



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Oligonucleótidos inmunomoduladores para el tratamiento de la diabetes tipo 1. Efectos y mecanismo de acción del IMT504

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área de Química Biológica

Sofía Gómez Bustillo

Director de tesis: Dr. Alejandro Montaner

Consejero de estudios: Dr. Diego Laderach

Lugar de trabajo: Instituto de Ciencia y Tecnología “Dr. César Milstein”
(CONICET – Fundación P. Cassará)

Buenos Aires, 2024

A Erika

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FCEN- UBA) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la formación.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología César Milstein (ICT-Milstein) y al Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) por el lugar de trabajo. Al Dr. Alejandro Montaner por dirigir esta tesis.

A The company of biologist y al laboratorio de la Dra. Carolin Daniel en el Helmholtz Zentrum por la oportunidad de desarrollar una parte fundamental de la tesis en Alemania. Tanto a nivel académico como personal la experiencia superó mis expectativas.

A Silvia Bianchi por su apoyo y compromiso académico, pero por sobre todo le agradezco la enorme vocación de enseñar, la dedicación en cada experimento, los fines de semana invertidos en ciencia, por ser una solucionadora de problemas, por todos los NOD que logra mantener y las muchas horas dedicadas a sus becarios.

A los amigos que me acompañaron todo este tiempo y más. A las pinky's y cerebro (Dani, Lau, La tota y Veri) con ustedes los 5 años fueron todo, gracias por estar, de verdad estuvieron en los momentos más fuertes de mi vida. Las quiero!! Al team del austral, Romi, Tucu, Pablo y Marce, con ustedes ciencia y religión todo la vida. A Erika, la hermana que me dio la vida y se la llevó la diabetes. Fue mi motor para empujar este doctorado en un contexto donde nadie acompaña la ciencia. A mi negrito, que me acompaña desde la facultad sin ranchar, lo que te quiero es gigante como vos.

A mi familia por haber aprendido de la diabetes y la palabra mesenquimales y por su infinita confianza en mi para que revise sus análisis de sangre. Son parte en cada momento y de distinta forma me acompañaron en momentos clave del doctorado. Viejita tus mimos y charlas lo son todo. Panza el empuje, el foco y el dulce de leche no pueden faltar llegar hasta acá. Larva gracias por tu estoicismo y por el ego de ryan que me regalaste en un momento justo, sin eso no escribía.

Resumen

Oligonucleótidos inmunomoduladores para el tratamiento de la diabetes tipo 1.
Efectos y mecanismo de acción del IMT504.

La diabetes tipo 1 (DT1) es una enfermedad autoinmune donde las células beta del páncreas son destruidas por células inmunológicas. Actualmente no existe ninguna intervención clínica efectiva y, por ende, los pacientes deben ser tratados de por vida con insulina. De todas formas, este tratamiento no es suficiente para evitar las complicaciones a largo plazo y, además, la calidad de vida de los pacientes está limitada. Avances en inmunología y regeneración permitieron el desarrollo de nuevos tratamientos, sin embargo, su uso se vio limitado por la necesidad crónica de medicamentos inmunosupresores. Por lo tanto, nuevas estrategias son indispensables para prevenir, tratar y/o curar la DT1. En este contexto, surge el uso de oligonucleótidos (ODNs) inmunomoduladores de la familia PyNTTTGT. El IMT504, prototipo de esta familia y conocido por sus propiedades regenerativas, ha demostrado reducir los niveles de glucemia en ratones diabéticos no obesos (NOD/LtJ). En este proyecto de tesis, evaluamos el efecto del IMT504 sobre células madre mesenquimales (MSCs) extraídas de médula ósea y células linfoides [linfocitos B (LB) y linfocitos T (LT)] extraídas del bazo, páncreas y nódulos linfáticos drenantes. MSCs y linfocitos de ratones NOD prediabéticos (pre-DT1) y diabéticos (DT1) fueron tratados *in vitro* con diferentes dosis de IMT504 (entre 0,5 y 20 µg/ml). Además, realizamos ensayos de viabilidad, proliferación y migración en MSCs. Determinamos que dosis bajas del IMT504 estimulan la formación de unidades formadoras de colonias [CFU-F (10^6 células sembradas/cm²): IMT504: 85 vs Control: 65 p<0.05] e inducen la

capacidad migratoria (índice migratorio: IMT504: 75 vs Control: 20, p<0.05). El efecto inductor fue detectado con la dosis de 0,5 µg/ml, mientras que dosis mayores a 10,5 µg/ml no generaron diferencias o incluso lograron el efecto contrario. Asimismo, no obtuvimos diferencias significativas en la activación y proliferación de LB de bazo luego del tratamiento con dosis altas de IMT504. Respecto a los LT, utilizamos células aisladas de páncreas o nódulos linfáticos. La población de interés se separó por citometría de flujo y se estimuló *in vitro* con 0,5 µg/ml de IMT504 o de ODN control. Luego de la estimulación, se midió la actividad y funcionalidad de los linfocitos (inducción de células T reguladoras y expresión de genes por citometría y activación de vías de señalización por qPCR). El IMT504 indujo la producción de TGF-β (p < 0.05 vs control), citoquina que estimula propiedades regenerativas en células madre y en las células β pancreáticas. Además, analizamos las vías de señalización moleculares involucradas en la desregulación de la DT1. Observamos una reducción en los niveles de PI3K (p < 0.01 vs control), mTOR (p < 0.05 vs control) y STAT (p < 0.01 vs control). La disminución en la expresión de estos genes está relacionada con altos niveles del transportador de glucosa 1 (GLUT1), la normoglucemia y la reprogramación celular hacia células tipo β, respectivamente. También observamos que la expresión de MAP3K7, asociada con la destrucción de células β, disminuye (p < 0.05 vs control). En conclusión, nuestros resultados indican que el IMT054 ejerce un efecto sobre las MSCs, que podrían ser partícipes de la regeneración observada y, sobre los LT, de forma de apagar o disminuir la respuesta auto inflamatoria que lleva al establecimiento y desarrollo de la DT1.

Palabras Clave: Diabetes tipo uno, NOD, Oligonucleótidos, IMT504, células madre mesenquimales, modulación del sistema.

Abstract

Immunomodulatory oligonucleotide for type 1 diabetes treatment. Effects and action mechanism of IMT504.

Type 1 diabetes (T1D) is a multifactorial autoimmune disease where autoreactive T cells destroy insulin-producing pancreatic β-cells. Currently, there are no effective clinical interventions for T1D, and patients rely on insulin treatment for life. There is a consensus that new innovative approaches to predict, treat, and prevent T1D. Different strategies to modulate the immunological response and restore β-cell mass have been performed but are limited by the availability of grafts and the need for chronic immunosuppression. IMT504 is the prototype of the PyNTTTGT family of immunomodulatory oligonucleotides (ODNs), which are known for their regenerative properties and have been shown to be effective in lowering glycemia in nonobese diabetic (NOD/LtJ or simply NOD) mice. Here, we investigate the effect of IMT504 on bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) and splenocytes in NOD/LtJ mice. BM-MSCs and splenocytes from pre-diabetic and diabetic NOD mice were treated in vitro with different doses of IMT504 (from 0.5 to 20 µg/ml). Fibroblast colony-forming units (CFU-F) that originate MSCs, viability, and migration assays were assessed. It was determined that 0.5 µg/ml of IMT504 stimulated MSCs (CFU-F (10⁶ seed cells/cm²): IMT504: 85 vs. Control: 65, p<0.05) and migration capacity (migration index: IMT504: 75 vs. Control: 20, p<0.05). No differences were observed in splenocyte activation/proliferation at higher doses. Also, we investigate the effect of the ODN IMT504 on T cells from NOD mice. Infiltrating T cells were isolated from the pancreas and lymph nodes of pre-diabetic and diabetic NOD mice. Cells were then

sorted and treated in vitro with 0.5 µg/ml IMT504 or control ODN. After treatment, lymphocyte activity and functionality were characterized (differentiated T cell subsets, gene expression (cytometry), activated signaling pathways (qPCR), and induction of regulatory T cells (cytometry)). IMT504 induced TGF-β (*p < 0.05 vs. control), a cytokine that stimulates regenerative properties in stem cells and higher β-cell number. We analyzed the molecular signaling pathways involved in the deregulation of T1D. We measured lower levels of PI3K (*p < 0.01 vs. control), mTOR (*p < 0.05 vs. control), and STAT (*p < 0.01 vs. control). Downregulation of these genes is associated with higher levels of glucose transporter 1 (GLUT1), normalized glycemia, and cellular reprogramming into β-like cells, respectively. MAP3K7 expression, which is associated with β cell destruction, was also downregulated (*p < 0.05 vs. control). In conclusion, our results indicate that IMT504 exerts an effect on MSCs and T cells that may prevent the onset of diabetic autoimmunity.

Keywords: type one diabetes, NOD, oligonucleotide, IMT504, mesenchymal stem cells, immune system modulation.

Índice

ÍNDICE.....	9
ABREVIATURAS.....	11
INTRODUCCIÓN	12
1. <i>Diabetes mellitus.....</i>	13
1.1 Epidemiología de la Diabetes mellitus	15
1.2 Etiología y patogenia.....	18
1.3 Sistema inmune en la diabetes tipo 1	26
1.4 Tratamientos y perspectivas	33
1.5 Modelo animal	36
2. <i>Oligonucleótidos: características generales.....</i>	39
2.1 <i>Oligonucleótidos inmunomoduladores.....</i>	41
2.2 Características del IMT504	43
2.3 Efectos del IMT504 sobre distintas poblaciones celulares.....	45
2.4 Efectos del IMT504 sobre distintos modelos experimentales	47
HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL	49
HIPÓTESIS.....	50
OBJETIVO GENERAL	50
CAPÍTULO 1.....	51
1.1 Efecto del IMT504 en células madre mesenquimales	52
1.2 Objetivo particular.....	57
1.3 Materiales y métodos	58
1.3.1 Oligonucleótidos.....	58
1.3.2 Modelo animal	59
1.3.3 Cultivo primario de células madre mesenquimales.....	60
1.3.4 Ensayo de unidades formadoras de colonias.	61
1.3.5 Ensayo de herida	62
1.3.6 Ensayo de viabilidad	63
1.3.7 Inmunofluorescencia	64
1.3.8 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	65
1.4 Resultados	67
1.4.1 Efecto del IMT504 en la proliferación de células madre mesenquimales	67
1.4.2 Sitio de unión del IMT504 en las células madre mesenquimales	73
1.4.3 Efecto del IMT504 sobre la movilización de las células madre mesenquimales	75
1.4.4 Efecto del IMT504 en la expresión génica de las células madre mesenquimales	79
1.5 Discusión.....	81
CAPÍTULO 2.....	85
2.1 Efecto del IMT504 en células del sistema inmunológico	86
2.2 Objetivos particulares.....	91
2.3 Materiales y métodos	92
2.3.1 Modelo animal	92
2.3.2 Disección de nódulos linfáticos y bazo, seguido de extracción de células linfoides.	93
2.3.3 Aislamiento de células T naïve.....	94
2.3.4 Activación de esplenocitos con IMT504	95
2.3.5 Inducción de células T reguladoras.....	96
2.3.6 Inducción ex vivo de citoquinas.....	98
2.3.7 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	100
2.4 Resultados	102
2.4.1 Efecto del IMT504 en la activación de esplenocitos.....	102

2.4.2	Efecto del IMT504 sobre la inducción de células T reguladoras.....	104
2.4.3	Efecto en la síntesis de citoquinas pro y antiinflamatorias luego del tratamiento de linfocitos T con IMT504	106
2.4.4	Vías de señalización reguladas por el tratamiento de linfocitos T con IMT504.....	108
2.5	<i>Discusión</i>	110
CAPÍTULO 3.....		114
3.1	<i>Efecto del IMT504 en células madre mesenquimales en un modelo hepático</i>	115
3.2	<i>Objetivos particulares</i>	122
3.3	<i>Materiales y métodos</i>	123
3.3.1	Cepas de ratón y cruzas realizadas para trazado de linaje	123
3.3.2	Tratamiento con IMT504 en animales con fibrosis	125
3.3.3	Citometría de flujo	126
3.3.4	Ensayo de unidades formadoras de colonias a partir de células de médula ósea	127
3.3.5	Diferenciación <i>in vivo</i> de células Wnt ⁺ de la médula ósea en células tipo hepatocitos y células endoteliales	128
3.3.6	Proliferación de células de médula ósea Wnt ⁺ tratadas con IMT504	129
3.3.7	Ensayo de herida de células de médula ósea Wnt ⁺ inducidas con IMT504	130
3.3.8	Ensayo de inducción de Wnt1 en cultivos primarios de pericitos trazados de ratones Wnt1 ^{Cre} ;Rosa26 ^{Tom} mediante empleo de IMT504	131
3.4	<i>Resultados</i>	132
3.5	<i>Discusión</i>	141
CONCLUSIÓN		143
BIBLIOGRAFÍA		146
SUPLEMENTARIAS.....		162

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico	Ig: Inmunoglobulinas
ADNc: ácido desoxirribonucleico copia	LB: Linfocitos B
ARN: ácido ribonucleico	L-glu: L-glutamina
BM: médula ósea	LoxP: Loci de recombinación P1
BMMCs: células mononucleares de médula ósea	LT: Linfocitos T
BM-MSCs: células madre mesenquimales de médula ósea	mDC: célula dendrítica madura
CAT#: número de catálogo	MDSCs: Células mieloide supresoras
CD: grupo de diferenciación	miRNA: micro ácido ribonucleico
CMH-I: complejo mayor de histocompatibilidad clase 1	MSCs: Células madre mesenquimales
CMH-II: complejo mayor de histocompatibilidad clase 2	MP: Metilfosfonato
Cre: Recombinación cíclica	NK: Asesinas naturales
CTS: Cataract Shionogi strain	NOD: Diabéticos no obesos
DC: Células dendríticas	ODN: Oligonucleótido
DG: Diabetes gestacional	PBMCs: células mononucleares de sangre periférica
DM: Diabetes mellitus	PBS: Tampón fosfato salino
DT1: diabetes tipo 1	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
DT2: diabetes tipo 2	pDC: Células dendríticas plasmacitoides
E/P/A: estreptomicina/ penicilina/ anfotericina A	Pre-DT1: Prediabético
GLUT1: Transportador de glucosa tipo 1	PS: Fosforotioato
H: Hora	SFB: Suero fetal bovino
HLA: antígeno leucocitario humano	TAA: Tioacetamida
HLCs: Células tipo hepatocito	TAE: Tris-Acetato-EDTA
	Treg: T reguladores

Introducción

1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas de múltiples etiologías. Se caracteriza por hiperglucemia crónica y trastornos en el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas, resultado de defectos en la secreción de insulina, en la acción de esta o ambas^{1,2}. Actualmente se puede clasificar la DM según su etiología en diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes mellitus gestacional y un grupo grande, pero con poca incidencia, de tipos específicos de diabetes.

La diabetes tipo 1 (DT1) autoinmune, originalmente llamada insulino dependiente o diabetes juvenil, se caracteriza por una insuficiencia absoluta de insulina, como consecuencia de la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas (célula β)^{1,3}. Representa el 5-10% de todos los tipos de diabetes. En general comienza en la niñez o adolescencia, aunque hay una forma de presentación menos frecuente y de progresión lenta que se da en los adultos denominada diabetes autoinmune latente del adulto⁴ (LADA, del inglés latent autoimmune diabetes of the adult). En algunas formas de DT1, denominadas idiopáticas, su etiología es desconocida y se caracterizan por insulinopenia sin evidencias de destrucción de células β asociada a autoinmunidad^{5,6}.

La diabetes tipo 2 (DT2) se asocia con defectos en la secreción y/o acción de la insulina debidos a la insulinorresistencia primaria. Ocurre típicamente en individuos con sobrepeso o aumento de grasa abdominal y representa el 90-95% de los casos de diabetes^{1,7}.

La diabetes mellitus gestacional (DG) se define como una intolerancia a los hidratos de carbono de severidad variable que comienza o se diagnostica durante el segundo o tercer trimestre de embarazo⁸.

