT residen en el tejido adiposo y su frecuencia se ve reducida en pacientes obesos, sugiriendo su implicación en la inflamación local y sistémica durante la obesidad [237, 240].

- **Células  $\gamma\delta$ T:** este tipo de células reguladoras expresan las cadenas  $\gamma\delta$  del receptor TCR y reconocen a proteínas presentadas por las moléculas CD1 y Qa-1, o por proteínas de choque térmico. El mecanismo regulador está basado en la liberación de TGF- $\beta$ , pero también presenta otros mecanismos adicionales. Su localización depende del subtipo celular, encontrándose con baja frecuencia en la sangre periférica y mayormente en compartimentos epiteliales, como la mucosa intestinal, piel, tracto digestivo o mucosa del aparato reproductor. Las células  $\gamma\delta$ T pueden suprimir *in vitro* la proliferación de células T bajo estimulación con anti-CD3/anti-CD28, al igual que las células Treg, pero su función no es dependiente de FoxP3 [241]. Además, las células  $\gamma\delta$ T infiltran tumores y liberan citocinas reguladoras como IL-10 y TGF- $\beta$  e inhiben la respuesta inmune contra la neoplasia. De esta manera, este tipo celular tiene un papel relevante en la tolerancia de la mucosa y la inmunidad tumoral [237, 242].

- **Macrófagos reguladores (Mreg):** el papel fisiológico de los Mreg es amortiguar la respuesta inmune y limitar la inmunopatología. A diferencia de los macrófagos activados clásicamente, los Mreg producen altos niveles de citoquina IL-10 y menor producción de IL-12, siendo su característica más distintiva. Los Mreg pueden surgir tras la respuesta inmune innata o la respuesta inmune adaptativa. Además, se ha demostrado que el co-cultivo de monocitos/macrófagos y células Tregs inducen la diferenciación hacia Mreg [243]. La activación de los macrófagos sucede mediante la exposición a un estímulo, resultando en la liberación de citocinas inflamatorias, pero esta estimulación parece no ser suficiente para producir altos niveles de IL-10. En este caso es necesario un segundo estímulo, que a través de la vía MAPK/ERK permite la transcripción del gen *IL-10* [244].

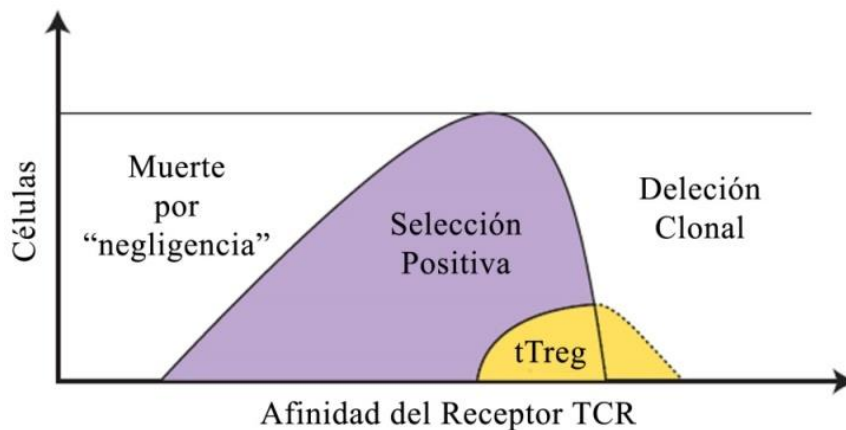
En este estudio nos hemos centrado en las células T reguladoras, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD127<sup>-/low</sup> FoxP3<sup>high</sup>, ya que son las más frecuentes en el torrente sanguíneo y las más estudiadas. Para comprender mejor su procedencia, caracterización y función haremos un recorrido por los procesos inmunológicos que tienen lugar en el desarrollo de las células T CD4<sup>+</sup> y células Treg, así como las subpoblaciones existentes y sus mecanismos de acción. Finalmente, comentaremos los hallazgos existentes que relacionan a las células Treg con la diabetes mellitus y las evidencias que apoyan su uso en la terapia celular de este trastorno.

### 1.3.3 Desarrollo de las Células T reguladoras

#### Diferenciación de las Células T CD4<sup>+</sup> en el timo

Los precursores de las células T se originan de las células madre hematopoyéticas (HSC) en la médula ósea y maduran en el timo. Principalmente ocurren dos procesos durante la diferenciación de las células T: la combinación de los genes del receptor TCR y la selección en el timo. Cuando los precursores de las células T entran en el timo interactúan con los péptidos expuestos por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) que presentan las APC. Este proceso permite que los precursores de las células T den forma a su receptor TCR para el reconocimiento del antígeno. El receptor TCR está compuesto por las cadenas  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ , asociadas a la membrana celular y combinadas con cuatro subunidades que conforman el complejo CD3 ( $\gamma, \delta, \epsilon, \xi$ ) que no presentan variabilidad morfológica, formando el complejo TCR:CD3. Además, expresan moléculas de superficie tales como CD4 y CD8. Los loci para las cadenas del receptor TCR contienen múltiples genes para la región variable (V) y uno, o solo unos pocos, para la región constante (C). Entre los genes V y los genes C hay unas pequeñas secuencias de nucleótidos, que se denominan segmentos génicos de unión (J) y de diversidad (D). Todos los loci contienen genes V, J y C; los D sólo se encuentran en el locus de la cadena  $\beta$ . La diversidad del receptor TCR está basada en recombinación somática, también conocida como recombinación V(D)J entre estos genes mediante un mecanismo de *splicing* [245, 246]. Estos cambios conllevan a que la secuencia de nucleótidos en la zona V(D)J del receptor TCR de un clon sea muy diferente a la zona de cualquier otro clon.

Una vez finalizado el proceso de recombinación de los genes del receptor TCR, se produce el proceso de selección. Este mecanismo consiste en la deleción clonal, por la cual los clones de linfocitos T con alta afinidad por los péptidos propios presentados por el complejo MHC son eliminados (selección negativa), mientras que las células T que exhiben baja afinidad completan su proceso de maduración. A todo este mecanismo que sucede en el timo y que previene la proliferación y maduración de células T autorreactivas se le denomina **tolerancia central**. Sin embargo, una pequeña proporción de células T con alta afinidad por auto-antígenos escapan de este mecanismo, y son sometidas a un proceso denominado “*clonal diversion*” o selección de clones autorreactivos con capacidad supresora [247, 248], denominados células T reguladoras procedentes del timo o células Treg naturales (tTreg o nTreg) (Figura 13).



**Figura 13. Modelo sugerido para la relación entre el desarrollo de las células T y la afinidad de su receptor TCR por el complejo péptido-MHC.** Las células cuyo receptor TCR presenta baja afinidad mueren por “negligencia”, ya que fallan en recibir señales co-estimuladoras eficaces. Aquellas células T que presentan afinidad intermedia son seleccionadas positivamente. El umbral entre la selección positiva y la negativa se cree que es muy brusco. Los clones autorreactivos con alta afinidad pueden morir por el proceso de deleción clonal. Las células T reguladoras del timo (tTreg) (área amarilla) presentan más afinidad que la mayoría de las células T convencionales (área morada). Algunas tTreg pueden tener una muy alta autorreactividad, y son rescatadas de la deleción clonal a través de la señalización con citocinas o gracias a tener un segundo TCR (línea punteada). Imagen tomada y modificada de *Yan Xing and Kristin A* [249].

En la actualidad, se están estudiando los factores que controlan la delección clonal y la selección de células tTreg. En este sentido, se ha encontrado que la ausencia de IL-2 y TGF- $\beta$  conlleva a una ausencia completa de células tTreg, lo que sugiere que estas citocinas son importantes para su diferenciación [250]. Además, se conoce que los factores de transcripción NFAT, NF $\kappa$ B y AP-1 son requeridos para la diferenciación de estas células en el timo [251, 252].

### **Activación de las Células CD4<sup>+</sup> en la periferia**

Las células T CD4<sup>+</sup> *naive* (aquellas que nunca han dado respuesta a un antígeno) abandonan el timo y comienzan a dispersarse a través del cuerpo, incluyendo los nódulos linfáticos. Durante una respuesta inmunológica, las células T CD4<sup>+</sup> reconocen los péptidos foráneos asociados al complejo MHC de clase II que son derivados de proteínas internalizadas y procesadas por las APC [253]. Cuando esto ocurre, el complejo TCR:CD3 de la célula T CD4<sup>+</sup> se enlaza fuertemente al complejo péptido/MHC, junto con su co-receptor CD4. Una vez producido este enlace, la tirosina quinasa LCK se une a CD4 y fosforila las cadenas intracelulares de CD3, lo que induce una cascada de señalización que activa a la célula T [254], denominada primera señal de activación.

Una vez activada la célula T CD4<sup>+</sup> a través de su complejo TCR:CD3, la completa activación de la célula T requiere la co-estimulación por la proteína de membrana CD28. Esta segunda señal de activación involucra la interacción entre el CD28 en la superficie de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y las proteínas CD80 o CD86 de las APC [255]. Este segundo paso de activación es un mecanismo que asegura que la célula T responde correctamente a un antígeno extraño. Si esta señal no ocurre durante la exposición inicial al antígeno, la célula T se vuelve anérgica [256, 257]. Durante el estado *resting* o de no activación de la célula T CD4<sup>+</sup>, CD28 es constantemente fosforilada por LCK y desfosforilada por CD45 (antígeno común leucocitario) permitiendo un estado neutro de fosforilación. Cuando las APC y las células T entran en contacto, CD45 es parcialmente excluido de la sinapsis para permitir una fosforilación constante de CD28 y su consecuente activación [258]. Esto genera señales en la célula T *naive* que induce su proliferación y diferenciación hacia diferentes subpoblaciones de linfocitos T.

Al igual que sucede en el timo, en la periferia también existen mecanismos que previenen la proliferación o expansión de las células T autorreactivas maduras que han escapado de la tolerancia central, y se denomina **tolerancia periférica**. La eliminación de estas células T autorreactivas tiene lugar mediante mecanismos intrínsecos de las células T, como la ignorancia (no reconoce o no tiene acceso al autoantígeno) [259] y la anergia (falta de coestimulación o segunda señal de activación) [257], o por mecanismos extrínsecos, que involucran a las células dendríticas [260] o a las células Treg [261].

### 1.3.4 Subpoblaciones de Células T CD4<sup>+</sup>

Las células T CD4<sup>+</sup> pueden ser diferenciadas en células Th1, Th2, Th17, Thf y Treg, mediante señales extracelulares mediadas por APC o NK y por la expresión de factores de transcripción, denominados “reguladores máster” que serán relevantes para especificar el tipo de célula T CD4<sup>+</sup>.

- **Células Th1:** la diferenciación de las células Th1 es inducida por la IL-12 y el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), secretado por las APC y NK, respectivamente [262]. El regulador máster de las células Th1 es el factor de transcripción T-BOX (T-BET), el cual suprime la diferenciación hacia Th2 bloqueando la expresión del regulador master GATA-3 [263]. La función principal de la célula Th1 es activar a las células fagocíticas y secretar IFN- $\gamma$  para inducir la generación de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>.

- **Células Th2:** la secreción de IL-4 y el factor de transcripción GATA-3 son necesarios para la diferenciación de células T *naive* en células Th2. Además, GATA-3 suprime la diferenciación de las células Th1 impidiendo la señalización celular llevada a cabo por el receptor de IL-12. La principal función de las células Th2 es secretar IL-4, IL-5 e IL-13, lo cual induce reacciones inmunes mediadas por eosinófilos y mastocitos contra infecciones producidas por helmintos [264].

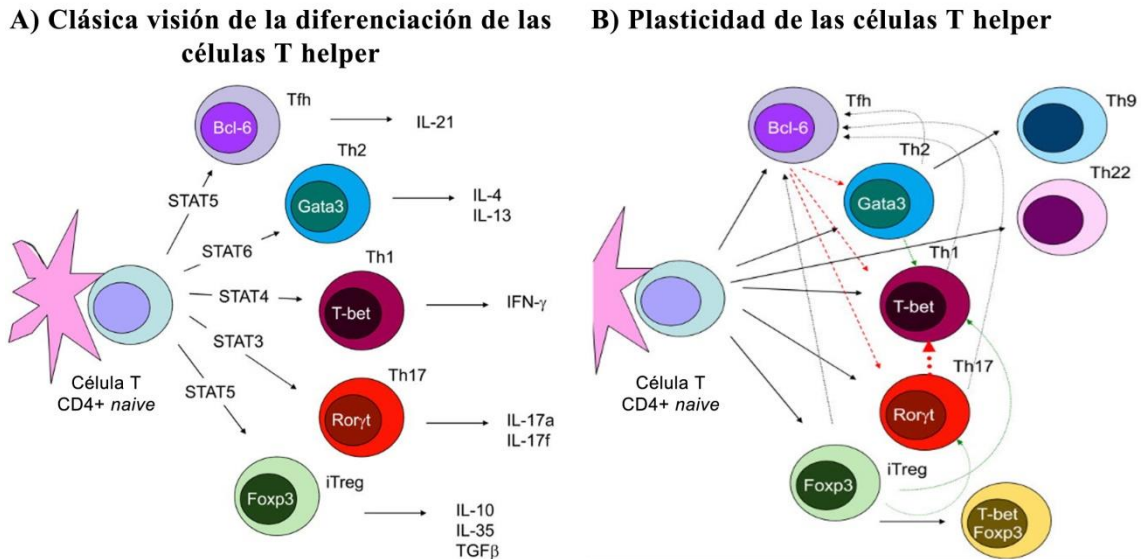
- **Células Th17:** la diferenciación de las células Th17 requiere la transcripción del regulador máster RORC, el receptor huérfano relacionado con el receptor de ácido retinoico [265], y la presencia de IL-6, IL-21, IL-23 y TGF- $\beta$ , aunque existen controversias acerca del papel de TGF- $\beta$  [266, 267]. La principal función de las células Th17 es proporcionar protección frente infecciones bacterianas y fúngicas. Las células

Th17 liberan IL-17A y IL-17F, lo cual estimula a las células epiteliales y endoteliales y a los macrófagos, e inducen movilización, reclutamiento y activación de neutrófilos [268]. Además, liberan IL-21, y activa a las NK, linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> y células B.

- **Células Thf (T helper foliculares):** El regulador máster de las células Thf es BCL-6 [269]. Las células Thf expresan el receptor de quimiocina CXCR5 [270] y pueden liberar IL-4 e IFN- $\gamma$ . Además, se ha descrito su capacidad de ayudar a las células B a producir anticuerpos [271].

- **Células Treg:** Las células Treg, como hemos mencionado anteriormente, pueden diferenciarse en el timo (tTreg), o pueden diferenciarse una vez que las células T CD4<sup>+</sup> pasan a la periferia, denominadas Treg derivadas de la periferia (pTreg). La diferenciación de las células pTreg requiere la presencia de TGF- $\beta$  y el regulador máster es FOXP3 [272]. Estas células se definen como CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD127<sup>-/low</sup> FoxP3<sup>high</sup>, además de expresar otros marcadores bajo condiciones estimuladoras (Anexo 4). Más adelante se explicará con detalle las diferencias entre las nTreg y pTreg, y los subtipos de células pTreg existentes, así como, las fuentes de células Treg y su mecanismo de acción.

En primer lugar se pensó que la diferenciación de células T *helper* estaba mediada por la expresión de un regulador máster y, una vez diferenciadas, ejercían su función de manera inflexible (Figura 14A). En la actualidad existen evidencias de que las células T CD4<sup>+</sup> presentan **plasticidad**, y que bajo ciertas condiciones pueden reestructurar su fenotipo y función. La idea inicial atribuía a un regulador máster el control de la diferenciación específica de las células T CD4<sup>+</sup>. Sin embargo, hoy en día se conoce que la especificidad de las células T CD4<sup>+</sup> se basa en la interacción de varios factores de transcripción, que inducen la expresión del regulador máster [273] (Figura 14B). Incluso, nuevos estudios sugieren que probablemente sea más apropiado entender la diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> en el contexto de relaciones variables entre los factores de transcripción, cuya expresión está regulada por factores extrínsecos e intrínsecos. De este modo, la expresión de los factores de transcripción es mucho más dinámica y flexible de lo que se pensó en los inicios [274].



**Figura 14. Representación de la diferenciación de las células T helper.** A) Los primeros estudios sobre la diferenciación de las células Th condujeron a la idea de que los subconjuntos de células Th se comportaban como linajes, lo que significaba que su fenotipo era inflexible. B) Estudios recientes de las células Th han revelado una mayor flexibilidad en la producción de citoquinas y en la actualidad hay muchos ejemplos de plasticidad de las células Th (líneas punteadas). Además, se han reconocido nuevas subpoblaciones, como las células Th9 y Th22, que producen selectivamente IL-9 e IL-22, respectivamente. Imagen tomada y modificada de *John J. O'Shea and William E. Paul* [274].

### 1.3.5 Subpoblaciones de Células T reguladoras

Como hemos comentado previamente, existen dos poblaciones de células Treg; aquellas que se diferencian en el timo (tTreg) y las que se diferencian en la periferia bajo ciertos estímulos (pTreg). Ambas poblaciones presentan fenotipos similares y son capaces de suprimir a las células efectoras [275], pero se distinguen por su estabilidad y por las modificaciones epigenéticas.

- **Células tTreg:** también denominadas Treg naturales (nTreg) por ser originadas de forma natural en el timo, tienen un papel relevante en la prevención de la autoinmunidad. Su mecanismo de supresión se basa principalmente en el contacto célula a célula y en la liberación de granzima B y perforinas [276]. Asimismo, se conoce que las células tTreg expresan intensamente FOXP3 y son estables después de varias divisiones; mientras que las células Treg que expresan bajos niveles de FOXP3 pueden contraer un fenotipo efector bajo determinadas condiciones [277]. Diversos

estudios han mostrado que la estabilidad de las células tTreg es debida a la desmetilación del promotor de *FOXP3* [278], y estudios más recientes han mostrado, además desmetilación del promotor del gen *CTLA-4* y del factor de transcripción *EOMES*, implicado en la diferenciación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> [279].

- **Células pTreg:** también denominadas células Treg inducidas (iTreg), por ser derivadas de las células T CD4<sup>+</sup> en la periferia mediante su activación por estímulos del entorno [280]. En presencia de IL-2 y TGF- $\beta$ , las células pTreg expresan FOXP3 y adquieren un fenotipo regulador; sin embargo, las células pTreg no son tan estables como las tTreg [281]. La falta de estabilidad de estas células puede ser explicada por la metilación del promotor del gen *FOXP3* [278]. El mecanismo de supresión de las células T efectoras por las células pTreg está mediado por la liberación de IL-10, IL-35 y TGF- $\beta$ 1 y tienen especial relevancia durante procesos inflamatorios, siendo detectadas en casos de inflamación crónica como asma, colitis e infecciones con parásitos intestinales [282]. Además, se ha descrito que la flora comensal dirige el desarrollo de células pTreg para inducir tolerancia a la mucosa [283, 284]. Las pTreg son una población de células Treg más heterogénea. Los dos grupos más comunes de células pTreg son:

**Células Tr1:** son células pTreg inducidas a través de la señalización por IL-10, tanto *in vitro* como *in vivo* y son FoxP3<sup>-</sup>. Las células Tr1 producen altas cantidades de IL-10 y niveles intermedios de TGF- $\beta$  y bajos niveles de IL-5 e IFN- $\gamma$ , tanto en humano como en ratón. La IL-10 directamente inhibe a las células T mediante supresión de CD28, inhibe la producción de citocinas inflamatorias y quimioquinas y reduce la expresión de CD80/86 sobre monocitos/macrófagos y CD. No se ha encontrado hasta ahora un marcador específico de células Tr1, pero el factor de transcripción GATA-3 muestra potencial utilidad para su caracterización, aunque no es específico [237, 285, 286].

**Células Th3:** secretan altas cantidades de TGF- $\beta$  y en menor medida IL-10, y expresan el factor de transcripción FoxP3. Su diferenciación es inducida por TGF- $\beta$ , y hasta el momento tampoco se conoce un marcador específico. Tienen un papel relevante en la tolerancia del intestino y en la mucosa [237, 286].



### 1.3.6 Fuentes de Células T reguladoras

Las células T reguladoras procedentes de Sangre Periférica de Adulto (PB) y de Sangre de Cordón Umbilical (CB) son una fuente potencial de células Treg para el tratamiento de enfermedades. En particular, las Treg de CB (CB Treg) son más atractivas que las células Treg de PB (PB Treg), ya que al ser procedentes de la maduración en el timo (pTreg), presentan un estado *naive* y una mayor capacidad de mantener la expresión de FOXP3 [287]. Sin embargo, existe controversia acerca de su funcionalidad *in vitro*, ya que algunos estudios han descrito su capacidad supresora [288, 289], mientras que otros han demostrado que no la presentan [290, 291]. Estas discrepancias, podrían ser debidas a las diferentes condiciones de cultivo para su activación, tales como el estímulo (activación del receptor TCR o IL-2) y el tipo de APC usadas en el ensayo de supresión *in vitro*. En la sección de la tesis dedicada a las células Treg haremos un estudio comparativo entre células PB Treg y CB Treg, en cuanto a su caracterización, proliferación y liberación de citocinas, para analizar sus diferencias y con la finalidad de conocer cuál de ellas sería más adecuada para uso en terapia celular.

### 1.3.6 Mecanismos de acción de las Células T reguladoras

Las células Treg han mostrado tener capacidad supresora sobre células del sistema inmune como células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, células B, NK, DC, mastocitos/macrófagos, células NKT, mastocitos, basófilos y eosinófilos. Después de ser estimuladas, las células Treg puede ejercer su función supresora sobre las células efectoras diana de forma directa o indirecta (Figura 15).

En la actualidad se conocen tres **mecanismos directos** por los cuales las células Treg suprimen la función de sus células diana.

- **Citocinas Inhibitorias:** Las células Treg pueden inhibir la proliferación celular mediante la liberación de citocinas supresoras como IL-10, TGF- $\beta$  y IL-35 o expresión de Galectina-1. Varios estudios han demostrado que TGF- $\beta$  puede ejercer su función supresora unido a la membrana plasmática de las células Treg, requiriendo así contacto celular, o mediante su liberación [292]. TGF- $\beta$  es sintetizado como un precursor (pro-TGF- $\beta$ ), consistente en dos fragmentos de 55 KDa. El homodímero C-terminal

corresponde a la proteína TGF- $\beta$  madura, mientras el homodímero N-terminal contiene el péptido asociado a latencia (LAP). Ambos homodímeros están unidos de forma no covalente en un complejo denominado TGF- $\beta$  latente, el cual es inactivo porque LAP impide la unión de TGF- $\beta$  a su receptor. Cuando la célula Treg es activada, LAP sufre un cambio conformacional o es degradado por proteasas, permitiendo que TGF- $\beta$  se una a su receptor [293]. La unión del complejo TGF- $\beta$  a la membrana plasmática esta mediada por la glicoproteína A predominante en repeticiones (GARP), la cual se expresa exclusivamente en células Treg activadas [294].

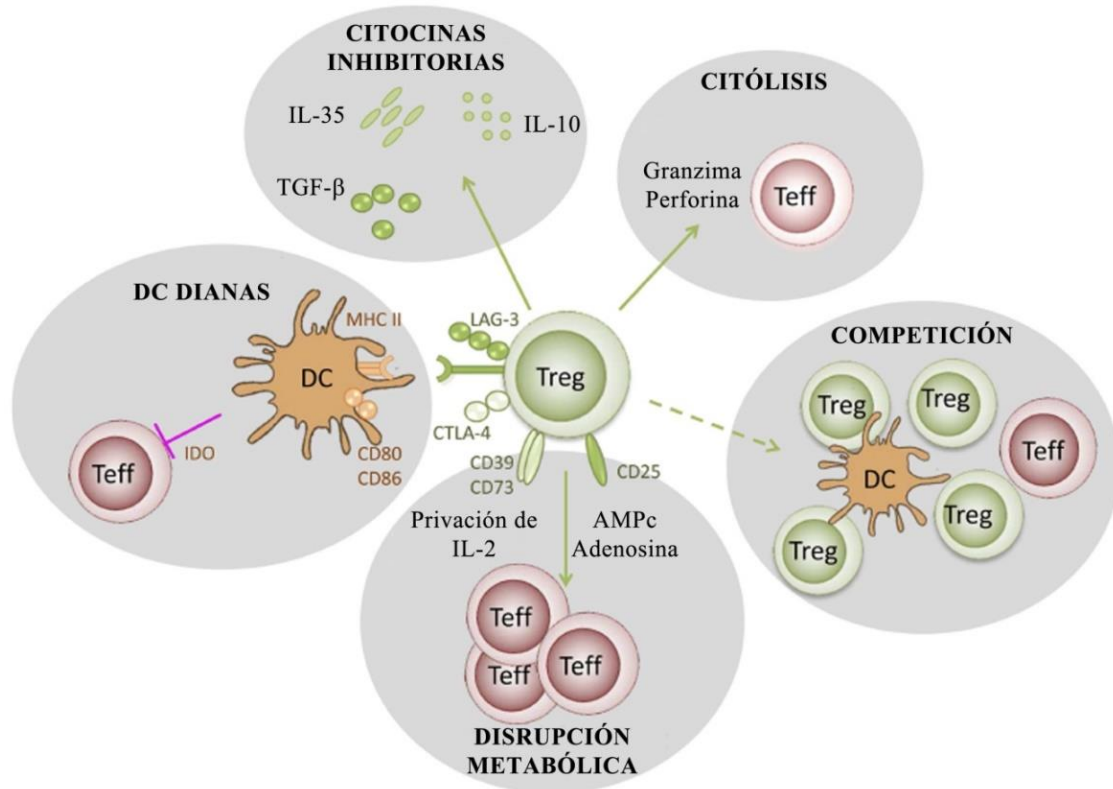
- **Citólisis:** Otro mecanismo por el cual las células Treg suprimir la función de sus células dianas es mediante la lisis directa. Tras la estimulación de su receptor TCR *in vitro*, las células Treg sobreexpresan granzima B y pueden lisar células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, mediante un mecanismo dependiente de perforinas [295]. Además, también se ha descrito la lisis de células B [296] y NK [297].

- **Disrupción Metabólica:** Las células Treg pueden suprimir a las células efectoras por privación de IL-2. Se ha demostrado que las células Treg son incapaces de producir IL-2; sin embargo, presentan una alta eficiencia en su degradación mediante la sobreexpresión de IL-2R $\alpha$  (CD25). De esta manera, las células Treg sobreexpresan más rápidamente el receptor de IL-2 que el resto de células T, lo que conlleva a su inanición. Por otro lado, las células T pueden anular su supresión mediada por las Treg mediante una sobreproducción de IL-2 [298].

Las células Treg pueden suprimir a sus células diana mediante **mecanismos indirectos**, a través de su interacción con APC, y en concreto, con células dendríticas (DC). Este mecanismo involucra a varias moléculas presentes en su membrana.

- **Modulación de la actividad de las APC:** Las células Treg se unen mediante la proteína de membrana CTLA-4 (Antígeno-4 asociado al Linfocito Citotóxico) a las proteínas CD80/CD86 de las DC. Esta interacción induce señales inhibitorias en las DC, disminuyendo así la co-estimulación de las células T [290]. Además, mediante el Gen-3 de activación de linfocitos (LAG-3), un homólogo de CD4, se unen al complejo MHC de clase II con alta afinidad de las DC, bloquea su maduración y disminuye la presentación del antígeno a las células T [299]. Otras proteínas de membrana, como Neuropilina-1 (NRP-1) [300], CD39 [301] o la proteína similar a fibrinógeno 2 (FGL-2)

[302], también se han implicado en los mecanismos de supresión de forma indirecta mediados por las células Treg.

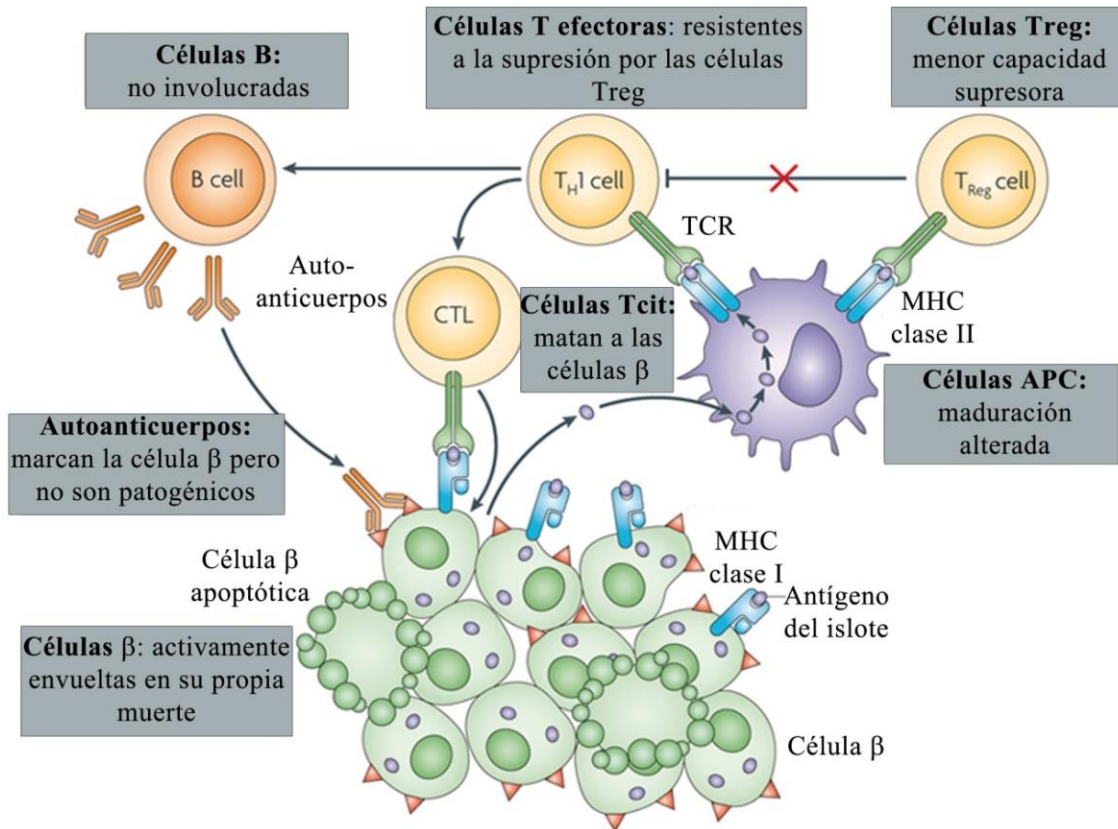


**Figura 15. Mecanismos de acción de las células T reguladoras.** *DC Dianas* Modulación de la actividad de las APC a través de la unión de las células Treg a sus receptores de membrana debilitando la señal enviada a las células efectoras (Teff); *Disrupción Metabólica:* incluye la privación de IL-2, la inhibición mediada por AMP cíclico (AMPc) y la inmunosupresión mediada por el receptor de adenosina 2A2; *Competición:* implica la competición con las células Teff por citocinas críticas como IL-2 y unión con las DC; *Citólisis:* efecto citotóxico directo a través de la producción de granzimas y perforinas, induciendo apoptosis de las células Teff o APC; *Producción de Citocinas Inhibitorias:* entre ellas IL-35, IL-10 y TGF-β. Imagen tomada y modificada de *Marta Caridade* y colaboradores [303].

### 1.3.7 Células T reguladoras y Diabetes

La DM Tipo 1 es una enfermedad autoinmune crónica mediada por células T. Bajo condiciones normales, la gran mayoría de células T autorreactivas son eliminadas en el timo a través del mecanismo denominado tolerancia central. Sin embargo, una pequeña parte escapa de este proceso y son liberadas a la circulación periférica. Normalmente, estas células T autorreactivas son suprimidas por las células Treg, asegurando ambos procesos la tolerancia frente a los antígenos propios. Si uno de estos dos mecanismos no funciona correctamente, los linfocitos T citotóxicos atacan a las células del organismo desencadenando una enfermedad autoinmune. En el caso de la DM1, las células T atacan a las células  $\beta$  del islote de Langerhans, resultando en una deficiencia de producción de insulina. El páncreas sano contiene alrededor de mil millones de células  $\beta$  [304]. Este número de células es perfectamente capaz de enfrentarse a la necesidad de insulina de un individuo sano. De hecho, solo un porcentaje de ellas son necesarias para garantizar la normoglicemia, encontrándose altos niveles de glucosa en sangre en DM1 cuando más del 70-80 % de las células  $\beta$  se han perdido o no son funcionales [305].

A lo largo de los años se han propuesto varias hipótesis sobre la etiología de la DM1. Estas incluyen el mimetismo molecular debido a antígenos de la dieta, reacción cruzada con antígenos víricos [306-308], implicación de la microbiota [309, 310] y defectos en la expresión de antígenos de las células  $\beta$  en los nódulos linfáticos o el timo. Además, se ha descrito una diversidad de defectos en las células B, células Treg, células T citotóxicas y APC, entre otros defectos inmunológicos (Figura 16). Colectivamente, estos eventos podrían determinar la pérdida de tolerancia inmunológica hacia la célula  $\beta$  con la consecuente disminución de masa celular y funcionalidad. De esta manera, la DM1 es una enfermedad muy heterogénea, y puede además variar entre cada paciente según su edad, si está asociado con otras enfermedades autoinmunes, el grado de susceptibilidad genética por el HLA, la titulación de anticuerpos contra el islote, la cantidad residual de célula  $\beta$  funcional en el momento del diagnóstico y el estado variable de la resistencia a la insulina. Todas estas características pueden tener un papel importante en el proceso de destrucción de la célula  $\beta$ , por lo que la detallada caracterización de los pacientes debería ser tomada en cuenta para los ensayos de intervención autoinmunes.



**Figura 16. Mecanismos de muerte celular de la célula  $\beta$  mediados por el sistema inmune en pacientes diabéticos tipo 1.** Proteínas de la célula  $\beta$  son fagocitadas por las células presentadoras de antígenos (APC), tales como las DC. Las APC procesan las proteínas en fragmentos peptídicos y los presentan a través del complejo MHC de tipo II. Estos péptidos serán reconocidos por las células Th1, las cuales activan una serie de cascadas de señalización, entre las que se incluye la activación de las células B que producirán autoanticuerpos específicos del islote y de linfocitos T citotóxicos (Tcit o CTL) específicos para el antígeno del islote, que pueden directamente lisar a la célula  $\beta$  que presenta este antígeno en su membrana a través del complejo MHC de tipo I. Alternativamente, las células APC pueden presentar el antígeno específico de islote a las células Treg que suprimen la cascada pro-inflamatoria, previniendo que la célula  $\beta$  sea destruida. Las cajas azules representan varias características inmunológicas que distinguen a los pacientes diabéticos tipo 1 de los individuos normales, predisponiéndolos a padecer la enfermedad. Imagen tomada y modificada de *Bart O. Roep & Mark Peakman* [311].

Hace ya más de una década que se describió que la disfunción de las células Treg estaba asociada a la DM1. En la actualidad, numerosos estudios documentan una baja frecuencia de células Treg en pacientes diabéticos, deficiencias en su activación o baja capacidad de supresión *in vitro* [312, 313]. De esta manera, el uso de las células

Treg en la terapia celular de la diabetes ha centrado la atención de investigadores de todo el mundo en los últimos años, con el objetivo de bloquear la destrucción de la célula  $\beta$  mediada por el sistema inmune, mantener los niveles de Péptido-C e incrementar el número de células  $\beta$  para restaurar su funcionamiento. Varios estudios se han centrado en el uso de mono-inmunoterapias, mediante la administración de anticuerpos monoclonales en pacientes diabéticos, con la finalidad de expandir la población de células Treg. Estos ensayos han mostrado retraso en el declive de la función de la célula  $\beta$  en ensayos clínicos fase II, en los que se incluyen el uso de anticuerpos anti-CD3 (*Otelixizumab*) [71], anti-CD20 para la delección selectiva de linfocitos B (*Rituximab*) [73] y CTLA-4-Ig (*Abatacept*), que se une selectivamente a CD80/86 para bloquear su interacción con CD28 evitando la fase temprana de activación de los linfocitos T [72]. Por otro lado, el uso de IL-2 en pacientes diabéticos está abarcando un gran terreno. El receptor de IL-2 de alta afinidad se compone por tres cadenas diferentes: cadena  $\alpha$  (IL-2R $\alpha$  o CD25),  $\beta$  (IL-2R $\beta$  o CD122) y  $\gamma$  (IL-2R $\gamma$  o CD132). CD25 es constitutivamente expresado en células Treg, mientras que su expresión en otras células T es inducida solo después de su activación. Esto condujo a la idea del uso terapéutico de IL-2 para inducir la proliferación de las células Treg y la restauración de la homeostasis inmune. Según esto, dosis bajas de IL-2 debería impulsar preferentemente la expansión de células Treg sin causar la activación inmune global. Esto se ha mostrado en modelos murinos [314, 315] pero, en humanos, aunque también se ha mostrado *in vitro* [316], aún queda por establecerse la dosis y abordar el problema de la variabilidad entre cada paciente que presenta esta enfermedad. En la actualidad, existen varios ensayos clínicos que trabajan estas cuestiones [316-318].

El trasplante de células Treg para la terapia celular de la diabetes se ha llevado a cabo en modelos murinos diabéticos, comprobándose que puede ser una estrategia efectiva para combatir este trastorno [307-309]. Recientemente, el grupo de *Bluestone* y colaboradores ha publicado el primer ensayo clínico con células Treg en fase I con pacientes diabéticos [76]. En este ensayo, 14 pacientes fueron trasplantados con células Treg autólogas expandidas *in vitro* con diferentes concentraciones celulares (desde  $0,05 \times 10^8$  hasta  $26 \times 10^8$  células). En un subconjunto de los pacientes trasplantados se pudo detectar un año después células en circulación y se mostró un aumento transitorio de células Treg con un fenotipo estable. Además, no se detectaron reacciones adversas relacionadas con el tratamiento y los niveles de Péptido-C persistieron en varios

individuos tras dos años del trasplante. Los favorables resultados obtenidos en este ensayo, apoyan el desarrollo de un ensayo en fase II para probar la eficacia de las células Treg en el tratamiento de la diabetes.

En resumen, hay un conjunto de evidencias que apoyan la idea de que las células T reguladoras pueden ser una nueva herramienta para el tratamiento de la DM autoinmune, por lo que su caracterización, mecanismos de activación y expansión *in vitro* y estudio de su función y estabilidad son claves para comprender y optimizar su empleo en terapia. Además, una cuestión importante es el planteamiento de usar para la terapia celular de la diabetes células Treg autólogas, como el equipo de *Bluestone* ha llevado a cabo, o si por el contrario el uso de células Treg alogénicas sería más conveniente. Según varios estudios, los pacientes diabéticos pueden presentar una baja frecuencia de células Treg, deficiencias en su activación o baja capacidad de supresión *in vitro* [312, 313], por lo que en éstos casos la terapia con células Treg alogénicas sería la mejor opción. En este terreno, las células CB Treg se presentan como una alternativa prometedora, por ser la sangre de cordón umbilical una fuente de fácil obtención y abundante, y por el estado *naive* de las células Treg.





## ***2. Hipótesis y Objetivos***



## Hipótesis

La necesidad de buscar una fuente de células productoras de insulina alternativa a los islotes de donantes cadavéricos, y de optimizar una terapia para el frenado del ataque inmunológico, que sucede tanto en la diabetes tipo 1 como tras el trasplante de células  $\beta$ , junto con los datos publicados hasta la fecha, nos lleva a proponer que la terapia combinada de células productoras de insulina derivadas de células madre y células T reguladoras puede ser una buena herramienta para el tratamiento de la DM. De este modo, por un lado nos hemos centrado en el estudio de los mecanismos que controlan la expresión del factor de transcripción Pdx1 en células madre embrionarias de ratón, ya que la expresión controlada de este gen puede ser de utilidad para diseñar un protocolo de diferenciación hacia células productoras de insulina. Por otro lado, nos hemos centrado en el estudio de las células T reguladoras procedentes de sangre Periférica de Adulto y sangre de Cordón Umbilical, para mejorar su caracterización y fenotipado, y buscar la mejor fuente de células T reguladoras humanas para la terapia celular de la DM. Además, aplicaremos dos técnicas de selección diferentes, ya que la pureza de las células y el rendimiento del aislamiento son dos parámetros fundamentales que necesitan ser optimizados para el uso de estas células en terapia celular.

## Objetivos

El objetivo general de esta tesis doctoral es la búsqueda de una terapia celular para la Diabetes Mellitus. Este estudio se ha centrado en dos ramas diferenciadas para constituir finalmente una terapia celular combinada para el tratamiento de la Diabetes:

- 1) Optimización de la diferenciación de células madre hacia células productoras de insulina para el reemplazo de las células beta dañadas. Generación *in vitro* de células productoras de insulina mediante la expresión controlada de Pdx1.
- 2) Inducción de la tolerancia mediante la terapia celular con células T reguladoras. Estudio de las células T reguladoras de sangre periférica de adulto y sangre de cordón umbilical.

Dentro de estos dos temas de estudio, los objetivos específicos son los siguientes:

1. Análisis del efecto del DETA-NO sobre la expresión de *Pdx1* en células madre embrionarias de ratón.
2. Definición del efecto del DETA-NO sobre la metilación de promotor de *Pdx1* en células madre embrionarias de ratón.
3. Estudio del efecto del DETA-NO sobre las modificaciones postraduccionales de las histonas sobre el promotor del gen *Pdx1* en células madre embrionarias de ratón.
4. Análisis de la ocupación de factores de transcripción y complejos reguladores sobre el promotor de *Pdx1* en células madre embrionarias de ratón.
5. Diseño de un protocolo de diferenciación de CMER hacia células productoras de insulina.
6. Diseño de un protocolo de diferenciación de CME e iPSCs humanas hacia células productoras de insulina.
7. Selección de células T reguladoras de sangre Periférica de Adulto y sangre de Cordón Umbilical y mediante dos técnicas de aislamiento diferentes.
8. Análisis comparativo de la capacidad de proliferación, activación y patrón de citocinas liberadas por las células T reguladoras en función de su origen y técnica de selección empleada.

### ***3. Materiales y Métodos***



## 3.1. Líneas celulares y cultivo celular

### 3.1.1 Células Madre Embrionarias de ratón

Las CMER empleadas en este estudio fueron **D3** (ATCC: CRL1934) y **R1/E** (ATCC, SCRC1036). Para ambos tipos celulares, el cultivo fue mantenido a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub> en medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco 32430-100, Carlsbad, CA, USA), suplementado con 15% suero fetal bovino inactivo (SFB) (Gibco, 10270106, Paisley, Scotland, UK), 0,1 mM β-mercaptoetanol (Gibco 131350-010, Paisley, Scotland, UK), 2 mM L-glutamina (Gibco 25030-032, Paisley, Scotland, UK), 1% aminoácidos no esenciales (Gibco 11140-035, Paisley, Scotland, UK) y 100 U/ml penicilina: 100 µg/ml estreptomina (Gibco 15140-122, Paisley, Scotland, UK). El estado indiferenciado fue mantenido mediante la adición de 1000 U/ml del Factor Inhibidor de la Leucemia (LIF) (Chemicon ESG1107, Charlottesville, VA, USA). El medio fue cambiado cada 2 o 3 días, y el pase se realizó cada 3-5 días.

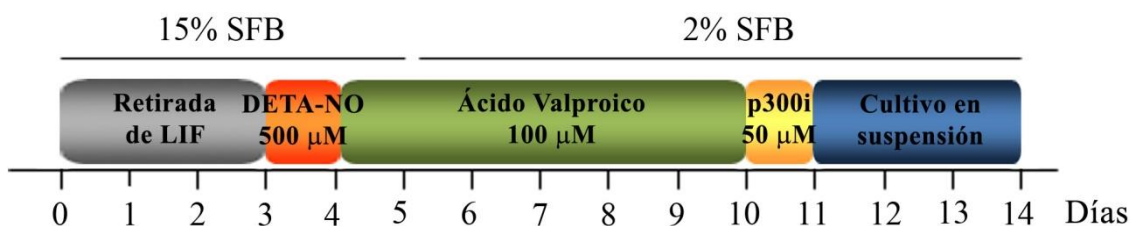
#### - Tratamientos para el estudio de la regulación de Pdx1

La línea celular R1/E fue empleada en el estudio de la regulación de Pdx1, y se mantuvieron entre los pases 15 y 40. Para los distintos experimentos se cultivaron durante 3 días en placas con gelatina en presencia y ausencia de LIF, y posteriormente fueron expuestas a 500 µM del donador de óxido nítrico diethylenetriamine nitric oxide adduct (DETA-NO) (Sigma), durante 19 horas. Para el análisis de la actividad de la acetiltransferasa P300, se utilizó un inhibidor específico (P300i) (C646, Calbiochem, 382113) añadido al medio de cultivo al tercer día y expuesto durante 20-22 horas. De la misma forma se usó el 5-Aza-2'-desoxicitidina para el estudio de metilación de ADN a concentración final de 1µM. Las células fueron tripsinizadas durante 5 minutos y recogidas mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos y lavadas con PBS. El pellet fue guardado a -20°C hasta su procesamiento.

#### - Protocolo de diferenciación de CMER hacia células productoras de insulina

La línea celular D3 fue mantenida entre los pases 10 y 40, y fueron empleadas en el desarrollo del protocolo de diferenciación hacia células productoras de insulina. Para ello, se sembraron unas 300.000 células en placas de cultivo de 152 cm<sup>2</sup> y se mantuvieron durante 3 días en ausencia de LIF, 19 horas con 500 µM DETA-NO, 6 días

con 100  $\mu\text{M}$  de ácido valproico (VA) (Sigma), y 20-22 horas con 50  $\mu\text{M}$  del inhibidor de la acetiltransferasa P300 (P300i), C646. A continuación, las células supervivientes fueron despegadas de la placa mediante un raspado suave y transferidas a un tubo donde las colonias celulares sedimentaron pasados unos 10 minutos. Los agregados resultantes fueron crecidos en placas no adherentes de 6 pocillos durante 3 días. El día 5 del protocolo, la concentración de FBS fue reducido al 2% hasta el final (Figura 17). El medio fue cambiado diariamente tras el quinto día de cultivo. Las células fueron recogidas en distintos puntos del protocolo para su análisis por tripsinización durante 5 minutos, centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos y lavadas con PBS. El pellet fue guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Para el análisis de liberación de insulina en respuesta a glucosa los agregados resultantes no fueron tripsinizados, se recogieron mediante precipitación y se procedió directamente a la estimulación con glucosa y KCl. Los sobrenadantes se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 17. Protocolo de diferenciación de células CMER hacia células productoras de insulina.** El protocolo de diferenciación en la línea celular D3 consistió en 5 pasos: 1) retirada del LIF de medio de cultivo para favorecer la diferenciación espontánea; 2) adición de 500  $\mu\text{M}$  de DETA-NO durante 19 horas; 3) cultivo durante seis días con VA 100  $\mu\text{M}$ ; 4) tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de P300i durante 20-22 horas; 5) cultivo en suspensión durante tres días para la formación de agregados celulares. El día 5 de cultivo se redujo el porcentaje de suero al 2% hasta el final del protocolo.

### 3.1.2 Células Madre Embrionarias y de Pluripotencia Inducida humanas

Las células madre embrionarias de origen humano (CMEh) que se ha empleado es la línea celular **HS181**, generada por O. Hovatta y cedida por el Instituto Karolinska, y la línea celular de Pluripotencia Inducida humana (hiPSC) fue **MSUH001**, obtenida de la Red de Biobancos del ISCIII (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad). Estas células derivan de la línea IMR90 (fibroblastos fetales obtenidos de la



ATCC). Ambas líneas celulares crecen en un medio de cultivo condicionado por **Fibroblastos humanos** (ATCC: CRL2429), por lo que el primer paso es el cultivo de éstos. Para la expansión de los fibroblastos se utilizó un medio de cultivo con medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Gibco, 2198-032), 10% de suero fetal inactivo (Gibco, 10270106, Paisley, Scotland, UK) y 25 U/ml penicilina: 25 µg/ml estreptomicina (Gibco, 15140-122, Paisley, Scotland, UK). Cuando el cultivo de fibroblastos alcanza una confluencia superior al 80% son inactivados con 10 ng/ml de mitomicina (Sigma, M4287-2M6) durante 3 horas. La placa debe lavarse dos veces con PBS para retirar la mitomicina y se mantienen durante 24 horas en su medio de cultivo. Al día siguiente los fibroblastos son mantenidos con el medio que será utilizado para el crecimiento de las líneas humanas HS181 y MSUH001, cambiándose y recogiendo el medio a diario hasta 10 días. Este medio está compuesto por KNOCKOUT DEMEN (Gibco, 10829-018, Paisley, Scotland, UK), 20% de sustituto de suero o suero *replacement* (KSR) (Gibco, 10828-028), 0,1 mM β-mercaptopetanol (Gibco, 131350-010, Paisley, Scotland, UK), 2 mM L-glutamina (Gibco, 25030-032, Paisley, Scotland, UK), 1% aminoácidos no esenciales (Gibco, 11140-035, Paisley, Scotland, UK) y 50 U/ml penicilina: 50 µg/ml estreptomicina (Gibco 15140-122, Paisley). El medio es filtrado y guardado a -80°C hasta su uso. Para el mantenimiento del estado indiferenciado se añade el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (bFGF) (Invitrogene, 13256029) a una concentración final de 8 ng/ml. Las células HS181 y MSUH001 crecen sobre matrigel (1:60) (BD BIOCIENCIAS, 354277), que es incubado sobre la placa durante una hora, después es retirado y la placa es lavada con KNOCKOUT DEMEN. El medio fue cambiado diariamente y se hizo pase cada 6-7 días.

#### **- Protocolo de diferenciación de CMEh e hiPSC hacia células productoras de insulina**

Las líneas celulares humanas HS181 y MSUH001 fueron utilizadas para el desarrollo del protocolo de diferenciación que anteriormente fue realizado en la línea de ratón D3. En este caso el protocolo fue adaptado en días y medios de cultivo óptimos para que fuera funcional. En primer lugar, se sembraron 60.000 células en placas de 6 pocillos (9,5 cm<sup>2</sup>/pocillo) y se mantuvieron durante 2 días en Medio Condicionado por fibroblastos (MC) suplementado con 8 ng/ml bFGF, tras lo cual se añadió medio al 20% de suero *replacement* sin condicionar y sin suplementar con bFGF para inducir diferenciación espontánea. Transcurridos dos días, se empleó el mismo medio de cultivo

pero reducido en suero *replacement* hasta el 2%, mantenido así hasta el final del protocolo. Al día siguiente, se trataron las células durante 19 horas con 500  $\mu\text{M}$  DETA-NO, 6 días con 100  $\mu\text{M}$  VA, y 20-22 horas con 50  $\mu\text{M}$  P300i. Para el paso de maduración con la línea celular HS181 se realizaron cultivos en suspensión, similares al protocolo establecido con las células de ratón, cultivo en adherencia, se probó un medio suplementado con Insulina (1,72 $\mu\text{M}$ )- Transferrina (0,069  $\mu\text{M}$ )- Selenito de sodio (0,039  $\mu\text{M}$ ) (ITS) y/o adición de pequeñas moléculas como 10 mM de nicotinamida (NC) (Sigma, N0636) y 75  $\mu\text{M}$  de resveratrol (RV) (Sigma, R5010) (Figura 18). El medio fue cambiado diariamente tras el cuarto día de cultivo. Las células fueron recogidas en distintos puntos del protocolo mediante la utilización de acutasa (Bioline, 00-4555-56), incubación durante 5 minutos a 37 °C, centrifugación a 800 rpm durante 5 minutos. Finalmente fueron lavadas con PBS y el pellet fue guardado a -20°C hasta su uso.



**Figura 18. Protocolo de diferenciación de células CMEh y hiPSC hacia células productoras de insulina.** El protocolo de diferenciación en la línea celular HS181 consistió en 7 pasos: 1) dos días de cultivo con Medio Condicionado (MC) suplementado con bFGF a una concentración de 8ng/ml; 2) cultivo con medio no condicionado al 20% de suero *replacement* (KSR) durante dos días; 3) reducción de KSR al 2% al cuarto día de cultivo mantenido hasta el final del protocolo; 4) tratamiento con 500  $\mu\text{M}$  de DETA-NO durante 19 horas; 5) mantenimiento del cultivo durante seis días con 100  $\mu\text{M}$  de ácido valproico; 6) tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  del inhibidor de la acetiltransferasa P300 durante 20-22 horas; 7) paso de maduración final, en el que se han probado distintas condiciones: cultivo en suspensión, cultivo en adherencia, medio con insulina-transferrina-selenito de sodio (ITS) y/o adición de pequeñas moléculas como nicotinamida (10 mM) y resveratrol (75  $\mu\text{M}$ ). El protocolo de diferenciación con la línea celular MSUH001 solo se ha reproducido hasta el día 13.

### 3.1.3 Células de insulinoma

Las células de insulinoma de rata INS-1E fueron cedidas gentilmente por el *Dr. P. Maechler*, Geneva University. Es una línea clonal derivada de insulinoma de rata (INS-1). La línea INS-1E se caracteriza, a diferencia de la línea parental, por ser clonal, homogénea y más estable en cultivos prolongados; su fenotipo y su capacidad de secretar insulina en respuesta a la glucosa se mantiene por más pases. El medio de cultivo utilizado para su crecimiento fue RPMI-1640 (LONZA, BE12-167F, San Diego, USA), suplementado con 10% suero fetal bovino inactivo (Gibco, 10270106, Paisley, Scotland, UK), 10 mM HEPES (Gibco, 15630-080, Paisley, Scotland, UK), 1 mM piruvato sódico (Gibco, 11360-070, Paisley, Scotland, UK), 100 U/ml penicilina: 100 µg/ml estreptomina (Gibco 15140-122, Paisley, Scotland, UK), 2 mM L-glutamina (Gibco 25030-032, Paisley, Scotland, UK) y 0,1 mM β-mercaptoetanol (Gibco 131350-010, Paisley, Scotland, UK). Fueron mantenidas a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> y el medio fue cambiado cada 2 o 3 días. El pase celular se realiza cuando la placa está confluyente. La línea celular INS-1E fue empleada como control para el estudio del análisis de metilación del promotor de *Pdx1*.

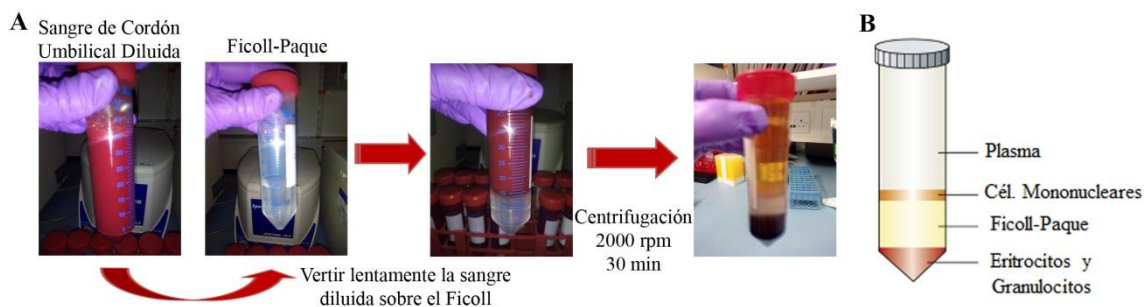
### 3.1.4 Células T reguladoras

El estudio de las células T reguladoras extraídas de sangre periférica de adulto y de cordón umbilical fue realizado en el Centro Anthony Nolan, Londres, bajo la supervisión de la *Dr. Aurore Saudemont* y el *Dr. Alejandro Madrigal*. El aislamiento de las células T reguladoras se llevó a cabo mediante dos procedimientos distintos, mediante el uso del *Kit CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec Kit)*, y por la tecnología *Streptamer*. El procedimiento seguido en cada caso se detalla a continuación.

- *CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec Kit)*. Este procedimiento de selección de células parte del aislamiento previo de las células mononucleares de la sangre mediante gradiente con Ficoll. En primer lugar, la sangre de cordón umbilical es diluida 1:1 con RPMI 1640 (Lonza, Belgium) conteniendo 0,63% de citrato trisodio (Sigma, USA) y 0,05 µM de β-mercaptoetanol (Life Technologies, UK), denominado medio de transporte. La sangre diluida es vertida sobre 15 ml de Ficoll-Paque-PLUS (GE Healthcare Life Sciences) muy lentamente sobre las paredes

del Falcon. A continuación, se procede a centrifugar las muestras a 2000 rpm durante 30 minutos, a temperatura ambiente (TA), con el frenado desactivado para evitar la parada brusca de la centrífuga. Tras la centrifugación, se observan claramente las distintas fases celulares (Figura 19A). Para el aislamiento de las células mononucleares se utiliza una pipeta Pasteur y se recolecta la fase que contiene este tipo celular (Figura 19B). Las células mononucleares son transferidas a tubos nuevos, donde se añade RPMI hasta 50 ml y son centrifugadas a 1600 rpm durante 10 min a TA. Para la eliminación de los eritrocitos que encontramos en el pellet resultante, se procede a realizar uno o dos pasos de lisis celular consistente en la adición de 4 ml de buffer de lisis PharmLyse 1X (BD Biosciences, UK) e incubación durante 4 minutos a 37 °C. Rápidamente se adiciona RPMI hasta rellenar el tubo Falcon y finalmente se centrifuga a 1600 rpm durante 10 minutos a TA. Finalmente se procede a contar las células mediante la dilución 1:1 con azul de tripán y la utilización de un hemocitómetro.

De la misma forma se aislaron las células T reguladoras de sangre periférica de adultos. La única variación del protocolo fue la cantidad de sangre diluida 1:1 con medio de transporte que se añade sobre el Ficoll-Paque Plus. En el caso de la sangre de cordón umbilical fueron 35 ml de sangre diluida por cada 15 ml de Ficoll; y en el caso de la sangre periférica 15 ml de sangre diluida por cada 15 ml de Ficoll.



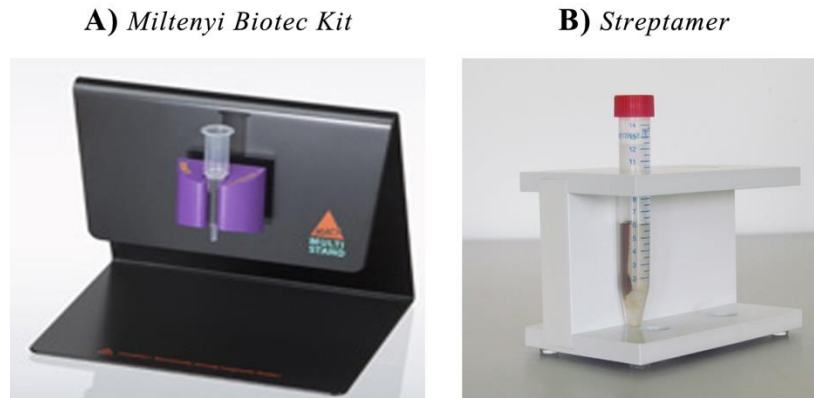
**Figura 19. Método de aislamiento de las Células Mononucleares de Cordón Umbilical por centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll.** A) La imagen de la izquierda muestra un tubo con sangre de cordón umbilical mezclada a dilución 1:1 con medio de transporte. La segunda imagen muestra un tubo con 15 ml de Ficoll Paque-PLUS, sobre cual se verterá la sangre diluida muy lentamente sobre las paredes del falcon. Finalmente, la imagen de la derecha muestra el resultado de la centrifugación a 2000 rpm durante 30 minutos, donde se observan las distintas fases celulares. B) Esquema de las fases formadas tras la centrifugación y separación de las células en función a su densidad.

