

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



“Microencapsulación de agregados celulares compuestos por células productoras de insulina (IPC) y glucagón (GPC) diferenciadas in vitro, a partir de células mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo (hASC)”.

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctora en Farmacología por:**

CLAUDIA ALICIA JARA CANCINO

Director de Tesis: Dr. Pablo Caviedes Fernández

Santiago-CHILE
Noviembre 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

CLAUDIA ALICIA JARA CANCINO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: _____ y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dr. Pablo Caviedes _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Marcelo Kogan _____

Dra. Jenny Fiedler _____

Dra. María Isabel Beherens _____

Dr. Roberto Ebensperger _____

Dedicatoria.

A mi hijo Lorenzo, la lucesito de alegría que llegó a nuestra vida en medio del Doctorado, quien me ha dado la fuerza necesaria para ser cada día mejor, gracias por existir y por enseñarme a ser tu mamá.

Agradecimientos.

En primer lugar, quisiera agradecer a mis pilares de vida, Claudio, Lorenzo y Mitzy, muchas gracias por estar siempre ahí apoyándome y por entender mis tiempos, agradezco día a día el tenerlos en mi vida, los amo! A mis Padres, quienes han formado la persona y profesional que hoy soy, gracias por entregarme los valores y principios que han sido fundamentales en todos los procesos de mi vida, los amo! Agradezco también a mi hermana Sindy, por hacer que valga la pena cada vez que podemos vernos y disfrutar todos juntos, y a mi sobrino Lucciano, por ser el mejor primo del mundo para Lorenzo, los amo!

Durante mi formación Doctoral, agradezco en primer lugar a mi tutor de tesis, el Dr. Pablo Caviedes, quien ha sido fundamental en todo el proceso, muchas gracias por el compromiso, la paciencia y la perseverancia que ha tenido conmigo todo este tiempo, me llevo la mejor experiencia del laboratorio y de haber trabajado bajo su dirección. Igualmente agradezco al Dr. Raúl Caviedes, por siempre mostrarse interesado e incentivarme a llevar a cabo esta investigación. También agradezco al Programa de Doctorado en Farmacología, y a su director, el Dr. Guillermo Díaz, por haberme permitido acceder a esta especialización en el área Farmacológica, sin duda un excelente programa, único en nuestro país. A los miembros de mi comisión de tesis: Dra. María Isabel Beherens, Dra. Jenny Fiedler, Dr. Roberto Ebensperger y Dr. Marcelo Kogan, muchas gracias por todos los comentarios, cuestionamientos y aportes al desarrollo de mi trabajo de tesis y de mi formación como profesional.

Esencial en el desarrollo de este trabajo, fue la colaboración con el Dr. Felipe Oyarzún y el Dr. Flavio Carrión, quienes con sus suspicaces aportes ayudaron también a llevar a cabo este proyecto, Felipe en el área de biomateriales y microencapsulación y Flavio en el área de cultivo de células hASC y su caracterización. No puedo dejar de agradecer a quienes tras bambalinas hacen todo posible en el laboratorio, a Guillermo y Fernando, muchas gracias por su ayuda día a día, por los consejos y por la buena acogida. También agradezco a los miembros del laboratorio: Cristian, Esteban, Natalia y Ramón, por la grata convivencia diaria y por la ayuda técnica y experimental, me llevo grandes recuerdos. Como no agradecer también a los miembros del laboratorio de Felipe, Mariela y Pablo, por el apañe, la buena onda y la ayuda brindada, compartimos muy buenos momentos. Finalmente, agradezco a mis amigos de la vida, de la U, de Stgo y de Valdivia, a cada uno por ser tal cuál son y por hacer más agradable cada momento, la familia que uno escoge, los amigos.

Índice de contenidos.

Producción científica.....	8
Abreviaciones.....	10
Resumen.....	12
Abstract.....	14
1) Introducción.....	15
1.1) Diabetes mellitus tipo I, T1DM.....	15
1.1.1) Tratamientos actuales: Ventajas y desventajas.....	16
a) Terapia de reemplazo de Insulina.....	16
b) Trasplante de Páncreas.....	18
c) Trasplante de Islote Pancreático.....	18
1.1.2) Nuevas perspectivas de tratamiento, terapia celular.....	19
1.2) Células madre derivadas de tejido adiposo humano (hASC): una población de células madre mesenquimales (MSC).....	19
1.2.1) Uso de hASC aplicado a T1DM.....	20
a) Desarrollo de IPC.....	21
b) Desarrollo de GPC.....	22
1.3) Células α y β pancreáticas: biología del desarrollo, secreción hormonal y regulación paracrina.....	23
1.3.1) Biología del Desarrollo de células α y β	23
1.3.2) Secreción de Insulina.....	23
1.3.3) Secreción de Glucagón.....	25
1.3.4) Regulación paracrina intraislote.....	25
1.4) Formación Agregado Celular.....	27
1.5) Encapsulación.....	28
1.5.1) Macroencapsulación.....	29
1.5.2) Microencapsulación.....	30
1.5.3) Biomateriales.....	30
1.5.4) Microencapsulación de islotes aplicado a T1DM.....	31
2) Estrategia Experimental.....	35

2.1) Obtención hASC.....	35
2.2) Caracterización hASC.....	35
2.2.1) Análisis marcadores de superficie.....	35
2.2.2) Análisis de potencial de tridiferenciación.....	36
a) Tinción Oil Red.....	36
b) Tinción Von Kossa.....	36
c) Tinción Alcian blue.....	36
2.3) Diferenciación <i>in vitro</i> hacia IPC a partir de hASC.....	36
2.4) Diferenciación <i>in vitro</i> hacia GPC a partir de hASC.....	37
2.5) Formación agregado celular compuesto de IPC y GPC.....	38
2.6) Inmunofluorescencia Indirecta.....	39
2.6.1) Inmunofluorescencia indirecta en células adherentes.....	39
2.6.2) Inmunofluorescencia de agregados celulares.....	39
2.7) Estimulación con Glucosa.....	40
2.8) Microencapsulación.....	40
2.8.1) Microencapsulación de proteínas BSA y SpA.....	41
a) Tamano de microgeles.....	42
b) Liberación de BSA y SpA al medio.....	42
2.8.2) Microencapsulación de agregado celular.....	42
2.9) Análisis estadístico.....	42
3) Resultados.....	43
3.1) Purificar y caracterizar hASC como una población de células MSC de acuerdo a lo establecido por la ISCT.....	43
3.2) Diferenciar <i>in vitro</i> IPC y GPC a partir de hASC independientemente.....	46

3.3) Expresión de marcadores endocrino pancreáticos en hASC, IPC y GPC.....	47
3.4) Determinar la funcionalidad de células IPCs y GPCs.....	50
3.5) Generación y caracterización de agregado celular compuesto de IPC y GPC.....	50
3.6) Encapsulación de las proteínas: albúmina de suero bovino (BSA) y staphylococcal protein A (SPA), caracterizando los microgeles obtenidos en tamaño, forma, permeabilidad.....	54
3.7) Generación y caracterización funcional de agregado celular esférico microencapsulado compuesto por IPCs y GPCs diferenciadas a partir de hASC.....	57
4) Discusión.....	60
5) Conclusiones.....	66
6) Referencias.....	67

Producción científica.

Presentaciones a Congresos:

- 1) Jara C., Lara P., Oyarzun-Ampuero F., Caviedes R., Caviedes P. Diferenciación de Células Mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo hacia Células Productoras de Insulina, y primeros estudios de Microencapsulación”. XVI aniversario del ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. 2013.
- 2) Jara, C., Caviedes, R., Caviedes, P. Differentiation of humans Adipose-derived Mesenchymal Stem Cell (hASC) into Insulin Producing Cells (IPC). XII PABMB Congress. XXXVI Annual Meeting Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. XLIX Annual Meeting Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular. LVI Annual Meeting Sociedad de Biología de Chile. 4° Latin American Protein Society Meeting. Puerto Varas, Chile, 9-14 Nov, 2013.
- 3) Oyarzun-Amparo, F., Jara, C., Lara, P., Rojas, R., Caviedes, P. Microencapsulación de proteínas en microgeles de Alginato: Caracterización de las variables que afectan la inclusión y liberación de los activos. XXX Jornadas Chilenas de Química, Sociedad Chilena de Química. Pucón, Chile, 12-15 Nov, 2013.
- 4) Jara, C., González, E., Carrión, F., Caviedes, R., Caviedes, P. Differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cell (hASC) into insulin producing cells (IPC). 8^{vo} Congreso Latinoamericano de órganos artificiales, biomateriales e Ingeniería de tejidos (COLAOB). Rosario, Argentina, 20-23 Agos, 2014.
- 5) Jara, C., González, E., Carrión, F., Caviedes, R., Caviedes, P. Microencapsulation of proteins in alginate microgels: description of variables affecting the inclusion and release of active compounds. 8vo Congreso Latinoamericano de órganos artificiales, biomateriales e Ingeniería de tejidos (COLAOB). Rosario, Argentina, 20-23 Agos, 2014.
- 6) Jara C., González E., Carrion F, Caviedes R., Oyarzun-Ampuero F., Caviedes P. Formation of cellular aggregate composed of differentiated insulin and glucagon producing cells from human mesenchymal cells derived from adipose tissue (hASC). 1° ITMR Congress, 7- 11 Nov, 2017.

Publicaciones:

- 1) Jara C., González E., Carrion F., Caviedes R., Oyarzún-Ampuero F., Caviedes P. Formation of celular aggregate composed of differentiated insulin and glucagon producing cells from human mesenchymal cells derived from adipose tissue (hASC), in 1st National Congress of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, C. Covarrubias (Editor), LAP LAMBERT Academic Publishing, p. 90-93, Mauritius, ISBN: 978-613-3-99514-7, 2018.

- 2) Jara C, Oyarzun-Ampuero F, Carrión F, González-Echeverría E, Cappelli C, Caviedes P. Microencapsulation of cellular aggregates composed of differentiated insulin and glucagon-producing cells from human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. *Diabetol Metab Syndr.* 2020;12:66. Published 2020 Aug 5. doi:10.1186/s13098-020-00573-9.

Abreviaciones.

Gcg:	Glucagón
Ins:	Insulina
SS:	Somatostatina
PP:	Polipéptido pancreático
T1DM:	Type 1 diabetes Mellitus
CVB:	Coxsackievirus
MCG:	Monitoreo continuo de glucosa
HbA1c:	Hemoglobina glicosilada
DCCT:	Ensayo de control y complicaciones de la diabetes
IPRT:	Registro Internacional de trasplante renal
ESC:	Células madre embrionarias
iPSC:	induced pluripotent stem cells
MSC:	mesenchymal stem cells
hASC:	human adipose-derived stem cells
IFATS:	International Fat Applied Technology Society
BM-MSC:	bone marrow mesenchymal stem cell
ISCT:	International Society of Cellular Therapy
IPC:	Insulin producing cells
GPC:	glucagon producing cells
STZ:	Estreptozotocina
Pdx1:	Pancreatic duodenal homeobox 1
Ngn3:	Neurogenina 3
Isl-1:	Islet 1 factor
HEACs:	human eyelid adipose-derived stem cells.
GLP-1:	Glucagon like protein 1
Arx:	Aristaless related homeobox
Pdx4:	Paired box gene 4
MafA:	Factor de transcripción bZIP MAF
VDCC:	Canal de Calcio dependiente de voltaje
cAMP:	AMP cíclico

DAG:	Diacilglicerol
IP3:	Inositol 3 fosfato
GABA:	γ -aminobutírico
PI3K:	Quinasa de 3 fosfatidilinosítidos
SFB/:	Suero fetal bovino
MHCI:	Complejo mayor de histocompatibilidad I
MHCII:	Complejo mayor de histocompatibilidad II
GAD65:	Ac. Glutámico descarboxilasa, isoforma 65kDa.
LCT:	Living cells technologies
PERV:	Retrovirus endógeno porcino
BSA:	bovine serum albumin
SpA:	Proteína A Staphylococcal
PBS:	phosphate buffer saline
FVE:	stromal vascular fraction
PFA:	Paraformaldehido
FGF:	Factor de crecimiento fibroblastoide
RA:	Ácido retinoico
ALK5:	Quinasa 5 del receptor de TGF β
IFI:	Inmunofluorescencia indirecta
Vim:	Vimentina
BKR:	Buffer Krebs Ringer
Td:	Tiempo de duplicación celular
LG:	Baja glucosa
HG:	Alta glucosa
DPSC:	Células madre derivadas de pulpa dental

Resumen.

La diabetes mellitus tipo I (T1DM), es una enfermedad caracterizada por la destrucción de las células β productoras de insulina, presentes en los islotes de Langerhans, estructuras que cumplen las funciones del páncreas endocrino. Como consecuencia, los pacientes que desarrollan esta enfermedad pierden la capacidad de producir Insulina. La tasa de incidencia de esta patología se encuentra en considerable aumento tanto a nivel mundial como en nuestro país. El tratamiento convencional es la terapia de reemplazo de insulina en conjunto con una dieta estricta y actividad física controlada; sin embargo, esto no reproduce el estricto control de la glicemia que presenta un individuo sano. El trasplante de islotes pancreáticos desde donantes cadáver es una alternativa en países desarrollados, y está dirigido a pacientes con pobre control glicémico. Sin embargo, el proceso de purificación de islotes resulta poco eficiente y reproducible. Además, es necesario someter a los pacientes a una terapia de inmunosupresión a permanencia para evitar el rechazo de los islotes trasplantados. Recientemente, nuevos estudios proponen que las células madre mesenquimales (MSC) podrían ser utilizadas para producir células tipo pancreáticas endocrinas. En este proyecto propusimos usar como fuente celular, MSC derivadas de tejido adiposo humano o “adipose-derived stem cells” (hASC), para promover su diferenciación *in vitro* hacia células productoras de glucagón e insulina. Para esto, se purificaron hASC de lipoaspirado humano y se clasificaron como una población de MSC de acuerdo con su perfil de marcadores de superficie y su potencial de diferenciación hacia fenotipos adipogénico, condrogénico y osteogénico. Posteriormente se indujo la diferenciación de hASC hacia células productoras de insulina (IPCs) y células productoras de glucagón (GPCs), para luego formar un agregado celular compuesto por IPC y GPC bajo condiciones de baja adherencia. Tanto las células diferenciadas IPC y GPC, como los agregados de ambos tipos celulares presentaron expresión de marcadores característicos de células endocrinas pancreáticas como Pdx1, Ngn3, Insulina y Glucagón. Los agregados celulares presentaron un diámetro promedio de $\sim 80 \mu\text{m}$. Finalmente, para otorgar inmunoprotección a los agregados celulares y así evitar el uso de inmunosupresores, dichos agregados fueron microencapsulados en alginato de sodio estabilizado con Ba^{2+} . Los microgeles presentaron un diámetro de $\sim 300 \mu\text{m}$, y los

agregados encapsulados mostraron secreción de insulina en respuesta a glucosa, la que decae luego de 7 días de cultivo.

En conclusión, logramos obtener agregados celulares IPC/GPC que una vez encapsulados en alginato de sodio 1,5 % y estabilizados con Bario, son capaces de responder con secreción de insulina frente a condición de alta glucosa *in vitro*. El procedimiento descrito en este trabajo permite generar agregados tipo islote pancreático utilizables como posible tratamiento para T1DM.

Abstract.

In type I diabetes mellitus (T1DM) insulin-producing pancreatic β cells are destroyed. As a consequence, patients with T1DM lose the ability to produce insulin. The incidence rate of this pathology is in considerable increase both globally and in our country. Treatment entails exogenous insulin administration, strict diet control and an active lifestyle, yet optimal glycemic control is hardly attainable. Islet transplant from cadaver donor could be an alternative in patients with poor glycemic control in developed countries, but inefficient islet purification and low reproducibility exist. Furthermore, it is necessary to subject patients to permanent immunosuppression therapy to avoid rejection of the transplanted islets. Recently, new studies propose that mesenchymal stem cells (MSCs) could be used to produce endocrine pancreatic-like cells. In this project we proposed to use MSC derived from human adipose tissue (hASC), to promote its differentiation in vitro to glucagon and insulin producing cells. For this, hASC were obtained from human lipoaspirated, and classified as a population of MSC according to their profile of surface markers and their potential for differentiation towards adipogenic, chondrogenic and osteogenic phenotypes. Posteriorly, hASC were differentiated in vitro to IPC and GPC. Then, we coincubated IPC and GPC cells in low adhesion conditions to induce the formation of cellular aggregates. We demonstrated that both, the differentiated cells (IPC and GPC) and the aggregates IPC/GPC showed expression of characteristic markers of pancreatic endocrine cells such as Pdx1, Ngn3, Insulin and Glucagon. The Feret diameter of cellular aggregates, finding mean diameters $\sim 80 \mu\text{m}$ at 72h of incubation. Finally, to privileged environment and avoid use of immunosuppressors the IPC/GPC aggregates were microencapsulated in sodium-alginate polymer microgels being more stable through time in Ba^{2+} stabilized microgels, with average diameters $\sim 300 \mu\text{m}$. Moreover, Ba^{2+} -microencapsulated aggregates respond to high external glucose with insulin secretion, what declines after 7 days of cultivation. In conclusion, the IPC/GPC differentiation process from hASC followed by generation of cellular aggregates IPC/GPC microencapsulated in sodium alginate 1.5% stabilized with Ba^{2+} in vitro represent a possible treatment for T1DM.

1) Introducción.

El páncreas es un órgano mixocrino, vale decir, presenta un compartimento exocrino y otro endocrino. El compartimento endocrino está formado por los islotes de Langerhans que juegan un rol central en el control de la glicemia, y están compuestos por células endocrinas α , β , δ y células PP, las cuales secretan glucagón (gcg), insulina (Ins), somatostatina (SS) y polipéptido pancreático (PP) respectivamente (Saito y cols., 2011). El control sobre la homeostasis de la glicemia, está determinado principalmente por las hormonas insulina y glucagón que presentan funciones contrapuestas; por un lado, insulina promueve la captación de glucosa y síntesis de glicógeno en hígado y músculo esquelético; mientras que glucagón promueve la glicogenólisis, cetogénesis y gluconeogénesis (Cherrington y cols., 1978 – Keller y cols., 1977).

Una de las patologías donde se pierde este balance hormonal es en la diabetes mellitus tipo I (T1DM), la cual se caracteriza por la destrucción selectiva de células β del islote, siendo necesaria la terapia de reemplazo con insulina exógena vía parenteral y control estricto de dieta y ejercicio. Sin embargo, esa terapia no reproduce el principio de variable regulada dada por la célula β , lo que conlleva en la mayoría de los casos a complicaciones vasculares y efectos colaterales indeseados y difíciles de controlar, afectando la calidad de vida del paciente y su expectativa de vida, como ha sido reportado por el grupo de ensayo de control de complicaciones de la diabetes (DCCT, 1993 – DCCT 2013).

En la búsqueda de nuevos horizontes para el tratamiento de la T1DM, se ha comenzado a estudiar la terapia celular como una importante alternativa. A continuación, se describen los antecedentes de los diferentes aspectos que llevaron a la formulación de este proyecto.

1.1) Diabetes mellitus tipo I, T1DM.

La T1DM, se caracteriza por la hiperglicemia persistente debido a la pérdida en la producción de insulina, se divide en tipo 1A y 1B. a) T1ADM o autoinmune, representa el 90% de los casos de T1DM, donde se detecta producción de auto-anticuerpos contra antígenos pancreáticos. b) T1BDM, o diabetes idiopática, está representada por un 10% de casos (Ize-Ludlow y cols., 2005).

Tanto la tasa de incidencia como la prevalencia de la patología han aumentado a nivel global durante las últimas décadas. El estudio del grupo DIAMOND, analiza datos de 114 centros de 57 países, reportando un aumento en la tasa de incidencia durante los años 1995-1999 de 3,4% comparado con los años 1990-1994 donde fue de 2,4% (DIAMOND Group, 2006); mientras que recientemente se publicó un meta-análisis que mostró una tasa de incidencia de 15/100000 personas y una prevalencia del 9,5% en el mundo (Mobasserri y cols., 2020). Aunque nuestro país no tiene información reciente sobre incidencia de T1DM a nivel nacional, a nivel de la región metropolitana, se observa una duplicación en la tasa de incidencia en el año 2004 respecto al año 2000, en pacientes de 0 a 4 años, lo que aumenta aún más en la población menor a los 2 años. (Carrasco y cols., 2006).

Los fundamentos etiológicos no se encuentran del todo determinados. Se han reportado múltiples factores que pueden predisponer a un paciente a generar la patología como son la edad, factores genéticos y ambientales. En relación a la edad, se ha determinado que a nivel mundial más del 85% de todos los casos de T1DM ocurre en jóvenes menores de 20 años de edad (Liese y cols., 2006) (Thunander y cols., 2008). Además, la tasa de incidencia aumenta desde el nacimiento con un pico entre los 10 y 14 años de edad, durante la pubertad (Dabalea y cols., 2007) (DIAMOND, 2006). Dentro de factores genéticos, el más importante son ciertos polimorfismos de HLA I y HLA II presentes en linfocitos T CD4⁺ autoreactivos y células presentadoras de antígeno respectivamente (Giwa y cols., 2020). Se ha reportado, por ejemplo, que sobreexpresión de moléculas HLA DR4, DQ8 y DQ2 aumentan la susceptibilidad y están presentes en ~ 90% de pacientes con T1DM (Maahs y cols., 2010).

Otros factores de riesgo son infecciones virales por enterovirus como coxsackievirus (CVB) o ecovirus (Giwa y cols., 2020) que se han implicado como fuertes gatillantes de la enfermedad. Finalmente, la alimentación, particularmente una alta exposición a temprana edad de leche de fórmula en vez de pecho materno y cereales a temprana edad permanecen en discusión sobre su causalidad en la patología (Giwa y cols., 2020).