Además, hay tipos específicos menos frecuentes de diabetes que surgen como consecuencia secundaria. En este grupo tenemos la diabetes asociada a defectos genéticos que llevan a una disfunción en las células β , como pueden ser la diabetes neonatal o diabetes del adulto de inicio juvenil (MODY: del inglés maturity onset diabetes of the young). Los distintos tipos de MODY se caracterizan por la secreción deficiente de insulina⁹. Otro tipo de diabetes surge por enfermedades del páncreas exocrino (fibrosis quística, neoplasias, pancreatitis, entre otras), donde se pierde la capacidad de regular la glucosa¹⁰. Además, existen diabetes debidas a endocrinopatías, diabetes inducida por drogas o químicos (tratamiento prolongado con glucocorticoides en HIV o postransplante), infecciones (citomegalovirus, rubeola congénita) y, por último, diabetes asociadas con otros síndromes genéticos (trisomía 21, Turner, Klinefelter, entre otros)^{5,6}.

1.1 Epidemiología de la Diabetes mellitus

En el último siglo, el mundo se enfrenta con un fenómeno de explosión demográfica de la DM con aumentos significativos en la incidencia y prevalencia de la enfermedad. Globalmente, en 2021 alrededor de 537 millones de personas de entre 20 y 79 años han sido diagnosticados con diabetes y se proyecta que en 2045 estos valores van a alcanzar los 783 millones de personas en la misma franja etaria, lo que representa el 12.2% de la población mundial (**Figura 1**). Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, del total de personas con diabetes, el 95% de los casos presenta DT2 y el 5% restante DT1. En Argentina, por ejemplo, 1,8 millones de personas de entre 20-79 años padecen la enfermedad, lo que representa el 6% de la población. Es fundamental tener en cuenta que se estima alrededor de 240 millones de personas a nivel mundial sin diagnóstico y que el mayor porcentaje de estas personas se encuentra en los países con menos ingresos per cápita¹¹.

A nivel mundial, la diabetes es una causa importante de ceguera, insuficiencia renal, cardiopatías, accidentes cerebrovasculares y amputaciones. En el año 2021, la diabetes fue responsable de la muerte de 6,7 millones de personas¹². En el caso de niños y adolescentes (0 a 19 años), el número de enfermos aumenta anualmente, donde alrededor de 1,2 millones manifiestan DT1. Asimismo, la diabetes gestacional o hiperglucemia durante el embarazo afecta a 1 de cada 6 embarazadas en todo el mundo.

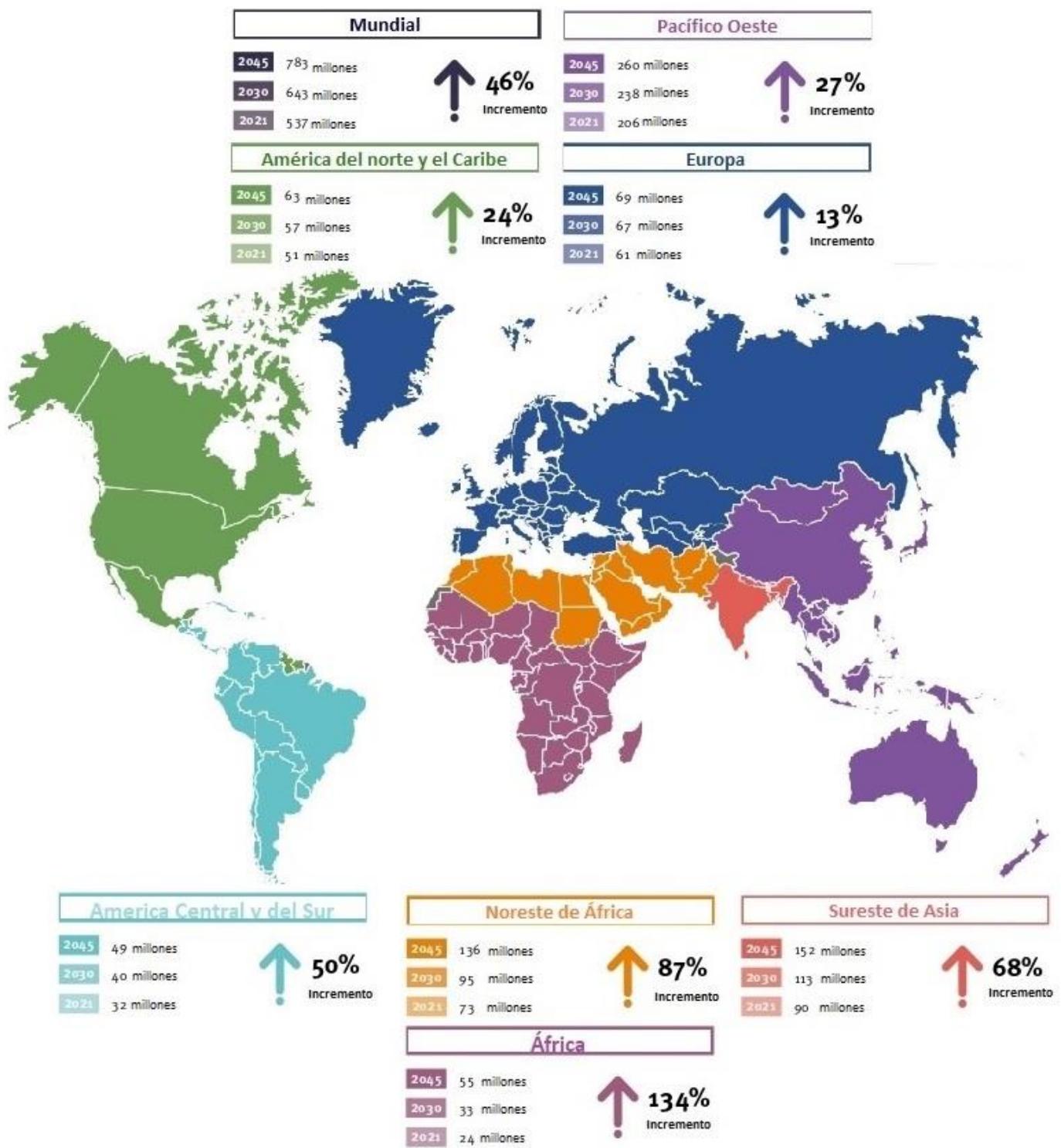


Figura 1: Número de personas entre 20-79 años con diabetes a nivel mundial y por región en 2021 y estimaciones para 2045. Adaptación de la 10^a edición del Atlas de la Federación Internacional de Diabetes.

El incremento en el número de personas con diabetes es multifactorial, como pueden ser los cambios en la alimentación, mayor esperanza de vida y mejoras en los métodos de detección. Pero, a pesar de los avances, se estima que hay un 45% de personas diabéticas sin diagnóstico, mayormente del tipo DT2. La detección tardía, así como la ausencia o complejidad del tratamiento, genera un déficit de insulina e hiperglucemia que llevan a complicaciones macro y microvasculares asociadas. Estas complicaciones son la retinopatía (32%), la neuropatía (25%), la nefropatía (23%), la enfermedad cardiovascular y las amputaciones^{13,14}.

La progresión de la enfermedad con complicaciones agudas y crónicas no solo reduce la calidad y expectativa de vida de los pacientes, sino que además representa un elevado costo socioeconómico^{15,16}. De lo expuesto, surge la necesidad de mejorar la eficacia en las estrategias de prevención, tanto en programas de detección, como en los de seguimiento y tratamiento de la enfermedad.

1.2 Etiología y patogenia

El páncreas es una glándula mixta compuesta por una porción exocrina, los acinos, y una porción endocrina, representada por los islotes de Langerhans. Los acinos representan el 98% de la masa pancreática y es donde se producen las enzimas digestivas. Los islotes representan el 2% de la masa y se encargan de la síntesis de hormonas vitales para la homeostasis metabólica¹⁷. Estos islotes están formados por cinco tipos principales de células secretoras de hormonas:

- Células α: secretoras de GLUCAGON (25%)
- Células β: secretoras de INSULINA (60%)
- Células δ: secretoras de SOMATOSTATINA (10%)
- Células PP y ε: secretoras del polipéptido pancreático y grelina (5%)

El número total de células β productoras de insulina es un factor crítico en la regulación de la homeostasis de la glucosa. El número de células está determinado durante el final de la gestación y los primeros días después del nacimiento pero, además, está regulado por mecanismos de replicación y apoptosis celular durante la vida del individuo. Alteraciones que llevan a una reducción en el número de células β generan un estado de insulinopenia, que puede terminar con el establecimiento de patologías metabólicas como puede ser la diabetes^{17–19}. Como se menciona anteriormente, la DT1 se caracteriza por la destrucción total o parcial de las células β y, por ende, los niveles de insulina disminuyen significativamente.

En el último tiempo se ha determinado que tanto factores genéticos como epigenéticos y ambientales están involucrados en la etiología de la DT1. Además de

determinar el tipo de células inmunes efectoras que van a guiar el proceso inflamatorio que lleva al desarrollo de la patología, estos factores generan defectos en las funciones de la médula ósea (BM, del inglés bone marrow) y el timo, en el sistema inmune y en las células β del páncreas, que colectivamente contribuyen en la fisiopatología de la DT1 (**Figura 2**)²⁰.

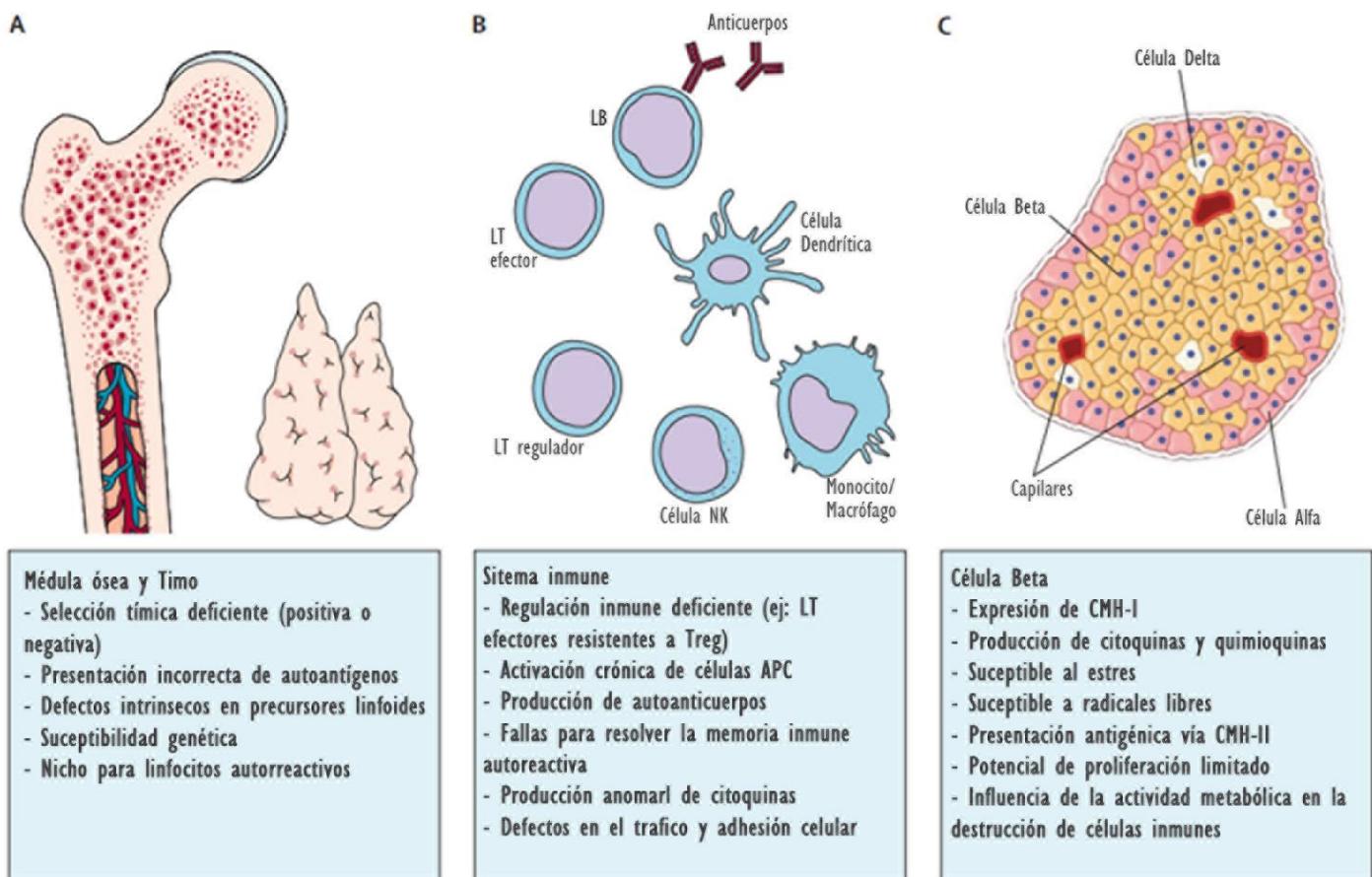


Figura 2: Procesos fisiopatológicos que contribuyen al desarrollo de la diabetes tipo 1. Defectos en **(A)** la médula ósea y el timo, **(B)** el sistema inmune y **(C)** las células β pancreáticas llevan a la destrucción de células β , lo que reduce significativa o totalmente los niveles de insulina. Treg: linfocitos T reguladores. APC: células presentadoras de antígeno. CMH: complejo mayor de histocompatibilidad. Imagen editada y traducida de Mark A. Atkinson et al (2014).

Se ha demostrado que el componente hereditario de la DT1 es mayor al 80%. Los genes involucrados se expresan en células del sistema inmune y/o en células β pancreáticas. El componente genético está asociado principalmente al locus del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II DQ y DR, aunque también se han encontrado otros

genes no-HLA que llevan al desarrollo de la enfermedad^{21,22}. Los genes de HLA de clase II se expresan en células presentadoras de antígeno (APC) como las células dendríticas (DCs), los macrófagos y las células de epitelio tímico. Estas últimas, por ejemplo, presentan autoantígenos en el timo y así inducen la auto-tolerancia. Alelos HLA de clase II ineficientes permiten que linfocitos T autorreactivos escapen al mecanismo de selección negativa. Los genes del locus HLA de clase I están relacionados con el progreso de la DT1²³. Respecto a los genes no-HLA, podemos encontrar polimorfismo en el gen de insulina (Ins), el de la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4), la proteína tirosina fosfatasa no receptora 22 (PTPN22), el receptor de IL-2 (IL-2R), el interferón inducible con dominio de helicasa 1 (IFIH1), entre otros nuevos que se han logrado determinar^{21,24}. Alteraciones en CTLA4 llevan a una mala regulación de la respuesta inmune, es decir, fallas en el funcionamiento de los LT reguladores²⁵. IL-2R afecta tanto a LT reguladores como efectores, pero en este caso se ha visto que variantes del gen que inducen su expresión tienen un efecto protector de la diabetes²⁶.

Con respecto a las modificaciones epigenéticas, se han asociado principalmente las metilaciones en el ADN como factor de riesgo de la DT1, pero también hay modificaciones en la regulación de micro ARN (miRNA del inglés) e histonas. Estos factores, por ejemplo, reducen la transcripción del gen de insulina o alteran la respuesta de células del sistema inmune, entre otros efectos²⁷.

Otro de los factores mencionados que participan en el establecimiento de la DT1 es el ambiente. El desarrollo de la enfermedad se ve influenciado por determinados hábitos y costumbres de los individuos, así como por la exposición a microorganismos o toxinas. Diversos estudios demuestran que, la reducción en la microbiota intestinal, la obesidad, el consumo prematuro de leche y fruta, el gluten, la falta de vitamina D, ciertas toxinas y algunas infecciones virales, son importantes para el desarrollo de la patología.

Las toxinas, por ejemplo, inducen un mal procesamiento de la proinsulina, lo que termina con la activación de células autorreactivas²⁸. La falta de vitamina D lleva al mal funcionamiento de los linfocitos²⁹. Los virus pueden inducir un efecto citolítico directo sobre células β ³⁰. Entonces, podemos decir que el ambiente contribuye con cambios en la homeostasis del sistema inmune y así induce el desarrollo de la DT1³¹.

El mecanismo que gatilla el desarrollo de la DT1 no se conoce con exactitud, sin embargo, se han logrado determinar una serie de sucesos que llevan a ciertos individuos a un estado hiperglucémico. En líneas generales, la combinación de eventos desfavorables establece un estado autoinmune que permite el desarrollo de la diabetes (**Figura 3**). Es decir, el establecimiento de la enfermedad depende de la susceptibilidad genética de los individuos y de la presencia de uno o más disparadores ambientales^{31,32}.

