



Fundació
La Marató de TV3

22è SIMPOSIUM
Diabetis i Obesitat



CIRCUITS CEL·LULARS SINTÈTICS ENCAPSULATS PER RESTABLIR CONTROL GLICÈMIC EN DIABETIS *MELLITUS* TIPUS 1

Rubén Díaz Naderi

Hospital Sant Joan de Déu – Esplugues de Llobregat

Francesc Posas Garriga

Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona

Gorka Orive Arroyo

Facultad de Farmacia - Universidad del Pais Vasco

1. Resum

Antecedents i context actual

La diabetis de tipus 1 (T1D) és una malaltia autoimmunitària que es caracteritza per una elevada concentració de glucosa en la sang dels pacients que la pateixen. La principal causa de la malaltia és una reacció del propi sistema immunològic, el qual destrueix les cèl·lules beta del pàncrees que s'encarreguen de produir i secretar la insulina. La manca d'aquesta hormona impossibilita la internalització de la glucosa circulant dins els òrgans on realitza tota una bateria de funcions vitals. Tot i que fa més de 100 anys que es coneix que la manca d'insulina és la causa de la malaltia, actualment encara no existeix una cura per a aquesta malaltia. Els tractaments actuals consisteixen en l'administració d'insulina, juntament amb el control de la dieta i un exercici moderat per ajudar a controlar els nivells de glucosa en sang.

Actualment existeixen dues línies de recerca principals dedicades a trobar una «cura» (o tractaments més eficients) per a la diabetis:

1. Desenvolupament d'un pàncrees artificial. Es tracta d'un dispositiu que mesura la concentració de glucosa en sang de manera contínua i conté una bomba d'insulina que injecta la dosi necessària calculada a partir d'un algoritme que té en compte diversos factors, a més de la glucèmia del pacient. Aquest dispositiu està molt avançat i és àmpliament utilitzat, encara que ha de superar la problemàtica de la injecció subcutània d'insulina cada vegada que es realitza una ingesta, sumada a la incomoditat de portar els aparells corresponents, que tampoc disposen d'alarmes en cas de fallada. Tot i la millora en la qualitat de vida dels pacients, aquesta línia de teràpia presenta com a hàndicap la impossibilitat de sintetitzar la insulina necessària en cada moment, que ha de ser subministrada externament. Això dificulta el fet de poder mimetitzar la biologia i la fisiologia de l'illot pancreàtic.

2. Teràpia gènica i cel·lular. En ambdues aproximacions s'utilitza un model biològic que té la capacitat de sintetitzar la insulina necessària per al control glucèmic sense el requeriment de la injecció d'insulina de manera externa. Conjuntament, l'evolució que ha tingut el camp de la biologia sintètica durant els últims anys ha permès la modificació de models cel·lulars per dotar-los de noves funcions per a les quals no estaven programats, com poden ser la síntesi d'hormones. El nostre projecte de La

Marató es basa en la utilització de la teràpia cel·lular per desenvolupar models cel·lulars secretors d'insulina/glucagó, capaços de respondre més ràpidament als canvis dels nivells de glucosa que permetin un millor control metabòlic i essent capaços d'emular els trasplantaments d'illots pancreàtics sense necessitat d'immunosuprimir els pacients trasplantats. Per aquest motiu la teràpia cel·lular és una via amb un alt potencial per al tractament de la T1D.

Objectius principals del projecte

1. Desenvolupar un nou sistema cel·lular integrant circuits sintètics de gens capaços de detectar les concentracions de glucosa extracel·lular i secretar insulina o glucagó per regular adequadament l'homeòstasi de la glucosa.
2. Encapsulació d'aquest sistema generat *in vitro* per comprovar-ne la viabilitat en un model *in vivo*.
3. Implantar aquest sistema de circuits cel·lulars sintètics encapsulats en un model de ratolí de diabetis de tipus 1.