1.1.1) Tratamientos actuales: Ventajas y desventajas

a) Terapia de reemplazo de Insulina. La inyección parenteral de insulina exógena junto con alimentación saludable y rigurosamente controlada, asociado con ejercicio

regulado, constituyen el tratamiento de elección a nivel mundial para T1DM, lo que ha reducido la mortalidad y aumentado la expectativa de vida de los pacientes; sin embargo, este tratamiento no es efectivo para mantener el nivel de glicemia dentro de rangos fisiológicos minuto a minuto como lo hace la insulina endógena. En las últimas décadas ha habido avances que han puesto al mercado diversos tipos de insulinas modificadas, unas de rápida acción y otras de acción más prolongada, con el fin de controlar finamente las variaciones de glicemia en los distintos momentos del día del paciente. Otro gran avance, ha sido el monitoreo continuo de la glicemia o MCG (CGM o continuous glucose monitoring), que ha permitido disminuir las crisis hiperglicémicas en los pacientes, así como también ha permitido la disminución de hemoglobina glicosilada (HbA1c), el parámetro indicativo por excelencia para monitorizar el buen manejo y control glicémico (Maahs y cols., 2010). El Ensayo de Complicaciones y Control de la Diabetes (DCCT) demostró que el MCG reduce también las complicaciones vasculares a largo plazo como retinopatía, microalbuminuria, nefropatía, y neuropatía asociadas a la T1DM (DCCT Research Group, 1993). Sin embargo, el control más intensivo de la glicemia se relaciona también con un aumento en los eventos hipoglicémicos (DCCT Research Group, 1991) (Panbiano y cols., 2006).

En T1DM bajo tratamiento con insulina exógena, se produce constantemente un estado hiperinsulinémico a nivel sanguíneo, pero no a nivel intraislote (cuando normalmente, la concentración de insulina intraislote es siempre mayor a insulina sanguínea), y por lo tanto se pierde el mecanismo regulador paracrino, en el cual insulina actúa sobre sus receptores en células α , inhibiendo la secreción de glucagón (Bansal y cols., 2008), esto en pacientes diabéticos, provoca aumento en la secreción de glucagón y la posterior hiperglicemia postprandial detectada en pacientes diabéticos (Unger y cols., 1970) (Wilinska y cols., 2009). Por otro lado, al no disminuir los niveles de insulina sanguíneo al mismo tiempo que se recuperan los niveles de glicemia, se produce hipoglicemia en los pacientes debido a que el cerebro detecta altos niveles de insulina plasmática, inhibiendo la secreción de glucagón (Wilinska y cols., 2009). Debido a estos inconvenientes en la terapia tradicional, es que se han explorado otras alternativas terapéuticas como son el trasplante de páncreas y de islote pancreático.

b) Trasplante de páncreas. Una alternativa terapéutica es el trasplante pancreático, un procedimiento quirúrgico mayor, que en el 90% de los casos se realiza en conjunto con trasplante renal (Gruessner y cols., 2016). Cabe mencionar además que para esta terapia es necesaria la administración de drogas inmunosupresoras a permanencia como tacrolimus o sirolimus, los que han mostrado ser diabetogénicos y provocar otros efectos secundarios como: úlceras bucales, diarrea y acné. Esto en conjunto con la baja cantidad de donantes han limitado el uso de esta estrategia (Cohen y cols., 2006 – Gruessner y cols., 2005) (Gruessner y cols. 2016). El Registro Internacional de Trasplante de Páncreas (IPTR) reportó que el 90% de los trasplantes de páncreas se hicieron en conjunto con trasplante renal y excelentes resultados, observando que pacientes que sobrevivieron 1 año postrasplante aumentó en 2010-2014 vs 2005- 2009 de un 95.7% a un 97.4%, la función del páncreas trasplantado aumentó de un 88.3% a un 91.3%, y la función renal aumentó de 93.6% a un 95.5% (Gruessner y cols. 2016).

c) Trasplante islote pancreático. Otra alternativa bastante prometedora, es el trasplante de islotes pancreáticos, un procedimiento que sólo utiliza la función endocrina del páncreas (1% del páncreas total) (Ionescu-Tirgoviste y cols., 2015). Hasta el año 2000 sólo el 12% de los trasplantados permaneció libre de insulina exógena luego de 1 año del trasplante. Pero una promisoriosa terapia surgió a raíz de los resultados del grupo de Shapiro y cols., el protocolo de Edmonton (Shapiro y cols., 2000), una terapia combinada que usa inmunosupresores libres de glucocorticoides junto con el trasplante de una masa adecuada de islotes pancreáticos recién purificados *post mortem*. Con este tratamiento, el 44% de los sujetos tratados se volvieron independientes de insulina exógena después de un año de trasplante (Shapiro y cols., 2006). Sin embargo, en la actualidad, esta terapia se limita a pacientes con pobre o nulo control metabólico (Shapiro y cols., 2000) (Ryan y cols., 2001), pues la cantidad de donantes es baja y las limitaciones técnicas que conlleva el aislamiento de islotes pancreáticos viables y funcionales dificultan la implementación masiva de dicha terapia (Ryan y cols., 2004). Por otro lado, a pesar de los avances en la generación de nuevas terapias de inmunosupresión usando anticuerpos neutralizantes o inhibidores de células del sistema inmune, aún se utilizan bajas dosis de tacrolimus o sirolimus, lo que conlleva a efectos secundarios a corto plazo como diarrea, acné y úlceras o efectos a largo plazo como neoplasias o infecciones graves, lo que no puede ser permitido en un paciente que ya tiene bastante deteriorada la calidad de vida (Ryan y

cols., 2004). Finalmente, cuando el trasplante es exitoso, la funcionalidad y supervivencia del injerto sigue siendo una limitante, debido a que la activación del sistema inmune contra el islote trasplantado resulta en la muerte gradual del injerto (Ryan y cols., 2004). Por ello se ha propuesto que el aislamiento inmunológico del injerto por encapsulación podría permitir una prolongada funcionalidad del trasplante (Ryan y cols., 2004), (Matsumoto y cols., 2016).

En conclusión, es esencial encontrar nuevas fuentes celulares y métodos de aislamiento inmunológico para enfrentar las limitaciones mencionadas.

1.1.2) Nuevas perspectivas de tratamiento, terapia celular.

Dentro de las posibles fuentes celulares que pueden utilizarse para reemplazar funcionalmente el islote pancreático, encontramos las células madre, entendiendo como tal a una población celular autorrenovable que en general es capaz de diferenciarse hacia un fenotipo específico. Las principales células madre utilizadas en terapia celular han sido: células madre embrionarias (ESC), lo que implican un gran debate ético y moral; células pluripotentes inducidas (iPSC), que implica mayor intervención celular y/o genética; y células madre mesenquimales (MSC) derivadas de tejidos adultos, que se han utilizado ampliamente gracias a su fácil obtención y manipulación. Diversos son los estudios sobre la aplicación MSC en terapia celular aplicada a enfermedades tales como: enfermedad de Crohn (Ciccocioppo, 2011), infarto agudo al miocardio (Chen, 2010), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (D'Agostino y cols., 2010), entre otros.

1.2) Células madre derivadas de tejido adiposo humano (hASC): una población de células madre mesenquimales (MSC).

Las MSC fueron primero aisladas desde aspirados de médula ósea en la década del '60 (Friedenstein y cols., 1968), pero en la actualidad se sabe que se encuentran presentes en casi todos los tejidos adultos (pulpa dental, la encía, tejido adiposo, hígado y pulmón, entre otros). Las muestras más utilizadas son médula ósea y tejido lipoaspirado, siendo la obtención de médula ósea un procedimiento altamente invasivo, complejo técnicamente y doloroso para el paciente. Por el contrario, el tejido adiposo se obtiene mediante lipoaspiración, un procedimiento quirúrgico rutinario, ambulatorio y poco invasivo. Posterior a la obtención del lipoaspirado, es posible purificar una cantidad de MSC

incluso mayor de la que se obtiene a partir de muestras de médula ósea (Li y cols 2015). Las MSCs obtenidas desde tejido adiposo, se denominan células madres derivadas de tejido adiposo humano (hASC por “human adipose-derived stem cell”) (Da Silva Mierelles y cols., 2006), término adoptado por la “International Fat Applied Technology Society” (IFATS); mientras que aquellas purificadas desde médula ósea se denominan BM-MSc.

Otras ventajas de hASC fueron descritas en un estudio comparativo reportado por el grupo de Kern, donde se observó mayor capacidad proliferativa (menor tiempo de duplicación o td) y menor tasa de senescencia en hASC comparado con BM-MSc (Li y cols., 2015) (Kern y cols., 2006). A su vez, Timper y cols. mostraron que hASC cultivadas *in vitro* expresan Nestina, un marcador de precursores neurales y pancreáticos, sugiriendo un alto potencial de diferenciación a células pancreáticas (Timper y cols., 2006).

De esta forma, las hASC son definidas por La Sociedad Internacional para Terapia Celular (ISCT) (Dominici y cols, 2006) (Bourin y cols., 2013) como una población de células MSC, autorrenovables, adherentes a sustrato en placas de plástico bajo condiciones de cultivo celular, expresan los marcadores de superficie CD105, CD73 y CD90, y presentan ausencia en la expresión de marcadores CD45, CD14, CD19 y HLA-DR. Son capaces de diferenciarse a fenotipo adipogénico, condrogénico, miogénico, osteogénico (Zuk y cols., 2002), neurogénico (Fraser y cols., 2006), epitelial (Fraser y cols., 2006), hepático (Aurich y cols., 2009) y pancreático (Chandra y cols., 2011). Sobre su potencial terapéutico, se ha investigado su uso en patologías como enfermedad de Crohn (González y cols., 2009), tolerancia al trasplante (Wan y cols., 2008), encefalomiелitis (Constantin y cols., 2009), artritis reumatoide (Gonzalez-Rey y cols., 2010), daño hepático (Aurich y cols., 2009), retinopatía (Vossmerbaeumer y cols., 2009) y daño renal (Li y cols., 2009). También han sido utilizadas en terapia génica para el tratamiento del cáncer (Josiah y cols., 2010 – Grisendi y cols., 2010 – Zolocheska y cols., 2011).

1.2.1) *Uso de hASC aplicado a T1DM.*

El uso de hASC en terapia celular ha sido ampliamente descrito, y ya han surgido trabajos orientados a su uso en T1DM, los que están enfocados principalmente en la diferenciación

hacia células secretoras de insulina (IPCs). Por otro lado, se ha reportado sólo un protocolo para inducir diferenciación hacia células productoras de glucagón (GPC).

a) Desarrollo de IPCs (“insulin-producing cells”).

Diversos protocolos de diferenciación han sido reportados hasta la fecha para generar IPCs desde hASC. Sin embargo, uno de los criterios para preferir la utilización de uno u otro protocolo radica en el análisis de la funcionalidad de las IPCs obtenidas. Esto se realiza analizando la capacidad de las células de responder frente a diferentes concentraciones de glucosa, ensayo denominado desafío o tolerancia a glucosa. Además, puede realizarse el análisis *in vivo* en un modelo animal de T1DM, ya sea inducida de forma farmacológica con tratamiento con estreptozotocina (STZ), o bien usando un modelo genético de la enfermedad, como la cepa de ratones NOD, que desarrollan espontáneamente la patología.

Por un lado, el grupo de Bhandari demostró expresión de marcadores pancreáticos como los factores de transcripción: gen homeocaja pancreático y duodenal 1 (Pdx-1), proteína enhancer del gen insulina 1 (Isl-1) y neurogenina 3 (Ngn3). También reportaron expresión de Ins, pero en condiciones de alta glucosa la secreción de Ins por estas células disminuye (Bhandari y cols., 2011). Mientras tanto, el grupo de Mohamad, además de corroborar expresión de marcadores endocrinos pancreáticos, obtuvieron aumento en la secreción de insulina en condición de alta glucosa (Mohamad y col., 2012). Este mismo protocolo de diferenciación fue utilizado previamente por el grupo de Kang (Kang y cols., 2009) usando células de tejido adiposo del párpado (HEACs), obteniendo funcionalidad en modelo *in vivo* de T1DM animal.

En humanos, el grupo de Trivedi, mostró el efecto del cotrasplante mediante infusión intraportal de IPCs derivadas de hASC con células madre hematopoiéticas en 5 pacientes insulino-dependientes. Todos los pacientes fueron trasplantados exitosamente sin efectos adversos y luego de 23 meses, los pacientes mostraron disminución entre 30-50% en los requerimientos de insulina exógena, además de aumentar entre 4-26 veces los niveles de péptido-C (Vanikar y cols., 2010). Este es el primer estudio que demuestra la seguridad y eficacia de la utilización de IPCs en humanos para tratar T1DM. Sin embargo, no se ha logrado restaurar los niveles normales de glicemia, lo que puede deberse entre otros factores a la falta de interacción paracrina existente entre células α y células β comentada

anteriormente, a factores derivadas del microentorno en el sitio del trasplante o a la masa de tejido trasplantado. (Dave y cols., 2015)

En este trabajo, nos propusimos inducir la diferenciación desde hASC hacia IPCs basándonos en el protocolo de diferenciación utilizado por los grupos de Mohamad y Kang, caracterizado por dos etapas. La 1^o semana se realiza en condición de alta glucosa. Entre la 2^o y 3^o semanas se realiza cultivo en condición de baja glucosa, ambas condiciones con suplemento de las moléculas nicotinamida, activina A y exendina-4 (análogo de “glucagón like-receptor” o GLP-1).

b) Desarrollo de GPCs (“glucagon-producing cells”).

En comparación a los estudios realizados para diferenciar células hacia IPCs, poco se ha estudiado la diferenciación hacia células α del islote, y poca importancia se le ha dado a la interacción paracrina que existe a nivel intraislote entre los distintos tipos celulares que lo componen. No existen por lo tanto, reportes que utilicen hASC como fuente celular para diferenciación hacia GPC. A este respecto, sólo el grupo de Reznia y cols., 2011 reportaron la exitosa diferenciación hacia GPCs funcionales a partir de ESC. El protocolo de este grupo se desarrolla en 6 etapas, de forma de ir dirigiendo la diferenciación secuencialmente. Para esto, en las primeras 3 etapas se estimula la expresión de Pdx1, posteriormente Ngn3 y finalmente se estimula la expresión de “Aristaless related homobox” or Arx por sobre la expresión de Pax4 (Reznia y cols., 2011) para comprometer el linaje hacia célula α . Este protocolo fue utilizado como base en este trabajo para estudiar la diferenciación desde hASC a GPCs.

Para comprender mejor los mecanismos que están involucrados en la generación de células productoras de hormonas es que a continuación exponemos de forma más específica la biología del desarrollo del islote pancreático, el mecanismo de secreción hormonal y cómo afecta la regulación paracrina el mejor control glicémico.

1.3) Células α y β pancreáticas: biología del desarrollo, secreción hormonal y regulación paracrina.

1.3.1) Biología del Desarrollo de células α y β .

Para comprender los procesos de diferenciación implicados en la generación de las células endocrinas pancreáticas α y β , es necesario conocer cómo ocurre este proceso a nivel de biología del desarrollo. En términos generales, el proceso de diferenciación en el desarrollo del islote pancreático comienza con un precursor primordial que expresa Pdx1 y que es común para todas las células que conforman el páncreas (Jonsson y cols., 1994). El programa de diferenciación endocrina se inicia a través de la expresión del factor de transcripción, Ngn3 de la familia Neuro D, donde células que expresan altamente Ngn3 generan todas las células pancreáticas endocrinas, por lo tanto, Ngn3 es considerado un marcador de células progenitoras de células endocrinas del islote (Johansson y cols., 2007). Existen estudios que reportan que el tipo de célula endocrina que se genere posteriormente está determinado principalmente por el balance de los factores Arx y gen de caja pareja 4 (Pdx4). La expresión de Arx, es detectada a través del desarrollo pancreático en células Ngn3+, considerándose crucial en el desarrollo de células α y células PP (Collombat y cols., 2003 – Collombat y cols., 2007); mientras que el factor Pdx4, favorece el desarrollo de células β y δ (Collombat y cols., 2003). Posteriormente, se activan factores de transcripción tardíos, específicos para los diferentes linajes; como el factor Isl1 que se expresa en todas las células del islote favoreciendo su correcta conformación (St-Onge y cols., 1997 – Ahlgren y cols., 1997). Pdx1 juega un rol en el mantenimiento de fenotipo diferenciado y en la regulación de productor génicos específicos de células β , como la proteína homólogo de oncogén de fibrosarcoma musculoponeurótico V-maf (MafA) restringida sólo a células que expresan insulina (Zhao y cols., 2005), entre otros.

1.3.2) Secreción de Insulina.

La secreción de insulina inducida por glucosa es el principal mecanismo por el cual se secreta insulina (figura 1). La glucosa, ingresa a la célula β a través de transportadores del tipo Glut (Glut 1 en humanos y Glut 2 en roedores) donde es rápidamente fosforilada

y metabolizada hacia piruvato, la acumulación de ATP intracelular, aumenta la relación ATP/ADP, lo que lleva al cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP y la ulterior depolarización de la membrana. Esto produce apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC), permitiendo el influjo de Ca^{2+} . Por tanto, se produce un aumento en la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$, lo que lleva a la fusión con la membrana plasmática de gránulos preformados que contienen insulina, un proceso dependiente de las proteínas tipo SNARE (Seino, 2012). En contraste a esta vía bien establecida, existen vías de amplificación neurohormonal como glucagón y acetilcolina (Henquin y cols., 2009), que involucran otras moléculas señalizadoras como AMP cíclico (cAMP), diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃).

La secreción de insulina es un proceso altamente dinámico, donde la glucosa induce secreción de insulina en un patrón bifásico, la primera fase ocurre rápidamente pero dura sólo unos pocos minutos, mientras que la segunda fase ocurre posteriormente y es sostenida. Se postula que existen dos tipos de pools de gránulos preformados en las células β , gránulos listos para ser liberados (liberados en la primera fase) y gránulos de reserva, que constituyen el 95% del total de gránulos (se liberan en la segunda fase) (Rorsman y cols., 2003).

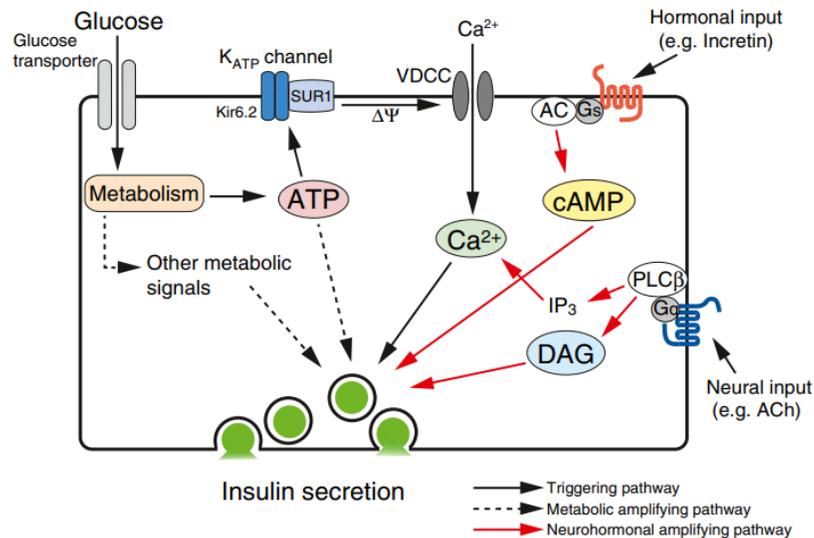


Figure 1: Mecanismo de secreción de Insulina por células β pancreáticas. Mecanismo clásico, dependiente de glucosa y mecanismos amplificadores dependientes de señales neurohormonales. Tomada de Seino, 2012.

1.3.3) Secreción de Glucagón.

En términos generales, el transportador de glucosa presente en las células α , se activa en condiciones de baja concentración de glucosa, lo cual lleva al cierre de los canales de K^+_{ATP} , lo que lleva a apertura de canales de Na^+ y Ca^{2+} promoviendo la fusión los gránulos preformados y la membrana plasmática con la subsecuente secreción de glucagón (Gylfe y cols., 2016), de manera similar a como ocurre la secreción de Ins.

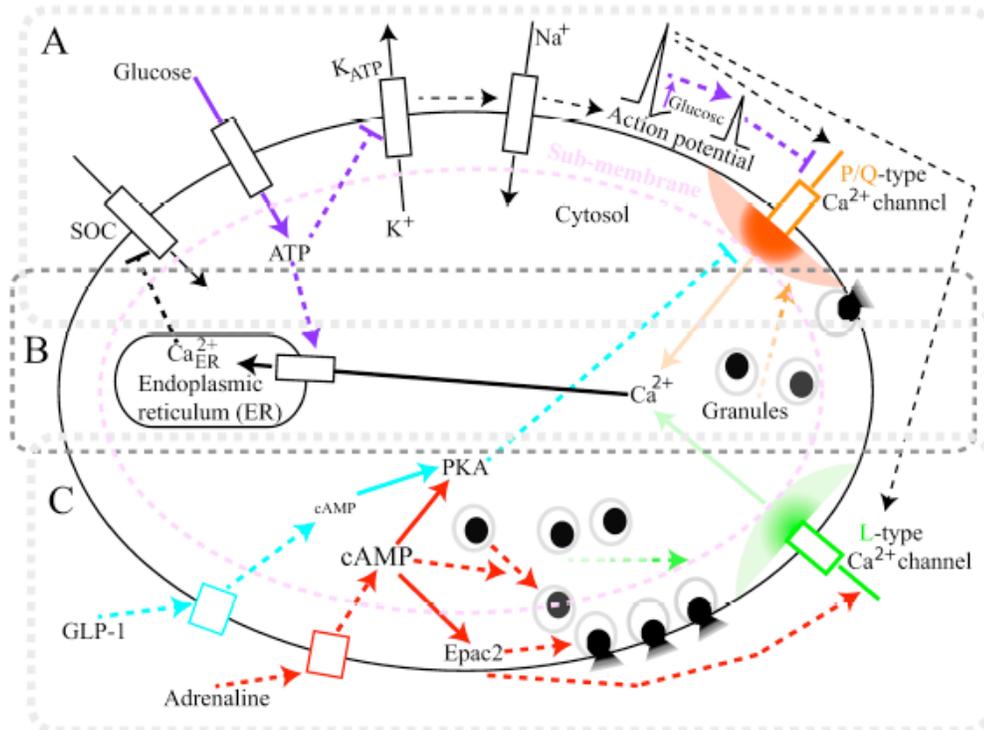


Figura 2: Mecanismo de secreción de glucagón en respuesta a a baja glicemia. A) canales iónicos determinan la actividad eléctrica de células α . B) canales iónicos involucrados en la exocitosis. C) inhibición en la secreción de glucagón por GLP-1 y adrenalina. Tomada de Pedersen y cols., 2016.

1.3.4) Regulación paracrina intraislote.