Las células mononucleares sedimentadas fueron resuspendidas en buffer de marcaje AB (Buffer MACS: 2 mM EDTA y 1% BSA, albúmina de suero bovino, en PBS, suplementado al 10% con suero humano AB) según el número de células mononucleares de partida. Se añadió 300  $\mu$ l de buffer de marcaje AB por cada  $300 \times 10^6$  células mononucleares. A continuación, se procede a marcar las células con las microesferas conjugadas con el anticuerpo anti-CD25: 2  $\mu$ l de microesferas anti-CD25 por cada  $10 \times 10^6$  células y se incuba a 4 °C por 15 minutos en oscuridad. Seguidamente, la suspensión celular se lava con 10 ml de buffer MACS y se centrifuga a 1500 rpm durante 10 minutos a TA. El sedimento es resuspendido en 2 ml de buffer MACS por cada  $100 \times 10^6$  células y se añade a una columna *Place LS column* colocada en un campo magnético (Figura 20A) y humedecida previamente con 3 ml de buffer MACS. Guardamos un poco de suspensión celular como control de material de partida para el análisis de pureza y cálculo del rendimiento de la selección. Posteriormente, se recoge la suspensión celular no retenida en la columna junto con el flujo que pasa tras los 4 lavados consecutivos con 2 ml de buffer MACS. Esta será la fracción celular de células CD25<sup>-</sup>. Para la elución de las células CD25<sup>+</sup>, se separa la columna del campo magnético y se recogen mediante la adición de 2 ml de buffer MACS y la utilización de un émbolo ejerciendo presión. Este paso se repite dos veces y los 4 ml de suspensión celular se centrifugan a 1400 rpm por 10 minutos a TA. Para una mayor pureza de células CD25<sup>+</sup>, el sedimento resultante de la primera purificación se resuspende en 1 ml de buffer MACS y se vuelve a pasar por una columna *Place LS column*, repitiéndose el mismo proceso. Las células seleccionadas se resuspenden en 1 ml de medio completo (RPMI suplementado al 10% de SFB) y se procede al recuento mediante dilución 1:1 con azul de tripán y el uso de un hemocitómetro. Para el análisis de pureza se empleó el marcaje con anticuerpos específicos para marcadores de superficie de células T reguladoras y se analizaron por citometría de flujo delimitando sobre Linfocitos/ DAPI/ CD45<sup>+</sup>/ CD4<sup>+</sup>/ CD25<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup>.

- **Tecnología *Streptamer*.** Para la selección de las células T reguladoras por este procedimiento, el primer paso es hacer un recuento de las células nucleares totales presentes en la sangre de cordón umbilical. Para ello, se utiliza una solución Türk que crea hemólisis de los eritrocitos por su contenido en ácido acético y tiñe de azul los leucocitos, que son contados con ayuda de un hemocitómetro. El contenido, por lo general, de células nucleares en la sangre de cordón umbilical suele ser entre  $7-10 \times 10^6$

células nucleares por ml. Para el aislamiento de las células Treg se partió de unos  $250 \times 10^6$  células nucleares, por lo que el volumen de sangre de cordón requerido fue de 25-35 ml aproximadamente. El primer paso consiste en incubar durante toda la noche en buffer IS 1X (PBS al 1% de BSA) (IBA-Lifesciences) las partículas magnéticas con *Strep-Tactin* (IBA-lifesciences) y la región variable del anticuerpo, fab anti-CD25 en agitación a 4 °C. Los volúmenes utilizados fueron: 50 µl de anti-CD25fab, 75 µl de buffer IS 1X, y 375 µl de microesferas *Strep-Tactin* por cada  $250 \times 10^6$  células nucleares. Al día siguiente se incuba, durante unos 20-25 minutos a 4 °C y agitación, el complejo magnético unido a fab anti-CD25 con el volumen de sangre de cordón umbilical correspondiente. Tras el periodo de incubación, la sangre se distribuye en tubos de 15 ml, los cuales se colocan sobre un soporte magnético (Figura 20B) durante 3 minutos. Trascorrido este tiempo, se retira el sobrenadante con cuidado con ayuda de una pipeta Pasteur, y se realizan 5 lavados con el buffer ISI 1X frío. Tras el segundo lavado, para evitar que el ADN de las células muertas se pegue y forme aglomerados entre las células y el complejo, se realizan uno o dos pasos de digestión de 100-200 µl de ADNasa ( $1 \times 10^6$  IU/ml) (Calbiochem, 260913), durante 10 minutos en agitación y TA. Durante este tiempo se puede observar cómo los grumos van desapareciendo conforme la ADNasa va digiriendo el ADN. Este paso es crítico para asegurar la unión de las células CD25<sup>+</sup> y evitar uniones inespecíficas por la formación de los agregados. Al finalizar los 5 pasos de lavados, se procede a la elución. Para ello, se prepara una solución en buffer ISI 1X a TA con D-Biotina a 1 mM, que competirá con el fab por unirse a la *Strep-Tactin*, y se incuba con el complejo durante 10 minutos a TA y agitación. Los tubos se colocan en el soporte magnético y se recoge el sobrenadante que contiene las células CD25<sup>+</sup> libres del complejo magnético. Este paso se repite dos veces más utilizando una solución a 100 µM de D-Biotina. Todos los sobrenadantes conteniendo las células de interés se juntan en un tubo Falcon y se centrifuga durante 10 minutos a 1600 rpm. En este punto es posible que queden posibles residuos de células unidas a complejos magnéticos, por lo que el sedimento celular se incuba con 1-2 ml de D-Biotina 1 mM durante 10 minutos a TA y agitación, y se coloca en el soporte magnético. En el momento que se observa la aparición de complejos (se ven de color marrón) desplazándose hacia el imán, el sobrenadante es recogido. Finalmente, tras otro paso de lavado con Buffer ISI 1X y centrifugación, las células se resuspenden en 1 ml de medio de cultivo completo y se procede a contarlas mediante tinción con la solución

Türk y ayuda de un hemocitómetro. El análisis de pureza de las células aisladas se llevó a cabo mediante citometría de flujo de la misma forma que en la selección por el método basado en columnas.



**Figura 20. Técnicas de selección de células T reguladoras.** A) Técnica de selección *Miltenyi Biotec Kit*. Tras el marcaje de las células mononucleares con el anticuerpo anti-CD25 del kit *CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit* unido a un complejo magnético, la suspensión celular se pasa por columnas colocadas en un campo magnético. Las células CD25<sup>+</sup> serán retenidas en la columna y las negativas serán eluidas. B) Técnica de selección mediante la tecnología *Streptamer*. Las células nucleadas de la sangre de cordón umbilical se unen a un complejo magnético de microesferas *StrepTactin*- fab anti-CD25, y se separan del resto con la ayuda de un soporte magnético. Mediante lavados y elución con D-Biotina se obtienen finalmente células CD25<sup>+</sup> libres de marcaje.

#### - Activación y cultivo de las células T reguladoras

Una vez que se han aislado las células T reguladoras, se resuspenden en medio completo a una concentración celular de 1000-2000 células por ml. Para cultivar las células Treg que van a ser activadas se prepara una placa de 96 pocillos (*flat bottom*) con anticuerpo anti-CD3 (clone HIT3a, BD Biosciences, Belgium). El anticuerpo anti-CD3 se diluye con PBS a una concentración de 10 µg/ml y 50 µl de esta dilución se añade a cada pocillo. La placa se incuba a 37 °C durante 2 horas o toda la noche, en el caso que se prepare la placa el día antes del aislamiento. Para el cultivo de células no activadas (“*resting*”), se prepara medio de cultivo completo con 2000 U/ml de IL-2 (Prospect, Israel), y para la activación celular preparamos medio completo con 2000 U/ml de IL-2 y 20 µg/ml de anticuerpo anti-CD28 (clone CD28.2, BD Biosciences, Belgium). Una vez pasado el tiempo de incubación de la placa de 96 pocillos con anti-CD3, se retira el anticuerpo y se lavan los pocillos con 200 µl de PBS. A continuación,

se añade 100 µl del medio para activar las células a los pocillos cultivados con anti-CD3 y 100 µl de medio para las células “resting” en otros pocillos no incubados con anti-CD3. Finalmente, se añade 100 µl del cultivo celular, de tal manera que el volumen de medio total por pocillo es 200 µl, el número celular es 100.000–200.000 células por pocillo, la concentración de IL-2 es de 1000 U/ml y la concentración de anti-CD28 es de 10 µg/ml. La placa se cultiva a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. La activación celular se analiza en el día 0, a la vez que se realiza en análisis de pureza, y en los días 2 y 5 mediante el marcaje con anticuerpos específicos y citometría de flujo. Además, se guardan células a día 0, y activadas y “resting”, a días 2 y 5, a -80 °C para el análisis de expresión génica; y sus respectivos sobrenadantes, a -20 °C, para el análisis de liberación de citocinas.

## 3.2. Técnicas de Biología Molecular

### 3.2.1 Medida de la expresión génica

- **Aislamiento del ARN.** El ARN total fue extraído usando trizol, “Easy Blue® reagent” (Intron Biotechnology, Gyeonggi-do, Korea) y cloroformo/ isopropanol. El Trizol es una solución monofásica de fenol y guanidina isotiocinato que rompe las células y disuelve los componentes celulares manteniendo intacto el ARN. La adición de cloroformo permite separar, mediante centrifugación, la fase acuosa que contiene el ARN de la fase orgánica (ADN y proteínas). El ARN obtenido se precipita con isopropanol, se lava con etanol al 75% y se diluye en agua libre de ARNasa. Las muestras se calentaron a 65 °C durante 5 minutos y el ARN total fue cuantificado mediante absorción espectrofotométrica (Nanodrop™, ND-1000) midiéndose su concentración a longitudes de onda de 260 nm y utilizando los ratios 260/280 y 260/230 como criterios de pureza del ARN obtenido. Posteriormente, las muestras fueron conservadas a -20 °C hasta el momento de su utilización. Para la extracción de ARN de las células T reguladoras, como el pellet celular es muy pequeño, se empleó RNeasy Micro Kit (Qiagen, 74004), según las instrucciones de la casa comercial. El ARN extraído fue cuantificado mediante absorción espectrofotométrica, de la misma forma que el caso anterior.



- **Transcripción inversa.** Las síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó a partir de 0,5-1 µg de ARN total de cada muestra, usando la retrotranscriptasa de *Quanta Biosciences* (95047-100) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se diluyó 0,5-1 µg de ARN en agua de grado molecular hasta un volumen final de 15 µl, se calentó a 65 °C durante 5 minutos para eliminar las estructuras secundarias, y se añadió 4 µl de Mix 5X a cada muestra y 1 µl de retrotranscriptasa. Las muestras se incubaron a TA durante 5 minutos y fueron mantenidas a 42 °C durante 30 minutos para favorecer la actividad de la enzima. Finalmente, para detener la reacción las muestras fueron incubadas 5 minutos a 85 °C y el ADNc obtenido se almacenó a -20 °C hasta el momento de su utilización. La transcripción inversa del ARN extraído de las células Treg se llevó a cabo con SuperScript® III Reverse Transcriptase (ThermoFisher), según las recomendaciones de la casa comercial. 200 ng de ARN fueron retrotranscritos en un volumen total de 20 µl y el ADNc obtenido se diluyó hasta 60 µl con agua y directamente fue usado para la reacción de PCR cuantitativa.

- **PCR cualitativa.** Para la realización de la PCR cualitativa, se empleó la enzima MyTaq red (Bioline, BIO21108) según las instrucciones de la casa comercial y un termociclador Biorad 1709701. Los reactivos y las concentraciones utilizadas para la reacción pueden ser consultados en la tabla 1. Las condiciones de la reacción fueron: una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95 °C, seguida del número establecido de ciclos (30-40), consistentes en tres fases de 30 segundos de desnaturalización a 95 °C, 15 segundos de hibridación a la temperatura adecuada para cada cebador y 15 segundos para la elongación a 72 °C. Finalmente, se procede a un paso de elongación final de 10 minutos a 72 °C. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON, 21141). La electroforesis se desarrolló en tampón TAE (Tris, Acetato y EDTA) durante aproximadamente 45 minutos o 1 hora a 100 V. Una vez finalizada la electroforesis, se tomaron imágenes de los productos de amplificación con luz ultravioleta en un transiluminador (Bio-Rad) mediante el software Quantity One (Bio-Rad). Como control endógeno, se empleó la amplificación del gen *β-actina*.

Reactivos	Volumen (µl)	Concentración Final
Buffer 5X	4	1X
Cebador F (10 µM)	0,5	250 nM
Cebador R (10 µM)	0,5	250 nM
MyTaq red (5 U/µl)	0,2	1U
ADNc	1-3	
Agua Grado Molecular	Hasta 20	

**Tabla 1.** Componentes de la reacción de PCR cualitativa.

- **PCR cuantitativa.** Para el análisis de PCR a tiempo real se empleó el reactivo SYBR Green 2X (iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step Kit, Bio-Rad 1725150) y para la amplificación del ADN y la detección de la señal se empleó el termociclador ABI Prism 7500, en el caso del estudio de Pdx1 y el protocolo de diferenciación, y CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), en el estudio de la expresión de marcadores de células Treg. El programa empleado consta de un paso de desnaturalización inicial de 10 minutos a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de amplificación consistentes en 30 segundos de desnaturalización y 1 minuto de hibridación a la temperatura adecuada para cada cebador, y una curva de disociación final consistente en 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C. Esta curva nos permitirá comprobar la especificidad de nuestros cebadores. Los resultados fueron normalizados a la expresión del marcador endógeno *β-actina*. Las reacciones de PCR a tiempo real llevadas a cabo en los diferentes ensayos y los cebadores usados en cada experimento, se detallan en las tablas que se presentan a continuación.

Reactivos	Volumen (µl)	Concentración Final	Reactivos	Volumen (µl)	Concentración Final
Sybr Green 2X	10	1X	Sybr Green 2X	10	1X
Cebador F	0,2	100 nM	Cebador F*	1,8	900 nM
Cebador	0,2	100 nM	Cebador R*	1,8	900 nM
ADNc	1		ADNc	3	
Agua	Hasta 20		Agua	Hasta 20	

**Tabla 2.** Tabla comparativa de los componentes de las PCR a tiempo real. Tabla izquierda: reacción llevada a cabo en el estudio de Pdx1 y el diseño del protocolo de diferenciación; tabla derecha: reacción llevada a cabo en el estudio de la caracterización de células Treg. \* En este último caso, para amplificar el gen endógeno *β-Actina*, se usó 1 µl de un mix de cebadores comerciales (Primerdesign), lo que equivale a 300 nM de concentración final.

- **Diseño de cebadores.** Para el diseño de las secuencias de los cebadores específicos de cada gen se empleó la base de datos como NCBI, BLASTn, referencias bibliográficas y herramientas informáticas como: <http://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>. Los cebadores empleados en cada experimento de amplificación por PCR se muestran en la tabla 3, ordenados por especie, ratón y humano y los utilizados en el estudio de las células T reguladoras.

*Cebadores utilizados en las líneas celulares de ratón*

Gen	Secuencia 5'-- 3'	Tamaño (pb)	Tm (°C)
Pdx1 F	AGCTCCCTTTCCCGTGGATGAAAT	112	60
Pdx1 R	TAGGCAGTACGGGTCCTCTTGTTT		
P300 F	GCATGCGGTCTGTGAACAACATG	191	60
P300 R	AGTACTAGATGGCTGAGCTGCTGT		
Jarid-2 F	AGAAGGATGATGCCTCCCAAGTGT	154	60
Jarid-2 R	ATCTTCACTGGAGTTGTGCTGGGA		
Ezh2 F	TCGTAAGTGCAGTTATTCCTTCCA'	151	60
Ezh2 R	ACGCTCAGCAGTAAG AGCAG		
Dnmt1 F	ATAGCTACCGTTTCTTCGGCAACA	116	60
Dnmt1 R	ACTGGACAGCAGGCAGAGCTTAAT		
Dnmt3a F	CGGAGCCGAGCAGCTGAA	180	60
Dnmt3a R	GCTGGCCACCTGGAGGA		
Dnmt3b F	GCACTGGCAATTGTCACTTTGTCATCA	150	60
Dnmt3b R	AGGGCTCCCAAGTATCAGAGGTTT		
Dnmtl F	TATGCGCTGCCTCGCCAG	205	60
Dnmtl R	GGGGCGCATGCTTGCTC		
Pax4 F	GCAGTGTGAATCAGCTAGGGG	103	60
Pax4 R	CAGGGTTCGCATCCCTCTTATT		
Nkx6.1 F	CTGCACAGTATGGCCGAGATG	135	60
Nkx6.1 R	CCGGGTTATGTGAGCCCAA		
FoxA2 F	TCAACGACTGCTTTCTCAAGGTGC	97	60
FoxA2 R	TTCTCGAACATGTTGCCGAGTCT		
Sox17 F	TTATGGTGTGGGCCAAAGACGAAC	105	60
Sox17 R	TCAACGCCTTCCAAGACTTGCCCTA		
Nkx2.2 F	ATCGCTACAAGATGAAACGTGCC	140	60
Nkx2.2 R	CAGTCGCCCCGACCTGAAATTGTTT		
Hnf1β F	ACAGGGCAGAATGTTTGCAACGAG	150	60
Hnf1β R	TATAGGCATCCATGGCCAGCTTCT		
Glut2 F	GGCCCTTGTCACAGGCATTCTTATT	139	58
Glut2 R	TGGACAGAAGAGCAGTAGCAGACA		
Ptf1a F	CATTAACCTCCTCAGCGAGCTGGT	137	60
Ptf1a R	AGATGATAACCTTCTGGGCCTGGT		
Insulina 1 F	AACCCCGAGCCCTTAGTGACC	124/242	59,5

Insulina 1 R	TTTGGGCTCCCAGAGGGCA		
Glucokinasa F	TGGATGACAGAGCCAGGATGG	208	58,8
Glucokinasa R	ACTTCTGAGCCTTCTGGGGTG		
Kir6.2 F	GGCTCCTAGTGACCTGCACCA	317	61
Kir6.2 R	CCACAGCCACACTGCGCTT		
Glucagón F	TTACTTTGTGGCTGGATTGCTT	148	60
Glucagón R	AGTGGCGTTTGTCTTCATTCA		
Somatostatina F	ACCGGGAACAGGAACTGG	159	60
Somatostatina R	TTGCTGGGTTCGAGTTGGC		
Amylasa 2 F	TTCGAGTGGCGCTGGGTTGATATT	214/546	59,5
Amylasa 2 R	TGTTGCACCTTGTCACCATGTCTCT		
b-Actina F	TCCTGTGGCATCCATGAAACTACA	93	60
b-Actina R	ACCAGACAGCACTGTGTTGGCATA		

*Cebadores utilizados en las líneas celulares humanas*

Gen	Secuencia 5'-- 3'	Tamaño (pb)	T <sub>m</sub> (°C)
PDX1 F	TACTGGATTGGCGTTGTTTGTGGC	133	60
PDX1 R	AGGGAGCCTTCCAATGTGTATGGT		
SOX17 F	TGGACCGCACGGAATTTGAACA	221	60
SOX17 R	TGTGTAACACTGCTTCTGGCCT		
FOXA2 F	TTGCTGGTCGTTTGTGTGGCT	153	60
FOXA2 R	TTCATGTTGCTCACGGAGGAGT		
HNF1β F	TCACAGATAACCAGCAGCATCAGT	74	60
HNF1β R	GGGCATCACCAGGCTTGTA		
NKX6.1 F	CTCCTCCTCGTCCTCGTCGTCGTC	700	59
NKX6.1 R	CTTGACCTGACTCTCTGTCATC		
NKX2.2 F	CGGACAATGACAAGGAGACCCCG	492	59
NKX2.2 R	CGCTCACCAAGTCCACTGCTGCTGG		
INS2 F	TTTGTGAACCAACACCTGTGCGG	210	59
INS2 R	TTGTTCCACAATGCCACGCTTCTG		
GLUT2 F	TTC CGG AAT CAA TGG CAT TT	101	58
GLUT2 R	TGT TTA CAG CGC CAA CTC CA		
GCK F	CCTGGGTGGCACTAACTTCAG	141	60
GCK R	TAGTCGAAGAGCATCTCAGCA		
β-ACTINA F	CGTACCACTGGCATCGTGAT	206	60
β-ACTINA R	TTCTCCTTAATGTCACGCAC		

***Cebadores utilizados en el estudio de las células T reguladoras***

Gen	Secuencia 5'-- 3'	Tamaño (pb)	Tm (°C)
IL-10 F	TGAGAACAGCTGCACCCACT	164	60
IL-10 R	GGCAACCCAGGTAACCCTTA		
TGF- $\beta$ 1 F	GACTACTACGCCAAGGAGGTCA	88	60
TGF- $\beta$ 1 R	TGCTGTGTGTACTCTGCTTGAAC		
FOXP3 F	CACCTGGCTGGGAAAATGG	63	60
FOXP3 R	GGAGCCCTTGTCGGATGAT		

**Tabla 3.** Lista de cebadores empleados en las PCR cualitativas y cuantitativas. F: cebador *Forward*; R: cebador *Reverse*.

### 3.2.2 Western Blot

- **Extracción y cuantificación de proteínas.** El precipitado celular fue resuspendido e incubado con buffer RIPA (Sigma) suplementado con inhibidor de proteasa (Sigma) y un cóctel inhibidor de fosfatasa (Sigma) durante 45 minutos en hielo. A continuación, se sonicaron las muestras en hielo con 4 pulsos de 10 segundos cada uno, al 10% de amplitud, en un sonicador Branson (Branson Digital Sonifier, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA) y se centrifugan a 4 °C y 10000 rpm durante 15 minutos. Tras la centrifugación, se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo y se procede a cuantificar la cantidad de proteína extraída mediante la técnica de Bradford, utilizando una recta de calibrado con BSA como estándar y un lector de placas (Asys UVM-340 Microplate reader V.1.0). Una vez conocida la concentración de proteína, se procede a su desnaturalización mediante la adición de buffer Laemmli 5X (315 mM Tris-HCl pH 6,8, glicerol 50%, SDS 10% y azul de bromofenol 0,01%) y 0,1% de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma) durante 10 minutos a 96 °C.

- **Electroforesis SDS-PAGE.** Para la electroforesis de proteínas se empleó geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) a concentraciones comprendidas entre 7,5 y 12% (Tabla 4) en función del tamaño de la proteína a inmunodetectar. Para P300, JARID-2 y DNMT se empleó geles al 7,5%; para EGR-1 y EZH2 geles al 10% y para PDX1 se empleó geles al 12%. Una vez cargadas las muestras y el patrón de peso molecular, los geles fueron sometidos a un voltaje

constante entre 120 y 150 V durante 1-2 horas. La composición del buffer de electroforesis es 5 mM de Tris-HCl, 50 mM de Glicina y 0,2% de SDS, a pH 8,3.

**Gel de Separación**

Reactivo	7,5 %	10%	12,5%
Acrilamida-Bis Acrilamida	5,6ml	5ml	4,4ml
Agua desionizada	2,5ml	2,5ml	2,5ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,9ml	2,5ml	3,1ml
SDS 10%	100 µl	100 µl	100 µl
Persulfato Amónico (APS) 10%	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

**Gel de Apilamiento**

Reactivo	4%
Acrilamida-Bis Acrilamida	2,90
Agua desionizada	850 µl
Tris-HCl 1 M pH 6,8	330 µl
SDS 10%	33 µl
Persulfato Amónico (APS) 10%	16 µl
TEMED	5 µl

**Tabla 4.** Composición de los geles desnaturizantes para la SDS-PAGE. Las tablas muestran los volúmenes empleados para la elaboración de los geles de separación y apilamiento. Acrilamida-Bis Acrilamida (Ultra Pure AccuGel 29:1; National diagnostics, EC-852), SDS (Sigma, L4390), APS (Sigma, A3678), TEMED (Fluka, 87689).

- **Transferencia.** Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a la transferencia de proteínas a una membrana de PVDF (Amersham, Hybond) mediante el método de transferencia húmeda. En primer lugar, se activan las membranas de PVDF mediante impregnación en metanol durante 10 segundos y a continuación se humedecen durante unos 20 minutos en tampón de transferencia cuya composición es: 0,3% Trizma Base, 1,4% Glicina, 0,03% SDS y 20% de metanol. A continuación, se monta el sistema de transferencia (Trans-Blot Transfer Cell Bio-Rad), mediante la colocación de esponjas, filtros, la membrana de PVDF activa y el gel de acrilamida. La transferencia se realizó a 350 mA, amperaje constante, durante 1-2 horas.

- **Inmunodetección de las membranas.** Una vez finalizada la transferencia se procede al desmontaje del sistema de transferencia y las membranas se bloquean con 5% de

proteínas de leche en polvo desnatada disuelta en PBS durante una 1 hora a TA. A continuación, se incuban las membranas con los anticuerpos primarios de interés en TBS-Tween 0,1% (TBS-T) y 5% de proteínas de leche en polvo desnatada durante toda la noche a 4 °C o 2 horas a TA. Posteriormente, las membranas se lavan 3 veces con TBS-T por 10 minutos y se incuban con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa en TBS-T durante 30 minutos a TA (Tabla 5).

Finalmente, las membranas se lavan 3 veces con TBS-T durante 10 minutos, se incuban 1 minuto a TA con la solución de detección ECL según las instrucciones de la casa comercial (Amersham™) y se revelan en la máquina reveladora (Amersham Biosciences).

Anticuerpos primarios	Dilución	Casa Comercial
anti-Pdx1	1:1000	Abcam, 47267
anti-P300	1:1000	Santa Cruz, sc585
anti-Jarid-2	1:1000	Abcam, 48137
anti-Ezh2	1:500	BD Transduction, 612667
anti-Egr1 588sc	1:1000	Santa Cruz, sc110
anti-Dnmt1	1:1000	Abcam, 13537
anti-Dnmt3a	1:1000	Abcam, 13888
anti-b-Actina	1:10000	Sigma, A5441

Anticuerpos secundarios	Dilución	Casa Comercial
anti-rabbit IgG	1:20000	Sigma, A6154
anti-mouse IgG	1:40000	Jackson ImmunoResearch, 115-035-003

**Tabla 5.** Lista de anticuerpos primarios y secundarios empleados en los Western Blot.

### 3.2.3 Inmunofluorescencia

Para analizar la expresión de Pdx1, las células R1/E ( $15 \times 10^3$  -  $30 \times 10^3$ ) fueron cultivadas sobre cubreobjetos recubiertos con matrigel (1:60) (BD BIOCIENCES, 354277) y mantenidas durante 3 días en presencia y ausencia de LIF y expuestas durante 19 horas a 500  $\mu$ M DETA-NO. Tras los 4 días de cultivo, se fijó las células con 4% de paraformaldehído, a continuación se permeabilizaron con metanol frío durante 5 minutos a -20°C y se bloquearon con 4% de BSA. Seguidamente, las células se incubaron con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C en PBS al 4% BSA. Al día siguiente, las células se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0,1% (TBS-T) y

se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados en TBS-T (Tabla 6). Finalmente, las células se lavaron 3 veces con PBS-T y se tiñeron con DAPI.

Para los estudios de los agregados obtenidos con el protocolo de diferenciación en la línea celular mESC D3, éstos se fijaron con 4% de paraformaldehído en PBS durante toda la noche a 4 °C, se deshidrataron con etanol y xileno, y se incluyeron posteriormente en parafina. El bloque resultante fue cortado en secciones de 5 micras de grosor con un microtono Leica DM6000B. Las secciones fueron desparafinadas mediante una serie de lavados con etanol y xilano, una incubación en PBS durante 5 minutos y autoclavadas en un buffer de citrato 0,01 M para una correcta presentación de los antígenos al anticuerpo. Las secciones fueron bloqueadas con 3% BSA y 2% Tritón X-100 en PBS durante 1 hora a TA e incubados posteriormente con los anticuerpos primarios a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, las células fueron lavadas 3 veces con PBS-T e incubadas con los anticuerpos secundarios (Tabla 6). Finalmente, se lavó las células 3 veces con PBS-T y se tiñeron con DAPI.

Las células humanas fueron marcadas siguiendo el siguiente protocolo. En primer lugar, las células fueron fijadas con 4% de paraformaldehído en PBS, durante 10 minutos a TA. Luego, fueron lavadas 3 veces con PBS durante 3 minutos. Después, las células se permeabilizaron durante 30 minutos con una solución de saponina al 0,01% en PBS a TA y se bloquearon con 5% BSA y 100 mM de glicina en PBS, a pH 7,2 durante 1 hora a TA. A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS y se procedió a la incubación del anticuerpo primario en 1% BSA y 0,01% de saponina en PBS durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se lavó las células 5 veces con 1% BSA y 0,01 de saponina en PBS durante 5 minutos cada vez y se incubaron con el anticuerpo secundario en PBS-Tween al 0,01% durante 30 minutos a TA. Finalmente las células se lavaron 3 veces con PBS y se tiñeron con DAPI.

Las imágenes se obtuvieron mediante un microscopio Leica DM 5500 microscope (Leica Microsystems, Wetzlar Germany) y un microscopio Zeiss Apotome para algunas inmunofluorescencias de las células humanas. El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo mediante Adobe Photoshop.



Anticuerpos primarios	Dilución	Casa comercial
anti-Pdx1	1:100	Abcam, 47267
anti- $\alpha$ -Tubulina	1:300	Sigma, T-6199
anti-Pdx1	1:300	Developmental Studies Hybridoma Bank, F109-D12-c
anti-Péptido-C	1:100	Beta Cell Biology
anti-Glut2	1:100	Chemicon
anti-Nanog	1:300	Cell Signalling, 4903
anti-Oct3/4	1:300	BD Transduction, 611203
anti-FoxA2 (HNF-3 $\beta$ , M-20)	1:300	Santa Cruz Biotechnology sc-6554
anti-Sox17	1:300	Millipore, 09-038

Anticuerpos secundarios	Dilución	Casa comercial
anti-rabbit Alexa Fluor 594	1:300	Invitrogen, A21207
anti-mouse Alexa Fluor 488	1:300	Invitrogen, A11001
Anti-rabbit -TRITC	1:400	Sigma, T-6778

**Tabla 6.** Lista de anticuerpos primarios y secundarios empleados en las inmunofluorescencias.

### 3.2.4 Citometría de flujo

#### - Medida de la expresión de Pdx1

Las células de la línea celular R1/E se despegan mediante incubación con tripsina y se recogen mediante centrifugación. A continuación, se fija las células con paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos a 4 °C, se permeabilizan 5% de Tritón X-100 en PBS durante 10 minutos a 4° C y se bloquean con 5% SFB en PBS a 4 °C durante 30 minutos. Seguidamente, las células se incuban a 4 °C durante 1 hora con el anticuerpo primario o con el anticuerpo control de isotipo. Luego, las células se lavan 2 veces a 4 °C con PBS y se exponen al anticuerpo secundario durante 30 minutos a TA (tabla 7). Finalmente, se lavan 3 veces con PBS y se resuspenden en 500  $\mu$ l de PBS. La lectura de la fluorescencia se realiza mediante el citómetro de flujo (BD FACSCalibur).

Anticuerpo Primario	Dilución	Referencia
anti-Pdx1	1:600	Abcam, 47267

Anticuerpo Control Isotipo	Dilución	Referencia
anti-rabbit IgG Phycoerythrin (PE) goat isotype	1:600	Abcam, 37409

Anticuerpo Secundario	Dilución	Referencia
anti-rabbit IgG-PE	1:500	Abcam, 97070

**Tabla 7.** Lista de anticuerpos empleados en la citometría de flujo para la medida de expresión de Pdx1 en células R1/E.

### **- Análisis de la pureza y activación de Células T Reguladoras procedentes de Sangre Cordón Umbilical y Sangre Periférica Humana**

Para comprobar la pureza y activación de las células de las células T reguladoras se emplea el marcaje de marcadores específicos con anticuerpos conjugados. Para poder utilizar paneles con varios anticuerpos y los espectros de las emisiones de fluorescencia no solapen, es necesario compensar el citómetro de flujo (BD LSRFortessa). Para ello, se añaden 50.000- 200.000 células mononucleares en pocillos de placas de 96 pocillos de base cónica y se añade hasta 200 µl de buffer FACs (5% SFB en PBS). Se añadirán tantos pocillos como fluoróforos queramos analizar, además de un pocillo para ser usado como control sin marcar, otro para marcar con DAPI y otro para marcar con el cóctel de anticuerpos y comprobar la compensación. La placa se centrifuga a 550 g durante 3 minutos a 4 °C. El sobrenadante se tira volcando la placa con un golpe seco. Se añaden los anticuerpos correspondientes a cada pocillo y se incuba durante 10-20 minutos a 4 °C. Tras la incubación se añade 150 µl de buffer FACs para lavar las células, la placa se centrifuga a 550 g durante 3 minutos a 4 °C y se desecha el sobrenadante. Finalmente, se añade a cada pocillo 150 µl de buffer FACs, se resuspende y se traspanan las células a los tubos de citometría, añadiendo otros 150 µl de buffer FACs, lo que hace un volumen total de 300 µl. Para el marcaje con DAPI, las células se resuspenden en agua para que se rompan por ósmosis y el DAPI (5ng/ml) tiña el ADN y pueda ser usado como control positivo de muerte celular. Para el resto de paneles (Tabla 8), el procedimiento de marcaje es el mismo y el DAPI se añade justo antes de leer la fluorescencia en el citómetro de flujo. El marcaje con FOXP3, al ser una proteína nuclear, las células previamente teñidas con el cóctel de anticuerpos del panel Treg, deben ser fijadas y permeabilizadas con un buffer de fijación/permeabilización durante 30 minutos a 4 °C en oscuridad (FoxP3 Staining Buffer Set, eBiosciences, 00-5523-00). Se centrifuga la placa a 550 g, durante 4 minutos a 4 °C y el sobrenadante se elimina. Las células se lavan con 160 µl de buffer de permeabilización en dos pasos de 80 µl,

dos veces consecutivas. Las células se resuspenden en 50  $\mu$ l de buffer de permeabilización conteniendo 1:80 del anticuerpo anti-FoxP3 y la placa se incuba 30 minutos a 4 °C en oscuridad. Tras la incubación, la placa se centrifuga a 550 g, durante 4 minutos a 4 °C, se elimina el sobrenadante y las células se lavan dos veces de nuevo con 160  $\mu$ l de buffer de permeabilización. Para la lectura de la fluorescencia, las células se resuspenden en 150  $\mu$ l de buffer FACs y transfieren a un tubo de citometría, añadiendo 150  $\mu$ l de buffer FACs para hacer un volumen total de 300  $\mu$ l. El análisis de datos fue realizado con FlowJo Software (Treestar Inc., USA).

#### COMPENSACIÓN (Treg, ACTIVACIÓN)

Anticuerpo Primario	Dilución	Referencia
CD45-AF700	1/100	BD Pharmingen, 560566
CD45-APC	1/100	BD Pharmingen, 555485
CD3-PerCP	1/10	BD Pharmingen, 345766
CD4-FITC	1/100	Immunotools, 21270043
CD8-PE	1/10	BD Pharmingen, 555367

#### PANEL CÉLULAS TREG

Anticuerpo Primario	Dilución	Referencia
CD45-AF700	1/100	BD Pharmingen, 560566
CD4-FITC	1/100	Immunotools, 21270043
CD25-APC	1/25	BD Pharmingen, 555434
CD127-PE	1/100	BD Pharmingen, 557938

#### PANEL ACTIVACIÓN

Anticuerpo Primario	Dilución	Referencia
CD45-AF700	1/100	BD Pharmingen, 560566
CD4-APC	1/100	BD Pharmingen, 555349
CD69-PerCP	1/50	BD Pharmingen, 340548
GITR-FITC	1/25	R&D Systems, FAB689F
LAP-PE	1/10	R&D Systems, FAB2463P

#### COMPENSACIÓN (FOXP3)

Anticuerpo Primario	Dilución	Referencia
CD45-AF700	1/100	BD Pharmingen, 560566
CD45-APC	1/100	BD Pharmingen, 555485
CD45-PerCPCy5.5	1/50	BD Pharmingen, 552724
CD4-FITC	1/100	Immunotools, 21270043
CD8-PE	1/10	BD Pharmingen, 555367

**PANEL FOXP3**

Anticuerpo Primario	Dilución	Referencia
CD45-AF700	1/100	BD Pharmingen, 560566
CD4-FITC	1/100	Immunotools, 21270043
CD25-APC	1/25	BD Pharmingen, 555434
CD127-PE	1/100	BD Pharmingen, 557938
FOXP3-PerCPCy5.5	1/80	eBioscience, 45-4776-73

**Tabla 8.** Listado de anticuerpos primarios conjugados usados para compensar el citómetro, analizar la pureza de las células T reguladoras, estudiar la expresión de marcadores de activación y el factor de transcripción FoxP3.

**3.2.5 Secuenciación por PCR dependiente de bisulfito (BSP)**

Una región de aproximadamente 7000 pb del promotor de Pdx1 y la región codificante fueron analizadas con el software Methylprimers Express v1.0. (Applied Biosystems) para identificar las islas CpG y, a continuación, se diseñaron cebadores con este mismo software específicos de las regiones de interés (Tabla 9).

Región promotora de Pdx1	Secuencia 5'-- 3'	Tm (° C)
CpG Distal F	GGTAGATTATTTGTGAGGGTTAAT	59,6
CpG Distal R	ATACTTTCCCTCTTAAAATCACC	
CpG Proximal 1 F	GGAGAGTAGTGGAGAATTGTAA	58
CpG proximal 1 R	ACTAACRACCCATATACAAACA	
CpG Proximal 2 F	GGGGTTGTT GGT TTT TAA GT	61
CpG Proximal 2R	TTACCTACCCACTAACCTTCC	
Sitio unión Egr1 F	TCCAGTG TCCTTGAGGACCAGGTC	56,5
Sitio unión Egr1 R	AACTCAAACACACTCCCAAATATAC	

**Tabla 9.** Lista de cebadores usado en la secuenciación dependiente de bisulfito para analizar el grado de metilación del promotor de Pdx1. F: cebador Forward; R: cebador Reverse.

El protocolo seguido para el desarrollo del BSP se resume brevemente a continuación. En primer lugar, el ADN genómico de  $7,5 \times 10^4$  células fue tratado con bisulfito de sodio, utilizando el kit Cells-to-CpG™ Bisulfito Conversión Kit (Applied Biosystems). El ADN tratado con bisulfito fue amplificado utilizando la enzima MyTaq™ HS Red DNA Polymerase, los productos de PCR obtenidos se purificaron utilizando QIAquick® PCR Purification Kit y se clonaron en el vector pGEM-T, empleando un ratio inserto: vector, 3:1, para finalmente ser transformados en E.Coli

Dh5 $\alpha$ . Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas de LB, ampicilina, IPTG y X-gal. Se analizaron 10 – 15 colonias blancas mediante PCR de la región del vector que contiene el inserto y el producto de PCR se secuenció en un equipo DNA analyzer 3730 (Applied Biosystems). Los resultados obtenidos de la secuenciación se analizaron con el software BiQ Analyzer. Como control de la técnica se metiló la región proximal del promotor de *Pdx1 in vitro* con la enzima CpG Methyltransferase (M.SssI) (NEB, M0226S) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

### 3.2.6 Pirosecuenciación de bisulfito

Los experimentos de pirosecuenciación de bisulfito se realizaron en el laboratorio del Dr. Mario Fraga en el Departamento de Epigenética del Instituto de Oncología del Principado de Asturias, Oviedo.

El ADN genómico de  $7,5 \times 10^4$  células R1/E cultivadas en presencia y ausencia de LIF y expuestas a 500  $\mu$ M de DETA-NO; y ADN de la línea celular INS1-E se trató con bisulfito de la misma forma que en el ensayo BSP, y se envió al laboratorio del Dr. Mario Fraga. Una vez allí, se realizaron las reacciones de PCR y la secuenciación, usando los cebadores diseñados con el software PyroMark, versión 2.0.01.15. El listado de primer puede en la siguiente tabla (Tabla 10). Estos cebadores fueron diseñados para hibridar con regiones del ADN libres de CpG para asegurar la amplificación independientemente de la metilación. La PCR fue desarrollada con cebadores biotinilados para convertir el producto de PCR en moldes de ADN de cadena sencilla, usando Vacuum Prep Tool (Biotage, Sweden), según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de pirosecuenciación y la cuantificación de la metilación se llevó a cabo mediante PyroMark Q24 System versión 2.0.6 (Qiagen).

Región promotora de <i>Pdx1</i>	Secuencia 5' -- 3'	Escala de síntesis	Purificación
Distal1-F2	TTTAAGGGGGTGATTAGGTGAAG	0,025	DESALT
Bio _distal1-R2	[Btm]ATATTAACCCTCACAAATAATCTACCT	0,05	HPLC
Distal1-Seq	AGGAAGGTTTTTATTTTTGTTTTAA	0,025	DESALT
Distal2-F2	AGGTAGATTATTTGTGAGGGTTAATAT	0,025	DESALT
Bio _distal2-R2	[Btm]ATTTCTTCAAAAAAAAAAACCACCTATAACC	0,05	HPLC
Distal2-Seq	ATTATTTGTGAGGGTTAATATT	0,025	DESALT
Egr1-F2	TGATAGATGGAGGTTAGGTATAGA	0,025	DESALT

Bio_egr1-R2	[Btn]AACTCAAAACACACTCCCAAATA	0,05	HPLC
Egr1-Seq	TGTTTTAATAATATGAAAAATGGG	0,025	DESALT
Proximal1-F2	TGGGGTGTTTTAGAGTTTATGGTA	0,025	DESALT
Bio-_proximal1-R2	[Btn]ATACTACTCCTCACTATTCATAATAAC	0,05	HPLC
Proximal1-Seq	GGAGAGTAGTGGAGAA	0,025	DESALT
Proximal2-F2	GTTGTTATTATGAATAGTGAGGAGTAGTA	0,025	DESALT
Bio-_proximal2-R2	[Btn]AAAAACTTCCCTACTCCAATAATC	0,05	HPLC
Proximal2-Seq	AATAGTGAGGAGTAGTATT	0,025	DESALT

**Tabla 10.** Listado de cebadores empleados en la pirosecuenciación. F: cebador Forward; R: cebador Reverse; Btn: biotina; Seq: empleado para la reacción de secuenciación.

### 3.2.7 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Una vez que las células son recogidas del cultivo, el sedimento celular se trata con 1% formaldehído (w/v) en PBS durante 10 minutos a TA para fijar la unión ADN-proteínas. A continuación, se añade glicina 125 mM para detener la reacción.  $3 \times 10^6$  células se resuspenden en tampón de rotura (10 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH8, 3 mM  $Cl_2Mg$  y 0,5 mM DTT) suplementado con inhibidores de proteasas (Sigma) durante 10 minutos en hielo y se centrifugan durante 5 minutos a 3000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se descarta y la fracción que contiene los núcleos celulares se lava cuidadosamente mediante inversión en un tampón de lavado que contiene 10 mM Tris HCl pH 8, 15 mM NaCl y 60 mM KCl. Los núcleos celulares se centrifugan durante 5 minutos a 3000 rpm a 4 °C y se incuban con un tampón de digestión, similar al tampón de lavado pero suplementado con 3mM  $Cl_2Ca$ , inhibidores de proteasas, 0,5 mM DTT y 5-10  $\mu$ l Micrococcal Nuclease diluida 1:200 en tampón de digestión (New England BioLabs, M0247S) durante 20 minutos a 37 °C en agitación orbital. La actividad de las nucleasas se detiene mediante la adición de 20  $\mu$ l de 0,5 mM EDTA. Después de centrifugar, los núcleos celulares se rompen con un tampón de rotura compuesto por 150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,5% NP-40, 1% Tritón, y 0,01% SDS y son sonicados con 3 pulsos de 10 segundos al 10% de amplitud en un sonicador Branson. Los extractos nucleares se centrifugan durante 10 minutos a 10000 rpm a 4 °C. La cromatina digerida en fragmentos de tamaños comprendidos entre 200 y 500 pb es inmunoprecipitada con 1-4  $\mu$ g de anticuerpo que reconocen la proteína de interés y anticuerpos como control de uniones inespecíficas (Tabla 11).

Anticuerpo Primario	Referencia
anti-P300 (c-20)	Santa Cruz Biotechnology, sc585
anti-Jarid2	Abcam, 48137
anti-H3 Acetilada	Abcam, 47915
anti-H3K4me3	Abcam, 1012
anti-H3K27me3	Abcam, 6147
anti-Egr1 (588)	Santa Cruz Biotechnology, sc110
anti-Egr1	Bethyl, A303-390A-T

Anticuerpo Control	Referencia
Rabbit Control IgG	Abcam, 46540
Mouse IgG1 Isotype Control mAb	Cell Signalling, 5415

**Tabla 11.** Listado de anticuerpos empleados en la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

15  $\mu$ L de partículas magnéticas, Dynabeads® (Invitrogen, Dynal AS, Oslo, Norway) se empleó para preparar los complejos de anticuerpo-partículas magnéticas mediante incubación de 30 minutos a 4 °C en rotación en un tampón que contiene: 0,01% SDS, 1,1% Tritón X-100, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris HCl pH 8,1, 167 mM NaCl). A continuación, la cromatina se añade a este complejo y se incuba durante 1 hora a 4 °C. Para eliminar las uniones inespecíficas se realizan lavados consecutivos empleando los siguientes tampones: tampón de baja concentración salina (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris HCl pH8,1, 150 mM NaCl), tampón de alta concentración salina (0,1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris HCl pH 8,1, 500 mM NaCl), tampón de LiCl (0,25 M LiCl, 1% NP40 (Igepal), 1% desoxicolato, 1 mM EDTA, 10 mM Tris HCl pH 8) y dos lavados con un tampón TE (10 mM Tris HCl pH y 8,1 mM EDTA). Finalmente, la cromatina se eluye con 500  $\mu$ l de una solución compuesta por 1% SDS y 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>. El DNA se purifica por un procedimiento de fenol: cloroformo y los análisis de ChIP se desarrollan por PCR a tiempo real o PCR cualitativa. La ocupación de las proteínas en el promotor de *Pdx1* fue analizada mediante el método “*Percent Input*” relativizado a la condición de pluripotencia. Los cebadores utilizados para la amplificar la región promotora de *Pdx1* se muestran en la siguiente tabla (tabla 12).

Zona Promotora de Pdx1	Secuencia 5'--> 3'	Tamaño (pb)	Tm (°C)
Pdx1 Proximal F	TGGCGTAGAGAGTCCGCGAGCCACC	179	60
Pdx1 Proximal R	CGC TGA ACT CTG GCA CCG GG		
Egr1 sitio de unión F	AGGCACAGACATCCTCAATATGCAGC	215	60
Egr1 sitio de unión R	TTGAGCAGTTGGGCAAGGGG		
Pdx1 Distal F	TCGCTCATAACCGTGTCCACCAAGT	189	60
Pdx1 Distal R	GCCTGCCTCAATGAGTCCATTGTT		

**Tabla 12.** Listado de cebadores empleados para amplificar el ADN por PCR inmunoprecipitado en la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). F: cebador Forward; R: cebador Reverse.

### 3.2.8 Coimmunoprecipitación

Las células se tripsinizan, centrifugan y lavan una vez con PBS frío. El precipitado celular se resuspende e incuba en un tampón de rotura no desnaturizante compuesto por 50 mM Tris HCl, pH 7,4, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1 mM neocuproina y 1% Tritón X-100, suplementado con un cóctel inhibidor de proteasas (Sigma) durante 45 minutos en hielo y sonificado con 4 pulsos de 10 segundos y 10% de amplitud. Después, la muestra se centrifuga y el sobrenadante se recoge. La cuantificación de proteínas se realiza por la técnica de Bradford mediante la medición de la absorbancia a 595 nm. A continuación, 3 mg de proteínas se incuban durante 2 horas con 3 µg del anticuerpo anti-Jarid-2 en rotación a 4 °C. Posteriormente, 70µl de *Dynabeads protein A* (Life Technologies, Paisley, Scotland) se añaden al complejo anticuerpo-proteína y se deja incubando durante toda la noche a 4 °C en rotación suave. Al día siguiente, las muestras se lavan 3 veces con tampón de rotura no desnaturizante durante 5 minutos en agitación a 4 °C y se someten a un último lavado con 200 µl de Tris 50 mM pH 8. Las proteínas finalmente se desnaturizan con 50 µl de tampón Laemmli 5X suplementado con β-mercaptoetanol, se separan mediante electroforesis en un gel de gradiente SDS-PAGE (Mini-Protean TGX Gels, 4-15 % acrylamide, Bio Rad, California, USA) y se transfieren a una membrana de PVDF. La membrana se bloquea con 5% de leche desnatada en polvo en TBS-Tween al 0,1% (TBS-T) durante 1 hora a TA y se incuba con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C. A la mañana siguiente, la membrana se lava 3 veces con TBS y se incuba con los anticuerpos secundarios (Tabla 13). Finalmente, la membrana se lava 3 veces con TBS-T, se incuba 1 minuto a TA con la solución de detección ECL (Amersham™) y se revela en la



máquina reveladora (Amersham Biosciences). Como control de carga se empleó 100 µg de proteína total.

Anticuerpos primarios	Dilución	Casa Comercial
anti-Jarid-2	1:1000	Abcam, 48137
anti-Ezh2	1:500	BD Transduction, 612667
anti-P300	1:500	Santa Cruz, sc585

Anticuerpos secundarios	Dilución	Casa Comercial
anti-rabbit IgG	1:20000	Sigma, A6154
anti-mouse IgG	1:40000	Jackson ImmunoResearch, 115-035-003

**Tabla 13.** Anticuerpos primarios y secundarios empleados en la inmunoprecipitación.

### 3.2.9 Transfección con pCGEgr1-HA y shEgr1

Para realizar estudios de pérdida de función de Egr-1 se procedió a la transfección en el segundo día de cultivo de las células embrionarias R1/E con 2 µg de una mezcla de cinco plásmidos que codifican una pequeña secuencia de Egr-1 en forma de horquilla (“*shRNA*”) (Sigma). Las células transfectadas se seleccionaron con 1,2 µg/ml de puromicina. Para el estudio de ganancia de función se transfectaron las células al segundo día de cultivo con 2,5 µg de un vector pCG-Egr1-HA, cedido por el Dr. *S. Taketani*, que sobreexpresa la secuencia codificante de Egr-1. Este vector no codifica ningún gen de resistencia, por lo que se realizaron transfecciones temporales. Para estos ensayos se utilizó “FuGENE HD Transfection”. Para los ensayos con NO, al tercer día de cultivo se añadió DETA-NO a 500 µM, durante 19 horas y se recogieron las células. La expresión de *Egr-1* fue analizada para comprobar la eficacia de la transfección y se analizó la expresión de *Pdx1* para comprobar los efectos producidos sobre la expresión de este gen por PCR a tiempo real, usando los cebadores mencionados anteriormente (tabla 3), y a las mismas condiciones de PCR. Como control de carga se utilizó la amplificación del gen *β-actina*.

### 3.3 Estudios Funcionales

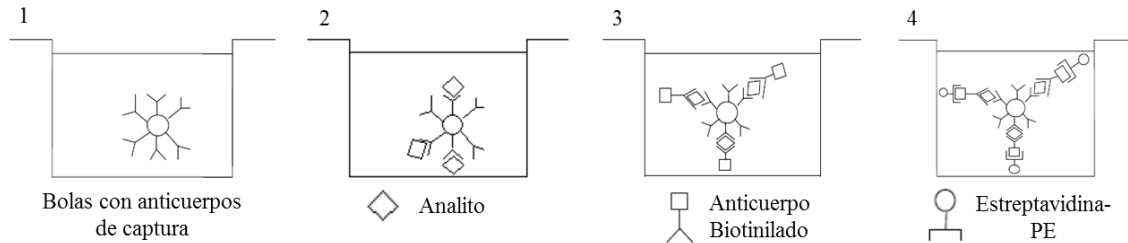
#### 3.3.1 Secreción de insulina estimulada por glucosa

Los agregados celulares obtenidos tras el protocolo de diferenciación fueron lavados 2 veces con el tampón Krebs (135 mM NaCl, 3,6 mM KCl, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10,5 mM MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O, 0,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10m M Hepes y 0,1% BSA) mediante inversión en un tubo y dejándolos decantar durante 10 minutos. A continuación fueron incubados durante 1 hora con el tampón Krebs suplementado con 3 mM de glucosa, a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> y el sobrenadante fue recogido. A continuación, los agregados celulares fueron divididos en dos tubos: uno fue incubado con tampón Krebs suplementado con 20 mM de glucosa y otro con tampón Krebs suplementado con 3 mM de glucosa y 25 mM de KCl (como control de liberación de glucosa por despolarización de la membrana) durante 1 hora a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> y el sobrenadante fue recogido. Finalmente, los sobrenadantes se procesaron usando el kit de medición de insulina “*Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA*” (Merckodia) y el ADN de los agregados celulares fue extraído y cuantificado en un espectrofotómetro (Nanodrop ND1000) para relativizar la liberación de glucosa a la cantidad de ADN.

#### 3.3.2 Liberación de citocinas por las células T reguladoras

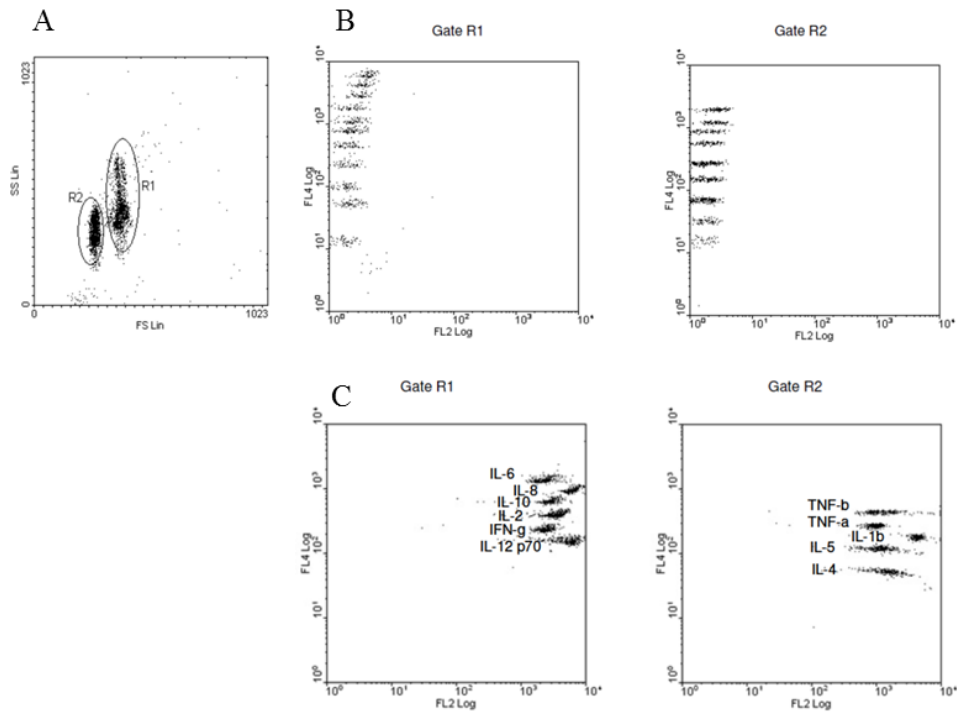
Los sobrenadantes de las células Treg de sangre periférica de adulto y de cordón umbilical, seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit* y la tecnología *Streptamer* que fueron guardados a -20 °C tras el cultivo celular a día 2 y a día 5, y fueron empleados en un inmunoensayo de detección de citocinas, FlowCytomix™ Multiple Analyte Detection System Th1/Th2 11plex Ready-to-Use (eBioscience, BMS810FFRTU). Mediante este kit, las citocinas IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), TNF-α, TNF-β e IFN-γ pueden ser detectadas y cuantificadas en los sobrenadantes. Este ensayo está basado en partículas esféricas fluorescentes unidas a anticuerpos específicos que reaccionan con los analitos a detectar con el mismo principio que un ELISA, en una placa de 96 pocillos. Las partículas esféricas presentan dos tamaños distintos (tamaño A: 5.5 μm y tamaño B: 4.4 μm) y están internamente marcadas con diferentes intensidades de un marcador fluorescente, por lo que pueden ser diferenciadas por su tamaño y espectro. Brevemente el protocolo a seguir es, en primer lugar, se incuba la mezcla de partículas esféricas unidas a los anticuerpos de interés con las muestras y con

un estándar. A continuación, se añade una mezcla de anticuerpos específicos contra los mismos analitos y conjugados con biotina. Finalmente, se añade estreptavidina conjugada con ficoeritrina, que se unirá a la biotina de los anticuerpos conjugados emitiendo una señal fluorescente (Imagen 21).



**Figura 21. Esquema del protocolo seguido en el inmunoensayo FlowCytomix™ Multiple Analyte Detection System Th1/Th2 11plex Ready-to-Use.**

Finalmente, estos complejos se resuspenden y se colocan en tubos de citómetro para medir la fluorescencia emitida. El análisis de las muestras se hizo al día siguiente de la realización del ensayo mediante el citómetro de flujo FACSCalibur™. El primer paso es calibrar el citómetro con partículas esféricas de calibración (CaliBRITE beads, BD), para evitar el solapamiento entre los espectros de los distintos fluorocromos. Para la lectura de la fluorescencia se pasa por el citómetro la mezcla de partículas esféricas solas, que será el cero de nuestro estándar. De esta forma delimitamos las dos poblaciones de partículas esféricas, las grandes R1 y las pequeñas R2 (Figura 22A) y situamos la fluorescencia en la parte izquierda del eje X, indicando que esto se corresponderá a concentración cero de nuestros analitos (Figura 22B). Posteriormente, pasamos una muestra, a la cual añadimos la concentración máxima de nuestro estándar, por lo que debe ser colocada a la derecha del gráfico (Figura 22C), para indicar que esta será la concentración máxima que podremos detectar en nuestros sobrenadantes. La fluorescencia de cada analito debe aparecer como una línea horizontal, sin solapamiento entre ellas. Esta horizontalidad puede ser manipulada mediante la compensación manual del citómetro. Finalmente, se pasa el estándar (por duplicado) y las muestras.



**Figura 22. Ilustración que hace referencia a los gráficos que debemos ver para poner a punto el citómetro de flujo antes de correr las muestras. A) Poblaciones de bolas fluorescentes tamaño R2: 5.5  $\mu\text{m}$  y R1: 4.4  $\mu\text{m}$ ; B) *Gate* sobre R1 y R2, a concentración cero del estándar; y C) *Gate* sobre R1 y R2, a concentración máxima del estándar.**

### 3.4 Análisis Estadístico

Los datos representados en histogramas o gráfico de cajas o puntos fueron analizados estadísticamente usando el análisis de variación *t-Student*. Los datos se han expresado como la media aritmética  $\pm$  la desviación estándar (SD) o error estándar de la media (SEM), indicándose en cada caso.