Inicialmente, estos sucesos inducen la producción de IFN- α y la expresión de moléculas del CMH-I en las células β pancreáticas, que quedan expuestas a los linfocitos CD8 $^{+}$ autorreactivos. Al mismo tiempo, en los nódulos linfáticos pancreáticos, las células APC presentan antígenos de células β mientras que, en la periferia, el ambiente induce un cambio metabólico hacia un estado proinflamatorio que va a favorecer la respuesta autorreactiva de los LT efectores³³. En este contexto proinflamatorio, los LB reconocen autoantígenos y, con la ayuda de linfocitos CD4 $^{+}$, van a diferenciarse a células plasmacitoides y producir autoanticuerpos. Además, los linfocitos CD8 $^{+}$ autorreactivos proliferan y migran hacia el páncreas, generando una segunda ola de destrucción de células β ^{34,35}.

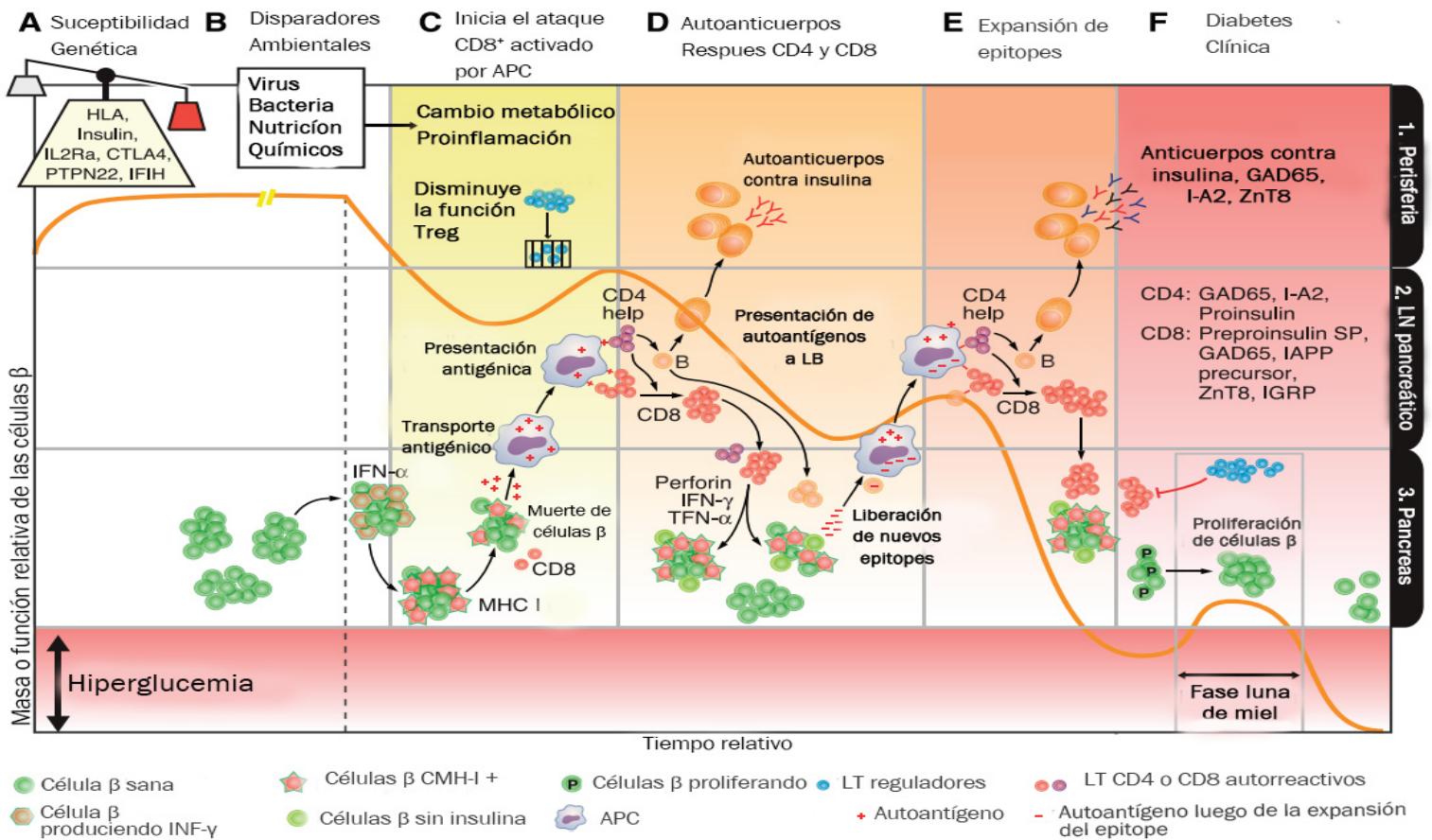


Figura 3: Hipótesis del desarrollo y establecimiento de la diabetes tipo 1 según la progresión de la respuesta inmunitaria (representado en columnas) en diferentes lugares anatómicos (representado en filas). Además, se muestra el deterioro en la función y número de las células β (curva naranja). Imagen adaptada y traducida de Tom L. Van Belle et al (2011).

Por un lado, la muerte celular estimula la liberación de nuevos autoantígenos que van a ser reconocidos por células APC y la generación de nuevos linfocitos CD4⁺, CD8⁺ y LB que retroalimentan la autoinmunidad. Por otro lado, el estrés producido por la masiva muerte de células β interrumpe la síntesis de insulina en las células β restantes²⁸. Podemos decir que llegar al estado hiperglucémico se debe a la retroalimentación positiva en células autorreactivas y, además, los mecanismos de autocontrol son disfuncionales, es decir, las células T reguladoras no logran mantener la homeostasis del sistema^{36,37}.

Curiosamente, la misma inflamación puede estimular la proliferación y funcionalidad de las células β , generando un estado de recaída y remisión constante hasta

que, finalmente, la respuesta autoinmune prevalece. En humanos con diabetes, el período de remisión es un estado transitorio donde hay producción de insulina y, por ende, control de la glucemia. Esta etapa se la conoce con el nombre de “fase de luna de miel”. En el modelo murino NOD esta etapa de remisión no se manifiesta y se asocia con una respuesta inmune más agresiva en estos animales³⁸.

La tasa de progresión de la enfermedad está determinada por la aparición de marcadores de autoinmunidad, intolerancia a la glucosa y la aparición de síntomas. Por este motivo, en la actualidad, la DT1 está dividida en 3 estadios. Individuos en el estadio 1 se caracterizan por presentar normoglucemia y la presencia de al menos dos autoanticuerpos, incluyendo IA-2, ZnT8, GAD65 e insulina³⁹. El salto al estadio 2 se determina con la prueba de tolerancia a la glucosa oral, que indica la capacidad del páncreas de controlar la glucemia. Individuos en estadio 2 no regulan correctamente la glucemia, pueden tener elevados los valores de hemoglobina glicosilada (HbA1c), y deben ser positivo para autoanticuerpos como en el estadio 1. En esta etapa, los pacientes pueden permanecer durante años antes de la aparición de los síntomas^{40,41}. En el estadio 3 se incluyen individuos con manifestaciones clínicas claras. Es decir, pérdida de peso, fatiga, poliuria, polidipsia, polifagia y cetoacidosis. Además, los pacientes en el estadio 3 presentan hiperglucemia y todos los marcadores mencionados en los estadios previos⁴². Desafortunadamente, en la mayoría de los casos, el diagnóstico se hace cuando quedan entre el 10-30% de las células β funcionales y, por ende, las manifestaciones clínicas se corresponden al último estadio de la DT1³².

El aspecto más preocupante del incremento en la prevalencia y la detección tardía o nula de los individuos con DT1 abarca las complicaciones crónicas asociadas a esta patología. Estas complicaciones representan un costo económico para los países donde

ocurren y, sobre todo, disminuyen drásticamente la calidad y esperanza de vida de sus habitantes.

Según el compromiso en los vasos sanguíneos, las complicaciones a largo plazo se dividen en dos grandes grupos. En primer lugar, pueden aparecer complicaciones asociadas a la microvasculatura, donde los capilares o vasos sanguíneos de menor calibre resultan dañados como consecuencia de la hiperglucemia. En segundo lugar, están las complicaciones en la macrovasculatura, donde los grandes vasos (arterias) son los que resultan perjudicados^{43,44}.

Las complicaciones microvasculares surgen en tejidos donde el metabolismo de la glucosa es independiente de la insulina, como en las neuronas, riñones y retina. Por este motivo, la gran mayoría de los individuos con DT1 desarrollan neuropatías, nefropatías y retinopatías. En la neuropatía se pierde el grosor de los axones, hay desmielinización e incluso muerte neuronal, que lleva a la pérdida de la sensibilidad nerviosa⁴⁵. En la nefropatía, el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular se ven alterados por la hiperglucemia, y generan cambios en la fisiología de los glomérulos y de los túbulos renales. A medida que progresan las complicaciones no sólo se relacionan con problemas de filtración, sino que aparecen fallas en la regulación de la presión arterial, la liberación hormonal (eritropoyetina), la activación de la vitamina D y la hipoglucemia⁴⁶. La retinopatía está relacionada con alteraciones en los capilares que irrigan la retina. El flujo y la permeabilidad a través de la microvasculatura se dificulta por la hiperglucemia, generando edema en la retina, obstrucción en los capilares y/o neovascularización, que se evidencia clínicamente con alteración en la visión^{43,44}.

Las complicaciones macrovasculares surgen como consecuencia de niveles elevados de glucosa en sangre que generan disfunción endotelial, inflamación vascular, estrés oxidativo, acumulación de lípidos en los vasos, adelgazamiento de la pared arterial

y arritmia. Todos estos cambios en la fisiología macrovascular dificultan el flujo sanguíneo y son causales de las cardiopatías y enfermedades cerebrovasculares características de la diabetes^{47,48}. Es importante señalar que el deterioro en el epitelio vascular afecta tanto a la micro como a la macrovasculatura. Es decir, el daño en vasos de menor y mayor calibre ocurre conjuntamente, por lo tanto, los pacientes desarrollan ambas complicaciones.

Los estudios epidemiológicos indican que la prevalencia en diabetes está aumentando drásticamente, lo que va de la mano con un incremento en las complicaciones a largo plazo¹⁵. Por este motivo, es fundamental entender la fisiopatología de la enfermedad para desarrollar nuevas estrategias que logren erradicar la enfermedad o que eviten el desarrollo de complicaciones que dificultan la vida de las personas.

1.3 Sistema inmune en la diabetes tipo 1

El sistema inmune (SI) es una compleja red de órganos, células y proteínas encargada de mantener la fisiología del organismo. Dicho sistema se caracteriza por responder frente a diversos estímulos patogénicos como pueden ser la presencia de microorganismos (virus, bacteria, hongo y parásitos), células cancerosas e incluso responder a moléculas indicadoras de daño tisular. De acuerdo con el agente causal de enfermedad, el SI va a activar una respuesta innata (natural o no específica) o adaptativa (específica). La respuesta inmune innata se caracteriza por responder rápidamente (horas/días) y por reconocer patrones moleculares asociados a patógenos. Por otro lado, la respuesta adaptativa ocurre lentamente (días/semanas) pero es más potente y efectiva.

Una propiedad fundamental del SI es su capacidad de distinguir o diferenciar los antígenos propios de los no propios o extraños. Cualquier desviación en esta capacidad puede conducir a complicaciones patogénicas. Esto último se conoce como autoinmunidad y es consecuencia de la ruptura de los mecanismos de tolerancia inmunitaria central o periférica⁴⁹. La tolerancia es la capacidad natural del sistema inmune de reconocer antígenos propios como propios y así poder mantener la homeostasis (**Figura 4**). En el timo se seleccionan y favorece la supervivencia de LT que reconocen el complejo CMH-péptido propio con baja afinidad. Cuando el autorreconocimiento falla se generan autoanticuerpos y/o LT autorreactivos donde las dianas o blancos son autoantígenos⁵⁰.

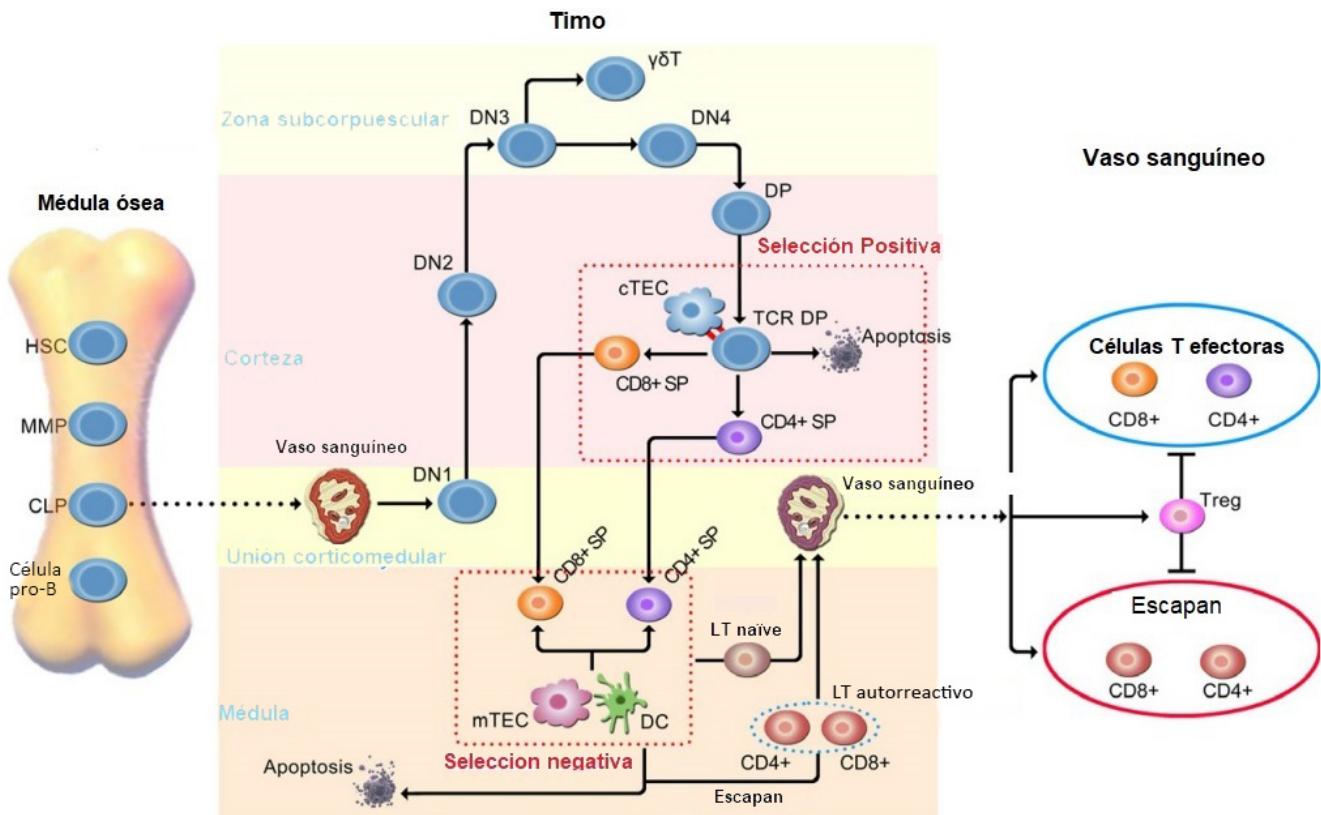


Figura 4: Mecanismo de tolerancia T. Progenitores tímicos entran al timo desde la médula ósea vía vasos sanguíneos. Los timocitos en sus estadios más inmaduros son doble negativo (DN) para CD4⁺CD8⁻ donde, sufren rondas de división (DN1 a DN4), rearreglos en el TCR y controles de reconocimiento. Los timocitos doble positivos (DS) CD4⁺CD8⁺ son los que sobreviven, proliferan, diferencian y entran en el proceso de selección positiva. Los timocitos DP que no expresan TCR mueren por negligencia. Timocitos SP que reconocen con mucha afinidad lo propio mueren por apoptosis en el proceso de selección negativa. TEC: células del epitelio tímico, DC: células dendríticas., TCR: receptor de células T. Imagen adaptada y traducida de Lifeng Wang et al (2015).