La comunicación entre las diferentes células del islote puede ocurrir mediante secreción de moléculas señalizadoras dentro de la microvasculatura del islote o en el espacio intersticial. La señalización gatillada a través de sus receptores en células blanco gatilla complejos loops regulatorios autocrinos y paracrinos (Arrojo e Digro y cols., 2015).

Dentro de estas moléculas, se encuentra acetilcolina, glutamato, ATP, y ácido γ -aminobutírico (GABA), ver figura 3.

La insulina, secretada en respuesta a hiperglicemia, actúa a nivel de su receptor en tejidos periféricos, pero también actúa a nivel intraislote, inhibiendo la secreción de glucagón en células α (Bansal y cols., 2008), ya sea reduciendo la sensibilidad de canales de K^+ ATP (Franklin y cols., 2005), lo cual regula la maquinaria de secreción de glucagón (Leung y cols., 2006); o bien modulando Akt, un efector río abajo de la proteína quinasa de 3 fosfatidilinosítidos (PI3K), reclutando al receptor GABA-A a la membrana que unido a su ligando GABA (co-secretado con Insulina), inhibe la secreción de glucagón por hiperpolarización de la membrana (Xu y cols., 2006). Finalmente, iones Zn^{2+} que se co-secretan con insulina, activan canales de K^+ ATP en células α , desensibilizándolos e inhibiendo la secreción de glucagón (Ravier y cols., 2005). Por lo tanto, la regulación normal de las células α requiere la presencia de células β juxtapuestas funcionando normalmente, ver figura 3.

Asimismo, se ha reportado que células α secretan acetilcolina cuando los niveles de glicemia son bajos, sensibilizando a células β a una posterior alza en la glicemia y regulando la secreción de SS en células δ . Por otro lado, glucagón causa aumento de cAMP lo que estimula a células β a secretar insulina inducida por glucosa en humanos (Huypens y cols., 2000), y además actúa de manera autocrina estimulando la expresión de glucagón (Leibiger y cols., 2012). Además, se ha reportado co-secreción de glutamato junto con glucagón en células α (Hayashi y cols., 2003), el cual actúa de manera autocrina generando un loop positivo de secreción de glucagón por depolarización de membrana a través de sus receptores AMPA (Arrojo e Drigo y cols., 2015).

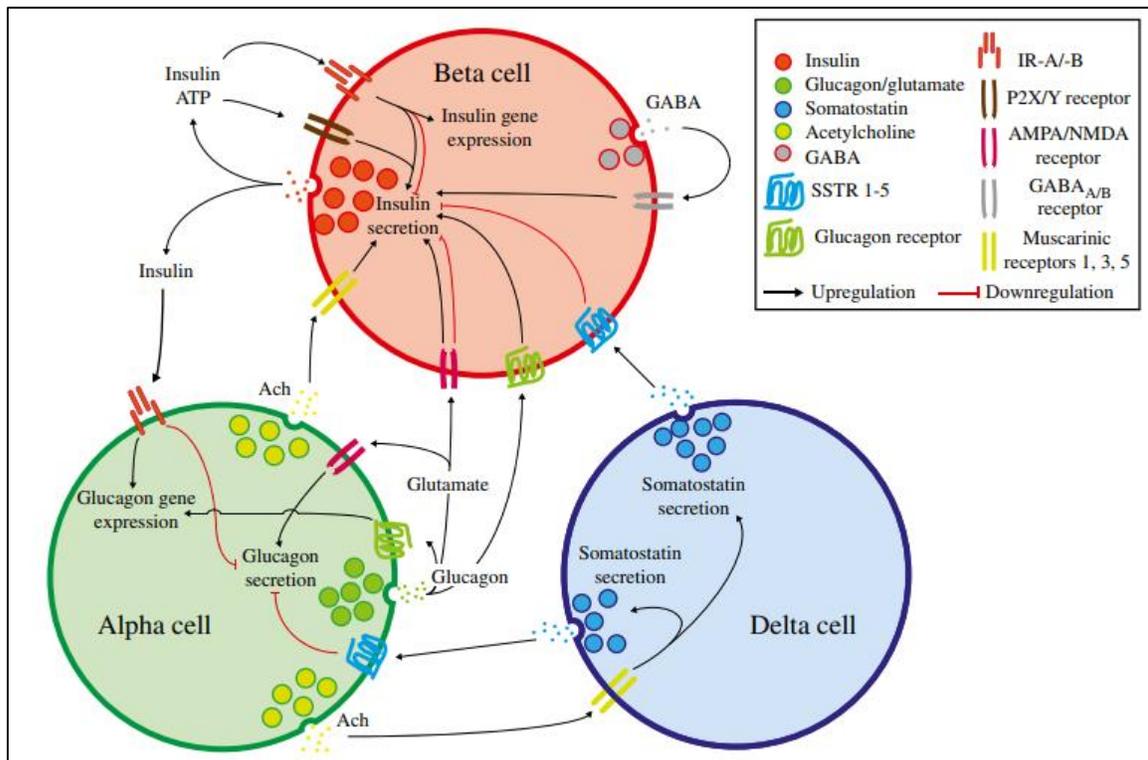


Figura 3: Imagen esquemática de la comunicación paracrina que ocurre a nivel intraislote entre células α , células β y células δ . Arrojo y Drigo y cols., 2015.

De esta forma, se puede comprender en parte, la importancia del microambiente a nivel intraislote que finalmente es el que comanda la regulación segundo a segundo de la glicemia, ya que aún hay mucho por dilucidar en esta compleja red de regulación endocrina.

Con el fin de restablecer tanto la función de las células β , como la interacción paracrina que existe entre al menos células α y β , es que postulamos la formación de un agregado celular compuesto por células IPC y GPC obtenidas por diferenciación desde hASC.

1.4) Formación de Agregado Celular.

En el Laboratorio de Terapia Celular (LTC), se ha patentado un protocolo que induce la formación de un agregado celular, bajo determinadas condiciones de cultivo. Se basa principalmente en el cultivo de las células en condiciones de suspensión o no adherencia

a sustrato y así facilitar la agregación entre ellas. Para ello, se realiza el cultivo en placa plástica microbiológica carente de carga, asociados con bajas o nulas concentraciones de Ca^{2+} en el medio al utilizar el medio MEM modificado por Joklik y una mínima cantidad de suero fetal bovino (SFB). En esta condición, las células crecen en suspensión y se agregan entre ellas, formando acúmulos que van aumentando su tamaño en el tiempo, debiendo ir monitoreando el tamaño y la funcionalidad para estandarizar el mejor tiempo de formación del agregado. Este protocolo se ha utilizado en diferentes líneas celulares, como células musculares, neuronales, fibroblastoides, epiteliales, etc (Caviedes y cols, 2008. Patent No US 7323333 B2), y puede por lo tanto aplicarse también a cultivos primarios de hASC y sus células diferenciadas para favorecer la interacción entre las células IPC y GPC obtenidas.

En resumen, hemos postulado por un lado, la utilización de hASC como alternativa de fuente celular destinada a diferenciarse hacia IPC o GPC. Y por otro lado, postulamos inducir la formación de un coagregado celular compuesto por IPC y GPC en condiciones de baja adherencia. Esperamos así obtener agregados semejantes a islotes pancreáticos (“islet-like clusters”) que reproduzcan la regulación crítica entre células α y β para asegurar su funcionalidad.

Finalmente, concluimos que era vital resolver el problema de la protección del injerto del sistema inmune hospedero evitando el uso de inmunosupresión. Como ya se mencionó, recientemente se ha desarrollado la encapsulación celular con el fin de otorgar inmunoprotección del tejido trasplantado favoreciendo la supervivencia del mismo sin afectar su funcionalidad.

1.5) Encapsulación.

La idea general de la encapsulación es cubrir la fuente celular (islote, células o tejido) con una membrana semipermeable de material inerte que permita el intercambio con el medio exterior de moléculas pequeñas o activos como insulina (insulina 6kDa), nutrientes como glucosa y factores de crecimiento, pero que impida la entrada de células inmunes ($7 \mu\text{m}$) o anticuerpos (Ig 150-900kDa), responsables de la respuesta inmune que finalmente

destruya el tejido injertado o produzca inflamación o fibrosis alrededor del injerto. La encapsulación puede ser clasificada en macroencapsulación o microencapsulación, de acuerdo al tamaño del encapsulado.

1.5.1) Macroencapsulación. Son sistemas de difusión relativamente grandes, que presentan paredes semipermeables, y que se pueden aplicar de forma intra o extravascular, ver figura 4. En los sistemas intravasculares, las células se siembran por la cara externa de capilares artificiales conectados al torrente sanguíneo, lo que implica el intercambio rápido de glucosa e insulina, pero que como complicación pueden generar trombosis, lo que no es aceptable en un paciente con diabetes. Por otro lado, en los dispositivos extravasculares, los islotes pancreáticos son envueltos dentro de un sistema de difusión semipermeable, implantados bajo la piel o en la cavidad peritoneal y sin vascularización directa, lo cual dificulta que las células trasplantadas puedan sentir y responder rápidamente frente a cambios en la glicemia. Además, en este tipo de trasplante se observa rápida necrosis del tejido trasplantado por un pobre acceso de nutrientes y oxígeno (Peredes-Juarez y cols., 2014).

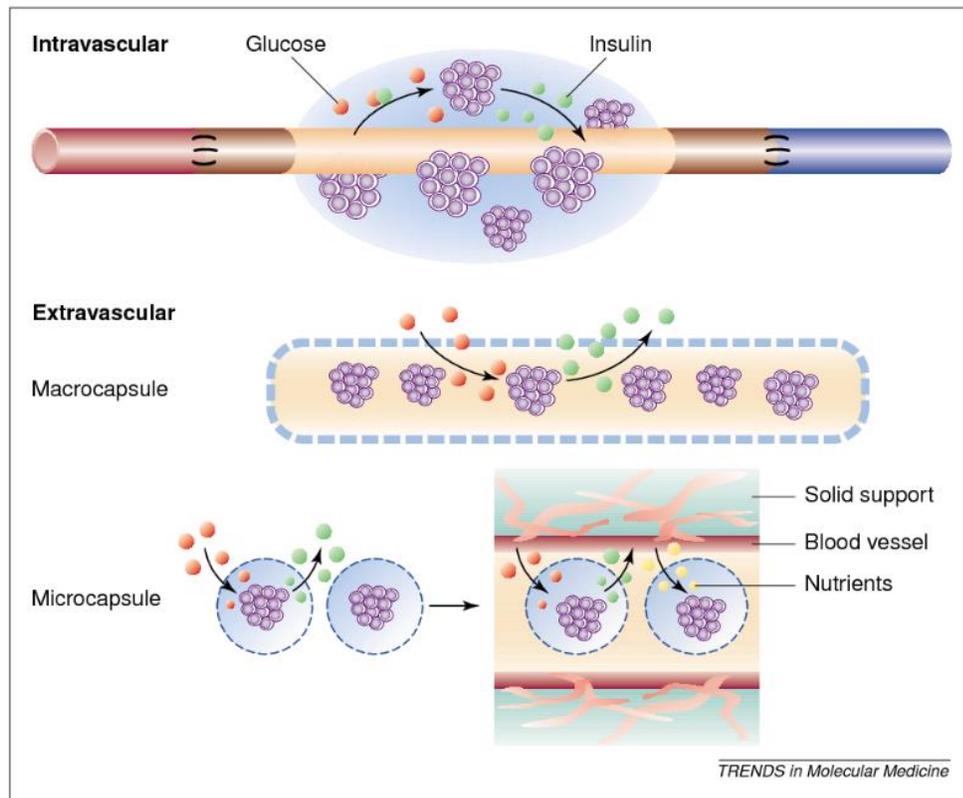


Figura 4. Representación de las distintas estrategias de encapsulación. Macroencapsulación intravascular, Macroencapsulación extravascular y Microencapsulación. de Voz y cols., 2002.

1.5.2) Microencapsulación. Corresponden a sistemas de difusión de tamaño micrométrico, entre 0,1 y 1000 μm de diámetro (ver figura 4). Permite empaquetar cada islote individualmente, ya que estos presentan un diámetro promedio de 100 μm . Además, estos sistemas presentan una relación superficie/volumen más óptima, lo que implica un rápido intercambio de oxígeno, glucosa, insulina y nutrientes. Finalmente, las microcápsulas pueden generarse de diferentes formas, tamaños, composición y permeabilidad (Basta y cols., 2011) (Paredes-Juarez y cols., 2014).

1.5.3) Biomateriales. Dentro de los biomateriales más usados para la formación de microcápsulas, el más estudiado, versátil y con un método de elaboración bien establecido es el alginato de sodio, un copolímero natural compuesto por ácidos β -D-manurónico (M) y α -L-glucorónico (G) (de Vos y cols., 2009), y que puede ser aislado de algas como *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*,

Laminaria japónica, Eclonia máxima, Lessonia nigrescens, Durvillea antártica y Sargassum spp. El alginato es fuertemente biocompatible cuando se encuentra altamente purificado (baja concentración de polifenoles, endotoxinas propias del alginato, metales pesados). El alginato se estabiliza con cationes divalentes pasando de líquido a gel, principalmente Ba^{2+} o Ca^{2+} , a concentraciones compatibles para su uso en humanos.

Durante las últimas décadas se ha investigado la posibilidad de trasplantar islotes encapsulados en distintos modelos animales (ratón, rata, y primates no humanos) realizando además estudios de fase clínica I en humanos.

1.5.4) Microencapsulación de islotes aplicado a T1DM.

Existen contados reportes sobre estudios clínicos con islotes microencapsulados. El grupo de Basta y cols. 2011, realizó un estudio clínico de fase I, consistente en alotrasplante de islotes microencapsulados en pacientes con T1DM de larga data, sin inmunosupresión, con un seguimiento de 5 años postrasplante. Estos investigadores no observaron reacción adversa alguna al implante quirúrgico, ni tampoco detectaron anticuerpos contra complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC-I), complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II) o anti-GAD65 (ácido glutámico descarboxilasa isoforma 65kDa) durante los 5 años de seguimiento. Por otro lado, lograron una disminución en los requerimientos diarios de insulina exógena, aunque sin llegar a suspenderla. En relación a la producción endógena de insulina, se detectaron niveles de péptido C en todos los casos (100-480 días de monitoreo).

Por otra parte, el grupo de Tuch y cols., 2009 realizó un estudio clínico fase I donde cuatro pacientes fueron trasplantados sin inmunosupresión con islotes microencapsulados en alginato/bario, logrando posteriormente disminuir los requerimientos de insulina exógena, pero no eliminarla. Sin embargo, los islotes microencapsulados fueron recuperados luego de 16 meses, encontrándose signos de necrosis y presencia de tejido fibroso rodeando la cápsula, atribuido posiblemente a contaminaciones presentes en el alginato utilizado.

Recientemente, la corporación “Living Cells Technologies” (LCT), reportó la sobrevida de hasta 10 años de islotes porcinos microencapsulados y trasplantados intraperitonealmente en pacientes diabéticos, sin inmunosupresión, demostrando que el

procedimiento era seguro a largo plazo, con preservación de viabilidad y función del tejido. En efecto, los pacientes lograron reducir considerablemente sus requerimientos de insulina exógena diaria (Elliott y cols. 2007 – Elliott y cols. 2011). Posteriormente, este grupo llevó a cabo un estudio de fase clínica I/IIa en Moscú, bajo el nombre comercial de DIABECCEL®, y otro en fase I/IIb en Nueva Zelanda y Argentina, donde confirmaron la seguridad del trasplante y la disminución de eventos hipoglicémicos en los pacientes trasplantados (Matsumoto y cols., 2016). Este producto se encuentra en este momento en estudio de fase clínica II en otros centros internacionales. A pesar de este gran avance, existen varios factores que deben ser considerados como el riesgo de infección de células humanas con Retrovirus endógeno porcino (PERV) (Güell y cols., 2017) (Lee y cols., 2008) (Kinsa y cols., 2013), un punto que permanece en discusión, ya que a pesar de detectar infección por PERV en células humanas *in vitro* (Valdes-González y cols., 2010) (Morozov y cols., 2017) (Matsumoto y cols., 2016), no se ha confirmado infección *in vivo* en pacientes trasplantados con islotes porcinos. Por otro lado, el estímulo de linfocitos B y T con insulina no humana, puede llevar a la producción de anticuerpos anti-insulina principalmente de clases IgG, e IgE lo que puede desencadenar resistencia a insulina o reacciones de hipersensibilidad a insulina respectivamente (Scherthaner y cols., 1993); en efecto, se reportó una disminución en el título de anticuerpos específicos para insulina de subclase IgG1, IgG3 e IgG4 en pacientes que inicialmente eran tratados con insulina porcina o bovina y luego con insulina recombinante humana (Kumar y cols., 1993), por lo que siempre es más favorable usar islotes humanos o insulina humana. En estudios previos de nuestro laboratorio en conjunto con el Hospital Clínico de la Universidad de Chile, se realizó un exitoso alotrasplante de tejido paratiroideo encapsulado en alginato estabilizado con Ba²⁺ fue reportado en un paciente que sufría una severa hipocalcemia debido a una resección paratiroide iatrogénica. En este caso, el tejido trasplantado mostró funcionalidad por al menos 20 meses con un discreto requerimiento suplemento de calcio oral (Cabané y cols., 2009) (Toledo y cols., 2017). En este sentido, se ha reportado que la encapsulación de islotes en alginato estabilizado con Ba²⁺, preserva la función del islote *in vitro* con similar regulación en la secreción de insulina que islotes no encapsulados (Paredes Juárez y cols., 2014). Además, Safley y cols., demostraron biocompatibilidad *in vivo* de microgeles de alginato estabilizados con Ba²⁺ (Safley y cols., 2008), y otros estudios *in vivo* han demostrado que microgeles de alginato estabilizado

con Ba^{2+} proveen inmunoprotección a largo plazo en modelos animales (Schneider y cols., 2005) (Omer y cols., 2005) (Qi y cols., 2008).

Por lo tanto, como último objetivo, se planteó microencapsular los agregados celulares compuestos por IPC/GPC diferenciadas a partir de hASC evaluando parámetros de diferenciación y de funcionalidad.

Para poder obtener las microcápsulas, contamos con la colaboración del Dr. Felipe Oyarzún, quien en el laboratorio de “Drug Delivery”, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad, cuenta con el equipo “Encapsulator B-395 Pro” (Büchi, Switzerland), que permite obtener geles esféricos de tamaños entre $\sim 150\mu m$ a 1mm de diámetro de forma controlada, en condiciones estériles, de manera reproducible y a gran escala. Debido a ello, decidimos colaborar con este grupo y así obtener las microcápsulas bajo los mejores estándares.

En base a los antecedentes anteriormente expuestos, se postula la siguiente hipótesis:

Hipótesis: “Se pueden obtener células IPC y GPC diferenciadas a partir de hASC bajo protocolos de diferenciación, las que son capaces de formar un agregado celular que, una vez microencapsulado, es capaz de responder con secreción hormonal frente a condiciones de alta y baja concentración de glucosa *in vitro*”.

Objetivo general: “Generar un agregado celular microencapsulado, a partir de IPCs y GPCs desde hASC, que responda frente a las diferentes condiciones de glucosa *in vitro*”.

Objetivos específicos:

Diferenciación:

- 1) Purificar y caracterizar hASC como una población de células MSC de acuerdo a lo establecido por la ISCT.
- 2) Diferenciar *in vitro* a partir de hASC, IPCs y GPCs independientemente bajo protocolos reportados por los grupos de Kang (2009) – Mohamad, (2012) y Rezania (2011) respectivamente con leves modificaciones.
- 3) Analizar la expresión de marcadores específicos de células endocrinas pancreáticas en células diferenciadas y control.
- 4) Determinar la funcionalidad de las IPCs y GPCs.
- 5) Formación, caracterización y funcionalidad del agregado IPC/GPC.

Microencapsulación:

- 6) Estandarizar las condiciones de formación de microgeles de alginato estabilizados con Bario y Calcio, evaluando eficiencia de encapsulación, tamaño, forma y permeabilidad de los microgeles. Para ello, se encapsularon proteínas de tamaño conocido: albúmina de suero bovino (BSA) y proteína A Staphylococcal (SpA).
- 7) Generación y caracterización funcional de agregado celular IPC/GPC microencapsulado.

2) Estrategia experimental.

2.1) Obtención hASC. Este estudio fue aprobado por el Comité de ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Se utilizaron entre 50 y 80mL de tejido lipoaspirado proveniente de donantes sanos sin antecedentes mórbidos de entre 20 y 50 años, previa autorización mediante consentimiento informado. El procedimiento quirúrgico se llevó a cabo en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile. El tejido lipoaspirado fue lavado con buffer fosfato salino (PBS) 1X y posteriormente incubado con colagenasa tipo I (Worthington, NJ, USA. cat. LS004196) 0,2% p/v por 1h a 37°C en agitación. La digestión fue inhibida por adición de medio completo (DMEM-F12 (Gibco™, Dublin, Irlanda. Cat. 12500062) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB)), centrifugando la muestra a 1500rpm por 20min. El pellet de células fue lavado con PBS y plaqueado con medio completo en condiciones de cultivo celular (37°C y 5.0% CO₂). Luego de 48h, se conservaron las células adheridas a las placas, las que corresponden a la fracción vascular estromal (FVE) que contiene células madre derivadas de tejido adiposo (hASC).

2.2) **Caracterización de hASC.**

2.2.1) *Análisis marcadores de superficie:* Células cultivadas según 2.1, con una confluencia del 60-80%, fueron caracterizadas mediante citometría de flujo en un equipo Coulter Epics (Universidad del Desarrollo, Colaboración Dr. Flavio Carrión) usando el programa FCS Express 4, analizando el perfil de marcadores descrito por la ISCT donde una población de MSC presenta expresión de marcadores CD90, CD73, CD105, CD44, y CD29 mientras que pierde expresión de CD45, CD34, CD19 y HLA-DR (Dominici y cols., 2006) (Bourin y cols., 2013). Los anticuerpos usados fueron: IgG1k-FITC (Invitrogen, cod. MG101), IgG1k-PE (Invitrogen, cod. MG104), CD90-FITC (BD, cod. 555595), CD105-PE (BD, cod. 560839), CD45-FITC (Beckman C, cod. IM078211), CD34-PE (Beckman C, cod. IM1871U), CD44-FITC (BD, cod. 347943), CD73-PE (BD, cod. 550257), CD19-FITC (Invitrogen, cod. MHCD1901), CD29-PE (BD, cod. CD2904), IgG1k-AF488 (Invitrogen, cod. MG120), IgG2bk-PE (Invitrogen, cod. MG2B04), CD11b-AF488 (BD, cod. 557701), HLADR-PE (Invitrogen, cod. MHLDR04).