## ***4. Resultados***



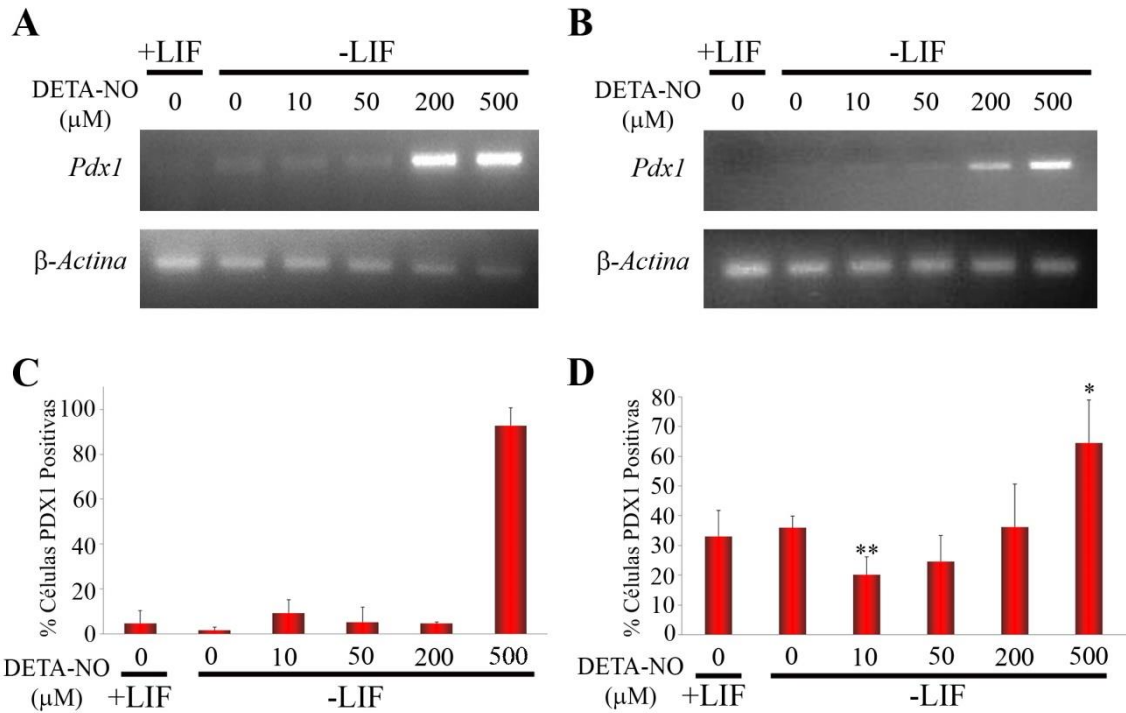
## **Bloque 1**

### **4.1 Estudio de la Regulación de la Expresión de *Pdx1* por Altas Concentraciones de Óxido Nítrico**

*El primer bloque de la tesis tiene como objetivo elucidar los mecanismos que regulan la expresión de *Pdx1* en células madre embrionarias de ratón. Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que el donador de óxido nítrico DETA-NO, empleado a altas concentraciones, incrementa significativamente la expresión de este factor de transcripción. Por ello, decidimos utilizar el DETA-NO como herramienta para inducir la expresión de *Pdx1* e indagar qué mecanismos controlan su expresión. Los resultados de este bloque muestran la cuantificación del incremento de *Pdx1* tras la exposición a DETA-NO, y estudios epigenéticos y de unión de proteínas a su promotor. El resultado del estudio epigenético del promotor de *Pdx1* muestra cambios en el patrón de metilación, posiblemente asociado a un cambio en la expresión de las metilasas de ADN, y cambios en la modificaciones postraduccionales de las histonas, con una ligera disminución de la ocupación de H3K27me3 e incremento de H3K4me3, no encontrándose cambios significativos en la ocupación de H3 acetilada. El estudio de las proteínas y complejos asociados al promotor de *Pdx1* revela el papel represor del Complejo Polycomb Represor 2 (PRC2), la histona acetiltransferasa P300 y el factor de transcripción *EGR-1* sobre la expresión de *Pdx1*.*

#### **4.1.1 Altas dosis de Óxido Nítrico inducen la expresión de *Pdx1***

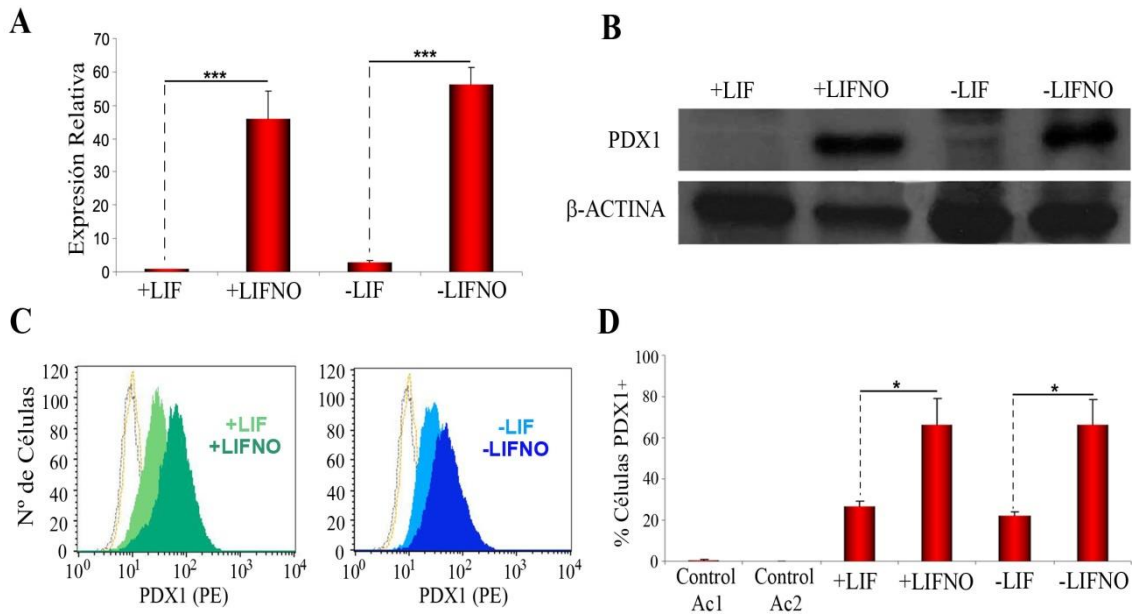
El primer paso fue determinar la expresión de *Pdx1* tras la exposición de células madre embrionarias (CME) de ratón (R1/E y D3) a diferentes dosis de DETA-NO con objeto de determinar la concentración óptima necesaria para incrementar la expresión de este gen. El resultado de estos experimentos mostró que las concentraciones 200 y 500  $\mu\text{M}$  de DETA-NO incrementaron considerablemente la expresión de *Pdx1* a nivel de ARNm (Figura 23A y B), pero solo a 500  $\mu\text{M}$  la expresión de la proteína se vio incrementada (Figura 23C y D). Por la cantidad de células que se recogen tras el tratamiento o mediante visión al microscopio, se puede comprobar que altas concentraciones de DETA-NO inducen muerte celular, por lo que dosis mayores de 500  $\mu\text{M}$  no fueron utilizadas en este ensayo.



**Figura 23. El incremento de expresión de *Pdx1* por DETA-NO es dependiente de dosis.** Las células de la línea celular R1/E y D3 se crecieron en medio de cultivo en ausencia de LIF y fueron tratadas con distintas dosis del donador de óxido nítrico DETA-NO (0, 10, 50, 200 y 500 μM) durante 19 horas. Como control negativo, las células se mantuvieron en estado indiferenciado mediante su cultivo en medio suplementado con LIF. **A)** y **B)** Expresión de *Pdx1* por PCR cualitativa, en células R1/E y D3, respectivamente. Como control de carga se empleó la amplificación del gen *β-Actina*. Estas imágenes son representativas de 3 experimentos independientes. **C)** y **D)** Las gráfica de barras representan el porcentaje de células positivas para PDX1, analizadas mediante citometría de flujo, para células R1/E y D3, respectivamente. Esta gráfica representa la media ± SD de 2 y 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , estadísticamente significativo comparado a la condición control (-LIF).

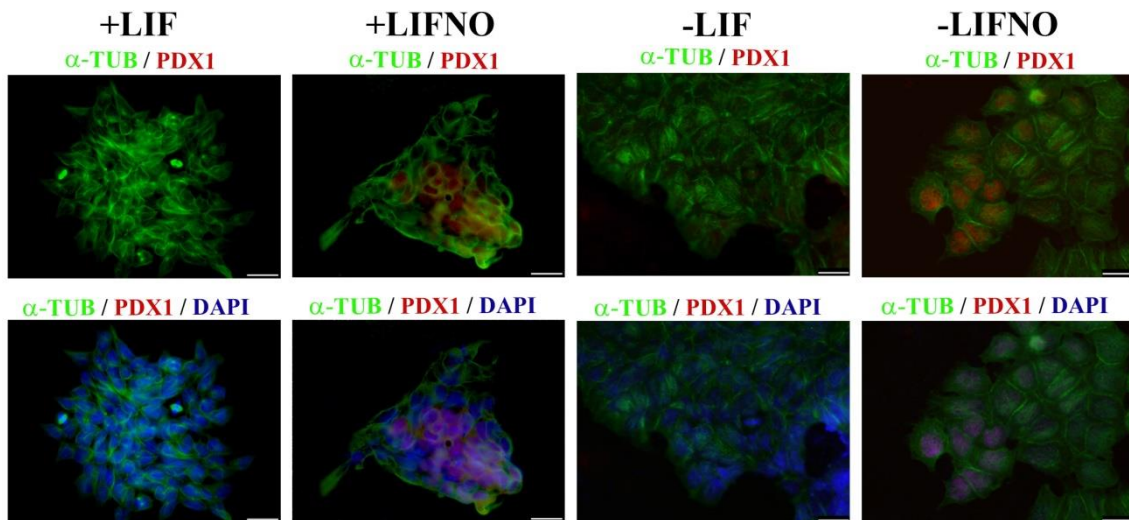
Una vez establecido que 500 μM es la concentración que provoca mayor nivel de expresión de *Pdx1*, procedimos a cuantificar esta expresión, tanto a nivel de ARN mensajero como de proteínas, en células R1/E. Estos experimentos muestran que el tratamiento de 19 horas con 500 μM de DETA-NO incrementa significativamente la expresión de *Pdx1* (Figura 24A y B). La cuantificación de la expresión por citometría de flujo permitió comprobar que el NO induce un aumento de expresión de *Pdx1* por cada célula analizada (Figura 24C) e incrementa el número de células positivas para *Pdx1* (Figura 24D) en células R1/E.





**Figura 24. Altas dosis DETA-NO induce un incremento significativo de expresión de *Pdx1* a nivel de ARN mensajero y proteína.** Las células de la línea celular R1/E se crecieron en medio de cultivo en presencia y ausencia de LIF y fueron tratadas con 500  $\mu$ M de DETA-NO durante 19 horas. **A)** Análisis de la expresión de *Pdx1* por PCR cuantitativa. La gráfica muestra la media de la expresión relativa de 5 experimentos independientes  $\pm$  SEM. La expresión relativa fue calculada con el algoritmo  $\Delta\Delta C_t$ , tomando como control endógeno la expresión del gen  $\beta$ -Actina y como muestra calibradora la expresión de *Pdx1* en la condición +LIF. **B)** Análisis de la expresión de Pdx1 por Western Blot. La expresión de la proteína  $\beta$ -Actina fue utilizada como control de carga. **C)** Análisis mediante citometría de flujo. El histograma representa la intensidad de fluorescencia de la expresión de Pdx1 respecto al número de células. Imagen representativa de 3 experimentos independientes. **D)** La gráfica de barras representa el porcentaje de células positivas para Pdx1, analizadas mediante citometría de flujo. Como control negativo se empleó el marcaje de las células con el anticuerpo control de isotipo (Control Ac1) y con el anticuerpo secundario (Control Ac2). Esta gráfica representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

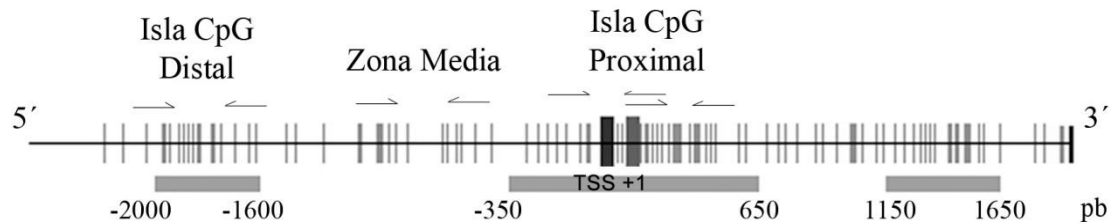
Finalmente, para comprobar la localización de la proteína a nivel celular realizamos una inmunofluorescencia de PDX1 (Figura 25), demostrando que el tratamiento con DETA-NO induce la expresión de la proteína con localización nuclear.



**Figura 25.** El tratamiento con DETA-NO induce la expresión de *Pdx1* con localización nuclear. Las imágenes muestran las células de la línea celular R1/E cultivadas durante 3 días en presencia y ausencia de LIF y/o tratadas con 500 $\mu$ M de DETA-NO durante 19 horas. Las células fueron marcadas con DAPI (azul), PDX1 (rojo) y  $\alpha$ -TUBULINA (verde). Barra de escala: 25 $\mu$ M. Las imágenes mostradas son representativas de 3 experimentos independientes.

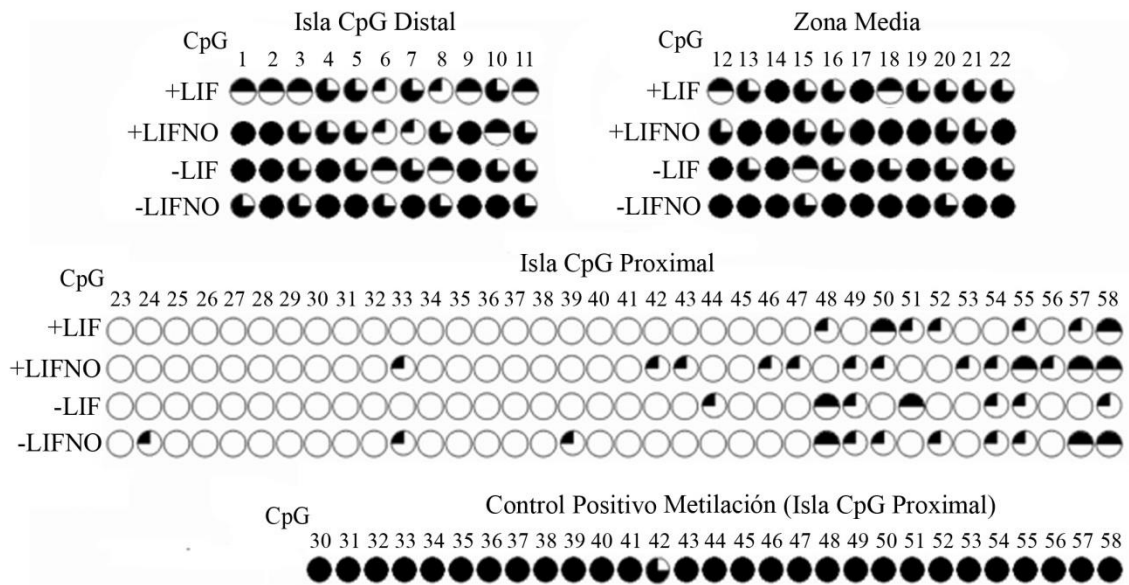
#### 4.1.2 El patrón de metilación del promotor de *Pdx1* se ve alterado tras el tratamiento con DETA-NO

Para estudiar qué mecanismos regulan la expresión *Pdx1*, estudiamos en primer lugar la metilación de su promotor. Para ello, recurrimos al software *Methyl Primer Express* (Applied Biosystems), que identifica las islas de metilación de una secuencia de interés, simula la modificación por bisulfito de las secuencias de ADN que contienen sitios CpG y diseña y recomienda parejas de cebadores para el análisis de Secuenciación por PCR dependiente de Bisulfito (BSP). Los parámetros para la búsqueda de islas de metilación vienen establecidos por el software, pero pueden ser modificadas. En nuestro caso, los parámetros establecidos para la búsqueda de las islas CpG fueron los siguientes: Longitud mínima de la isla: 150 pb; Longitud máxima de la isla: 3000 pb; Contenido en C+G respecto al número total de bases >50%; y Número de CpGs observados frente a los esperados >0,6. De esta manera, analizamos unas 7000 pb del promotor y región codificante del gen *Pdx1* e identificamos la presencia de 3 islas de metilación nombradas y enumeradas en función a su proximidad al inicio de la traducción (Figura 26).



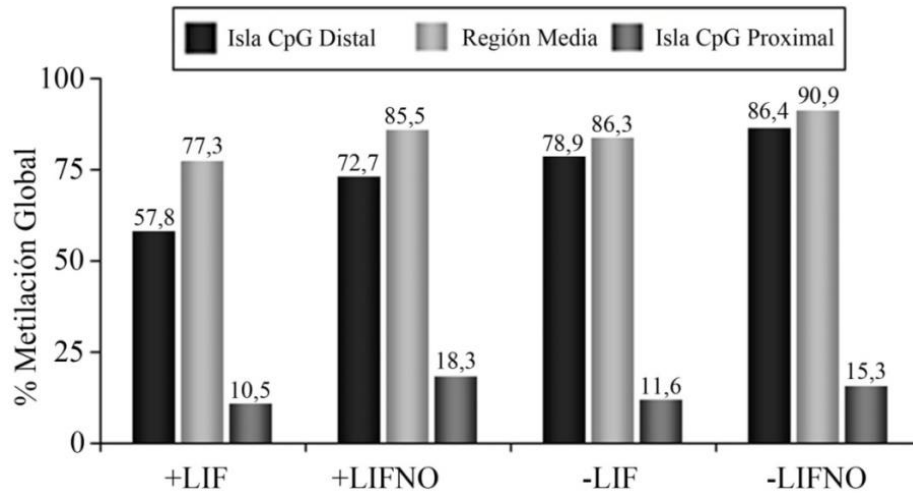
**Figura 26. Esquema del promotor de *Pdx1*, islas CpG encontradas y cebadores diseñados con el software *Methyl Primer Express*.** Esta imagen representa el promotor y la secuencia codificante del gen *Pdx1*. Los rectángulos grises horizontales representan las islas CpG y las líneas verticales los sitios CpG. Se observan 3 islas de metilación, nombradas según su cercanía al inicio de la traducción: Isla CpG Distal (-2000, -1600 pb); Isla CpG proximal (-350, 650 pb), y una isla CpG dentro de la secuencia codificante del gen (1150, 1650 pb). Además, identificamos una zona intermedia entre las islas CpG distal y proximal, rica en sitios CpG (zona media). Los rectángulos verticales representan el inicio de la transcripción (TSS) y el inicio de la traducción (+1). Las flechas representan las parejas de cebadores diseñadas para la amplificación de las regiones de interés para el estudio de Secuenciación por PCR dependiente de Bisulfito (BSP).

El estudio de BSP se llevó a cabo en las islas CpG proximal y distal, ya que según la bibliografía estas regiones tienen un rol importante en la regulación del gen *Pdx1*, no estudiándose de esta manera la metilación de la isla CpG encontrada dentro de la secuencia codificante del gen. Además, decidimos estudiar la región media, localizada entre las islas CpG distal y proximal, ya que presenta un alto contenido en sitios CpG, aunque sin llegar a considerarse una isla de metilación. Lo más llamativo de los resultados obtenidos por BSP fue la diferencia en el grado de metilación de las regiones estudiadas, presentando la isla CpG distal y la región media un alto nivel de metilación en todas las condiciones de cultivo, mientras que la isla CpG proximal se encontró prácticamente desmetilada en su totalidad. Por otro lado, los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con DETA-NO induce cambios de metilación en determinados sitios CpG del promotor de *Pdx1*. Por ejemplo, en el caso de la isla CpG distal, el NO incrementó el nivel de metilación de los sitios CpG 8 y 10 en condiciones de cultivo celular tanto presencia como en ausencia de LIF. Esto mismo sucedió en los sitios CpG 13, 18 y 22 de la zona intermedia, y los sitios CpG 33 y 57 de la isla CpG proximal. El único sitio CpG de los estudiados que disminuyó su nivel de metilación tras el tratamiento con NO, siendo este resultado reproducible tanto presencia como en ausencia de LIF, fue el sitio CpG 51 (Figura 27).



**Figura 27. Análisis de metilación del promotor de *Pdx1* por Secuenciación por PCR dependiente de Bisulfito (BSP).** Esta figura muestra los sitios CpG estudiados por BSP de las islas CpG distal y proximal y la región media entre ellas (zona media) en células de la línea celular R1/E cultivadas en presencia y ausencia de LIF y/o tratadas con 500  $\mu$ M de DETA-NO durante 19 horas. Estos sitios CpG son representados mediante círculos: círculos blancos: 0-20% de metilación; un cuarto de círculo en negro: 20-40% metilación; mitad de círculo blanco y mitad negro: 40-60% metilación; tres cuartos del círculo en negro: 60-80% metilación; círculo negro: 80-100% metilación. Como control de la técnica, se metiló *in vitro* la isla proximal con la enzima *CpG Methyltransferase* (M.SssI).

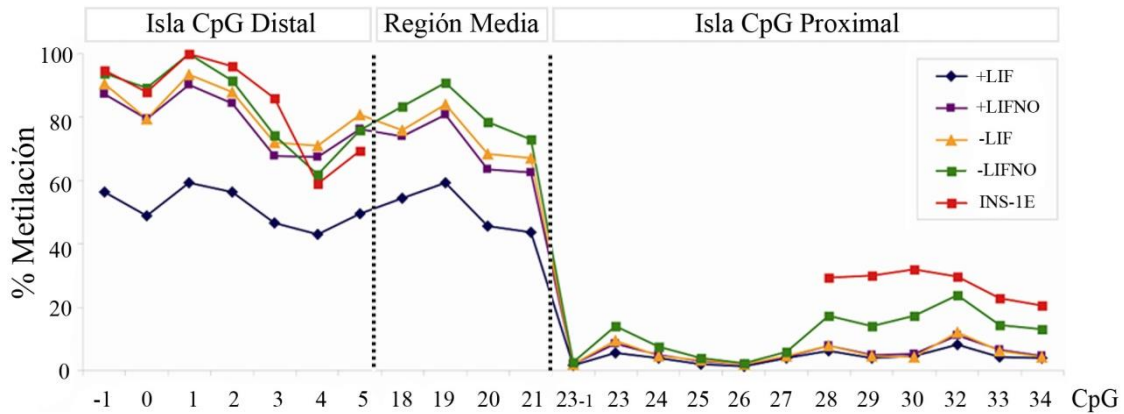
Para analizar si el NO tiene un efecto en la metilación global de las islas CpG y la región media del promotor de *Pdx1* se calculó el porcentaje de metilación de cada región en cada condición de cultivo. El resultado de este análisis mostró que el tratamiento con NO induce ligeramente un aumento de metilación en las 3 regiones estudiadas. Además, también se observa un aumento de metilación tras la retirada del LIF del medio de cultivo (Figura 28).



**Figura 28. Metilación global de la isla CpG proximal, CpG distal y zona media analizadas por Secuenciación por PCR dependiente de Bisulfito (BSP).** Esta gráfica representa el porcentaje de metilación global de cada región del promotor de *Pdx1* estudiado. Para la obtención de estos valores se contaron los sitios CpG analizados de cada región, en todos los clones estudiados (10-15 clones) y cuántos de ellos estaban metilados respecto al número total de sitios CpG en cada condición de cultivo.

Para confirmar los resultados de BSP, realizamos pirosecuenciación de bisulfito en colaboración con el Dr. Mario Fraga en el Departamento de Epigenética del Instituto de Oncología del Principado de Asturias. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos por BSP. La isla CpG distal y la región media mostraron un mayor grado de metilación que la isla CpG proximal, que se encontró en su mayoría desmetilada. Además, se puede observar claramente como la condición de pluripotencia presenta el nivel más bajo de metilación, siendo este resultado más significativo en la isla CpG distal y región media. La adición de DETA-NO y la retirada de LIF del medio de cultivo aumentó el nivel de metilación de estas dos regiones, tal y como se observó por BSP. Como control, estudiamos la metilación del promotor de *Pdx1* en la línea celular INS-1E, que expresa de forma constitutiva este gen. Se puede comprobar que la condición de cultivo en ausencia de LIF y NO presenta el patrón de metilación que más se asemeja al de la línea celular INS-1E (Figura 29).

Estos resultados indican que las condiciones de cultivo diferenciadoras, como son el cultivo en ausencia de LIF o el tratamiento con DETA-NO, provocan un aumento de metilación del promotor. Estos cambios del patrón de metilación del promotor de *Pdx1* inducidos por el NO, podrían afectar a la expresión del gen, mediante la ocupación y liberación de factores de transcripción. Esta posibilidad será estudiada más adelante.

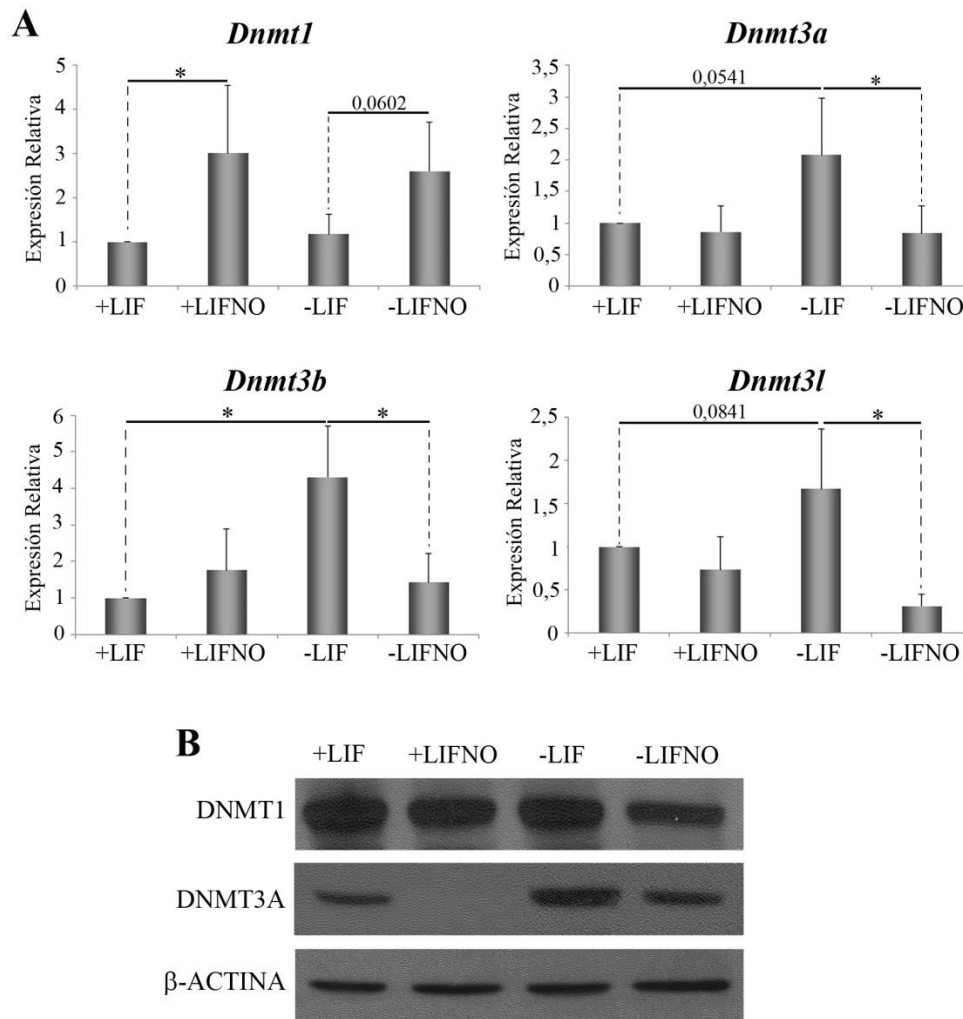


**Figura 29. Análisis de la metilación del promotor *Pdx1* por pirosecuenciación.** Esta gráfica representa el porcentaje de metilación de las 3 regiones estudiadas del promotor de *Pdx1*, la isla CpG distal, la región media y la isla CpG proximal. Cada línea representa una condición de cultivo de células de la línea celular R1/E: +LIF (azul), +LIFNO (morado), -LIF (amarillo) y -LIFNO (verde). Como control positivo de expresión de *Pdx1* se utilizó la línea celular INS-1E (rojo). Las regiones no conservadas entre ratón y rata no fueron estudiadas en la línea celular INS-1E.

#### 4.1.3 El tratamiento con DETA-NO modifica la expresión de las Metilasas de ADN

Una vez comprobado que el tratamiento con DETA-NO induce un cambio en el patrón de metilación del promotor de *Pdx1*, procedimos a analizar si este cambio puede ser explicado por la expresión de las metilasas de ADN. De esta manera, medimos la expresión la metilasa *de novo* Dnmt1 y las metilasas de mantenimiento Dnmt3a, Dnmt3b y Dnmt3l a nivel de ARN mensajero y proteína. Los resultados muestran que el tratamiento con NO incrementa la expresión de ARN mensajero de la metilasa Dnmt1 (Figura 30A), pero el nivel de proteína no se ve afectado (Figura 30B). Por otro lado, la retirada de LIF del medio de cultivo incrementa la expresión de las metilasas de mantenimiento Dnmt3a, Dnmt3b y Dnmt3l, mientras que el tratamiento con NO en esta condición de cultivo disminuyó significativamente la expresión en los tres casos (Figura 30A). Además, los niveles de proteína de la metilasa Dnmt3a muestran que la condición de cultivo en ausencia de LIF presenta la mayor cantidad de esta proteína, mientras que el tratamiento con NO la disminuye significativamente (Figura 30B). Estos resultados confirman que el tratamiento con DETA-NO modifica la expresión de las metilasas de ADN *de novo* y de mantenimiento, pudiendo de esta manera afectar a la expresión de los genes diana. Según los resultados de metilación del promotor de *Pdx1*, podría

relacionarse el incremento de metilación de determinados sitios Cps tras el tratamiento con NO con la actividad de la metilasa *de novo* Dnmt1, que incrementa de forma significativa la expresión a nivel génico tras la exposición a NO. El incremento de metilación observado tras la retirada de LIF del medio de cultivo podría ser explicado por la actividad de las metilasas de mantenimiento, pues incrementan su expresión significativamente en esta condición de cultivo.

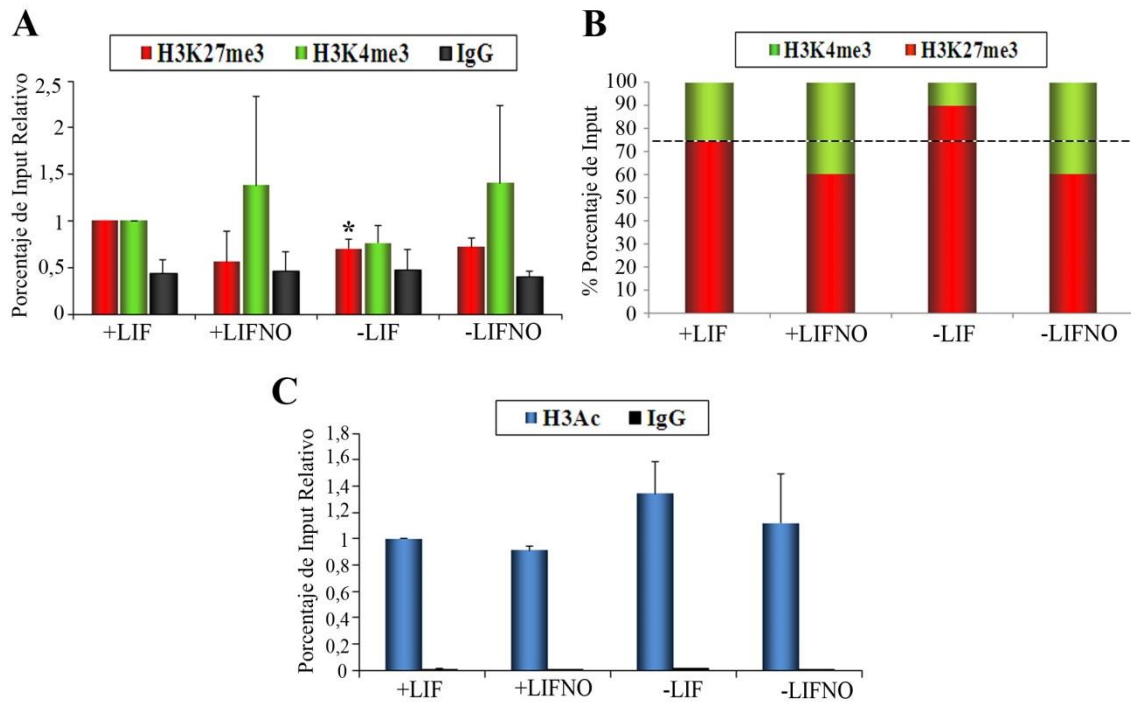


**Figura 30. El tratamiento con DETA-NO induce un cambio en la expresión de las metilasas de ADN.** Células de la línea celular R1/E fueron cultivadas en presencia y ausencia de LIF y/o tratadas con 500  $\mu$ M de DETA-NO durante 19 horas. **A)** Medida de la expresión de las metilasas *de novo* Dnmt1 y de mantenimiento Dnmt3a, Dnmt3b y Dnmt3l mediante PCR cuantitativa. La gráfica muestra la media de la expresión relativa de 3 experimentos independientes  $\pm$  SD. La expresión relativa fue calculada con el algoritmo  $\Delta\Delta$ Ct, tomando como control endógeno la expresión del gen  $\beta$ -Actina y como muestra calibradora la expresión en la condición +LIF. \* $p < 0,05$ . **B)** Análisis de la expresión de las metilasas de ADN DNMT1 y DNMT3A por Western Blot. La expresión de la  $\beta$ -Actina fue utilizada como control de carga. Imagen representativa de 5 experimentos independientes.

#### **4.1.4 El DETA-NO induce cambios en las modificaciones postraduccionales de histonas del promotor de *Pdx1***

Otro de los mecanismos por los que la expresión génica puede verse modificada, además de la metilación del ADN, es la modificación postraduccionales de las histonas que ocupan la zona promotora del gen. Por ello, nos centramos en estudiar si el tratamiento con NO induce cambios en la modificaciones postraduccionales de las histonas presentes en el promotor de *Pdx1*. Para ello, desarrollamos experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para la histona H3 y su trimetilación en el residuo de lisina (K) 27 (H3K27me3) o 4 (H3K4me3), lo cual representa una marca represora o activadora, respectivamente. Además, estudiamos el estado de acetilación de la histona H3 (H3Ac), que está referenciada como marca génica activadora. De esta forma, los resultados de ChIP mostraron que la retirada de LIF del medio de cultivo induce una disminución de la ocupación de H3K27me3, mientras que el tratamiento con DETA-NO parece disminuir también su ocupación, aunque debido a la variabilidad de los datos, este cambio no es significativo. Por otro lado, la ocupación de la H3K4me3 no se ve afectada tras la retirada del LIF del medio de cultivo, pero el DETA-NO induce un aumento de su ocupación, aunque estos cambios, al igual que el caso anterior, no son significativos debido a la variabilidad de los resultados (Figura 31A). Estos datos están representados de manera normalizada a la condición de pluripotencia. Si lo graficamos de manera absoluta, para observar qué modificación postraduccionales prevalece en cada caso, podemos comprobar cómo en la condición de pluripotencia la zona proximal del promotor de *Pdx1* se encuentra ocupada por H3K27me3 en aproximadamente un 75%, mientras que tras el tratamiento con NO, esta balanza se equilibra hasta un 60% por H3K27me3 y 40% por H3K4me3. De forma similar sucede en el cultivo en ausencia de LIF (Figura 31B). Por otro lado, el resultado de ChIP de la histona H3 acetilada mostró que el tratamiento con DETA-NO o la retirada de LIF del medio de cultivo no afectan a la acetilación de la histona H3, encontrándose presente en las 4 condiciones de cultivos estudiadas (Figura 31C).



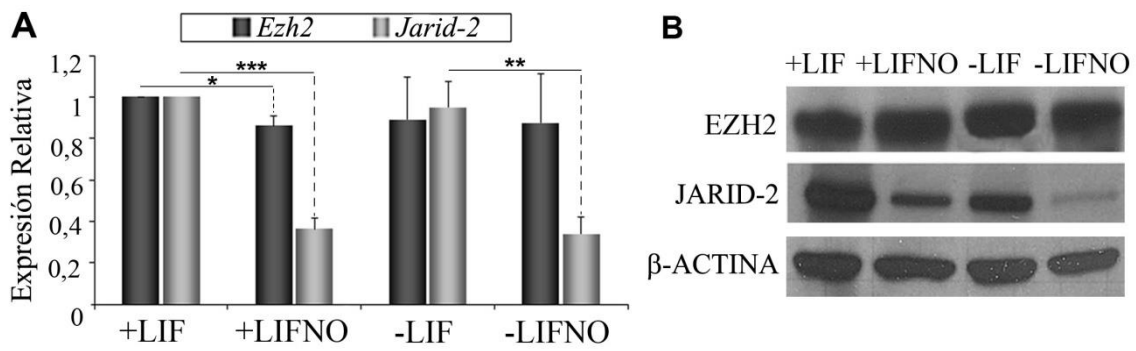


**Figura 31. Análisis de las modificaciones postraduccionales de las histonas presentes en la zona proximal del promotor de *Pdx1* mediante ChIP.** Células de la línea celular R1/E fueron cultivadas en presencia y ausencia de LIF y/o tratadas con 500  $\mu$ M de DETA-NO durante 19 horas. **A)** Media del porcentaje de input de las histonas H3K27me3 y H3K4me3 relativo a la condición de pluripotencia (+LIF)  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. **B)** La gráfica de barras apiladas simboliza la dinámica de las histonas H3K27me3 y H3K4me3. Representa la media de 3 experimentos independientes. **C)** Media de la ocupación de la histona H3 acetilada, representado como el porcentaje de input relativo a la condición de pluripotencia (+LIF)  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes \* $p < 0,05$ , valor estadísticamente significativo comparado con la condición control (+LIF).

#### 4.1.5 El Complejo Represor Polycomb 2 (PRC2) y la Histona Acetiltransferasa P300 regulan la expresión de *Pdx1*

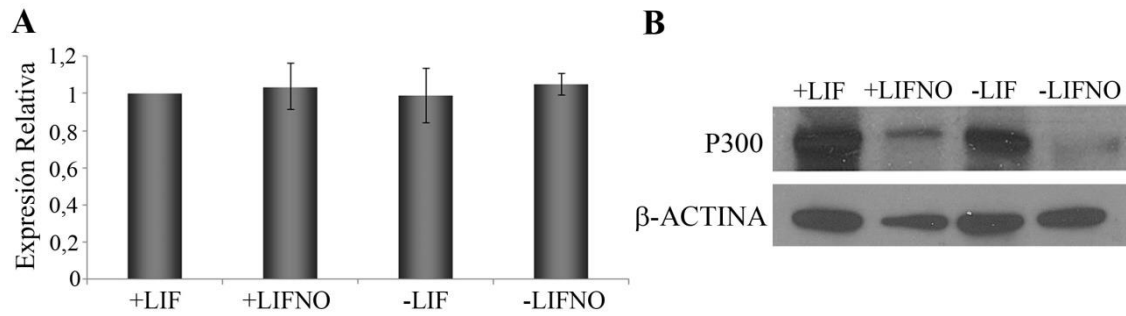
Se ha descrito que el Complejo Polycomb Represor 2 (PCR2) es un elemento clave regulador de genes de pluripotencia y diferenciación en células embrionarias, y en concreto, hay estudios que demuestran su rol en la represión de *Pdx1*. Por ello, decidimos estudiar si el NO tiene algún efecto sobre la expresión y ocupación de este complejo al promotor de *Pdx1*. En primer lugar, medimos la expresión de dos subunidades de PRC2: JARID-2, cuya función principal es unirse al ADN y reclutar al resto de subunidades que conforman el complejo, y EZH2, que tiene actividad metilante

sobre la histona H3 en el residuo de lisina 27, mono-, di- y trimetilación, silenciando de esta manera la expresión génica. La medida de la expresión de nivel de ARN mensajero mostró que la expresión de *Ezh2*, disminuyó ligeramente tras el tratamiento con NO en condiciones de cultivo en presencia de LIF, mientras que la expresión no se vio afectada por la retirada de LIF del medio de cultivo y la adición de NO. Sin embargo, la expresión de *Jarid-2* se vio disminuida significativamente tras el tratamiento con NO en ambas condiciones de cultivo (Figura 32A). Por otro lado, los niveles de proteínas medidas por Western Blot confirmaron la disminución de la expresión de JARID-2 tras la exposición al NO, mientras que los niveles proteicos de EZH2 no se ven afectados (Figura 32B).



**Figura 32. Análisis de la expresión de las subunidades del PRC2, Jarid-2 y Ezh2, tras el tratamiento con NO.** Células de la línea celular R1/E fueron cultivadas en presencia y ausencia de LIF y/o tratadas con 500  $\mu$ M de DETA-NO durante 19 horas. **A)** Análisis de la expresión de *Ezh2* y *Jarid-2* por PCR cuantitativa. La gráfica muestra la media de la expresión relativa de 4 (*Jarid-2*) y 3 (*Ezh2*) experimentos independientes  $\pm$  SEM. La expresión relativa fue calculada con el algoritmo  $\Delta\Delta$ Ct, tomando como control endógeno la expresión del gen  $\beta$ -Actina y como muestra calibradora la expresión en la condición +LIF. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . **B)** Análisis de la expresión de EZH2 y JARID-2 por Western Blot. La expresión de  $\beta$ -ACTINA fue utilizada como control de carga. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

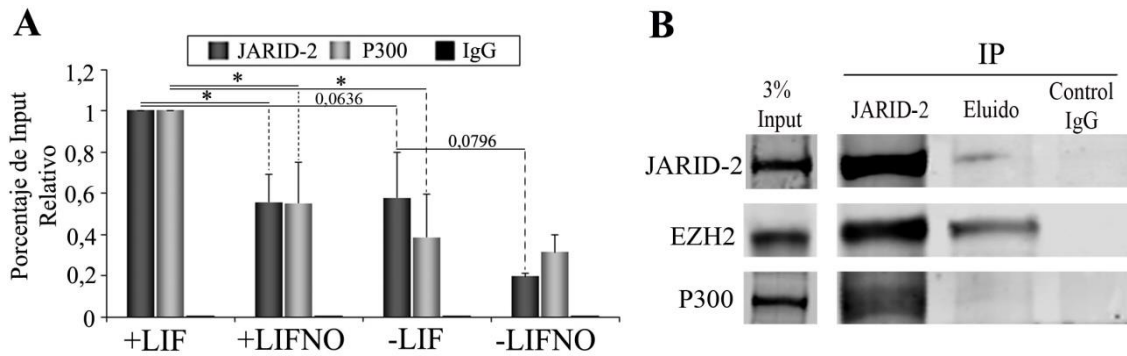
De la misma manera estudiamos la expresión de la Histona Acetiltransferasa P300, ya que se ha descrito que tiene un rol en la acetilación de histonas y otros factores de transcripción importantes para la regulación génica. Los resultados de expresión a nivel de ARN mensajero mostraron que la expresión de *P300* no se ve afectada por el tratamiento con NO o la retirada de LIF del medio de cultivo (Figura 33A). No obstante, los niveles de proteínas se vieron drásticamente disminuidos tras la exposición al NO (Figura 33B).



**Figura 33. Análisis de la expresión de la Histona acetiltransferasa P300 tras el tratamiento con NO.** Células de la línea celular R1/E fueron cultivadas en presencia y ausencia de LIF y/o tratadas con 500  $\mu$ M de DETA-NO durante 19 horas. **A)** Análisis de la expresión de *P300* por PCR cuantitativa. La gráfica muestra la media de la expresión relativa de 3 experimentos independientes  $\pm$  SEM. La expresión relativa fue calculada con el algoritmo  $\Delta\Delta$ Ct, tomando como control endógeno la expresión del gen  $\beta$ -Actina y como muestra calibradora la expresión en la condición +LIF. **B)** Análisis de la expresión de P300 por Western Blot. La expresión de  $\beta$ -ACTINA fue utilizada como control de carga. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

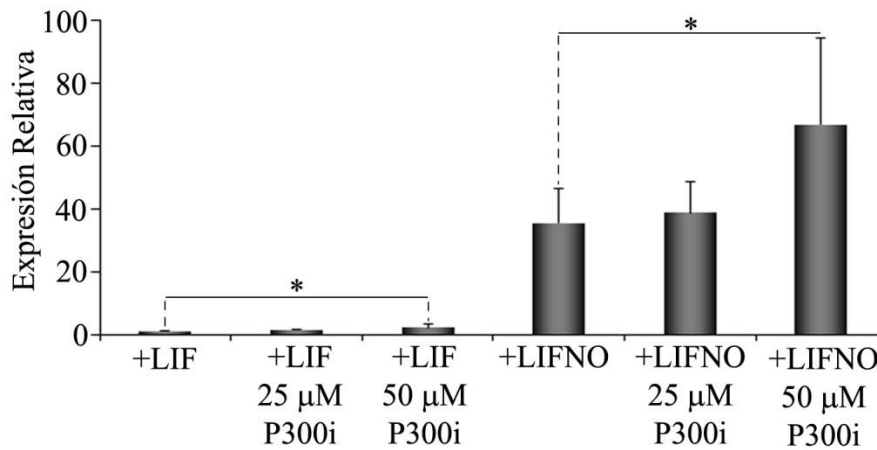
Una vez conocido que el tratamiento con DETA-NO a altas concentraciones afecta negativamente a la expresión de Jarid-2 y P300, procedimos a estudiar su ocupación sobre la zona proximal del promotor de *Pdx1*. Los resultados de inmunoprecipitación de cromatina mostraron que la condición de pluripotencia presenta el mayor nivel de ocupación de JARID-2 y P300, mientras que la retirada de LIF del medio de cultivo y el tratamiento con DETA-NO en presencia de LIF disminuyeron los niveles de ocupación de ambas proteínas. El cultivo en ausencia de LIF junto con la exposición a NO mantuvo bajo el nivel de ocupación (Figura 34A).

A continuación, decidimos estudiar si ambas proteínas interaccionan. Para ello, realizamos una coimmunoprecipitación de proteínas en la condición de cultivo en presencia de LIF y en condiciones no desnaturizantes, con el anticuerpo anti-Jarid-2, revelando con este mismo para comprobar la eficacia de la técnica, y con los anticuerpos para EZH2 y P300. Los resultados mostraron que las tres proteínas interaccionan (Figura 34B).



**Figura 34. El PRC2 y la histona acetiltransferasa P300 ocupan el promotor de *Pdx1* e interaccionan.** Células de la línea celular R1/E fueron cultivadas en presencia y ausencia de LIF y/o tratadas con 500  $\mu$ M de DETA-NO durante 19 horas. **A)** Media de la ocupación de JARID-2 y P300 sobre el promotor de *Pdx1*, representado como el porcentaje de input relativo a la condición de pluripotencia (+LIF)  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes y obtenido mediante ChIP. \* $p < 0,05$ . **B)** Ensayo de coimmunoprecipitación de JARID-2, EZH2 y P300. El 3% del extracto total de proteína fue utilizado como control de carga (Input). Las proteínas no retenidas al complejo de las partículas de agarosa y el anticuerpo anti-Jarid-2 fueron cargadas como control del grado de inmunoprecipitación (Eluido). Un ensayo de inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-IgG se llevó a cabo como control de uniones inespecíficas (IgG). IP: inmunoprecipitados.

Para confirmar la acción represora de la histona acetiltransferasa P300 sobre la regulación de *Pdx1*, utilizamos el inhibidor de P300 (C646), el cual se ha demostrado que inhibe de forma específica a la histona acetiltransferasa P300. Para comprobar su efecto, hicimos un ensayo dosis dependiente en la condición de pluripotencia, donde observamos que el papel represor de P300 es mayor. El resultado de PCR cuantitativa mostró que el inhibidor de P300 (P300i) utilizado a una concentración de 50  $\mu$ M incrementa la expresión de *Pdx1* de forma significativa, aún tras la exposición a NO, mostrándose efectos sinérgicos entre el DETA-NO y el inhibidor de P300 (Figura 35). Además, se empleó concentraciones inferiores (10  $\mu$ M) y superiores (75 y 100  $\mu$ M) de P300i. La concentración más baja de P300i no produjo cambios en la expresión de *Pdx1*, mientras que a concentraciones elevadas se observó un incremento de expresión (datos no mostrados). Sin embargo, la muerte celular fue drástica a concentraciones superiores a 50  $\mu$ M, por lo que decidimos que ésta sería la concentración óptima.

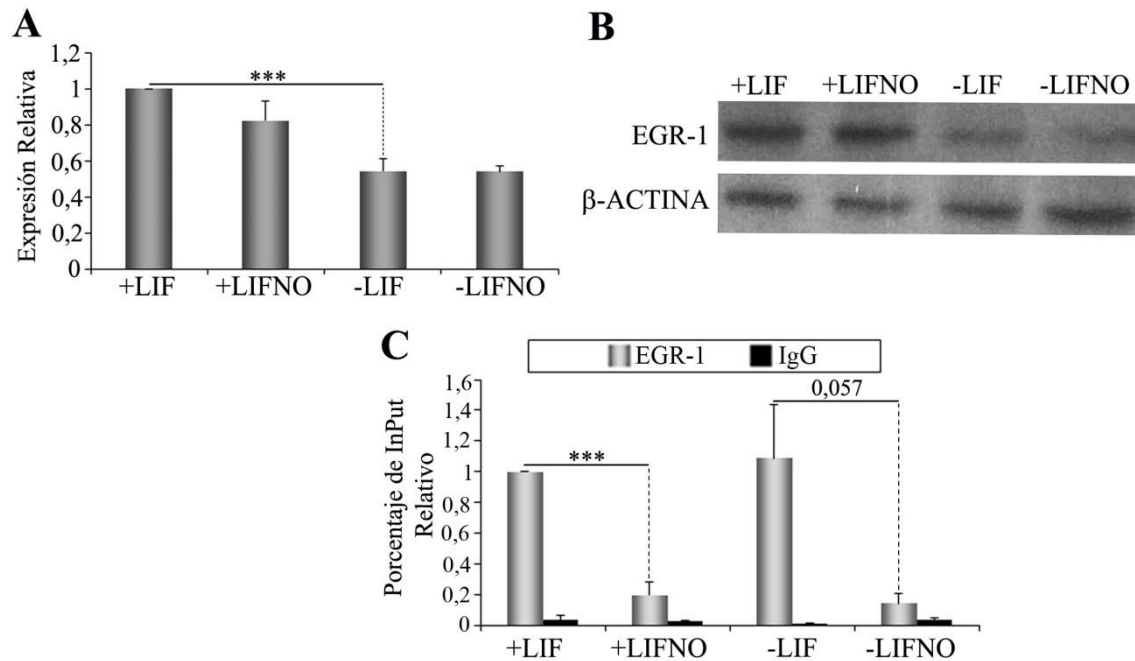


**Figura 35. La histona acetiltransferasa P300 tiene un papel represor sobre la expresión de *Pdx1*.** Células de la línea celular R1/E fueron cultivadas en presencia de LIF y/o tratadas con 500  $\mu$ M de DETA-NO y P300i durante 19-20 horas. Medida de la expresión de *Pdx1* mediante PCR cuantitativa. La gráfica representa la media de la expresión relativa  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. La expresión relativa fue calculada con el algoritmo  $\Delta\Delta$ Ct, tomando como control endógeno la expresión del gen  $\beta$ -Actina y como muestra calibradora la expresión en la condición +LIF. \* $p < 0,05$ .

#### 4.1.6 El factor de transcripción Egr-1 tiene un papel represor en la regulación génica del gen *Pdx1* en CMER

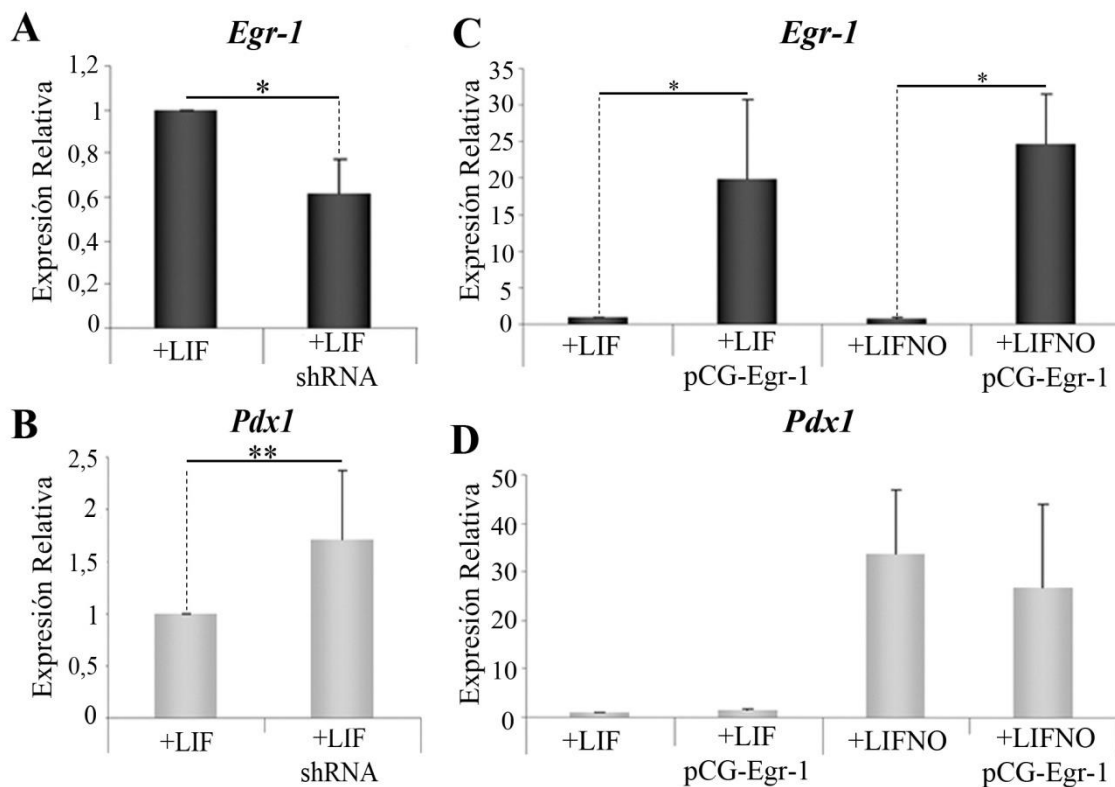
Como siguiente paso en el estudio de la regulación de *Pdx1* por óxido nítrico, realizamos una búsqueda en la base de datos bioinformática JASPAR, la cual predice posibles sitios consenso de unión de factores de transcripción a una secuencia de ADN de interés. Así, analizamos unas 2000 pb del promotor de *Pdx1* y obtuvimos una lista de factores de transcripción con un importante papel en el mantenimiento de la pluripotencia y factores de transcripción implicados en la diferenciación hacia endodermo. Además, encontramos factores de transcripción de respuesta temprana. Entre ellos, encontramos el factor de transcripción Egr-1, el cual presenta un posible sitio consenso sobre el promotor de *Pdx1* (TGCGGGGGGG) situado entre -1064 y -1054 pb aguas arriba del inicio de la traducción, con un *score* de 10,403 y un *score* relativo de 0,8688. Además, la localización de este sitio consenso se encuentra en la zona media del promotor entre las islas de metilación CpG proximal y distal, y la cual estudiamos su grado de metilación por BSP y pirosecuenciación. Por ello, decidimos estudiar el posible papel de este factor de transcripción sobre la regulación del gen *Pdx1*.

En primer lugar, estudiamos la expresión de Egr-1 a nivel de ARN-mensajero y proteína tras el tratamiento con NO. Los resultados mostraron que la retirada de LIF del medio de cultivo disminuye la expresión de Egr-1, mientras que la exposición a NO no modifica los valores de expresión (Figura 36A y B). A continuación, para estudiar si Egr-1 tiene un papel regulador sobre la expresión de *Pdx1*, desarrollamos un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina de EGR-1 sobre la región media del promotor de *Pdx1*. El resultado de ChIP mostró que EGR-1 ocupa el promotor de *Pdx1*, y el tratamiento con NO libera este factor de transcripción del ADN (Figura 36C). Este resultado hace intuir que EGR-1 tiene un papel represor sobre la expresión de *Pdx1*, ya que cuando este ocupa el promotor, *Pdx1* no se expresa y cuando EGR-1 sale del promotor se activa la expresión.



**Figura 36. El factor de transcripción Egr-1 no ve modificada su expresión tras la exposición a DETA-NO, pero el tratamiento afecta a su ocupación sobre el promotor de *Pdx1*.** Células de la línea celular R1/E fueron cultivadas en presencia y ausencia de LIF y/o tratadas con 500  $\mu$ M de DETA-NO durante 19 horas. **A)** Medida de la expresión de *Egr-1* mediante PCR cuantitativa. La gráfica muestra la media de la expresión relativa de 5 experimentos independientes  $\pm$  SD. La expresión relativa fue calculada con el algoritmo  $\Delta\Delta$ Ct, tomando como control endógeno la expresión del gen  $\beta$ -Actina y como muestra calibradora la expresión en la condición +LIF. **B)** Análisis de la expresión de EGR-1 por Western Blot. La expresión de  $\beta$ -ACTINA fue utilizada como control de carga. Imagen representativa de 3 experimentos independientes. **C)** Media de la ocupación de EGR-1 sobre el promotor de *Pdx1*, representado como el porcentaje de input relativo a la condición de pluripotencia (+LIF)  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes y obtenido mediante ChIP. \*\*\* $p < 0,001$ .

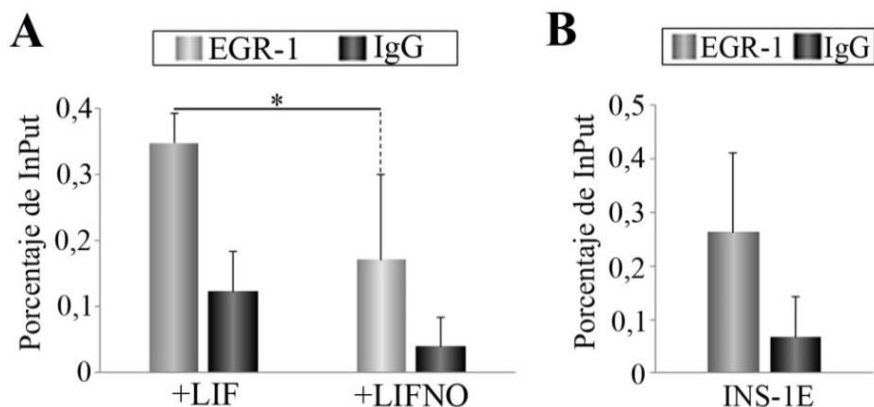
A continuación, decidimos desarrollar ensayos de pérdida y ganancia de función de *Egr-1*, para comprobar si efectivamente este factor de transcripción tiene un papel represor sobre la regulación de *Pdx1*. De esta manera, transfectamos las células R1/E con un conjunto de cinco vectores que expresan el *shRNA* o el ARN en forma de horquilla corta que silencia la expresión de *Egr-1* (pérdida de función); y con un vector que sobreexpresa la secuencia codificante del gen *Egr-1* (ganancia de función). La expresión de *Egr-1* se midió para analizar la eficacia de la técnica. Estos ensayos se hicieron en condiciones de cultivo pluripotentes, en presencia de LIF.