2. Resultats

1. Desenvolupament de circuits cel·lulars sintètics secretors d'insulina en funció de la concentració de glucosa extracel·lular

En iniciar el projecte es van fer simulacions *in silico* per estudiar quin seria el paper de les diverses hormones implicades en la regulació de la glucosa subministrades externament en pacients diabètics. Des de l'inici es va veure que la funció del glucagó en el control de la glucèmia en aquests pacients amb diabetis és secundària en comparació amb el paper principal que exerceix la insulina. Per aquest motiu, i a fi de simplificar els circuits genètics i el disseny de les cèl·lules sintètiques, es va optar per controlar només la producció d'insulina en funció dels nivells de glucosa en sang. Seguidament, es va escollir el sistema de detecció de la glucosa i la producció d'insulina. Es va optar per la selecció de promotors induïts de manera natural en funció de concentracions creixents de glucosa. El promotor escollit va ser el del gen TXNIP, que codifica per una tioredoxina necessària per protegir les cèl·lules de l'estrès oxidatiu. La transcripció d'aquest gen s'indueix per alta concentració de glucosa i es troba reprimat en condicions de baixa glucosa. A continuació es va escollir el model cel·lular per modificar. La modificació de manera estable de cèl·lules endocrines és

difícil d'aconseguir. Per aquest motiu vam utilitzar models cel·lulars no endocrins. A fi que la insulina produïda en cèl·lules no endocrines fos processada i funcional, es va utilitzar una versió modificada del gen insulina de rata on la proinsulina es processa per l'endoproteasa furina. El disseny final del constructe sintètic conté el promotor TXNIP, sensible a glucosa, el qual controla l'expressió d'un mARN policistrònic que codifica per la profurina-insulina i un gen reporter. Aquest parell d'elements clau, juntament amb altres gens reporters utilitzats per seleccionar les cèl·lules modificades, facilitaven el seguiment de la viabilitat cel·lular i de l'expressió de la mateixa insulina. La tecnologia utilitzada permetia produir la insulina correctament processada en alliberar-se al medi i els sistemes de detecció actuals amb anticossos contra la forma activa de la insulina en permetien la quantificació. El procés va concloure amb la validació de l'activitat de la insulina *in vitro*.

Un cop dissenyat i validat el mecanisme de producció d'insulina, es van construir diverses línies cel·lulars sintètiques capaces de detectar els nivells de glucosa i produir insulina a través del promotor TXNIP en resposta a les concentracions extracel·lulars de glucosa. Després de testar diferents línies cel·lulars, es va escollir el millor model cel·lular basat en les cèl·lules HEK293t d'origen humà. Les cèl·lules HEK293t-TXNIP-Ins resultants es van sotmetre a una validació exhaustiva en condicions de concentracions de glucosa dinàmiques similars a les que es trobaven en un ratolí diabètic. Els primers assaigs *in vitro* suggerien que els nostres implants requerien llargs períodes d'activació abans que es pogués detectar la insulina en el medi. També mostraven que caldria incrementar-ne la quantitat secretada per fer front als requeriments insulinèmics dels animals.

Durant el disseny dels circuits cel·lulars sintètics, es va desenvolupar un model matemàtic que permetia modelar les dinàmiques de secreció d'insulina de les nostres cèl·lules sintètiques, tant en format de monocapa com en el format encapsulat (3D). La producció d'insulina calculada a partir d'aquesta modelització era consistent amb les dades experimentals obtingudes *in vitro* quan s'exposaven aquestes cèl·lules a diferents concentracions de glucosa. També es va aprofitar aquest model matemàtic per introduir-lo en un model de ratolí diabètic virtual. Les simulacions computacionals en aquest model diabètic van revelar que els nostres implants requerien llargs períodes d'activació (aproximadament entre 6 i 8 hores) en condicions d'alta glucosa per secretar nivells d'insulina efectius, així es provocaven períodes d'hiperglucèmia als

ratolins. Es va determinar que aquest efecte era causat per l'arquitectura genètica del nostre circuit, bàsicament a la resposta lenta de la regulació transcripcional. Durant el transcurs del projecte es van dur a terme diferents aproximacions, incloent la modificació de l'arquitectura interna de la cèl·lula, amb l'objectiu de solucionar aquestes limitacions. Per exemple, es va intentar produir la insulina en forma de propèptid que pogués ser retingut a l'interior cel·lular i regular-ne la secreció només quan les condicions ho requerissin. No obstant això, cap d'aquestes aproximacions no va permetre la construcció de cèl·lules productores d'insulina amb millors dinàmiques que les obtingudes inicialment.