2.2.2) *Análisis de potencial de tridiferenciación.* Se evaluó el potencial de tri-diferenciación hacia linajes: adipogénico, condrogénico y osteogénico definido para células MSC de acuerdo a lo establecido por la ISCT (Dominici y cols, 2006) (Bourin y cols., 2013). Se usaron kits de diferenciación comerciales (StemPro, Gibco) bajo las instrucciones del fabricante, confirmando luego de 21 días, la diferenciación adipogénica (cat. A10070-01) mediante tinción con Oil Red, la diferenciación condrogénica (cat. A10071-01) mediante tinción con Alcian Blue y la diferenciación osteogénica (cat. A10072-01) mediante tinción de Von Kossa, visualizadas bajo microscopía óptica.

a) Tinción Oil Red. Preparar solución stock de oil red (Sigma-Aldrich), 0,5g en isopropanol 100%. Las células se fijaron con PFA 4% por 10min a temperatura ambiente. Luego se lavó con PBS 1X por 3 veces. Aparte se preparó oil red diluido en proporción 6: 4 con dH₂O, incubar 15 min y filtrar por filtro 0,22 µm. Se incubó 15 min la solución diluída de oil red con las células fijadas, luego se lavó con PBS y último lavado en agua. Se observó por microscopía de campo claro.

b) Tinción Von Kossa. Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4% por 10min, y se lavaron con PBS 1X. Luego se incubó con solución de nitrato de plata (Sigma-Aldrich) 5% y se incubó por 30 min bajo luz UV. Luego se lavó con PBS 1X por 3 veces, para incubar con tiosulfato de sodio 5% por 5 min. Las células finalmente se lavaron con PBS y se visualizaron bajo microscopía.

c) Tinción Alcian Blue. Las células se fijaron con PFA 4% por 10 min, y se lavaron con PBS 1X. Luego se incubó con solución alcian blue 1% pH 2.5 por 30min y se lavó con PBS 1X. Finalmente se visualizó la tinción por microscopía.

2.3) **Diferenciación *in vitro* hacia IPC a partir de hASC.** La diferenciación se realizó de acuerdo al protocolo reportado por los grupos Kang y cols. 2009, y Mohamad y cols. 2012 agregando una leve modificación, figura 5A. Dicho protocolo se basó en un estímulo dividido en dos etapas: en la primera etapa, se usó DMEM 25mM glucosa (Gibco™, Grand Island, NY, USA. Cat. 12100046) por 7 días; seguido de una segunda etapa donde se usó DMEM 5,5mM glucosa (Gibco™, Cat. 31600034) por 14 días. Ambos medios fueron suplementados con Activina A 2nM (Prospecbio, CA, USA. Cat. CYT-145), Nicotinamida 10mM (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Catalog number N0636) y GLP1 10nM (Prospecbio, CA, USA. Cat. HOR-284). Nuestra

única modificación es que, para todo el protocolo de diferenciación, el medio contenía SFB 2% (figura 5) y no 10% como usaron los autores (Jara y cols., 2020).

2.4) Diferenciación *in vitro* hacia GPC a partir de hASC. La diferenciación hacia GPC, se realizó basado en el protocolo reportado por Rezania y cols., 2011 con una modificación. El protocolo se basó en 6 etapas, figura 5B:

Etapas 1, se incubó por 3 a 4 días con medio RPMI 1640 (Gibco™. Cat. 31800), BSA 2% (Sigma-Aldrich, cat. A9418), activina A 100ng/mL (Prospecbio), Wnt3a 20ng/mL (Sigma-Aldrich. Cat. H17001), factor de crecimiento fibroblastos (FGF2) 8ng/mL (Prospecbio. Cat. CYT-085).

Estado 2, se incubó por 2 días con medio DMEM-F12 suplementado con BSA 2%, FGF7 50ng/mL (Prospecbio. Cat. CYT-303), Ciclopamina-KAAD 0,25µM (SCBT, Dallas, Tx, USA. Cat. sc-200929).

Estado 3, se incubó por 4 días con medio DMEM-F12 suplementado con Ciclopamina-KAAD 0,25µM, ácido retinoico (RA) 2µM (Sigma-Aldrich. Cat. R2625), FGF7 50ng/mL (Prospecbio), Nogina 100ng/mL (Prospecbio. Cat. CYT-475).

Estado 4, se incubó por 3 días con medio DMEM F12 suplementado con Inhibidor II de quinasa 5 del receptor tipo I para TGFb (ALK5) 1µM (SCBT. Cat. sc-221234), Nogina 100ng/mL, DAPT 1µM (SCBT. Cat. sc-201315).

Estado 5, se incubó por 7 días con medio DMEM F12 suplementado con Inhibidor II ALK5 1µM.

Estado 6: se incubó por 7 días con medio DMEM F12.

La modificación al protocolo es uso de SFB 2% (figura 1B) en los estados 3 al 6, a diferencia del protocolo reportado por Rezania donde usaron B27 1% (Jara y cols., 2020).

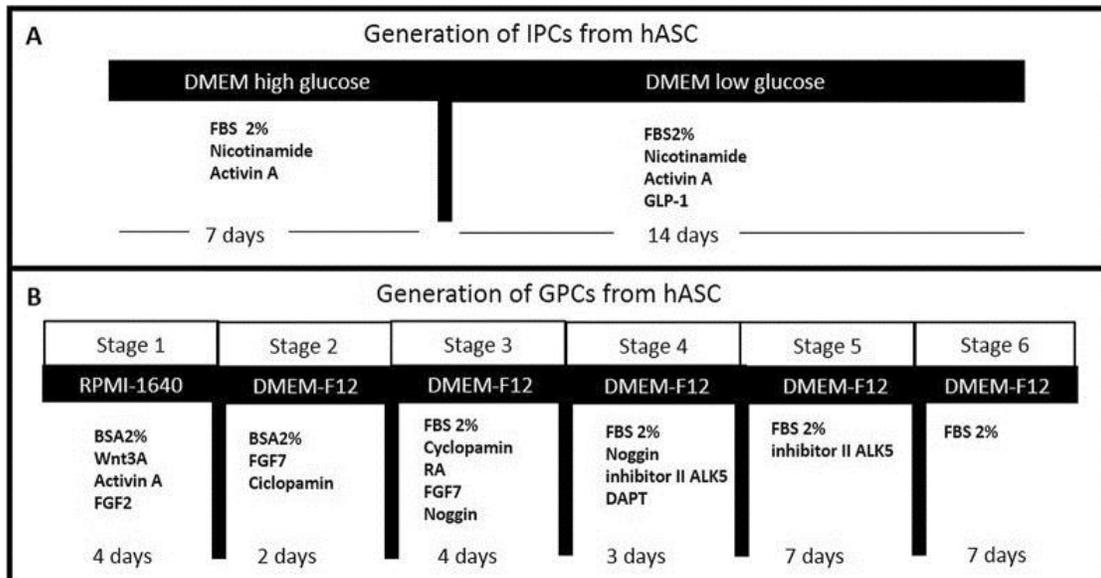


Figura 5: Esquema del protocolo de diferenciación para IPC y GPC a partir de hASC *in vitro*. A) Protocolo de diferenciación hacia IPC, B) Protocolo de diferenciación hacia GPC. Jara y cols., 2020.

2.5) Formación de agregado celular compuesto de IPC y GPC. Una vez obtenidas las células diferenciadas independientemente, se indujo la formación del agregado celular compuesto por IPC y GPC en condiciones de baja adherencia a sustrato de acuerdo a la patente No US 7323333 B2 (Caviedes y cols., 2008). En detalle, se cultivaron células IPC y GPC en proporción 4:1, usando 10^5 células totales, bajo condiciones de baja adherencia. Este protocolo combina 1) uso de placa bacteriológica, 2) cultivo en medio MEM modificado por Joklik (bajo contenido de Ca^{2+} y Mg^{2+}) (Sigma-Aldrich. Cat. M0518) y 3) baja concentración de SFB 5%. Se visualizó la formación de los agregados en el tiempo mediante microscopía óptica, determinando el volumen de los agregados mediante el programa ImageJ.

Se determinó 72h de formación como el tiempo donde se concentra una mayor cantidad de agregados celulares con el tamaño de interés filtrándolos por mallas de 40 y $120\mu m$ previo a la microencapsulación. Finalmente, se obtuvo el diámetro de Feret mediante el programa ImageJ, el cual se define como la distancia de dos tangentes al contorno de la partícula en una orientación bien definida, usado para el cálculo del diámetro considerando dos ejes.

2.6) Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

2.6.1) *Inmunofluorescencia de células adherentes.* Se analizó tanto en células diferenciadas como en células indiferenciadas o control, la expresión de marcadores pancreáticos endocrinos (Pdx1, Ngn3, Ins y Gcg). Además, se analizó expresión de la glicoproteína CD44 y Vimentina (Vim) como marcador de citoesqueleto.

Las células se sembraron en cubreobjetos redondos estériles de 18mm de diámetro, luego del protocolo de diferenciación según corresponda (IPC o GPC) las células se fijaron con PFA 4% (Sigma-Aldrich. Cat. 158127) por 10 min y se lavaron 3 veces con PBS 1X, posteriormente se permeabilizaron con Tritón X-100 0.1% (Sigma-Aldrich. Cat. T8787) en PBS 1X por 10 min y se lavaron 3 veces. A continuación, se bloqueó con BSA 2% en PBS 1X durante 90 min a T ambiente y se incubó O.N. a 4°C con anticuerpo primario (Ab 1°) según corresponda (tabla 1), para posteriormente lavar 3 veces e incubar con anticuerpo secundario (Ab 2°) según corresponda (tabla 1) durante 90 min a T ambiente. Luego de lavar, se incubó por 15min a T ambiente con solución Hoechst dilución 1:500 (Millipore, Massachusetts, USA) y se lavó 3 veces para posteriormente montar el cubreobjeto en el portaobjeto con medio de montaje para fluorescencia DAKO (Agilent, CA, USA. Cat. S302380), dejar secar a temperatura ambiente y guardar a 4°C en oscuridad. Analizar las muestras mediante microscopía confocal LSM 700 (Carl Zeiss).

Proteína	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
CD44	Ms anti-C44, abcam ab6124 lot. 93098	Dnk anti Mouse, abcam ab96875 lot. R113082-8
PDX1	Goat anti-PDX1, abcam, lot. GR201765-1	Dnk anti Goat, abcam ab96933 lot. GR76558-1
NGN3	Rb anti-NGN3, abcam ab38548 lot. GR13669	Dnk anti Rb, abcam ab96919 GR145574-5
INS	GPig anti-Ins, abcam ab7842 lot. GR67894-2	Dnk anti-GPig, abcam ab150185 lot. R148257-1
GCG	Mouse anti-Gcg, abcam ab 10988 lot.R86942-4	Goat anti Mouse, abcam ab6787 lot. GR24647-5
VIM	Goat anti-Vim, Sigma- Aldrich V-4630 lot. 58F4828	Dnk anti-goat, abcam ab96931 lot. GR74509-2

Tabla 1: Anticuerpos utilizados para detectar expresión de proteínas características de hASC e IPC o GPC mediante IFI.

2.6.2) *Inmunofluorescencia de agregados celulares.* Se analizó la expresión de marcadores endocrino pancreáticos (Pdx1, Ngn3, Ins, Gcg) en los agregados celulares IPC/GPC formados a las 72h. Los agregados fueron lavados y fijados con PFA 4% durante 1 h.

Luego se agregó 300µL de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (Sigma-Aldrich, cat. A9414) en PBS 1X (50°C). Para obtener el block celular, la mezcla agarosa-agregados se centrifugó a 1500 rpm por 5 min y se guardó el block a 4°C por 1 h para su completa solidificación. Luego se realizaron cortes por congelación de 6µm de espesor, a los que se realizó IFI tal como se describió anteriormente para el análisis en células adherentes. Los cortes se analizaron bajo microscopía confocal LSM 700 (Carl Zeiss).

- 2.7) Estimulación con Glucosa.** Para evaluar la liberación de insulina o glucagón en respuesta a glucosa desde células hASC, IPC o GPC, las células fueron incubadas con 2 concentraciones de glucosa (2 mM y 25 mM) en buffer Krebs Ringer (BKR) (120mM NaCl, 5mM KCl, 2,5mM CaCl₂, 1,1mM MgCl₂, 25mM NaHCO₃, 10mM HEPES, 0.1% BSA). Inicialmente las células fueron incubadas con BKR sin glucosa por 2h para lavar las células, luego se incubó independientemente con diferentes concentraciones de glucosa por 4h a 37°C. El nivel de hormonas secretadas al medio fue cuantificado mediante kit ELISA anti-insulin (Merckodia, Uppsala, Sweden. Cat. 10-1132-01) o anti-glucagón (Cusabio, Houston, TX, USA. Catalog number CSB-E09207h) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes.
- 2.8) Microencapsulación.** El proceso se realizó de forma automatizada con el equipo “*Microencapsulator B395 Pro*” (Büchi-Suiza). El proceso general de encapsulación, se explica en la figura 6B y se realizó bajo los parámetros publicados anteriormente (Hassan y cols., 2014). Para estandarizar las condiciones de encapsulación en este equipo, se procedió a encapsular proteínas de tamaño conocido como BSA que pesa 66kDa y la proteína *Staphylococcal protein A* o SpA que pesa 40kDa.

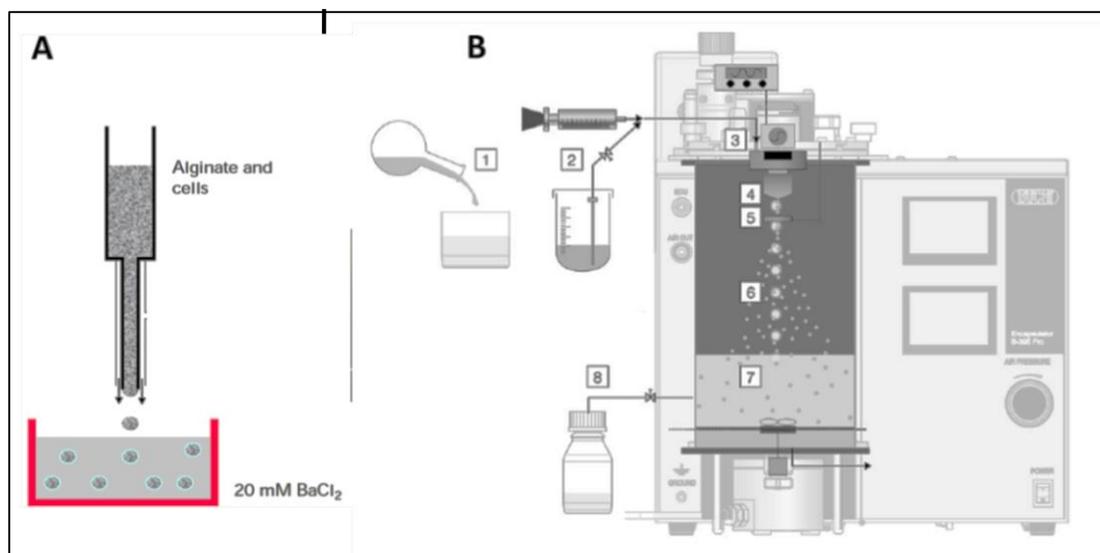


Figure 6: Representación del proceso de encapsulación. A) Descripción de una encapsulación convencional por “goteo”. B) Descripción del proceso de encapsulación utilizando equipamiento automatizado (Encapsulador B-395-Pro). B1) Se mezcla el ingrediente activo y el polímero, B2) La mezcla se carga en una jeringa o un sistema de presión. B3) Se inyecta la muestra y se ajusta el flujo de forma de obtener una expulsión adecuada de la mezcla. B4) Se ajusta la frecuencia de vibración del dispositivo para producir gotas individuales. B5) Se aplica un campo eléctrico para producir repulsión entre las gotas formadas y prevenir su coalescencia. B6) Se evidencia las características de las gotas mediante una luz estroboscópica. B7) Gelificación (reticulación) de las gotas que contienen las estructuras de interés al entrar en contacto con la solución gelificante. B8) Recolección de los microgeles.

2.8.1) *Microencapsulación de proteínas BSA y SpA.* Se preparó alginato de sodio (1,5 y 2% PM medio) (Sigma- Aldrich. Cat. A2033) disuelto en NaCl 0.9%. A continuación, se disolvió la proteína BSA o SpA 1mg/mL en la solución de alginato. Como solución estabilizadora o gelificante, se usó BaCl₂ 20 mM (115mM NaCl, 50mM histidina pH 7.0) (Cabané y cols. 2009) y CaCl₂ 40mM (85mM NaCl, 10mM HEPES, pH 7,0). La solución de alginato-proteína fue inyectada a través de una jeringa de 5mL en el equipo Microencapsulador B-395 Pro y se extruyó a través de una boquilla (*nozzle*) con un lúmen de 150 μ m, flujo de 32mL/min, frecuencia de 3000Hz y carga electrostática de 1000V. Bajo las condiciones descritas, se aspersó la mezcla sobre la solución gelificante bajo agitación constante durante 30 seg. Una vez formados, los microgeles fueron

lavados con NaCl 0.9% e incubados en condiciones fisiológicas (BKR, 37°C, 5.0% CO₂) para los análisis posteriores.

- a) Tamaño de microgeles. Se analizó la apariencia y el tamaño de los microgeles mediante microscopía óptica usando el programa ImageJ.
- b) Liberación de BSA o SpA al medio. Los microgeles fueron incubados en agitación en 5mL de BKR, tomando muestras del sobrenadante a los tiempos 0, 5, 10, 15 y 20 min. Se cuantificó la cantidad de proteína liberada al medio utilizando el reactivo de Bradford (595nm), usando como curva de calibración de BSA: 0- 0,02- 0,04- 0,06- 0,08- 0,1- 0,2mg/mL, determinando así la eficiencia de encapsulación (EE) de cada proteína encapsulada y el % de liberación de BSA o SpA al medio.

2.8.2) *Microencapsulación de agregado celular*. Los agregados celulares formados durante 72h fueron filtrados a través de tamices de 40 y 120µm, concentrándolos en este rango de tamaño, y luego fueron microencapsulados en alginato de sodio 1,5% estabilizado con una solución de CaCl₂ o BaCl₂.

De forma similar a la encapsulación de proteínas, se mezclaron los agregados celulares a razón de 2×10^4 agregados/mL de alginato de sodio al 1,5%. Se usó el equipo mencionado anteriormente con nozzle de 150µm, aspersando sobre una solución de BaCl₂ o CaCl₂ según corresponda durante 30 segundos bajo los mismos parámetros usados en encapsulación de proteínas. Los microgeles fueron posteriormente lavados con NaCl 0.9% e incubados en condiciones de cultivo celular en medio completo DMEM/F12 suplementado con SFB 10%.

Se analizó el tamaño de los microgeles a diferentes tiempos de formación (0, 24, 48, 72h y 7 días). Además, se cuantificó la liberación de Insulina desde los microgeles que contienen agregados celulares mediante ELISA.

2.9) **Análisis estadístico**. Para los ensayos de formación de agregado celular y encapsulación de proteínas BSA o SpA, se usó test ANOVA de una cola seguido de Student's *t* test. Para ensayos de liberación hormonal se usó Student's *t* test. La diferencia se consideró estadísticamente significativa cuando p-value <0.05.

3) **Resultados.**

3.1) ***Purificar y caracterizar hASC como una población de células MSC de acuerdo a lo establecido por la ISCT.***

Una vez se digerido con colagenasa el tejido adiposo, se obtiene la FVE de todas las muestras. Las FVE contiene células epiteliales, sanguíneas, leucocitos y células mesenquimales mayoritariamente. Las células que permanecen adheridas en condiciones de cultivo celular corresponden a células mesenquimales, las que fueron cultivadas en medio completo en condiciones de cultivo celular. Las células fueron expandidas y trabajadas entre los subcultivos 2 al 6. Para definir la población celular obtenida como una población de células MSC, debemos validarlas de acuerdo a los criterios mínimos establecidos por la ISCT (Dominici y cols., 2006) (Bourin y cols., 2013). Las células resultaron ser adherentes a matriz en condiciones de cultivo celular, y desde los primeros subcultivos o pasajes celulares se observó mediante microscopía óptica la apariencia celular, encontrando en todas las muestras utilizadas una morfología tipo fibroblastoide característica de una población mesenquimal, (figura 7).

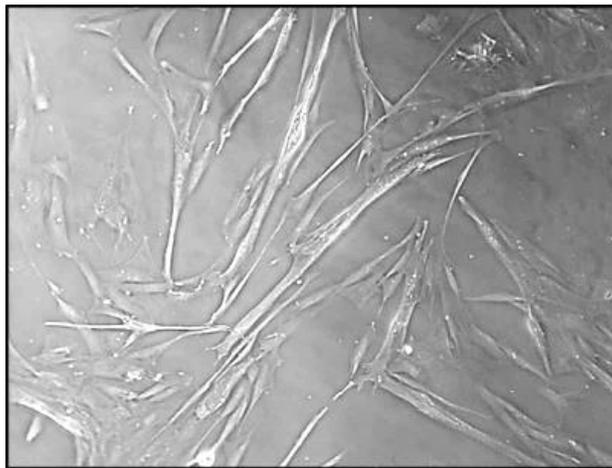


Figura 7. Visualización en microscopio óptico de hASC en condiciones de cultivo celular. Cultivo primario de hASC2 sc4, cultivadas en medio de mantención. Aumento de 40X en microscopio óptico. La imagen es representativa del total de las muestras utilizadas

Posteriormente, al analizar los marcadores de superficie característicos para MSC establecidos por la ISCT mediante citometría de flujo (figura 8, tabla 2), se puede

observar que todas las muestras utilizadas en el estudio expresan marcadores CD90, CD105, CD44, CD73 y CD29, mientras que carecen de expresión de marcadores CD45, CD34, CD19 y HLA-DR.