**Figura 37. Ensayo de pérdida y ganancia de función de *Egr-1* sobre la expresión de *Pdx1*.** Células de la línea celular R1/E fueron cultivadas en presencia de LIF y/o tratadas con 500  $\mu$ M de DETA-NO durante 19 horas. **A y B)** Ensayo de pérdida de función. Medida de la expresión de *Egr-1* (A) y *Pdx1* (B) mediante PCR cuantitativa. **C y D)** Ensayo de ganancia de función. Medida de la expresión de *Egr-1* (C) y *Pdx1* (D) mediante PCR cuantitativa. Las gráficas muestran la media de la expresión relativa de 3 experimentos independientes  $\pm$  SD. La expresión relativa fue calculada con el algoritmo  $\Delta\Delta$ Ct, tomando como control endógeno la expresión del gen  $\beta$ -Actina y como muestra calibradora la expresión en la condición +LIF. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . shRNA: mezcla de cinco vectores que portan el ARN en forma de horquilla corta; pCG-Egr-1: vector que sobreexpresa la secuencia codificante del gen *Egr-1*.

En el ensayo de pérdida de función observamos un silenciamiento de *Egr-1* en torno al 40%, respecto a las células sin transfectar (Figura 37A), lo que consiguió la sobreexpresión de *Pdx1* de 1,5 veces respecto a las células control (Figura 37B). Tras el tratamiento con NO, no se consiguieron cambios significativos en la expresión de *Pdx1* (datos no mostrados). Por otro lado, mediante el ensayo de ganancia de función conseguimos una sobreexpresión de *Egr-1* de unas 20 veces respecto a las células sin transfectar (Figura 40C), pero la expresión de *Pdx1* no se vio alterada (Figura 37D).

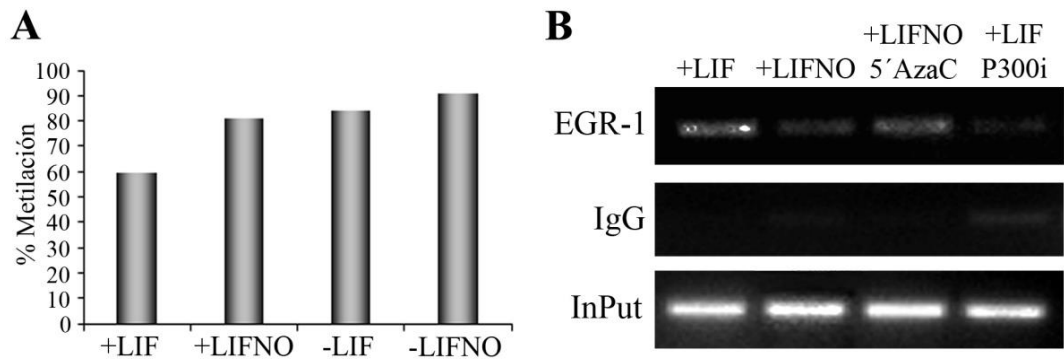
Estos resultados demostraron que el factor de transcripción Egr-1 tiene un papel represor sobre la regulación de *Pdx1* en células madre embrionarias de ratón. Sin embargo, en la bibliografía se ha descrito que EGR-1 se une a la región distal del promotor de *Pdx1* en células de insulinoma de ratón, MIN6, las cuales expresan *Pdx1* de forma constitutiva, por lo que se define a EGR-1 como un activador de la expresión de *Pdx1* en estas células. Para comprobar, si EGR-1 se une en la región distal del promotor de *Pdx1* en CMEr, realizamos un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina en esta zona promotora. El resultado de ChIP mostró que EGR-1 se encuentra ocupando el promotor de *Pdx1* en condiciones de pluripotencia, y se libera del promotor tras el tratamiento con NO (Figura 38A). Como control de lo que existe publicado, realizamos un ensayo de ChIP en células insulinoma de rata, INS-1E, en la zona promotora distal, y el resultado mostró que EGR-1 ocupa el promotor de *Pdx1* en este tipo celular (Figura 38B). Por tanto, deducimos que el papel de EGR-1 sobre el control de la expresión de *Pdx1* depende del tipo celular y/o periodo del desarrollo o nivel de diferenciación de las células.



**Figura 38. El papel de EGR-1 sobre la regulación de *Pdx1* depende del tipo celular.** A) Medida de la ocupación de EGR-1 sobre el promotor de *Pdx1* en células R1/E. B) Medida de la ocupación de EGR-1 sobre el promotor de *Pdx1* en células INS-1E. Las gráficas representan el porcentaje de input  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes obtenido mediante ChIP sobre la zona distal del promotor de *Pdx1*. \* $p < 0,05$ .



Finalmente, nos planteamos estudiar el mecanismo implicado en la salida del factor de transcripción EGR-1 del promotor de *Pdx1* tras la exposición a NO. Uno de los mecanismos que puede estar regulando esta unión es la metilación del sitio consenso de EGR-1. En el análisis de metilación de la zona media del promotor de *Pdx1*, se estudió la metilación del sitio CpG presente en la secuencia consenso de unión de EGR-1 (TGCGGGGGGGG) correspondiente al sitio CpG que fue numerado como sitio CpG 18. Teniendo en cuenta el resultado de BSP y del pirosecuenciamiento, los cuales mostraron que este sitio CpG aumenta su metilación tras el tratamiento con NO, podríamos atribuir a la metilación del ADN la razón por la cual EGR-1 sale del promotor de *Pdx1* tras la exposición a NO. Además, así se explicaría por qué en el ensayo de ganancia de función, en el que se sobreexpresa Egr-1, no se observan cambios en la expresión de Pdx1 en presencia de NO, ya que el sitio CpG de su sitio consenso está metilado y Egr-1 no puede unirse independientemente de la sobreexpresión. Sin embargo, si observamos el resultado de pirosecuenciamiento del sitio CpG 18 (Figura 39A), el incremento de metilación no es drástico, pero sí lo es la liberación de EGR-1 del promotor de *Pdx1*. Por ello, nos planteamos que podría haber otro mecanismo que está implicado en esta unión proteína-ADN. Según la bibliografía, se conoce que EGR-1 puede ser acetilado por la histona acetiltransferasa P300, y esta modificación postraduccional puede afectar a la ocupación de este factor de transcripción al ADN, así como formar complejos con distintas proteínas. Por tanto, decidimos estudiar la ocupación de EGR-1 al promotor de *Pdx1*, en células tratadas con DETA-NO y 5-Aza-2'-desoxicitidina, que inhibe la metilación del ADN, para saber si la metilación del sitio consenso afecta a la ocupación de EGR-1, y en células tratadas con el inhibidor de P300, para comprobar si la acetilación de EGR-1 por la histona acetiltransferasa P300 podría ser responsable de los cambios en la ocupación. Los resultados de inmunoprecipitación de cromatina mostraron que el tratamiento con 5-Aza-2'-desoxicitidina, evita la liberación de EGR-1 del promotor de *Pdx1* que induce el NO; mientras que el tratamiento con P300i impidió su ocupación (Figura 39B). De esta manera se desvelaron los mecanismos por el cual la exposición a NO permite la liberación de EGR-1 del promotor de *Pdx1*, fomentando así la expresión de este gen. Por un lado, el DETA-NO modifica el patrón de metilación del promotor de *Pdx1*, incrementado el nivel de metilación del sitio consenso de unión de EGR-1 al ADN y, por otro, disminuye la expresión y ocupación de P300 al promotor de *Pdx1*, lo que conlleva a una disminución de la acetilación de EGR-1.



**Figura 39. Mecanismos de liberación del factor de transcripción Egr-1 del promotor de *Pdx1* por el DETA-NO.** **A)** La gráfica de barras representa el porcentaje de metilación global del sitio CpG del sitio consenso de EGR-1 en el promotor de *Pdx1* medido por pirosecuenciamiento (CpG 18). **B)** Ocupación de EGR-1 sobre el promotor de *Pdx1* mediante ChIP y PCR cualitativa. Esta imagen es representativa de 2 réplicas técnicas.

## **Bloque 2**

### **4.2 Desarrollo de un protocolo de diferenciación de células madre hacia células productoras de insulina**

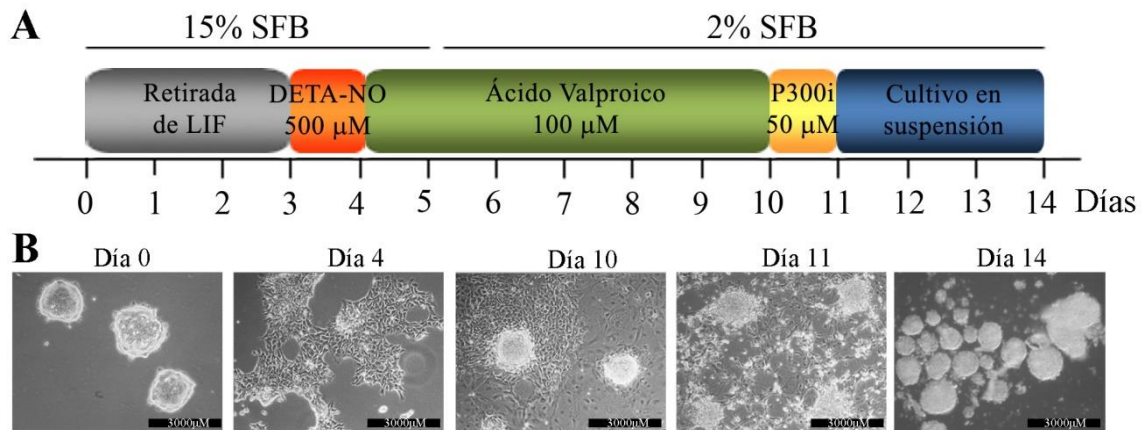
*En el primer bloque de la tesis se ha llevado a cabo un estudio de la regulación del gen *Pdx1* en células madre embrionarias de ratón tras la exposición a óxido nítrico, desvelándose mecanismos claves que regulan la expresión de este gen. La expresión de *Pdx1* es fundamental en el desarrollo y función de las células  $\beta$ , por lo que la expresión controlada de este gen puede ser de gran utilidad en el desarrollo de protocolos de diferenciación hacia células productoras de insulina. De esta manera, el segundo bloque de la tesis trata sobre el desarrollo de un protocolo de diferenciación de células madre hacia células productoras de insulina a través de la expresión controlada del gen *Pdx1* mediante la adición de pequeñas moléculas al medio de cultivo. Los resultados muestran el diseño de un protocolo de diferenciación sencillo, no muy extenso, y que podría complementar los protocolos de diferenciación desarrollados por otros grupos de investigación que utilizan factores de crecimiento para mimetizar el desarrollo del páncreas, reduciendo el costo por sustituir estos factores por pequeñas moléculas como el DETA-NO, ácido valproico, P300i, nicotinamida y resveratrol.*

#### **4.2.1 Desarrollo de un protocolo de diferenciación de células madre embrionarias de ratón hacia células productoras de insulina**

Anteriormente en nuestro laboratorio se desarrolló un protocolo de diferenciación de células madre embrionarias de ratón, con la línea celular D3, hacia endodermo definitivo consistente en 3 pasos. En primer lugar, las células se cultivaron en medio de cultivo en ausencia de LIF, durante 3 días, para inducir la diferenciación espontánea de las células. Al tercer día, las células fueron tratadas con 500  $\mu$ M de DETA-NO, lo cual indujo la expresión de *Pdx1*, como hemos visto en el primer bloque de la tesis, además de inhibir genes de pluripotencia e incrementar la expresión de genes de diferenciación de las tres líneas germinales. A continuación, las células fueron mantenidas en cultivo durante 6 días expuestas a 100  $\mu$ M de ácido valproico (VA), un

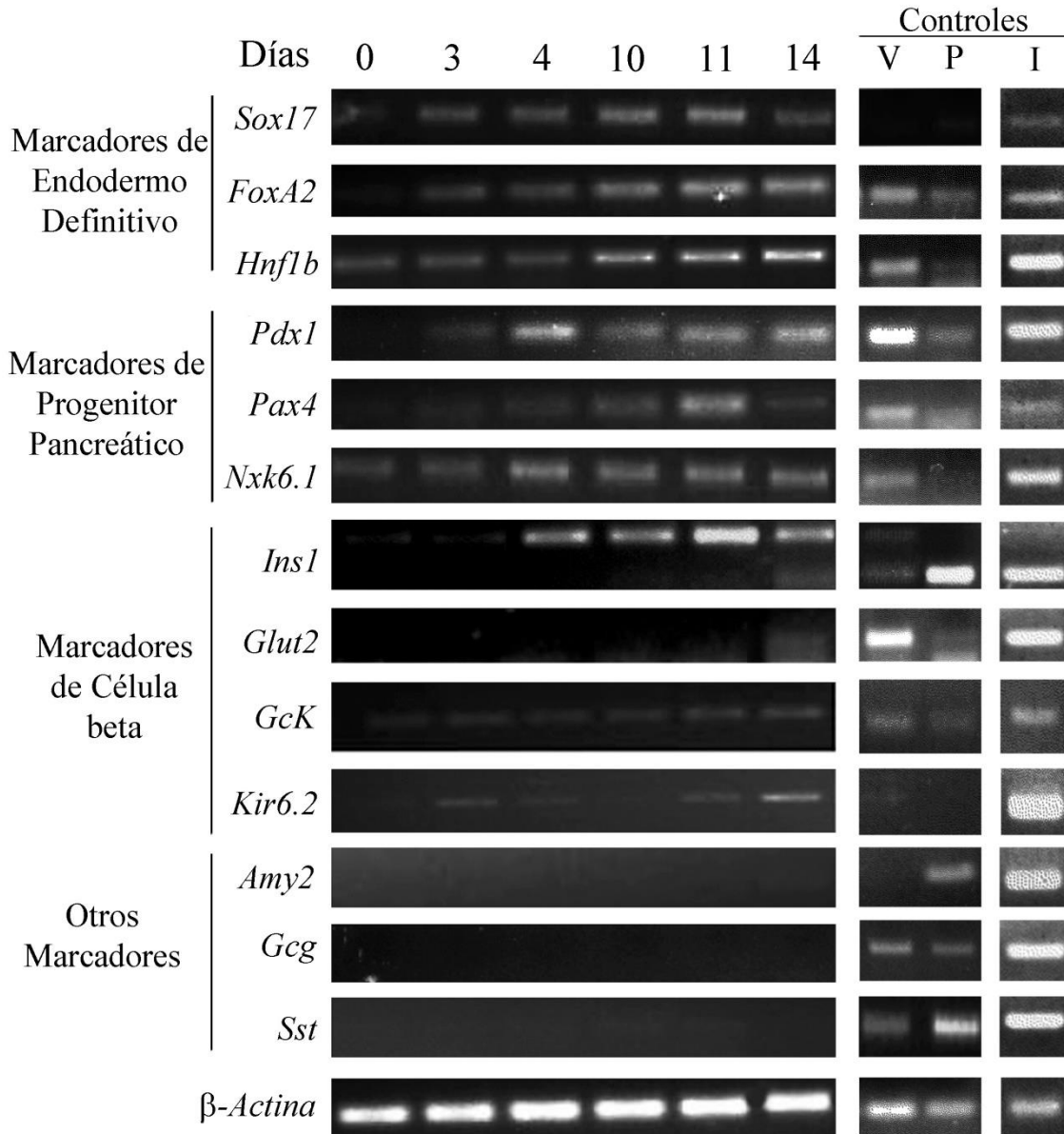
inhibidor de la actividad de la histona desacetilasa de tipo I (HDACI), y se redujo la concentración de suero del medio del 15% al 2% al quinto día de cultivo. Al final de este protocolo, día 10 de cultivo, se consiguió una alta expresión de marcadores de endodermo definitivo como son FoxA2, Sox17, Gata4 y Hnf1 $\beta$ . Sin embargo, el incremento de expresión de *Pdx1* que se observa tras el tratamiento con NO, se pierde en los días siguientes y no se vuelve a recuperar.

Para la continuación del protocolo decidimos utilizar del inhibidor de la histona acetiltransferasa P300, ya que vimos anteriormente que las células tratadas con 50  $\mu$ M de este reactivo incrementan significativamente la expresión de *Pdx1*. A continuación, el último paso del protocolo consistió en el cultivo de las células en suspensión durante 3 días, con la finalidad de que se agrupen y formen agregados celulares, lo que se conoce que ayuda a la maduración de las células  $\beta$ . De esta forma, el protocolo de diferenciación final consiste en 5 pasos y 14 días de cultivo, durante los cuales la morfología celular va variando. A día 0, las células presentan una morfología brillante y redondeada, por ser mantenidas en cultivo en presencia de LIF. En este punto, realizamos el pase celular para iniciar el protocolo. El cultivo durante 4 días en ausencia de LIF y la exposición durante 19 horas a 500  $\mu$ M de DETA-NO, conlleva a un cambio en la morfología celular observándose colonias estrelladas y con menos brillo. Tras los 6 días de cultivo con 100  $\mu$ M de VA, a día 10, se pueden distinguir principalmente dos tipos celulares; células que forman agregados circulares y brillantes, y células más opacas crecidas alrededor de estas colonias. A continuación, el tratamiento con 50  $\mu$ M de P300i, además de generar muerte celular, crea un cambio morfológico en los dos tipos celulares (Figura 40).

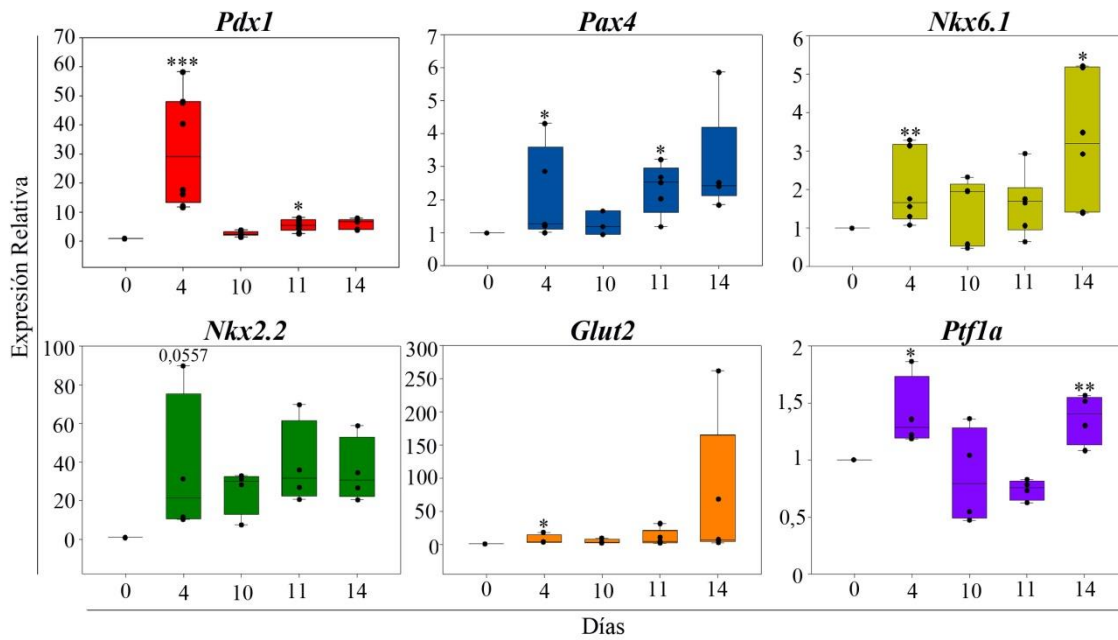


**Figura 40. Protocolo de diferenciación de células madre embrionarias de ratón hacia células productoras de insulina con la línea celular D3.** A) Esquema del protocolo de diferenciación, mostrando las condiciones de cultivos, tratamientos y días. B) Morfología celular de cada paso del protocolo de diferenciación mediante un microscopio Leica en campo claro.

Para analizar la expresión génica durante el desarrollo del protocolo de diferenciación, se recogieron las células tras cada paso del protocolo y se analizaron marcadores característicos de endodermo definitivo (*Sox17*, *FoxA2*, *Hnf1 $\beta$* ), progenitor pancreático (*Pdx1*, *Pax4*, *Nkx6.1*), células beta (*Insulina1*, *Glut2*, *Glucoquinasa* y *Kir6.2*), y otros marcadores de islotes (*Amilasa2*, *Glucagón* y *Somatostatina*). Los resultados obtenidos muestran, tal y como se describió en el protocolo diseñado previamente en el laboratorio, que el tratamiento con DETA-NO incrementa el nivel de expresión de *Pdx1*, además de *Nkx6.1*, *Ptf1a* y *Nkx2.2* (no analizados previamente) y que la exposición durante 6 días con ácido valproico incrementa la expresión de *Sox17*, *FoxA2* y *Hnf1 $\beta$* . El tratamiento con P300i consiguió incrementar el nivel de expresión de *Pdx1*, *Pax4* y *Kir6.2*, y tras el cultivo en suspensión se observa la expresión, además de *Pdx1*, *Glut2*, *Insulina*, *Kir6.2* y *Glucoquinasa*, marcadores característicos de células  $\beta$ . Además, se analizó la expresión de *Glucagón* y *Somatostatina*, como marcadores característicos de células  $\alpha$  y  $\delta$ , respectivamente, y *Amilasa2*, como marcador de células exocrinas, no encontrándose indicios de expresión de estos genes (Figura 41 y 42).

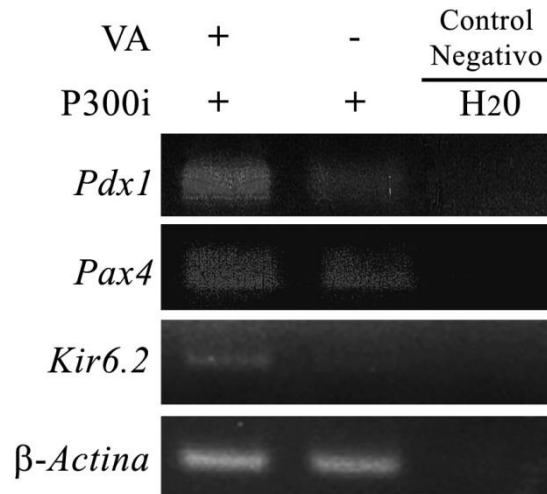


**Figura 41. Marcadores de endodermo definitivo, progenitor pancreático y células beta expresados durante el desarrollo del protocolo de diferenciación de células D3.** Análisis de la expresión por PCR cualitativa de genes endodermo definitivo (*Sox17*, *FoxA2*, *Hnf1b*), progenitor pancreático (*Pdx1*, *Pax4*, *Nkx6.1*), células beta (*Insulina1*, *Glut2*, *Glucocinasa* y *Kir6.1*), y otros marcadores (*Amilasa2*, *Glucagón* y *Somatostatina*) a diferentes días del protocolo de diferenciación (día 0, 3, 4, 10, 11 y 14). La expresión del gen *β-Actina* fue usado como control de carga. Como controles positivos de expresión se empleó vísceras de embrión (V), páncreas de ratón adulto (P) e islotes pancreáticos de ratón (I). Esta imagen es representativa de 3-5 experimentos independientes para la expresión de los marcadores en el protocolo de diferenciación y los controles víscera y páncreas, y sólo una réplica para el control de islotes.



**Figura 42. Expresión de marcadores pancreáticos durante el desarrollo del protocolo de diferenciación de células D3.** Análisis de la expresión de marcadores pancreáticos mediante gráficos de cajas y puntos de dispersión a distintos días durante el protocolo de diferenciación por PCR cuantitativa. La expresión relativa fue calculada con el algoritmo  $\Delta\Delta C_t$ , tomando como control endógeno la expresión del gen  $\beta$ -Actina y como muestra calibradora la expresión a día 0. Cada punto representa el valor de expresión relativa de un experimento y la línea horizontal indica la mediana de los datos. El análisis estadístico muestra la significancia estadística de cada muestra respecto a la muestra recogida el día anterior al analizado. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Para comprobar que la adición del VA es necesario para el desarrollo del protocolo de diferenciación, se llevó a cabo un protocolo sin adición de esta molécula, seguido con el tratamiento de P300i, y se compararon los niveles de expresión de los genes *Pdx1*, *Pax4* y *Kir6.2*, los cuales incrementan su expresión tras la exposición a P300i en un protocolo completo. El resultado de este ensayo determinó que el protocolo al cual se le adiciona VA y P300i, presenta un mayor nivel de expresión de estos tres genes, siendo más significativa esta diferencia en la expresión de *Kir6.2* (Figura 43). Así demostramos que, aunque el incremento de expresión de *Pdx1*, *Pax4* y *Kir6.2* se observe tras el tratamiento con P300i, el VA ayuda a que este incremento tenga lugar. Posiblemente, los genes de endodermo definitivo que se expresan de forma significativa después de los 6 días de cultivo con VA, *Sox17*, *FoxA2* y *Hnf1b*, sean necesarios para la expresión de estos genes más tardíos.

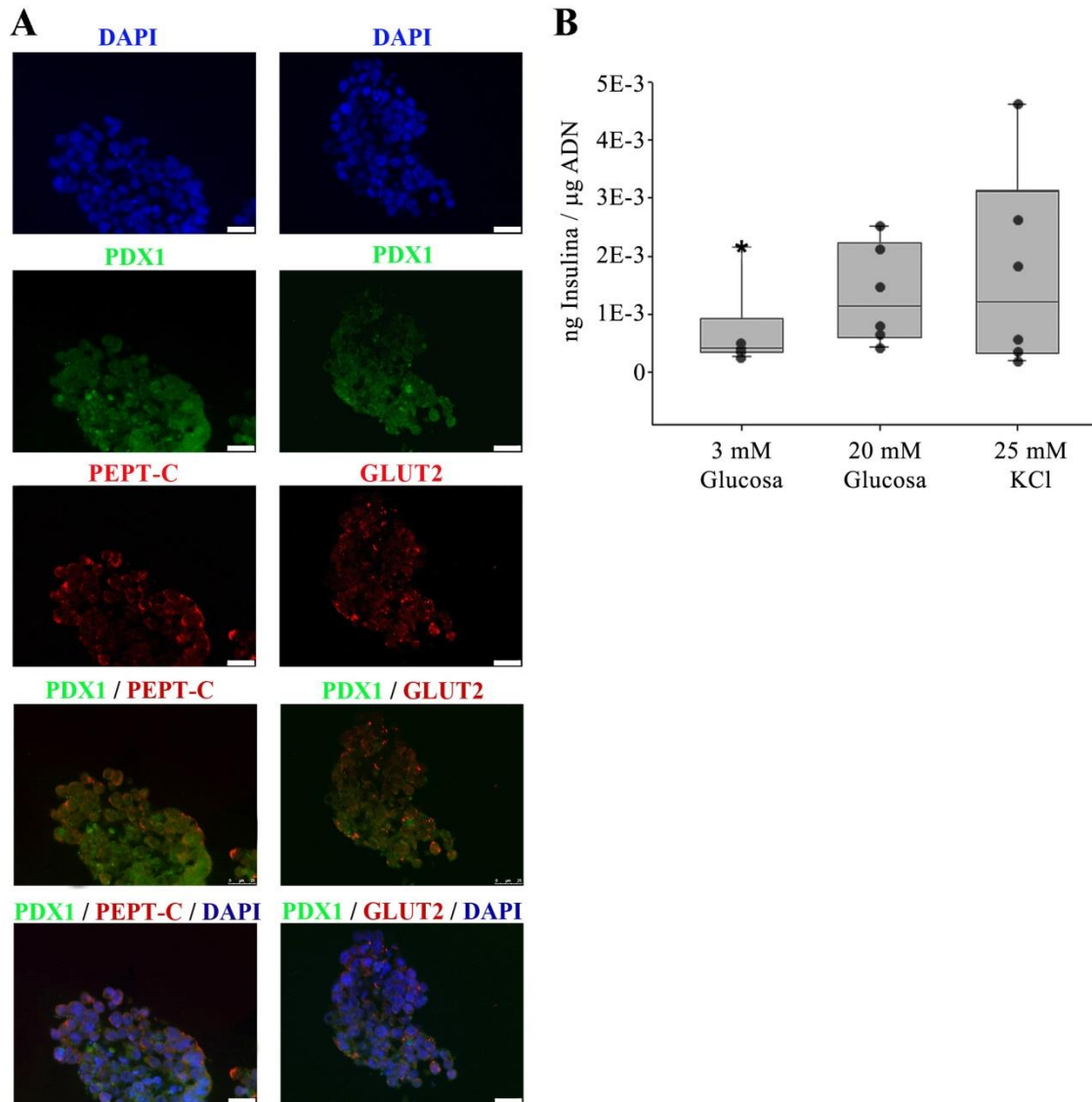


**Figura 43. El ácido valproico es necesario para el correcto desarrollo del protocolo de diferenciación.** Análisis de la expresión por PCR cualitativa de genes marcadores de progenitor pancreático (*Pdx1* y *Pax4*) y de células beta (*Kir6.2*), en un protocolo de diferenciación completo o sin el uso de ácido valproico. La expresión del gen  $\beta$ -Actina fue usado como control de carga. Como control negativo se empleó agua.

Una vez conocido que el protocolo de diferenciación es eficaz en obtener células que expresan insulina a nivel de ARN mensajero, decidimos comprobar si estas células son capaces de sintetizarla y procesarla. Para ello, llevamos a cabo ensayos de inmunofluorescencia con los agregados obtenidos tras el protocolo de diferenciación cortados con el microtono. Los resultados obtenidos muestran que los agregados presentan células positivas para PÉPTIDO-C y PDX1, además de células positivas para GLUT-2 y PDX1 (Figura 44A). De esta manera comprobamos que las células obtenidas son capaces de procesar la pro-insulina en insulina y Péptido-C, y que presentan en su membrana celular el transportador de glucosa Glut-2, necesario para el transporte de glucosa al interior celular.

Finalmente, decidimos estudiar si las células obtenidas tras el protocolo de diferenciación son completamente maduras y liberan insulina en respuesta a glucosa y a otros secretagogos. Para ello, estimulamos los agregados celulares con una solución baja en concentración de glucosa (3 mM), alta concentración de glucosa (20 mM) y una solución con KCl (25 mM), y recogimos el sobrenadante, el cual utilizamos en un ensayo de ELISA de insulina. El resultado de este experimento confirmó que las células generadas en cultivo son maduras, siendo capaces de responder a los cambios de glucosa del medio, y al KCl, el cual induce una despolarización de la membrana plasmática (Figura 44B).

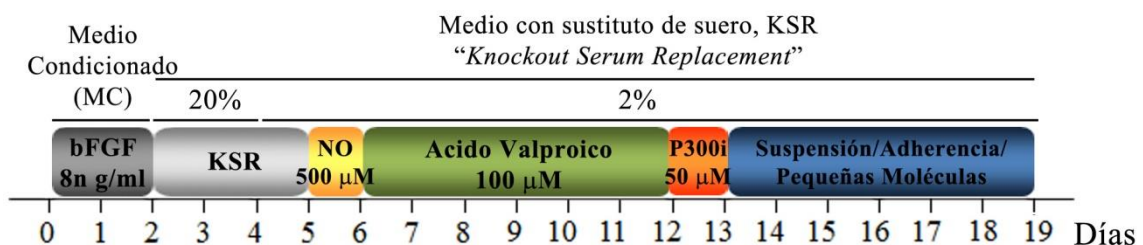




**Figura 44.** El protocolo de diferenciación consigue obtener células maduras capaces de liberar insulina en respuesta a glucosa. **A)** Las imágenes muestran las células de la línea celular D3 diferenciadas según el protocolo de diferenciación celular, y estudiadas a día 14 de cultivo. Las células fueron marcadas con DAPI (azul), PÉPTIDO-C y GLUT2 (rojo) y PDX1 (verde). Barra de escala: 25µM. Las imágenes mostradas son representativas de 3 experimentos independientes. **B)** La gráfica de cajas y bigotes muestra la liberación de insulina de los agregados formados tras el protocolo de diferenciación. Cada círculo negro representa el valor obtenido en un experimento independiente (n=6). El eje Y representa la cantidad de insulina liberada en ng Insulina / µg DNA. La estimulación de glucosa a 3 mM estuvo valores comprendidos entre 2,74E-4 – 2,15E-3 (\*); cuando se estimuló con glucosa a 20 mM la concentración de insulina medida fue 4,31E-4 – 2,53E-3; y tras la estimulación con KCl a 25 mM se obtuvieron unos valores de insulina de 2,01E-4 – 4,61E-3. La línea horizontal indica la mediana de los valores obtenidos. (\*) Indica un valor atípico.

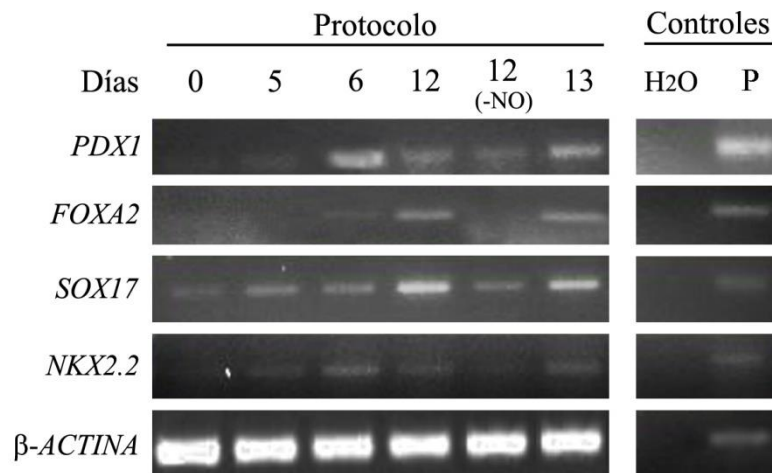
### 4.2.2 Desarrollo de un protocolo de diferenciación de células embrionarias humanas hacia células productoras de insulina

Una vez desarrollado un protocolo de diferenciación exitoso hacia células productoras de insulina a partir de células madres embrionarias de ratón, decidimos comprobar su reproducibilidad en células humanas, en primer lugar, mediante el uso de la línea celular HS181. Para el desarrollo y optimización del protocolo de diferenciación en éstas células, se varió principalmente dos puntos en el protocolo. Por un lado, variamos el número de días de cultivos previo al tratamiento con DETA-NO; y por otro, el momento de la disminución de suero, o en este caso, el sustituto de suero (*KSR*). De esta manera, el protocolo de diferenciación en células humanas se puede resumir como sigue. En primer lugar, las células fueron crecidas durante las primeras 48 horas con medio condicionado por fibroblastos y suplementado con bFGF, para generar un ambiente óptimo de crecimiento y proliferación. Tras este periodo, el medio es reemplazado por medio sin condicionar, manteniendo la misma concentración de *KSR* que en el medio condicionado (20%), durante 2 días, momento en el cual esta concentración se redujo al 2% hasta el final del protocolo. Al día 5 de cultivo, las células son expuestas a 500  $\mu\text{M}$  de DETA-NO durante 19 horas. A continuación, las células se mantienen en cultivo durante 6 días con 100  $\mu\text{M}$  de VA y después son sometidas a un tratamiento de 50  $\mu\text{M}$  de inhibidor de P300 (P300i) durante unas 20 horas. Finalmente, procedemos a desarrollar un paso de maduración final. Debido a que el comportamiento de las células humanas es diferente a las de ratón, este paso de maduración está siendo optimizado mediante el cultivo de las células en suspensión y/o adherencia y empleo de pequeñas moléculas, como nicotinamida o resveratrol (Figura 45).



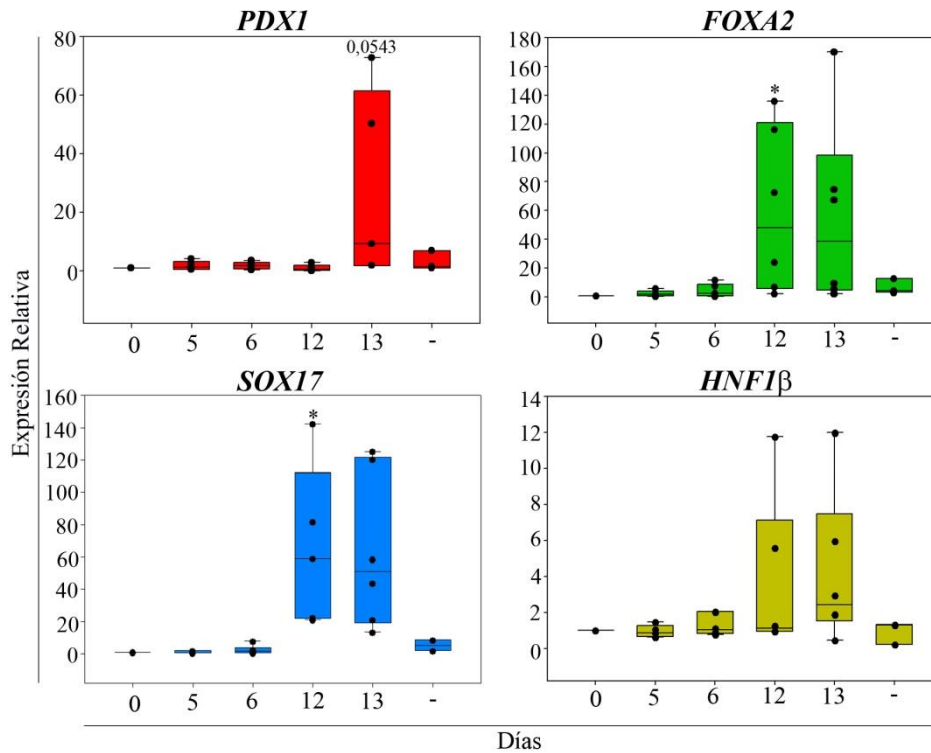
**Figura 45. Protocolo de diferenciación de células madre embrionarias humana hacia células productoras de insulina con la línea celular HS181.** El esquema representa el protocolo de diferenciación, mostrando las condiciones de cultivos, tratamientos y días.

En primer lugar, nos centramos en analizar la reproducibilidad del protocolo hasta la exposición del inhibidor de P300. Para analizar la expresión génica a cada paso del protocolo de diferenciación, se recogieron las células y analizaron a día 0, que corresponden a células mantenidas con medio condicionado suplementado con bFGF, y a los días 5, 6, 12 y 13 del protocolo. En estos puntos, se analizó de expresión de marcadores característicos de endodermo definitivo (*SOX17* y *FOXA2*) y progenitor pancreático (*PDX1* y *NKX2.2*). Los resultados mostraron que el tratamiento con DETA-NO, incrementa la expresión *PDX1* y *NKX2.2*, la exposición a VA durante 6 días, incrementa los niveles de expresión de las marcadores de endodermo definitivo, *FOXA2* y *SOX17*, y el tratamiento con P300i, induce un aumento de expresión de *PDX1*, de igual manera que sucede en las células madre embrionarias de ratón. Además, desarrollamos un protocolo de diferenciación en el cual las células fueron expuestas a VA durante 6 días, pero sin haber sido tratadas previamente con NO. Los resultados de este protocolo muestran que la expresión de *FOXA2*, *SOX17* y *NKX2.2* se ve drásticamente disminuida comparada con la obtenida en un protocolo donde las células son tratadas con NO previamente a la exposición a VA (Figura 46).



**Figura 46. Marcadores de endodermo definitivo y progenitor pancreático durante el desarrollo del protocolo de diferenciación de células HS181.** Análisis de la expresión por PCR cualitativa de genes endodermo definitivo (*SOX17* y *FOXA2*) y progenitor pancreático (*PDX1* y *NKX2.2*) a diferentes días del protocolo de diferenciación (día 0, 5, 6, 12 y 13). Además, se desarrolló un protocolo de diferenciación sin la adición de NO y fue recogido a día 12 tras los 6 días de cultivo con ácido valproico (día 12-NO). La expresión del gen de la  $\beta$ -*ACTINA* fue usado como control de carga. Como control positivo se empleó muestras de páncreas humano comercial (P) y como control negativo agua. Las imágenes mostradas son representativas de 3-5 experimentos independientes.

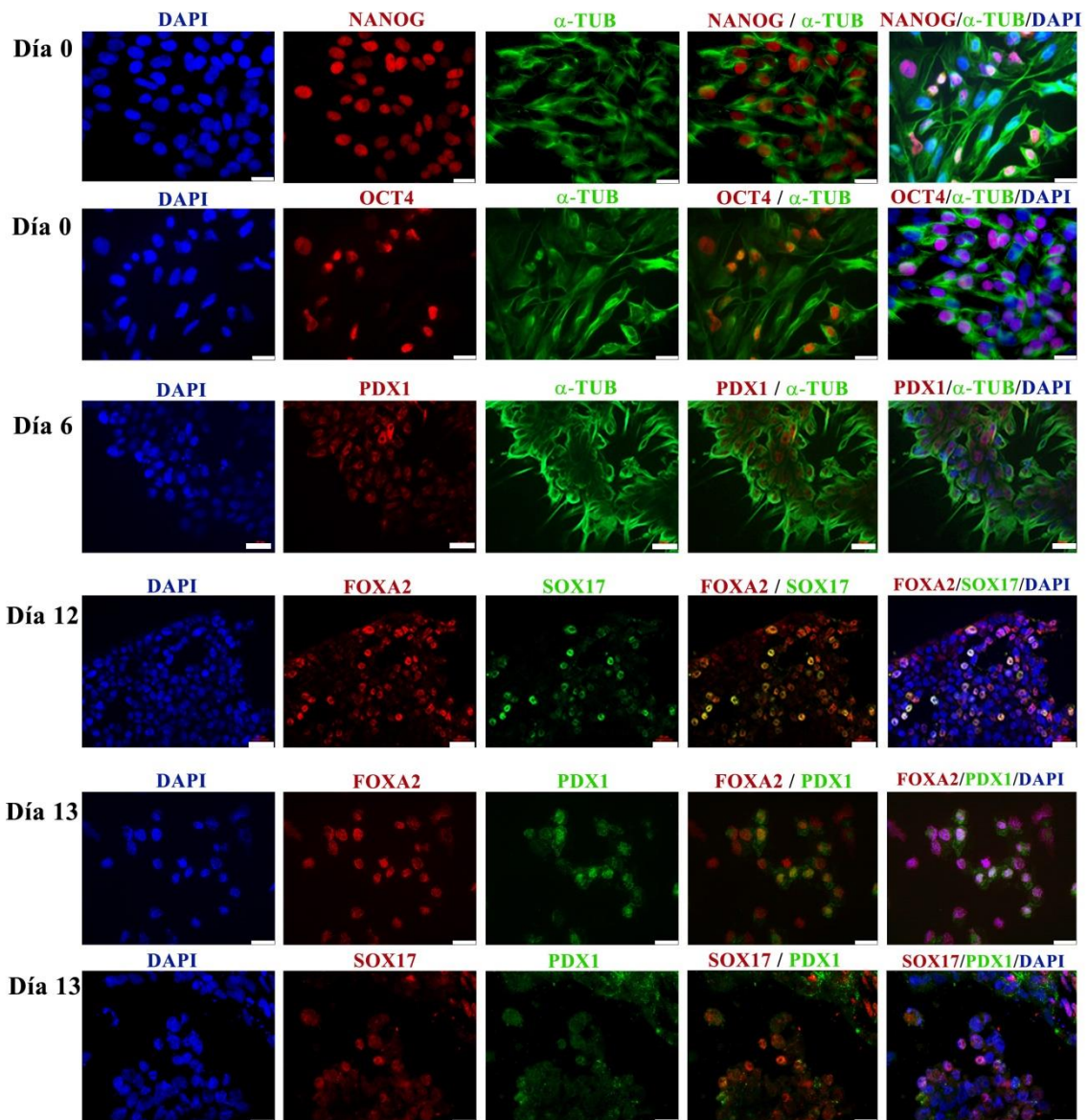
Para analizar si los cambios de expresión de los marcadores de endodermo definitivo y de *PDX1* son significativos, se analizó la expresión por PCR cuantitativa. Además, como control de diferenciación espontánea se cultivaron células en el mismo medio de cultivo que el protocolo completo, pero no se adicionó ninguna molécula. Este ensayo mostró que el tratamiento con NO incrementa significativamente la expresión de *PDX1*, el tratamiento con VA, induce significativamente la expresión de *FOXA2*, *SOX17* y *HNF1β* y la exposición con P300i, incrementa la expresión de *PDX1*, a la vez que mantiene la expresión de *SOX17*, *FOXA2* y *HNF1β* (Figura 47).



**Figura 47. Expresión de marcadores de endodermo definitivo y *PDX1* durante el desarrollo del protocolo de diferenciación de células HS181.** Análisis de la expresión de marcadores pancreáticos mediante gráficos de cajas y puntos de dispersión a distintos días durante el protocolo de diferenciación por PCR cuantitativa. Como control de diferenciación espontánea (-) se crecieron las células en el mismo medio de cultivo que el protocolo completo, pero sin adición de ninguna molécula. La expresión relativa fue calculada con el algoritmo  $\Delta\Delta Ct$ , tomando como control endógeno la expresión del gen  $\beta$ -Actina y como muestra calibradora la expresión a día 0. Cada punto representa el valor de expresión relativa de un experimento y la línea horizontal indica la mediana de los datos. El análisis estadístico muestra la significancia estadística de cada muestra respecto a la muestra recogida el día anterior al analizado. \* $p < 0,05$ .

Para comprobar la expresión de los marcadores de endodermo definitivo, FOXA2 y SOX17, y PDX1 a nivel de proteína, realizamos una inmunofluorescencia a distintos días del protocolo de diferenciación. Además, comprobamos la pluripotencia de las células HS181, marcando las células mantenidas en medio condicionado y suplementado con bFGF con NANOG y OCT4, dos marcadores importantes en el mantenimiento del estado indiferenciado. El resultado de la inmunofluorescencia indica que las células HS181 mantenidas en condiciones de pluripotencia presentan altos niveles de expresión de NANOG y OCT4, marcándose intensamente los núcleos celulares, lo que indica la gran capacidad diferenciadora de estas células. Por otro lado, tras el tratamiento con DETA-NO, día 6 de cultivo, se observó la expresión de PDX1 con localización nuclear. En el día 12 de cultivo, tras la exposición de las células a VA durante 6 días, se observa la expresión de FOXA2 y SOX17, observándose claramente colocalización entre ambos. Finalmente, tras el tratamiento con P300i, se observan células positivas para FOXA2 y SOX17, y a su vez, un porcentaje de ellas son positivas para PDX1 (Figura 48).

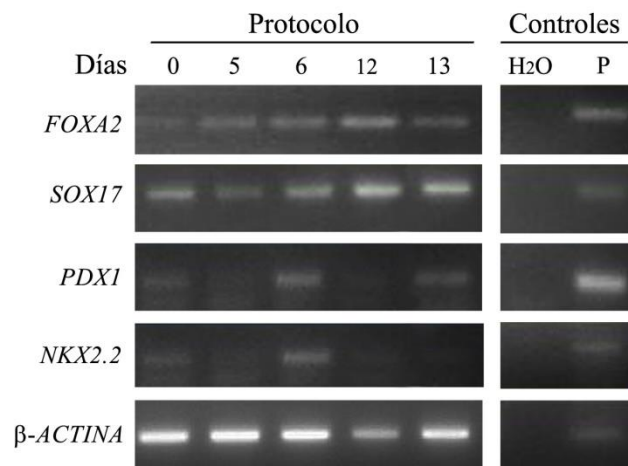
Según los resultados obtenidos en la línea celular HS181, el protocolo de diferenciación, hasta la adición del P300i, puede ser reproducido en células humanas. Aunque tras el tratamiento con DETA-NO no se observa un incremento significativo a nivel de ARNm mediante PCR a tiempo real, mediante inmunofluorescencia detectamos la proteína con localización nuclear. Además, el cultivo continuado durante 6 días con VA promueve la expresión de genes de endodermo definitivo y la inhibición de la histona acetiltransferasa P300 induce significativamente la expresión de Pdx1.



**Figura 48. Análisis de marcadores en cada paso del protocolo de diferenciación.** Las imágenes muestran las células de la línea celular HS181 a cada paso del protocolo de diferenciación estudiado. A día 0, cultivo en medio condicionado suplementado con bFGF, las células fueron marcadas con DAPI (azul), los marcadores de pluripotencia NANOG y OCT4 (rojo) y  $\alpha$ -TUBULINA (verde). A día 6, tras el tratamiento con DETA-NO, las células se marcaron con DAPI (azul), PDX1 (rojo) y  $\alpha$ -TUBULINA (verde). Tras los 6 días de cultivo con exposición a VA, día 12, las células fueron marcadas con DAPI (azul), FOXA2 (rojo) y SOX17 (verde). Finalmente, a día 13, tras el tratamiento con P300i, las células se marcaron con DAPI (azul), FOXA2 y SOX17 (rojo) y PDX1 (verde). Barra de escala: 25  $\mu$ M. Las imágenes mostradas son representativas de 3 experimentos independientes.

### 4.2.3 Desarrollo de un protocolo de diferenciación de células de pluripotencia inducida humanas hacia células productoras de insulina

Llegados a este punto, quisimos dar un paso más y comprobar si el protocolo puede ser reproducible en células de pluripotencia inducida (iPSC) humanas. Para ello, desarrollamos el protocolo de diferenciación en la línea celular MSUH001 y analizamos la expresión génica a cada paso del protocolo de diferenciación, de igual manera que se hizo con la línea celular HS181. Los resultados mostraron que el tratamiento con DETA-NO, incrementa la expresión *PDX1* y *NKX2.2*, el cultivo con VA durante 6 días, incrementa los niveles de expresión de los marcadores de endodermo definitivo, *FOXA2* y *SOX17*, y el tratamiento con P300i, induce un nuevo aumento de expresión de *Pdx1*, de igual manera que sucede en las líneas celulares D3 y HS181 (Figura 49).



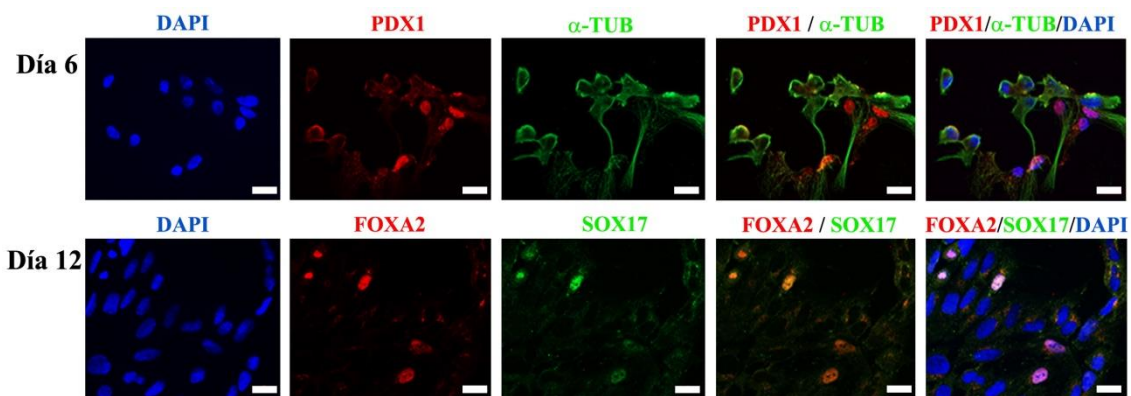
**Figura 49. Marcadores de endodermo definitivo y progenitor pancreático durante el desarrollo del protocolo de diferenciación de células MSUH001.** Análisis de la expresión por PCR cualitativa de genes endodermo definitivo (*SOX17* y *FOXA2*) y progenitor pancreático (*PDX1* y *NKX2.2*) a diferentes días del protocolo de diferenciación (día 0, 5, 6, 12 y 13). La expresión del gen  $\beta$ -*ACTINA* fue usado como control de carga. Como control positivo se empleó muestra de ADN complementario de páncreas humano comercial (P) y como control negativo, agua. Esta imagen es representativa de 2 experimentos independientes.

Según la expresión de los marcadores de endodermo definitivo, *FOXA2* y *SOX17*, y progenitor pancreático, *PDX1* y *NKX2.2*, parece ser que el protocolo de diferenciación hacia células productoras de insulina puede reproducirse en la línea celular MSUH001. Sin embargo, la muerte celular durante el desarrollo del protocolo en esta línea celular fue mucho más pronunciada en comparación con la línea celular

HS181. La reducción del sustituto de suero, *KSR*, hasta el 2% el día 4 de cultivo, el tratamiento con 500  $\mu\text{M}$  de DETA-NO y la exposición a 50  $\mu\text{M}$  de P300i causaron una muerte celular bastante significativa, pudiéndose observar tanto al microscopio invertido como por el tamaño del pellet celular que se recoge en cada paso del protocolo.

No obstante, decidimos estudiar la expresión a nivel de proteína de los marcadores PDX1, SOX17 y FOXA2, mediante inmunofluorescencia. El resultado de este ensayo indica que las células de la línea celular MSUH001 expuestas a 500  $\mu\text{M}$  de DETA-NO, día 6 de cultivo, expresan PDX1 con localización nuclear. Tras la exposición de las células a VA durante 6 días consecutivos, día 12 de cultivo, se observa la expresión de FOXA2 y SOX17, observándose de forma clara colocalización entre ambos (Figura 50). La inmunofluorescencia tras el tratamiento con P300i, día 13 de cultivo, no mostró resultados claros, debido a la baja cantidad de células adheridas que se encontró en este punto del protocolo.

Estos resultados indican que el protocolo de diferenciación desarrollado en la línea celular HS181 podría ser reproducible en la línea celular MSUH001. Sin embargo, algunos ajustes deberían ser llevados a cabo para evitar, en la medida de lo posible, la muerte celular que tiene lugar durante el desarrollo del protocolo de diferenciación en esta línea celular.



**Figura 50. Análisis de la expresión de PDX1 y marcadores de endodermo definitivo.** Las imágenes muestran las células de la línea celular MSUH001 en dos puntos del protocolo de diferenciación. A día 6, tras el tratamiento con DETA-NO, las células se marcaron con DAPI (azul), PDX1 (rojo) y  $\alpha$ -TUBULINA (verde). Tras los 6 días de cultivo con exposición a VA, día 12, las células fueron marcadas con DAPI (azul), FOXA2 (rojo) y SOX17 (verde). Barra de escala: 25  $\mu\text{M}$ . Las imágenes mostradas son representativas de 2 experimentos independientes.

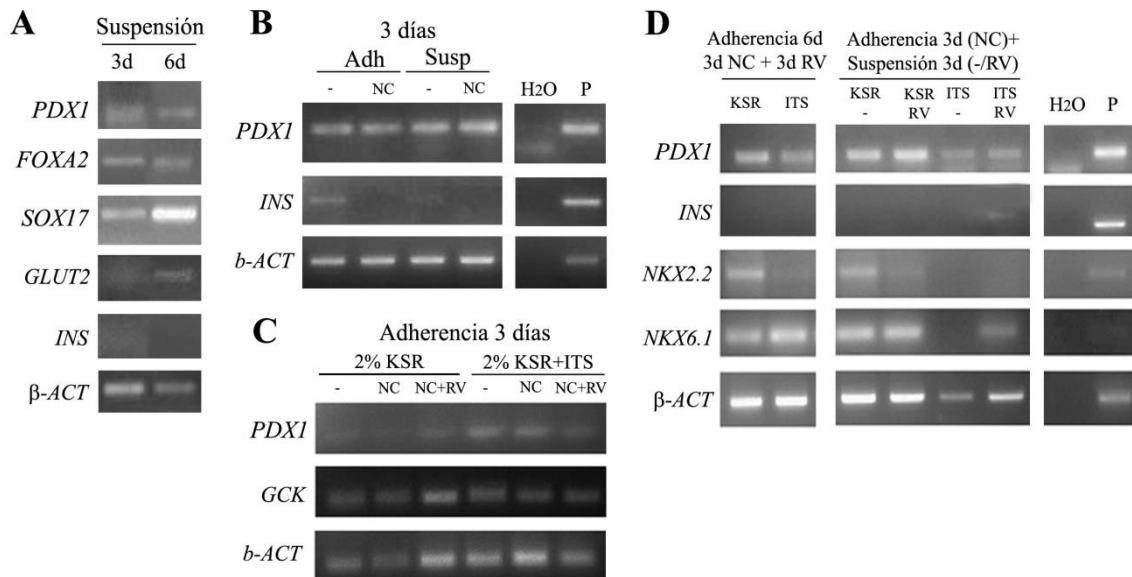


#### 4.2.4 Proceso de maduración hacia células productoras de insulina en la línea celular HS181

Nuestro objetivo principal es obtener *in vitro* células maduras productoras de insulina, por lo que debemos continuar el protocolo diseñado previamente, al menos hasta obtener señal de expresión de insulina y otros marcadores característicos de células  $\beta$ . Para ello, utilizamos la línea celular HS181, que es la que mejores resultados nos ha proporcionado y mejor ha respondido al protocolo, y procedemos a madurarlas utilizando distintas estrategias. Para el paso de maduración final, tras el protocolo de diferenciación desarrollado hasta la exposición a P300i, cultivamos las células en suspensión y/o adherencia durante 3 y 6 días con medio de cultivo al 2% de *KSR* y/o suplementado con Insulina-Transferrina-Selenito de sodio (ITS), y adición de pequeñas moléculas como nicotinamida (NC) y resveratrol (RV).