La DT1 es una enfermedad autoinmune del tipo órgano-específico, donde los elementos de la respuesta inmunitaria afectan las células β del páncreas. El desarrollo de la enfermedad es multifactorial; la influencia tanto de factores ambientales como genéticos llevan al mal funcionamiento de los mecanismos de tolerancia inmunológica contra las células β . Entonces, desde el punto de vista fisiopatológico, hay deficiencia parcial o total en la secreción de insulina. La evidencia sugiere que el desarrollo de la DT1 se da, en gran parte, como consecuencia de la presentación de antígenos propios (péptidos de células β) en el CMH de células APC. Estas células, cargadas con los

autoantígenos, migran a los nódulos linfáticos pancreáticos e interactúan con LT CD4⁺ autorreactivos que, a su vez, van a activar LT CD8⁺ autorreactivos. Estos LT citotóxicos vuelven a los islotes y lisan las células β que expresan autoantígenos vía el CMH-II (**Figura 5**)⁵¹. Además, la destrucción de células β se exacerba como consecuencia de la liberación de citoquinas proinflamatorias y de especies reactivas de oxígeno. Por ejemplo, linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ secretan INF- γ que induce señales quimiotácticas que, a su vez, estimulan la migración de más células B, T e innatas hacia los islotes. El INF- γ activa las células APC y estromales residentes de los islotes, lo que aumenta la producción de mediadores inflamatorios, como especies reactivas de oxígeno. Todo esto potencia la necrosis de células β y la progresión de la enfermedad⁵².

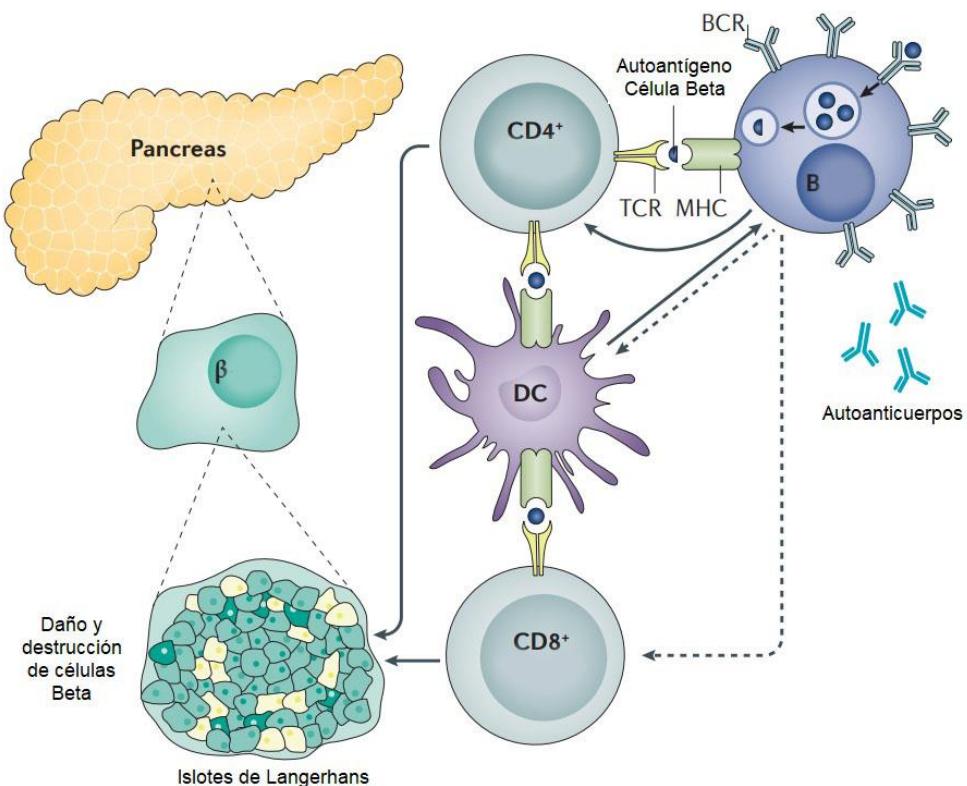


Figura 5: Patogenia de la diabetes tipo 1. Linfocitos B y células dendríticas (DC) interactúan con linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. La presentación antígenos por parte de LB y DC activa LT específicos contra células β . Además, los LB al reconocer autoantígenos producen autoanticuerpos contra proteínas presentes en los islotes. BCR y TCR: receptor de células B y T respectivamente. MHC: complejo mayor de histocompatibilidad. Imagen adaptada de A. Katsarou et al (2017).

Asimismo, en los nódulos linfáticos pancreáticos, las células APC presentan autoantígenos a LT y LB, cuya comunicación termina exacerbando la respuesta inflamatoria. Los LT CD4⁺ colaboran con la diferenciación de LB a células plasmacitoides productoras de anticuerpos contra proteínas propias. Estos autoanticuerpos, a su vez, potencian la respuesta de células inmunes innatas y adaptativas, lo que termina reduciendo la cantidad relativa de células β productoras de insulina.

La producción de autoanticuerpos varía en las distintas etapas del desarrollo de la DT1. En los primeros estadios, principalmente, encontramos autoanticuerpos anti-insulina (IAA, del inglés insulin autoantibody) mientras que, en etapas avanzadas, además de IAA hay anticuerpos anti-ácido glutámico decarboxilasa (anti-GAD, del inglés glutamic acid decarboxylase), anti- antígeno 2 de islete (anti-IA2, del inglés islet antigen 2) y anti- transportador de zinc 8 (anti-ZnT8, del inglés zinc transporter 8)⁵³. Los autoanticuerpos generados son indicadores del deterioro pancreático y, además, se utilizan como biomarcadores de la DT1^{27,49,54}. Todo el proceso se ve amplificado porque los LT reguladores son defectuosos, por lo que no logran apagar efectivamente la respuesta autoinmune (**Figura 6**). Este dato resulta interesante ya que en individuos control (sanos) se han detectado LT autorreactivos que podrían destruir las células β. La gran diferencia está en la eficiencia de los LT reguladores, cuya función supresora evita la autorreactividad⁴⁹.

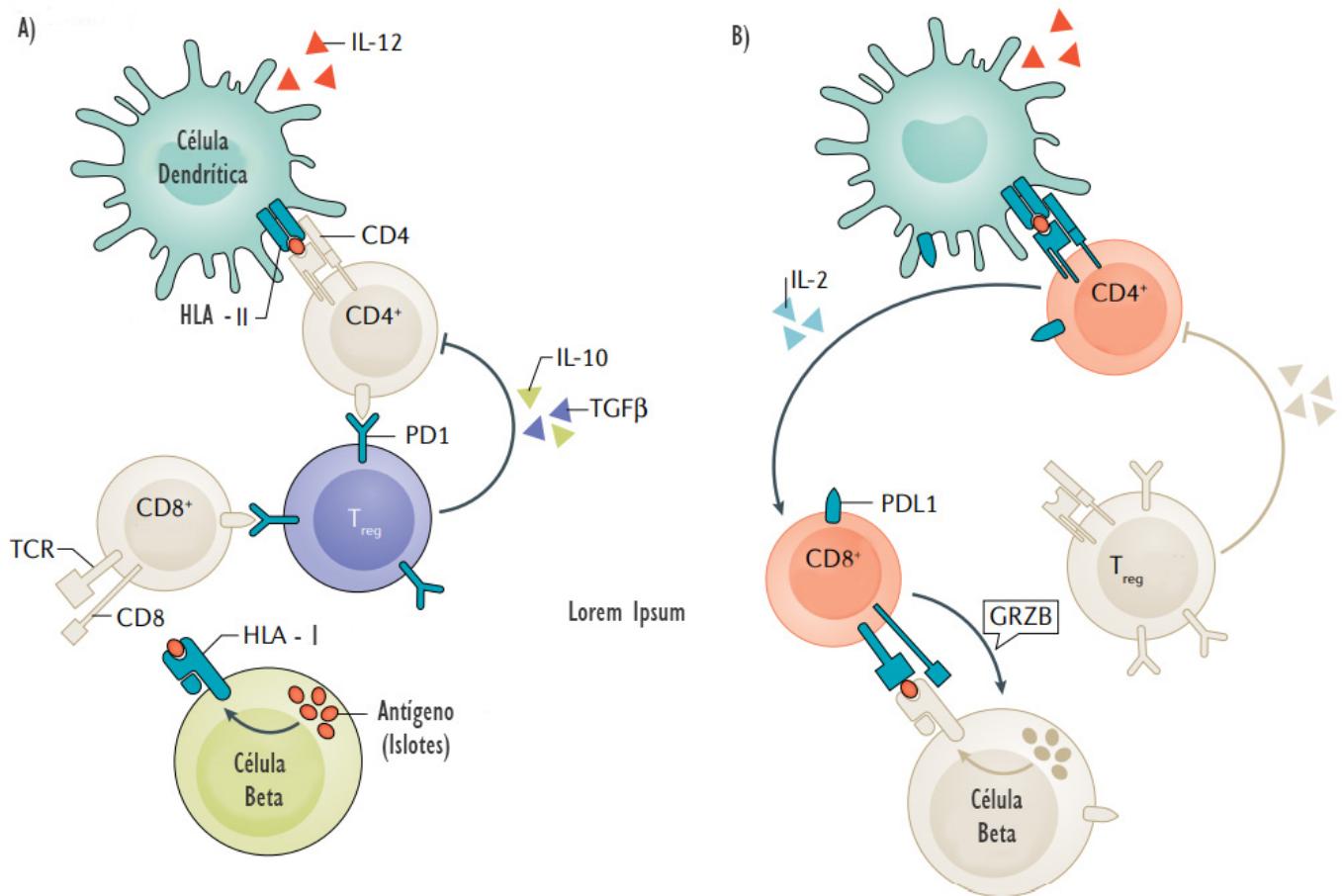


Figura 6: Inmuno regulación e inmuno desregulación. **(A)** En pacientes sanos las células β están protegidas de la destrucción autoinmune por la regulación exacerbada por células T reguladoras y la unión con PD1. **(B)** En pacientes con diabetes tipo 1 la regulación es deficiente y las células autorreactivas logran destruir las células β . PD1: proteína de muerte celular programada, PDL1: ligando de la proteína de muerte celular programada, GRZB: granzima, TCR: receptor de célula T. Imagen adaptada y traducida de Bart O. Roep et al (2021).

Es importante destacar el rol fundamental que cumplen las citoquinas y quimioquinas en la fisiopatología de la DT1 (**Figura 7**). El desarrollo y progreso de la DT1 se ve influenciado por las citoquinas secretadas por células inmunes y pancreáticas. Por un lado, tenemos citoquinas anti-inflamatorias como IL-10, TGF- β , IL-4, IL-2 e IL-15 que detienen el desarrollo de la enfermedad al inducir un fenotipo regulatorio. En particular, IL-10 estimula DCs tolerogénicas, células T reguladoras (Treg) y B reguladoras (Breg). Además, sobre células CD4+ (o linfocitos T colaboradores Th) induce la síntesis de citoquinas antiinflamatorias (perfil Th2) e inhibe las del tipo inflamatorio

(perfil Th1)^{55,56}. El desarrollo de la DT1 también se ve inhibido por TGF-β, que estimula la proliferación de células Treg por bajas dosis de IL-2, que activan células Treg y favorecen un perfil Th2; y por IL-4, que restablece los niveles de IL-12, activa y expande las células NKT y Treg, y activa en las células β las vías de señalización PI3K y JAK/STAT⁵⁷. Por otro lado, las citoquinas proinflamatorias van a inducir la proliferación y activación de células inmunes diabetogénicas (células CD4⁺ perfiles Th1 y Th17, células T CD8⁺ y NK). Ejemplos de este grupo son: TNF-α, que induce la maduración de DC, activa linfocitos T antígeno específicos contra islotes y acelera la apoptosis de células β; IL-6, que promueve la migración y respuesta de células efectoras e; IL-1, que induce la inflamación local y estimula la apoptosis de células β⁵⁸.

Las vías de señalización y los genes involucrados en la progresión y regulación de la respuesta inmunitaria también pueden contribuir al desarrollo de la autoinmunidad. Por ejemplo, la inhibición de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR es fundamental para la inducción y funcionalidad de las células Treg⁵⁹. Se ha demostrado que la inhibición de PI3Kγ bloquea la funcionalidad de las células T autorreactivas⁶⁰. Otra vía involucrada en el proceso de activación de la autoinmunidad está relacionada con la expresión de STAT3, donde se ha demostrado que ratones sobre-expresando STAT3 desarrollan prematuramente la DT1⁶¹.

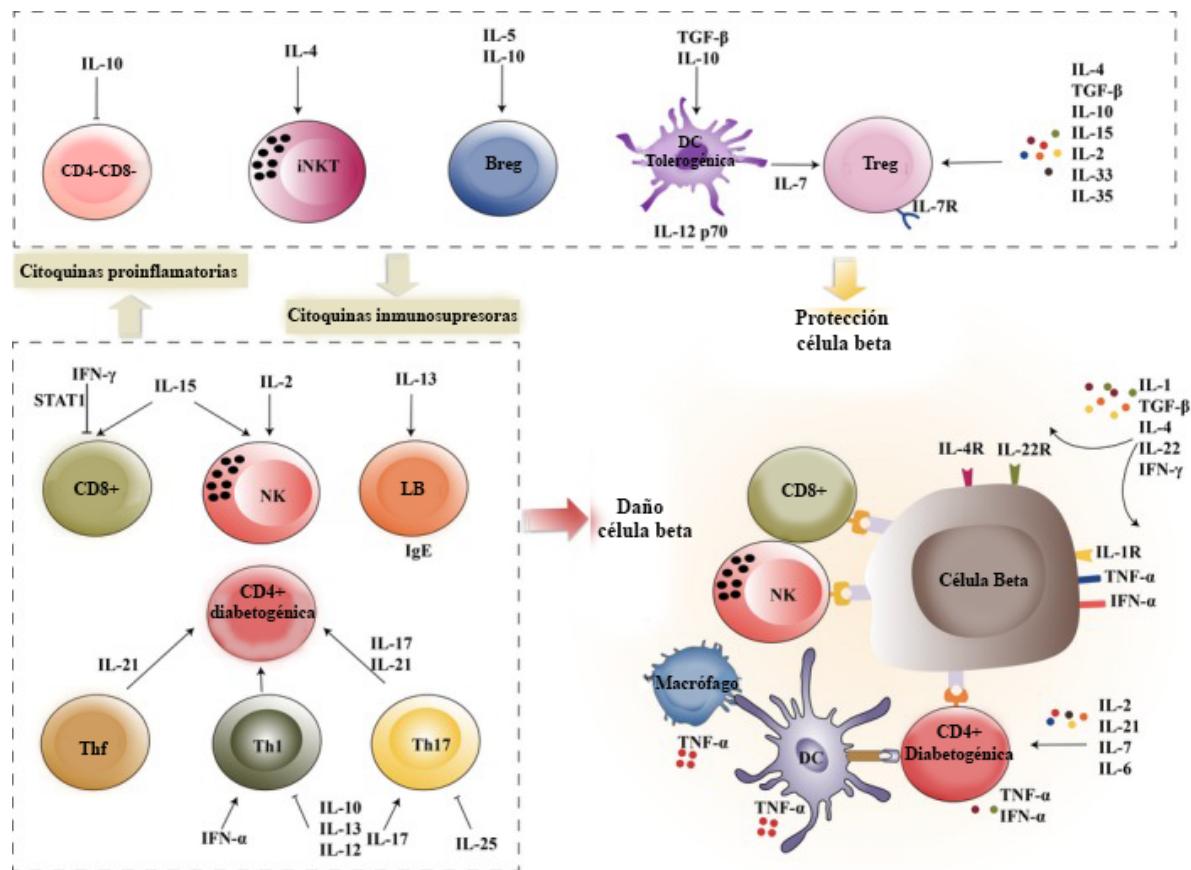


Figura 7: Citoquinas involucradas en el desarrollo y progreso de la diabetes tipo 1. Citoquinas como IL-10, TGF- β , IL-5, IL-4, IL-2, IL-15, IL-33 e IL-35 inducen un fenotipo regulatorio. Citoquinas proinflamatorias como IL-6, TNF- α , IFN- α , IL-17 e IL-21 potencian el estado inflamatorio al activar células inmunes diabetogénicas. Breg: linfocitos B reguladores, Treg: linfocitos T reguladores, DC: células dendríticas, Th: linfocitos T colaboradores (son células CD4+ con un perfil característico), Thf: linfocitos T colaboradores foliculares, CD8+: linfocitos T citotóxicos, NK: linfocitos asesinos naturales, LB: linfocitos B. Imagen adaptada y traducida de Jingli Lu et al (2020).