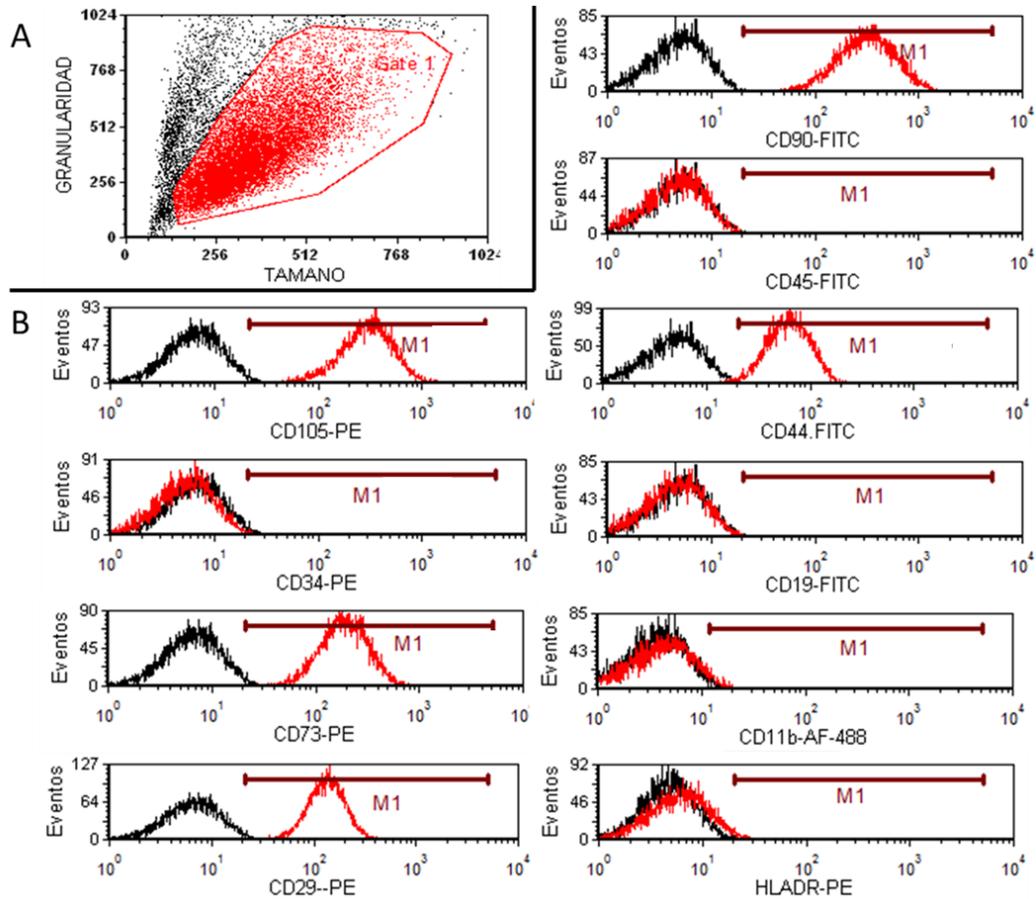


Figura 8. Análisis de expresión de marcadores mesenquimales en muestras de hASC. Citometría de flujo representativa del total de muestras analizadas. A) Gráfica de Dot Blot, donde se muestra la población de células analizadas o “gate 1” (en rojo), para cada marcaje). B) Gráficas de Histogramas, donde se muestra la intensidad de fluorescencia detectada para: la población hASC control o sin marca (IgG1k-FITC, línea negro) y células hASC marcadas con el respectivo anticuerpo (línea roja): CD105, CD34, CD73, CD29, CD90, CD45, CD44, CD19, CD11b, HLA-DR. Para cada marcaje n=5.

Marcador	% células positivas						
	hASC1	hASC2	hASC3	hASC4	hASC 8	Promedio	DS
CD90	99,44	98,31	97,31	99,42	98,60	98,62	0,88
CD105	99,31	99,40	99,42	99,5	94,50	98,16	2,44
CD45	2,27	0,30	0,08	0,01	3,30	1,19	1,50
CD34	11,67	6,60	1,20	0,15	3,50	4,62	4,65
CD44	99,41	97,25	96,31	99,21	96,90	97,82	1,41
CD73	99,29	99,18	99,88	99,44	99,20	99,40	0,29
CD19	2,08	1,84	0,08	0,62	11,40	3,20	4,66
CD29	99,80	99,92	99,96	99,43	95,90	99,00	1,75
CD11b	2,08	0,77	0,11	0,56	3,30	1,36	1,31
HLADR	0,04	5,19	0,13	0,26	2,80	1,68	2,27

Tabla 2: Análisis de marcadores de expresión mesenquimales en hASC. Los resultados están expresados como porcentaje de células positivas a cada marcador. Se analizaron 5 n usando el citómetro Beckman Coulter Epics y los datos fueron procesados con el software FCS Express 4. DS, desviación estándar.

Al evaluar la capacidad de diferenciación hacia los 3 linajes característicos para MSC (figura 9), se observa que hASC sometidas a diferenciación adipogénica presentaron formación de vesículas lipídicas detectadas por tinción oil red, figura 9A, a diferencia de células control o indiferenciadas donde no se observan células positivas para la tinción. Aquellas células sometidas a diferenciación osteogénica presentaron depósitos de calcio en su matriz, detectados mediante tinción Von Kossa, figura 9B, mientras que la tinción resultó ser negativa para células control. Finalmente, las células hASC sometidas a diferenciación condrogénica resultaron positivas para la detección de mucinas sulfatadas mediante tinción alcian blue, a diferencia de células control, negativas para la tinción figura 9C.

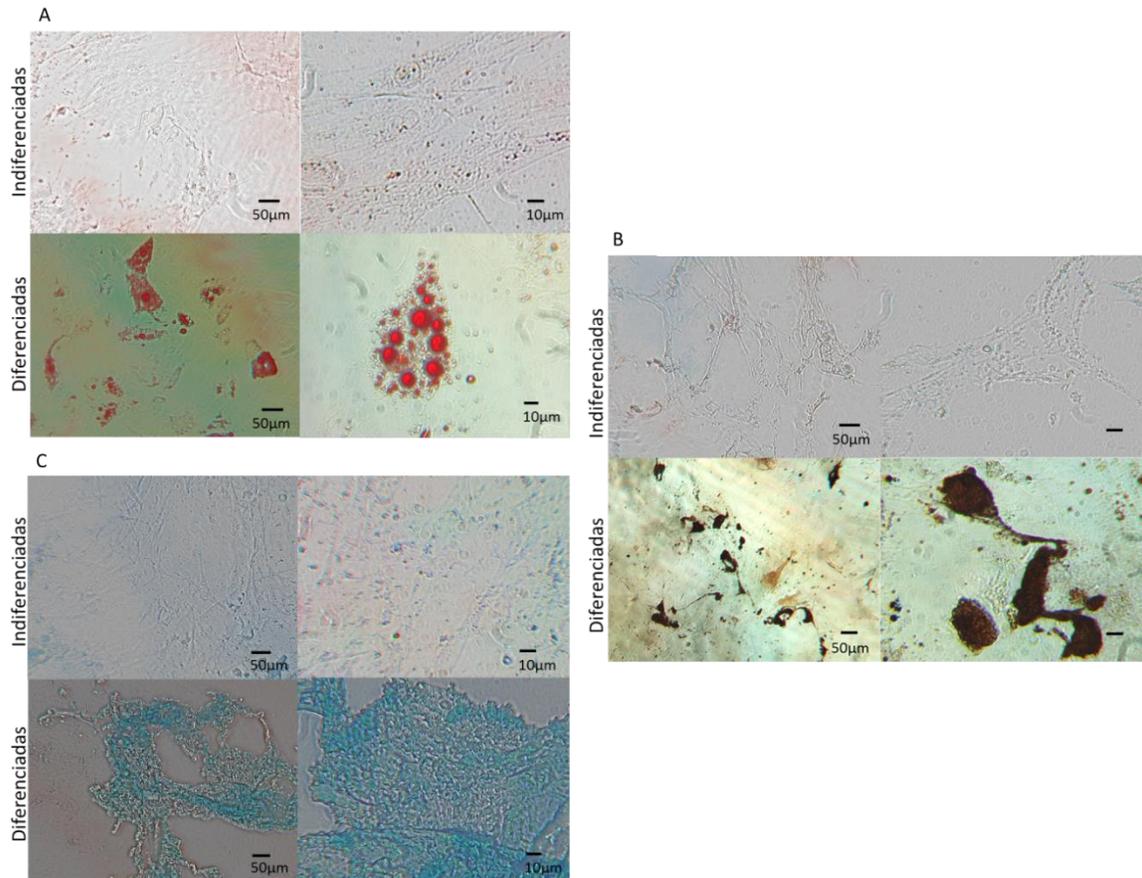


Figura 9. Potencial de diferenciación de hASC hacia fenotipos adipogénico, condrogénico y osteogénico *in vitro*. La diferenciación hacia los distintos linajes se realizó durante 21 días usando *kits* de diferenciación comerciales. Las imágenes son representativas de un total de 3n analizados. A) Tinción “Oil Red” para hASC indiferenciadas y diferenciadas a adipocitos. B) Tinción de Von Kossa para células hASC indiferenciadas y diferenciadas a osteocitos. C) Tinción “Alcian Blue” para células hASC indiferenciadas y diferenciadas a condrocitos.

Estos resultados de diferenciación hacia trilineaje característico para poblaciones de células mesenquimales, junto con el perfil de expresión de marcadores por citometría y las características de adhesión y morfología celular, sugieren fuertemente que las células purificadas desde tejido lipoaspirado bajo el protocolo descrito, efectivamente corresponden a una población de células mesenquimales hASC.

3.2) ***Diferenciar in vitro IPC y GPC a partir de hASC independientemente.*** Se sometieron las células hASC a diferenciación hacia IPC y GPC en placas de 6 pocillos bajo condiciones de cultivo celular, basándonos en los protocolos de Kang y Mohamad para

IPC y en el protocolo de Rezania para GPC, ambos reportados en la publicación de nuestro trabajo (Jara y cols., 2020). Los cultivos fueron visualizados mediante microscopía en contraste de fases, figura 10, donde se puede observar que las células indiferenciadas o hASC control, retienen la morfología de célula mesenquimal (figura 10A) y además presentan notoriamente mayor número de células, es decir, continúan proliferando. Aquellas células sometidas al protocolo de diferenciación se vuelven más redondeadas tipo epiteliales, ya sea hacia fenotipo IPC o GPC, y se puede observar menor número de células en comparación a células indiferenciadas (figura 10B y 10C).

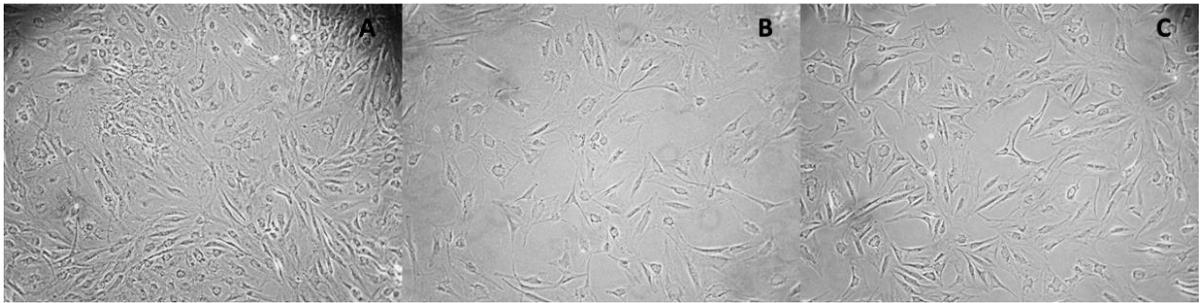


Figura 10: Imagen representativa de células indiferenciadas o hASC, y células diferenciadas, IPC y GPC. A) Células hASC control incubadas con medio de mantención. B) Células IPC luego de 21 días de diferenciación. C) Células GPC luego de 26 días de diferenciación.

- 3.3) ***Expresión de marcadores endocrino pancreáticos en células hASC, IPC y GPC.*** Se sembraron células hASC en cubreobjetos redondos estériles para posteriormente inducir su diferenciación hacia IPC y GPC *in vitro*. Luego del proceso de diferenciación, los cubreobjetos fueron fijados y analizados por IFI para la expresión de vimentina como marcador de citoesqueleto y marcadores endocrino pancreáticos como Pdx1, Ngn3, insulina y glucagón, figura 12. Previamente, los anticuerpos fueron estandarizados en la línea celular Min6, correspondiente a una línea de adenoma de células pancreáticas de ratón, (figura 11).

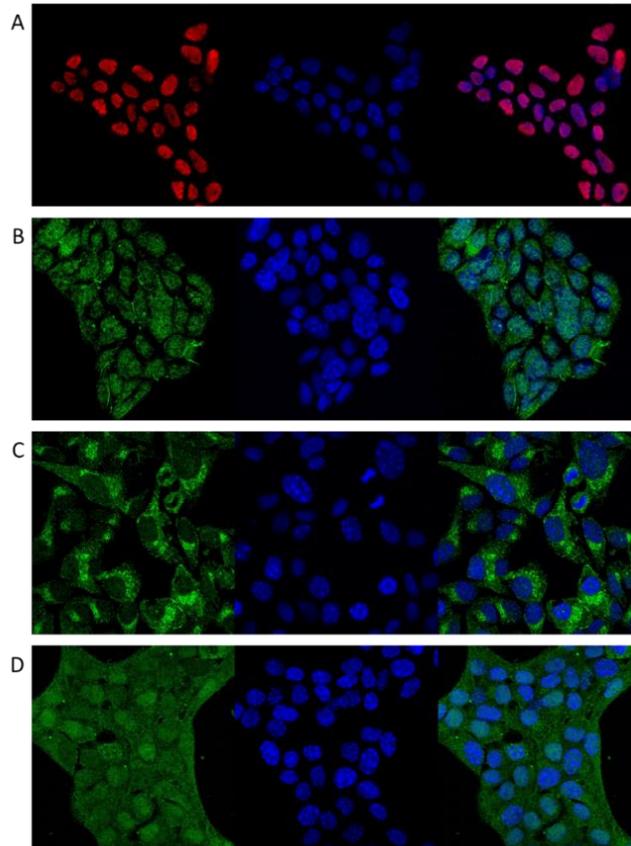


Figura 11: Análisis de expresión de marcadores en línea Min6 mediante IFI. Las imágenes que se muestran son la imagen final de un “Z Stack” de un total de 11-13 planos con cortes de $0.3\mu\text{m}$ entre cada plano. La tinción nuclear se realizó con Hoechst 1:500. En todos los casos se muestran imágenes representativas de IFIs realizadas a un total de mínimo 5 muestras. A) Expresión de PDX1 en rojo. B) Expresión de Ngn3 en verde. C) Expresión de Insulina en verde. D) Expresión de CD44 en verde.

Al analizar la expresión de marcadores tanto en hASC como en IPC y GPC, se puede observar en la figura 12A, que las células hASC o indiferenciadas expresan fuertemente CD44 al igual como se detectó por citometría de flujo. También expresan vimentina, un marcador de citoesqueleto. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia de los marcadores pdx1 y ngn3, característicos de linaje pancreático, es pobre o casi nula; mientras que la expresión de insulina es completamente indetectable. Contrariamente, las células sometidas al protocolo de diferenciación, tanto IPC como GPC expresan marcadores pdx1 y ngn3 de forma nuclear, mientras que continúan siendo positivas para

la expresión de CD44 y vimentina. Finalmente, GPC expresan glucagón e IPC expresan insulina, ambos de forma citoplasmática, figura 12B y 12C respectivamente.

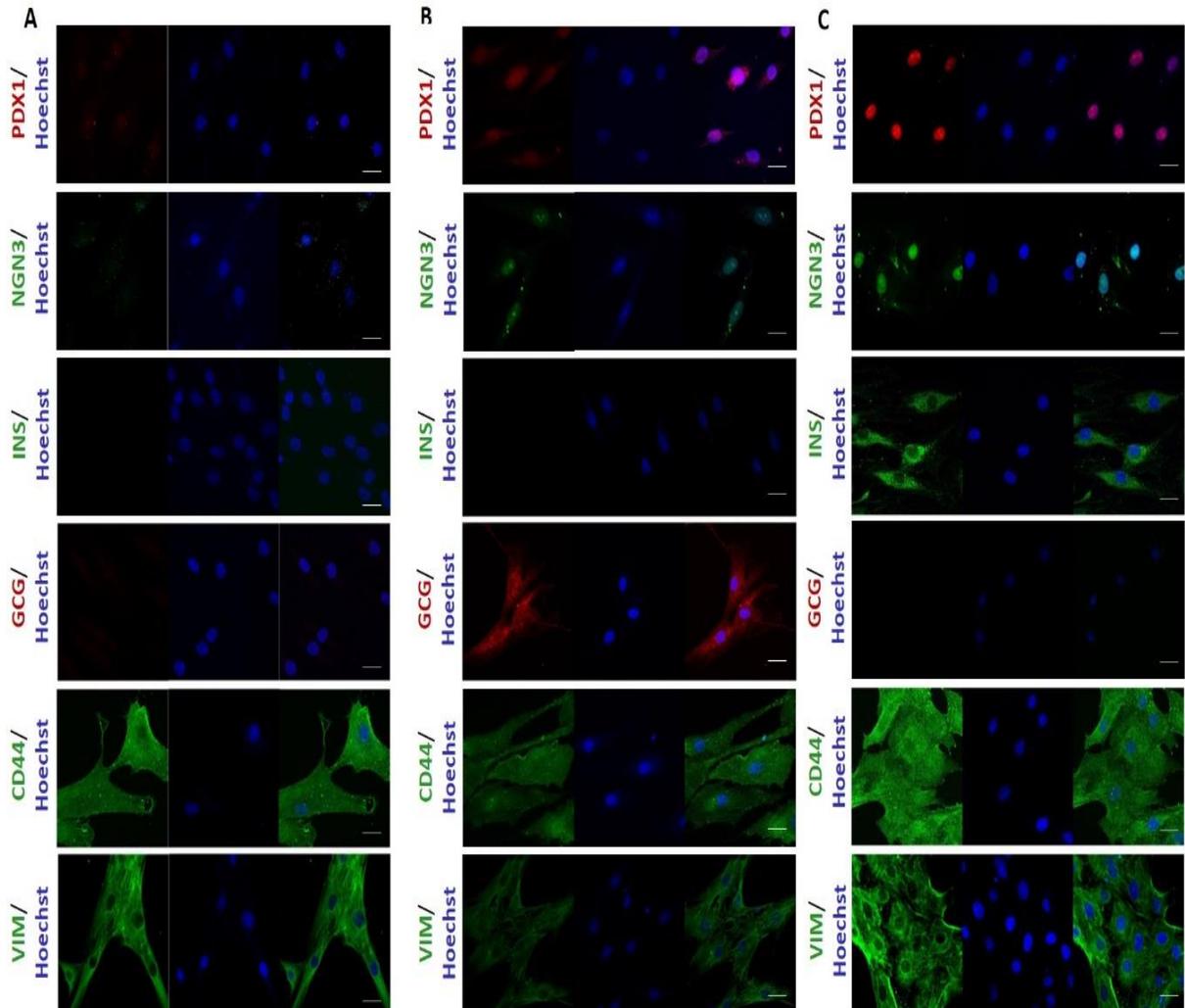


Figura 12. Expresión de marcadores endocrino pancreáticos en células hASC, IPC y GPC mediante inmunofluorescencia indirecta. Las imágenes son representativas de n=3. La tinción nuclear se realizó con Hoechst 1:300 en todos los casos. Los marcadores analizados fueron Pdx1, Ngn3, Ins, Gcg, CD44 and Vimentina. A) Análisis de expresión en células hASC. B) Análisis de expresión en células GPC. C) Análisis de expresión en células IPC. Publicado en Jara y cols., 2020.

3.4) *Determinar la funcionalidad de las IPCs y GPCs.*

Para evaluar la funcionalidad de las células diferenciadas, se cuantificó mediante ELISA la secreción hormonal desde células diferenciadas al medio frente a condición de alta o baja glucosa *in vitro*, considerando para IPC la relación [(secreción Ins alta glucosa HG)/(secreción Ins baja glucosa LG)], y para GPC la relación [(secreción Gcg LG)/(secreción Gcg HG)].

En células IPC, se detectó un aumento en la secreción de Ins en condición de HG de 10 veces con respecto a condición LG; a diferencia de células indiferenciadas, que en medio HG aumentó el doble la cantidad de insulina secretada con respecto a LG (figura 13A). Células IPC, secretaron 4 veces más Ins que células hASC. Por otro lado, células GPC secretaron 3 veces más gcg que las células control, figura 13B.

Estos resultados acerca de la funcional de células IPC y GPC producidas *in vitro*, en conjunto con los datos obtenido en IFI, sugieren una exitosa diferenciación *in vitro* desde hASC hacia IPC y GPC de forma independiente.

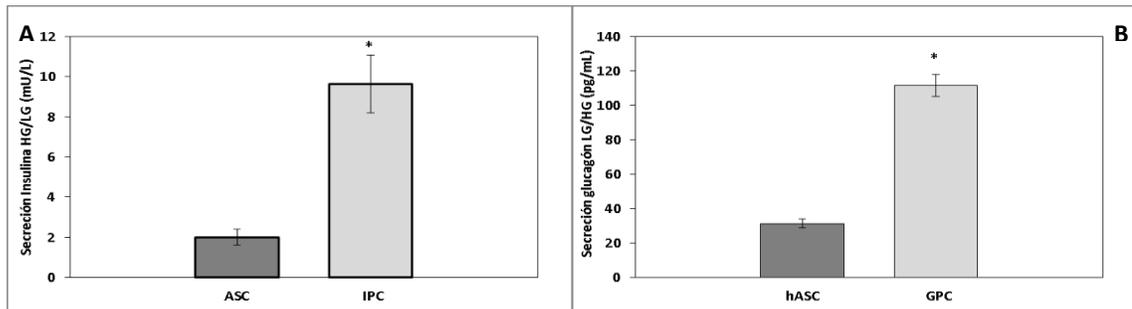


Figura 13. Secreción hormonal de células IPC y GPC. A) Secreción de insulina en células IPC. Cuantificación mediante ELISA en condición de alta glucosa extracelular en relación a la secreción de glucosa frente a condición de baja glucosa extracelular. B) Secreción de glucagón en células GPC. Cuantificación mediante ELISA en condición de baja glucosa extracelular en relación a la secreción de glucosa frente a condición de alta glucosa extracelular. Resultados de un n=4, *p<0.05, *Test t student*. Publicado en Jara y cols. 2020.