En primer lugar, procedimos a madurar las células mediante un cultivo en suspensión, para reproducir exactamente el protocolo de diferenciación desarrollado en células de ratón. Después de 3 y 6 días de cultivo en suspensión con medio al 2% de *KSR*, las células mostraron expresión de *PDX1*, *FOXA2* y *SOX17*. Además, se observó expresión de *GLUT2* a 6 día de cultivo, pero no expresión de insulina, que solo se intuye muy ligeramente a día 3 de cultivo (Figura 51A). Posteriormente, procedimos a analizar si el cultivo en suspensión mejora la expresión de *PDX1* con respecto a un cultivo en adherencia, y si la adición de 10 mM de NC durante 3 días consecutivos, puede ayudar a conseguir expresión de insulina. Para ello, cultivamos las células durante 3 días en adherencia y suspensión y adicionamos o no, NC. El resultado de este ensayo mostró que el cultivo en adherencia y suspensión presentan niveles de *PDX1* bastante similares. Además, igual que el caso anterior, se observó expresión de insulina, en células maduras mediante cultivo en suspensión durante 3 días, pero el cultivo en adherencia presentó mayor nivel de expresión de insulina. Por otro lado, la adición de NC no ayudó a incrementar los niveles de expresión *PDX1*, y parece afectar negativamente a la expresión de insulina (Figura 51B). A continuación decidimos analizar, si el medio condicionado con ITS produce algún efecto en la expresión de *PDX1*. Además, volvimos a utilizar NC, además de RV a 75  $\mu$ M. Para este ensayo las células fueron cultivadas durante 3 días en adherencia en medio *KSR* o *KSR* suplementado con ITS y en presencia o ausencia de NC durante 3 días, o NC durante 2 días y los 2 días finales con RV, solapándose de esta manera en cultivo a día 2 con

ambas moléculas. El resultado de este ensayo mostró que la expresión de *PDX1* parece ser un poco más elevada en medio suplementado con ITS, mientras que la adición de NC o NC más RV no varió su expresión (las pequeñas variaciones de expresión observadas podrían deberse a cambios en el ARN de partida, pues la expresión de  $\beta$ -*ACTINA* también presenta ligeros cambios). Además, medimos la expresión de glucoquinasa, no observándose cambios significativos en la expresión de la misma en las diferentes condiciones de cultivo (Figura 51C). Finalmente, de la misma manera, decidimos realizar cultivo celulares en medio *KSR* y suplementado con ITS, y o adición de NC y RV, pero esta vez durante 6 días de cultivo. Por un lado, cultivamos las células durante 6 días en adherencia en medio *KSR* y *KSR* suplementado con ITS. Los primeros 3 días en presencia de NC 10 mM y los 3 días siguientes con RV 75  $\mu$ M. En estas dos condiciones de cultivo, medimos la expresión de *PDX1*, la cual fue más elevada en medio *KSR*, al igual que la expresión de *NKX2.2*. Sin embargo, *NKX6.1* parece mostrar mayor expresión en medio suplementado con ITS. La expresión de insulina no se detectó en ninguno caso (Figura 51, panel izquierdo). Por otro lado, cultivamos las células en adherencia por 3 días y en presencia de NC, en medio *KSR* o *KSR* suplementado con ITS y 3 días en suspensión en presencia o ausencia de RV. Los resultados de PCR de este experimento, mostraron que la expresión de  $\beta$ -*ACTINA* fue bastante diferente entre las células cultivadas con medio *KSR* y *KSR*-ITS, por lo que será complicado poder comparar entre ellos la expresión de los genes de interés, si pudiendo comprobar el efecto de adición de RV pues la expresión de  $\beta$ -*ACTINA* es algo más similar. De esta manera, mediante este experimento podemos deducir que la adición de RV no afectó a la expresión de *PDX1*, disminuye la expresión de *NKX2.2* y parece incrementar el nivel de expresión de *NKX6.1*, como ocurrió en el caso anterior. Además, se observó expresión de insulina en las células cultivadas en medio *KSR*-ITS y en presencia de RV (Figura 54D, panel derecho). Como se puede comprobar, la maduración de las células humanas es un proceso complejo que requiere optimizar rigurosamente las condiciones de cultivo para obtener la mejor condición que ayude a obtener células maduras in vitro.



**Figura 51. Marcadores de endodermo definitivo, progenitor pancreático y células  $\beta$  expresados tras el paso de maduración final del protocolo de diferenciación de células HS181.** **A)** Maduración mediante cultivo en suspensión durante 3 y 6 días. **B)** Maduración mediante 3 días de cultivo en adherencia y suspensión y presencia o ausencia (-) de nicotinamida 10 mM (NC). **C)** Maduración mediante 3 días de cultivo celular en adherencia en medio *KSR* al 2%, y este mismo medio suplementado con Insulina (1,72  $\mu$ M)- Transferrina (0,069  $\mu$ M)- Selenito de sodio (0,039  $\mu$ M) (ITS), y/o adición de nicotinamida 10 mM (NC) durante las primeras 48 horas del cultivo y resveratrol 75  $\mu$ M (RV), las últimas 48 horas, solapándose entre ellas 24 horas (día 2). **D)** Panel izquierdo: Maduración mediante 6 días de cultivo en adherencia en medio *KSR* al 2% y en este mismo medio suplementado con ITS. Los 3 primeros días se expuso el cultivo a 10 mM de nicotinamida (NC), y los 3 días finales a resveratrol 75  $\mu$ M (RV). Panel derecho: Maduración mediante 3 días de cultivo en adherencia y nicotinamida 10 mM (NC) y 3 días consecutivos de cultivo en suspensión en presencia o ausencia de resveratrol 75  $\mu$ M (RV). Además, se comparó entre los medios *KSR* al 2% y este mismo suplementado con ITS (ITS). Como control negativo de la técnica se usó agua, y como control positivo ADNc de páncreas humano comercial (P). La expresión del gen  $\beta$ -*ACTINA* fue usado como control de carga.

Según los resultados obtenidos en estos experimentos de maduración, podemos concluir que el cultivo en adherencia durante 3 días en medio *KSR* al 2% es eficaz porque permite la expresión de *PDX1*, *GCK* e *INS*. Sin embargo, la adición de nicotinamida en este punto parece no ser beneficiosa. Por otro lado, la combinación de cultivo en adherencia con nicotinamida durante 3 días y cultivo en suspensión con medio *KSR*-ITS hasta día 6, junto con la exposición a resveratrol, también parece ser

eficaz, encontrándose expresión de *PDX1*, *INS* y *NKX6.1*. Para conocer qué procedimiento es más eficaz deberemos realizarlos de forma simultánea y compararlos entre ellos, además de probar nuevas condiciones de cultivo, como este último protocolo de 6 días de maduración, combinando adherencia y suspensión pero sin la adición previa de nicotinamida, ya que parece no ayudar en este punto a la expresión de *INS*. Estos experimentos mencionados, juntos con otros que muestren la expresión a nivel de proteínas, su localización celular y medida de la liberación controlada de insulina en respuesta a glucosa de las células obtenidas al final del protocolo, han quedado pendientes de realizar.

## **Bloque 3**

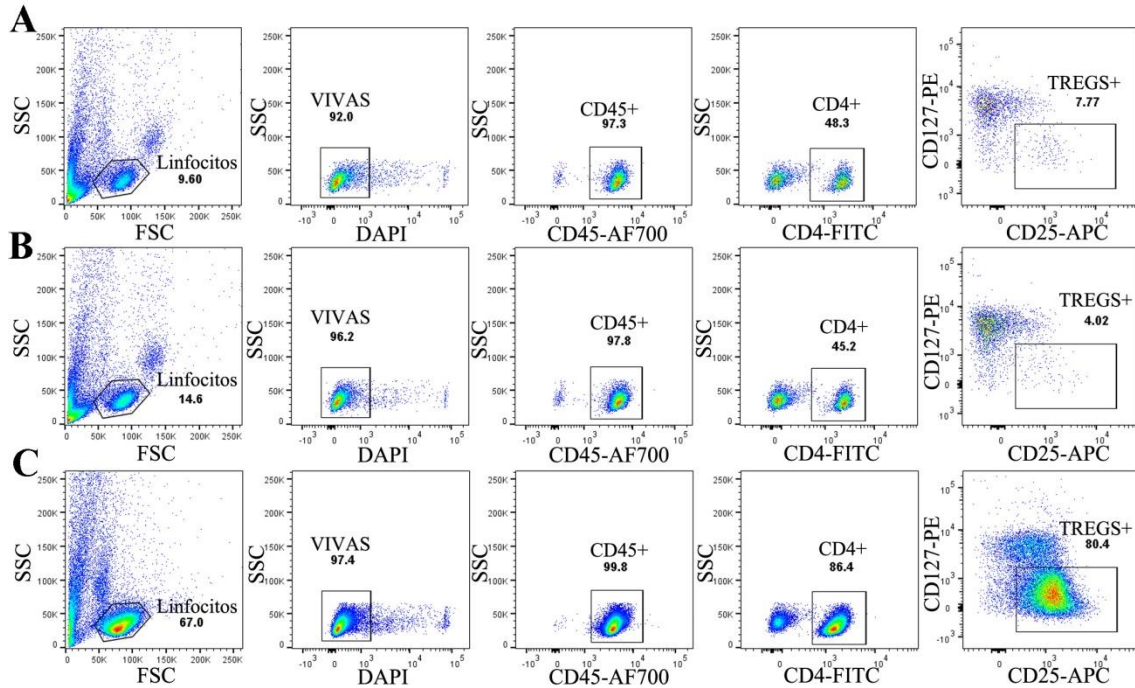
### **4.3 Estudio de las Células T reguladoras de Cordón Umbilical y Sangre Periférica de adulto**

*En este bloque de la tesis se realiza un estudio de caracterización comparativo de células T reguladoras (Treg) derivadas de Sangre Periférica de Adulto y Sangre de Cordón Umbilical. Además, las células procedentes de Cordón Umbilical son aisladas mediante dos técnicas distintas, una basada en un sistema de separación por columnas (Miltenyi Biotec Kit) y una nueva tecnología que parte directamente de la sangre total y no requiere uso de columnas magnéticas (Streptamer). Este estudio tiene como objetivo la búsqueda de fuentes de células T reguladoras humanas para la terapia celular de la DM y permitirá conocer si la procedencia de las células T reguladoras y/o la técnica empleada para su aislamiento pueden influir en sus características. Los resultados revelan que la capacidad de proliferación in vitro es independiente de la procedencia de las células y o técnica de selección utilizada; mientras que se muestran diferencias significativas de pureza, expresión de marcadores característicos de las células T reguladoras y en el patrón de liberación de citocinas, según la procedencia de las células y la tecnología usada para su selección.*

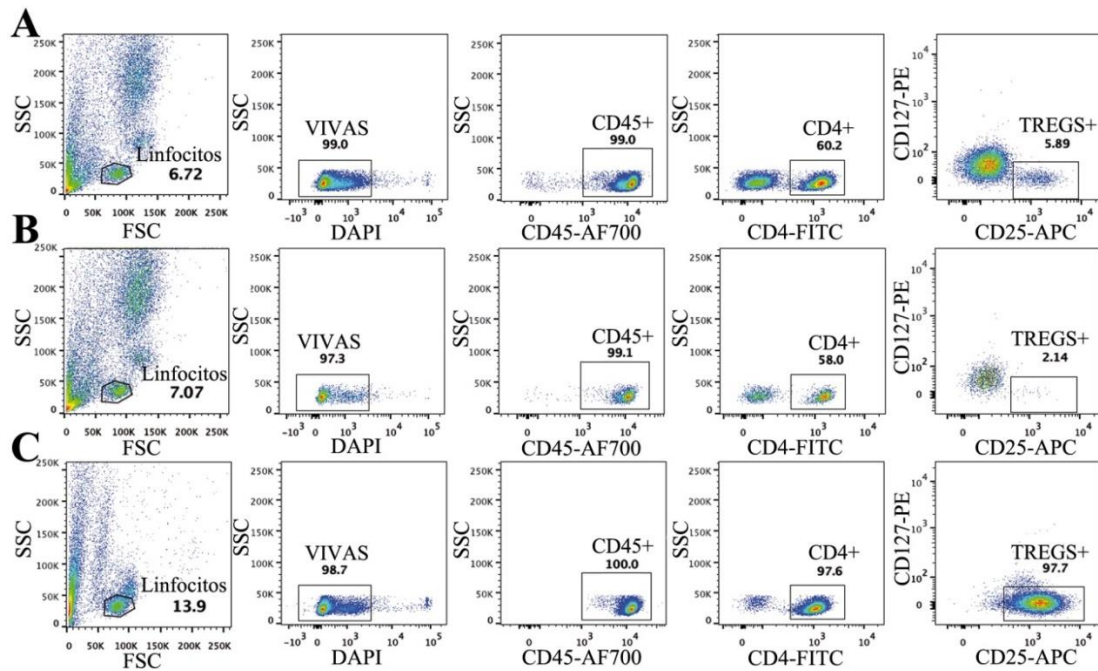
#### **4.3.1 Aislamiento de células T reguladoras**

El primer paso para la realización del estudio fue la selección de las células Treg de Sangre Periférica de Adulto (PB Treg) y de Sangre de Cordón Umbilical (CB Treg) por el método de selección basado en columnas, *Miltenyi Biotec Kit*. Este procedimiento de selección parte del aislamiento previo de las células mononucleares de la sangre mediante un gradiente de densidad con Ficoll. Las células Treg son seleccionadas de las células mononucleares mediante marcaje con complejos del anticuerpo anti-CD25 y partículas magnéticas, y pasadas por columnas colocadas en un soporte con campo magnético. Para conocer la pureza de las células Treg aisladas, las células seleccionadas son marcadas con el panel de anticuerpos CD45-AF700, CD4-FITC, CD25-APC y CD127-PE. Además, también se marcaron las células mononucleares y las células no retenidas a la columna, para saber cuánta proporción de células Treg tiene el material de partida, cuántas se pierden y cuántas se seleccionan al final del proceso, pudiendo calcular así el rendimiento de la técnica.

Una imagen representativa del resultado para la selección de células PB Treg (Figura 52) y CB Treg (Figura 53) con el sistema de selección *Miltenyi Biotec Kit* se muestra a continuación.

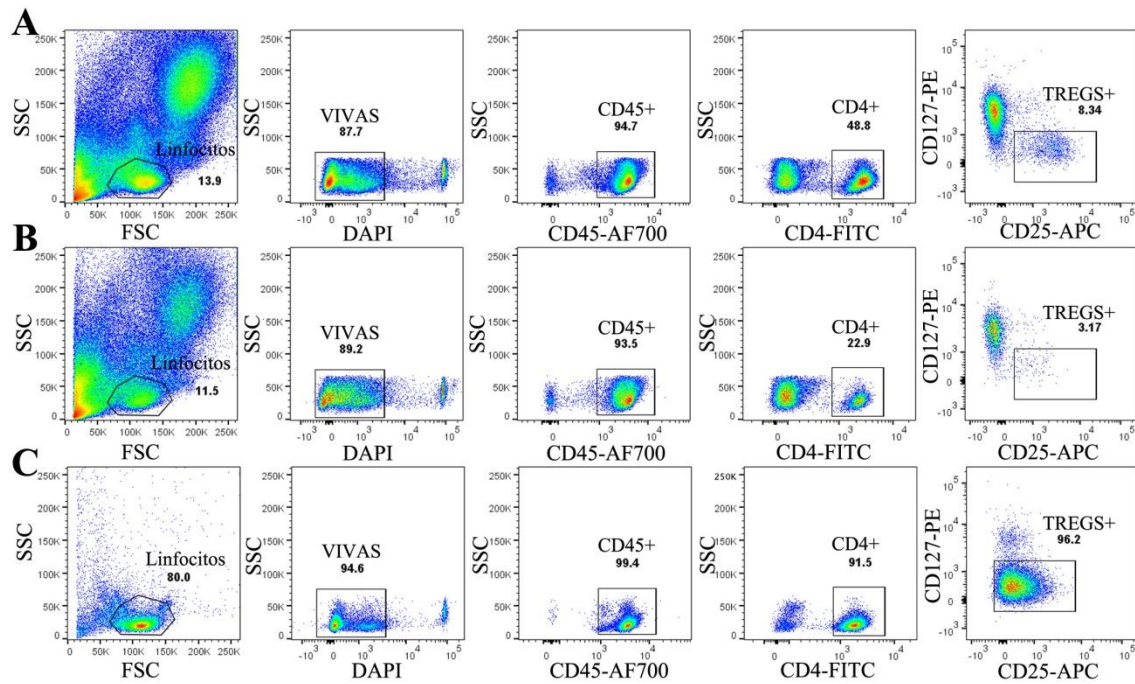


**Figura 52. Selección de células T reguladoras de Sangre Periférica de Adulto por *Miltenyi Biotec Kit*.** Las gráficas de puntos muestran el panel de citometría obtenido al delimitar la población celular sobre linfocitos / células vivas (DAPI) / CD45<sup>+</sup> / CD4<sup>+</sup> / CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-low</sup>. En cada paso se muestra el porcentaje de células positivas. **A)** Material de partida, células mononucleares aisladas tras el gradiente de densidad. **B)** Fracción negativa, células no retenidas a la columna. **C)** Fracción positiva, células unidas a la columna. Imagen representativa de 8 experimentos independientes.



**Figura 53. Selección de células T reguladoras de Sangre de Cordón Umbilical por *Miltenyi Biotec Kit*.** Las gráficas de puntos muestran el panel de citometría obtenido al delimitar la población celular sobre linfocitos / células vivas (DAPI) / CD45<sup>+</sup> / CD4<sup>+</sup> / CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-low</sup>. En cada paso se muestra el porcentaje de células positivas. **A)** Material de partida, células mononucleares aisladas tras el gradiente de densidad. **B)** Fracción negativa, células no retenidas a la columna. **C)** Fracción positiva, células unidas a la columna. Imagen representativa de 8 experimentos independientes.

Por otro lado, se seleccionaron células Treg procedentes de Sangre Cordón Umbilical mediante la tecnología *Strepamer*. En este caso, la selección se lleva a cabo directamente de la sangre de cordón umbilical, sin necesidad del gradiente de densidad previo. Las células nucleadas totales serán marcadas con un complejo de partículas magnéticas recubiertas con *Strep-Tactin* y fab anti-CD25. Las células marcadas con este complejo serán seleccionadas mediante el uso de un soporte con un fuerte campo magnético. Al igual que la selección por el sistema *Miltenyi Biotec Kit*, para calcular la pureza de las células Treg aisladas, las células se marcaron con el panel de anticuerpos CD45-AF700, CD4-FITC, CD25-APC y CD127-PE. Además, también se marcó el material de partida, que en este caso son las células totales nucleadas, y las células no retenidas al soporte magnético (Figura 54).



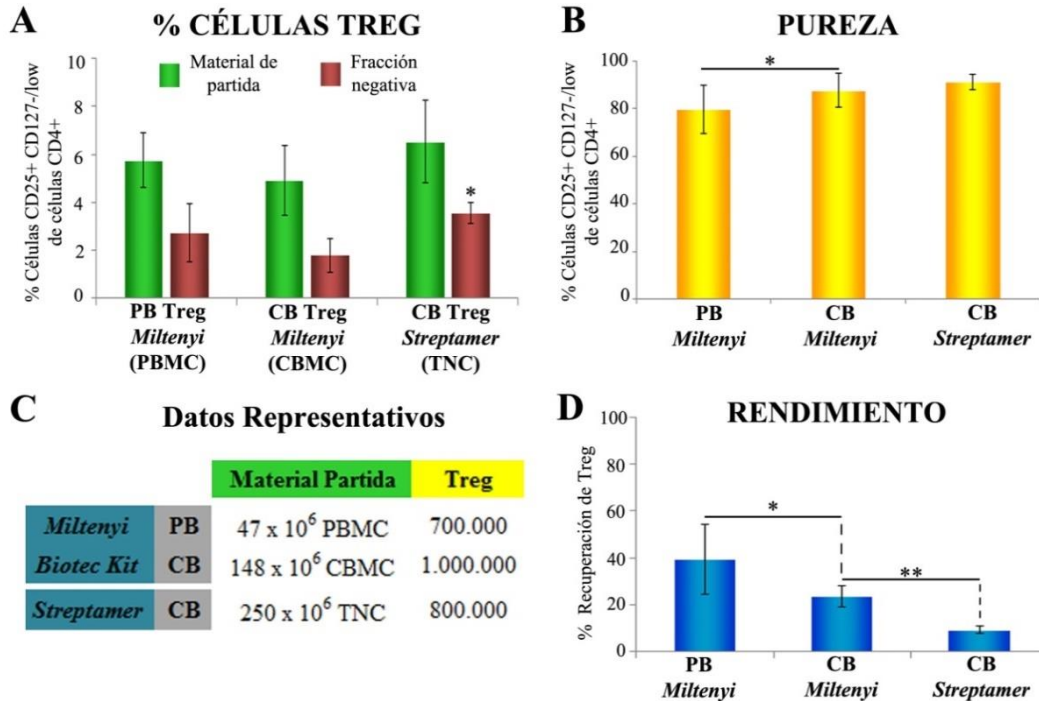
**Figura 54. Selección de células T reguladoras de Cordón Umbilical por *Streptamer*.** Las gráficas de puntos muestran el panel de citometría obtenido al delimitar la población celular sobre linfocitos / células vivas (DAPI) / CD45<sup>+</sup> / CD4<sup>+</sup> / CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-low</sup>. En cada paso se muestra el porcentaje de células positivas. **A)** Material de partida, células totales nucleadas. **B)** Fracción negativa, células no unidas a la pared del tupo Falcon situado en el campo magnético. **C)** Fracción positiva, células unidas a la pared del tupo Falcon situado en el campo magnético. Imagen representativa de 4 experimentos independientes.

La media de todos los ensayos realizados mostró que las células mononucleares (MC) de la sangre periférica de adulto y de cordón umbilical presentan una proporción de células Treg de  $5,75 \pm 1,33$  % y  $4,91 \pm 1,47$  % respectivamente, de las células CD4<sup>+</sup>. Por otro lado, las células nucleadas totales (TNC) de la sangre de cordón umbilical presentan una media de  $6,53 \pm 1,74$  % de células Treg respecto a las células CD4<sup>+</sup> (Figura 55A). Estos resultados son concordantes con los porcentajes de células Treg que se han previamente descrito en otros ensayos (5-10%) [232, 319].

Por otro lado, respecto a las células Treg obtenidas en la fracción negativa; es decir, aquellas células Treg no seleccionadas, los resultados mostraron un  $2,72 \pm 1,20$  % para las células PB Treg y  $1,79 \pm 0,69$  % para las células CB Treg, seleccionadas ambas mediante *Miltenyi Biotec Kit*; y  $3,56 \pm 0,43$  % para células CB Treg seleccionadas por *Streptamer*. Este último resultado fue estadísticamente significativo con respecto al porcentaje de células Treg encontradas en la fracción negativa de las CB Treg



seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit*, encontrándose un porcentaje menor en éstas últimas (Figura 55A). Esto parece indicar que la metodología *Miltenyi Biotec Kit* es más efectiva, ya que consigue seleccionar más células Treg.



**Figura 55. Análisis de la selección de las células Treg de Sangre Periférica de Adulto y Cordón Umbilical seleccionadas por las tecnologías *Miltenyi Biotec Kit* y *Streptamer*.** **A)** La gráfica de barras representa la media  $\pm$  SD del porcentaje de células Treg (CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-low</sup> respecto a las células CD4<sup>+</sup>) en el material de partida, MC para la selección con *Miltenyi Biotec Kit* y TNC para *Streptamer*; y el porcentaje de Treg en la fracción negativa. **B)** La gráfica representa la media  $\pm$  SD del porcentaje de células Treg obtenidas en la fracción positiva. **C)** La tabla muestra el número medio de células utilizadas para la selección de Treg por ambas tecnologías y el número medio de células Treg aisladas. **D)** La gráfica representa el rendimiento medio  $\pm$  SD de la selección de células PB Treg y CB Treg por *Miltenyi Biotec Kit* y células CB Treg por *Streptamer*. **A, B y C)** PB Treg *Miltenyi* (n=8); CB Treg *Miltenyi* (n=8), CB Treg *Streptamer* (n=3). **D)** PB Treg *Miltenyi* (n=7); CB Treg *Miltenyi* (n=7), CB Treg *Streptamer* (n=3). \*p<0,05, \*\*p<0,01.

La pureza de las células Treg aisladas es un parámetro de interés, ya que el objetivo es seleccionar el mayor número de células Treg posibles, pero con el menor número de células contaminantes. Para ello, analizamos el porcentaje de células Treg, CD45<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-low</sup>, obtenido en la fracción positiva. El resultado mostró que existen diferencias significativas entre la pureza de las células PB Treg (78,8  $\pm$  11,2 %) y CB Treg (86,1  $\pm$  6,9 %) seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit*. Esto es debido a la

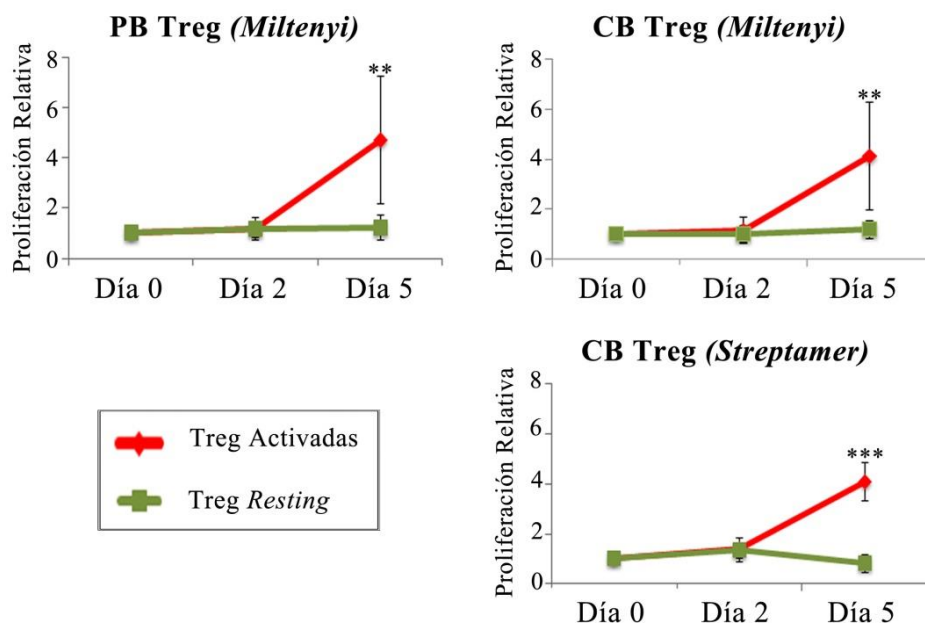
presencia de células CD25<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup> en la sangre periférica de adulto, que son seleccionadas por ser positivas para CD25, pero no son células T reguladoras sino efectoras. Esto muestra que el CB es una excelente fuente de células Treg, por presentar menor número de células T efectoras, y poder conseguir así una selección más pura de células Treg. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre las células CB Treg seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit* ( $86,1 \pm 6,9$  %) y las células CB Treg aisladas por *Streptamer* ( $91,7 \pm 4,8$  %) (Figura 55B), lo que indica que la tecnología *Streptamer* es una buena herramienta para seleccionar células CB Treg con alta pureza.

Finalmente, para conocer el rendimiento o eficacia de la técnica de selección, hay que tener en cuenta la cantidad de células de partida y las que se obtienen tras el procedimiento. La figura 55C muestra una tabla donde se representa la media de las células de partida, células mononucleares en el caso de la selección por *Miltenyi Biotec Kit* y células nucleadas totales en la selección con *Streptamer*, y la media de células Treg obtenidas en cada caso. El rendimiento de la técnica se calculó teniendo en cuenta el número de células Treg presentes en el material de partida y el número y la pureza de las células Treg seleccionadas. Los resultados mostraron que el rendimiento de la metodología *Miltenyi Biotec Kit* presenta diferencias estadísticamente significativas para la selección de células PB Treg y CB Treg, encontrándose unos valores de rendimiento de  $39,55 \pm 14,85$  % y  $23,57 \pm 4,71$  %, respectivamente. Respecto al rendimiento conseguido con la tecnología *Streptamer*, el valor medio obtenido fue  $9,33 \pm 1,70$  %, bastante menor al rendimiento de la técnica *Miltenyi Biotec Kit* para células CB Treg (Figura 55D). Estos resultados muestran que la tecnología *Miltenyi Biotec Kit* es más eficaz para la selección de células Treg, en especial para células PB Treg, aunque éstas presentan menor pureza que las CB Treg aisladas por esta misma metodología. Los resultados de proliferación *in vitro*, expresión de marcadores y liberación de citocinas, nos darán más datos para poder comparar la efectividad de las técnicas y las células Treg en función a su origen, y establecer que células y qué metodología es más adecuada para el uso de células Treg en la terapia de la DM.

### 4.3.2 Análisis de la proliferación de las células T reguladoras

Una vez hemos aislado las células T reguladoras, procedemos a su cultivo y activación. Para ello, las células Treg que van a ser activadas se cultivan en pocillos

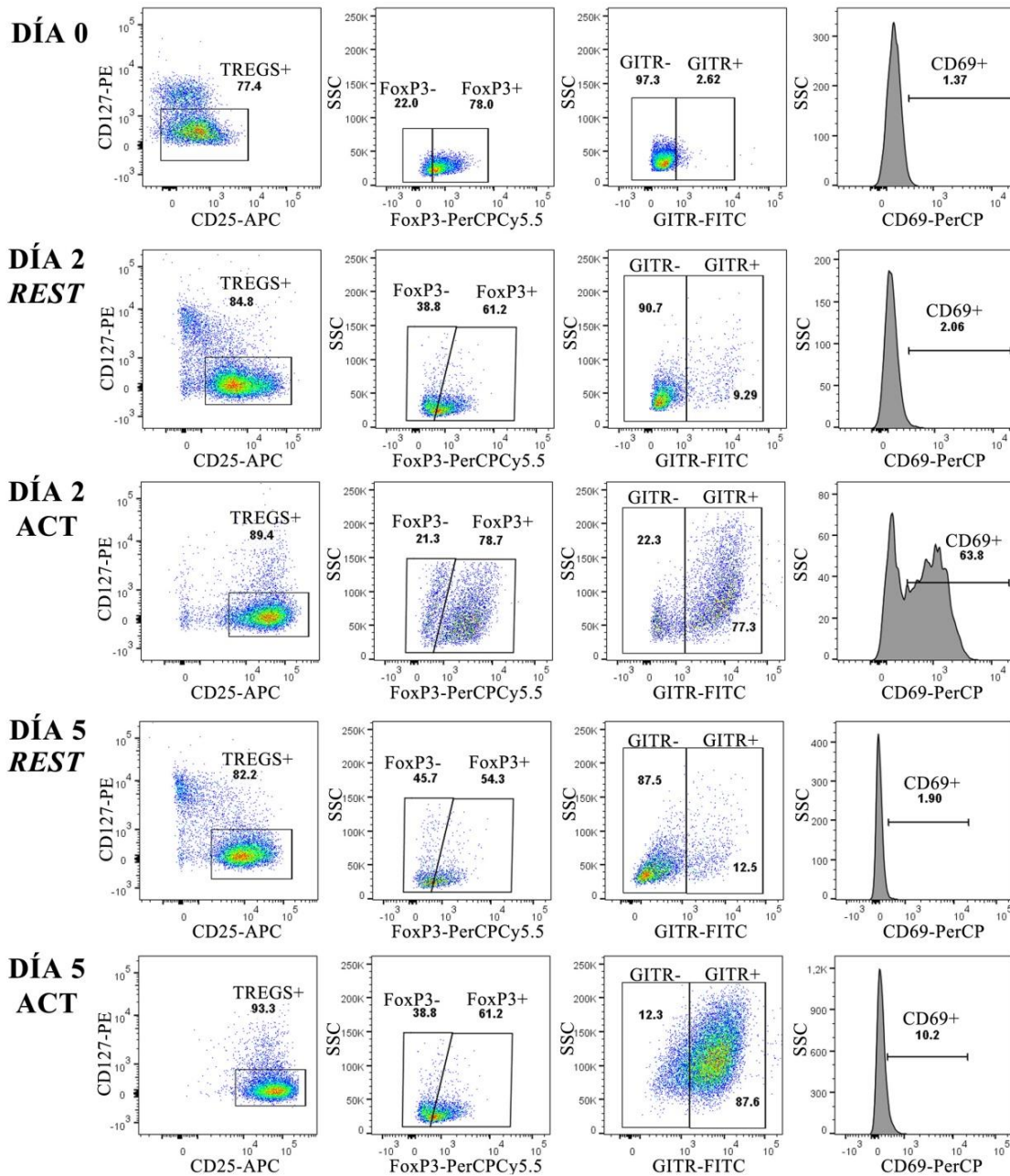
recubiertos con el anticuerpo anti-CD3 (10  $\mu\text{g/ml}$ ), y en medio completo con 1000 U/ml de IL-2 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo anti-CD28. Las células no activadas o *resting* se cultivaron en medio completo con 1000 U/ml de IL-2. Para la medida de la proliferación, las células son contadas mediante tinción con azul de tripán y la ayuda de un hemocitómetro a día de cultivo 0, 2 y 5. De esta manera podemos conocer la capacidad de proliferación de las células Treg, ya que sabemos el número de células que cultivamos a día 0, y el número de células que obtenemos a día 2 y 5. Los resultados obtenidos de estos ensayos muestran que las células que no son activadas *in vitro* (*resting*) no presentan tasa de proliferación, encontrándose el mismo número de células a día 0, 2 y 5, tanto para células PB Treg y CB Treg aisladas por *Miltenyi Biotec Kit*, como células CB Treg seleccionadas por *Streptamer*. De la misma manera, no se observó proliferación celular a día 2 de cultivo para las células activadas. Sin embargo, la activación de las células Treg conlleva a un incremento en el número de células a día 5, resultando en una tasa de proliferación relativa aproximada de 4, no encontrándose diferencias significativas según el origen de las células Treg o técnica utilizada para su selección (Figura 56).



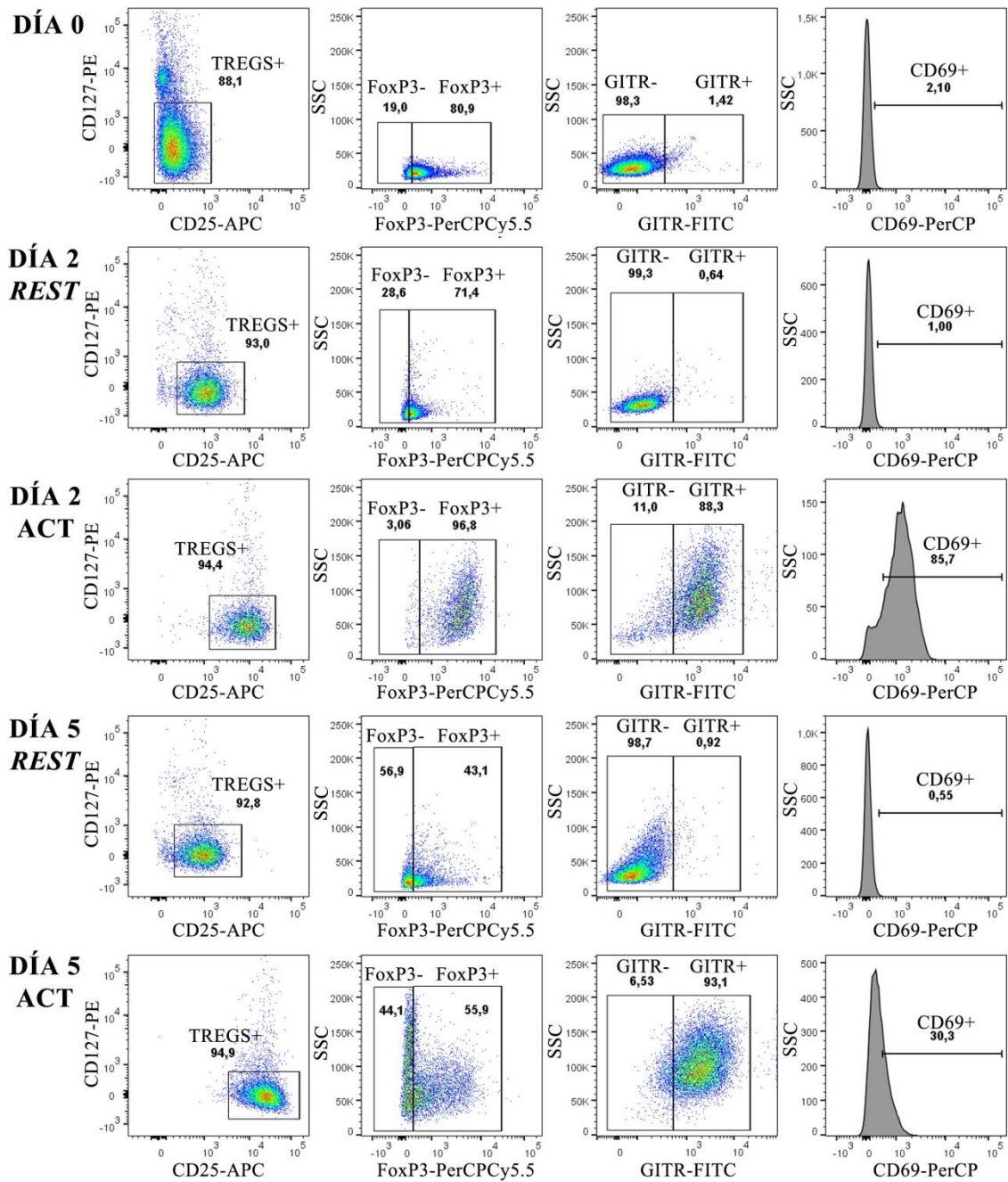
**Figura 56. Tasa de proliferación de las células T reguladoras activadas y *resting*.** El número de células contadas a cada día de cultivo fueron divididas entre el número de células a día 0, obteniéndose así la tasa de proliferación relativa y representando como 1 el valor de proliferación a día 0. Esta imagen muestra la media  $\pm$  SD de la proliferación relativa de las células PB Treg seleccionadas por *Miltenyi* (n=8); CB Treg seleccionadas por *Miltenyi* (n=12), y CB Treg aisladas por *Streptamer* (n=4). \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

### 4.3.3 Análisis de la capacidad de activación de las células T reguladoras

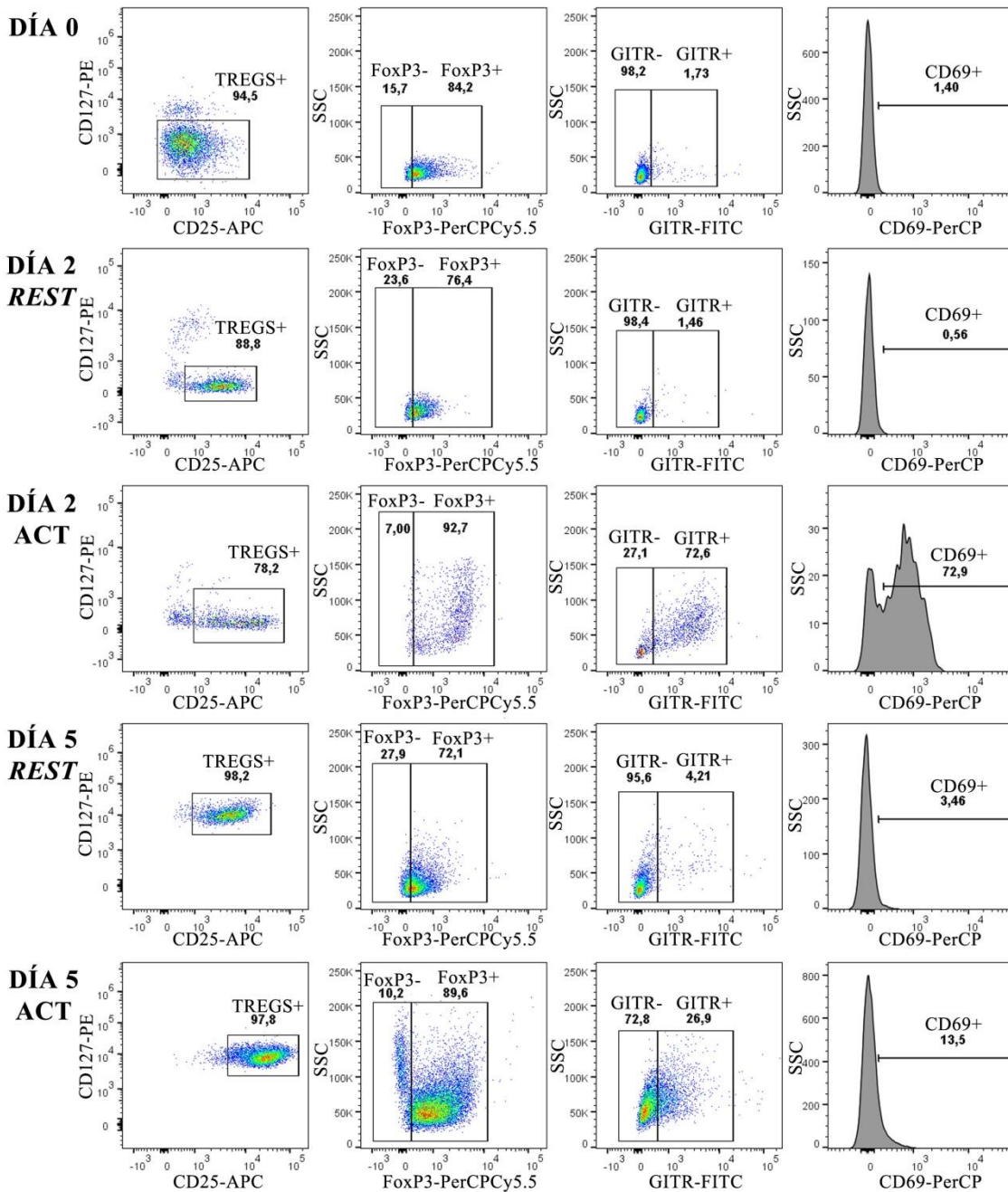
Tras contar el número de células Treg que tenemos en cada día de cultivo al ser activadas o no, procedemos a estudiar la expresión de marcadores característicos de las células T reguladoras, como son CD25 y el factor de transcripción FOXP3, además de las proteínas de superficie GITR y CD69, conocidos por incrementar su expresión en células Treg activas. El análisis de la expresión se llevó a cabo mediante citometría de flujo y los resultados mostraron que el porcentaje de células Treg (CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup>) aumenta ligeramente tras la activación celular, al igual que el porcentaje de células Treg positivas para FOXP3. La expresión del marcador GITR se vio significativamente incrementada tras la activación de las células a día 2 y día 5, y el marcador CD69 incrementó su expresión a día 2, disminuyendo su expresión a día 5, ya que es un marcador de activación temprano. Imágenes representativas de los resultados obtenidos para células PB Treg (Figura 57) y CB Treg seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit* (Figura 58) y CB Treg seleccionadas por *Streptamer* (Figura 59) se muestran a continuación.



**Figura 57. Análisis de la activación de células T reguladoras de Sangre Periférica de Adulto seleccionadas por Miltenyi Biotec Kit.** Las gráficas de puntos muestran el porcentaje de células positivas, sobre las células CD4<sup>+</sup>, para la población de células Treg (CD25<sup>high</sup> CD127<sup>-low</sup>); porcentaje de células positivas para FOXP3 (sobre células CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-low</sup>) y porcentaje de células positivas para GITR (sobre las células CD4<sup>+</sup>). El histograma representa el porcentaje de células positivas para CD69 (respecto a las células CD4<sup>+</sup>). Imagen representativa de 8 experimentos independientes. La delimitación de las células negativas se estableció según las células no marcadas, y en el caso de FOXP3, según la fluorescencia emitida por todos los anticuerpos menos el de FoxP3 (FMO). *REST*: células Treg sin activar o *resting*; *ACT*: células Treg activadas.

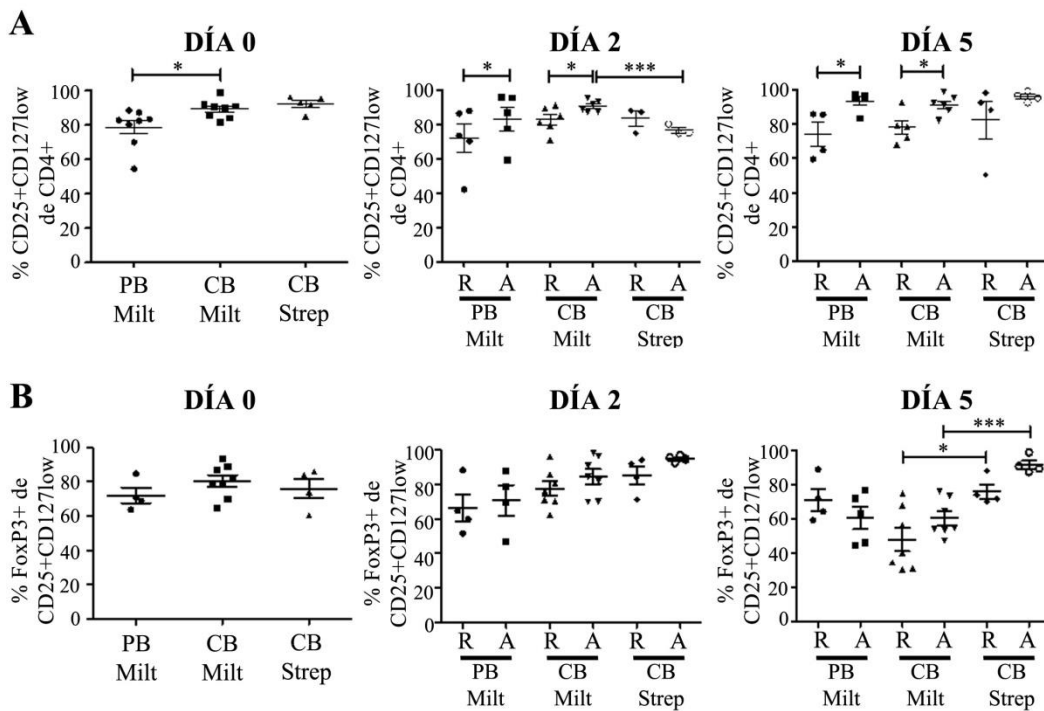


**Figura 58. Análisis de la activación de células T reguladoras de Sangre de Cordón Umbilical seleccionadas por Miltenyi Biotec Kit.** Las gráficas de puntos muestran el porcentaje de células positivas, sobre las células CD4<sup>+</sup>, para la población de células Treg (CD25<sup>high</sup> CD127<sup>-low</sup>); porcentaje de células positivas para FOXP3 (sobre células CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-low</sup>) y porcentaje de células positivas para GITR (sobre las células CD4<sup>+</sup>). El histograma representa el porcentaje de células positivas para CD69 (respecto a las células CD4<sup>+</sup>). Imagen representativa de 8 experimentos independientes. La delimitación de las células negativas se estableció según las células no marcadas, y en el caso de FOXP3, según la fluorescencia emitida por todos los anticuerpos menos el de FoxP3 (FMO). *REST*: células Treg sin activar o *resting*; *ACT*: células Treg activadas.



**Figura 59. Análisis de la activación de células T reguladoras de Sangre de Cordón Umbilical seleccionadas por *Streptamer*.** Las gráficas de puntos muestran el porcentaje de células positivas, sobre las células CD4<sup>+</sup>, para la población de células Treg (CD25<sup>high</sup> CD127<sup>-low</sup>), porcentaje de células positivas para FOXP3 (sobre células CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-low</sup>) y porcentaje de células positivas para GITR (sobre las células CD4<sup>+</sup>). El histograma representa el porcentaje de células positivas para CD69 (sobre las células CD4<sup>+</sup>). Imagen representativa de 4 experimentos independientes. La delimitación de las células negativas se estableció según las células no marcadas, y en el caso de FoxP3, según la fluorescencia emitida por todos los anticuerpos menos el de FoxP3 (FMO). *REST*: células Treg sin activar o *resting*; *ACT*: células Treg activadas.

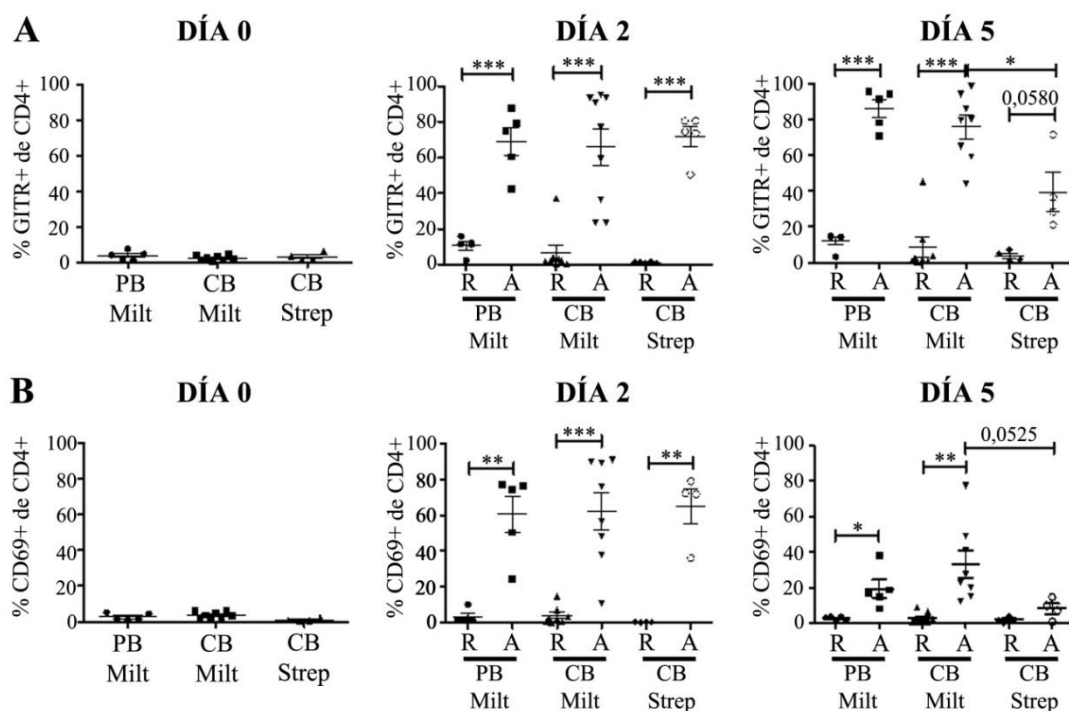
El análisis de activación mostró que el porcentaje de células Treg ( $CD25^+ CD127^{low}$ ) de sangre periférica de adulto y de cordón umbilical, ambas seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit* activadas a día 2 y 5, presentan diferencias significativas respecto a las células no activadas. Sin embargo, las células CB Treg aisladas por *Streptamer* no muestran cambios significativos ni a día 2 ni a día 5 tras la activación. El día 0, corresponde con los datos de pureza comentados previamente, en los que se observaron diferencias significativas entre las células PB Treg y CB Treg seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit* (Figura 60A). Respecto al estudio del factor de transcripción FOXP3, no existen diferencias de expresión significativas a día 0 y día 2 de cultivo, encontrándose valores de 70-90% de células FOXP3<sup>+</sup> de células  $CD25^+ CD127^{low}$ . Sin embargo, a día 5 se observaron diferencias significativas entre las células CB Treg aisladas por *Miltenyi Biotec Kit* y aquellas aisladas por *Streptamer*, tanto en estado *resting* como activadas, presentando mayor nivel de FOXP3 las células CB Treg seleccionadas por la tecnología *Streptamer* (Figura 60B).



**Figura 60. Estudio de los marcadores CD25 y FOXP3 a diferentes días de cultivo para células T reguladoras seleccionadas por ambas tecnologías, activadas y *resting*.** Las gráficas muestran los porcentajes de células **A)**  $CD25^+CD127^{low}$  de las células  $CD4^+$ ; **B)**  $FOXP3^+$  de las células  $CD25^+CD127^{low}$ . Cada punto representa un experimento y se muestra la media  $\pm$  SD. R: células *resting*; A: células activadas; Milt: células seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit*; *Strep*: células seleccionadas por *Streptamer*. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

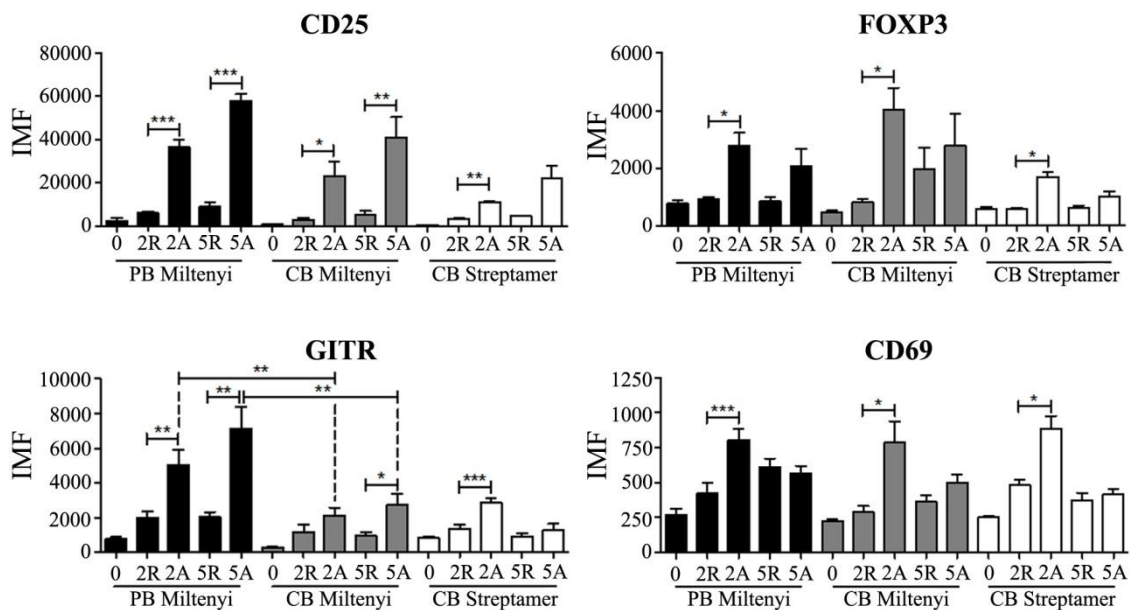


De la misma manera se hizo el estudio para los marcadores de activación GITR y CD69. Los resultados mostraron que el porcentaje de células GITR<sup>+</sup> a día 0 de cultivo, es prácticamente nulo, mientras que la activación a día 2 y 5 incrementó de forma muy significativa la expresión de GITR (Figura 61A). Igual sucede con la expresión del marcador CD69, ya que a día 0 la expresión de CD69 fue casi inexistente y la activación a día 2 y 5 de cultivo incrementó significativamente el porcentaje de células CD69<sup>+</sup> (Figura 61B). La diferencia entre GITR y CD69, es que el primero se expresa tras la activación indistintamente a día 2 y 5, mientras que CD69, es un marcador de activación temprano y puede observarse como a día 2 encontramos una media de porcentaje de células CD69<sup>+</sup> aproximada de 60% y a día 5 de cultivo entre 20 y 30%. Además, se encontraron diferencias de expresión de GITR y CD69 entre las células CB Treg seleccionadas por *Miltenyi* y las células CB Treg aisladas por *Streptamer* activadas a día 5 de cultivo, presentando niveles más bajos de expresión las seleccionadas por *Streptamer*.



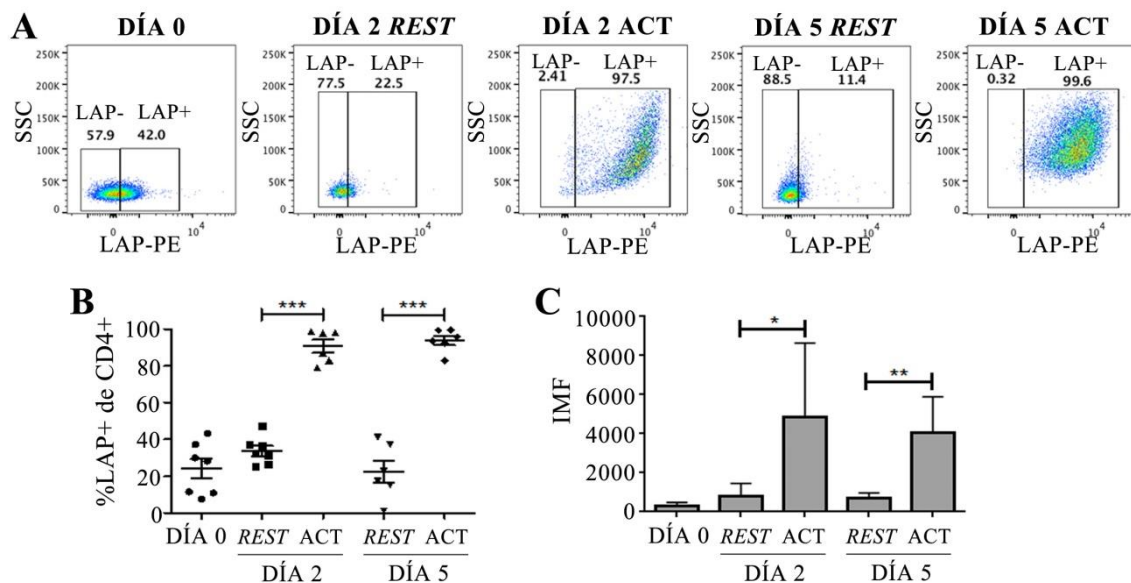
**Figura 61. Estudio de los marcadores GITR y CD69 a diferentes días de cultivo para células T reguladoras y seleccionadas por ambas tecnologías, activadas y *resting*.** Las gráficas muestran los porcentajes de células A) GITR<sup>+</sup> de las células CD4<sup>+</sup>; B) CD69<sup>+</sup> de las células CD4<sup>+</sup>. Cada punto representa un experimento y se muestra media  $\pm$  SD R: células *resting*; A: células activadas; Milt: células seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit*; Strep: células seleccionadas por *Streptamer*. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Además de estudiar el porcentaje de células positivas, hicimos un análisis de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF). Los resultados para el marcador CD25 mostró que la IMF se vio incrementada significativamente tras la activación a día 2 y 5 de cultivo. La IMF de FoxP3 mostró que a día 2 de cultivo en células activadas, se incrementa la IMF significativamente, siendo este incremento muy discreto a día 5. Para los marcadores CD25 y FoxP3 no se encontraron diferencias significativas entre PB Treg y CB Treg, ni entre las dos técnicas de aislamiento celular. El resultado de la IMF para GITR mostró que la activación incrementa la IMF, tanto a día 2 como a día 5 de cultivo. Además, se observan diferencias bastante significativas entre las células PB Treg y CB Treg, presentando mayor nivel de IMF para GITR las células Treg de sangre periférica de adulto. Por último, la IMF del marcador CD69, mostró lo mismo que el porcentaje de células CD69<sup>+</sup>. La IMF aumentó significativamente en células activadas a día 2, mientras que a día 5 la IMF fue similar entre células activadas y *resting*. Sin embargo, la IMF no mostró diferencias significativas entre los tipos celulares PB Treg y CB Treg, ni entre las distintas técnicas de aislamiento (Figura 62).