Por todo lo mencionado podemos concluir que la conexión entre células β e inmunes, entre la inmunidad innata y la adaptativa, y entre el sistema inmune/células β y el entorno, potencian el desarrollo de la DT1.

1.4 Tratamientos y perspectivas

La DT1 es una enfermedad autoinmune causada por la destrucción de células β pancreáticas. El modelo inicial sobre la patogenia de la diabetes fue presentado en 1980 por Eisenbarth que, junto a décadas de investigación, nos permitieron entender a la DT1 como un proceso crónico deficiente de insulina, caracterizado clínicamente por la aparición de autoanticuerpos, seguido de hiperglucemias y cetoacidosis⁶². En 1922, Frederick Banting and Charles Best, descubrieron la insulina y la DT1 pasó de ser una enfermedad fatal a una enfermedad crónica manejada por la administración exógena de insulina⁶³. Lamentablemente, el uso de insulina tiene ciertas limitaciones en el control de la glucosa, siendo la hipoglucemia la principal preocupación y contraindicación⁶⁴.

Los pacientes con DT1 necesitan compensar la falta de insulina para sobrevivir. Actualmente, el tratamiento o terapia por excelencia para individuos con DT1 consiste en la administración basal y posprandial de múltiples dosis diarias (inyecciones/lapiceras) o en infusiones continuas (bombas) subcutáneas de insulina exógena. La variedad de insulina y las formas de administración han cambiado y mejorado a lo largo de los años. Se reemplazaron los preparados de insulina animal por análogos de insulina y/o insulina humanizada. Hoy en día, encontramos bolos de insulina de acción rápida (Lispro, Aspart, Glulisine) y corta (insulina regular humana), e insulina basal de acción intermedia (NPH insulina U100) y larga (Detemir U100, Gla-100, Gla-200, Degludec U100), según el tiempo que demoran en ejercer su efecto y su eliminación⁶⁵. Dichos avances mejoraron la farmacocinética, principalmente se mejoró la capacidad de absorción, pero también se lograron reducir eventos de hipoglucemia, cambios en el peso corporal, estabilizar la hemoglobina glicosilada y retardar las complicaciones a largo plazo. De todas formas, los preparados de insulina no logran replicar exactamente los efectos biológicos de la insulina endógena⁶⁶.

Conjuntamente, se han desarrollado estrategias terapéuticas que reúnen los siguientes criterios: a) prevenir o retrasar la destrucción autoinmune de células β , b) estimular o reprogramar las células β remanentes para que secreten insulina cuando es necesario, y c) reducir el riesgo de complicaciones a largo plazo⁶⁷. En la **Tabla 1** se muestran algunos de los nuevos avances terapéuticos y el mecanismo por el cual actúan⁶⁸.

Mecanismo de acción/ Blanco	Agente terapéutico
Enfoque sistémico <ul style="list-style-type: none"> - Células T efectoras - Células B - Expansión de células Treg - Anti-inflamatorio 	Anti-CD3 (teplizumab), anti-CD80 y anti-CD86 (abatacept), anti-IL21 Anti-CD20 (rituximab) Dosis baja de IL-2 Anti-TNF α (infliximab), anti-IL6 (tocilizumab), GLP-1
Enfoque en células β o islotes <ul style="list-style-type: none"> - Tolerancia con antígenos - Reducir el stress en célula β 	Insulina oral, GAD65, péptidos GLP-1, Verapamil

Tabla 1: Agentes para prevenir y manejar la diabetes tipo 1 sin considerar la insulina. Tabla adaptada y traducida de Miriam Cabello-Olmo, (2019).

Una alternativa, aunque menos frecuente, es el trasplante de páncreas e islotes de Langerhans, para normalizar los niveles de glucemia y reducir las complicaciones microvasculares. Este tipo de intervenciones, por la dependencia de un tratamiento inmunosupresor, sólo se recomiendan cuando los pacientes necesitan trasplante renal, presentan cetoacidosis recurrente o episodios de hipoglucemia severa⁶⁷.

Los avances en la tecnología y en la comprensión del desarrollo de células β , el metabolismo de la glucosa, y de los mecanismos inmunológicos que subyacen la enfermedad promueven la investigación de nuevos enfoques terapéuticos (**Figura 8**)⁶⁹.

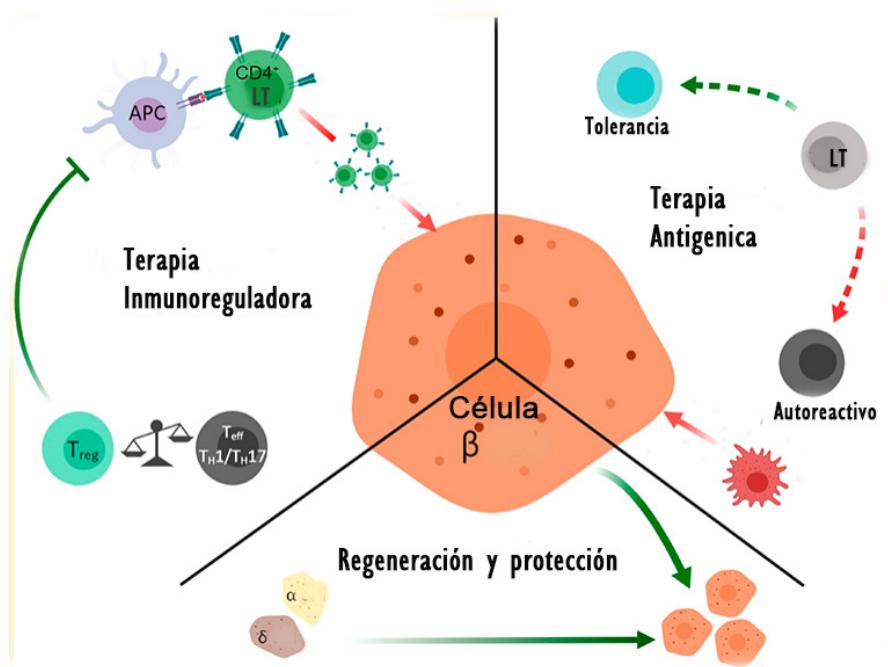


Figura 8: Nuevas estrategias terapéuticas apuntan a regenerar y proteger las células β al modular la respuesta inmune que subyace en la DT1. Adaptado y traducido de Daniel F. Sheehy, (2019).

En este contexto, proponemos el uso de oligonucleótidos (ODN) inmunomoduladores con el objetivo de controlar las alteraciones inmunológicas que llevan al desarrollo de la DT1. Como primer acercamiento al estudio del efecto de los ODN en el contexto de la diabetes tipo 1, nuestro grupo demostró, en un modelo de diabetes inducida por estreptozotocina, que los ODN pueden reducir la glucemia, inducir la regeneración de células β , estimular la proliferación de células madre y, entre otros efectos, disminuir el infiltrado inflamatorio⁷⁰.

1.5 Modelo animal

La cepa NOD/ShiLtJ (comúnmente llamada NOD) surge luego de seis generaciones de endocría de ratones CTS (Cataract Shionogi strain) que presentaban espontáneamente un fenotipo diabético, como poliuria, niveles de glucemia elevados y un descenso en el peso corporal⁷¹.

La cepa NOD es un modelo poligénico utilizado para el estudio de la DT1. La diabetes en ratones NOD comienza a manifestarse de forma espontánea a partir de las 12 semanas en hembras y, varias semanas después, en machos, alcanzando un 90% de hembras y un 52% de machos diabéticos en la semana 30 de vida. La diabetes en la cepa NOD se caracteriza por hiperglucemia (glucemia sin ayuno mayor 250mg/dl)⁷², insulitis, poliuria, disminución espontánea del peso y un marcado descenso en los niveles de insulina pancreática. El fenotipo diabético en los NOD se relaciona con defectos en la presentación antigénica, el repertorio de LT, el funcionamiento de células NK, y la producción de citoquinas por parte de los macrófagos^{72,73}.

El infiltrado de células inmunes innatas en el páncreas, que incluye células dendríticas, neutrófilos y macrófagos, se puede observar a partir de las 3 semanas de vida de los ratones NOD. La presencia de estas células en el páncreas induce el infiltrado de células adaptativas, linfocitos T y B, hacia los islotes de Langerhans, a partir de las semanas 4 a 6. La presencia de linfocitos establece el desarrollo de la diabetes, donde células T autorreactivas destruyen las células β del páncreas. Los LB también participan en la autoinmunidad de la cepa, regulando la activación, proliferación y producción de citoquinas en células T y T autorreactivas⁷⁴. Además, los LB secretan autoanticuerpos (anti-insulina, anti-GAD y anti-tirosina fosfato) que inducen el desarrollo de la enfermedad. Más aún, se observa que, al generar NOD deficientes en células B, la

incidencia de ratones diabéticos disminuye^{74,75}. Por lo tanto, la destrucción de las células β es el resultado de una interacción entre las células del sistema inmune innato y las del sistema inmune adaptativo tanto en el modelo animal NOD como en humanos.

El haplotipo único de MHC ($H2^{g7} = K^d, A^{ad}, Ab^{g7}, E^{null}, D^b$) presente en ratones NOD es el componente de mayor relevancia para el desarrollo de la diabetes⁷⁶. Es decir, la susceptibilidad a la diabetes se debe principalmente a que los ratones NOD presentan polimorfismo en las moléculas I-A^{g7} (ortólogo al HLA-DQ) del complejo mayor de histocompatibilidad II (CMH-II) y no expresan I-E (ortólogo al HLA-DR) y H-2K^dD^d en el complejo mayor de histocompatibilidad I (CMH-I)^{77,78}. Además, la susceptibilidad de la cepa a desarrollar diabetes se ve afectada por factores ambientales. La exposición a organismos infecciosos, los cambios en el microbiota y las situaciones de estrés son los principales disparadores de la enfermedad no solo en ratones, sino que también en seres humanos⁷⁵.

La gran similitud que presentan los animales NOD con la diabetes insulinodependiente humana hace de esta cepa el modelo de referencia (del inglés: gold standard) para el estudio de dicha enfermedad (**Tabla 2**). Más aún, el uso de esta cepa ha permitido tanto la identificación de nuevos antígenos y genes de susceptibilidad como la generación de nuevos agentes terapéuticos o el desarrollo de técnicas de imagen para visualizar la inflamación de los islotes, entre otros⁷⁹.

	NOD	HUMANO
Edad de aparición	>10 semanas	>6 meses y en adolescencia principalmente
Susceptibilidad Genética	Principalmente MHC	Principalmente HLA
Autoantígenos	Insulina, GAD, IA-2, IA-2b, ZnT8, IGRP, Cromogranina A	Insulina, GAD, IA-2, IA-2b, ZnT8, IGRP, IAPP, HSP60, Carboxipeptidasa H
Insulitis	DCs, Macrófagos, LB, células NK, LT CD4 y CD8	DCs, Macrófagos, LB, células NK, LT CD4 y CD8
Cetoacidosis	-	Severa
Efecto según genero	Principalmente Hembras	Hombres y mujeres se ven afectados casi en la misma proporción (10.2% vs 10.8% respectivamente)

Tabla 2: Comparación en el desarrollo de la DT1 en la cepa NOD y en humanos. Traducido de Cabello-Olmo et al (2019).

2. Oligonucleótidos: características generales

Los oligonucleótidos sintéticos (ODNs) son moléculas cortas de ácido nucleico de simple cadena, formadas por 15 a 25 nucleótidos que pueden actuar de forma específica en el control de la expresión génica^{80,81}. Existe una gran variedad de ODNs, como pueden ser los ODNs de interferencia o los ODNs anti-sentido, que se unen por complementariedad a secuencias específicas del ADN o ARNm respectivamente y, de esta manera, modulan la transcripción y traducción de genes de interés terapéutico⁸⁰. Además, encontramos el grupo de ODNs inmunomoduladores, moléculas sintéticas que actúan sobre células del sistema inmunológico, que han sido evaluados como adyuvantes de vacunas y en estudios relacionados a la inmunoterapia del cáncer⁸².

Los ODNs se sintetizan por un procedimiento conocido como síntesis en fase sólida de fosforamiditos, donde las bases nitrogenadas se unen por enlaces fosfodiéster al esqueleto de fosfato y azúcar desoxirribosa, en sentido 5' → 3'^{83,84}. El ODN resultante es una cadena compuesta por un esqueleto polar con carga negativa de azúcar-fosfato y nucleótidos hidrofóbicos determinados. Los ODNs sintetizados se purifican por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) o por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Con el objetivo de optimizar el ingreso al compartimento celular y prevenir la degradación por nucleasas, se realizan modificaciones químicas en el esqueleto de los ODNs^{85,86}. Ejemplos de esto son las modificaciones fosforotioato (PS) o modificaciones metilfosfonato (MP), donde un átomo de oxígeno del enlace fosfodiéster es reemplazado por uno de azufre, o por un grupo metilo eléctricamente neutro, respectivamente (**Figura 9**). Los ODNs con modificaciones PS logran activar la RNasaH, por lo que son más utilizados en ensayos moleculares y aplicaciones terapéuticas^{87,88}.

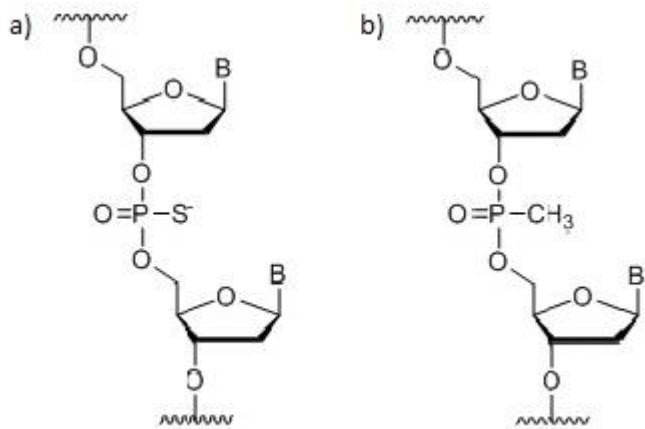


Figura 9: Modificaciones químicas oligonucleótidos sintéticos, (A) fosforotioato (PS) y (B) metilfosfonato (MP). Imagen adaptada de Ariful Islam et al, Drug Discoveries & Therapeutics, (2016).

Zamecnik y Stephenson, en 1978, fueron los primeros en proponer los ODN con fines terapéuticos, al demostrar que podían inhibir la traducción de ARNm y la replicación del virus del sarcoma de Rous⁸⁹. En los años siguientes, los avances en biotecnología, biología molecular, y producción automatizada de secuencias en fase sólida, permitieron un incremento notable en el uso de ODNs como agentes terapéuticos⁸¹. Es más, en los últimos años, surgieron ensayos clínicos que utilizan ODNs en el tratamiento de infecciones virales, cáncer y enfermedades inflamatorias^{90,91}.

En resumen, podemos mencionar que existen dos grupos de ODNs con diferentes mecanismos de acción, 1) los ODNs de interferencia y anti-sentido, que permiten regular la expresión génica a nivel transcripcional o traduccional⁸⁰ y 2) los ODNs con motivos de activación determinados, que pueden modular el sistema inmunológico. Estos últimos se conocen como inmunomoduladores y son los de interés para nuestro grupo.

2.1 Oligonucleótidos inmunomoduladores

Los ODNs inmunomoduladores son moléculas sintéticas que estimulan células del sistema inmune de vertebrados. Dichos ODNs inmunomoduladores se dividen principalmente en dos grupos o familias:

- ❖ Los **ODNs CpG** (C: Citosina y G: Guanina), donde el sitio activo contiene el dinucleótido CG flanqueado por bases nitrogenadas diferentes según la especie⁸⁶.
- ❖ Los **ODNs PyNTTTGT o no-CpG**, en donde Py es una pirimidina (C o T: Timidina) y N es una base nitrogenada aleatoria (C, T, G o A: Adenina)⁹².