3.5) *Generación y caracterización de agregado celular compuesto de IPC y GPC.* Luego de la diferenciación hacia IPC y GPC, se indujo la formación del agregado celular entre ambos tipos celulares bajo condiciones de baja adherencia a sustrato. En la figura 14, se observa la formación de los agregados celulares en el tiempo. A las 24h de formación,

se observa la mayoría de las células de forma individual y algunos agregados comenzando a formarse. A las 48h de formación, se observa la mayoría de las células formando parte de algún agregado, aunque permanecen células individuales en baja cantidad. A las 72 y 96h se observan varios agregados de tamaño mayor compuesto por más de 3 células, y observan sólo 1 a 2 células individuales por campo; además, a estos tiempos se comienzan a apreciar restos celulares. A los 7 días de cultivo se aprecia bastante resto celular y agregados celulares con límites celulares mal definidos.

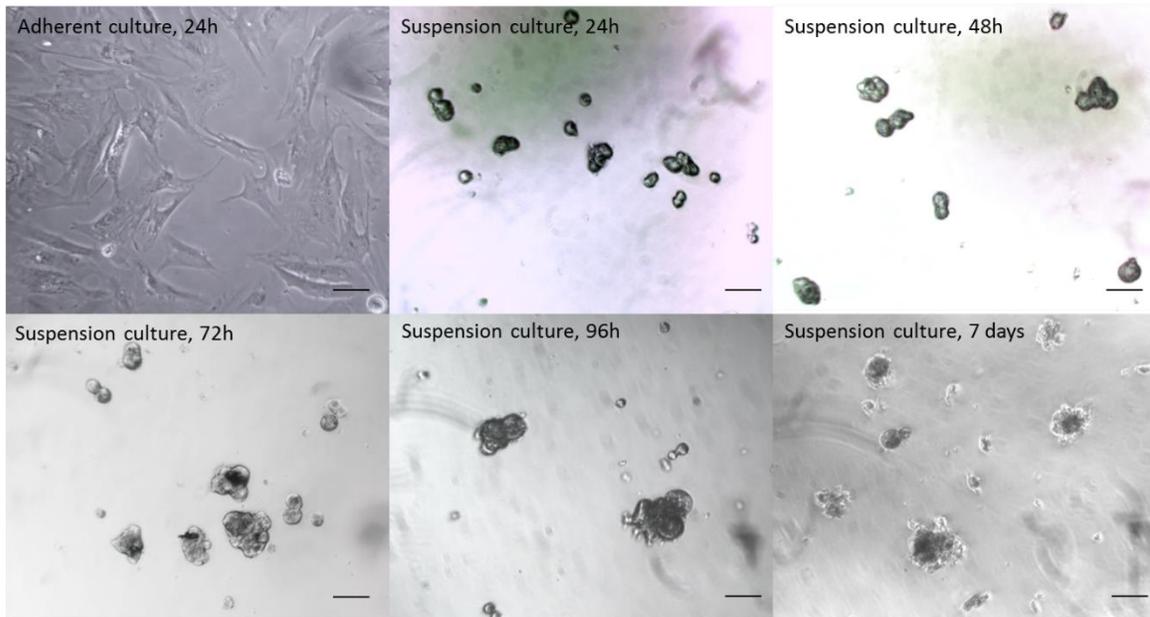


Figura 14: Formación de agregados celulares compuestos por IPC/GPC 4:1 en el tiempo en condiciones de baja adherencia a sustrato. Los agregados se visualizaron bajo microscopía con contraste de fases a los tiempos 24, 48, 72, 96 h y 7 días. Imágenes representativas de un total 4 muestras. Barra tamaño = 50 μ m. Publicado en Jara y cols., 2020.

A partir de las imágenes tomadas, se analizaron como mínimo 40 agregados por tiempo, utilizando el programa ImageJ determinamos la distribución del área de los agregados en el tiempo (figura 15A). Se apreció que los agregados efectivamente van aumentando su área en el tiempo producto de la agregación entre IPC y GPC diferenciadas. A las 24h de formación, estimamos que un 55% de los agregados se concentra en un área menor a 2000 μ m². A las 48h, la mayoría de los agregados (un 65%) se encuentra al menos en los 2500 μ m². Luego, a las 72h sólo se encontró que un 55% de los agregados

se encontraban entre 3000-5000 μm^2 , pudiendo encontrar además agregados de hasta 9000 μm^2 . A las 96h los datos resultan muy similares a 72h de formación, un 50% de los agregados presentaban un área entre 3000-5000 μm^2 , sin embargo, comienza a aumentar el % de agregados $<2000\mu\text{m}^2$. Ya a los 7 días, la mayoría de los agregados se encuentran distribuidos entre 1000 y 4000 μm^2 , lo que sugiere un debilitamiento en la estructura del agregado.

Posteriormente, los agregados fueron filtrados por mallas de Marlex tamaño de poro 40 μm y 120 μm , concentrando los agregados de este tamaño para luego proceder con la encapsulación, evitando así la encapsulación de restos celulares ($<40\ \mu\text{m}$) y de agregados muy grandes que pueden contener células centrales muertas o hipóxicas ($>120\ \mu\text{m}$). Al analizar el diámetro de Feret, se observa aumento del diámetro conforme avanza el tiempo (figura 15B) hasta los 7 días de incubación, pero dado que los agregados de 96h y 7 días se observaban deteriorados y con límites poco definidos se optó por usar agregados formados a las 72h para la realizar la microencapsulación.

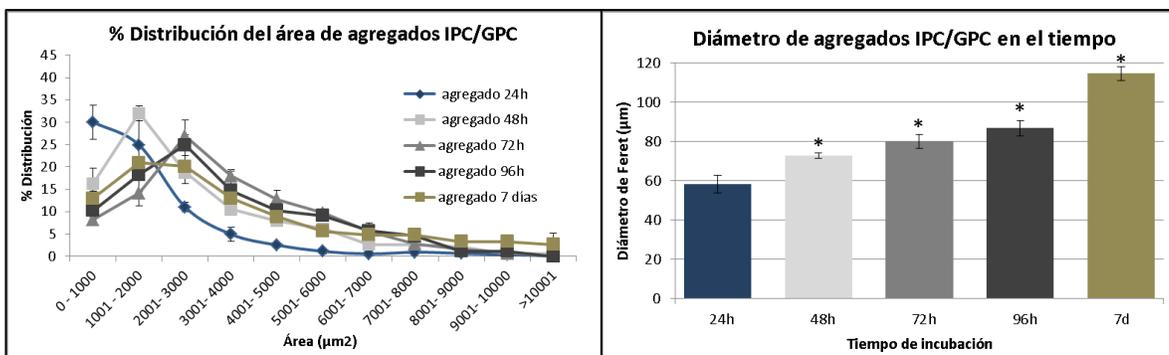


Figura 15: Distribución del área y diámetro de los agregados en el tiempo. Se representan los promedios y error estándar de un total de 4 muestras. A) Distribución del área en el tiempo. B) Distribución del diámetro de Feret en el tiempo. Resultados de un $n=4$, $*p<0.05$.

Para determinar la viabilidad de las células que conforman el agregado, se tomaron los agregados IPC/GPC formados a 24, 48, 72h y 7 días, se disgregaron enzimáticamente con tripsina y se analizó la viabilidad con azul tripán de la suspensión de células obtenidas. El paralelo, se realizó el mismo procedimiento para células en condiciones de adherencia a los mismos tiempos. En la figura 13, se observa que aquellas células en

condiciones de formación del agregado, bajan significativamente su viabilidad a las 96h y 7 días confirmando lo observado en las imágenes de microscopía óptica, mientras que mantienen una alta viabilidad a las 24, 48 y 72h. Por otro lado, se puede observar que células en condiciones de adherencia no se observó un número de células significativamente alto a los 7 días en comparación con las 24h, evidenciando que las células no continúan proliferando luego del proceso de diferenciación.

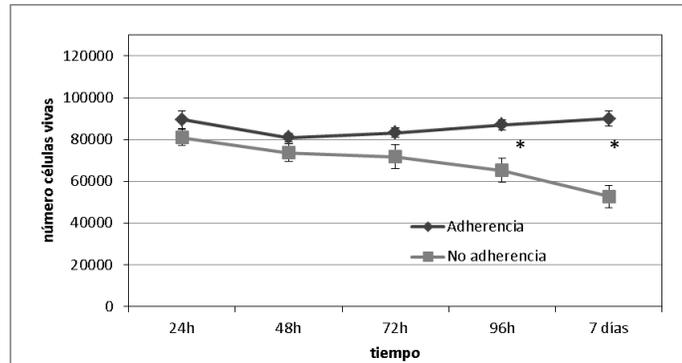


Figura 16: Análisis de viabilidad celular en agregados celulares IPC/GPC. Se sembraron 10^5 células al tiempo 0 en condiciones de no adherencia y adherencia, se digirieron con tripsina y se evaluó viabilidad mediante azul de tripán. Resultados de un $n=4$, $p<0.05$, *Test t student*.

En base a todos estos resultados, es que se fijó 72h como el mejor tiempo de incubación en condiciones de no adherencia para la formación del agregado celular IPC/GPC, ya que a este tiempo se concentran agregados de diámetro aproximado de $80\mu\text{m}$ con un área $2000-5000\mu\text{m}^2$, conservando más de un 80% de viabilidad.

Luego de las 72h de formación, se realizaron blocks celulares tanto para agregados IPC/GPC como agregados hASC o control, en agarosa 1% y se realizaron cortes por congelación de $6\mu\text{m}$ de los agregados celulares. Al analizar mediante IFI los marcadores pancreáticos, figura 17, se observa que agregados IPC/GPC presentan marca de Ins y Pdx1 comparado con agregados control hASC donde no se observa la marca. Por otro lado, al analizar la expresión de gcg, se observa una baja señal en algunas células.

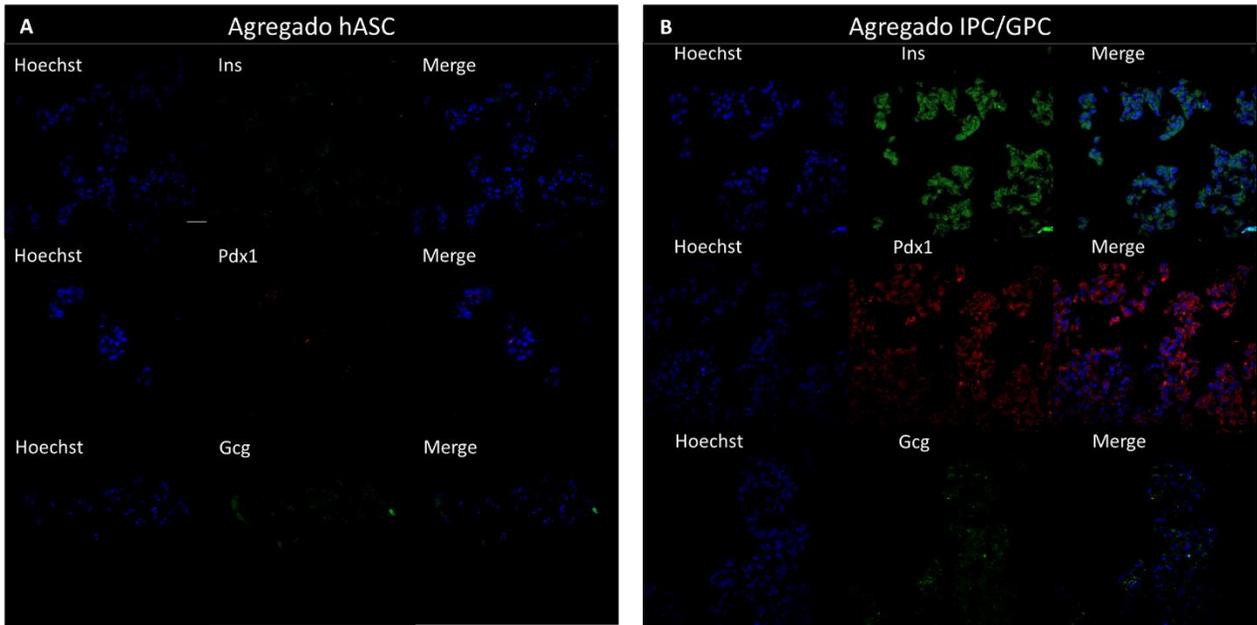


Figura 17: Análisis de marcadores pancreáticos expresados en agregados celulares de hASC formados a las 72h en condiciones de baja adherencia. Imágenes representativas de cortes por congelación de 3n. En todos los casos la tinción nuclear se realizó con Hoechst 1:500. Los marcadores analizados fueron Ins, pdx1 y gcg. A) Análisis en cortes de agregados celulares de hASC. B) Análisis en cortes de agregados celulares IPC/GPC. Barra tamaño = 40 μ m.

Microencapsulación:

Previo a la encapsulación del agregado celular, con el fin de estandarizar las mejores condiciones de encapsulación en el equipo Encapsulator-B395 Pro, es que se realizó en primera instancia la caracterización de los microgeles obtenidos al encapsular proteínas modelo.

3.6) Encapsulación de las proteínas: albúmina de suero bovino (BSA) y staphylococcal protein A (SpA), caracterizando los microgeles obtenidos en tamaño, forma, permeabilidad.

Con el fin de caracterizar los microgeles formados con el equipo automatizado es que se encapsuló proteína BSA de 66kDa en microgeles de alginato de sodio 1,5 y 2% estabilizados con Ca^{2+} o Ba^{2+} , visualizando los microgeles mediante microscopía óptica. Como se observa en la figura 18, al momento de la obtención (tiempo 0), los microgeles presentan un aspecto esférico, tanto al usar Ca^{2+} o Ba^{2+} como solución estabilizadora.

Además, los microgeles permanecen íntegros durante las 72h de monitoreo en condiciones fisiológicas (37 grados, 5% CO₂), en BKR.

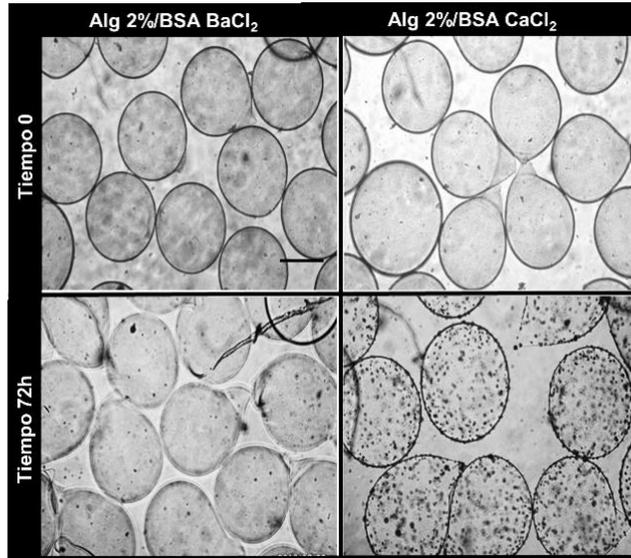


Figura 18: Visualización de microgeles Alg/BSA mediante microscopía óptica. Se observan los microgeles en diferentes condiciones de tiempo de visualización (0 y 72h), y composición de solución estabilizadora (CaCl₂ o BaCl₂). Imágenes representativas de n>5 para cada condición. Barra tamaño = 200µm, igual para todas las imágenes.

Con respecto al tamaño, todos los microgeles analizados presentaron un tamaño similar de ~300µm de diámetro sin diferencias significativas al usar Ca²⁺ o Ba²⁺ o al usar alginato al 1,5 o 2% (tabla 3).

Muestra	Diámetro tiempo 0 (µm)		Diámetro 7 días (µm)	
	CaCl ₂	BaCl ₂	CaCl ₂	BaCl ₂
Alginato 1.5%-proteína BSA	304 ± 9	309 ± 13	329 ± 5 *	284 ± 17
Alginato 2%-proteína BSA	315 ± 16	296 ± 09	323 ± 08	305 ± 15
Alginato 1.5%-proteína SpA	317 ± 14	285 ± 16	325 ± 4	286 ± 11

Tabla 3: Análisis de tamaño de los microgeles de alginato estabilizados con Ca²⁺ o Ba²⁺. Las mediciones fueron realizadas al tiempo de obtención de los microgeles (t0). Las mediciones mediante microscopía óptica corresponden a un total de 5 muestras analizadas, cada una con 40 mediciones de tamaño de al menos 5 campos ópticos distintos.

Posteriormente se encapsuló en alginato 1,5% estabilizado con Ca^{2+} o Ba^{2+} , otra proteína de tamaño conocido, la proteína SpA, que presenta un tamaño de 40kDa. Una vez obtenidos los microgeles que contenían SpA, observamos que estos no presentaban diferencia ni en aspecto, ni en el tamaño con respecto a los microgeles que contenían BSA, tabla 3. De igual forma, tampoco se observaron diferencias significativas en el tamaño de los microgeles-SpA obtenidos al estabilizar el alginato con Ca^{2+} o con Ba^{2+} , ver tabla 3.

Luego de evaluar el aspecto y tamaño de los microgeles obtenidos, se analizó la eficiencia de encapsulación, es decir, cuánto porcentaje de la proteína total presente en el alginato realmente se encapsuló dentro de los microgeles. Como se observa en la figura 16A, no hay diferencia significativa en la eficiencia de encapsulación de microgeles que contenían proteína BSA o SpA, ni de microgeles estabilizados con Ca^{2+} o Ba^{2+} , alcanzando un mínimo de 54% de eficiencia y un máximo de 58% de eficiencia entre las distintas condiciones, por lo que se considera que la eficiencia de encapsulación en este caso, para las proteínas BSA o SpA, no depende de la proteína encapsulada, ni de la solución estabilizadora para microgeles de alginato de sodio 1,5%.

Posteriormente, se analizó la liberación de las proteínas BSA y SpA desde los microgeles al medio. Para estandarizar el porcentaje de liberación de proteína, la eficiencia de encapsulación determinó el % de proteína que se encapsula al tiempo 0 o tiempo de obtención de los microgeles. Desde los resultados, observados en la figura 16B, se desprende que la cantidad de proteína encapsulada al tiempo 0 o eficiencia de encapsulación corresponde al ~56%, a partir de la solución 1mg/mL. Cabe mencionar que la eficiencia de encapsulación no varía de forma significativa al usar Bario o Calcio como solución estabilizadora, ni tampoco varía al encapsular proteína BSA o SpA. La cantidad de proteína encapsulada al tiempo 0 se considera como 100% para los ensayos de liberación de proteínas al medio que se expone a continuación.

Al analizar la liberación de las proteínas desde los microgeles, como se muestra en la figura 19B, se observa un “*efecto burst*”, que corresponde a una rápida liberación durante los primeros 5 minutos que va entre 10% a 13% de liberación para las distintas condiciones analizadas, posteriormente se llega a un estado estacionario donde no hay mayor aumento en la liberación, tiempo 15 y 20 minutos, donde se observa de 10% a 15% de liberación de BSA o SpA al medio. Este comportamiento de liberación ocurre

tanto para BSA como para SpA, no habiendo diferencia significativa entre los perfiles de liberación para las distintas condiciones de encapsulación analizadas (proteínas BSA o SpA, y soluciones estabilizadoras). Es importante destacar que una vez terminada la liberación, las muestras fueron incubadas en buffer citrato para romper los microgeles y analizar el contenido de proteína que queda al interior de estos, encontrando que la suma resulta ser $\geq 95\%$ de proteína total, confirmando los resultados encontrados.

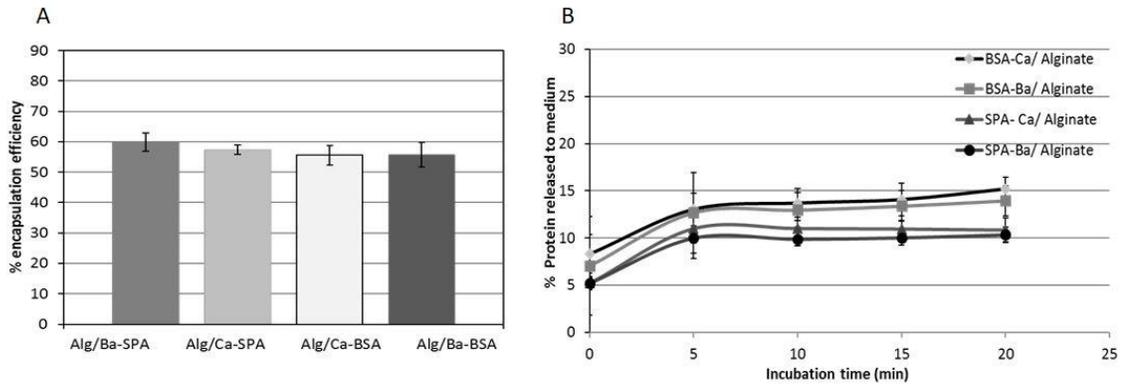


Figura 19: Análisis de microgeles de alginato de sodio que contenían BSA y SpA. A) Eficiencia de encapsulación de proteínas BSA y SpA en microgeles de alginato de sodio 1,5% estabilizados con Ca^{2+} o Ba^{2+} . La barra muestra el error estándar de al menos 3n en cada caso. $p > 0,05$. B) Liberación de proteína a BKR desde microgeles que contenían proteína BSA o SpA en alginato de sodio 1,5% estabilizado con Ca^{2+} o Ba^{2+} según corresponda. formados en distintas condiciones. Las mediciones corresponden a un total de 5n. $p > 0,05$.

3.7) *Generación y caracterización funcional de agregado celular esférico microencapsulado compuesto por IPCs y GPCs diferenciadas a partir de hASC.*

Luego de la estandarización tanto de la formación del agregado celular como de las condiciones de encapsulación (sección 3.5 y 3.6), se tomaron agregados celulares IPC/GPC formados a las 72h, los que luego se filtraron por mallas estériles de 40 y 120 μm de diámetro con el fin de concentrar agregados de entre 40 y 120 μm . Una vez concentrados los agregados, se mezclaron con alginato de sodio 1,5% a razón de 2×10^4 agregados/mL de alginato. Utilizando el equipo Encapsulator 395-Pro (Büchi, Switzerland), se formaron microgeles como los que se aprecian en la figura 20. En términos generales se observaron de 0 a 2 agregados por microgel en todas las condiciones, donde la mayoría se centró en un agregado por microgel.