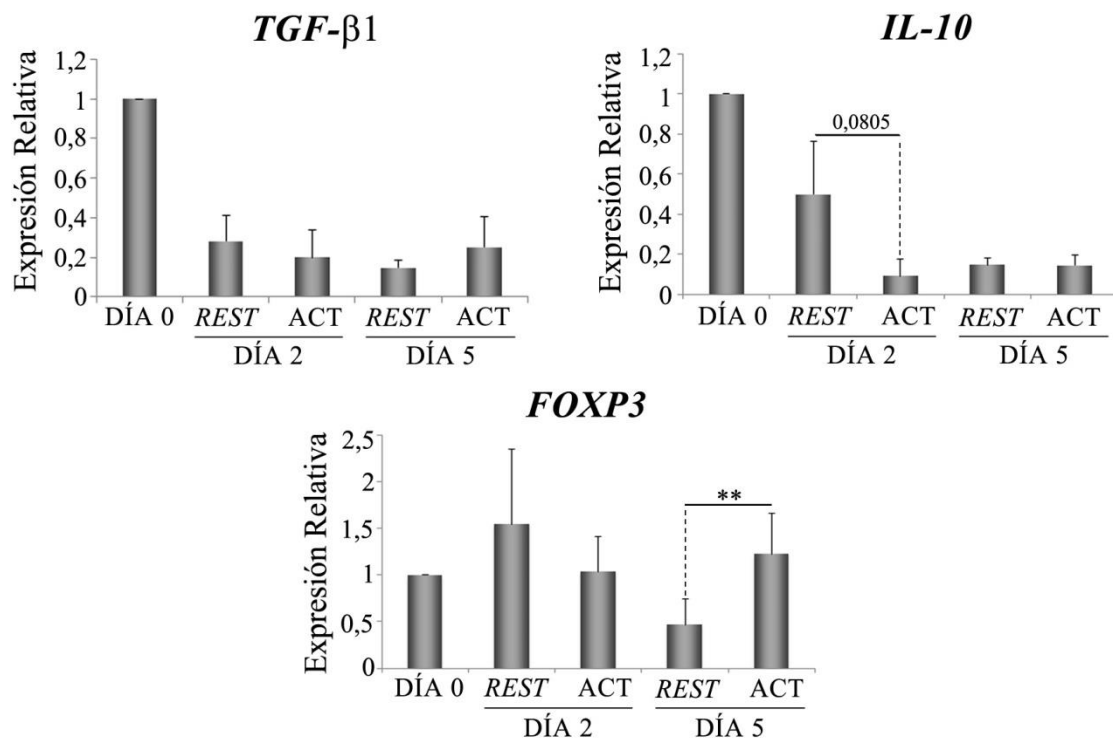
**Figura 62. Análisis del efecto de la activación celular sobre la IMF de los marcadores CD25, FOXP3, GITR y CD69.** Las gráficas de barras representan la media de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF)  $\pm$  SD. R: células *resting*; A: células activadas; 0, 2 y 5: día 0, 2 y 5 de cultivo. PB Miltenyi: células PB Treg seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit*; CB Miltenyi: células CB Treg seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit*; CB Strep: células CB Treg seleccionadas por *Strepamer* \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Un marcador importante para estudiar la capacidad supresora de las células T reguladoras es TGF- $\beta$ 1 y puede ser medido fácilmente mediante el estudio del péptido asociado a latencia o LAP, por encontrarse en la superficie celular. Por ello, llevamos a cabo un estudio mediante citometría de flujo de la presencia de este péptido en la membrana celular de las células Treg de sangre de cordón umbilical. Los resultados mostraron que la activación de las células Treg conllevó a un incremento significativo del porcentaje de células que presentan LAP en la superficie celular, tanto a día 2 como a día 5 de cultivo (Figura 63A). La media de todos los ensayos realizados mostró que a día 0 de cultivo, un 25% de células Treg son LAP<sup>+</sup> respecto a las células CD4<sup>+</sup>, manteniéndose estos valores en las células CB Treg *resting*. Sin embargo, las células CB Treg activadas mostraron ser un 85-90% LAP<sup>+</sup> respecto a las células CD4<sup>+</sup> (Figura 63B). Los valores de IMF también se vieron incrementados de forma significativa tras la activación de las células CB Treg (Figura 63C).



**Figura 63. Efecto de la activación sobre la expresión de LAP en células T reguladoras de Sangre de Cordón Umbilical seleccionadas por Miltenyi Biotec Kit.** A) Gráfica de puntos representativa del porcentaje de células LAP<sup>+</sup> de las células CD4<sup>+</sup>. La delimitación de las células negativas se estableció según las células no marcadas. B) La gráfica representa todos los experimentos realizados para la medida de células LAP<sup>+</sup> de células CD4<sup>+</sup> (n=6-7). C) La gráfica de barras representa la media de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF)  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . REST: células CB Treg *resting*; ACT: células CB Treg activadas.

Además decidimos estudiar la expresión de *TGF- $\beta$ 1* a nivel de expresión de ARN mensajero, así como la expresión del factor de transcripción *FOXP3* y la *IL-10*, los cuales son conocidos por jugar un papel importante en la capacidad supresora de las células T reguladoras. Los resultados de PCR mostraron que la expresión de *TGF- $\beta$ 1* e *IL-10* se vieron disminuidas a día 2 y 5 de cultivo, independientemente de la activación celular, siendo esta caída de expresión, en el caso de *IL-10*, más drástica en células activadas a día 2 que las células *resting*. La expresión de *FOXP3* se mantuvo los 5 días de cultivo en células activadas. Sin embargo, la expresión de *FOXP3* en las células *resting* a día 5 de cultivo se vio disminuida, encontrándose diferencias significativas respecto a las células activadas (Figura 64).



**Figura 64. Análisis de la expresión de marcadores importantes para el funcionamiento de las células T reguladoras.** Análisis de la expresión de los marcadores *TGF- $\beta$ 1*, *IL-10* y *FOXP3* por PCR cuantitativa en células Treg procedentes de sangre de cordón umbilical y seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit*. La gráfica muestra la media de la expresión relativa de 4 experimentos independientes  $\pm$  SD. La expresión relativa fue calculada con el algoritmo  $\Delta\Delta$ Ct, tomando como control endógeno la expresión del gen  $\beta$ -ACTINA y como muestra calibradora la expresión a día 0. \*\* $p < 0,01$ .

#### 4.3.4 Análisis de liberación de citocinas

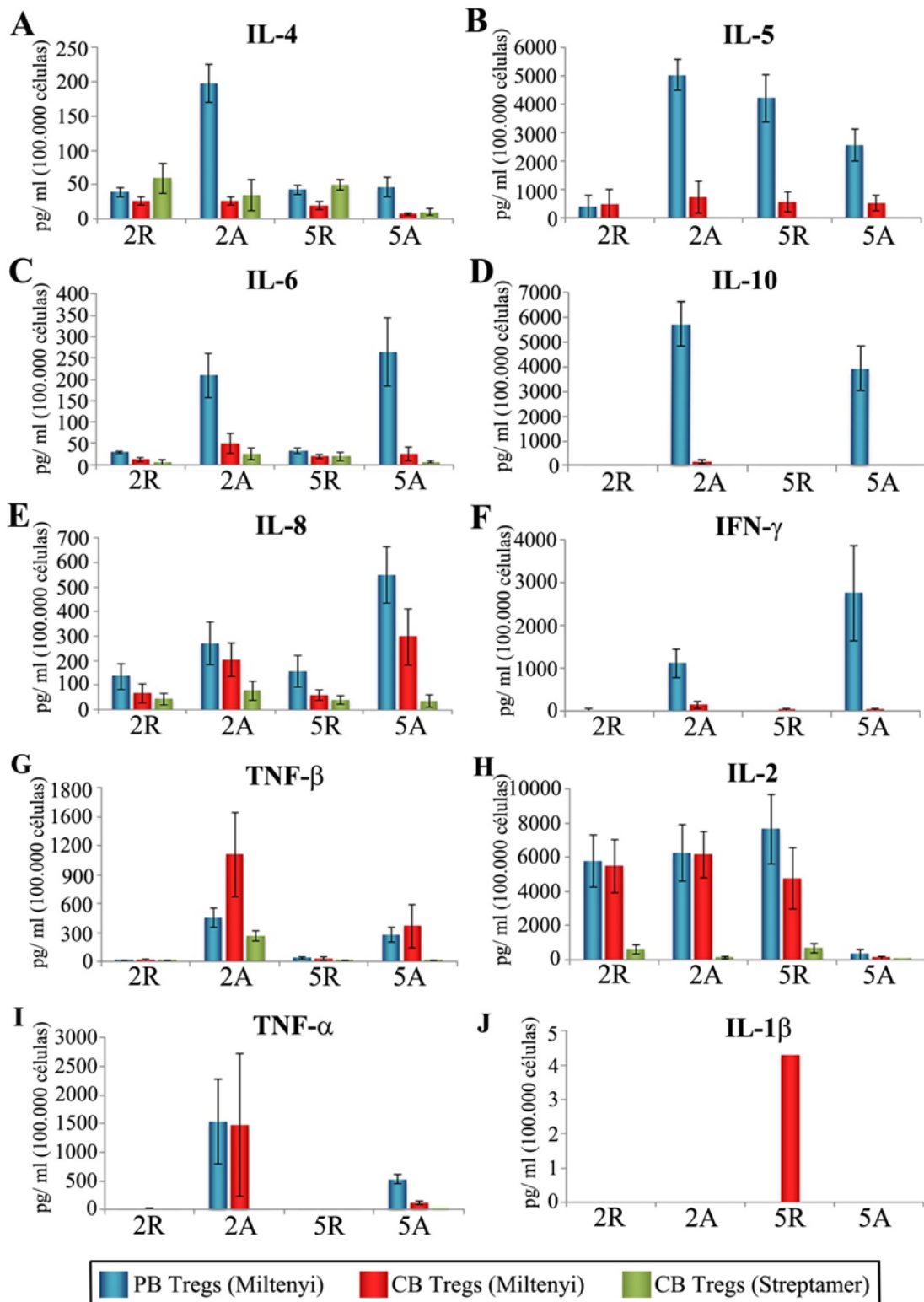
Finalmente, realizamos un análisis múltiple de liberación de citocinas de las células Treg procedentes de sangre periférica de adulto y de cordón umbilical, y éstas últimas seleccionadas mediante las dos tecnologías diferentes, para caracterizarlas mejor e indagar en su mecanismo de acción. Para ello, utilizamos los sobrenadantes de las células activadas y *resting*, cultivadas durante 2 y 5 días, que habían sido guardados a -20°C, y el kit FlowCytomix Human Th1/Th2 11plex Kit (IFN- $\gamma$ , IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ). De esta forma podemos estudiar la liberación de las citocinas de Tipo 1, que incluyen IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$  y, por lo general, favorecen una fuerte respuesta inmune celular, y las de tipo 2, IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10, que por lo general favorecen el desarrollo de una fuerte respuesta inmune humoral.

El resultado de este experimento mostró que las citocinas de Tipo 2, IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10, además de la IL-8, fueron secretadas en mayor medida por las células T reguladoras procedentes de sangre periférica de adulto. En concreto, la concentración de IL-4 encontrada en células PB Treg activadas a día 2 de cultivo, fue significativamente mucho mayor a la concentración medida en células CB Treg (Figura 65A). La IL-5, fue encontrada en mayor concentración en células PB Treg, aumentado esta concentración tras la activación a día 2, pero no se observó cambios muy significativos entre las células activadas y *resting* a día 5 (Figura 65B). De forma muy similar sucede con las citocinas IL-6 e IL-10, encontradas con mayor concentración en células PB Treg activadas a día 2 y 5 de cultivo, siendo la concentración muy baja en las células CB Treg seleccionada por ambas tecnologías (Figura 65C y D). El nivel de IL-8 encontrada en células PB Treg y CB Treg aisladas por *Miltenyi Biotec Kit* fue mayor en células activadas a día 2 y 5 de cultivo, siendo mayor la concentración en células PB Treg a día 5 (Figura 65E).

En cuanto a las citocinas de Tipo 1, los resultados fueron más variados. Al igual que las citocinas de Tipo 2, el IFN- $\gamma$  fue encontrado en mayor concentración en el sobrenadante de las células PB Treg activadas a día 2 y 5 de cultivo, siendo casi inexistente la presencia de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de las células CB Treg, sobre todo en aquellas seleccionadas por *Streptamer* (Figura 65F). Por el contrario, la concentración de TNF- $\beta$  fue mayor en las células CB Treg seleccionadas por *Miltenyi*

*Biotec Kit*, siendo más significativa esta diferencia en células activadas a día 2 de cultivo (Figura 65G). La concentración de IL-2 fue bastante similar entre las células PB Treg y CB Treg seleccionadas con *Miltenyi*, siendo más elevada que la concentración de IL-2 encontrada para células CB Treg seleccionadas con *Streptamer* (Figura 65H). La citocina IL-12 p70 no fue encontrada en el sobrenadante de ningún tipo celular ni ninguna condición de cultivo (datos no mostrados). Por último, la concentración de TNF- $\alpha$  se encontró incrementada en el sobrenadante de células PB Treg y CB Treg seleccionadas por *Miltenyi* activadas a día 2 y en menor medida, a día 5, no encontrándose en el sobrenadante de células CB Treg aisladas por *Streptamer* (Figura 65I) y la citocina IL-1 $\beta$  solo fue hallada en el sobrenadante de células CB Treg seleccionadas por *Miltenyi* de células no activadas a día 5 de cultivo, pero a niveles muy bajos (Figura 65J).

De esta forma, este estudio revela patrones de liberación de citocinas claramente diferenciables. Por lo general, las células PB Treg al ser activadas liberan mayor cantidad de citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-8 e INF- $\gamma$ , mientras que el factor TNF- $\beta$  fue encontrado en mayor concentración en las células CB Treg. La concentración de IL-2 fue similar entre las células PB Treg y CB Treg seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit*, pero este hallazgo puede ser debido a la IL-2 adicionada al medio de cultivo para promover la supervivencia y proliferación celular. Sin embargo, es de extrañar que las células CB Treg seleccionadas por *Streptamer* no presenten IL-2 en sus sobrenadantes, ya que fueron crecidas en un medio similar. La citocina IL12 p70 no fue hallada en ningún sobrenadante. Por lo general, las células CB Treg seleccionadas por *Streptamer* parecen ser las células que menos citocinas liberan, encontrándose en la mayoría de citocinas analizadas valores de concentración muy bajos.



**Figura 65.** Análisis comparativo de liberación de citocinas entre las células T reguladoras de sangre periférica de adulto y de cordón umbilical y las técnicas de selección Miltenyi y Streptamer, bajo condiciones de cultivo activadoras y *resting*. La gráfica de barras muestra la media de la concentración de citocinas liberadas en pg/ml por cada 100.000 células cultivadas  $\pm$ SD. PB Miltenyi (n=8); CB Miltenyi (n=8); CB Streptamer (n=4). R: células *resting*; A: células activadas.

Como conclusión, podemos decir que existen diferencias en el patrón de liberación de citocinas según la procedencia de las células Treg y según la tecnología usada para su selección. El hecho de encontrar en mayor medida citocinas pro-inflamatorias en los sobrenadantes de las células PB Treg seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit* puede deberse a la menor pureza en su selección, comparado a las células CB Treg. Esto se justifica por la presencia de células T CD25<sup>+</sup> efectoras presentes en la sangre periférica de adulto y ausentes en cordón umbilical. Este aspecto favorece el uso de células CB Treg para la terapia celular, ya que la liberación de estas citocinas podría generar efectos inmunológicos no deseados. Además, según los datos obtenidos, la selección por la metodología *Miltenyi Biotec Kit* parece ser la mejor opción, pues las células aisladas por esta técnica presentan una pureza similar a las seleccionadas por la tecnología *Streptamer*, pero el rendimiento de la selección es mayor. Asimismo, la expresión de CD25, GITR y CD69 tras la activación de las células CB Treg es mayor para células aisladas por *Miltenyi Biotec Kit*, aunque la expresión de FOXP3 parece ser controversial. Finalmente, para corroborar esta idea sería conveniente realizar ensayos de supresión *in vitro* para comprobar la acción de cada tipo celular y decantarnos finalmente por el uso de PB Treg o CB Treg seleccionadas por una u otra tecnología.



## ***5. Discusión***



## **Bloque 1**

### **5.1 Estudio de la Regulación de la Expresión de Pdx1 por Altas Concentraciones de Óxido Nítrico**

Pdx1 es un factor de transcripción necesario para el desarrollo pancreático [42] y la diferenciación hacia tipos celulares específicos en la región “*foregut*” posterior y en la formación de los primordios [45, 46], y exhibe un patrón de expresión bifásico durante la embriogénesis del páncreas [320]. Ratones y humanos homocigotos con mutaciones de *Pdx1*, que conllevan a su inactivación, son apancreáticos y humanos heterocigotos desarrollan una diabetes no dependiente de insulina. Además mutaciones en *Pdx1* causan diabetes tipo MODY, denominada MODY4 [44, 47]. De esta forma, la expresión y regulación de *Pdx1* es de vital importancia para el correcto desarrollo y funcionamiento de la célula  $\beta$ , así como, para la generación de células productoras de insulina desde células madre pluripotentes *in vitro*.

El presente estudio muestra que la exposición de dos líneas celulares de CMEr, R1/E y D3, a altas concentraciones del donador de óxido nítrico DETA-NO, induce un aumento de la expresión de *Pdx1* a nivel de ARN mensajero (Figura 23A). El tratamiento con 500  $\mu$ M de DETA-NO induce además la expresión de PDX1 a nivel de proteína en ambas líneas celulares (Figura 23B). De esta manera, esta concentración de DETA-NO fue usada como herramienta para inducir la expresión de *Pdx1* en la línea celular R1/E (Figura 24) y estudiar la regulación de este gen en CME murinas. Además, mediante inmunofluorescencia determinamos que el tratamiento con 500  $\mu$ M es efectivo en inducir la expresión proteica de PDX1 en células cultivadas en presencia y ausencia de LIF, con localización nuclear de la proteína (Figura 25).

Se ha descrito que el NO induce modificaciones en la metilación del ADN [321]. Por otro lado, se ha encontrado que la isla de metilación proximal del promotor de *Pdx1* está asociada con su silenciamiento y con retraso en el crecimiento intrauterino del feto (IUGR), que se acompaña de un desarrollo de diabetes tipo 2 en la edad adulta [322, 323]. Por ello, estudiamos el grado de metilación del promotor de *Pdx1* tras el tratamiento con DETA-NO, para comprobar si este mecanismo epigenético está relacionado con la inducción de su expresión en CME. En primer lugar, mediante el

software *Methyl Primer Express* dilucidamos la presencia de las islas de metilación CpG presentes en el promotor de *Pdx1* (Figura 26). Decidimos centrarnos en la isla CpG distal, ya que las áreas conservadas II y III del promotor de *Pdx1* (-2800 y -1600 pb) [55] se localizan en esta región; y en la isla CpG proximal, por la relación entre metilación y silenciamiento génico de *Pdx1* reportado en modelo de IUGR en la zona promotora (-275 y +1 pb) [322, 323]. Además, entre estas dos islas de metilación encontramos una región rica en sitios CpG, a la cual denominamos zona media. Esta zona también fue objeto de estudio, por su riqueza en sitios CpG, su cercanía al inicio de la transcripción y la posibilidad jugar un papel relevante en la regulación de *Pdx1*. De esta manera, estudiamos el grado de metilación de estas tres regiones mediante dos técnicas distintas, secuenciación por PCR dependiente de bisulfito (BSP) y pirosecuenciación, encontrando resultados similares con ambas metodologías. Este estudio reveló que la isla CpG distal y la zona media presentan en todas las condiciones de ensayo un porcentaje de metilación superior al 50 y 70%, respectivamente; mientras que en la isla CpG proximal, el porcentaje de metilación no superó en ningún caso el 20% de metilación. Además, el tratamiento con DETA-NO incrementó ligeramente el porcentaje de metilación en las tres regiones (Figura 28). Estos datos son interesantes debido a que la isla CpG distal representa las regiones conservadas II (-2139, -1958 bp) y III (-1879, -1799 bp) descritas por *Gerrish* y colaboradores [54], y donde se ha encontrado la unión de factores de transcripción importantes en el desarrollo pancreático e implicados en la regulación de *Pdx1* como PAX6 y FOXA2 [58], MAFA [61], HNF6 [59] y PTF1a [60]. Por tanto, estos cambios de metilación en sitios CpG específicos inducidos por el NO en la isla CpG distal, podrían influir en la ocupación de estos factores de transcripción. Por otro lado, la isla CpG proximal envuelve la región analizada en el estudio de metilación realizado en el promotor de *Pdx1* en modelo de IUGR (-275 y +1 pb) por *Park* y colaboradores [322], donde describen el requerimiento de la desmetilación de esta región para la expresión del gen. Nuestros resultados revelan que las CME de la línea celular R1/E presentan esta región prácticamente desmetilada (Figura 27-29), lo que sugiere que la represión de la expresión de *Pdx1* en células madre pluripotentes debe ser controlada por la metilación en otras regiones de su zona promotora o por otros mecanismos. En concreto, en la isla CpG proximal nos encontramos dos sitios CpG que incrementan ligeramente su metilación (sitios CpG 33 y 57), y un sitio CpG que se desmetila (sitio CpG 51), tras la exposición al NO (Figura 28), lo que podría estar afectando a la ocupación de factores de transcripción que

controlan la expresión de *Pdx1* y hace que su estudio sea interesante. Asimismo, es de especial interés cómo la retirada de LIF del medio de cultivo y el tratamiento con NO inducen un patrón de metilación muy similar al que presenta la línea celular de insulinoma de rata, INS-1E (Figura 29), sugiriendo que el incremento de metilación observado en ciertos sitios CpG favorecen la expresión de *Pdx1*. Parte de la región de la isla CpG proximal no se encuentra conservada en rata, y por tanto no se ha estudiado en la línea celular INS-1E. Curiosamente, en esta región no conservada no se observaron cambios de metilación en la condición ausencia de LIF y NO. El hecho de que solo en la región conservada de la isla CpG proximal se observen cambios en el patrón de metilación refuerza la hipótesis de que la metilación puede jugar un papel importante en la regulación de *Pdx1*. En cuanto a la región media, los resultados fueron similares a la isla CpG distal, encontrándonos un alto nivel de metilación en la condición de pluripotencia e incrementos de metilación en ciertos sitios CpG, lo que condujo a un aumento de la metilación global de esta región (Figura 27-29). Estos datos también podrían ser de gran relevancia y manifiesta el interés en estudiar la unión de factores de transcripción a esta región, lo que podría revelar nuevos mecanismos que controlan la expresión de *Pdx1*. Este campo centró nuestra atención, y como se discutirá más adelante, encontramos que el factor de transcripción EGR-1 ocupa esta zona promotora, controla la expresión de *Pdx1* en CMEr y su unión depende de la metilación del ADN. Sin embargo, hay que mencionar que esta región no se encuentra conservada en rata, por lo que el mecanismo de regulación de *Pdx1* por EGR-1 puede que tampoco se encuentre conservado entre especies.

Las ADN metiltransferasas, o DNMT, son las responsables del mantenimiento del patrón de metilación de la hebra complementaria de ADN tras la división celular (metilasas de mantenimiento), como de la incorporación de nuevas marcas de metilación (metilasas “*de novo*”). Por ello, se analizó la expresión de estas proteínas y estudió si el NO induce cambios en su expresión que pudieran estar relacionados con los cambios de metilación del promotor de *Pdx1*. Los resultados revelaron que el tratamiento con NO induce un incremento significativo en la expresión, a nivel de ARN mensajero, de la ADN metiltransferasa de mantenimiento, *Dnmt1*, no observándose cambios sustanciales en los niveles proteicos (Figura 30). Por otro lado, las DNMT de “*de novo*”, *Dnmt3a*, *Dnmt3b* y *Dnmt3l*, presentan un patrón de expresión similar entre ellas, pero opuestos a la *Dnmt1*, ya que la expresión se vio incrementada en condiciones

de cultivo en ausencia de LIF, pero el tratamiento con NO, redujo significativamente este aumento de expresión (Figura 30).

En la actualidad, existen estudios que tratan de relacionar el efecto de la metilación con el estado de pluripotencia y diferenciación de las células madre. Las primeras evidencias surgieron tras estudiar el nivel de metilación de los promotores de los genes implicados en el mantenimiento de la pluripotencia. Estos estudios revelaron que los genes que controlan la pluripotencia y la autorrenovación, como son *Nanog* y *Oct4*, presentan sus promotores hipometilados en células madre pluripotentes, mientras que la metilación se incrementa durante el proceso de diferenciación [324-327]. Por otro lado, la implicación de la metilación de ADN en el control de los procesos de diferenciación de las células madre se ha apoyado por la diferenciación inducida por agentes desmetilantes. En este sentido, se han diseñado protocolos de diferenciación de CME hacia células endoteliales, mediante el uso de 5-aza-2'-desoxicitidina [328] o hacia cardiomiocitos, con 5-aza-2'-desoxicitidina o zebularina [329-331].

Previos estudios en nuestro laboratorio mostraron que la exposición de CME a altas dosis de NO, inducen la represión de marcadores de pluripotencia, como *Nanog* y *Oct4*, y favorece la expresión de marcadores de diferenciación temprana [188, 332]. Ahora, los resultados de este trabajo apuntan a que el incremento de expresión de *Pdx1* puede estar relacionado con los cambios en el patrón de metilación de su promotor inducido tras la exposición al NO. Los datos de expresión de las DNMT muestran que el NO disminuye significativamente la expresión de las metilasas de “*de novo*”, *Dnmt3*, *Dnmt3b* y *Dnmt3l*. Así, posiblemente, el sitio CpG del promotor de *Pdx1* que se ha encontrado desmetilado por el tratamiento con NO (sitio CpG 51), deba su desmetilación a este hecho. Además, la represión de la expresión de las DNMT “*de novo*” puede implicar el silenciamiento o activación de otros genes que controlan la pluripotencia y la diferenciación. De esta forma, el NO podría actuar de manera similar a como lo hacen los agentes desmetilantes, favoreciendo la diferenciación, este caso hacia un linaje pancreático. Por otro lado, la metiltransferasa DNMT1 no ve afectada su expresión a nivel de proteína de forma significativa, sin embargo existen estudios que han reportado el incremento de su actividad tras la exposición a NO [321]. De este modo, la DNMT1 podría ser la responsable del ligero incremento de metilación encontrado en el promotor de *Pdx1*. De gran interés sería estudiar el patrón de metilación en otros genes, tales *Nanog* y *Oct4*, tras el tratamiento con altas dosis de NO,

ya que posiblemente la metilación tenga una implicación importante en su silenciamiento y consecuente inducción de la diferenciación.

La remodelación de la cromatina inducida por la metilación/desmetilación del ADN, va asociada a las modificaciones postraduccionales de las colas de las histonas. Asimismo existen estudios en CME que relacionan la metilación de los residuos de lisina 4 y 27 de la histona H3 (H3K4me3 y H3K27me3) con nivel de expresión de los factores que controlan la pluripotencia y la diferenciación [135, 136], o el patrón de estas marcas en genes que controlan la diferenciación cardíaca y pancreática [138-140]. Además, se ha descrito que los genes reguladores específicos de linaje son doblemente marcados con H3K4me3 y H3K27me3, creando un estado bivalente en el cual los genes están preparados para una futura activación, pero permanecen inactivos hasta que la marca represora sea eliminada (“estado *poised*”) [148]. Debido a la importancia de las marcas bivalentes durante la diferenciación, decidimos estudiar las marcas K4me3 y K27me3 de las histonas H3 presentes en la zona proximal del promotor de *Pdx1*. Nuestros resultados de ChIP mostraron un ligero descenso de H3K27me3 e incremento de H3K4me3 tras el tratamiento con NO (Figura 34A), sin embargo los resultados no son significativos, existiendo variabilidad en los datos. No obstante, al graficar el % porcentaje de input, podemos comparar la ocupación que representa cada marca de histona, simbolizando la dinámica de ocupación entre H3K27me3 y H3K4me3 en las condiciones control y tras la exposición a NO. Estos datos revelan que las CMEr pluripotentes presentan un mayor porcentaje de ocupación de H3K27me3 en el promotor de *Pdx1*; y tras el tratamiento con NO este ratio se equilibra. En presencia de LIF, la ocupación de H3K4me3 aumenta de un 25% a un 40% y en ausencia de LIF, de un 10% a un 40%; mientras que la ocupación de H3K27me3 se reduce de 75% a 60% y de 90% a 60%, respectivamente en ambas condiciones de cultivo (Figura 31B). Este resultado concuerda con previos estudios que muestran el progresivo descenso en la relación de H3K27me3/H3K4me3 en el promotor de *Pdx1* durante la diferenciación pancreática [139]. Según este estudio, conforme avanza el proceso de diferenciación la balanza se inclina de manera más significativa hacia la prevalencia de ocupación de H3K4me3 con respecto a H3K27me3. Por tanto, el estudio de las marcas bivalentes sobre el promotor de *Pdx1* podría ser una herramienta interesante para conocer en qué punto del proceso de diferenciación del páncreas nos encontramos en un protocolo de diferenciación *in vitro*. En el mismo contexto, la acetilación de las colas de las histonas

en los residuos de lisina también se relaciona con la expresión génica, en concreto con la activación transcripcional. En este estudio, los resultados obtenidos mostraron que la ocupación de la H3 acetilada no se ve alterada tras el tratamiento con NO, encontrándose presente en todas las condiciones estudiadas (Figura 31C). La persistencia de ambas marcas, H3 acetilada y H3K27me3, encontrada en CMEr pluripotentes sobre el promotor de *Pdx1*, se ha descrito previamente en hepatoblastos, donde *Pdx1* está silenciado [333-335]. Es posible que la presencia de H3 acetilada en el promotor de *Pdx1* pueda contribuir también al “estado *poised*” de este gen durante las fases tempranas del desarrollo pancreático.

Se ha descrito que la expresión de multitud de genes específicos de estadio están controlados por proteínas del grupo Polycomb (PcG), siendo este mecanismo de gran importancia en el control de estos genes esenciales en el desarrollo, además del mantenimiento de la pluripotencia y diferenciación, plasticidad y especificación hacia un destino celular [139, 144, 146, 336, 337]. Dentro de este grupo de proteínas se encuentra el Complejo Polycomb Represor 2 (PRC2), el cual regula negativamente genes implicados en el desarrollo que deben ser reprimidos para mantener la pluripotencia en CME y que se encuentran en “estado *poised*” para ser activados durante la diferenciación [147]. De las proteínas que conforman este complejo, EZH2 es de especial relevancia, ya que es la responsable de la di- y tri- metilación del residuo de lisina (K) 27 de la histona H3 (H3K27me2/3) [141-143]. Además, también podemos destacar a JARID-2, cuya principal función es la de reclutar al complejo PRC2 y unirlo al ADN. De hecho, estudios de silenciamiento de Jarid-2 han mostrado que la reducción de los niveles de expresión de esta proteína conlleva la disminución de la unión del resto de proteínas de PRC2 a sus genes diana [153, 338, 339]. Asimismo, se ha encontrado que las CME deficientes en Jarid-2 muestran, además de un reducido reclutamiento de PRC2, una reducida marca H3K4me2/me3 y H3K27me3, sugiriendo que las marcas bivalentes en CME pluripotentes son dependientes de JARID-2 y que esta proteína es esencial para el proceso de diferenciación hacia los diferentes linajes [340]. En este mismo contexto, se ha descrito que la sobreexpresión de Jarid-2, y otras unidades que conforman el complejo, favorecen la reprogramación de fibroblastos embrionarios murinos hacia células iPSC, mientras que su silenciamiento inhibe este proceso [341].



Debido a la gran importancia que tienen las proteínas del grupo Polycomb en el desarrollo y, en concreto, en la regulación de genes específicos de estadio, en esta tesis se ha realizado un estudio del papel de PRC2 sobre la expresión de *Pdx1* en CMEr tratadas con DETA-NO. Los resultados muestran que la expresión de Jarid-2 disminuye por la exposición a NO, mientras que la expresión de Ezh2 solo disminuye ligeramente a nivel de ARN mensajero tras el tratamiento con NO en presencia de LIF. En cambio, la expresión proteica no se vio afectada en ninguna condición (Figura 32). Además, mostramos que JARID-2 se encuentra en el promotor de *Pdx1* en CMEr pluripotentes, y que se separa del ADN tras la retirada de LIF del medio de cultivo y el tratamiento con NO (Figura 34A). Para demostrar si la presencia de JARID-2 en el promotor de *Pdx1* en condiciones de pluripotencia permite la ocupación del complejo PRC2, se llevó a cabo una co-inmunoprecipitación para detectar la presencia de complejos JARID-2/EZH2. Los resultados de este estudio muestra la presencia de estos complejos (Figura 34B). Estos resultados apuntan a que la unión del complejo PRC2 al promotor de *Pdx1* en condiciones de pluripotencia están implicados en su represión, y que la retirada de LIF del medio del cultivo y el tratamiento con NO inducen la liberación del complejo del promotor. Estos resultados son consistentes con estudios previos que describen la ocupación del promotor de *Pdx1* por JARID-2 y EZH2 en CME y que el silenciamiento de la expresión de *Jarid-2* conlleva a una disminución en la ocupación de EZH2 y un incremento en la expresión de *Pdx1*. Uno de estos estudios fue realizado por Peng y colaboradores [339], y en este contexto requiere una mención especial, ya que realizaron un análisis de ocupación de las proteínas que componen el complejo PRC2 en el genoma completo de CME humanas. Los resultados revelaron que el 99,2 y el 99,8% de los sitios de unión de JARID-2 al ADN, son enriquecidos a su vez con SUZ12 y EZH2, respectivamente, y presentaron a su vez correlación con la marca H3K27me3. Además, desarrollaron experimentos de silenciamiento de *Jarid-2*, y observaron una disminución de ocupación tanto de JARID-2 como de EZH2 en los promotores de sus genes diana. Interesantemente, a pesar de que la marca H3K27me3 prácticamente no se vio modificada, la expresión de los genes que se encuentran regulados por este complejo se vio incrementada, como fue el caso de *Pdx1*; y esta sobreexpresión fue correlacionada con un incremento modesto de los niveles de H3K4me3. Este último fenómeno también es de especial relevancia para nuestro estudio, ya que concuerda con los cambios de ocupación de las marcas bivalentes observados tras el tratamiento con NO, que no fueron especialmente significativos, como sí lo fue la expresión de *Pdx1*.

Otro estudio de gran relevancia, fue el realizado por Xie y colaboradores en 2013 [139], quienes desarrollaron un protocolo de diferenciación *in vitro* de CME humanas a células endocrinas funcionales y analizaron los cambios globales de expresión génica, así como, un estudio de ocupación de las marcas bivalentes H3K27me3 y H3K4me3 en seis estadios definidos del desarrollo. Los resultados mostraron que, en CMEh pluripotentes, un 17% de los transcritos conocidos mostraron marcas bivalentes y un 78% de estos, resolvieron la bivalencia durante la diferenciación; mientras otros adquirieron la ocupación de estas marcas bivalentes durante el proceso. La mayoría de estos promotores, cambiaron en gran medida el estado de H3K27me3, mientras la marca H3K4me3 fue menos dinámica, lo que implica un papel importante de las proteínas PcG en la remodelación de la cromatina durante la diferenciación endocrina. Además, agruparon los genes que resolvieron la bivalencia durante la diferenciación en diferentes grupos. Por ejemplo, los genes característicos de progenitores pancreáticos fueron agrupados según el tiempo transcurrido en el que la represión por proteínas PcG era revertida. Entre estos genes se encuentran *Pdx1* y *Sox9*, que resolvieron su bivalencia en un estadio más temprano, mientras que la bivalencia de *Nkx6.1* o *Pft1a* fue resuelta más tarde, concordando con el proceso de embriogénesis murino. En resumen, estos resultados demostraron que la inducción de los genes específicos endocrinos durante la diferenciación pancreática está asociada tanto a la pérdida de la marca represora H3K27me3, como a la adquisición “*de novo*” de la marca activadora H3K4me3.

Considerando tanto nuestros resultados como toda la información reportada en la bibliografía, se puede afirmar que el tratamiento con DETA-NO en CME murinas induce la represión de *Jarid-2*, reduciéndose el reclutamiento del complejo PRC2 sobre el promotor de *Pdx1*, lo que conlleva una ligera disminución de la marca H3K27me3 e incremento de H3K4me3, y su activación transcripcional.

Por otro lado, hemos realizado un estudio de la histona acetiltransferasa P300 sobre la expresión de *Pdx1*, ya que se conoce su papel como coactivador de la transcripción en una amplia variedad de procesos celulares [129, 130]. Además, se ha descrito que P300 es necesaria para la especificación de progenitores endodérmicos hacia hígado, no favoreciendo la diferenciación de progenitores pancreáticos, un estudio que discutiremos más adelante [335]. En este contexto, nos centramos en primer lugar, en el análisis de la expresión de P300 en células expuestas a NO. Los resultados mostraron que el NO no modifica los valores de expresión a nivel de ARN mensajero.

En cambio, los niveles de proteínas se vieron disminuidos considerablemente tras el tratamiento (Figura 34). Además, los datos revelan la ocupación de P300 en la zona promotora proximal de *Pdx1* en condiciones de pluripotencia, y su liberación bajo condiciones diferenciadoras (Figura 34A). El hecho de encontrar una ocupación de JARID-2 y P300 en la misma zona promotora de *Pdx1*, plantea la posibilidad de interacción. De este modo, se llevó a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas, que demostraron que JARID-2 y P300 interaccionan en condiciones de pluripotencia, sugiriendo un papel represor de P300 en la expresión de *Pdx1*. Para comprobar esta hipótesis se empleó un inhibidor de P300, encontrándose que la exposición a 50  $\mu$ M de P300i induce un incremento significativo de expresión de *Pdx1* respecto a las células control, actuando incluso de manera sinérgica junto el NO (Figura 35). Estos datos confirman el papel represor de la histona acetiltransferasa P300 sobre la expresión de *Pdx1* en CMER y son consistentes con previos estudios que demuestran el papel represor de P300 independientemente de su actividad acetiltransferasa [342-345]. La adición de un grupo SUMO [344] y /o el reclutamiento de otros componentes represores como HDAC1 o HDAC6 [345] está relacionado con la actividad represora de P300, por lo que el estudio de estas proteínas sobre el promotor de *Pdx1* y ensayos de coimmunoprecipitación podrían proporcionar más datos interesantes.

El estudio realizado por Xu y colaboradores en 2011 [335], en el que se analizan las marcas epigenéticas de las histonas en células de endodermo embrionario de ratón y hepatoblastos presenta resultados de interés. Este estudio mostró que genes propios de hepatoblastos presentan marcas de histonas represoras, como H3K27m3, tanto en estadios de endodermo embrionario como en hepatoblastos, donde estos genes se expresan. No obstante, las marcas activadoras H3K9me3K14me3 presentaron una mayor ocupación en hepatoblastos, relacionándose con la expresión de estos genes. Sin embargo, el promotor de *Pdx1* presentó, en sus cuatro áreas conservadas, ocupación de las marcas activadoras y represoras, en ambos estadios, donde *Pdx1* no es expresado. Por otro lado, observaron una significativa disminución del número de hepatoblastos, con un reducido nivel de H3 acetilada, en embriones P300<sup>+/-</sup>. No obstante, estos embriones presentaron más células de endodermo ventral positivas para PDX1, pero sin diferencias en el endodermo pancreático dorsal. Para comprobar si estos resultados se producen como consecuencia de la heterogeneidad de P300, y no por otras vías indirectas, trataron embriones murinos durante 24 horas con el inhibidor de P300, y los

resultados fueron equivalentes al de los embriones P300<sup>+/-</sup>: reducción del número de hepatoblastos, disminución de la expresión de los genes característicos de hígado y un incremento de la expresión de *Pdx1*. De esta forma demostraron, por vías genéticas y farmacológicas, que P300 modula la especificación hacia hígado o páncreas. Además, también estudiaron el papel de *Ezh2* en la toma de esta decisión. Experimentos de ChIP revelaron que EZH2 ocupa el promotor de *Pdx1* en células de endodermo embrionario, donde colocaliza con la marca represora de histona H3K27me3. Asimismo, la delección de EZH2 condujo a un aumento del dominio progenitor pancreático ventral positivo para PDX1, pero sin cambios en el dominio dorsal. Así demostraron que EZH2 promueve indirectamente el programa hacia hígado, mediante la restricción de la extensión del páncreas ventral en el endodermo. Anteriormente, este mismo grupo demostró que la señalización por BMP favorece la formación del hígado sobre la pancreática en el endodermo ventral, pero poco tiempo después, BMP promueve la especificación del páncreas [346]. Ahora en este nuevo estudio, revelaron que la señalización por BMP es mediada por SMAD4, el cual recluta a P300 en los elementos reguladores del hígado, lo que conduce a la acetilación de las histonas y la activación génica. Este excelente estudio muestra claramente como P300 favorece la especificación hacia hígado en detrimento de la especificación pancreática, al igual que lo hace EZH2, y la persistencia de ambas marcas epigenéticas H3 acetilada y H3K27me3 en el gen *Pdx1* silenciado, siendo estos resultados análogos con los obtenidos en nuestro trabajo en CME murinas.

Indagando más en el proceso que controla la regulación de *Pdx1* en CME, analizamos unas 2000 pb de su región promotora con la base de datos JASPAR, para dilucidar sitios de unión consenso de factores de transcripción. El resultado de esta búsqueda fue una amplia lista de factores de transcripción implicados en el mantenimiento de la pluripotencia y factores de transcripción involucrados en la especificación hacia el linaje pancreático, entre otros. Además, encontramos algunos factores de transcripción tempranos, como es el caso de EGR-1, que presenta un sitio de unión a *Pdx1* entre -1064 y -1054 pb aguas arriba del inicio de la traducción, localizado en la zona media en la cual realizamos el estudio de metilación. Además, este sitio consenso (TGCGGGGGGGG) presentó un *score* de 10,403 y un *score* relativo de 0,8688, considerándose estos valores favorables a que exista una unión real entre la proteína y el ADN. Por otro lado, se ha descrito que EGR-1 controla la expresión de

numerosos genes implicados en la diferenciación y el crecimiento en respuesta a señales ambientales tales como factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores, estrés celular, daño, mitógenos y citocinas [143, 144]. Se sabe además que EGR-1 se induce en respuesta a hipoxia, hiperoxia, señalización mediada por ROS e inflamación [145-147]. Por todo ello, se ha estudiado la capacidad de EGR-1 de regular la expresión de *Pdx1*.

Para ello, se midió en primer lugar la expresión de Egr-1 a nivel de ARN mensajero y de proteína. Los resultados muestran que la expresión de Egr-1 se ve disminuida significativamente tras la retirada de LIF del medio de cultivo, pero el tratamiento con NO no induce cambios en su expresión (Figura 36A y B). Asimismo, se estudió la ocupación de EGR-1 en la zona media del promotor de *Pdx1* mediante ChIP. Los resultados muestran claramente que EGR-1 ocupa el promotor de *Pdx1* en CME pluripotentes y el tratamiento con NO induce su liberación (Figura 36C). Estos resultados fueron significativos en células cultivadas en presencia y ausencia de LIF, y sugirieron el posible papel represor de EGR-1 sobre la expresión de *Pdx1*. Para corroborar el papel represor de EGR-1 sobre la regulación de *Pdx1* en CMER, se llevaron a cabo experimentos de pérdida y ganancia de función de Egr-1. Los resultados de estos ensayos revelaron un incremento significativo de la expresión de *Pdx1* en células donde Egr-1 fue silenciado (Figura 37A y B), reforzándose la idea de que EGR-1 regula negativamente la expresión de *Pdx1* en CMER. Sin embargo, la ganancia de función de Egr-1 no modificó la expresión de *Pdx1* (Figura 37C y D), fenómeno que puede estar relacionado al nivel de metilación de ADN en células expuestas al NO, y que se discutirá más adelante.

En contraposición a estos, se ha descrito un papel activador de EGR-1 sobre *Pdx1* en células de insulinoma de ratón, MIN6 [347]. Este estudio reveló la unión de EGR-1 a varios sitios dentro del promotor de *Pdx1*, lo que favorece su activación transcripcional. En concreto, describieron que la sobreexpresión de Egr-1 incrementa la activación transcripcional de la zona promotora situada a -4500 pb y las regiones altamente conservadas I, II y III. Además, mutaciones de los sitios consensos localizados en la zona III y la zona IV disminuyeron sustancialmente la activación de *Pdx1* mediada por EGR-1. Por tanto, para reforzar nuestros resultados, desarrollamos un ensayo ChIP en la zona promotora distal de *Pdx1* (-2000 pb aguas arriba del inicio de la traducción, aproximadamente) en condición control y en células expuestas a NO. Los

resultados mostraron que EGR-1 se encuentra unido a la zona distal del promotor de *Pdx1* y el tratamiento con DETA-NO induce su liberación de forma significativa (Figura 38A), como lo hace con la ocupación de EGR-1 en la zona promotora media. Para asegurar que la diferencia de nuestros resultados con los de *Eto K.* y colaboradores es debida a la línea celular, y probablemente al estado de diferenciación de estas células, desarrollamos una co-inmunoprecipitación de cromatina en células de insulinoma de rata, INS-1E, en el área conservada III del promotor de *Pdx1*. Los resultados mostraron que EGR-1 se encuentra ocupando esta región del promotor de *Pdx1* en la línea celular INS-1E, como había sido previamente reportado (Figura 38B), lo que sugiere que la ocupación de EGR-1 y su actividad sobre el control de la regulación génica depende de la línea celular y/o estado de diferenciación.

Finalmente, para revelar qué mecanismos están implicados en la liberación de EGR-1 del promotor de *Pdx1* tras el tratamiento con NO, e intentar explicar por qué el experimento de ganancia de Egr-1 no resultó en un incremento de expresión de *Pdx1*, decidimos estudiar la posible implicación de la metilación del ADN y el estado de acetilación de EGR-1 en este fenómeno. Previos estudios han reportado que la unión de EGR-1 al ADN está condicionada a la desmetilación de los sitios CpG localizados en su sitio consenso [160, 163, 348]. Los resultados del análisis de metilación de la zona media del promotor de *Pdx1*, y en concreto, el estado de metilación del sitio CpG presente en la secuencia consenso de unión de EGR-1 (TGCGGGGGGGG), sitio numerado como CpG 18, revelaron que este sitio CpG aumenta su metilación tras el tratamiento con NO (Figura 27, 29 y 39A). Teniendo en cuenta que tras la exposición a NO este sitio se encuentra hipermetilado, esto explicaría por qué la unión de EGR-1 podría verse afectada. En la condición control o ausencia de NO, la sobreexpresión de Egr-1 tampoco afecta a la expresión de *Pdx1*, pero si tenemos en cuenta que *Pdx1* no es expresado en células pluripotentes no es de extrañar esta falta de respuesta. No obstante, es curioso que el incremento de metilación observado en el pirosecuenciamiento del sitio CpG 18 es muy ligero, comparado con la drástica liberación de EGR-1 del promotor de *Pdx1* en células tratadas con NO. *Jian Xu* y colaboradores encontraron que EGR-1 induce represión o activación transcripcional dependiendo del estímulo, y explicaron este papel dual, en parte, por la acetilación del complejo EGR-1/P300/CBP [349]. Demostraron además que después de un estímulo exógeno, como la radiación UV, EGR-1 se desacetila y el promotor p300/CBP se reprime. Así, el estado de

acetilación de EGR-1 y su unión a otras proteínas, como P300, puede regular su capacidad de unión al ADN y modular su actividad. Por tanto, decidimos estudiar la ocupación de EGR-1 en el promotor de *Pdx1* en células tratadas con un agente desmetilante de ADN, como es la 5-Aza-2'-desoxicitidina, y con el inhibidor de P300 para corroborar nuestra hipótesis. Los resultados de ChIP desvelaron que el tratamiento con 5-Aza-2'-desoxicitidina, evita la liberación de EGR-1 del promotor de *Pdx1* inducida por el NO; mientras que el tratamiento con P300i impide su ocupación (Figura 39B). Un estudio realizado en nuestro laboratorio, mediante la co-inmunoprecipitación de EGR-1 y revelado con un anticuerpo anti-panAcetil, reveló que el nivel de acetilación de EGR-1 se ve disminuido tras el tratamiento con NO (datos no mostrados). Por tanto, se demuestra que la exposición a NO induce la metilación del sitio CpG de la secuencia consenso de unión de EGR-1, y esto conlleva a su liberación del ADN; y por otro lado, que el NO disminuye la expresión de P300, favoreciendo la liberación de EGR-1, posiblemente a través de su desacetilación.





## **Bloque 2**

### **5.2 Desarrollo de un protocolo de diferenciación de células madre hacia células productoras de insulina**

En la actualidad, hay numerosos científicos dedicados al diseño de protocolos de diferenciación *in vitro* de células madre pluripotentes hacia células productoras de insulina, con objeto de reemplazar las células beta dañadas en pacientes diabéticos. Sin embargo, este proceso no es sencillo, ya que hay que dirigir su diferenciación hacia el linaje pancreático y, en concreto, hacia células endocrinas y células  $\beta$ . La mayoría de los protocolos existentes a día de hoy, tratan de reproducir el desarrollo pancreático mediante la generación *in vitro* de los diferentes estadios que suceden durante la embriogénesis del páncreas, como endodermo definitivo, intestino primitivo o “*gut tube*”, intestino anterior o “*foregut*”, endodermo pancreático, progenitores endocrinos y células beta funcionales.

De esta manera, el primer paso para diferenciar las CM hacia un linaje pancreático, es inducir su diferenciación hacia endodermo definitivo. Gracias a los estudios realizados en el desarrollo embrionario murino, se conoce que una de las vías de señalización implicada en este proceso es la señalización mediada por Nodal, que controla la especificación hacia endodermo o mesodermo, según la intensidad y duración de la señal. Por tanto, en el desarrollo de los protocolos de diferenciación se utilizan Activina A o Nodal para activar la vía de señalización Nodal y favorecer la generación de endodermo definitivo [212, 223, 350, 351]. Además, se conoce que la inducción de la vía Nodal es realmente eficaz en la diferenciación hacia endodermo definitivo cuando la vía de señalización de PI3K se encuentra silenciada, lo que se consigue con la reducción del suero del medio de cultivo o mediante inhibidores específicos [207, 208, 212, 213]. Asimismo, la vía de señalización Wnt, también tiene un papel relevante en este paso, controlando la expresión de Brachyury, implicado en la diferenciación mesoendodérmica [352]. Así, los protocolos de diferenciación utilizan el ligando Wnt3a para activar la vía de señalización de Wnt y favorecer la formación de endodermo definitivo [212, 214, 220]. De esta forma, la adición de Activina A/Nodal, inhibidores de PI3K y Wnt3 son utilizados en la actualidad para la diferenciación de células madre humanas a endodermo definitivo de manera eficiente (Anexo 3).

En este trabajo, nos hemos centrado en el diseño de un protocolo de diferenciación hacia células productoras de insulina, partiendo de un protocolo diseñado previamente en nuestro laboratorio con CME murinas, de la línea celular D3. Este protocolo fue exitoso en diferenciar CMEr hacia endodermo definitivo mediante la utilización de pequeñas moléculas adicionadas de forma secuencial, como es el DETA-NO y el ácido valproico, junto con la reducción de la concentración de suero del medio de cultivo [188]. Tras 10 días de protocolo, se consiguió la expresión significativa de genes de endodermo definitivo como *FoxA2*, *Sox17* o *Hnf1 $\beta$* . Aunque este protocolo no se basa en la mimetización del desarrollo embrionario del páncreas, en cuanto a las vías de señalización y los ligandos utilizados, consigue, de forma eficaz y simple, la generación de endodermo definitivo.

Los siguientes pasos del proceso de diferenciación pancreática es la formación del intestino primitivo o “*gut tube*” e intestino anteroposterior o “*posterior foregut*”. En esta fase del desarrollo, y la formación de los primordios dorsal y ventral, participan varias señales procedentes de la notocorda y la aorta, como la Activina A y el bFGF, que inducen el silenciamiento de *Sonic Hedgehog* y expresión de *Pdx1* [22, 23], por lo que los protocolos de diferenciación *in vitro* utilizan inhibidores de *Ssh*, como ciclopamina o SANT1 [207, 214, 220, 222]. Además, señales procedentes del mesodermo cardiaco y *septum transversum*, bFGF y BMP, silencian *Pdx1* favoreciendo el desarrollo del hígado y del sistema biliar [24]. Así, se puede observar cómo una misma molécula, bFGF, puede tener un efecto opuesto. Este efecto dual se ha descrito ser dependiente de dosis; ya que bajas dosis de bFGF inducen la generación del hígado, niveles intermedios favorecen la diferenciación pancreática y altas concentraciones generan precursores de intestino delgado [218]. Por tanto, inductores de la vía FGF e inhibidores de BMP son ampliamente utilizados en protocolos de diferenciación de CM humanas hacia un linaje pancreático [208, 217, 218, 220, 222, 226]. Además, se ha descrito que el ácido retinoico (RA) tiene un papel importante en la diferenciación pancreática, por lo que muchos protocolos de diferenciación hacia linaje pancreático lo incluyen [214, 229, 353]. Como resumen, podemos destacar el uso de inhibidores de *Ssh* (Ciclopamina y SANT1), inductores de FGF (bFGF, FGF4 o FGF7), inhibidores de BMP (Noggin) y RA para favorecer la generación de endodermo pancreático (Anexo 3).

En nuestro caso, para conseguir la formación de progenitores pancreáticos, así como la expresión de *Pdx1*, decidimos basarnos en el control de la represión de *Pdx1* que ejerce P300, según los resultados obtenidos en el primer bloque y los datos

descritos en la bibliografía sobre el papel de P300 y su control en la especificación de progenitores hepáticos y pancreáticos [335]. De esta manera, continuamos el protocolo de diferenciación mediante la exposición durante unas 20-22 horas con 50  $\mu$ M del inhibidor de P300, lo que generó una muerte celular considerable y un cambio en la morfología de las células supervivientes, además de un aumento significativo de expresión de *Pdx1*, *Pax4* y *Kir6.2* (Figura 41 y 42). Esto demuestra que en esta etapa del desarrollo, *Pdx1* sigue siendo reprimido por P300 y la inhibición de la actividad de P300 es crucial para favorecer el desarrollo pancreático. Así, el tratamiento con P300i, combinado con pequeñas moléculas como el DETA-NO y el VA, permite la activación secuencial de marcadores necesarios para la diferenciación del linaje pancreático.

Finalmente, el último paso consiste en la inducción de la diferenciación endocrina y la obtención de células  $\beta$  maduras. Se conoce que el equilibrio entre la diferenciación acinar y la endocrina se mantiene por el antagonismo entre *Ptf1a* y *Nkx6.1* en los progenitores multipotentes [28]. Además, se ha descrito que la distinción de los precursores endocrinos de los ductales está modulada por el factor de transcripción *Ngn3*, y que la vía de señalización celular de *Notch* tiene un papel relevante en la especificación de los linajes pancreáticos y en la expresión de este factor de transcripción [30]. Por otro lado, se ha descrito el papel fundamental de *Nkx2.2*, *Pax4* y *Arx*, conociéndose la función antagónica que existe entre *Pax4* y *Arx* para la inducir la formación de células  $\beta$  o  $\alpha$ , respectivamente [36]. Por tanto, los protocolos de diferenciación existentes tratan de modular la actividad de la vía de señalización *Notch*, exponiendo a las células a inhibidores como DAPT, un inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa [214, 224] o GsiXX [227], siendo este último más eficaz al favorecer en mayor medida la generación de células endocrinas en detrimento de las exocrinas. Por otro lado, se han diseñado protocolos de diferenciación que favorecen la diferenciación endocrina mediante la formación de estructuras tridimensionales, favoreciendo la agregación de los progenitores pancreáticos mimetizando la estructura de los islotes de Langerhans [222, 228, 229]. Asimismo, la obtención de células  $\beta$  funcionales, es un tema de especial relevancia, y para el paso final de maduración final, se han probado multitud de moléculas como IGF1, exedin-4, HGF, suplemento B27, betacelulina o nicotinamida, entre otras [224, 227]. Sin embargo, sólo tres de los protocolos de diferenciación diseñados hasta la fecha, han obtenido *in vitro* células  $\beta$  maduras, capaces de liberar insulina en respuesta a la concentración de glucosa extracelular; anteriormente sólo se

había conseguido después del trasplante de progenitores endocrinos en modelos murinos [220, 222, 226, 354]. Por ello, estos estudios son de gran relevancia, y han supuesto un paso de gigante en este terreno. Por un lado, el grupo de *Melton* publicó en 2014 un protocolo de diferenciación escalable de células productoras de insulina a partir de células madre pluripotentes humanas, capaces de responder a los cambios de glucosa *in vitro*, y que revertía la hiperglicemia en ratones diabéticos [221]. Por otro lado, el laboratorio de *Kieffer* publicó, ese mismo año, otro protocolo de diferenciación completamente *in vitro* que diferencia eficazmente CME humanas en células productoras de insulina maduras capaces de revertir la diabetes en modelos murinos. No obstante, la dinámica de estimulación con glucosa reveló semejanzas, pero también diferencias, entre las células productoras de insulina generadas *in vitro* y las células  $\beta$  humanas [227]. Además, el grupo de *Soria* y colaboradores ha reportado recientemente un protocolo de diferenciación optimizado, el cual se basa en la formación de agregados celulares y adición de resveratrol en su paso de maduración final, obteniendo células productoras de insulina maduras que consiguen revertir la hiperglucemia en ratones diabéticos de forma transitoria [228].

En el trabajo actual, hemos conseguido también células productoras de insulina maduras a partir de CME murinas, a través del cultivo en suspensión y la formación de agregados celulares. En el paso anterior, ya encontramos un incremento de expresión de *Kir6.2*, una subunidad del canal de potasio ( $K^+$ ) dependiente de ATP, y *Pax4*, un marcador de progenitor pancreático, que según se ha descrito, favorece la formación de células  $\beta$  respecto a las células  $\alpha$ . Por ello, intuimos que el tratamiento con P300i favorece la diferenciación pancreática, y en concreto, la diferenciación hacia célula  $\beta$ , aunque hay que mencionar que la expresión de *Arx* no fue analizada. En esta última fase del protocolo, mediante el cultivo en suspensión, se generaron estructuras tridimensionales homogéneas en su morfología y aspecto (Figura 40), y se indujo la expresión de marcadores característicos de células  $\beta$ , como *Pdx1*, *Glut2*, *Insulina*, *Kir6.2* y *Glucoquinasa* (Figura 41 y 42). Además, se puede comprobar que la expresión de *Nkx6.1* es mayor que la expresión de *Ptf1a*, lo que muestra que el cultivo en suspensión favorece la diferenciación endocrina respecto a la acinar. Para comprobar la presencia en el cultivo de otras células endocrinas, se analizó la expresión de *Glucagón* y *Somatostatina*, como marcadores característicos de células  $\alpha$  y  $\delta$ , respectivamente. Asimismo, se midió la expresión *Amilasa2*, para analizar la presencia de células

exocrinas. Los resultados no mostraron indicios de expresión de estos genes (Figura 41), demostrando que los agregados generados *in vitro* son exclusivamente monohormonales. Mediante inmunofluorescencia de finos cortes de los agregados, se comprobó la expresión proteica y colocalización de PDX1 y GLUT2. Además, se analizó la presencia de PÉPTIDO-C, para verificar la capacidad de los agregados celulares de expresar, generar y procesar la insulina (Figura 44A). Finalmente, para conocer si los agregados son maduros y capaces de responder a secretagogos se estimularon con baja (3 mM) y alta (25 mM) concentración de glucosa, así como con una solución con KCl (25 mM), el cual induce una despolarización de la membrana plasmática, y los sobrenadantes fueron utilizados en un ensayo de ELISA de insulina. El resultado de este experimento confirmó que los agregados generados en cultivo *in vitro* son maduros, siendo capaces de responder a los cambios de glucosa del medio y al KCl (Figura 44B). De este modo, presentamos en este trabajo un innovador y sencillo protocolo de diferenciación basado en la adición de pequeñas moléculas al medio de cultivo consistente en 5 pasos, en los cuales las células son diferenciadas en un sistema completamente *in vitro* hacia células productoras de insulina, con fenotipo maduro y capaz de responder a diferentes secretagogos.