Dichas familias comparten ciertas características en cuanto a su incorporación, activación y funcionalidad, pero difieren en ciertas otras.

Por un lado, los ODNs CpG se caracterizan por tener en su secuencia al menos un dinucleótido CG no metilado, y actúan imitando el ADN bacteriano, porque son reconocidos y activan células inmunes vía receptores toll 9, como lo hacen las secuencias CpG del ADN bacteriano⁹³. Además, se observó que su efecto inmunológico está dado por nucleótidos específicos que flanquean el motivo CpG y varían según la especie. Por ejemplo, en primates, se sabe que el motivo GTCGTT es el que activa la respuesta inmune⁹². En cuanto a sus efectos inmunológicos, se observó que inducen la secreción de IFN- α en células dendríticas plasmacitoides vía receptores tipo toll 9 (TLR9, del inglés Toll Like Receptor 9)⁹⁴. Además, inducen la secreción de IL-6 y TNF- α , y esta última citoquina inhibe a su vez la secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, del inglés granulocyte-macrophage colony stimulating factor)⁹⁵. Otro hecho distintivo es que los ODNs CpG no actúan sobre las MSCs de médula ósea⁹⁶. En cuanto a sus posibles usos terapéuticos, han sido estudiados como mediadores de la

respuesta inmune innata frente a patógenos extracelulares, como adyuvantes de vacunas, en la inmunoterapia del cáncer y en las respuestas alérgicas (**Figura 10**)^{82,97}.

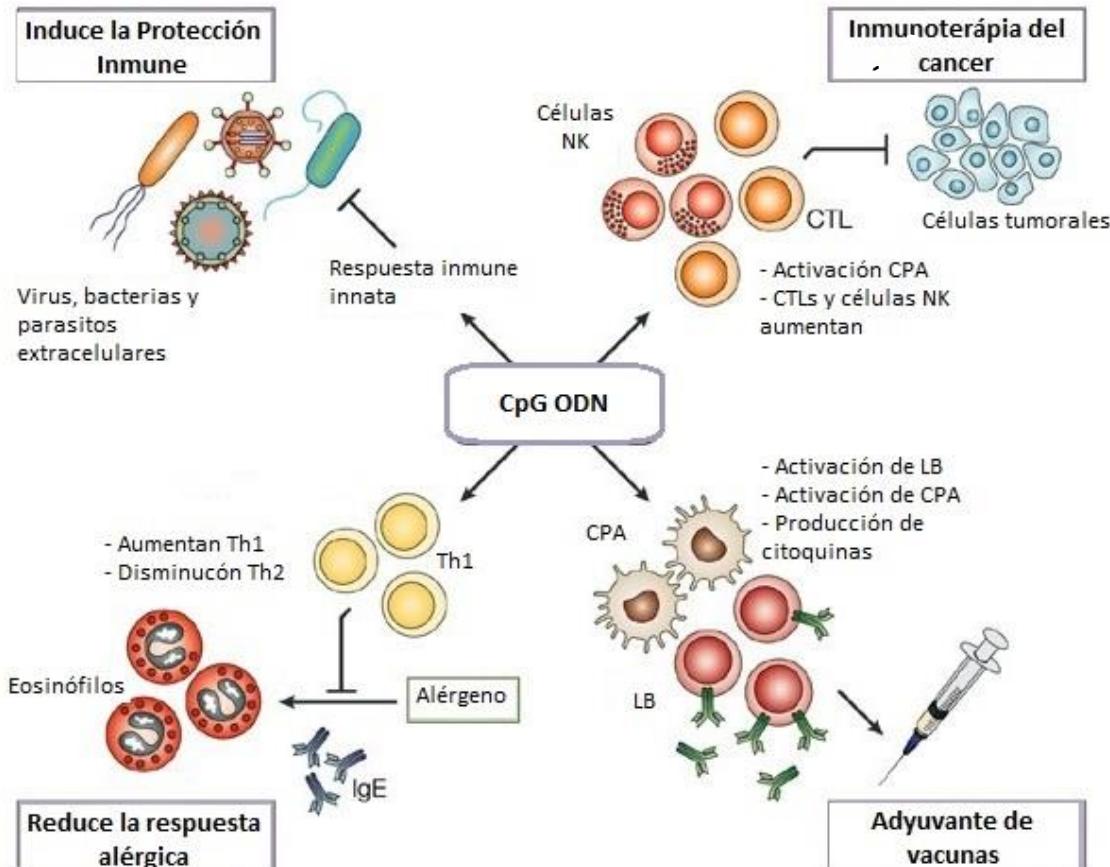


Figura 10: Usos terapéuticos de los oligonucleótidos CpG. El uso de ODNs CpG reduce la susceptibilidad a infecciones. En combinación con alérgenos inducen una respuesta Th1 antígeno específica que inhibe la respuesta Th2. Los ODNs CpG también activan LB, células NK, CTL y CPA, y estimulan la síntesis de citoquinas. Th: linfocitos T colaboradores; LB: linfocitos B; NK: células asesinas naturales; CTLs: linfocitos T citotóxicos y CPA: células presentadoras de antígeno. Adaptación de Dennis M. Klinman, (2004).

Por otro lado, los ODNs de tipo PyNTTTTGT poseen al menos un octanucleótido PyNTTTTGT en su secuencia y se vio, a diferencia de los CpG, que los cambios fuera de esa secuencia no afectan su actividad immunomoduladora⁹². Una de las características de esta familia es la secreción, en presencia de IL-2, de GM-CSF a través de células NK y células T Natural Killers (NKT)⁹⁸. A diferencia de los ODNs CpG, los ODNs PyNTTTTGT inhiben la secreción de TNF- α ⁹⁹. Actúan sobre LB, células dendríticas

(DCs) y MSCs⁹⁹, donde pueden inducir su activación, proliferación y/o producción de citoquinas (IL-6, etc) e inmunoglobulinas (Ig). Además, en células humanas se vio que incrementan la expresión de marcadores inmunológicos de membrana como CD40 (CD, del inglés clúster of differentiation), CD86, CMH-I y CMH-II.

2.2 Características del IMT504

El IMT504 es el prototipo de la familia de ODNs inmunomoduladores PyNTTTGT, está formado por 24 nucleótidos donde se encuentra repetido dos veces el sitio de activación CATTGT. Exactamente, el IMT504 es una secuencia de bases nitrogenadas simple cadena con modificaciones fosforotioato (*) en cada uno de sus nucleótidos, siendo su ordenamiento específico el siguiente:

24-mer: 5'- T*C*A*T*C*A*T*T*T*T*G*T*C*A*T*T*T*T*G*T*C*A*T*T* - 3'

Tanto la longitud como las modificaciones de la cadena nucleotídica del IMT504 fueron seleccionadas para obtener actividad inmunológica y prevenir la acción de nucleasas en fluidos biológicos, respectivamente⁹⁸. El uso de grupos fosforotioato en cada una de las bases nitrogenadas le confiere termoestabilidad al ODN^{100,101}. Además, estas características hacen del IMT504 una molécula altamente soluble y de rápida distribución.

Para cualquier posible aplicación clínica, es importante conocer ciertas características del ODN IMT504, como pueden ser la bioseguridad, toxicidad, el rango de concentración efectiva, entre otras. Los primeros ensayos de farmacodinámica demostraron que el IMT504 tiene efectos sobre la proliferación y activación de los LB en modelos de rata^{102,103}. Respecto a la farmacocinética, se vio que luego de la

administración de una única dosis subcutánea, la biodisponibilidad del IMT504 en plasma alcanza un máximo a los 60 minutos, y disminuye a partir de los 240 minutos. Dicha disminución se asocia con el aumento en la biodisponibilidad en tejidos. Como es de esperar, en la administración intravenosa, la biodisponibilidad máxima del IMT504 se alcanza más rápidamente. En ambos métodos de administración, la excreción del IMT504 es progresiva por orina y casi indetectable en heces¹⁰⁴.

Otro de los parámetros fundamentales que se debe tener en cuenta en los estudios preclínicos de seguridad es la toxicidad de las moléculas. Por este motivo, se han estudiado los efectos adversos del IMT504 en diversos modelos de mamíferos. En modelos *in vivo* de rata, se evaluó la toxicidad de diferentes dosis de IMT504 administrado de forma subcutánea e intravenosa. En estos ensayos, se estudiaron cambios en la sobrevida, el peso de los animales, la ingesta, la morfología e histología de órganos y reacciones al tratamiento (cambios en la piel, hematomas, sangrado, secreciones, etc.). Hasta una dosis máxima de 50 mg/kg no se observan cambios en la sobrevida ni en el peso de los animales, pero sí un aumento en el tamaño del bazo e hígado. Dicho efecto es temporal y se asocia a una fuerte respuesta inmunológica que induce el ODN¹⁰⁴. Por encima de la dosis máxima mencionada, el daño hepático es irreversible, la mortalidad aumenta y se detectan cambios significativos en el peso⁸². No se observaron alteraciones en el desarrollo embrionario en casos donde se administró IMT504¹⁰⁵. En estudios en primates se realizaron esquemas de administración de múltiples dosis de forma subcutánea y un esquema de dosis única intravenosa. Se estableció que la dosis máxima en la cual no hay cambios en los parámetros clínicos es de 10 mg/kg/día, lo que implica que no se detectaron efectos adversos en ningún nivel evaluado¹⁰⁴.

2.3 Efectos del IMT504 sobre distintas poblaciones celulares

Estudios previos demostraron que el IMT504 ejerce diversos efectos directos e indirectos actuando sobre los LB, las células dendríticas plasmocitoides (pDCs, de sus siglas en inglés plasmacytoid dendritic cells) y las células NK, NKT y MSCs de mamíferos.

En LB y pDCs, el IMT504 aumenta la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80/CD86), así como también la expresión de moléculas CMH I y CMH II. Además, induce la secreción de IL-6, IL-10 e IgM (inmunoglobulina M). Dichos cambios modulan la respuesta inmune, ya que podrían facilitar la presentación antigenica a LT, y así inducir un perfil tanto inmunogénico como tolerogénico^{102,106}.

Respecto a las células CD56⁺ (NK y NKT), se sabe que son capaces de modular la respuesta inmune inflamatoria y la autoinmunidad. En estos tipos celulares, el IMT504 en presencia de IL-2 induce la secreción de IFN-γ, TNF-α y GM-CSF. A su vez, estas citoquinas contribuyen en la regulación de la respuesta inmune. Por un lado, IFN-γ y TNF-α podrían inducir un perfil inmunosupresor en las MSCs y, por el otro, GM-CSF activa células mieloides supresoras (MDSCs, del inglés myeloid-derived suppressor cells)¹⁰⁷ (**Figura 11**). Además, se ha demostrado que el IMT504 tiene un efecto en la regeneración de los tejidos. En modelos de lesión ósea y lesión de nervio ciático, el IMT504 estimula la regeneración al inducir MSCs y células madre específicas del tejido¹⁰⁸ (**Figura 11**).

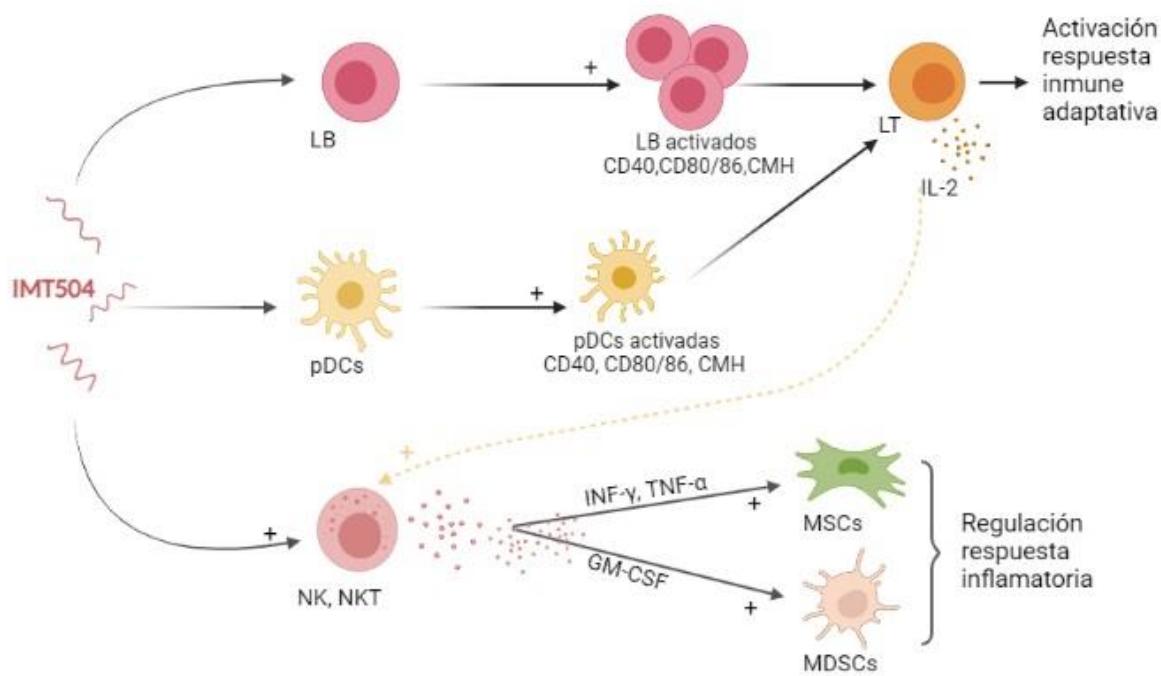


Figura 11: Efectos del IMT504 sobre las células del sistema inmunológico. Los principales blancos del IMT504 son los linfocitos B (LB), células dendríticas plasmacitoides (pDCs), células asesinas naturales (NK) y células T asesinas naturales (NKT). El IMT504 induce la presentación antigenica en LB y pDCs y, al actuar sobre células NK y NKT induce la secreción de IFN- γ y TNF- α que estimulan a su vez las células madre mesenquimales (MSCs) y células mieloides supresoras derivadas (MDSCs). Adaptación de J. Zorzopoulos,(2017).

Finalmente, es importante destacar que, en modelos experimentales de diabetes, como la diabetes inducida por estreptozotocina en ratas y la diabetes espontánea en ratones NOD, el IMT504 tiene un efecto directo sobre las células β pancreáticas, donde se vio un incremento en la proliferación y funcionalidad de las mismas. Se observó, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, que el número de células β y la síntesis de insulina aumentan luego de la estimulación o tratamiento con IMT504^{109,110}.

2.4 Efectos del IMT504 sobre distintos modelos experimentales

Las propiedades inmunomoduladores del IMT504 se estudiaron inicialmente en modelos experimentales de vacunas. Los primeros resultados de nuestro grupo de trabajo mostraron que el IMT504 podría ser utilizado como adyuvante de vacunas para los virus de la hepatitis B, rabia e influenza¹⁰³. En todos los casos, se observó que el ODN estimula/aumenta la respuesta inmune, disminuye el tiempo de respuesta y la masa de antígeno vacunal necesaria, aumenta la diversidad de respuesta y mantiene las células B de memoria¹⁰².

Además, se estudió el efecto del IMT504 sobre distintos modelos de inflamación crónica como DT1 (inducida por STZ en ratas y en modelos NOD), dolor inflamatorio crónico, sepsis y dolor neuropático.

En el caso del dolor neuropático, generado por una aplastamiento o lesión del nervio ciático, los individuos presentan dolor extremo y crónico. Se determinó que, en modelos de ratas, el tratamiento con IMT504 por vía sistémica reduce significativamente la alodinia mecánica y térmica¹⁰⁸. El efecto antialodínico generado por el tratamiento se correlaciona con la movilización de MSCs a las zonas de lesión, y al fenotipo anti-inflamatorio que induce el IMT504 sobre las MSCs (estimula la expresión de IL-10 y TGF-β)¹¹¹. De la misma manera, en modelos de dolor inflamatorio, se demostró que el IMT504 reduce la alodinia tanto mecánica como térmica, y disminuye el infiltrado inflamatorio y el edema en los sitios de lesión. Esto se asocia con un menor infiltrado mieloide y linfoide, con la reducción en los niveles de expresión de moléculas de adhesión en leucocitos, y con la modulación del perfil de citoquinas de pro a anti-inflamatorias^{112,113}.