Además, fue posible observar que aquellos microgeles estabilizados con Ca^{2+} , luego de 96h de formación comienzan a perder su forma, hincharse y por ende aumentar su diámetro, y ya a los 7 días no es posible distinguir definitivamente el borde de los microgeles. Además, los agregados contenidos en microgeles estabilizados con Ca^{2+} , desde las 96h, se comienzan a observar disgregados dentro del microgel.

Por otra parte, aquellos microgeles estabilizados con Ba^{2+} , se observan mucho más estables en los tiempos analizados, ya que, hasta los 7 días de análisis, estos mantienen su diámetro y el borde del microgel bien definido, lo que concuerda con nuestros resultados previos (Cabané y cols, 2009). Además, los agregados contenidos en estos microgeles, se observaron íntegros hasta los 7 días analizados.

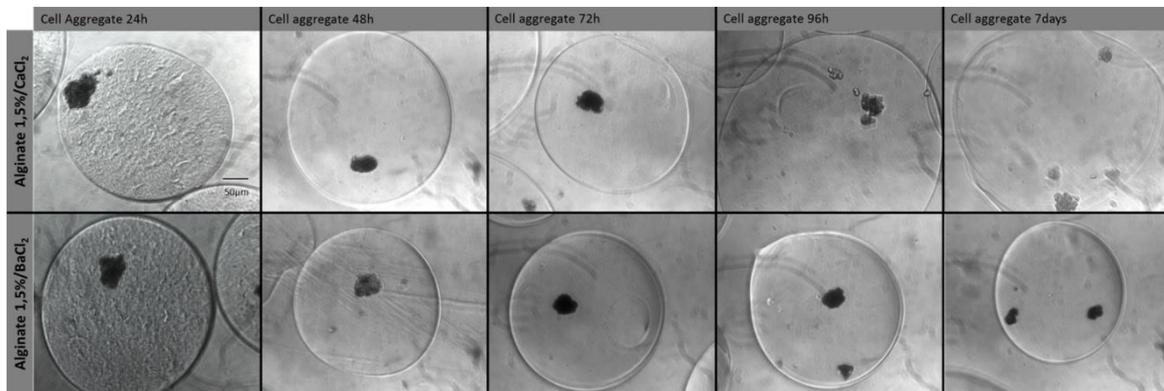


Figura 20: Agregado celular IPC/GPC encapsulado en alginato de sodio. Se encapsularon los agregados en alginato estabilizado con Ca^{2+} (panel superior) o estabilizado con Ba^{2+} (panel inferior). Las imágenes de microscopía óptica muestran el aspecto de los microgeles en el tiempo (24, 48, 72, 96 horas y 7 días). Las imágenes son representativas de un $n=5$. Barra tamaño = $50\mu\text{m}$. Publicado en Jara y cols., 2020.

Al analizar más de 40 microgeles por condición, se obtuvo la tabla 4, donde es posible observar que el tamaño no varía al encapsular agregados IPC/GPC o agregados hASC. Tampoco, se observó diferencia significativa en el diámetro de microgeles estabilizados con Ba^{2+} a tiempo 0 vs 7 días, mientras que sí se encontró diferencia significativa en el tamaño de microgeles estabilizados con Ca^{2+} luego de 7 días de cultivo, el que aumenta 0,5 veces con respecto al tiempo 0, figura 21, confirmando el aumento de tamaño visualizado por microscopía.

Muestra	Diámetro tiempo 0 (μm)		Diámetro 7 días (μm)	
	CaCl ₂	BaCl ₂	CaCl ₂	BaCl ₂
Agregado hASC- Alginato 1.5%	310 ± 14	303 ± 23	459 ± 28 *	314 ± 15
Agregado IPC/GPC- Alginato 1,5%	302 ± 13	309 ± 12	468 ± 27 *	316 ± 9

Tabla 4: Tamaño de agregados celulares microencapsulados en alginato de sodio 1,5%. Tamaños de microgeles analizado por ImageJ de al menos 10 fotografías para cada n, con un total de 3n analizados.

Finalmente, se analizó la capacidad secretora o funcionalidad del agregado celular microencapsulado para corroborar que mantenga la secreción hormonal como se demostró previamente en células diferenciadas IPC y GPC bajo condiciones adherentes, sección 3.4.

Debido a la falta de un método de análisis para la detección de glucagón ya sea dentro del laboratorio como de forma particular, no se pudo cuantificar la capacidad de secreción de esta hormona desde el microgel al medio; sin embargo, sí pudo ser analizada la secreción de Ins al medio de cultivo mediante ELISA. Como se observa en la figura 21, los agregados microencapsulados en alginato de sodio estabilizado con Ba²⁺, son capaces de secretar insulina en respuesta a un medio alto en glucosa (25mM) al momento de la obtención, mientras que agregados hASC no son capaces de responder frente al medio alto en glucosa. Sin embargo, a los 7 días de cultivo de los microgeles, no se detectó insulina en el medio en respuesta a glucosa, obteniendo valores muy similares al control de agregado hASC (Jara y cols., 2020).

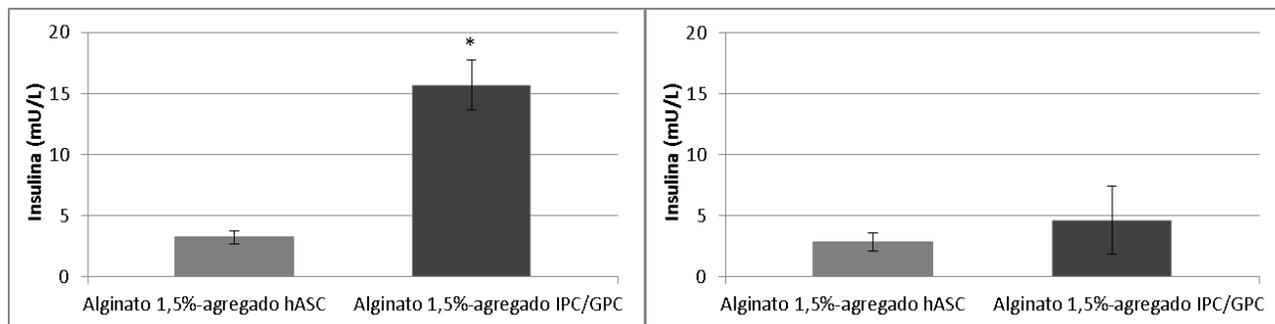


Figura 21: Secreción de insulina desde agregado microencapsulado al medio. Los microgeles en condiciones de cultivo celular fueron analizados en: A) Tiempo 0, y B) 7 días de formación en equipo automatizado. Resultados de un n=3, p<0.05, *Test t student*.

4) **Discusión.**

La terapia celular orientada hacia la diabetes tipo I se ha vuelto una gran herramienta de investigación. Se ha logrado reportar diferenciación hacia IPC o células tipo pancreáticas desde varias fuentes celulares de células madre como: células madre embrionarias (ESC) (Hua y cols., 2014), células madre pluripotentes inducidas (IPSC) (Jeon y cols., 2012), células MSC derivadas de tejido adultos como tejido adiposo (hASC), médula ósea (BM-MSC) (Gabr y cols., 2013), pulpa dental (DPSCs) y placenta (Carnevale y cols., 2013). El uso de ESC e IPSC en clínica aún no está aprobado de forma rutinaria debido a consideraciones éticas y de implementación. Por otro lado, dentro de las células MSC aquellas más estudiadas son hASC y BM-MSC, siendo las primeras mucho más fáciles de obtener, a través de un procedimiento poco invasivo como es la lipoaspiración, logrando obtener un gran rendimiento de purificación celular a diferencia de la utilización de BM-MSC que presenta menor rendimiento de obtención celular y el procedimiento para obtener la muestra de médula ósea es mucho más invasiva y dolorosa (Kern y cols., 2006) (Heo y cols., 2016).

En este trabajo, logramos establecer exitosamente cultivos primarios de hASC adherentes y estables durante al menos 10 pasajes celulares, con un tiempo de duplicación de 320h. Las células, fueron capaces de adherirse a plástico en condiciones de cultivo celular, su morfología a microcopía de contraste de fases fue tipo fibroblastoide. Las células expresan marcadores CD90, CD73, CD105, CD44, y CD29 mientras que carecen de expresión de CD45, CD34, CD19 y HLA-DR, y presentan alto potencial de multidiferenciación hacia fenotipos: adipogénico, condrogénico y osteogénico, (Dominici y cols. 2006 - Bourin y cols, 2013). De esta forma, las células hASC así obtenidas cumplen con los requerimientos acordados por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) para clasificar una población celular como MSC (González y cols., 2018) (Jara y cols., 2020) y además son concordantes con células hASC obtenidas y caracterizadas por otros grupos de investigación (Kang y cols., 2009) (Mohamad y cols., 2012) (Kern y cols., 2006). Por lo tanto, proponemos a hASC como una excelente fuente celular para su uso en terapia celular orientado a T1DM u otras patologías de interés en terapia celular.

Posteriormente, logramos diferenciar hASC *in vitro* hacia fenotipo IPC y GPC de forma independiente. Los resultados de expresión de marcadores y funcionalidad concuerdan con resultados publicados por otros autores tanto para IPC (Kang y cols., 2009) (Mohamad y cols., 2012) como para GPC (Rezania y cols., 2011). La investigación sobre obtención de IPC funcionales ha sido llevada a cabo ampliamente en el mundo y usando variadas fuentes celulares para su diferenciación; en particular destacan los grupos de Kang y Mohamad, cuyos protocolos de diferenciación en los que basamos nuestro trabajo utilizó SFB 10% en el medio de diferenciación. En este trabajo, se utilizó SFB 2% durante todo el proceso de diferenciación hacia IPC, ya que en nuestra experiencia, al intentar usar SFB al 10%, tuvimos problemas de sobrecrecimiento de la monocapa de células, lo que llevaba a la posterior muerte gradual del cultivo por sobrecrecimiento, antes de que finalizara el protocolo de diferenciación (Jara y cols., 2020). Por otro lado, con respecto a la diferenciación hacia GPC, existe sólo un grupo que ha reportado diferenciación exitosa, usando como fuente celular ESC (Rezania y cols., 2011). Por lo tanto, hemos sido los únicos en reportar la eficiente diferenciación hacia GPC desde hASC *in vitro*, basándonos en el protocolo descrito por el grupo de Rezania, usando como suplemento SFB al 2% en vez de B27 al 1% como ellos han reportado, esto debido a que al intentar usar B27 1% en los primeros ensayos, observamos que las células comenzaban a morir con el pasar de los días hasta que finalmente no se observaban células viables al final del protocolo de diferenciación. A este respecto, nosotros decidimos usar SFB 2% para ambos protocolos de diferenciación. Por otro lado, se ha reportado que a mayor contenido de SFB se produce un mayor estímulo del proceso de proliferación por sobre el proceso de diferenciación celular, debido a la gran cantidad y variedad de factores de crecimiento presentes en el suero. En base a estos resultados obtenidos para la diferenciación hacia IPC y GPC, postulamos hASC como una fuente celular adecuada para generar IPC y GPC funcionales *in vitro*.

Para la diferenciación hacia IPC, se utilizaron los factores activina A, nicotinamida y GLP-1, ver figura 2. Activina A, miembro de la superfamilia de TGF β , a través de sus receptores (RIA, RIB, RIIA, RIIB) ha demostrado inducir la expresión tanto de PAX4, un factor de transcripción maestro de la diferenciación de células β pancreáticas (Sosa-Pineda y cols., 1997); como la expresión de Ngn3, factor de transcripción maestro en la

diferenciación pancreática (Rukstalis y Haberner, 2009) en una subpoblación de progenitores endocrinos. Además, se usó Nicotinamida, reportado como un potente inductor de la expresión de insulina (Yang y cols., 2015) (Hou y cols., 2008). Finalmente, se usó GLP-1, hormona del tipo incretina que es capaz de modular la expresión de genes específicos de células β *in vitro* (28–30,52–56) e *in vivo* (9,11–13). Por otro lado, la diferenciación hacia GPC ocurre secuencialmente en 6 estadios, ver figura 2. Primero Activina A, Wnt3a y FGF2 estimulan la expresión de marcadores de mesoendodermo como CD184 (CXCR4), FOXA2, and SOX17. Luego en los estadios 2 y 3 se estimularon las células con FGF7, Cyclopamine (inhibidor señalización shh), RA, and Noggin (inhibidor señal TGF β), estimulando la expresión de HNF4 y Pdx1, marcadores de precursores pancreáticos. Posteriormente, en el estadio 4 se observa aumento en la expresión de NeuroD y Ngn3 gracias a la inhibición en la señalización TGF β y Notch vía Inhibidor II ALK5 y DAPT respectivamente, mientras que Inh II ALK 5 también es un potente inductor de la expresión de Ins y Gcg, determinando un fenotipo endocrino pancreático. En el estadio 5, Inh II ALK5 por un lado estimula de manera concentración dependiente la expresión de Arx, factor de transcripción maestro presente en células α y ausente en células β ; y por otro lado, inhibe la expresión de Nkx6.1, factor de transcripción limitado a células β , contribuyendo a la maduración de células tipo α pancreáticas. Finalmente, el estadio 6 contribuyó a la maduración de las células.

Con respecto a la caracterización de las células IPC y GPC sería interesante poder lograr determinar la expresión de diferentes marcadores en distintos estadios del proceso de diferenciación endocrino-pancreática *in vitro*, para poder asegurar con mayor certeza una exitosa diferenciación terminal de las células IPC y GPC.

Luego de la diferenciación celular, formamos los agregados celulares compuestos por células IPC y GPC en condiciones de baja adherencia (Caviedes y cols., 2008). Los agregados fueron aumentando su área en el tiempo de formación, alcanzando a las 72 h, un diámetro de $\sim 80 \mu\text{m}$ similar al tamaño reportado para islotes humanos ($108 \mu\text{m}$) (Ionescu-Tirgoviste y cols., 2015). Cabe destacar, que la expresión de marcadores pancreáticos se mantuvo en los agregados IPC-GPC, lo que es indicativo de que se mantiene el estado diferenciado en las condiciones de formación del agregado (medio

de cultivo distinto y condiciones generales de baja adherencia) y por tanto podemos decir que no se produce desdiferenciación celular, aunque para poder confirmar esto, se hace necesario un estudio más riguroso de marcadores de diferenciación terminal endocrino pancreático como son Nkx6.1 y MafA para el caso de IPC y Arx para el caso de GPC. Desde estos resultados es posible afirmar que se ha logrado generar un agregado celular compuesto de células IPC y GPC diferenciadas *in vitro* desde hASC. Estudios posteriores podrían entonces bordar el escalamiento y la estandarización la cantidad de agregados necesarios para emular la cantidad de equivalentes de islotes (IE), parámetro usado en clínica para definir la masa necesaria de islotes para lograr el efecto terapéutico en el paciente. Como referencia, en el Protocolo de Edmonton se trasplantaron una masa de islotes de 11.000 IE / kg de peso corporal (Shapiro y cols., 2000) (Shapiro y cols., 2006).

Los agregados celulares, implantados sin inmunosupresión o inmunoaislamiento, podrían generar rechazo inmune hacia las células trasplantadas, ya que serían susceptibles al reconocimiento y ataque del sistema inmune, considerando que el paciente con T1DM presenta anticuerpos anti-proteínas del islote que activan rápidamente el sistema inmune a pesar de que el injerto sea compatible. Para sortear este obstáculo, es que postulamos el uso de la encapsulación para otorgar soporte y protección de los agregados celulares generados *in vitro*. Como importante antecedente tenemos el reporte de trasplante de islotes pancreáticos encapsulados en algunos estudios clínicos, donde se ha observado inmunoprotección del injerto sin afectar mayormente la funcionalidad de estos (Basta y cols., 2011). Previo a la encapsulación de los agregados, encapsulamos proteínas de tamaño conocido como BSA y SpA, de 66 y 40kDa respectivamente, usando un encapsulador automatizado, con el objetivo de caracterizar los microgeles obtenidos y definir un protocolo que asegure un corte de peso molecular adecuado, que impidiera el paso de anticuerpos y permitiera el paso de moléculas de menor tamaño relevantes para la función y sobrevivencia de los agregados. El tamaño de los microgeles-proteína fue similar ya sea usando Ca^{2+} o Ba^{2+} como estabilizador del alginato. Además, los microgeles-proteína liberaron el 7% de ambas proteínas (BSA y SpA) en los primeros 5 minutos, luego la liberación fue más lenta hasta alcanzar una liberación del 15% estable a los 20 minutos tanto para microgeles-

BSA como para microgeles-SpA. En este sentido, sólo podemos afirmar que los microgeles no permiten el paso de moléculas mayores o iguales a 44kDa que es lo que pesa la proteína SpA, ya que no observamos mayor liberación de la proteína desde estos microgeles, ni tampoco en microgeles con BSA corroborando esta información. Por lo tanto, los microgeles no permitirían la entrada de anticuerpos que pesan entre 100-150kDa y no habría activación del sistema inmune. Sin embargo, no podemos afirmar que los distintos nutrientes puedan atravesar el microgel, para esto habría que encapsular proteínas o péptidos más pequeños que pesen 30, 20 y 10 kDa, y de esa forma determinar el tamaño de corte de los microgeles obtenidos.

Posteriormente, logramos encapsular agregados IPC / GPC en microgeles de alginato de sodio utilizando un encapsulador automatizado. El tamaño inicial de los microgeles, fue muy similar al usar Ca^{2+} o Ba^{2+} como solución estabilizadora, y fue similar al tamaño de los microgeles-proteína (BSA o SpA). En condiciones de cultivo, los microgeles-IPC/GPC estabilizados con Ba^{2+} fueron más estables que aquellos formados con Ca^{2+} , que aumentaron de tamaño y fueron menos estables después de 7 días de cultivo. Una explicación de este fenómeno radica en las características químicas del copolímero de alginato de sodio, que está compuesto por residuos de ácido 1,4- β -D-manurónico (M) y ácido 1,4- α -L-glucorónico (G), y se puede estabilizar en términos generales por cationes divalentes siendo Ba^{2+} el más eficiente ($\text{Mg}^{2+} \ll \text{Ca}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$) (Morch y cols., 2006). Igualmente, confirmamos que los agregados celulares microencapsulados responden con secreción de Ins en respuesta a cambios en la concentración de glucosa externa, lo que da cuenta de que la glucosa es capaz de atravesar los microgeles y ser “sensada” por agregados celulares, los que son capaces de responder con secreción de Ins, la que a su vez es capaz de difundir fuera del microgel al medio, donde es detectada mediante ELISA. Por lo tanto, la encapsulación con alginato de sodio, está otorgando una barrera físico-química a los agregados celulares IPC/GPC sin impedir el paso de las moléculas de interés como nutrientes y pequeños péptidos, hecho que ha sido reportado por otros grupos de trabajo para encapsulación de islotes en geles de alginato de sodio (Dufrane y cols., 2006) (Hu y cols., 2019).

A pesar de la alta estabilidad de los microgeles-IPC/GPC obtenidos con Ba^{2+} , los agregados de IPC / GPC dejaron de secretar Ins después de 7 días en cultivo. Esta pérdida en la función se puede atribuir a varios factores como: 1) pérdida de función

debido a un proceso de desdiferenciación; 2) pérdida de función por problemas en la secreción de Ins; 3) pérdida de capacidad de sensar la glucosa externa; 4) pérdida de función debido a una desensibilización de IPC a la glucosa; 5) pobre supervivencia del agregado celular a largo plazo *in vitro*. Para poder dilucidar esto, se requiere realizar ensayos de viabilidad y muerte celular de los agregados recuperados desde los microgeles. Para evaluar esto, se deben rescatar agregados encapsulados postrasplante en modelo *in vivo* para evaluar la viabilidad de dichos agregados, ya que el ambiente *in vivo*, puede otorgar mejor supervivencia de los agregados que el ambiente *in vitro*. Asimismo, en modelo *in vivo*, se puede medir la cantidad de péptido C humano secretado, lo que permite evaluar la funcionalidad *in vivo* de los agregados microencapsulados trasplantados. Actualmente, se está planificando la producción a gran escala de agregados IPC/GPC en sistemas de biorreactores, para expandir y obtener una gran masa de hASC, la que servirá como materia prima para aplicar los protocolos de diferenciación, agregación y encapsulamiento. Finalmente, se ha planificado evaluar la funcionalidad de los agregados celulares IPC/GPC trasplantándolos en ratones NOD, un modelo *in vivo* para T1DM, que generan diabetes espontáneamente tras un proceso de destrucción autoinmune selectivo de sus islotes, monitorizando posteriormente el control glicémico y producción de insulina y péptido C, para evaluar la recuperación de la función reguladora de glicemia en estos animales.

Nuestros hallazgos refuerzan el conocimiento actual sobre el potencial de hASC como fuente de células multipotentes en terapia celular orientado a T1DM. Además, hemos desarrollado un protocolo para generar agregados funcionales IPC / GPC, que pueden encapsularse en microgeles de alginato de sodio. En tales condiciones, los agregados son estables y retienen la función endocrina *in vitro* hasta 7 días en cultivo.

5) Conclusiones.

En el presente trabajo, hemos logrado la exitosa obtención y cultivo de células madre multipotentes desde tejido lipoaspirado, hASC. Reportamos la diferenciación funcional de células hASC, hacia IPC y GPC, las que coagregadas mantienen su perfil de expresión de marcadores pancreáticos. Finalmente, agregados IPC/GPC microencapsulados alcanzan la capacidad de responder con secreción de insulina en presencia de estímulo con alta de glucosa.

En el proceso de microencapsulación de estos agregados celulares, utilizamos un equipo automatizado que permite encapsulación en condiciones de esterilidad y es altamente reproducible, obteniendo un agregado celular inmunoprotegido y funcional. Estos hallazgos dan lugar a nuevos estudios, donde la funcionalidad del agregado microencapsulado se pueda evaluar *in vivo*.

Importantemente, las condiciones de formación de coagregados celulares se estandarizaron en nuestro laboratorio, un protocolo podría potencialmente usarse para inducir la agregación de otros tipos celulares de interés, proyectando así, su uso no solo para el tratamiento de la diabetes sino también de otras patologías.