2. Encapsulació dels circuits genètics

L'encapsulació de cèl·lules terapèutiques permet el control dinàmic de l'alliberament de compostos actius en resposta a estímuls externs, cosa que fa incrementar dramàticament la bioseguretat i l'eficiència d'aquesta tecnologia. Així doncs, es va utilitzar un sistema d'encapsulació que permetés embolcallar les cèl·lules vives productores d'insulina i que procurés un alliberament de l'agent terapèutic, en aquest cas la insulina, a llarg termini. El sistema es basava en la idea que la implantació d'aquestes microcàpsules carregades de cèl·lules productores d'insulina pogués reduir o fins i tot eliminar completament la necessitat externa d'injeccions d'insulina per assolir el control glucèmic en l'individu.

En el disseny del tipus d'encapsulació es va tenir en compte un aspecte clau com era la resposta immunitària als biomaterials que constitueixen la càpsula tridimensional utilitzada per a l'embolcallament de les cèl·lules. Es van seleccionar i avaluar diferents tipus d'alginat ultrapurificat. El procés d'encapsulació es va basar en la suspensió de les cèl·lules secretores en una suspensió d'alginat que, quan entrava en contacte amb una solució de CaCl_2 , formava gotes gelificades. Addicionalment, i per assegurar l'estabilitat d'aquestes partícules, es van recobrir amb una capa de poli-L-lisina i una segona capa d'alginat. El resultat final va ser l'obtenció de partícules 3D de dimensions optimitzades (400 micròmetres de diàmetre) que permetien un equilibri òptim entre l'estabilitat de la partícula i la seva capacitat de difusió, tant de la l'entrada de la glucosa com de la sortida de la insulina secretada. L'avaluació en continu *in vitro* de les densitats cel·lulars utilitzades i les capacitats de síntesi d'insulina de les microcàpsules dutes a terme abans i en paral·lel als experiments *in vivo* van ser vitals durant el desenvolupament del projecte.

3. Caracterització farmacològica de les microcàpsules en models de ratolí diabètic

Un cop acabat l'estudi de la farmacodinàmica de les microcàpsules *in vitro*, es van estudiar diferents vies d'administració en el nostre model d'estudi *in vivo*. Amb aquest propòsit, es va establir un model de ratolí diabètic mitjançant la injecció d'una única dosi d'estreptozotocina (STZ), un fàrmac que malmet les cèl·lules beta del pàncrees productores d'insulina. Aquest procediment, altament estandarditzat, permetia generar un model de ratolí amb hiperglucèmia, però sense l'opció de modular-ne els nivells de glucosa.

Les quantitats d'insulina produïdes per les cèl·lules encapsulades van obligar a la utilització de grans volums de microcàpsules, cosa que ens va abocar a administrar-les al ratolí intraperitonealment. Altres aproximacions, com les subcutànies, presentaven dificultats tècniques i els volums injectables no cobrien les nostres necessitats de producció d'insulina. Amb aquesta aproximació vam observar que les càpsules no produïen cap efecte terapèutic. Aquesta falta de resposta es deu a la combinació de: (i) una resposta lenta de les microcàpsules en produir insulina, (ii) una producció relativament baixa de la quantitat global d'insulina i (iii) inducció de teixit fibròtic al voltant de la microcàpsula. En conjunt, aquests resultats indicaven que hi havia un mecanisme que impossibilitava la viabilitat de les cèl·lules encapsulades o la correcta secreció d'insulina.

Es van abordar diferents aproximacions realitzades simultàniament per solucionar les problemàtiques detectades. Els resultats experimentals demostraven que els materials d'encapsulació utilitzats sense la presència de cèl·lules reduïen a zero la resposta immunitària de l'hoste i, per tant, la formació de la fibrosi. D'altra banda, el canvi de la soca de ratolí C57BL6/J utilitzada fins al moment per la soca ICR-CD1, menys immunoreactiva, no mostrava una millora de la resposta immunitària de l'animal. Finalment, va ser mitjançant la utilització d'un model cel·lular d'una línia beta pancreàtica de ratolí (Min6) amb capacitat de síntesi i secreció d'insulina estimulada per glucosa que vam aconseguir reduir significativament els nivells de fibrosi generats. Aquests resultats indicaven que l'ús de cèl·lules humanes HEK293t modificades podien despertar una resposta de rebuig contra les càpsules que impossibilitava l'alliberament d'insulina en l'animal. Per solucionar els problemes d'immunocompatibilitat, es va optar pel xenotrasplantament, és a dir, utilitzar una cèl·lula murina modificada per obtenir

una alta capacitat de síntesi d'insulina. Els assajos utilitzant diverses línies murines van mostrar que les cèl·lules sintètiques basades en la línia C2C12 podien ser un bon model per produir furina-insulina.