La sepsis, o shock séptico, es un proceso inflamatorio que se define como un síndrome de desregulación sistémica en la respuesta inmune frente a una infección. El proceso se divide en dos fases: 1) acumulación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que provocan un aumento de citoquinas pro-inflamatorias e infiltración de células inmunes a los distintos tejidos y, 2) inmunosupresión y exposición a infecciones intrahospitalarias¹⁰⁷. Se analizó el efecto del IMT504 en un modelo de sepsis en ratas y se determinó que el tratamiento con IMT504 mejora el estado clínico fisiológico, inmunológico e histológico. Esta mejoría se determinó al observar una disminución en los niveles de IL-6, IL-10 y GM-CSF, un aumento en el porcentaje de células B activadas (aumento en el marcador CD40), y una reducción en el porcentaje de células polimorfonucleares en sangre periférica^{104,114}.

Hipótesis y objetivo general

Hipótesis

La fisiopatología de la DT1 está relacionada a un defecto del sistema inmune que resulta en la pérdida de la auto-tolerancia, llevando a la destrucción de las células β del páncreas por LT reactivos. El IMT504 es un oligonucleótido con propiedades inmunomoduladoras y regenerativas. Por este motivo, proponemos que el ODN IMT504 promueve la recuperación del estado diabético en ratones con DT1 al actuar sobre:

- a) MSCs locales o a distancia, transformándolas en tolerogénicas, lo que induce la producción de factores que promueven la regeneración tisular y que convierte al entorno inmunológico en tolerogénico.
- b) LTs, transformándolos en LT reguladores, e inhibir así la insulitis y estimular la secreción de citoquinas antiinflamatorias que llevan a mejorar la condición diabética.

Objetivo general

Estudiar el mecanismo de acción del ODN IMT504 en el modelo murino de referencia para el estudio de la DT1 con el fin de identificar una potencial terapia farmacológica que promueva la regeneración de las células β e inhiba el daño por insulitis.

Capítulo 1

1.1 Efecto del IMT504 en células madre mesenquimales

Las MSCs constituyen una población heterogénea de células residentes del estroma de diversos tejidos, como médula ósea, sangre periférica, tejido adiposo, pulmón, hígado, páncreas, pulpa dental, cerebro, bazo, timo y cordón umbilical^{115,116}. Esta población tiene características de células madre multipotente¹¹⁷, es decir, son aquellas capaces de generar células de su propia capa embrionaria (endodermo, ectodermo y mesodermo) y, además, tienen capacidades de auto renovación y diferenciación¹¹⁸.

Las MSCs son consideradas las células más efectivas en la reparación tisular y son reclutadas al tejido dañado para cubrir las demandas de regeneración debido a la gran cantidad de factores bioactivos secretados que presentan actividad inmunomoduladora y antinflamatoria¹¹⁹. Las mejoras funcionales en modelos de lesión *in vivo* obtenidas a partir de la aplicación de MSCs se deben fundamentalmente a la acción paracrina de distintos factores solubles producidos y liberados por estas células, o bien al contacto célula-célula¹²⁰ (**Figura 12**).

Dado que no existe un marcador único para su aislamiento, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT; del inglés, *International Society for Cellular Therapy*)¹²¹ definió que los criterios mínimos para definir a las MSCs son:

- Adherencia al plástico en cultivo.
- Capacidad de diferenciación *in vitro* hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos.
- Expresión de las proteínas de superficie CD105, CD73 y CD90; las MSCs de ratón también expresan Sca-1 (*Stem cells antigen-1*)¹²².

- Ausencia de los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19, y ausencia del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II.

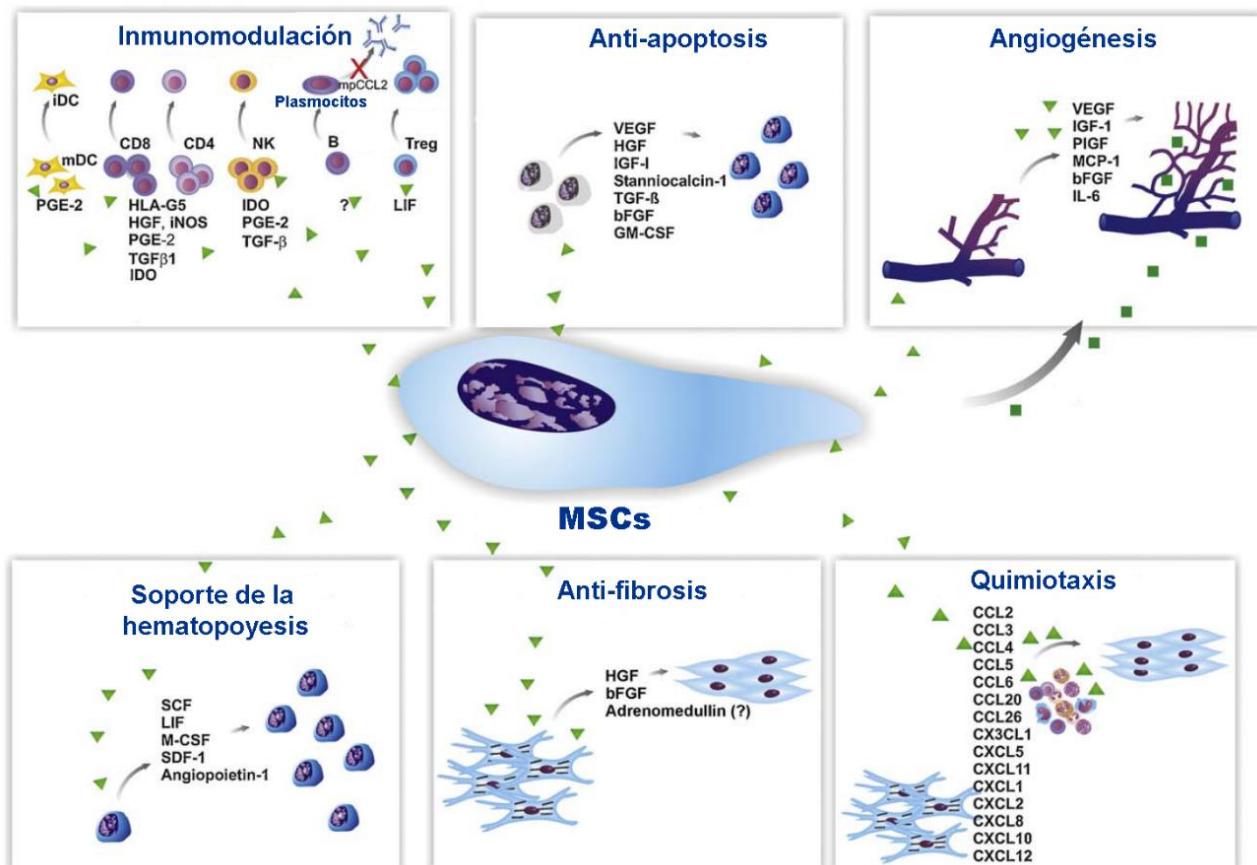


Figura 12: Efecto paracrino de los factores secretados por las MSCs cultivadas in vitro. Las moléculas bioactivas secretadas por las células madre mesenquimales (MSCs) son los principales efectores terapéuticos. Según su efecto se dividen en 6 categorías: inmunomodulación, anti-apoptosis, angiogénesis, hematopoyesis, anti-fibrosis y quimiotaxis. Figura adaptada de Meirelles Lda et al 2009.

Las MSCs expresan bajos niveles de moléculas del CMH clase I y no expresan el CMH de clase II¹²³. Por esta característica es que las MSCs son consideradas células capaces de evadir la respuesta inmunitaria alogénica¹²⁴⁻¹²⁶. Se ha demostrado que las MSCs tienen un efecto inmunosupresor generalizado sobre las células de la inmunidad innata y adaptativa^{127,128}. Por ejemplo, tienen un fuerte efecto inhibitorio sobre la función

de las células NK, mantienen las CD inmaduras, y además pueden inhibir la apoptosis, la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos, la capacidad de migrar de neutrófilos, entre otras (**Figura 13**).

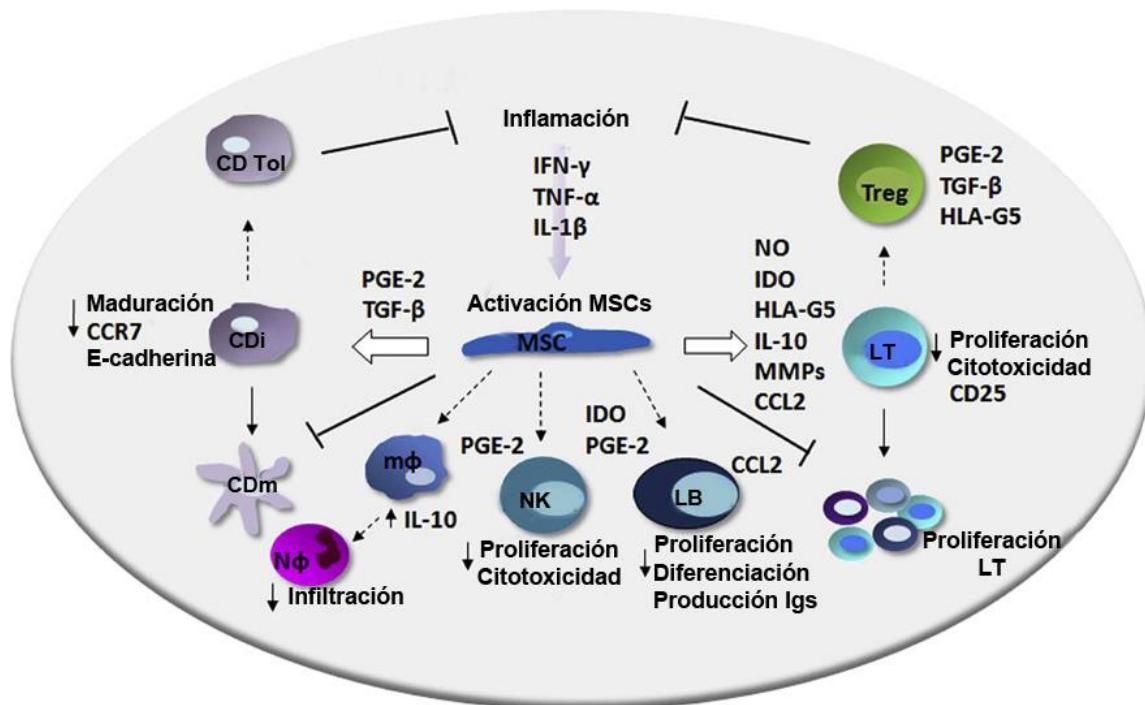


Figura 13: Efecto inmunomodulador de las MSCs. Diversos mediadores de la inflamación activan a las MSCs, que en consecuencia inhiben la proliferación y capacidad citotóxica de los linfocitos T (LT) e inducen células T regulatorias (Treg) a través de la secreción de óxido nítrico (NO), indoleamino 2,3-dioxigenasa (IDO) y metaloproteasas (MMPs), entre otros. La secreción de prostaglandina E2 (PGE2) y del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) cumplen un rol importante en la regulación de las células dendríticas (CD). Las MSCs también regulan funciones de los linfocitos B (LB), células asesinas naturales (NK) y macrófagos (mφ). mDC: célula dendrítica madura, CDi: célula dendrítica inmadura, CD Tol: célula dendrítica tolerogénica, Nφ: neutrófilo. Figura adaptada de English et al 2010.

La reparación de los tejidos dañados¹²⁹ y la hematopoyesis¹³⁰ son funciones primordiales de las MSCs. Se incorporan al tejido dañado y pueden diferenciarse en componentes del tejido conectivo o diversos tipos celulares dependiendo el órgano (**Figura 14**)¹³¹, donde participan en la vasculogénesis y en la secreción de citoquinas y factores de crecimiento que facilitarían los procesos de cicatrización¹³². Además, se ha demostrado que las MSCs facilitan la regeneración de células β pancreáticas *in vitro*¹³³.

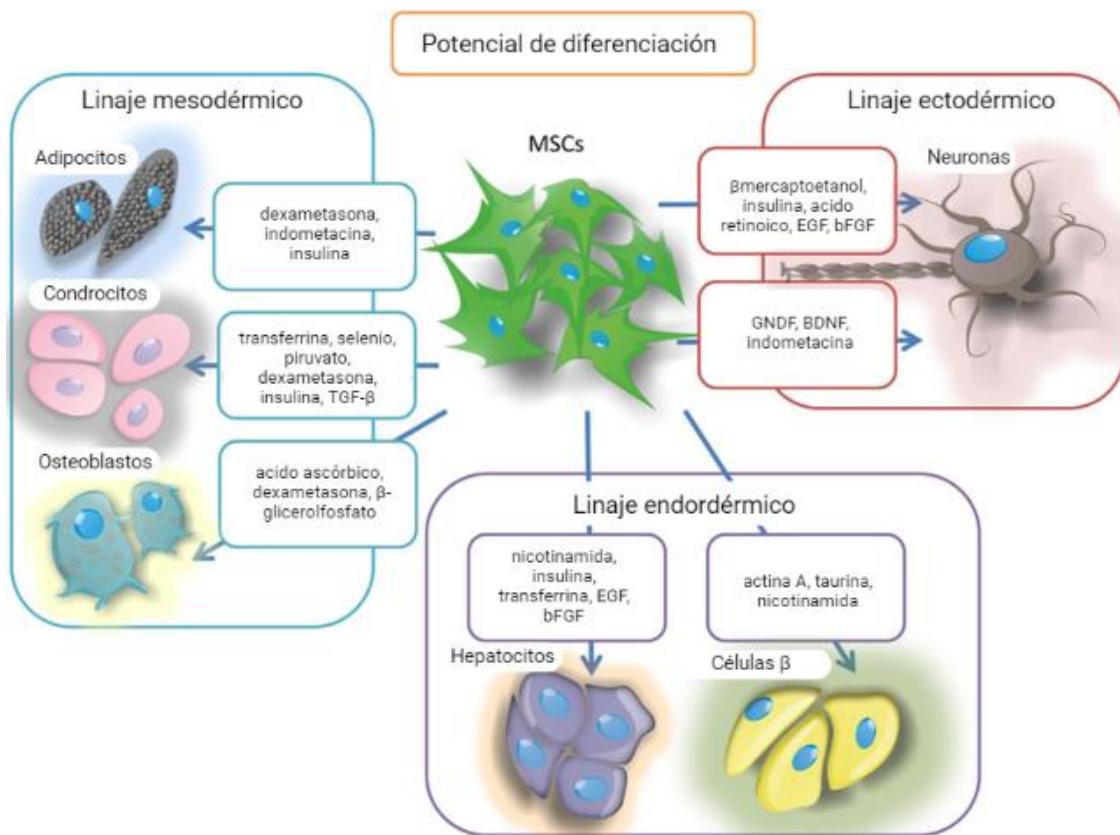


Figura 14: Potencial de diferenciación de las células madre mesenquimales (MSCs). Figura adaptada de Anna Andrzejewska et all, Stem Cells (2019).

Los mecanismos de reparación de daño tisular se ven facilitados por la capacidad de las MSCs de migrar hacia los sitios de lesión e inflamación^{134,135}. En condiciones fisiológicas, las MSCs se encuentran principalmente en médula ósea y, en menor medida, circulando por sangre periférica¹³⁶. En respuesta a señales endocrinas liberadas como consecuencia del daño tisular [el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), la proteína quimioatractante de monocitos 1 (MCP-1), la interleuquina (IL)-8, IL-6 e IL-1 β], las MSCs se movilizan al torrente sanguíneo, migran y llegan al sitio lesionado^{134,137,138}.

Es importante tener en cuenta que las MSCs pueden modificar el patrón de factores liberados tras su interacción con otros tipos celulares, particularmente del sistema inmune¹³⁹. El microambiente que las rodea genera una respuesta funcional característica en las MSCs, que podría deberse a la gran cantidad de factores secretados por las células residentes en ese microambiente¹⁴⁰. Además, se ha demostrado que las MSCs pueden polarizarse hacia dos fenotipos diferentes, similar a lo que ocurre con los macrófagos: MSC1 (fenotipo proinflamatorio e inmunocompetente) y MSC2 (fenotipo inmunosupresor), dependiendo de la respuesta inducida por las señales vía receptores tipo Toll (TLR). Se observó que las MSCs estimuladas vía TLR4 secretaban principalmente mediadores inflamatorios y las estimuladas vía TLR3 producían factores inmunosupresores¹⁴¹. Asimismo, el trasplante de MSCs es controversial, por lo que se propone utilizar fármacos que estimulen las propiedades de las MSCs endógenas¹⁴². Así, se ha demostrado que, tanto *in vitro* como *in vivo*, las capacidades regenerativas de las MSCs se ven estimuladas por el tratamiento con ODN immunomoduladores, como el IMT504^{143,144}.