6) **Referencias.**

- 1) Ahlgren U, Pfaff SL, Jessell TM, Edlund T, Edlund H. Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* 1997; 385: 257–260.
- 2) Arrojo e Drigo R, Ali Y, Diez J, Srinivasan DK, Berggren PO, Boehm BO. New insights into the architecture of the islet of Langerhans: a focused cross-species assessment. *Diabetologia*. 2015;58(10):2218-2228. doi:10.1007/s00125-015-3699-0
- 3) Aurich, H. et al. (2009) Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut* 58, 570–581.
- 4) Bansal P, Wang Q. Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295(4):E751-E761. doi:10.1152/ajpendo.90295.2008
- 5) Basta, G. Montanucci, P., Luca, G., Boselli, C., Noya, G., Barbaro, B., Qi, M., Kinzer, KP., Oberholzer, J., Calafiore, R. (2011). Long-term metabolic and immunological follow-up of nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes treated with microencapsulated islet allografts: four cases, *Diabetes Care* 34 (2011) 2406–2409.
- 6) Bhandari D., Seo KW., Sun B., Seo MS., K HS., Seo YJ., Marcin J., Forraz., Le Roy H., Larry D., Colin M., Kang KS. (2011) The simplest method for in vitro β -cell production from human adult stem cells. *Differentiation* 82, 144-152.
- 7) Bourin, P., Bunnell, BA., Casteilla, L., Dominici, M., Katz AJ., March KL, Redl, H., Rubin, JP., Yoshimura, K., Gimble, JM. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013, 15(6):641-8.
- 8) Cabané P, Gac P, Amat J, et al. Allotransplant of microencapsulated parathyroid tissue in severe postsurgical hypoparathyroidism: a case report. *Transplant Proc.* 2009;41(9):3879-3883. doi:10.1016/j.transproceed.2009.06.211.
- 9) Caviedes P., Caviedes R., Freeman T., Asenjo J., Andrews B., Sepúlveda D., Arriegada C., Salazar J. (2008) Materials and methods for regulating process formation in cell culture. Pub US 2004/0219666 A1, Date Nov 4, 2004. Patent No US 7323333 B2.

- 10) Carnevale G, Riccio M, Pisciotta A, et al. In vitro differentiation into insulin-producing β -cells of stem cells isolated from human amniotic fluid and dental pulp. *Dig Liver Dis.* 2013, 45(8):669-76.
- 11) Carrasco E, Angel B, Codner E, et al. Incidencia de diabetes mellitus tipo 1 en Santiago de Chile: análisis por comunas de la Región Metropolitana en el período 2000-2004 [Type 1 diabetes mellitus incidence in Santiago, Chile. Analysis by counties in the period 2000-2004]. *Rev Med Chil.* 2006;134(10):1258-1264. doi:10.4067/s0034-98872006001000007
- 12) Chandra, V. et al. (2011) Islet-like cell aggregates generated from human adipose tissue derived stem cells ameliorate experimental diabetes in mice. *PLoS ONE* 6, e20615.
- 13) Chen Y., Liu W., Li W., Gao C. Autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation improves left ventricular function in a rabbit model of dilated cardiomyopathy. *Exp Mol Pathol.* 2010 Apr;88(2):311-5.
- 14) Cherrington AD, Lacy WW, Chiasson JL. *J Clin Invest.* Effect of glucagon on glucose production during insulin deficiency in the dog. 1978 Sep;62(3):664-77.
- 15) Cohen DJ, St Martin L, Christensen LL, Bloom RD, Sung RS. Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1995–2004. *Am J Transplant* 2006. 6(5Pt2): 1153-1169.
- 16) Ciccocioppo R., Bernardo ME., Sgarella A., Maccario R., Avanzini MA., Ubezio C., Minelli A., Alvisi C., Vanoli A., Calliada F., Dionigi P., Perotti C., Locatelli F., Corazza GR. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut.* 2011 Jun;60(6):788-98.
- 17) Collombat P, Mansouri A, Hecksher-Sorensen J et al. Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes Dev* 2003; 17:2591–2603.
- 18) Collombat P, Hecksher-Sorensen J, Krull J et al. Embryonic endocrine pancreas and mature beta cells acquire alpha and PP cell phenotypes upon Arx misexpression. *J Clin Invest* 2007; 117: 961–970.
- 19) Constantin, G. et al. (2009) Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells* 27, 2624–2635.
- 20) Dabelea D, Bell RA, D'Agostino RB Jr, et al. Incidence of diabetes in youth in the United States. *JAMA* 2007;297:2716–2724. [PubMed: 17595272]

- 21) D'Agostino B., Sullo N., Siniscalco D., De Angelis A., Rossi F. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin Biol Ther.* 2010 May;10(5):681-7.
- 22) Da Silva Meirelles, L. et al. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* 119, 2204–2213.
- 23) Dave SD, Vanikar AV, Trivedi HL, Thakkar UG, Gopal SC, Chandra T. Novel therapy for insulin-dependent diabetes mellitus: infusion of in vitro-generated insulin-secreting cells. *Clin Exp Med.* 2015;15(1):41-45. doi:10.1007/s10238-013-0266-1
- 24) de Vos P, Marchetti P. Encapsulation of pancreatic islets for transplantation in diabetes: the untouchable islets. *Trends Mol Med.* 2002;8(8):363-366. doi:10.1016/s1471-4914(02)02381-x
- 25) de Vos P, Bucko M, Gemeiner P, Navratil M, Svitel J, Faas M, Strand BL, Skjak-Braek G, Morch YA, Vikartovska A, et al. Multiscale requirements for bioencapsulation in medicine and biotechnology. *Biomaterials* 2009. 30(13):2559-2570.
- 26) DIAMOND Project Group. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet Med.* 2006;23(8):857-866. doi:10.1111/j.1464-5491.2006.01925.x.
- 27) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315–317.
- 28) Dufrane, D., Goebbels, R. M., Saliez, A., Guiot, Y., and Gianello, P. Six-month survival of microencapsulated pig islets and alginate biocompatibility in primates: proof of concept *Transplantation* (2006). 81, 1345–1353.
- 29) Elliott, R.B., Escobar, P.L. Tan, M. Muzina, S. Zwain, C. Buchanan, Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation, *Xenotransplantation* 14 (2007) 157–161.
- 30) Elliott RB, Communication to 23th World Congress of IPITA. Prague, Czech Republic, 2011.
- 31) Franklin I, Gromada J, Gjinovci A, Theander S, Wollheim CB. Diabetes. Beta-cell secretory products activate alpha-cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. 2005 Jun;54(6):1808-15.
- 32) Fraser J., Schreiber R., Strem B., Zhu M., Alfonso Z., Wulur I., Hedrick M. (2006) Plasticity of human adipose stem cells toward endothelial cells and cardiomyocytes. *Nat Clin Prac Cardiovasc Med.* 3 (Suppl 1): S33-37.

- 33) Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968 Mar;6(2):230-47.
- 34) Gabr MM, Zakaria MM, Refaie AF, et al. Insulin-producing cells from adult human bone marrow mesenchymal stem cells control streptozotocin-induced diabetes in nude mice. *Cell Transplant*. 2013, 22(1):133-145. doi:10.3727/096368912X647162.
- 36) Giwa AM, Ahmed R, Omidian Z, et al. Current understandings of the pathogenesis of type 1 diabetes: Genetics to environment. *World J Diabetes*. 2020;11(1):13-25. doi:10.4239/wjd.v11.i1.13
- 37) González E, Carrión F, Caviedes P. The UCHT1 method have a proliferative effect in human adipose stem cells (hASC), in 1st National Congress of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, LAP LAMBERT Academic Publishing, 2018, p. 77-79, Mauritius, ISBN: 978-613-3-99514-7.
- 38) Gonzalez, M.A. et al. (2009) Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 136, 978–989
- 39) Gonzalez-Rey, E. et al. (2010) Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 241–248
- 40) Grisendi, G. et al. (2010) Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer Res.* 70, 3718–3729
- 41) Gruessner RW. Immunosuppression after pancreas transplantation. *Transplant Proc* 2005. 37:1663-1666.
- 42) Gruessner AC1, Gruessner RW1. Pancreas Transplantation of US and Non-US Cases from 2005 to 2014 as Reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). *Rev Diabet Stud.* 2016 Spring;13(1):35-58.
- 43) Güell M, Niu D, Kan Y, et al. PERV inactivation is necessary to guarantee absence of pig-to-patient PERVs transmission in xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2017;24(6):10.1111/xen.12366. doi:10.1111/xen.12366
- 44) Gylfe E. Glucose control of glucagon secretion-'There's a brand-new gimmick every year'. *Ups J Med Sci.* 2016;121(2):120-132. doi:10.3109/03009734.2016.1154905

- 45) Hayashi M, Yamada H, Uehara S et al (2003) Secretory granule-mediated co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islets of Langerhans. *J Biol Chem* 278:1966–1974
- 46) Hassan N, Oyarzun-Ampuero F, Lara P, Guerrero S, Cabuil V, Abou-Hassan A, Kogan M.J. Flow Chemistry to Control the Synthesis of Nano and Microparticles for Biomedical Applications. *Curr Top Med Chem*. 2014 Mar;14(5):676-89. doi:10.2174/1568026614666140118213915.
- 47) Henquin JC (2009) Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 52:739–751
- 48) Heo JS, Choi Y, Kim HS, Kim HO. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med*. 2016; 37(1):115-25. doi:10.3892/ijmm.2015.2413.
- 51) Hua XF, Wang YW, Tang YX, et al. Pancreatic insulin-producing cells differentiated from human embryonic stem cells correct hyperglycemia in SCID/NOD mice, an animal model of diabetes. *PLoS One*. 2014;9(7):e102198. doi:10.1371/journal.pone.0102198.
- 52) Huypens P, Ling Z, Pipeleers D, Schuit F (2000) Glucagon receptors on human islet cells contribute to glucose competence of insulin release. *Diabetologia* 43:1012–1019
- 53) Ionescu-Tirgoviste C, Gagniuc PA, Gubceac E, Mardare L, Popescu I, Dima S, Militaru M. A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas. *Sci. Rep.* 2015, 5, 14634.
- 54) Ize-Ludlow D., Sperling M. (2005) The classification of diabetes mellitus: a conceptual framework. *Pediatr Clin N Am* 54: 1533-1552.
- 55) Jara C, Oyarzun-Ampuero F, Carrión F, González-Echeverría E, Cappelli C, Caviedes P. Microencapsulation of cellular aggregates composed of differentiated insulin and glucagon-producing cells from human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. *Diabetol Metab Syndr*. 2020;12:66. Published 2020 Aug 5. doi:10.1186/s13098-020-00573-9.
- 56) Jeon K, Lim H, Kim JH, et al. Differentiation and transplantation of functional pancreatic beta cells generated from induced pluripotent stem cells derived from a type 1 diabetes mouse model. *Stem Cells Dev*. 2012;21(14):2642-2655. doi:10.1089/scd.2011.0665

- 58) Johansson KA, Dursun U, Jordan N 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: 457–465.
- 59) Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 1994; 371: 606–609.
- 60) Josiah, D.T. et al. (2010) Adipose-derived stem cells as therapeutic delivery vehicles of an oncolytic virus for glioblastoma. *Mol. Ther.* 18, 377–385
- 61) Kang HM., Kim J., Park S., Kim J., Kim H., Kim KS., Lee EJ., Seo SI., Kang SG., Lee JE., Lim H. Insulin-secreting cells from human eyelid-derived stem cells alleviate type I diabetes in immunocompetent mice. *Stem Cells*. 2009 Aug;27(8):1999-2008. doi: 10.1002/stem.127.
- 62) Keller U, Chiasson JL, Liljenquist JE, Cherrington AD, Jennings AS, Crofford OS. The roles of insulin, glucagon, and free fatty acids in the regulation of ketogenesis in dogs. *Diabetes*. 1977 Nov;26(11):1040-51.
- 63) Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., Bieback, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells*. 2006, 24: 1294-1301.
- 64) Kimsa MC, Strzałka-Mrozik B, Kimsa MW, et al. Porcine endogenous retrovirus infection changes the expression of inflammation-related genes in lipopolysaccharide-stimulated human dermal fibroblasts. *Ann Transplant*. 2013;18:576-586. Published 2013 Oct 25. doi:10.12659/AOT.889310
- 65) Kumar D. Insulin antibodies: reduction in various anti-insulin IgG subclasses with human insulin therapy. *Horm Metab Res*. 1993;25(7):360-364. doi:10.1055/s-2007-1002120
- 66) Lee D, Kim NY, Bae GE, et al. Transmissible infection of human 293T cells with porcine endogenous retroviruses subgroup a from NIH-miniature pig. *Transplant Proc*. 2008;40(10):3742-3745. doi:10.1016/j.transproceed.2008.09.035
- 67) Leung YM1, Ahmed I, Sheu L, Gao X, Hara M, Tsushima RG, Diamant NE, Gaisano HY. *Endocrinology*. 2006 May;147(5):2155-62. Epub 2006 Feb 2. Insulin regulates islet alpha-cell function by reducing KATP channel sensitivity to adenosine 5'-triphosphate inhibition.
- 68) Leibiger B, Moede T, Muhandiramlage TP et al (2012) Glucagon regulates its own synthesis by autocrine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:20925–20930

- 69) Li CY., Wu XY., Tong JB., Yang XX., Zhao JL., Zheng QF., Zhao GB., Ma ZJ. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2015 Apr 13;6:55. doi: 10.1186/s13287-015-0066-5.
- 70) Liese AD, D'Agostino RB Jr, Hamman RF, et al. The burden of diabetes mellitus among US youth: prevalence estimates from the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *peds* 2006;118:1510–1518.
- 71) Maahs, D., West, N., Lawrence, J. and Mayer-Davis, E.: Chapter 1: Epidemiology of Type 1 Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010 Sep; 39(3): 481–497.
- 72) Matsumoto S, Abalovich A, Wechsler C, Wynyard S, Elliott RB. Clinical Benefit of Islet Xenotransplantation for the Treatment of Type 1 Diabetes. *EBioMedicine.* 2016, 12:255-262.
- 73) Mobasser M, Shirmohammadi M, Amiri T, Vahed N, Hosseini Fard H, Ghojzadeh M. Prevalence and incidence of type 1 diabetes in the world: a systematic review and meta-analysis. *Health Promot Perspect.* 2020;10(2):98-115. Published 2020 Mar 30. doi:10.34172/hpp.2020.18
- 74) Mohamad M., Seng H., Chung L., Saim A., Idrus R. (2012) In vitro generation of functional insulin-producing cells from lipoaspirated human adipose tissue-derived stem cells. *Archives of medical research* 43, 83-88.
- 75) Morch, Y.A., Donati, I., Strand B.L., Skjak Braek, G. Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on alginate microbeads, *Biomacromolecules* 7 (2006) 1471–1480.
- 76) Morozov VA, Wynyard S, Matsumoto S, Abalovich A, Denner J, Elliott R. No PERV transmission during a clinical trial of pig islet cell transplantation. *Virus Res.* 2017;227:34-40. doi:10.1016/j.virusres.2016.08.012
- 77) Omer A, Duvivier-Kali V, Fernandes J, Tchipashvili V, Colton CK, Weir GC. Long-term normoglycemia in rats receiving transplants with encapsulated islets. *Transplantation.* 2005;79(1):52-58. doi:10.1097/01.tp.0000149340.37865.46.
- 78) Pambianco G, Costacou T, Ellis D, Becker DJ, Klein R, Orchard TJ. The 30-year natural history of type 1 diabetes complications: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience. *diab* 2006;55:1463–1469.
- 79) Paredes-Juárez GA, Spasojevic M, Faas MM, de Vos P. Immunological and technical considerations in application of alginate-based microencapsulation systems. *Front Bioeng Biotechnol.* 2014, Aug 6;2:26.

- 80) Pedersen MG, Tagliavini A, Cortese G, Riz M, Montefusco F. Recent advances in mathematical modeling and statistical analysis of exocytosis in endocrine cells. *Math Biosci.* 2017;283:60-70. doi:10.1016/j.mbs.2016.11.010
- 81) Qi M, Strand BL, Mørch Y, et al. Encapsulation of human islets in novel inhomogeneous alginate-calcium/barium microbeads: in vitro and in vivo function. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2008; 36(5):403-402. doi:10.1080/10731190802369755.
- 82) Ravier MA, Rutter GA. Glucose or insulin, but not zinc ions, inhibit glucagon secretion from mouse pancreatic alpha-cells. *Diabetes.* 2005 Jun;54(6):1789-97.
- 83) Rezania A., Riedel M., Wideman R., Karanu F., Ao Z., Warnock G., Kieffer T. (2011) Production of functional glucagon-secreting cells from human embryonic stem cells. *Diabetes* 60, 239-247.
- 84) Rorsman P, Renstrom E (2003) Insulin granule dynamics in pancreatic β cells. *Diabetologia* 46:1029–1045
- 85) Rukstalis JM., Habener JF. Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration. *Islets.* 2009 Nov-Dec;1(3):177-84.
- 86) Ryan EA, Lakey JRT, Rajotte RV, G. Korbitt, T. Kin, S. Imes, A. Rabinovitch, J. Elliott, D. Bigam, NM. Kneteman, GL. Warnock, I. Larsen and AM. James Shapiro. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* 2001, 50:710–719.
- 87) Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Shapiro AM. Risks and side effects of islet transplantation. *Curr Diab Rep.* 2004, Aug;4(4):304-9.
- 88) Saito H., Takeuchi M., Chida K., Miyajima A. (2011) Generation of glucose-responsive functional islets with a tree-dimensional structure from mouse fetal pancreatic cells and iPS cells in vitro. *PloS ONE.* 6(12), e28209.
- 89) Schernthaner G. Immunogenicity and allergenic potential of animal and human insulins. *Diabetes Care.* 1993;16 Suppl 3:155-165. doi:10.2337/diacare.16.3.155.
- 90) Schneider S, Feilen PJ, Brunnenmeier F, et al. Long-term graft function of adult rat and human islets encapsulated in novel alginate-based microcapsules after transplantation in immunocompetent diabetic mice. *Diabetes.* 2005;54(3):687-693. doi:10.2337/diabetes.54.3.687.
- 91) Seino, S. Cell signalling in insulin secretion: the molecular targets of ATP, cAMP and sulfonylurea. *Diabetologia* 55, 2096–2108 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2562-9>.

- 92) Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* (2000) Jul 27;343(4):230-8.
- 93) Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, Secchi A, Brendel MD, Berney T, Brennan DC, Cagliero E, Alejandro R, Ryan EA, DiMercurio B, Morel P, Polonsky KS, Reems JA, Bretzel RG, Bertuzzi F, Froud T, Kandaswamy R, Sutherland DE, Eisenbarth G, Segal M, Preiksaitis J, Korbitt GS, Barton FB, Viviano L, Seyfert-Margolis V, Bluestone J, Lakey JR. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med.* 2006, 355(13):1318-1330.
- 94) St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* 1997; 387: 406–409.
- 95) Sosa-Pineda B., Chowdhury K., Torres M., Oliver G., Gruss P. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature.* 1997 Mar 27;386(6623):399-402.
- 96) The DCCT Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977–986.
- 97) The DCCT Research Group. Epidemiology of severe hypoglycemia in the diabetes control and complications trial. *Am J Med* 1991;90:450–459.
- 98) Nathan, David M, and DCCT/EDIC Research Group. “The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview.” *Diabetes care* vol. 37,1 (2014): 9-16. doi:10.2337/dc13-2112.
- 99) Timper K., Seboek D., Eberhardt M., Linscheid P., Christ-Crain M., Keller U., Müller B., Zulewski H. (2006) Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341, 1135-1140.
- 100) Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 1996. 85(3):291-297.
- 101) Toledo PC, Rossi RL, Caviedes P. Microencapsulation of Parathyroid Cells for the Treatment of Hypoparathyroidism. *Methods Mol Biol.* 2017; 1479:357-363. doi: 10.1007/978-1-4939-6364-5_27.

- 102) Tuch BE, Keogh GW, Williams LJ, Wu W, Foster JL, Vaithilingam V, Philips R. Safety and viability of microencapsulated human islets transplanted into diabetic humans. *Diabetes Care* 2009. 32(10):1887-1889.
- 103) Thunander M, Petersson C, Jonzon K, et al. Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults and children in Kronoberg, Sweden. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;82:247–255. [PubMed: 18804305]
- 104) Unger RH, Aguilar-Parada E, Müller WA, Eisentraut AM. Studies of pancreatic alpha cell function in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest*. 1970 Apr;49(4):837-48.
- 105) Vanikar A., Dave S., Thakkar U., Trivedi H. (2010) Cotransplantation of adipose tissue-derived insulin-secreting mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells: a novel therapy for insulin-dependent diabetes mellitus. *Stem cell international*. ID 582382, 5 pages.
- 106) Valdes-Gonzalez R, Dorantes LM, Bracho-Blanchet E, Rodríguez-Ventura A, White DJ. No evidence of porcine endogenous retrovirus in patients with type 1 diabetes after long-term porcine islet xenotransplantation. *J Med Virol*. 2010;82(2):331-334. doi:10.1002/jmv.21655
- 107) Vossmerbaeumer, U. et al. (2009) Retinal pigment epithelial phenotype induced in human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 11, 177–188
- 108) Wilinska M., et al. (2009) Overnight closed-loop insulin delivery with model predictive control: Assessment of hypoglycemia and hyperglycemia risk using simulation studies. *J Diabetes Sci Tech* 2:1109-1120.
- 109) Xu E1, Kumar M, Zhang Y, Ju W, Obata T, Zhang N, Liu S, Wendt A, Deng S, Ebina Y, Wheeler MB, Braun M, Wang Q. Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system. *Cell Metab*. 2006 Jan;3(1):47-58.
- 110) Yang SF., Xue WJ., Duan YF., Xie LY., Lu WH., Zheng J., Yin AP. Nicotinamide Facilitates Mesenchymal Stem Cell Differentiation into Insulin-Producing Cells and Homing to Pancreas in Diabetic Mice. *Transplant Proc*. 2015 Jul-Aug;47(6):2041-9.
- 111) Zhao L, Guo M, Matsuoka Ta et al. The islet β -cell-enriched MafA activator is a key regulator of insulin gene transcription. *J Biol Chem* 2005; 280: 11887–11894.
- 112) Zolocheska, O. et al. (2011) Pigment epithelial-derived factor and melanoma differentiation associated gene-7 cytokine gene therapies delivered by adipose-derived stromal/mesenchymal stem cells are effective in reducing prostate cancer cell growth. *Stem Cells Dev*. DOI: 10.1089/scd.2011.0247

113) Zuk, P.A. et al. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279–4295.