Nuestra finalidad, es obtener células productoras de insulina de origen humano, por lo que analizamos la reproducibilidad de este protocolo en células madre embrionarias humanas, en la línea celular HS181. Además, mantuvimos las células pluripotentes y desarrollamos el protocolo de diferenciación, en medio condicionado con sustituto de suero (*KSR*), para posibilitar su uso en terapia celular. Para ajustar el protocolo en células humanas, modificamos por un lado el número de días de cultivos previo al tratamiento con DETA-NO; y por otro, el momento de la disminución del sustituto de suero (*KSR*), de manera que el protocolo consiste en seis pasos, con un número final de días comprendidos entre 16 y 19. El paso de maduración final, está siendo optimizado mediante el cultivo de las células en suspensión y/o adherencia, durante 3 o 6 días, y empleo de pequeñas moléculas, como nicotinamida o resveratrol (Figura 45).

En primer lugar, analizamos la expresión génica de marcadores de endodermo definitivo (*SOX17*, *FOXA2* y *HNF1 $\beta$* ) y progenitor pancreático (*PDX1* y *NKX2.2*), en cada fase del protocolo. Los resultados mostraron que el tratamiento con DETA-NO, incrementó la expresión *PDX1* y *NKX2.2*, la exposición a ácido valproico durante 6 días, aumentó el nivel de expresión de las marcadores de endodermo definitivo, *FOXA2*,

*SOX17* y *HNF1 $\beta$*  y el tratamiento con P300i, indujo un aumento de expresión de *PDX1*, por lo que el patrón de expresión génica es similar al encontrado en CME de origen murino (Figura 46 y 47). Además, los experimentos de inmunofluorescencia revelaron que las células HS181 mantenidas en condiciones de pluripotencia presentan altos niveles de expresión de NANOG y OCT4, el tratamiento con DETA-NO induce un incremento de la expresión de *PDX1*, el ácido valproico favorece la expresión de *FOXA2* y *SOX17* y el tratamiento con P300i, induce la colocalización *FOXA2* y *SOX17*, con *PDX1* (Figura 48). Teniendo en cuenta estos resultados, podemos deducir que, hasta este punto, el protocolo de diferenciación es reproducible en CME de origen humano.

Por otro lado, quisimos comprobar la reproducibilidad del protocolo de diferenciación en iPSC, ya que estas células además de evitar los problemas éticos que supone el uso de las células madre embrionarias humanas, al poder ser derivadas del propio paciente, omiten los problemas de rechazo en el trasplante. De esta forma, utilizamos células de la línea celular MSUH001, y desarrollamos el protocolo de diferenciación, tal y como se hizo con las células HS181. Los resultados de expresión génica en cada fase del protocolo fue muy similar al obtenido con las células HS181, mostrándose un incremento de expresión de *PDX1* y *NKX2.2*, tras el tratamiento con DETA-NO, una inducción de la expresión de *FOXA2* y *SOX17*, tras el tratamiento consecutivo con ácido valproico y un nuevo aumento de expresión de *PDX1* tras la exposición a P300i (Figura 49). Además, la expresión proteica de *PDX1*, *FOXA2* y *SOX17*, observada mediante inmunofluorescencia, corroboraron estos resultados (Figura 50). Sin embargo, la muerte celular durante el desarrollo del protocolo en esta línea celular fue mucho más pronunciada en comparación con la línea celular HS181, de tal manera que la cantidad de células adheridas que se encontró tras el tratamiento con P300i, fue muy escasa, y la inmunofluorescencia no pudo realizarse con éxito en este punto del protocolo. La muerte celular observada fue bastante significativa tras la reducción del *KSR*, el tratamiento con 500  $\mu$ M de DETA-NO y la exposición a 50  $\mu$ M de P300i. Por tanto, para reproducir de forma más eficaz el protocolo de diferenciación en esta línea celular, habría que rediseñar estos puntos, como cambios de concentración u horas de exposición, e intentar disminuir así la muerte celular acontecida. Asimismo, podrían utilizarse otras líneas celulares de iPSC, para comprobar si es una cuestión concreta de esta línea celular o es debido a las diferencias existentes entre las células

madre embrionarias y las célula madre de pluripotencia inducida, como plasticidad, y perfiles genéticos y epigenéticos [91-93].

Finalmente, decidimos continuar el protocolo de diferenciación en células HS181, hasta la obtención de células productoras de insulina *in vitro*, el igual que hicimos con las CME murinas. Para el proceso de maduración, utilizamos distintas estrategias, como cultivo en suspensión y/o adherencia, medio suplementado con Insulina-Transferrina-Selenito (ITS), y adición de moléculas, como nicotinamida y resveratrol. Por un lado, el cultivo en suspensión, ya ha mostrado ser eficaz en inducir maduración de las células CME de ratón en nuestro estudio, así como en previos protocolos de diferenciación con células madre pluripotentes humanas [222, 228, 229]. Por otro lado, el medio suplementado con ITS favorece el crecimiento celular en medio con suero reducido, y se ha utilizado en etapas finales de diversos protocolos de diferenciación hacia linaje pancreático [228, 229]. Finalmente, se ha descrito en diversos protocolos de diferenciación el uso de nicotinamida y resveratrol para favorecer la diferenciación pancreática y la maduración de las células beta [206-208, 228].

Según los resultados obtenidos en los distintos ensayos de maduración, podemos concluir que el cultivo en adherencia durante 3 días en medio *KSR* al 2% podría ser una alternativa eficaz para madurar las células, ya que favorece la expresión de *PDX1*, *GCK* e *INS* (Figura 51B). Por otro lado, el uso de medio *KSR* suplementado con ITS, y la combinación del cultivo en adherencia durante 3 días con 10 mM de nicotinamida y cultivo en suspensión con 75  $\mu$ M de resveratrol durante otros 3 días, también parece ser eficaz, encontrándose expresión de *PDX1*, *INS* y *NKX6.1* (Figura 51D). Por tanto, nos encontramos con dos procesos alternativos de maduración que parecen favorecer la expresión de insulina en las células HS181, así como genes características de células  $\beta$ . No obstante, estos resultados son preliminares, y requieren ser reproducidos nuevamente, además de ser corroborados con otras metodologías que muestren la expresión a nivel de proteína. Además, queda pendiente comprobar la capacidad de liberar insulina en respuesta a la glucosa extracelular, para determinar si las células obtenidas *in vitro* son maduras, y en este caso, calcular la proporción de células funcionales obtenidas al final del protocolo para conocer la eficacia del mismo.

Como conclusión de este bloque podemos mencionar que, mediante la adición secuencial de pequeñas moléculas al medio de cultivo, como DETA-NO, ácido valproico (VA) y P300i, junto con el cultivo en suspensión, hemos conseguido

desarrollar un protocolo de diferenciación de CME murinas hacia células productoras de insulinas maduras. Este protocolo es innovador, ya que no se basa en la mimetización del desarrollo embrionario del páncreas, como lo hacen la mayoría de los protocolos diseñados hasta el momento (Anexo 3), sino en la expresión controlada del factor de transcripción Pdx1. Además, los resultados obtenidos hasta la fecha, muestran su capacidad de ser reproducido en células madre de origen humano. Por tanto, nos encontramos frente a un nuevo mecanismo para diferenciar células madre pluripotentes hacia linaje pancreático, y en concreto hacia célula  $\beta$ , de una manera sencilla y controlada, además de económica, ya que se prescinde del uso de factores de crecimiento, como Activina A o Nodal, Wnt3a, FGF y Noggin, entre otros, que encarecen de forma significativa el desarrollo de los protocolos de diferenciación.



## **Bloque 3**

### **5.3 Estudio de las Células T reguladoras de Sangre de Cordón Umbilical y Sangre Periférica de adulto**

El hallazgo de una asociación entre la disfunción de las células Treg y la aparición de la DM tipo 1 [312, 313], permite proponer la idea de que la expansión y/o activación de este tipo celular podría frenar el ataque inmunitario sobre la célula  $\beta$ . De este modo, varios estudios se han centrado en el uso de mono-inmunoterapias, mediante la administración de anti-CD3, anti-CD20 o CTL4-Ig [71-73], o la aplicación de IL-2 [316-318], con la finalidad de expandir la población de células Treg *in vivo*. Respecto a la terapia celular con células Treg, ya fue probada con éxito en varios modelos diabetes en murinos [307-309] y, recientemente, se ha descrito el primer ensayo clínico con células Treg en fase I con pacientes diabéticos obteniéndose resultados prometedores [76]. En este sentido, nos encontramos un paso más cerca de un posible tratamiento de la DM de origen inmune, aunque hoy en día sigue siendo objeto de estudio por numerosos científicos la caracterización, los mecanismos de activación y expansión *in vitro* y estudio de la función y estabilidad de las células Treg para tratar de optimizar su uso en terapia.

El uso de cordón umbilical como fuente de células Treg para la terapia celular se ha convertido en los últimos años en una alternativa atractiva. Esto es debido a que las células Treg de CB son una población mucho más homogénea, y mantienen la expresión de FoxP3 y la capacidad de supresión después de su expansión *in vitro*, aunque este aspecto ha generado algunas controversias [288-291]. Asimismo, recientemente se ha hecho un verdadero progreso en la evaluación de la seguridad del uso de células CB Treg en la clínica. Brunstein y colaboradores publicaron, en 2011, el primer ensayo en fase I donde se utilizaron células CB Treg expandidas *in vitro*, en pacientes trasplantados con HSC procedentes de dos cordones umbilicales para tratar la enfermedad injerto contra huésped (GvHD) [79]. Sin embargo, aún existen complicaciones como la escasez en su persistencia y tolerancia en el organismo, lo que requiere un conocimiento mayor sobre las condiciones óptimas bajo las cuales las células CB Treg presentan capacidad supresora y mantienen sus propiedades con el fin de alcanzar los tejidos diana *in vivo*. De este modo, en este bloque del trabajo nos hemos

centrado en la caracterización de células Treg de sangre de cordón umbilical, mediante un análisis comparativo con células Treg de sangre periférica, en base a su capacidad proliferativa, expresión de marcadores de activación y patrón de liberación de citocinas, bajo condiciones estimuladoras de su receptor TCR a distintos tiempos. Además, hemos desarrollado estos análisis utilizando dos técnicas de selección distintas, para comprobar si el proceso de aislamiento influye en las características de las células CB Treg.

Las células Treg presentan una expresión elevada de CD25. Sin embargo, este marcador no es específico para células T reguladoras CD4<sup>+</sup>, por lo que el uso de CD25 para la selección de las células Treg tiene algunas limitaciones. En primer lugar, CD25, es un marcador tradicional de activación de células T, por lo que su expresión se incrementa en células T CD4<sup>+</sup> no reguladoras tras la activación de su receptor TCR [232, 288]. En segundo lugar, aunque la población de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> esté enriquecida en células con funciones supresoras, poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> también pueden presentar un papel regulador después de su expansión clonal *in vitro*. Incluso, las células Treg CD25<sup>+</sup> pueden perder la expresión de este marcador tras diferentes estimulaciones *in vivo* [355]. Por otro lado, existe un panel de moléculas, como GITR [356], CTL4-A [357], CD103 [358], entre otras, que se han relacionado con las células Treg, pero ninguna de ellas se califica como marcador exclusivo de células Treg [359, 360]. En este sentido, el descubrimiento del factor de transcripción FoxP3, como factor clave en el desarrollo de las células Treg y en su actividad, representó uno de los avances más significativos en la biología de las células Treg. Además, se ha descrito que sólo las células que expresan un alto nivel de CD25 y Foxp3 presentan capacidad supresora [232, 361], ya que algunas células T efectoras también lo expresan, pero en menor nivel y de forma transitoria [362]. En este mismo contexto, el grupo de *Boehmer* y colaboradores mostró que células T *naive* murinas podían ser convertidas en células Treg, mediante la sobreexpresión de FoxP3, fenómeno que se vio favorecido tras la adición de TGF- $\beta$  o la reducción de IL-2, indicando que las células Treg son aquellas que expresan altos niveles de FoxP3 independientemente de su origen [363]. Por otro lado, fue demostrado que la baja expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor IL-7 (CD127) se correlaciona con una alta expresión de FoxP3, por lo que es posible identificar las células Treg como CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup> sin requerir la tinción intracelular de FoxP3 [364], ya que esto imposibilita su uso en experimentos funcionales.

La pureza tras el proceso de selección y el rendimiento de los métodos de aislamiento de células Treg, suponen todavía un reto importante para su uso en terapia. Por eso, quisimos analizar la pureza conseguida tras la selección de las células Treg con la nueva tecnología de aislamiento *Streptamer*, y compararla con el método tradicional basado en columnas magnéticas. En nuestro estudio, para la medida de la pureza hemos considerado a las células Treg como la población: CD45<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> y CD127<sup>-/low</sup>, ya que, según hemos comentado anteriormente, es la caracterización más apropiada sin requerir la tinción intranuclear de FoxP3. Los resultados mostraron que las células mononucleares (MC) de la sangre periférica de adulto y de cordón umbilical presentan una proporción de células Treg de  $5,75 \pm 1,33$  % y  $4,91 \pm 1,47$  % respectivamente, respecto a las células CD4<sup>+</sup>. Por otro lado, las células nucleadas totales (TNC) de la sangre de cordón umbilical presentan una media de  $6,53 \pm 1,74$  % de células Treg respecto a las células CD4<sup>+</sup> (Figura 55A). Estos resultados concuerdan con los datos que se han previamente descrito en otros ensayos (5-10%) [232, 319]. Por otro lado, el análisis de la pureza mostró que existen diferencias significativas entre las células PB Treg ( $78,8 \pm 11,2$  %) y CB Treg ( $86,1 \pm 6,9$  %) seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit*. Esto es debido a la presencia de células T efectoras CD25<sup>+</sup> en la sangre periférica de adulto. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre las células CB Treg seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit* ( $86,1 \pm 6,9$  %) y las células CB Treg aisladas por *Streptamer* ( $91,7 \pm 4,8$  %) (Figura 55B), lo que indica que la tecnología *Streptamer* es una buena herramienta para seleccionar células CB Treg y que la sangre de cordón umbilical es una magnífica fuente de células Treg con alta pureza.

Respecto al rendimiento de las metodologías, los resultados mostraron la selección por *Miltenyi Biotec Kit* presenta diferencias estadísticamente significativas para la selección de células PB Treg y CB Treg, encontrándose unos valores de rendimiento de  $39,55 \pm 14,85$  % y  $23,57 \pm 4,71$  %, respectivamente. Respecto al rendimiento conseguido con la tecnología *Streptamer*, el valor medio obtenido fue  $9,33 \pm 1,70$  %, bastante menor al rendimiento de la técnica *Miltenyi Biotec Kit* para células CB Treg (Figura 55D), demostrándose que la tecnología *Miltenyi Biotec Kit* es más eficaz para la selección de células Treg, en especial para células PB Treg, aunque éstas presentan menor pureza que las CB Treg aisladas por esta misma metodología.

La elevada cifra de células Treg que son necesarias para su empleo en terapia celular implica la necesidad de su expansión *in vitro*. Un ejemplo de esto es el ensayo

clínico en fase I publicado *Bluestone* y colaboradores, basado en el uso de células Treg en pacientes diabéticos, donde utilizan células Treg autólogas expandidas *in vitro* con diferentes concentraciones celulares (desde  $0,05 \times 10^8$  hasta  $26 \times 10^8$  células) [76]. Por otro lado, el grupo de *Trzonkowski* ha publicado un ensayo clínico con células Treg en niños diabéticos [365-367], para el cual han utilizado una dosis celular de  $10\text{-}30 \times 10^6$  células Treg por Kg del individuo. De esta manera, la expansión *in vitro* de las células Treg es un tema de especial relevancia, y los protocolos de expansión siguen en continua investigación. Además, no sólo es importante obtener un número elevado de células, sino que tras el protocolo de expansión las células Treg sigan manteniendo sus propiedades supresoras.

En nuestro estudio, la metodología seguida para la expansión y activación de las células Treg ha consistido en la adición de  $10 \mu\text{g/ml}$  de anti-CD3 unido a la placa, mediante su incubación durante 2 horas o toda la noche a  $37^\circ\text{C}$ , y  $10 \mu\text{g/ml}$  de anti-CD28 soluble. La utilización del anticuerpo monoclonal anti-CD3 para la estimulación del receptor TCR se ha venido estudiando y utilizando desde hace ya varias décadas, y se ha demostrado que su adición de forma soluble o unido a la placa tiene efectos diferentes [368, 369]. Por un lado, se ha comprobado que el anticuerpo anti-CD3 soluble favorece una estimulación gradual, mientras que anti-CD3 unido a la placa induce una estimulación más fuerte del receptor TCR en un menor periodo de tiempo y menor variabilidad entre las muestras, siendo estos efectos dependientes también de la concentración de anticuerpo utilizada [370]. Por otro lado, la estimulación de la proteína de membrana CD28 es necesaria para la completa activación de la célula T, mediada *in vivo* por la unión de las proteínas CD80 o CD86 de las APC [255]. De esta manera, la utilización de anti-CD3 y anti-CD28 favorece la activación *in vitro* de las células Treg aisladas. Asimismo, suplementamos el medio de cultivo con  $1000 \text{ U/ml}$  de IL-2, ya que se conoce que IL-2 favorece la proliferación y supervivencia de las células T y es un componente esencial en todos los protocolos publicados para la expansión *in vitro* de células Treg, junto con la activación del receptor TCR y CD28 [371-376]. Incluso, se ha descrito la incapacidad de proliferación de las células CB Treg bajo condiciones estimulantes de receptor TCR en ausencia de IL-2 [377]. Nuestros resultados de proliferación celular concuerdan con estos datos, ya que se observó una tasa de proliferación relativa aproximada de 4, para las células Treg estimuladas con anti-CD3/anti-CD28 junto con IL-2, tras 5 días de cultivo; mientras que las células no

estimuladas (*resting*), solo cultivadas en presencia de IL-2, no presentaron tasa de proliferación. Además, no se encontraron diferencias significativas entre las células PB y CB Treg y las diferentes técnicas de aislamiento (Figura 56). Estos datos indican que la estimulación con 10 µg/ml de anti-CD3 unido a la placa y 10 µg/ml de anti-CD28 soluble, junto a la adición de 1000 U/ml de IL-2, es eficaz para inducir la expansión de las células Treg *in vitro*, independientemente de su origen o técnica de selección empleada. Sin embargo, un ensayo realizado por *Theil* y colaboradores mostró diferencias significativas en la capacidad de proliferación de las células CB Treg y las células PB Treg y PB Treg *naive* [378]. Además, este grupo demostró que la mayoría de las células CB Treg (aproximadamente el 85%) presentan un fenotipo *naive* (RA<sup>+</sup>); mientras que las células PB Treg de adultos jóvenes, presentan solo un 30% de Treg RA<sup>+</sup>, y este porcentaje disminuye con la edad. Para la activación de las células Treg y su expansión *in vitro*, desarrollaron dos rondas de activación con partículas anidas a anti-CD3/anti-CD28, y suplemento de IL-2, con un total de 14 días en cultivo. Tras este tiempo observaron que las células CB Treg tienen una mayor capacidad de expansión *in vitro*. Además, tras este periodo las células CB Treg presentaron mayor expresión del factor de transcripción FOXP3.

Por tanto, es importante destacar que aunque en nuestro estudio no hallamos observados diferencias significativas en cuanto a la capacidad de proliferación de las células PB Treg y CB Treg, ensayos a largo plazo sí podrían mostrar diferencias. Asimismo, es necesario diseñar un protocolo de expansión en un periodo de tiempo más prolongado para llegar a obtener un número de células apropiado para el uso en terapia. Teniendo en cuenta que, en el caso del cordón umbilical y la selección de células Treg por la metodología *Miltenyi Biotec Kit*, obtuvimos en torno a 1 millón de células, y que tras 5 días de cultivo conseguimos una tasa de proliferación de aproximadamente 4, en este punto del protocolo tendríamos sólo unos 4 millones de células Treg, lo que conlleva a estricta necesidad de un protocolo continuado. El diseño de un protocolo de expansión a largo plazo podría incluir la estimulación con anti-CD3/anti-CD28 e IL-2 en sucesivas ocasiones, así como la división de las células en distintos pocillos para evitar una confluencia excesiva que pudiera ocasionar su muerte, a la vez que añadir medio de cultivo fresco.

Por otro lado, para obtener un fenotipo más completo de las células Treg, analizamos el efecto de la estimulación del receptor TCR y la proteína CD28 sobre la

expresión de los marcadores característicos de las células Treg, como son CD25 y FOXP3, y marcadores de membranas, tales como GITR, CD69 y LAP.

CD25 es una de tres las subunidades que conforman el receptor de alta afinidad de IL2 (IL-2R):  $\alpha$  (IL-2R $\alpha$  o CD25),  $\beta$  (IL-2R $\beta$  o CD122) y  $\gamma$  (IL-2R $\gamma$  o CD132). La IL-2 es una pequeña citocina (15KDa) producida principalmente por células T activadas, lo que induce su respuesta biológica al unirse a su receptor de alta afinidad. Es conocido que IL-2 tiene un papel relevante en el desarrollo de las células Treg [379], y es esencial para su función reguladora [380], y la privación IL-2 es uno de los mecanismos por los que las Treg suprimen la función de las células efectoras [298]. Todos estos mecanismos por los que IL-2 afecta al desarrollo y a la función de las Treg, implican la función de su receptor y, en concreto, a la actividad de CD25, por lo que hace que el estudio de la expresión de esta proteína sea de gran interés.

Por ello, estudiamos la expresión de CD25 tras la activación del receptor TCR *in vitro*, a través de su incubación con anti-CD3/anti-CD28 e IL-2. Nuestros resultados mostraron que el porcentaje de células PB y CB Treg (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-low</sup>) seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit* y activadas a día 2 y 5 presentan diferencias significativas respecto a las células no activadas. Sin embargo, las células CB Treg aisladas por *Streptamer* no presentaron cambios significativos tras la activación, e incluso a día 2 presentaron menor porcentaje de CD25<sup>+</sup> respecto a las CB Treg seleccionadas por el método de columnas (Figura 60A). De forma similar, el análisis de la intensidad media de la fluorescencia (IMF) reveló un incremento de la señal de CD25 tras la estimulación tanto a día 2 como a día 5, a excepción de las células CB Treg seleccionadas por *Streptamer*, cuyo incremento no fue significativo a día 5 (Figura 62). Aunque los resultados de la IMF indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambas metodologías, el resultado global de la gráfica, sumado a la falta de respuesta a la estimulación observado en el porcentaje celular y al menor número de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-low</sup> encontrado tras la activación a día 2 en las células CB Treg seleccionadas por *Streptamer*, conduce a la idea de que esta tecnología está modificando de alguna forma la expresión de CD25. Cabe pensar que este resultado puede ser debido a un artefacto de la técnica y que necesite ser optimizada en cuanto a la cantidad de anticuerpo Fab-CD25 que se está utilizando en el proceso de selección, ya que un exceso de anticuerpo puede quedar adherido a la proteína y dificultar su lectura real mediante citometría. El análisis de la expresión de CD25 a nivel de ARNm

o de proteína mediante western blotting podría ser interesante en este punto, ya que podría ayudar a descartar que estos resultados sean producidos como consecuencia de un exceso de anticuerpo acoplado a la proteína, o se debe realmente a qué la técnica de selección modifica la expresión proteica.

El análisis de factor de transcripción FOXP3 también nos ha proporcionado datos interesantes a este estudio. Como ya fue descrito, las células Treg se caracterizan como células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-/low</sup>, ya que la baja expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor IL-7 (CD127) directamente se correlaciona con una alta expresión de FOXP3 [364]. Nuestros resultados concuerdan con este estudio, ya que las células Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-/low</sup> correlacionaron, en los tres casos estudiados, con células con alta expresión de FOXP3 en más de un 70%, no existiendo diferencias significativas entre los tipos celulares o técnicas de selección empleadas. El análisis del porcentaje de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD127<sup>-/low</sup> FoxP3<sup>high</sup> no mostró diferencias estadísticamente significativas bajo condiciones activadoras; sin embargo, sí se encontraron diferencias entre ambas tecnologías a día 5 de cultivo (Figura 60B). En este caso, el porcentaje de células FOXP3<sup>+</sup> fue mayor en células CB Treg seleccionadas por la tecnología *Streptamer*. No obstante, los resultados obtenidos de la IMF indican que la activación a día 2 de cultivo incrementa la expresión de FOXP3, tanto en células PB Treg y CB Treg seleccionadas por ambas metodologías, pero a día 5 de cultivo el incremento es muy discreto, no llegando a ser significativo en ningún caso. Además no se encontraron diferencias significativas entre ambos métodos de selección (Figura 62). Estos datos muestran que la activación de las células Treg mediante su cultivo con anti-CD3/anti-CD28 tiene un efecto inductor en la expresión de FOXP3 a día 2 de cultivo, pero los efectos se ven disminuido a día 5. Para confirmar estos datos, se analizó la expresión de *FOXP3* mediante PCR a tiempo real. Los resultados mostraron que la estimulación del receptor TCR permite mantener el nivel expresión de *FOXP3* constante hasta el quinto día de cultivo; mientras que las células no activadas o “resting”, presentan una expresión disminuida el día 5 (Figura 64). Por tanto, se demuestra que la activación del receptor TCR es eficaz en mantener un nivel estable de expresión de *FOXP3*, aunque los niveles de proteínas sí parecen decaer ligeramente tras el quinto día de cultivo. Debido a la importancia de FOXP3 para la capacidad de supresión de las células Treg [232, 361], lo ideal sería que su expresión se mantuviera estable y elevada durante todos los días de expansión *in vitro*. Por ello, quizás sería interesante analizar los efectos de

una segunda estimulación, tras el segundo o tercer día de cultivo y comparar los niveles de expresión de FOXP3 a día 5 o incluso en un periodo de tiempo más prolongado para obtener un mayor número de células Treg con alta funcionalidad.

GITR se expresa en células tTreg y pTreg y en otros grupos de células T reguladoras, incrementándose su expresión tras la estimulación de las células T [276, 362]. Además, en menor medida, las células T no reguladoras activadas, las células B, monocitos, macrófagos, células dendríticas y mastocitos también expresan GITR [381-385]. El receptor GITR se activa por el ligando GITRL, el cual se expresa principalmente en APC y en células endoteliales [386, 387]. La estimulación de GITR activa el receptor TCR de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, promoviendo su proliferación y la producción de citocinas, tales como IL-10 [276, 388, 389]. Sin embargo, varios estudios centrados en la función de GITR revelaron su papel inhibitorio sobre la actividad supresora de las células Treg. Estos estudios mostraron mediante el co-cultivo de células Treg y células T efectoras que la activación de GITR induce la proliferación de las células T efectoras [381, 385]. Más tarde se encontró que este efecto es indirecto, ya que la estimulación de GITR en células T no reguladoras les permite escapar de la supresión mediada por las células Treg [390]. No obstante, otros estudios describieron que la sobreestimulación de GITR en células Treg conlleva la disminución de la expresión de granzima B y la degradación de FOXP3, entre otros efectos que afectan a la capacidad supresora de las células Treg; aunque también se ha propuesto que estos efectos son transitorios y que se producen como consecuencia de una condición de sobreestimulación no fisiológica y que incluso depende del contexto en el que se produzca [276]. De este modo, la activación de GITR parece tener distintos efectos en la interacción de células Treg-T efectoras y es un tema actual de debate.

En este estudio, estudiamos la expresión de GITR, tras aislar las células PB y CB Treg mediante las dos metodologías empleadas en este trabajo, así como tras la estimulación de las células Treg, tal y como hicimos con el resto de marcadores. Los resultados obtenidos mostraron que la proporción de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-/low</sup> GITR<sup>+</sup>, se vio significativamente incrementada tras la activación de las células PB y CB Treg a día 2 y día 5 de cultivo, en células Treg seleccionadas por ambas tecnologías, siendo este porcentaje más bajo en el caso de las células CB Treg seleccionadas por *Streptamer* a día 5 de cultivo (Figura 61A). Un dato muy interesante fue el obtenido tras el análisis de la IMF para GITR, ya que mostró diferencias bastante significativas entre



las células PB Treg y CB Treg, presentando mayor nivel de IMF las células Treg de sangre periférica de adulto (Figura 62). Este hecho podría estar implicado en las diferencias funcionales entre las PB y CB Treg descritas en la bibliografía, e incluso con la capacidad de liberación de IL-10, como ya se ha descrito previamente. Por tanto, sería de gran interés realizar estudios comparativos de supresión *in vitro* con PB y CB Treg en condiciones de activación y bloqueo de GITR, ya que podrían revelar nuevos datos acerca de la actividad de este receptor.

La expresión del marcador CD69 también es de gran importancia en el estudio de las células Treg. CD69 es un receptor de membrana glicoproteico de la familia de las lectinas tipo C, y es una de las moléculas que más rápidamente son inducidas tras la activación de todas las células derivadas de la médula ósea, a excepción de los eritrocitos [391, 392]. La expresión de CD69 en las células T induce su estimulación y proliferación [393]. Por otro lado, varios estudios han mostrado que la activación de CD69 induce la activación de la vía ERK y la transcripción de los genes IL-2 y INF- $\gamma$ , modula los niveles de TGF- $\beta$  y favorece la proliferación de las células T [394-396]. Ya que TGF- $\beta$  participa en la diferenciación tanto de células Treg como de células Th17 [397, 398], se cree que CD69 puede regular la respuesta inmune a través de la diferenciación de las células T, además de ser un receptor crítico para el control de la función supresora de las células Treg [399]. Por ello, decidimos analizar la expresión de este receptor tras la estimulación del receptor TCR de las células Treg en nuestro estudio.

Los resultados muestran que la población CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-/low</sup> CD69<sup>+</sup> fue casi inexistente tras la selección de las células PB y CB Treg seleccionadas por ambas metodologías, pero la activación con anti-CD3/anti-CD28 e IL-2 incrementó la expresión de CD69 significativamente tras 2 días de cultivo. Es importante destacar que este receptor es un marcador de activación temprano, lo que podría explicar que su expresión se vea disminuida al quinto día de cultivo tras la activación (Figura 61B). Otro aspecto interesante, es la diferencia significativa encontrada entre la expresión de CD69 en las células CB Treg seleccionadas por *Miltenyi* y las aisladas por *Streptamer* activadas a día 5 de cultivo, presentando niveles más bajos de expresión las células Treg seleccionadas por *Streptamer*. Sin embargo, aunque el análisis de la IMF de CD69 fue concordante con el incremento de expresión de CD69 tras la estimulación al segundo

día de cultivo, no se observaron diferencias significativas entre las dos técnicas de selección a día 5 de cultivo (Figura 62). Una posible explicación de por qué la proporción de células CB Treg CD69<sup>+</sup> seleccionadas por *Streptamer* al quinto día de cultivo es menor, sería que la técnica de selección afecta ligeramente a la cinética de expresión del gen, aunque las células que lo siguen expresando lo hacen con la misma intensidad que las CB Treg seleccionadas por el método de columnas. Para verificar esto, podría analizarse la expresión de CD69 cada 12-24 horas y obtener una cinética de expresión más precisa.

Para mejorar el fenotipo de las CB Treg analizamos también la expresión del péptido asociado a latencia o LAP, es cual es asociado a la funcionalidad de las células Treg. LAP es una molécula que permanece unida de forma no covalente a TGF- $\beta$  en un complejo denominado TGF- $\beta$  latente [400]. Se ha descrito que TGF- $\beta$  puede ejercer su función supresora unido a la membrana plasmática de las células Treg, lo que requiere contacto celular, o mediante su liberación [292]. Tras la estimulación del receptor TCR, LAP sufre cambios conformacionales o es degradado por proteasas, permitiendo la liberación de TGF- $\beta$  del complejo y la unión con su receptor [293]. De esta forma, la expresión de LAP puede ser directamente asociada con la disponibilidad de TFG- $\beta$  en su forma soluble o unida a la membrana en las células Treg [294]. Los resultados de nuestro estudio mostraron que la estimulación del receptor TCR de las células Treg conlleva a un incremento significativo del porcentaje de células que presentan LAP en su superficie celular, encontrando un 85-90% de células CB Treg LAP<sup>+</sup>, tanto a día 2 como a día 5 de cultivo, mientras que las células no estimuladas no presentaron prácticamente expresión (Figura 63B). Estos resultados son consistentes con otros datos publicados que muestran que la expresión de LAP se ve incrementada tras la estimulación del receptor TCR en células Treg [401]. De este modo, se demuestra que la estimulación del receptor TCR con anti-CD3 unida a placa y anti-CD28 soluble, junto con la adicción de IL-2, consigue incrementar los niveles de expresión de LAP de forma significativa. Esto podría suponer una mayor capacidad reguladora, ya que se ha descrito que las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> LAP<sup>+</sup> tienen mayor capacidad de supresión *in vitro* e *in vivo*, comparado con las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> LAP<sup>-</sup> [402]. Cabe señalar, que la expresión de LAP fue analizada en PB Treg y en CB Treg, seleccionadas por *Streptamer*, pero por diversos problemas que tuvimos con el anticuerpo empleado y con la compensación del citómetro, asociado a la falta de tiempo, fue imposible obtener

resultados concluyentes. Hubiera sido de gran interés comparar los resultados entre las distintas células Treg y las metodologías de selección, para hacer un estudio más exhaustivo de la caracterización de las células Treg.

Por otro lado, debido a la gran relevancia que tienen TGF- $\beta$ 1 y la IL-10 en el desarrollo de las células Treg [250, 272, 281], así como en su capacidad supresora [292, 293, 403, 404], decidimos analizar la expresión génica de estas moléculas en células CB Treg. Los resultados de PCR mostraron que la expresión de TGF- $\beta$ 1 e IL-10 se vieron disminuidas a día 2 y 5 de cultivo, independientemente de la activación celular (Figura 64). Estos resultados indican que las células CB Treg, pierden la expresión de TGF- $\beta$ 1 e IL-10 cuando son cultivadas *in vitro* y que la activación del receptor TCR mediante cultivo con anti-CD3/anti-CD28 no induce la expresión de estos genes. De esta forma, debido a la importancia de la expresión y liberación de IL-10 y TGF- $\beta$ 1, y otras citocinas, en la capacidad de supresión de las células Treg, el estudio de la liberación de citocinas al medio de cultivo es una cuestión interesante para indagar en su mecanismo de acción.

Las células Treg se clasifican principalmente en dos grupos: las células Treg derivadas del timo o naturales (tTreg o nTreg) y las células Treg derivadas de la periferia o inducibles (pTreg o iTreg). Se conoce que las tTreg ejercen su función supresora principalmente a través del contacto celular por proteínas unidas a la membrana, de una manera no específica de antígeno; es decir, la supresión es independiente de la especificidad del antígeno de la población de las células T efectoras. Las proteínas GITR, OX40, CD62L, CTLA-4, TFG-1 $\beta$  y FoxP3 se enfocan como las principales partícipes de su acción reguladora, pero aún en la actualidad existen controversias acerca de su función [405]. Por otro lado, las células iTreg median su función reguladora a través de la liberación de citocinas supresoras como IL-10 y TGF- $\beta$ 1. Dentro de este grupo de células Treg se han descrito dos subtipos de células T reguladoras: Tr1 y Th3. Las células Tr1 se definen por su capacidad de liberar una alta cantidad de IL-10, en menor medida IL-5 e IFN- $\gamma$ , muy poca concentración de TGF- $\beta$ 1, y no liberan IL-2 ni IL-4, y su función supresora es específica de antígeno. Las células Th3 producen preferencialmente TGF- $\beta$ 1, y su acción supresora no es específica de antígeno [405]. Así, los distintos tipos de células Treg presentan un patrón de liberación de citocinas diferentes, por lo que un estudio de liberación de citocinas más

exhaustivo puede darnos una información valiosa acerca de su mecanismo de acción. Por ello, decidimos hacer un ensayo múltiple de liberación de citocinas mediante el uso del kit *FlowCytomix™ Multiple Analyte Detection System Th1/Th2 11plex Ready-to-Use*, el cual permite detectar citocinas propias de células Th1 y Th2 en los sobrenadantes. De este modo, hicimos un análisis con los sobrenadantes de las células PB Treg y CB Treg, aisladas por ambos procedimientos, y cultivadas *in vitro* bajo condiciones activadoras o *resting* del receptor TCR, a día 2 y 5 de cultivo.

Las citocinas de tipo 1 que fueron analizadas en los sobrenadantes con el kit *FlowCytomix* son IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ . Los resultados mostraron que la concentración de IFN- $\gamma$  es mayor en el sobrenadante de las células PB Treg activadas, comparado al valor hallado en células CB Treg. Por el contrario, la concentración de TNF- $\beta$  fue mayor en las células CB Treg seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit*, siendo más significativa esta diferencia en células activadas a día 2 de cultivo. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de TNF- $\alpha$  e IL-2 en los sobrenadantes de las células PB Treg y CB Treg seleccionadas por *Miltenyi*; y la citocina IL-1 $\beta$  solo fue hallada en el sobrenadante de células CB Treg *resting* seleccionadas por *Miltenyi* de células a día 5 de cultivo. La citocina IL-12 (p70) no fue encontrada en el sobrenadante de ningún tipo celular ni en ninguna condición de cultivo (datos no mostrados). En cuanto a las citocinas de tipo 2, se midió la concentración en el medio de cultivo de las citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, y los resultados mostraron que todas ellas, además de la IL-8, fueron secretadas de forma significativa en mayor medida por las células PB Treg tras la activación del receptor TCR. Es interesante destacar que las células CB Treg seleccionadas por *Streptamer* son las células que menos citocinas liberan, encontrándose valores de concentración muy bajos en la mayoría de las citocinas analizadas (Figura 65).

Aunque la expresión de IL-10 está asociada a una respuesta de Th2, su función es más relevante en células Treg, en concreto en las células Tr1, y su ausencia en el sobrenadante de las células CB Treg activadas ya se ha descrito anteriormente por *Godfrey* y colaboradores en 2005 [406]. Este grupo realizó un análisis comparativo de liberación de citocinas entre células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> procedentes de CB y reveló que las células CB CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, tras 24 horas bajo estimulación de su receptor TCR con partículas unidas a anti-CD3/anti-CD28 e IL-2, liberan bajos niveles de IL-5,

IL-8, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1, y la concentración de IL-2, IL-10 y IFN- $\gamma$  en el medio fue prácticamente nula, pero observaron capacidad de supresión *in vitro*. De esta manera se demostró que las células CB Treg ejercen su función supresora mediada por contacto celular y no por liberación de citocinas, al igual que lo hacen las nTreg. Otro estudio realizado por *Theil* y colaboradores mostró diferencias significativas en la capacidad de secreción de citocinas por las células CB Treg y las células PB Treg y PB Treg *naive* [378]. Este grupo describió que las células CB Treg y PB Treg *naive* (Treg RA<sup>+</sup>) expandidas *in vitro*, presentan en el sobrenadante baja concentración de TNF- $\alpha$  e IL-10; mientras que las células PB Treg, liberan altas cantidades de IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-5, moderados valores de IL-4, y una concentración similar de TNF- $\alpha$  al encontrado en las células CB Treg. Estos resultados son concordantes a los nuestros, donde hemos observado que las células CB Treg seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit* liberan bajas concentraciones de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-8, y la cantidad de IL-10 e IFN- $\gamma$  fue prácticamente nula. Los valores de concentración de TNF- $\alpha$  fue similar entre ambos tipos celulares, al igual que demostró el estudio anteriormente citado. Un dato más que aporta nuestro estudio, es la concentración del factor TNF- $\beta$ , encontrado con mayor concentración en las células CB Treg. La cantidad de IL-2 fue análoga entre PB Treg y CB Treg, pero al suplementar el medio con esta citocina, no podemos conocer si es debido al suplemento del medio añadido o a su liberación. En nuestro estudio no fue analizada la concentración de TGF- $\beta$ 1 en los sobrenadantes, pero los niveles de ARNm mostraron una baja expresión de este factor en células CB Treg aisladas por *Miltenyi Biotec Kit*, al igual que muestran estos ensayos una vez más llegando a la conclusión de que las células CB Treg ejercen su función supresora por contacto celular y no mediante por liberación de citocinas.

De este modo, los resultados muestran que las células PB Treg y las células CB Treg presentan un patrón de citocinas diferentes, y la metodología de selección de las células CB Treg es un factor que influye claramente al fenotipo celular. El hecho de que la activación de las células PB Treg favorezca la aparición en el sobrenadante de IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , e IL-10, podría deberse a que la aislación de células CD25<sup>+</sup> por *Miltenyi Biotec Kit* se realiza con menor pureza al partir de sangre periférica de adulto, lo que también fue demostrado en el análisis de pureza en el momento de la selección, y nos encontramos ante una población mixta de células Treg, Th1 y Th2. Este aspecto favorece a la hipótesis del beneficio de usar células CB Treg para la terapia

celular de la DM, y no células PB Treg, ya que la liberación de estas citocinas podría generar efectos inmunológicos nocivos. Asimismo, según los datos obtenidos, la selección por la metodología *Miltenyi Biotec Kit* parece ser la mejor opción, pues las células aisladas por esta técnica presentan una pureza similar a las seleccionadas por la tecnología *Streptamer*, pero el rendimiento de la selección es mayor, al igual que lo es la expresión de los marcadores CD25, GITR y CD69 tras la activación de las células CB Treg. Sin embargo, para decidir el uso de células PB Treg o CB Treg para su uso en terapia celular, sería conveniente realizar ensayos de supresión *in vitro* con ambos tipos celulares, y mediante la selección con ambas metodologías.

Como resumen de este bloque podemos decir que, este trabajo demuestra que la sangre de cordón umbilical es una fuente excelente de células Treg y las técnicas de selección *Miltenyi Biotec Kit* y *Streptamer* son una buena herramienta para la selección de CB Treg con alta pureza, presentando más rendimiento la tecnología *Miltenyi Biotec Kit*, aunque quizás sea debido a la falta de optimización de la tecnología *Streptamer*. Además, la activación mediante anti-CD3 unido a la placa, anti-CD28 soluble y adición de IL-2, es una buena estrategia para inducir la proliferación *in vitro* de células Treg, aunque es necesario diseñar protocolos con tiempos más prolongados para llegar a obtener un gran número de células Treg para su uso en terapia. Asimismo, esta técnica de activación / expansión de células Treg es efectiva en inducir la expresión de los marcadores característicos de células Treg como CD25, FOXP3, GITR, CD69 y LAP.

## ***6. Conclusiones***





## Conclusiones

Las conclusiones obtenidas de esta tesis son:

1. La expresión del factor de transcripción Pdx1 se ve incrementada de forma significativa tras la exposición a 500  $\mu$ M de DETA-NO durante 19 horas en CMER.
2. El tratamiento con 500  $\mu$ M de DETA-NO induce cambios epigenéticos en el promotor de Pdx1 en CMER (R1/E), incluyendo cambios en la metilación de sitios CpG específicos y en el balance de ocupación de las histonas H3K27me3/H3K4me3.
3. Las subunidades del Complejo Represor Polycomb 2 (PRC2), JARID-2 y EZH2 y la Histona Acetiltransferasa P300 ocupan e interaccionan en el promotor de Pdx1 en CMER pluripotentes (R1/E) y el tratamiento con 500  $\mu$ M de DETA-NO induce su liberación. El efecto represor de P300 sobre la expresión de Pdx1 es comprobado por el efecto del inhibidor de P300 (P300i) en CMER.
4. El factor de transcripción Egr-1, actúa como represor de la transcripción de Pdx1 en CMER (R1/E). Sin embargo, en células de insulinoma de rata (INS-1E), donde Pdx1 se expresa de forma constitutiva, Egr-1 aparece unido al promotor de Pdx1.
5. La adición secuencial de pequeñas moléculas al medio de cultivo, como DETA-NO, ácido valproico y P300i, junto con la reducción del porcentaje de suero y finalmente el cultivo en suspensión, consigue el desarrollo de un protocolo de diferenciación de CMER (D3) hacia células productoras de insulina maduras.
6. Los resultados obtenidos hasta la fecha, muestran que el protocolo de diferenciación desarrollado en CMER, puede ser reproducido en CME humanas (HS181). Sin embargo, el protocolo produce una muerte celular considerable en células iPSCs (MSUH001), por lo que para su reproducibilidad en este tipo celular hay que considerar cambios de concentración, tiempos y/o uso de otra línea celular.
7. La maduración del protocolo de diferenciación en CME humanas (HS181) está actualmente en fase de optimización. Los datos preliminares muestran que el cultivo con medio KSR al 2% y/o suplementado con ITS, nicotinamida y resveratrol

puede ser una buena alternativa, pero es necesaria su comprobación mediante réplicas y otras metodologías.

8. El método de selección de células Treg basado en columnas magnéticas, *Miltenyi Biotec Kit*, presenta un porcentaje mayor de pureza de células CD45<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD127<sup>-low</sup> en células CB Treg, comparado al aislamiento de células PB Treg. Sin embargo, no existen diferencias significativas en el porcentaje de pureza para las células CB Treg entre los métodos de selección *Miltenyi Biotec Kit* y *Streptamer*.
9. El rendimiento del método de selección de células Treg basado en columnas magnéticas, *Miltenyi Biotec Kit*, es significativamente mayor al aislar células PB Treg comparado con la selección de CB Treg. Por otro lado, el rendimiento de la metodología *Streptamer* fue significativamente menor al rendimiento de la *Miltenyi Biotec Kit* al seleccionar células CB Treg.
10. Las células Treg presentan una misma tasa de proliferación *in vitro*, a día 5 de cultivo, tras la estimulación de su receptor TCR, la proteína de membrana CD28 y el cultivo con IL-2, independientemente de su origen y técnica de selección empleada. Para la obtención de un mayor número de células Treg sería conveniente diseñar un protocolo de expansión /activación más prolongado en el tiempo.
11. La estimulación del receptor TCR y la proteína de membrana CD28, junto con el cultivo con IL-2, es eficaz en incrementar la expresión de los marcadores CD25, FoxP3, GITR, CD69 y LAP, existiendo diferencias significativas entre PB Treg y CB Treg, y la técnica de aislamiento utilizada.
12. La estimulación de las células Treg induce la liberación de citocinas, con un patrón diferencial entre las células PB Treg y CB Treg, y las células CB Treg seleccionadas por *Miltenyi Biotec Kit* y *Streptamer*.
13. Teniendo en cuenta la pureza y el rendimiento de la técnica, junto con la medida de la expresión de marcadores y el patrón de citocinas liberadas, las células Treg procedentes de sangre cordón umbilical, seleccionadas con la metodología *Miltenyi Biotec Kit*, parece ser la mejor alternativa para el uso de células Treg en terapia celular.

## Conclusions

The conclusions of this thesis are:

1. The expression of the transcription factor Pdx1 is significantly increased after exposure to 500  $\mu$ M of DETA-NO for 19 hours in mouse embryonic stem cells (mESC).
2. Treatment with 500  $\mu$ M of DETA-NO induces epigenetic changes in *Pdx1* promoter in mESC (R1/E), including changes in methylation of CpG specific sites and the occupancy balance of H3K27me3 / H3K4me3.
3. The Polycomb Repressor Complex 2 (PRC2) subunits, JARID-2 and EZH2, and Histone Acetyltransferase P300 occupy and interact on *Pdx1* promoter in pluripotent mESC (R1/E) and the treatment with 500  $\mu$ M of DETA-NO induces their release. P300 repressor effect on *Pdx1* expression is proved by the effect of the inhibitor of P300 (P300i) in mESC.
4. The transcription factor EGR-1 acts as a repressor of *Pdx1* in mESC (R1/E). However, EGR-1 binds to *Pdx1* promoter and plays an activator role of *Pdx1* expression in rat insulinoma cells (INS-1E) where this gene is constitutively expressed.
5. Sequential addition of small molecules to the culture medium, as DETA-NO, valproic acid and P300i, with percentage of serum reduced and finally suspension culture, achieve the development of a differentiation protocol of mESC (D3) to mature insulin producing cells.
6. The differentiation protocol developed in mESC (D3) can be replicated in human ESC (hESC), HS181. However, the protocol produces a considerable cell death in human iPSCs (MSUH001). In order to reproduce the differentiation protocol in this cell type could be considered some concentration and time changes and/or using another cell line.
7. The maturation process of the differentiation protocol in hESC (HS181) is currently undergoing optimization. Preliminary data show that the 2% KSR culture medium and/or supplemented with ITS, nicotinamide and resveratrol could be a good tool to

maturate the cells. Nevertheless, checking with replicas and other methodologies are necessary.

8. The method of selecting Treg cells based on magnetic columns, *Miltenyi Biotec Kit*, presents a greater purity percentage of CD45<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD127<sup>-low</sup> CB Treg cells, compared to cells PB Treg isolation. However, no significant differences were found between the purity percentage of CB Treg cells by *Miltenyi Biotec Kit* and *Streptamer* isolation.
9. The recovery of PB Treg cells was significant higher compared to CB Treg isolation by *Miltenyi Biotec Kit*. Moreover, significant differences were found between CB Treg isolation by *Miltenyi Biotec Kit* and *Streptamer*, being *Miltenyi Biotec Kit* more effective.
10. Treg cells have the same rate of proliferation *in vitro* after stimulation of their TCR receptor and the membrane protein CD28 and culture with IL-2, regardless their origin and selection technique employed. In order to get a high number of cells to use them in the cell therapy, the design of a expansion /activation protocol is required.
11. Stimulation of TCR receptor and the membrane protein CD28, along with IL-2, is a effective tool to increase the expression of CD25, FoxP3, GITR, CD69 and LAP markers. Significant differences were observed between PB Treg and CB Treg cells, and the technique used to isolate them.
12. Stimulation of Treg cells induces the release of cytokines, with a differential pattern according to their origin or technique used for the selection. PB Treg release high amounts of pro-inflammatory cytokines which could be due to the isolation of effector T cells, while CB Treg release low concentration of these cytokines. The concentrations of cytokines measured for CB Treg isolated by *Streptamer* were almost zero.
13. Given the purity, performance, marker expression and cytokine pattern, Treg cells from umbilical cord blood and *Miltenyi Biotec Kit* isolation methodology seem to be the best alternative for the use of Treg cells in cell therapy.

## ***7. Bibliografía***



1. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. Diabet Med, 1998. **15**(7): p. 539-53.
2. Lakhtakia, R., *The history of diabetes mellitus*. Sultan Qaboos Univ Med J, 2013. **13**(3): p. 368-70.
3. MacCracken, J. and D. Hoel, *From ants to analogues. Puzzles and promises in diabetes management*. Postgrad Med, 1997. **101**(4): p. 138-40, 143-5, 149-50.
4. Willis, T., *Pharmaceutice rationalis sive diatriba de medicamentorum operationibus in humano corpore*. Vol. 2. 1974: Apud Samvelem De Tovrnes//De Tournes.
5. Sakula, A., *Paul Langerhans (1847-1888): a centenary tribute*. J R Soc Med, 1988. **81**(7): p. 414-5.
6. v. Mering, J. and O. Minkowski, *Diabetes mellitus nach Pankreasextirpation*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 1890. **26**(5): p. 371-387.
7. De Meyer, J., *Action de la sécrétion interne du pancréas sur différents organes et en particulier sur la sécrétion rénale*. Arch Fisiol, 1909. **7**: p. 96-9.
8. Banting, F.G., et al., *Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus*. Can Med Assoc J, 1922. **12**(3): p. 141-6.
9. Villa-Komaroff, L., et al., *A bacterial clone synthesizing proinsulin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(8): p. 3727-31.
10. *Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance*. National Diabetes Data Group. Diabetes, 1979. **28**(12): p. 1039-57.
11. *WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus: second report*. World Health Organ Tech Rep Ser, 1980. **646**: p. 1-80.
12. American Diabetes, A., *Standards of medical care in diabetes--2014*. Diabetes Care, 2014. **37 Suppl 1**: p. S14-80.
13. Canivell, S. and R. Gomis, *Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(4-5): p. 403-7.
14. Nguyen, C., et al., *Definition of high-risk type 1 diabetes HLA-DR and HLA-DQ types using only three single nucleotide polymorphisms*. Diabetes, 2013. **62**(6): p. 2135-40.
15. Abarzúa, J., C. Alvarado, and A. Aravena, *Diabetes mellitus tipo 1: aspectos genéticos*. Medwave, 2005. **5**(02).
16. Palmer, J.P., et al., *Is latent autoimmune diabetes in adults distinct from type 1 diabetes or just type 1 diabetes at an older age?* Diabetes, 2005. **54 Suppl 2**: p. S62-7.
17. Stenstrom, G., et al., *Latent autoimmune diabetes in adults: definition, prevalence, beta-cell function, and treatment*. Diabetes, 2005. **54 Suppl 2**: p. S68-72.
18. Francis, T., et al., *Histamine regulation of pancreatitis and pancreatic cancer: a review of recent findings*. Hepatobiliary Surg Nutr, 2013. **2**(4): p. 216-26.
19. Efrat, S. and H.A. Russ, *Making beta cells from adult tissues*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(6): p. 278-85.

20. Soria, B., et al., *Engineering pancreatic islets*. Pflugers Arch, 2000. **440**(1): p. 1-18.
21. Wang, Z. and D.C. Thurmond, *Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 7): p. 893-903.
22. Hebrok, M., S.K. Kim, and D.A. Melton, *Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development*. Genes Dev, 1998. **12**(11): p. 1705-13.
23. Hebrok, M., *Hedgehog signaling in pancreas development*. Mech Dev, 2003. **120**(1): p. 45-57.
24. McCracken, K.W. and J.M. Wells, *Molecular pathways controlling pancreas induction*. Semin Cell Dev Biol, 2012. **23**(6): p. 656-62.
25. Herrera, P.L., *Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages*. Development, 2000. **127**(11): p. 2317-22.
26. Zhou, Q., et al., *A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis*. Dev Cell, 2007. **13**(1): p. 103-14.
27. Pan, F.C. and C. Wright, *Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland*. Dev Dyn, 2011. **240**(3): p. 530-65.
28. Schaffer, A.E., et al., *Nkx6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors*. Dev Cell, 2010. **18**(6): p. 1022-9.
29. Thakur, S., et al., *MR in complete dorsal pancreatic agenesis: Case report and review of literature*. The Indian journal of radiology & imaging, 2014. **24**(2): p. 156.
30. Bar, Y. and S. Efrat, *The NOTCH pathway in beta-cell growth and differentiation*. Vitam Horm, 2014. **95**: p. 391-405.
31. Seymour, P.A., *Sox9: a master regulator of the pancreatic program*. Rev Diabet Stud, 2014. **11**(1): p. 51-83.
32. Shih, H.P., et al., *A Notch-dependent molecular circuitry initiates pancreatic endocrine and ductal cell differentiation*. Development, 2012. **139**(14): p. 2488-99.
33. Desgraz, R. and P.L. Herrera, *Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors*. Development, 2009. **136**(21): p. 3567-74.
34. Johansson, K.A., et al., *Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types*. Dev Cell, 2007. **12**(3): p. 457-65.
35. Mastracci, T.L., et al., *Nkx2.2 and Arx genetically interact to regulate pancreatic endocrine cell development and endocrine hormone expression*. Dev Biol, 2011. **359**(1): p. 1-11.
36. Collombat, P., et al., *Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development*. Genes Dev, 2003. **17**(20): p. 2591-603.
37. Jennings, R.E., et al., *Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment*. Diabetes, 2013. **62**(10): p. 3514-22.



38. Sarkar, S.A., et al., *Global gene expression profiling and histochemical analysis of the developing human fetal pancreas*. Diabetologia, 2008. **51**(2): p. 285-97.
39. Dorrell, C., et al., *Transcriptomes of the major human pancreatic cell types*. Diabetologia, 2011. **54**(11): p. 2832-44.
40. Stanger, B.Z. and M. Hebrok, *Control of cell identity in pancreas development and regeneration*. Gastroenterology, 2013. **144**(6): p. 1170-9.
41. Cabrera, O., et al., *The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2334-9.
42. Jonsson, J., et al., *Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice*. Nature, 1994. **371**(6498): p. 606-9.
43. Ohlsson, H., K. Karlsson, and T. Edlund, *IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene*. EMBO J, 1993. **12**(11): p. 4251-9.
44. Stoffers, D.A., M.K. Thomas, and J.F. Habener, *Homeodomain protein IDX-1: a master regulator of pancreas development and insulin gene expression*. Trends Endocrinol Metab, 1997. **8**(4): p. 145-51.
45. Larsson, L.I., et al., *Pancreatic-duodenal homeobox 1 -role in gastric endocrine patterning*. Mech Dev, 1996. **60**(2): p. 175-84.
46. Offield, M.F., et al., *PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum*. Development, 1996. **122**(3): p. 983-95.
47. Stoffers, D.A., et al., *Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1*. Nat Genet, 1997. **17**(2): p. 138-9.
48. Gu, G., J. Dubauskaite, and D.A. Melton, *Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors*. Development, 2002. **129**(10): p. 2447-57.
49. Ahlgren, U., J. Jonsson, and H. Edlund, *The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice*. Development, 1996. **122**(5): p. 1409-16.
50. Boyer, D.F., et al., *Complementation rescue of Pdx1 null phenotype demonstrates distinct roles of proximal and distal cis-regulatory sequences in pancreatic and duodenal expression*. Dev Biol, 2006. **298**(2): p. 616-31.
51. Fujitani, Y., et al., *Targeted deletion of a cis-regulatory region reveals differential gene dosage requirements for Pdx1 in foregut organ differentiation and pancreas formation*. Genes Dev, 2006. **20**(2): p. 253-66.
52. Hale, M.A., et al., *The homeodomain protein PDX1 is required at mid-pancreatic development for the formation of the exocrine pancreas*. Dev Biol, 2005. **286**(1): p. 225-37.
53. Holland, A.M., et al., *Experimental control of pancreatic development and maintenance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12236-41.
54. Gerrish, K., et al., *Pancreatic beta cell-specific transcription of the pdx-1 gene. The role of conserved upstream control regions and their hepatic nuclear factor 3beta sites*. J Biol Chem, 2000. **275**(5): p. 3485-92.
55. Gerrish, K., J.C. Van Velkinburgh, and R. Stein, *Conserved transcriptional regulatory domains of the pdx-1 gene*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(3): p. 533-48.