Conseqüentment, l'estratègia final per aconseguir els resultats desitjats va ser la utilització del nou model cel·lular no humà, juntament amb la immunosupressió dels animals per reduir al màxim la resposta immunitària. Els resultats observats amb aquesta aproximació van demostrar l'eficiència dels models de cèl·lules d'origen murí en el control glucèmic dels animals diabètics (fins a 21 dies), especialment els primers dies postinjecció de les microcàpsules en combinació amb la immunosupressió dels individus. Les microcàpsules desenvolupades a partir de les noves cèl·lules C2C12 demostraven la capacitat de reduir els nivells de glucèmia dels animals fins a més de tres setmanes postinjecció, resultats similars als observats en el model Min6. La variació dels nivells de glucosa anava acompanyada d'un increment en els nivells d'insulina en plasma dels animals. Cal destacar que les càpsules secretores d'insulina de manera constitutiva (Min6) van resultar en l'aparició de signes d'hipoglucèmia perllongada en els animals, deixant palesa la importància d'una secreció regulada d'insulina i amb una dinàmica depenent dels nivells de glucosa en sang per restablir l'homeòstasi de la glucosa sense tenir efectes secundaris adversos.

D'altra banda, per solucionar la limitació de la resposta lenta que ofereix la regulació transcripcional dels circuits genètics generats, es van avaluar *in silico* els efectes de la combinació de diferents patrons d'alimentació, juntament amb els implants cel·lulars, en un model virtual de ratolí diabètic. Utilitzant un algoritme evolucionat es va determinar i optimitzar un patró d'alimentació basat en el *time-restriction feeding* (TRF) en combinació amb els nostres implants. Aquests patrons d'alimentació es van testar *a posteriori* i *in vivo* en els nostres models de ratolins diabètics injectats amb microcàpsules i comparant-ne l'alimentació *ad libitum* amb el TRF. Els resultats indiquen que els efectes dels nostres implants milloraven significativament quan es combinaven amb un patró d'alimentació adequat. A més, les dades obtingudes es van utilitzar altra vegada com a *input* del nostre model computacional per millorar l'algoritme.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Els resultats obtinguts al llarg del projecte posen de manifest la importància del desenvolupament d'un model cel·lular capaç de produir insulina de manera regulada en funció de les concentracions de glucosa extracel·lular per al desenvolupament de futures teràpies en el camp de la diabetis de tipus 1.

Durant el projecte, hem demostrat que la combinació de les diferents estratègies abordades fins al moment (canvi de model animal, model cel·lular productor d'insulina i immunosupressió dels animals) són claus per assolir el restabliment de l'homeòstasi de la glucosa en el nostre model de ratolí diabètic. Actualment, el projecte ens ha portat a desenvolupar un model de cèl·lula murina capaç de produir alts nivells d'insulina d'una manera regulable en funció dels nivells de glucosa de l'exterior de la microcàpsula. Això, juntament amb el perfeccionament de la millora del sistema de retenció i secreció del propèptid d'insulina generada i la millora de les quantitats cel·lulars que poden ser embolcallades, ens fan entreveure avenços en el tractament de la diabetis. Així mateix, la forta dependència de la immunosupressió durant els xenotrasplantaments utilitzats reflecteix la necessitat futura d'utilitzar cèl·lules modificades del propi individu, juntament amb sistemes complementaris o alternatius a la simple encapsulació com podria ser la utilització de sistemes similars als implants subcutanis o la utilització d'estructures 3D basades en biomaterials. Es important destacar que tots els coneixements adquirits durant el projecte, així com la metodologia utilitzada, contribuiran en un futur al tractament de la diabetis i en altres camps de la recerca biomèdica.

4. Bibliografia científica generada

Urrios A, González-Flo E, Canadell D, de Nadal E, Macià J, Posas F.
Plug-and-Play Multicellular Circuits with Time-Dependent Dynamic Responses.
ACS Synth Biol. 7: 1095-104 (2018).