56. Gannon, M., et al., *Persistent expression of HNF6 in islet endocrine cells causes disrupted islet architecture and loss of beta cell function*. *Development*, 2000. **127**(13): p. 2883-95.
57. Gerrish, K., M.A. Cissell, and R. Stein, *The role of hepatic nuclear factor 1 alpha and PDX-1 in transcriptional regulation of the pdx-1 gene*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(51): p. 47775-84.
58. Samaras, S.E., et al., *Conserved sequences in a tissue-specific regulatory region of the pdx-1 gene mediate transcription in Pancreatic beta cells: role for hepatocyte nuclear factor 3 beta and Pax6*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(13): p. 4702-13.
59. Jacquemin, P., F.P. Lemaigre, and G.G. Rousseau, *The Onecut transcription factor HNF-6 (OC-1) is required for timely specification of the pancreas and acts upstream of Pdx-1 in the specification cascade*. *Dev Biol*, 2003. **258**(1): p. 105-16.
60. Wiebe, P.O., et al., *Ptf1a binds to and activates area III, a highly conserved region of the Pdx1 promoter that mediates early pancreas-wide Pdx1 expression*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(11): p. 4093-104.
61. Samaras, S.E., et al., *The islet beta cell-enriched RIPE3b1/Maf transcription factor regulates pdx-1 expression*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(14): p. 12263-70.
62. Gao, N., et al., *Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development*. *Genes Dev*, 2008. **22**(24): p. 3435-48.
63. Kelly, W.D., et al., *Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy*. *Surgery*, 1967. **61**(6): p. 827-37.
64. Najarian, J.S., et al., *Human islet transplantation: a preliminary report*. *Transplant Proc*, 1977. **9**(1): p. 233-6.
65. Ricordi, C., P.E. Lacy, and D.W. Scharp, *Automated islet isolation from human pancreas*. *Diabetes*, 1989. **38 Suppl 1**: p. 140-2.
66. Scharp, D.W., et al., *Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patient*. *Diabetes*, 1990. **39**(4): p. 515-8.
67. Tzakis, A.G., et al., *Pancreatic islet transplantation after upper abdominal exenteration and liver replacement*. *Lancet*, 1990. **336**(8712): p. 402-5.
68. Shapiro, A.M., et al., *Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(4): p. 230-8.
69. Dupre, J., et al., *Effects of immunosuppression with cyclosporine in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset: the Canadian open study at 44 months*. *Transplant Proc*, 1988. **20**(3 Suppl 4): p. 184-92.
70. Stiller, C.R., et al., *Effects of cyclosporine immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset*. *Science*, 1984. **223**(4643): p. 1362-7.
71. Aronson, R., et al., *Low-dose oteelixizumab anti-CD3 monoclonal antibody DEFEND-1 study: results of the randomized phase III study in recent-onset human type 1 diabetes*. *Diabetes Care*, 2014. **37**(10): p. 2746-54.

72. Orban, T., et al., *Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet, 2011. **378**(9789): p. 412-9.
73. Pescovitz, M.D., et al., *Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function*. N Engl J Med, 2009. **361**(22): p. 2143-52.
74. Levy, L.M., M.C. Dalakas, and M.K. Floeter, *The stiff-person syndrome: an autoimmune disorder affecting neurotransmission of gamma-aminobutyric acid*. Ann Intern Med, 1999. **131**(7): p. 522-30.
75. Gaglia, J.L., et al., *Noninvasive imaging of pancreatic islet inflammation in type 1A diabetes patients*. J Clin Invest, 2011. **121**(1): p. 442-5.
76. Bluestone, J.A., et al., *Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells*. Science translational medicine, 2015. **7**(315): p. 315ra189-315ra189.
77. Acosta, L., et al., *Adipose mesenchymal stromal cells isolated from type 2 diabetic patients display reduced fibrinolytic activity*. Diabetes, 2013. **62**(12): p. 4266-9.
78. Hu, J., et al., *Long term effects of the implantation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from the umbilical cord for newly-onset type 1 diabetes mellitus*. Endocr J, 2013. **60**(3): p. 347-57.
79. Brunstein, C.G., et al., *Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics*. Blood, 2011. **117**(3): p. 1061-70.
80. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
81. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
82. Solter, D. and B.B. Knowles, *Immunosurgery of mouse blastocyst*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(12): p. 5099-102.
83. Turetsky, T., et al., *Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis*. Hum Reprod, 2008. **23**(1): p. 46-53.
84. Valbuena, D., et al., *Derivation and characterization of three new Spanish human embryonic stem cell lines (VAL -3 -4 -5) on human feeder and in serum-free conditions*. Reprod Biomed Online, 2006. **13**(6): p. 875-86.
85. Wilmut, I., et al., *Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells*. Nature, 1997. **385**(6619): p. 810-3.
86. Cowan, C.A., et al., *Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells*. Science, 2005. **309**(5739): p. 1369-73.
87. Tada, M., et al., *Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells*. Curr Biol, 2001. **11**(19): p. 1553-8.
88. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.

89. Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka, *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 313-7.
90. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
91. Boulting, G.L., et al., *A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(3): p. 279-86.
92. Gore, A., et al., *Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells*. Nature, 2011. **471**(7336): p. 63-7.
93. Hussein, S.M., et al., *Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency*. Nature, 2011. **471**(7336): p. 58-62.
94. Williams, R.L., et al., *Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells*. Nature, 1988. **336**(6200): p. 684-7.
95. Niwa, H., et al., *Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3*. Genes Dev, 1998. **12**(13): p. 2048-60.
96. Matsuda, T., et al., *STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells*. EMBO J, 1999. **18**(15): p. 4261-9.
97. Jirmanova, L., et al., *Differential contributions of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclin D1 expression and to the control of the G1/S transition in mouse embryonic stem cells*. Oncogene, 2002. **21**(36): p. 5515-28.
98. Burdon, T., et al., *Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells*. Dev Biol, 1999. **210**(1): p. 30-43.
99. Ying, Q.L., et al., *BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3*. Cell, 2003. **115**(3): p. 281-92.
100. Kang, H.B., et al., *Basic fibroblast growth factor activates ERK and induces c-fos in human embryonic stem cell line MizhES1*. Stem Cells Dev, 2005. **14**(4): p. 395-401.
101. Armstrong, L., et al., *The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFkappabeta signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(11): p. 1894-913.
102. Xu, C., et al., *Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium*. Stem Cells, 2005. **23**(3): p. 315-23.
103. James, D., et al., *TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells*. Development, 2005. **132**(6): p. 1273-82.
104. Sato, N., et al., *Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor*. Nat Med, 2004. **10**(1): p. 55-63.
105. Hao, J., et al., *WNT/beta-catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells*. Dev Biol, 2006. **290**(1): p. 81-91.

106. Xu, C., et al., *Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(10): p. 971-4.
107. Dodge, J.E., et al., *De novo methylation of MMLV provirus in embryonic stem cells: CpG versus non-CpG methylation*. Gene, 2002. **289**(1-2): p. 41-8.
108. Haines, T.R., D.I. Rodenhiser, and P.J. Ainsworth, *Allele-specific non-CpG methylation of the Nf1 gene during early mouse development*. Dev Biol, 2001. **240**(2): p. 585-98.
109. Lister, R., et al., *Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences*. Nature, 2009. **462**(7271): p. 315-22.
110. Razin, A. and R. Shemer, *DNA methylation in early development*. Hum Mol Genet, 1995. **4 Spec No**: p. 1751-5.
111. Kafri, T., et al., *Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line*. Genes Dev, 1992. **6**(5): p. 705-14.
112. Monk, M., M. Boubelik, and S. Lehnert, *Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development*. Development, 1987. **99**(3): p. 371-82.
113. Day, J.J. and J.D. Sweatt, *DNA methylation and memory formation*. Nat Neurosci, 2010. **13**(11): p. 1319-23.
114. Egger, G., et al., *Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(38): p. 14080-5.
115. Riggs, A.D. and Z. Xiong, *Methylation and epigenetic fidelity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): p. 4-5.
116. Jair, K.W., et al., *De novo CpG island methylation in human cancer cells*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 682-92.
117. Ting, A.H., et al., *Differential requirement for DNA methyltransferase 1 in maintaining human cancer cell gene promoter hypermethylation*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 729-35.
118. Okano, M., S. Xie, and E. Li, *Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases*. Nat Genet, 1998. **19**(3): p. 219-20.
119. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell, 1999. **99**(3): p. 247-57.
120. Karetka, M.S., et al., *Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 25893-902.
121. Iqbal, K., et al., *Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(9): p. 3642-7.
122. Wossidlo, M., et al., *5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming*. Nature communications, 2011. **2**: p. 241.
123. Berger, S.L., *An embarrassment of niches: the many covalent modifications of histones in transcriptional regulation*. Oncogene, 2001. **20**(24): p. 3007-13.

124. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
125. Loidl, P., *Histone acetylation: facts and questions*. Chromosoma, 1994. **103**(7): p. 441-9.
126. Lee, K.K. and J.L. Workman, *Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(4): p. 284-95.
127. Khochbin, S., et al., *Functional significance of histone deacetylase diversity*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(2): p. 162-6.
128. Ogryzko, V.V., et al., *The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases*. Cell, 1996. **87**(5): p. 953-9.
129. Giordano, A. and M.L. Avantaggiati, *p300 and CBP: partners for life and death*. J Cell Physiol, 1999. **181**(2): p. 218-30.
130. Shiama, N., *The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin*. Trends Cell Biol, 1997. **7**(6): p. 230-6.
131. Giles, R.H., D.J. Peters, and M.H. Breuning, *Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease*. Trends Genet, 1998. **14**(5): p. 178-83.
132. Sterner, D.E. and S.L. Berger, *Acetylation of histones and transcription-related factors*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(2): p. 435-59.
133. Zhang, Y. and D. Reinberg, *Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails*. Genes Dev, 2001. **15**(18): p. 2343-60.
134. Rice, J.C., et al., *Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains*. Mol Cell, 2003. **12**(6): p. 1591-8.
135. Pan, G., et al., *Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 299-312.
136. Zhao, X.D., et al., *Whole-genome mapping of histone H3 Lys4 and 27 trimethylations reveals distinct genomic compartments in human embryonic stem cells*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 286-98.
137. Wang, Y.C., S.E. Peterson, and J.F. Loring, *Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells*. Cell Res, 2014. **24**(2): p. 143-60.
138. Hong, S.-H., et al., *Cell fate potential of human pluripotent stem cells is encoded by histone modifications*. Cell stem cell, 2011. **9**(1): p. 24-36.
139. Xie, R., et al., *Dynamic chromatin remodeling mediated by polycomb proteins orchestrates pancreatic differentiation of human embryonic stem cells*. Cell Stem Cell, 2013. **12**(2): p. 224-37.
140. Paige, S.L., et al., *A temporal chromatin signature in human embryonic stem cells identifies regulators of cardiac development*. Cell, 2012. **151**(1): p. 221-32.
141. Cao, R., et al., *Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1039-43.

142. Czermin, B., et al., *Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites*. Cell, 2002. **111**(2): p. 185-196.
143. Kuzmichev, A., et al., *Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein*. Genes Dev, 2002. **16**(22): p. 2893-905.
144. Schuettengruber, B., et al., *Genome regulation by polycomb and trithorax proteins*. Cell, 2007. **128**(4): p. 735-45.
145. Simon, J.A. and R.E. Kingston, *Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(10): p. 697-708.
146. Boyer, L.A., et al., *Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells*. Nature, 2006. **441**(7091): p. 349-53.
147. Lee, T.I., et al., *Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells*. Cell, 2006. **125**(2): p. 301-13.
148. Bernstein, B.E., et al., *A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells*. Cell, 2006. **125**(2): p. 315-26.
149. Chamberlain, S.J., D. Yee, and T. Magnuson, *Polycomb repressive complex 2 is dispensable for maintenance of embryonic stem cell pluripotency*. Stem cells, 2008. **26**(6): p. 1496-1505.
150. Margueron, R., et al., *Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks*. Nature, 2009. **461**(7265): p. 762-7.
151. Jung, J., M.R. Mysliwiec, and Y. Lee, *Roles of JUMONJI in mouse embryonic development*. Dev Dyn, 2005. **232**(1): p. 21-32.
152. Takeuchi, T., et al., *Roles of jumonji and jumonji family genes in chromatin regulation and development*. Dev Dyn, 2006. **235**(9): p. 2449-59.
153. Li, G., et al., *Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression*. Genes Dev, 2010. **24**(4): p. 368-80.
154. Thiel, G. and G. Cibelli, *Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1*. J Cell Physiol, 2002. **193**(3): p. 287-92.
155. Sukhatme, V.P., et al., *A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization*. Cell, 1988. **53**(1): p. 37-43.
156. Jones, N. and F.H. Agani, *Hyperoxia induces Egr-1 expression through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway*. J Cell Physiol, 2003. **196**(2): p. 326-33.
157. Yan, S.F., et al., *Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression*. J Biol Chem, 1999. **274**(21): p. 15030-40.
158. Mishra, S., et al., *Carbon monoxide rescues ischemic lungs by interrupting MAPK-driven expression of early growth response 1 gene and its downstream target genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(13): p. 5191-6.
159. Kumbrink, J., M. Gerlinger, and J.P. Johnson, *Egr-1 induces the expression of its corepressor nab2 by activation of the nab2 promoter thereby establishing a negative feedback loop*. J Biol Chem, 2005. **280**(52): p. 42785-93.

160. Ogishima, T., et al., *Promoter CpG hypomethylation and transcription factor EGR1 hyperactivate heparanase expression in bladder cancer*. *Oncogene*, 2005. **24**(45): p. 6765-72.
161. Yan, Y.X., et al., *Transforming growth factor-alpha enhances cyclin D1 transcription through the binding of early growth response protein to a cis-regulatory element in the cyclin D1 promoter*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(52): p. 33181-90.
162. Khachigian, L.M., A.J. Williams, and T. Collins, *Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(46): p. 27679-86.
163. Figliola, R., et al., *Regulation of p57(KIP2) during muscle differentiation: role of Egr1, Sp1 and DNA hypomethylation*. *J Mol Biol*, 2008. **380**(2): p. 265-77.
164. Silverman, E., et al., *cAMP-response-element-binding-protein-binding protein (CBP) and p300 are transcriptional co-activators of early growth response factor-1 (Egr-1)*. *Biochem. J*, 1998. **336**: p. 183-189.
165. Marletta, M.A., *Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis*. *Cell*, 1994. **78**(6): p. 927-30.
166. Cosby, K., et al., *Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation*. *Nat Med*, 2003. **9**(12): p. 1498-505.
167. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. *Pharmacol Rev*, 1991. **43**(2): p. 109-42.
168. Krischel, V., et al., *Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts*. *J Invest Dermatol*, 1998. **111**(2): p. 286-91.
169. Lee, S.K., et al., *Dual effect of nitric oxide in immortalized and malignant human oral keratinocytes: induction of apoptosis and differentiation*. *J Oral Pathol Med*, 2006. **35**(6): p. 352-60.
170. Li, J., et al., *Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(24): p. 17325-33.
171. Hajri, A., et al., *Role of nitric oxide in pancreatic tumour growth: in vivo and in vitro studies*. *Br J Cancer*, 1998. **78**(7): p. 841-9.
172. Dimmeler, S., et al., *Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases*. *J Exp Med*, 1997. **185**(4): p. 601-7.
173. Chung, H.T., et al., *Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **282**(5): p. 1075-9.
174. Kim, Y.M., et al., *Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(2): p. 1402-11.
175. Mannick, J.B., X.Q. Miao, and J.S. Stamler, *Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(39): p. 24125-8.
176. Sciorati, C., et al., *Autocrine nitric oxide modulates CD95-induced apoptosis in gammadelta T lymphocytes*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(37): p. 23211-5.



177. Wong, J.C. and R.R. Fiscus, *Essential roles of the nitric oxide (no)/cGMP/protein kinase G type-Ialpha (PKG-Ialpha) signaling pathway and the atrial natriuretic peptide (ANP)/cGMP/PKG-Ialpha autocrine loop in promoting proliferation and cell survival of OP9 bone marrow stromal cells.* J Cell Biochem, 2011. **112**(3): p. 829-39.
178. Yamane, T., et al., *Enforced Bcl-2 expression overrides serum and feeder cell requirements for mouse embryonic stem cell self-renewal.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(9): p. 3312-7.
179. Cahuana, G.M., et al., *Nitric oxide mediates the survival action of IGF-1 and insulin in pancreatic beta cells.* Cell Signal, 2008. **20**(2): p. 301-10.
180. Tejedo, J.R., et al., *Low concentrations of nitric oxide delay the differentiation of embryonic stem cells and promote their survival.* Cell Death Dis, 2010. **1**: p. e80.
181. Ankarcona, M., et al., *Interleukin-1 beta-induced nitric oxide production activates apoptosis in pancreatic RINm5F cells.* Exp Cell Res, 1994. **213**(1): p. 172-7.
182. Kaneto, H., et al., *Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic beta-cells.* Diabetes, 1995. **44**(7): p. 733-8.
183. Fehsel, K., et al., *Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes.* J Immunol, 1995. **155**(6): p. 2858-65.
184. Enikolopov, G., J. Banerji, and B. Kuzin, *Nitric oxide and Drosophila development.* Cell Death Differ, 1999. **6**(10): p. 956-63.
185. Matarredona, E.R., et al., *Nitric oxide synthesis inhibition increases proliferation of neural precursors isolated from the postnatal mouse subventricular zone.* Brain Res, 2004. **995**(2): p. 274-84.
186. Bloch, W., et al., *Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis.* Cardiovasc Res, 1999. **43**(3): p. 675-84.
187. Krumenacker, J.S., et al., *Differential expression of genes involved in cGMP-dependent nitric oxide signaling in murine embryonic stem (ES) cells and ES cell-derived cardiomyocytes.* Nitric Oxide, 2006. **14**(1): p. 1-11.
188. Mora-Castilla, S., et al., *Nitric oxide repression of Nanog promotes mouse embryonic stem cell differentiation.* Cell Death Differ, 2010. **17**(6): p. 1025-33.
189. Beltran-Povea, A., et al., *Role of nitric oxide in the maintenance of pluripotency and regulation of the hypoxia response in stem cells.* World J Stem Cells, 2015. **7**(3): p. 605-17.
190. Kanno, S., et al., *Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(33): p. 12277-81.
191. Krumenacker, J.S., K.A. Hanafy, and F. Murad, *Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase.* Brain Res Bull, 2004. **62**(6): p. 505-15.
192. Bartsch, C., et al., *NADPH oxidase and eNOS control cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells on ascorbic acid treatment.* Free Radic Biol Med, 2011. **51**(2): p. 432-43.

193. Mujoo, K., et al., *Curcumin induces differentiation of embryonic stem cells through possible modulation of nitric oxide-cyclic GMP pathway*. Protein Cell, 2012. **3**(7): p. 535-44.
194. Dulak, J., et al., *Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(3): p. 659-66.
195. Huang, N.F., et al., *Role of nitric oxide signaling in endothelial differentiation of embryonic stem cells*. Stem Cells Dev, 2010. **19**(10): p. 1617-26.
196. Malan, D., et al., *Endothelial beta1 integrins regulate sprouting and network formation during vascular development*. Development, 2010. **137**(6): p. 993-1002.
197. McCloskey, K.E., et al., *Embryonic stem cell-derived endothelial cells may lack complete functional maturation in vitro*. J Vasc Res, 2006. **43**(5): p. 411-21.
198. Liu, Z., et al., *Endothelial nitric oxide synthase is dynamically expressed during bone marrow stem cell differentiation into endothelial cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(3): p. H1760-5.
199. Chu, L., et al., *Nitric oxide enhances Oct-4 expression in bone marrow stem cells and promotes endothelial differentiation*. Eur J Pharmacol, 2008. **591**(1-3): p. 59-65.
200. Arnhold, S., et al., *NOS-II is involved in early differentiation of murine cortical, retinal and ES cell-derived neurons-an immunocytochemical and functional approach*. Int J Dev Neurosci, 2002. **20**(2): p. 83-92.
201. Tao Li, J., et al., *Nitric oxide signaling and neural stem cell differentiation in peripheral nerve regeneration*. Eplasty, 2010. **10**: p. e42.
202. Shami, P.J. and J.B. Weinberg, *Differential effects of nitric oxide on erythroid and myeloid colony growth from CD34+ human bone marrow cells*. Blood, 1996. **87**(3): p. 977-82.
203. Teixeira, C.C., et al., *Nitric oxide-nitric oxide synthase regulates key maturational events during chondrocyte terminal differentiation*. Bone, 2005. **37**(1): p. 37-45.
204. Yan, H., et al., *Nitric oxide promotes differentiation of rat white preadipocytes in culture*. J Lipid Res, 2002. **43**(12): p. 2123-9.
205. Pan, W., et al., *Genistein stimulates the osteoblastic differentiation via NO/cGMP in bone marrow culture*. J Cell Biochem, 2005. **94**(2): p. 307-16.
206. Soria, B., et al., *Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice*. Diabetes, 2000. **49**(2): p. 157-62.
207. Leon-Quinto, T., et al., *In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells*. Diabetologia, 2004. **47**(8): p. 1442-1451.
208. Hori, Y., et al., *Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16105-10.
209. Hansson, M., et al., *Artifactual insulin release from differentiated embryonic stem cells*. Diabetes, 2004. **53**(10): p. 2603-9.

210. Rajagopal, J., et al., *Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake*. Science, 2003. **299**(5605): p. 363.
211. Sipione, S., et al., *Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells*. Diabetologia, 2004. **47**(3): p. 499-508.
212. D'Amour, K.A., et al., *Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(12): p. 1534-41.
213. McLean, A.B., et al., *Activin a efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed*. Stem Cells, 2007. **25**(1): p. 29-38.
214. D'Amour, K.A., et al., *Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(11): p. 1392-401.
215. Zhang, D., et al., *Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells*. Cell Res, 2009. **19**(4): p. 429-38.
216. Borowiak, M., et al., *Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(4): p. 348-58.
217. Johannesson, M., et al., *FGF4 and retinoic acid direct differentiation of hESCs into PDX1-expressing foregut endoderm in a time- and concentration-dependent manner*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4794.
218. Ameri, J., et al., *FGF2 specifies hESC-derived definitive endoderm into foregut/midgut cell lineages in a concentration-dependent manner*. Stem Cells, 2010. **28**(1): p. 45-56.
219. Jiang, W., et al., *In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells*. Cell Res, 2007. **17**(4): p. 333-44.
220. Kroon, E., et al., *Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(4): p. 443-52.
221. Pagliuca, F.W., et al., *Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro*. Cell, 2014. **159**(2): p. 428-39.
222. Rezanian, A., et al., *Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice*. Diabetes, 2012. **61**(8): p. 2016-2029.
223. Sulzbacher, S., et al., *Activin A-induced differentiation of embryonic stem cells into endoderm and pancreatic progenitors—the influence of differentiation factors and culture conditions*. Stem Cell Reviews and Reports, 2009. **5**(2): p. 159-173.
224. Cho, Y.M., et al., *Betacellulin and nicotinamide sustain PDX1 expression and induce pancreatic  $\beta$ -cell differentiation in human embryonic stem cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2008. **366**(1): p. 129-134.
225. Rezanian, A., et al., *Enrichment of human embryonic stem cell-derived NKX6. 1-expressing pancreatic progenitor cells accelerates the maturation of insulin-secreting cells in vivo*. Stem Cells, 2013. **31**(11): p. 2432-2442.

226. Schulz, T.C., et al., *A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37004.
227. Rezania, A., et al., *Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells*. Nat Biotechnol, 2014. **32**(11): p. 1121-33.
228. Pezzolla, D., et al., *Resveratrol Ameliorates the Maturation Process of  $\beta$ -Cell-Like Cells Obtained from an Optimized Differentiation Protocol of Human Embryonic Stem Cells*. PloS one, 2015. **10**(3).
229. Shim, J.H., et al., *Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate*. Diabetologia, 2007. **50**(6): p. 1228-38.
230. Miyara, M. and S. Sakaguchi, *Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(3): p. 346-51.
231. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes*. Immunology, 1970. **18**(5): p. 723-37.
232. Baecher-Allan, C., et al., *CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1245-53.
233. Dieckmann, D., et al., *Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1303-10.
234. Najafian, N., et al., *Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model*. J Clin Invest, 2003. **112**(7): p. 1037-48.
235. Li, S., et al., *A naturally occurring CD8+ CD122+ T-cell subset as a memory-like Treg family*. Cellular and Molecular Immunology, 2014. **11**(4): p. 326.
236. Zhang, Z.X., et al., *Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression*. Nat Med, 2000. **6**(7): p. 782-9.
237. Peterson, R.A., *Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression*. Toxicol Pathol, 2012. **40**(2): p. 186-204.
238. Mauri, C. and M. Menon, *The expanding family of regulatory B cells*. Int Immunol, 2015. **27**(10): p. 479-86.
239. Mauri, C. and M.R. Ehrenstein, *The 'short' history of regulatory B cells*. Trends Immunol, 2008. **29**(1): p. 34-40.
240. Tard, C., O. Rouxel, and A. Lehuen, *Regulatory Role of Natural Killer T Cells in Diabetes*. Biomed J, 2015.
241. Kabelitz, D., et al., *Regulatory functions of gammadelta T cells*. Int Immunopharmacol, 2013. **16**(3): p. 382-7.
242. Hayday, A. and R. Tigelaar, *Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 233-42.
243. Tiemessen, M.M., et al., *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(49): p. 19446-51.
244. Fleming, B.D. and D.M. Mosser, *Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy*. Eur J Immunol, 2011. **41**(9): p. 2498-502.

245. Chien, Y.H., et al., *Somatic recombination in a murine T-cell receptor gene*. Nature, 1984. **309**(5966): p. 322-6.
246. Goldrath, A.W. and M.J. Bevan, *Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire*. Nature, 1999. **402**(6759): p. 255-62.
247. Bautista, J.L., et al., *Intraclonal competition limits the fate determination of regulatory T cells in the thymus*. Nat Immunol, 2009. **10**(6): p. 610-7.
248. Leung, M.W., S. Shen, and J.J. Lafaille, *TCR-dependent differentiation of thymic Foxp3+ cells is limited to small clonal sizes*. J Exp Med, 2009. **206**(10): p. 2121-30.
249. Xing, Y. and K.A. Hogquist, *T-cell tolerance: central and peripheral*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(6).
250. Liu, Y., et al., *A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 632-40.
251. Mantel, P.Y., et al., *Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells*. J Immunol, 2006. **176**(6): p. 3593-602.
252. Tai, X., et al., *CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2*. Nat Immunol, 2005. **6**(2): p. 152-62.
253. Weenink, S., et al., *Impaired antigen presentation by murine I-Ad class II MHC molecules expressed in normal and HLA-DM-defective human B cell lines*. Int Immunol, 1997. **9**(6): p. 889-96.
254. Thomas, S.M. and J.S. Brugge, *Cellular functions regulated by Src family kinases*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 513-609.
255. Ledbetter, J.A., et al., *CD28 ligation in T-cell activation: evidence for two signal transduction pathways*. Blood, 1990. **75**(7): p. 1531-9.
256. Harding, F.A., et al., *CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones*. Nature, 1992. **356**(6370): p. 607-9.
257. Jenkins, M.K. and R.H. Schwartz, *Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo*. J Exp Med, 1987. **165**(2): p. 302-19.
258. Davis, S.J. and P.A. van der Merwe, *The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond*. Nat Immunol, 2006. **7**(8): p. 803-9.
259. Zinkernagel, R.M., *Response: immunology taught by darwin*. Science, 1996. **272**(5262): p. 635a.
260. Janeway, C.A., Jr., *The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self*. Immunol Today, 1992. **13**(1): p. 11-6.
261. Sakaguchi, S., et al., *T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases*. J Autoimmun, 1996. **9**(2): p. 211-20.
262. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.

263. Hwang, E.S., et al., *T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3*. Science, 2005. **307**(5708): p. 430-3.
264. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
265. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., *Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 639-46.
266. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., *Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 942-9.
267. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-4.
268. Weaver, C.T., et al., *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 821-52.
269. Yu, D., et al., *The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment*. Immunity, 2009. **31**(3): p. 457-68.
270. Breitfeld, D., et al., *Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production*. J Exp Med, 2000. **192**(11): p. 1545-52.
271. Reinhardt, R.L., H.E. Liang, and R.M. Locksley, *Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire*. Nat Immunol, 2009. **10**(4): p. 385-93.
272. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
273. Oestreich, K.J., S.E. Mohn, and A.S. Weinmann, *Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile*. Nat Immunol, 2012. **13**(4): p. 405-11.
274. O'Shea, J.J. and W.E. Paul, *Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells*. Science, 2010. **327**(5969): p. 1098-102.
275. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, *Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?* Immunity, 2009. **30**(5): p. 626-35.
276. Ronchetti, S., et al., *Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor-related protein: a key marker of functional regulatory T cells*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 171520.
277. Yang, X.O., et al., *Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs*. Immunity, 2008. **29**(1): p. 44-56.
278. Polansky, J.K., et al., *Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells*. J Mol Med (Berl), 2010. **88**(10): p. 1029-40.
279. Ohkura, N., et al., *T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development*. Immunity, 2012. **37**(5): p. 785-99.

280. Abbas, A.K., et al., *Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature*. Nat Immunol, 2013. **14**(4): p. 307-8.
281. Chen, Z.M., et al., *IL-10 and TGF-beta induce alloreactive CD4+CD25- T cells to acquire regulatory cell function*. Blood, 2003. **101**(12): p. 5076-83.
282. Curotto de Lafaille, M.A., et al., *Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation*. Immunity, 2008. **29**(1): p. 114-26.
283. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(27): p. 12204-9.
284. Grainger, J.R., et al., *Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF-beta pathway*. J Exp Med, 2010. **207**(11): p. 2331-41.
285. Akdis, C.A. and M. Akdis, *Mechanisms of immune tolerance to allergens: role of IL-10 and Tregs*. J Clin Invest, 2014. **124**(11): p. 4678-80.
286. Jonuleit, H. and E. Schmitt, *The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations*. The Journal of Immunology, 2003. **171**(12): p. 6323-6327.
287. Hoffmann, P., et al., *Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion*. Blood, 2006. **108**(13): p. 4260-7.
288. Seddiki, N., et al., *Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life*. Blood, 2006. **107**(7): p. 2830-8.
289. Wing, K., et al., *CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells from human thymus and cord blood suppress antigen-specific T cell responses*. Immunology, 2005. **115**(4): p. 516-25.
290. Thornton, A.M., C.A. Piccirillo, and E.M. Shevach, *Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function*. Eur J Immunol, 2004. **34**(2): p. 366-76.
291. Wing, K., et al., *CD4 T cell activation by myelin oligodendrocyte glycoprotein is suppressed by adult but not cord blood CD25+ T cells*. Eur J Immunol, 2003. **33**(3): p. 579-87.
292. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta*. J Exp Med, 2001. **194**(5): p. 629-44.
293. Annes, J.P., J.S. Munger, and D.B. Rifkin, *Making sense of latent TGFbeta activation*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 2): p. 217-24.
294. Stockis, J., et al., *Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg*. Eur J Immunol, 2009. **39**(12): p. 3315-22.
295. Grossman, W.J., et al., *Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2840-8.
296. Zhao, D.M., et al., *Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes*. Blood, 2006. **107**(10): p. 3925-32.

297. Cao, X., et al., *Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance*. *Immunity*, 2007. **27**(4): p. 635-46.
298. Pandiyan, P., et al., *CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4<sup>+</sup> T cells*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(12): p. 1353-62.
299. Huang, C.T., et al., *Role of LAG-3 in regulatory T cells*. *Immunity*, 2004. **21**(4): p. 503-13.
300. Sarris, M., et al., *Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition*. *Immunity*, 2008. **28**(3): p. 402-13.
301. Borsellino, G., et al., *Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3<sup>+</sup> Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression*. *Blood*, 2007. **110**(4): p. 1225-32.
302. Shalev, I., et al., *Targeted deletion of fgl2 leads to impaired regulatory T cell activity and development of autoimmune glomerulonephritis*. *J Immunol*, 2008. **180**(1): p. 249-60.
303. Caridade, M., L. Graca, and R.M. Ribeiro, *Mechanisms Underlying CD4<sup>+</sup> Treg Immune Regulation in the Adult: From Experiments to Models*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 378.
304. Ferrannini, E., *The stunned beta cell: a brief history*. *Cell Metab*, 2010. **11**(5): p. 349-52.
305. Lebastchi, J. and K.C. Herold, *Immunologic and metabolic biomarkers of beta-cell destruction in the diagnosis of type 1 diabetes*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(6): p. a007708.
306. Afonso, G. and R. Mallone, *Infectious triggers in type 1 diabetes: is there a case for epitope mimicry?* *Diabetes Obes Metab*, 2013. **15 Suppl 3**: p. 82-8.
307. Akerblom, H.K., et al., *The case for elimination of cow's milk in early infancy in the prevention of type 1 diabetes: the Finnish experience*. *Diabetes Metab Rev*, 1993. **9**(4): p. 269-78.
308. Roep, B.O., et al., *Molecular mimicry in type 1 diabetes: immune cross-reactivity between islet autoantigen and human cytomegalovirus but not Coxsackie virus*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **958**: p. 163-5.
309. Brugman, S., et al., *Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes?* *Diabetologia*, 2006. **49**(9): p. 2105-8.
310. Foustieri, G., M. von Herrath, and D. Bresson, *Mucosal exposure to antigen: cause or cure of type 1 diabetes?* *Curr Diab Rep*, 2007. **7**(2): p. 91-8.
311. Roep, B.O. and M. Peakman, *Surrogate end points in the design of immunotherapy trials: emerging lessons from type 1 diabetes*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(2): p. 145-52.
312. Kukreja, A., et al., *Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(1): p. 131-40.
313. Aghili, B., et al., *Altered Suppressor Function of Regulatory T Cells in Type 1 Diabetes*. *Iran J Immunol*, 2015. **12**(4): p. 240-51.



314. Tang, Q., et al., *Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction*. *Immunity*, 2008. **28**(5): p. 687-97.
315. Grinberg-Bleyer, Y., et al., *IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells*. *J Exp Med*, 2010. **207**(9): p. 1871-8.
316. Yu, A., et al., *Selective IL-2 responsiveness of regulatory T cells through multiple intrinsic mechanisms supports the use of low-dose IL-2 therapy in type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2015. **64**(6): p. 2172-83.
317. Truman, L.A., et al., *Protocol of the adaptive study of IL-2 dose frequency on regulatory T cells in type 1 diabetes (DILfrequency): a mechanistic, non-randomised, repeat dose, open-label, response-adaptive study*. *BMJ Open*, 2015. **5**(12): p. e009799.
318. Yang, J.H., et al., *Natural Variation in Interleukin-2 Sensitivity Influences Regulatory T-Cell Frequency and Function in Individuals With Long-standing Type 1 Diabetes*. *Diabetes*, 2015. **64**(11): p. 3891-902.
319. Wing, K., et al., *Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood*. *Immunology*, 2002. **106**(2): p. 190-9.
320. Bernardo, A.S., et al., *Biphasic induction of Pdx1 in mouse and human embryonic stem cells can mimic development of pancreatic beta-cells*. *Stem Cells*, 2009. **27**(2): p. 341-51.
321. Hmadcha, A., et al., *Methylation-dependent gene silencing induced by interleukin 1beta via nitric oxide production*. *J Exp Med*, 1999. **190**(11): p. 1595-604.
322. Park, J.H., et al., *Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(6): p. 2316-24.
323. Pinney, S.E., et al., *Exendin-4 increases histone acetylase activity and reverses epigenetic modifications that silence Pdx1 in the intrauterine growth retarded rat*. *Diabetologia*, 2011. **54**(10): p. 2606-14.
324. Fouse, S.D., et al., *Promoter CpG methylation contributes to ES cell gene regulation in parallel with Oct4/Nanog, PcG complex, and histone H3 K4/K27 trimethylation*. *Cell Stem Cell*, 2008. **2**(2): p. 160-9.
325. Lagarkova, M.A., et al., *Diverse epigenetic profile of novel human embryonic stem cell lines*. *Cell Cycle*, 2006. **5**(4): p. 416-20.
326. Hattori, N., et al., *Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells*. *Genes Cells*, 2007. **12**(3): p. 387-96.
327. Hawkins, R.D., et al., *Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells*. *Cell Stem Cell*, 2010. **6**(5): p. 479-91.
328. Banerjee, S. and M. Bacanamwo, *DNA methyltransferase inhibition induces mouse embryonic stem cell differentiation into endothelial cells*. *Exp Cell Res*, 2010. **316**(2): p. 172-80.
329. Xu, C., et al., *Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells*. *Circ Res*, 2002. **91**(6): p. 501-8.

330. Yoon, B.S., et al., *Enhanced differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes by combining hanging drop culture and 5-azacytidine treatment*. Differentiation, 2006. **74**(4): p. 149-59.
331. Horrillo, A., et al., *Zebularine regulates early stages of mESC differentiation: effect on cardiac commitment*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e570.
332. Mora-Castilla, S., et al., *Transient Downregulation of Nanog and Oct4 Induced by DETA/NO Exposure in Mouse Embryonic Stem Cells Leads to Mesodermal/Endodermal Lineage Differentiation*. Stem Cells Int, 2014. **2014**: p. 379678.
333. Azuara, V., et al., *Chromatin signatures of pluripotent cell lines*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(5): p. 532-8.
334. Rojas, A., et al., *Islet cell development*. Adv Exp Med Biol, 2010. **654**: p. 59-75.
335. Xu, C.R., et al., *Chromatin "prepattern" and histone modifiers in a fate choice for liver and pancreas*. Science, 2011. **332**(6032): p. 963-6.
336. Schwartz, Y.B. and V. Pirrotta, *Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(1): p. 9-22.
337. Neri, F., et al., *Myc regulates the transcription of the PRC2 gene to control the expression of developmental genes in embryonic stem cells*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(4): p. 840-51.
338. Pasini, D., et al., *JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells*. Nature, 2010. **464**(7286): p. 306-10.
339. Peng, J.C., et al., *Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells*. Cell, 2009. **139**(7): p. 1290-302.
340. Landeira, D., et al., *Jarid2 is a PRC2 component in embryonic stem cells required for multi-lineage differentiation and recruitment of PRC1 and RNA Polymerase II to developmental regulators*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(6): p. 618-24.
341. Zhang, Z., et al., *PRC2 complexes with JARID2, MTF2, and esPRC2p48 in ES cells to modulate ES cell pluripotency and somatic cell reprogramming*. Stem Cells, 2011. **29**(2): p. 229-40.
342. Baluchamy, S., et al., *Repression of c-Myc and inhibition of G1 exit in cells conditionally overexpressing p300 that is not dependent on its histone acetyltransferase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9524-9.
343. Chen, W., et al., *Distinct roles for CBP and p300 on the RA-mediated expression of the meiosis commitment gene Stra8 in mouse embryonic stem cells*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66076.
344. Girdwood, D., et al., *P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification*. Mol Cell, 2003. **11**(4): p. 1043-54.
345. Ma, H., et al., *Differential roles for the coactivators CBP and p300 on TCF/beta-catenin-mediated survivin gene expression*. Oncogene, 2005. **24**(22): p. 3619-31.
346. Wandzioch, E. and K.S. Zaret, *Dynamic signaling network for the specification of embryonic pancreas and liver progenitors*. Science, 2009. **324**(5935): p. 1707-10.

347. Eto, K., V. Kaur, and M.K. Thomas, *Regulation of pancreas duodenum homeobox-1 expression by early growth response-1*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 5973-83.
348. Ogishima, T., et al., *Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(3): p. 1028-36.
349. Yu, J., et al., *Coactivating factors p300 and CBP are transcriptionally crossregulated by Egr1 in prostate cells, leading to divergent responses*. Mol Cell, 2004. **15**(1): p. 83-94.
350. Guo, S., et al., *Activin A supplement in the hESCs culture enhances the endoderm differentiation efficiency*. Cell Biol Int, 2014. **38**(7): p. 849-56.
351. Loh, K.M., et al., *Efficient endoderm induction from human pluripotent stem cells by logically directing signals controlling lineage bifurcations*. Cell Stem Cell, 2014. **14**(2): p. 237-52.
352. Kubo, A., et al., *Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture*. Development, 2004. **131**(7): p. 1651-62.
353. Jiang, J., et al., *Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2007. **25**(8): p. 1940-53.
354. Schiesser, J.V. and J.M. Wells, *Generation of beta cells from human pluripotent stem cells: are we there yet?* Ann N Y Acad Sci, 2014. **1311**: p. 124-37.
355. Zelenay, S., et al., *Foxp3+ CD25-CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(11): p. 4091-4096.
356. Shimizu, J., et al., *Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 135-42.
357. Read, S., V. Malmström, and F. Powrie, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+ CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation*. The Journal of experimental medicine, 2000. **192**(2): p. 295-302.
358. Lehmann, J., et al., *Expression of the integrin  $\alpha E\beta 7$  identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(20): p. 13031-13036.
359. Sakaguchi, S., et al., *Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease*. Immunological reviews, 2006. **212**(1): p. 8-27.
360. Shevach, E.M., *From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 195-201.
361. Gavin, M.A., et al., *Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(17): p. 6659-64.
362. Allan, S.E., et al., *Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production*. International immunology, 2007. **19**(4): p. 345-354.

363. Kretschmer, K., et al., *Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1219-27.
364. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1701-11.
365. Marek-Trzonkowska, N., et al., *Clinical application of regulatory T cells in type 1 diabetes*. Pediatr Diabetes, 2013. **14**(5): p. 322-32.
366. Marek-Trzonkowska, N., et al., *Therapy of type 1 diabetes with CD4(+)CD25(high)CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets - results of one year follow-up*. Clin Immunol, 2014. **153**(1): p. 23-30.
367. Marek-Trzonkowska, N., et al., *Administration of CD4+CD25highCD127-regulatory T cells preserves beta-cell function in type 1 diabetes in children*. Diabetes Care, 2012. **35**(9): p. 1817-20.
368. Geppert, T.D. and P.E. Lipsky, *Accessory cell independent proliferation of human T4 cells stimulated by immobilized monoclonal antibodies to CD3*. J Immunol, 1987. **138**(6): p. 1660-6.
369. Van Wauwe, J.P., J.R. De Mey, and J.G. Goossens, *OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties*. J Immunol, 1980. **124**(6): p. 2708-13.
370. van Lier, R.A., et al., *Immobilized anti-CD3 monoclonal antibodies induce accessory cell-independent lymphokine production, proliferation and helper activity in human T lymphocytes*. Immunology, 1989. **68**(1): p. 45-50.
371. Bluestone, J.A., *Regulatory T-cell therapy: is it ready for the clinic?* Nature Reviews Immunology, 2005. **5**(4): p. 343-349.
372. Hoffmann, P., et al., *Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4+ CD25high regulatory T cells*. Blood, 2004. **104**(3): p. 895-903.
373. Tang, Q., et al., *In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes*. The Journal of experimental medicine, 2004. **199**(11): p. 1455-1465.
374. Tarbell, K.V., et al., *CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes*. The Journal of experimental medicine, 2004. **199**(11): p. 1467-1477.
375. Peters, J.H., et al., *Ex vivo generation of human alloantigen-specific regulatory T cells from CD4(pos)CD25(high) T cells for immunotherapy*. PLoS One, 2008. **3**(5): p. e2233.
376. Trzonkowski, P., et al., *Ex vivo expansion of CD4(+)CD25(+) T regulatory cells for immunosuppressive therapy*. Cytometry A, 2009. **75**(3): p. 175-88.
377. Li, L., et al., *CD4+ CD25+ regulatory T-cell lines from human cord blood have functional and molecular properties of T-cell anergy*. Blood, 2005. **106**(9): p. 3068-3073.
378. Theil, A., et al., *The relative merits of cord blood as a cell source for autologous T regulatory cell therapy in type 1 diabetes*. Horm Metab Res, 2015. **47**(1): p. 48-55.

379. Malek, T.R., *The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells*. Journal of leukocyte biology, 2003. **74**(6): p. 961-965.
380. De La Rosa, M., et al., *Interleukin-2 is essential for CD4+ CD25+ regulatory T cell function*. European journal of immunology, 2004. **34**(9): p. 2480-2488.
381. McHugh, R.S., et al., *CD4+ CD25+ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor*. Immunity, 2002. **16**(2): p. 311-323.
382. Nocentini, G., et al., *A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(12): p. 6216-6221.
383. Nocentini, G., et al., *GITR/GITRL: More than an effector T cell co-stimulatory system*. European journal of immunology, 2007. **37**(5): p. 1165-1169.
384. Shevach, E.M. and G.L. Stephens, *The GITR–GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity?* Nature Reviews Immunology, 2006. **6**(8): p. 613-618.
385. Shimizu, J., et al., *Stimulation of CD25+ CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance*. Nature immunology, 2002. **3**(2): p. 135-142.
386. Krausz, L.T., et al., *GITR-GITRL system, a novel player in shock and inflammation*. ScientificWorldJournal, 2007. **7**: p. 533-66.
387. Lacal, P.M., et al., *Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related ligand triggering upregulates vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 and promotes leukocyte adhesion*. J Pharmacol Exp Ther, 2013. **347**(1): p. 164-72.
388. Ronchetti, S., et al., *Frontline: GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations*. European journal of immunology, 2004. **34**(3): p. 613-622.
389. van Olfen, R.W., et al., *GITR triggering induces expansion of both effector and regulatory CD4+ T cells in vivo*. The Journal of Immunology, 2009. **182**(12): p. 7490-7500.
390. Stephens, G.L., et al., *Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+ CD25+ T cells*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(8): p. 5008-5020.
391. Lopez-Cabrera, M., et al., *Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 537-47.
392. Testi, R., et al., *The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells*. Immunol Today, 1994. **15**(10): p. 479-83.
393. Ziegler, S.F., F. Ramsdell, and M.R. Alderson, *The activation antigen CD69*. Stem Cells, 1994. **12**(5): p. 456-65.

394. Cebrián, M., et al., *Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes*. The Journal of experimental medicine, 1988. **168**(5): p. 1621-1637.
395. Sancho, D., et al., *CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor- $\beta$  production in collagen-induced arthritis*. The Journal of clinical investigation, 2003. **112**(6): p. 872-882.
396. Zingoni, A., et al., *CD69-triggered ERK activation and functions are negatively regulated by CD94 / NKG2-A inhibitory receptor*. Eur J Immunol, 2000. **30**(2): p. 644-51.
397. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-238.
398. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-89.
399. Cortes, J.R., et al., *Maintenance of immune tolerance by Foxp3+ regulatory T cells requires CD69 expression*. J Autoimmun, 2014. **55**: p. 51-62.
400. Khalil, N., *TGF- $\beta$ : from latent to active*. Microbes and Infection, 1999. **1**(15): p. 1255-1263.
401. Andersson, J., et al., *CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF- $\beta$ -dependent manner*. The Journal of experimental medicine, 2008. **205**(9): p. 1975-1981.
402. Chen, M.-L., et al., *Latency-associated peptide identifies a novel CD4+ CD25+ regulatory T cell subset with TGF $\beta$ -mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis*. The Journal of Immunology, 2008. **180**(11): p. 7327-7337.
403. Annacker, O., et al., *CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10*. The Journal of Immunology, 2001. **166**(5): p. 3008-3018.
404. Oida, T., et al., *TGF- $\beta$ -mediated suppression by CD4+ CD25+ T cells is facilitated by CTLA-4 signaling*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(4): p. 2331-2339.
405. Jonuleit, H. and E. Schmitt, *The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations*. J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6323-7.
406. Godfrey, W.R., et al., *Cord blood CD4+ CD25+-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function*. Blood, 2005. **105**(2): p. 750-758.

## ***8. Anexos***





## ANEXO 1. Estimaciones de la Federación Internacional de Diabetes (FID) en 2015 y en 2040.

	2105	2040
<b>Población</b>		
Población Mundial Total	7301 millones	9001 millones
Población Adulta (20-79 años)	4720 millones	6160 millones
Población Infantil (0-14 años)	1920 millones	-
<b>Diabetes</b>		
Prevalencia Global	8,8 % (7,2-11,4 %)	10.4% (8.5-13.5%)
Números de Personas con Diabetes	415 (340-536) millones	642 (521-829) millones
Números de Muertes debido a Diabetes	5 millones	-
<b>Gasto en Salud debido a Diabetes (20 - 79 años)</b>		
Total de gastos	673.000 millones de dólares	802.000 millones de dólares
<b>Hiperglicemia durante el Embarazo (20 - 79 años)</b>		
Proporción de nacidos vivos afectados	16,2 %	-
Número de nacidos vivos afectados	20,9 millones	-
<b>Intolerancia a la Glucosa (20 - 79 años)</b>		
Prevalencia Global	6,7 % (4,5-12,1 %)	7.8% (5.2-13.9%)
Número de personas con Intolerancia a la Glucosa	318 (212,2-571,6) millones	481 (317,1-855,7) millones
<b>Diabetes Tipo 1 (0 - 14 años)</b>		
Número de niños con DM tipo 1	542.000	-
Nuevos casos diagnosticados cada año	86.000	-

**Anexo 1.** La tabla muestra las proyecciones del número de personas y los gastos en salud relacionados con problemas de la diabetes (20 y 79 años), hiperglicemia durante el embarazo, intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 1. Tabla realizada con datos recogidos del *Atlas de la diabetes de la Federación Internacional de Diabetes 2015*

## ANEXO 2. Diferencia temporal y de expresión génica entre el desarrollo pancreático murino y humano.

<b>A) Proceso</b>	<b>Ratón</b>	<b>Humano</b>
Gastrulación	E6.5	G14-16d
Primordio Dorsal	E9.5 ( $\alpha$ )	G26d
Primordio Ventral	E10	G32d
Fusión	E11.5	G6w
2ª Transición	E13.5	G8w ( $\alpha$ y $\beta$ ) / G11w (acinos)
Islotes	E18-21	G17-19w
Islotes GSIS	P8	G>20w
<b>B) Genes</b>	<b>Ratón</b>	<b>Humano</b>
Pdx1	Primordios V y D	Más tardío
Gata4	Primordio V	Más tardío
Sox17	Primordio V	Primordios V y D
Nkx2.2	MPC	Progenitor endocrino
Nkx6.1	Dominio Tip hasta E14	Expresión más duradera en Tip
Ngn3	2º Transición	Expresión más prolongada
MafB	Ausente en células $\beta$	Presente en células $\beta$

**Anexo 2. A)** Muestra los procesos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario del páncreas y el momento en el que se producen en ambas especies. E: día embrionario, P: día posterior al nacimiento, G-d: día de gestación, G-w: semana de gestación. **B)** Muestra las principales diferencias de expresión génica durante el desarrollo pancreático de ratón y humano. V: ventral, D: Dorsal, MPC: célula pancreática Multipotente.

### ANEXO 3. Principales protocolos de diferenciación, y estrategias y mecanismos implicados en el proceso de diferenciación.

AÑO	AUTORES	REVISTA	ESPECIE	MECANISMO	ESTRATEGIA
2000	Soria B y col.	Diabetes	Ratón	Transfección PI3K	INS+ Nicotinamida
2002	Hori Y y col.	PNAS	Ratón	FGF PI3K PI3K	bFGF Nicotinamida Ly294002
2004	Leon-Quinto T y col.	Diabetologia	Ratón	Transfección PI3K SSH	Nkx6.1+ Nicotinamida Anti-Patched
2005	D'Amour K y col.	Nat Biotechnol	Humano	Nodal PI3K Wtn	Activina A/Nodal Reduccion de suero Wnt3a
2006	D'Amour K y col.	Nat Biotechnol	Humano	Nodal PI3K Wtn RAR SSH	Activina A/Nodal Reduccion de suero Wnt3a RA Ciclopamina
2007	Mc Lean AB y col.	Stem Cells	Humano	Nodal PI3K	Activina A/Nodal Inhibidores
2007	Jiang J y col.	Stem cells	Humano	Nodal HDAC RAR	Activina A Sodio Butirato RA
2007	Shim y col.	Diabetologia	Humano	Nodal RAR Agregados celulares	Activina A RA ITS/ Fibronectina Suspensión
2008	Kroon E y col.	Nat Biotechnol	Humano	Nodal Wnt FGF BMP SHH	Activina A Wnt3a FGF7 Noggin Ciclopamina
2009	Zhang D y col.	Cell research	Humano (CME, iPSC)	Nodal PI3K RAR	Activina A/Nodal Wortmannin RA
2009	Borowiak M y col.	Cell stem cell	Humano (CME, iPSC)	Vía TGF- $\beta$ -	IDE1 / IDE2 Indolactam V
2009	Johannesson M	PloS one	Humano	Nodal	Activina A

	y col.			Wnt RAR FGF	Wnt3a RA FGF4
2010	Ameri J y col.	Stem Cells	Humano	Nodal Wnt FGF	Activina A Wnt3a bFGF
2012	Schulz TC y col.	PloS one	Humano	Nodal Wnt FGF BMP SHH	Activina A Wnt3a FGF7 Noggin Ciclopamina Cultivo Rotación
2012	Rezania A y col.	Diabetes	Humano	Nodal Wnt FGF BMP RAR SHH TFG-b Agregados celulares	Activina A Wnt3a FGF7 Noggin RA SANT1 Alk5i Suspensión
2014	Pagliuca FW y col	Cell	Humano	Nodal Wnt FGF RAR SHH EGFR TFG-b	Activina A CHIR FGF7 RA SANT1 Betacelulina Alk5i T3
2015	Pezzolla D y col.	PloS one	Humano	Nodal Wnt FGF BMP SHH RAR Agregados celulares SIRT1	Activina A Wnt3a FGF7 Noggin Ciclopamina RA ITS/Fibronectina Suspensión Resveratrol

**Anexo 3.** Muestra los principales protocolos de diferenciación diseñados hasta hoy y las vías de señalización que son modificadas durante el proceso de diferenciación, así como las moléculas utilizadas para ello. Verde: activación; Rojo: inhibición.

#### ANEXO 4. Listado de proteínas de membrana, genes y citocinas referidos a las células T reguladoras

Proteínas de membrana			
	Descripción	Función	Células que lo expresan
<b>CD45</b>	Antígeno común de leucocitos, Tirosina fosfatasa	Desfosforilación de CD28	Leucocitos
<b>CD3</b>	Complejo Proteico asociado con TCR	Estimulación de TCR	Linfocitos T
<b>CD4</b>	Co-receptor de MHC tipo II	Estimulación de TCR	Linfocitos Th / Treg, monocito, macrófagos, CD
<b>CD25</b>	Cadena $\alpha$ del receptor de IL-2	Receptor de IL-2	Linfocitos T efectores (CD25+) / Treg (CD25 high)
<b>CD127</b>	Cadena $\alpha$ del receptor de IL-7	Receptor de IL-7	Linfocitos T memoria
<b>CD28</b>	Interacción con CD80 y CD86 de APC	Activación de linfocitos T (2 <sup>o</sup> señal)	Linfocitos T
<b>GITR</b>	Receptor de TNF inducido por glucocorticoide	Activación de TCR, regulación de Treg	Treg, Linf T act, B, monocitos, macrófagos, CD, mastocitos
<b>LAP</b>	Homodímero del complejo TGF-b latente	Regulación de la secreción de TGF- $\beta$	Linfocitos T, B, macrófagos
<b>CD69</b>	Marcador de activación temprano	Estimulación y proliferación	Células hematopoyéticas activadas (excepción, eritrocitos)

Genes			
	Descripción	Función	Células que lo expresan
<b>FoxP3</b>	Factor de transcripción ( <i>forkhead box P3</i> )	Implicado en el desarrollo y función de Treg	Linf T efectores (FoxP3+) / Treg (FoxP3 high)
<b>IL-10</b>	Citocina anti-inflamatoria	Limita la respuesta inmune	Treg, pero también por Th2, Th17 y B
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	Factor de crecimiento transformante 1 beta	Inhibe activación y proliferación de T y B Inhibe la diferenciación de Th1 y Th2 y favorece el desarrollo y supervivencia de Treg	Treg, linfocitos B, Treg, Breg

La Diabetes Mellitus es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por la presencia de elevados niveles de glucosa en sangre, como consecuencia de un fallo en la producción de insulina por el páncreas y/o por la ineficacia de su uso por el organismo. El trasplante de páncreas, al igual que sucede en cualquier trasplante de órganos, está sometido a la escasez de donantes, y debido a la alta prevalencia de la diabetes a nivel mundial y la estimación de su incremento en los próximos años, este problema se ve agravado. Por ello, científicos de todo el mundo tratan de encontrar fuentes alternativas para la terapia de la diabetes, que puede ser enfocada desde dos perspectivas distintas. Por un lado, la sustitución de las células beta pancreáticas productora de insulina, ámbito en el cual las células madre (CM) han ganado terreno en las últimas décadas, gracias a su capacidad de proliferación y diferenciación hacia los distintos linajes. Y, por otro lado, la detección de la destrucción de las células beta mediante el control del sistema inmune. En este sentido, el papel de las células T reguladoras (Treg) parecen ser fundamental debido a su capacidad de mediar el balance entre la tolerancia y la autoinmunidad.

Este trabajo se ha centrado en el estudio de la regulación del factor de transcripción Pdx1 en células madre embrionarias de ratón (CMER), debido a su implicación en la embriogénesis y función pancreática. El estudio epigenético del promotor de Pdx1, así como el estudio de la regulación por distintos factores de transcripción, nos ha permitido desarrollar un protocolo de diferenciación de CMER hacia células productoras de insulina. Este protocolo está basado en la adición de pequeñas moléculas, y consigue la obtención de células productoras de insulina maduras *in vitro*. Asimismo, este protocolo parece ser reproducible en células madre humanas, por lo que puede ser una alternativa o proporcionar complementariedad a los protocolos de diferenciación existentes, reduciendo de forma significativa su costo y complejidad. En este trabajo nos hemos centrado también en el estudio y caracterización de células Treg procedentes de sangre de cordón umbilical y sangre periférica de adulto, además de comparar dos técnicas de selección distintas. Este estudio ha revelado que existen diferencias significativas en función de la procedencia y técnica de aislamiento empleada, por lo que este análisis proporciona datos interesantes a tener en cuenta para el uso de las células Treg en terapia celular.

Citocinas	
Th1	Función
<b>IL-2</b>	Activación y proliferación de Linfocitos T, B y NK. Importante en el desarrollo de las Treg.
<b>IL-12</b>	Producida principalmente por macrófagos. Promueve la diferenciación de linfocitos Th1 e inhibe la diferenciación de Th2.
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Liberado por linfocitos T y B activados, y NK. Inhibe la diferenciación de linfocitos Th2 y la proliferación de células infectadas.
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Citocina pro-inflamatoria. Recluta a células inflamatorias en el sitio dañado e induce la liberación de otras citocinas inflamatorias.
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	Citocina pro-inflamatoria liberada por linfocitos activados.

Th2	Función
<b>IL-4</b>	Liberada por Th2 activados y NKT. Favorece la diferenciación de Th2, y el crecimiento y la supervivencia de linfocitos T, B y mastocitos
<b>IL-5</b>	Promueve la proliferación, activación y diferenciación de eosinófilos y la generación de linfocitos T citotóxicos.
<b>IL-6</b>	Secretada por una gran variedad de células del sistema inmune tras su activación, induce diferenciación de linfocitos T y B, y expresión de IL-2 y CD25
<b>IL-8</b>	Quimioquina secretada por monocitos, neutrófilos y células T, entre otras tipos celulares. Atrae a los granulocitos al sitio de la infección
<b>IL-10</b>	Producida principalmente por Treg, pero también por Th2, Th17 y B, entre otras. Limita la respuesta inmune para evitar el daño del huésped.

**Anexo 4.** La tabla muestra el listado de proteínas de membrana y genes característicos de células Treg y a los que nos referimos en el bloque 3 de este trabajo. Se muestra una breve descripción, la función y las células donde son expresados en cada caso. Además, la tabla muestra las citocinas de tipo 1 (Th1) y de tipo 2 (Th2) que se han analizado en el ensayo de liberación de citocinas con inmunoensayo FlowCytomix™ Multiple Analyte Detection System Th1/Th2 11plex Ready-to-Use, y una breve descripción de su función.