1.2 Objetivo particular

Determinar el efecto del IMT504 sobre cultivos primarios de MSCs de ratones NOD prediabéticos y diabéticos.

Por un lado, se pretenden evaluar los factores liberados por las MSCs al medio de cultivo y la modulación de la expresión génica en MSCs, luego de la estimulación con el ODN.

Por otro lado, se busca evaluar los efectos directos del IMT504 sobre la viabilidad (apoptosis), la proliferación y la funcionalidad de las MSCs.

1.3 Materiales y métodos

1.3.1 Oligonucleótidos

Los ODNs utilizados en todos los experimentos fueron adquiridos en Biosynthesis (Texas, EE. UU.). Los ODNs presentan modificaciones fosforotioato, donde un átomo de oxígeno es reemplazado por uno de azufre en todos los grupos fosfato de la cadena nucleotídica.⁸⁵ Dichas modificaciones protegen a los ODNs de la degradación por nucleasas, prolongando su vida media en el suero y, además, permitiendo la unión a proteínas del plasma, lo que facilita la farmacocinética.

Los ODNs con niveles de purificación por Dual-HPLC mayores al 98% se resuspendieron en agua despirogenada (concentración final 1mg/ml)¹⁴⁵ y se mantuvieron a -20°C hasta su uso. La secuencia nucleotídica de cada ODN se presenta en la **Tabla 3**.

ODNs	Secuencia nucleotídica
IMT504	24-mer (5'-TCATCATTTGTCATTTGTCATT-3')
PolyC	24-mer (5'-CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC-3')
IMT504*	24-mer (5'-TCATCATTTGTCATTTGTCATT-3' [Texas Red]).

Tabla 3: Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos. * Se utilizó para indicar el oligonucleótido marcado.

1.3.2 Modelo animal

Se utilizaron ratones del modelo poligénico de diabetes autoinmune NOD/ShiLtJ (comúnmente llamados **NOD**, CAT#: JAX:001976, RRID: IMSR_JAX:001976, The Jackson Laboratory), y se establecieron colonias en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) para la realización de los experimentos. Los ensayos con animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y uso Animal (CICUAL) de la institución, que sigue las reglas establecidas por el NIH (EE. UU.). Se determinó el índice glucémico a partir de sangre de la cola, colocando una gota de sangre sobre las tiras reactivas (One Touch Ultra, Johnson & Johnson.), y los niveles de azúcar se detectaron con un glucómetro (One Touch Ultra Glucose Meter LifeScan, New Jersey). La DT1 en los NOD aparece de forma espontánea a partir de las 12 semana de vida y, se caracteriza por una hiperglucemia e insulitis. Se consideraron como animales diabéticos (DT1) aquellos que presentaron 2 valores de glucemia consecutiva entre 250/350 mg/dl¹⁴⁶. Animales con valores inferiores a 150 mg/dl se utilizaron como grupo control (prediabético, pre-DT1), y animales con valores superiores a 400 mg/dl fueron sacrificados.

1.3.3 Cultivo primario de células madre mesenquimales

Se establecieron y caracterizaron cultivos de MSCs siguiendo los protocolos de Boregowda et al., y Dominici et al^{147,148}. Brevemente, se aislaron MSCs de médula ósea de fémur y tibia de ratones NOD diabéticos y prediabéticos¹⁴⁹. Se plaquearon las células a una densidad de 5×10^5 células/cm² en medio completo (DMEM baja glucosa + 10% suero fetal bovino (SFB, Gibco) + 1% L-glutamina + 1% Penicilina/Estreptozotocina/anfotericina B). Se cambiaron los medios cada 72hs hasta lograr una confluencia del 80%, luego se levantaron las células por tripsinización (Tripsina 0,25% + EDTA 1mM,) y se sembraron en nuevas botellas T25 a una densidad de 5000 células/cm². Estas células en pasaje 1 se mantuvieron en cultivo hasta lograr un 80% de confluencia, para luego repicar y generar un nuevo pasaje. Este procedimiento de amplificación se realizó hasta alcanzar el pasaje número 4, a partir del cual se consideraron MSCs puras¹⁵⁰. Previo a los ensayos, se verificaron las características multipotenciales de las MSCs. Para esto se determinó la capacidad *in vitro* de diferenciar a osteoblastos, adipocitos y condroblastos, siguiendo la metodología propuesta por el grupo de Dominici et al¹⁴⁷. Las mismas se utilizaron como máximo hasta pasaje 8.

1.3.4 Ensayo de unidades formadoras de colonias.

El número de progenitores de MSCs de médula ósea se evaluó mediante el recuento de la unidad biológica funcional. Se asume que una célula progenitora de médula ósea da origen a varias células con las mismas características, por lo que reciben el nombre de unidades formadoras de colonias (UFC). Se define como UFC a un grupo de al menos 50 células con una disposición circular¹⁴⁴. Se extrajeron células de médula ósea (CMO) a partir de tibia y fémur de ratones NOD prediabéticos¹⁴⁹. Se cultivaron en botellas T25 a una densidad de 80.000 células/cm² por 15 días. Durante los primeros 7 días las células recibieron distintos tratamientos. Según el grupo, se agregó al medio de cultivo completo (DMEM baja glucosa 10% SFB + L-glu + E/P/A), IMT504 (0 - 0,5 - 1,5 - 4 - 6,5 - 10,5 µg/ml) o PolyC (4 µg/ml). Al día 8 se descartaron los medios, se lavó 3 veces con PBS y se agregó medio completo durante 7 días. Finalizado el periodo de incubación, se fijaron las células con metanol 100% y se tiñeron con Azul-Eosina-Azul de metíleno (Giemsa, dilución 1:4). Se cuantificó el número de colonias utilizando el microscopio óptico invertido (Nikon Eclypse NiE). Los datos se representaron como número de UFC cada 2x10⁶ CMO sembradas (nº UFC/2x10⁶ CMO).

1.3.5 Ensayo de herida

Se cultivaron MSCs en pasaje 6 en placas de 12 pocillos hasta alcanzar un 80% de confluencia. Se trabajaron dos esquemas de tratamiento. En el primero, cuando se alcanzó la confluencia deseada se generó una herida (raspadura de la monocapa), se lavó con PBS para retirar las células no adheridas y se agregó nuevo medio de cultivo sin SFB en presencia o ausencia de ODNs. En el segundo esquema, cuando se alcanzó la confluencia deseada, se estimuló durante 2hs con ODNs, luego se generó la herida, se lavó para sacar las células no adheridas y se agregó medio sin SFB. Cada condición experimental se realizó por cuadruplicado. Se tomaron fotografías con microscopio invertido (Nikon Eclipse Ts2) a las 0hr (T0), 12hr (T12) y 18hr (T18) de generada la lesión^{151,152}.

Se cuantificó el porcentaje de herida abierta, se midió el área de herida abierta con ImageJ en los diferentes tiempos y se determinó el porcentaje que representaba respecto al tiempo inicial.

$$\% \text{Herida abierta} = \frac{\text{Area a Tiempo} X \times 100}{\text{Area a Tiempo} 0hr}$$

Las concentraciones utilizadas de IMT504 fueron 0,5 - 4 - 10.5 µg/ml y como control de ODN se utilizó PolyC 4µg/ml. Como control positivo de migración se sembraron pocillos con medio de cultivo completo 10% SFB y como control negativo se sembró medio sin suero.

1.3.6 Ensayo de viabilidad

Se sembraron MSCs en pasaje 5/6 en placas de 48 pocillos hasta lograr un 80% de confluencia. Se retiró el medio de cultivo completo (DMEM baja 10% SFB + L-glu + E/P/A) y se agregó medio sin suero durante 6hs, de esta forma se logran liberar las posibles proteínas asociadas a distintos receptores. Se cultivaron las células durante 18hrs con o sin ODNs y, para los controles, se incubó con 10% SFB (positivo) y DMSO 5% (negativo). Se descartó el medio con los tratamientos y se lavó 3 veces con PBS. Se agregó el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) diluido 1:10 en solución fisiológica y se incubó a 37°C durante 4hs. Se lavó 3 veces para luego agregar dimetilsulfóxido (DMSO) durante 10 minutos. Se determinó la absorbancia en espectrofotómetro (Microplate Reader, Cambridge Technology, Inc) a una longitud de onda de 570nm.

El % de viabilidad se determinó como:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Absorbancia tratadas}}{\text{Absorbancia control}} \times 100$$

Donde la absorbancia tratada representa las células que recibieron tratamiento con IMT504, SFB o DMSO y, absorbancia control representa células sin tratar.

1.3.7 Inmunofluorescencia

Se sembraron MSCs en pasaje 6-7 en placas de 24 pocillos a los que previamente se les introdujo vidrios redondos de microscopía. Una vez adheridas, se lavaron las células 3 veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído 4% + Sucrosa 2% a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con 0.2% tritón en PBS durante 5 minutos. Luego, se lavaron nuevamente y se agregó una solución de bloqueo (albumina 2%) durante 1h. Se realizaron 3 lavados con PBS y se agregó el anticuerpo conjugado a Faloidina-Alexa 488 (Invitrogen, Cat: A12379) diluido según las indicaciones del fabricante, que se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron con PBS y se incubaron las MSCs con el ODN marcado con Texas-Red IMT504* (0,5 µg/ml) a tiempos cortos (5 minutos) y largos (1 y 4 horas) a 37°C. Se lavaron y montaron con líquido de montaje con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Vectashield Hard set™, Vector Laboratories, Inc), que tiñe los núcleos celulares. Se determinó la presencia de IMT504 en citoplasma y/o núcleo por medio de microscopía confocal (LSM 980, ZEIZZ).

1.3.8 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Se sembraron MSCs en pasaje 5-6 en placas de 6 pocillos cuando habían alcanzado un 90% de confluencia, se descartaron los medios de cultivo con SFB y se agregaron los distintos tratamientos (presencia o ausencia de ODNs) durante 2 y 18 horas a 37°C. Se lavaron las células con PBS y se agregó TRI Reagent® (Molecular research center, Inc.) para la extracción de ácido ribonucleico (ARN). Luego, se incubó con cloroformo para separar la fase acuosa que contiene el ARN. El mismo se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol 75% en agua tratada con dietilpirocarbonato (H₂O-DEPC). El pellet de ARN se resuspendió en H₂O-DEPC, se determinó su concentración y pureza (Absorbancias: 260nm/280nm y 230nm/280nm) por espectrofotometría (eppendorf BioPhotometer plus®) y su integridad en gel de agarosa 1% en TAE (40mM tris-acetato, 1mM EDTA, pH 8,0), revelado junto con la sonda SYBR®-Green. Para la electroforesis (Power Pac 300, Bio-Rad), se sembró el ARN en buffer de carga, se corrió a 70 voltios durante 1 hora y se reveló en documentador de imagen (Gel Doc™ EZ imager, BIO-RAD).

A partir del ARN se generó ácido desoxirribonucleico copia (ADNc) por retrotranscripción acoplada a PCR (RT-PCR). Se incubó el ARN con una mezcla de Oligo DT (0,5 µg / µl), dNTPs 10 mM y Agua-DEPC. Luego, se agregó buffer concentrado con ditiotreitol (DTT) 0,1M, agente reductor que mantiene la estabilidad de los puentes disulfuro en las ribonucleasas (RNasas) y, por ende, funciona como un coadyuvante en la inactivación de dichas enzimas. Finalmente, se indujo la transcripción reversa con la enzima del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) (Invitrogen).

Se amplificaron las muestras de ADNc con el Kit *5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus* (Solis BioDyne) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En la **Tabla 4** se muestran las secuencias de las sondas utilizadas para amplificar y cuantificar los genes de interés.

Gen	Sonda Sentido (5'-3')	Sonda Anti-Sentido (5'-3')
IL-6	CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA	GCAAGTGCATCATCGTTGTTACAC
TGF-β	CAACAATT CCTGGCGTTACC	AGCCCTGTATTCCGTCTCCT

Tabla 4: Secuencia de sondas utilizadas para amplificar, por qPCR, los genes de las citoquinas IL-6 y TGF-β.

La amplificación se realizó en un termociclador Step One™ Real.Tyme PCR (Applied Biosystems).

1.4 Resultados

1.4.1 Efecto del IMT054 en la proliferación de células madre mesenquimales

Se estudió el efecto del ODN IMT504 sobre la proliferación de MSCs de médula ósea en distintos modelos de ratón, mediante ensayos de recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). En primer lugar, se evaluó la concentración de IMT504. Observamos que el IMT504 induce un efecto sobre las células de médula ósea obtenidas a partir de ratones BALB/c. Para ello, se realizó una curva dosis-respuesta (**Figura 15**), donde observamos que las concentraciones más bajas del ODNs inducen un efecto mayor en la cantidad de UFC. Con 0,5; 1,5 y 4 μ l/ml de IMT504 obtuvimos recuentos comparables de 19 ± 2 , 18 ± 2 y $20\pm0,5$ UFC/ 2×10^6 CMO, respectivamente. A 6,5 μ g/ml de ODN se obtienen recuentos de 14 ± 3 UFC/ 2×10^6 CMO; y a 10,5 μ g/ml de ODN no observamos diferencias significativas respecto del control (**Figura 15**).

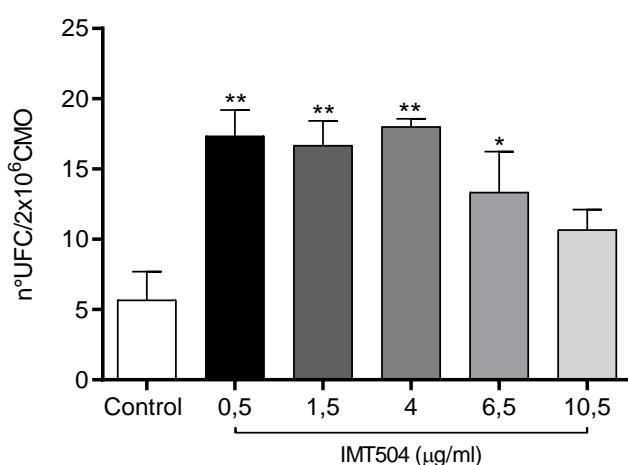


Figura 15: Curva dosis respuesta del ODN IMT504 sobre el recuento de UFC de MSCs de médula ósea de ratones BALB/c (n=6). ANOVA de una vía y Holm-Sidak's para comparaciones múltiples: *p<0,05; **<0,01.

Estos resultados se tomaron como base para continuar los estudios de proliferación de MSCs de médula ósea de ratones NOD prediabéticos y diabéticos. Nuevamente, se determinó que la concentración más baja de IMT504 utilizada ($0,5\mu\text{g}/\text{ml}$) induce la máxima proliferación ($63\pm1 \text{ UFC}/2\times10^6 \text{ CMO}$), mientras que la concentración más alta ($10,5\mu\text{g}/\text{ml}$) no induce significativamente la proliferación de las MSCs (**Figura 16A**). En función de estos resultados seleccionamos como concentración de trabajo la concentración de $0,5\mu\text{g}/\text{ml}$ de IMT504.

A continuación, comparamos el efecto del IMT504 sobre MSCs de médula ósea de animales NOD prediabéticos (pre-DT1) y diabéticos (DT1). Observamos, efectivamente, que el tratamiento con $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ de IMT504 induce la proliferación de MSCs en ambos grupos, con 12 y $17 \text{ UFC}/2\times10^6 \text{ CMO}$, respectivamente (**Figura 16B**). Finalmente, se estudió el efecto de altas concentraciones de IMT504 sobre las MSCs de médula ósea de ratones NOD pre-DT1 y DT1. Nuevamente, observamos que dosis altas de ODN (a partir de $6,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) inhiben la proliferación de MSCs (**Figura 16C**).

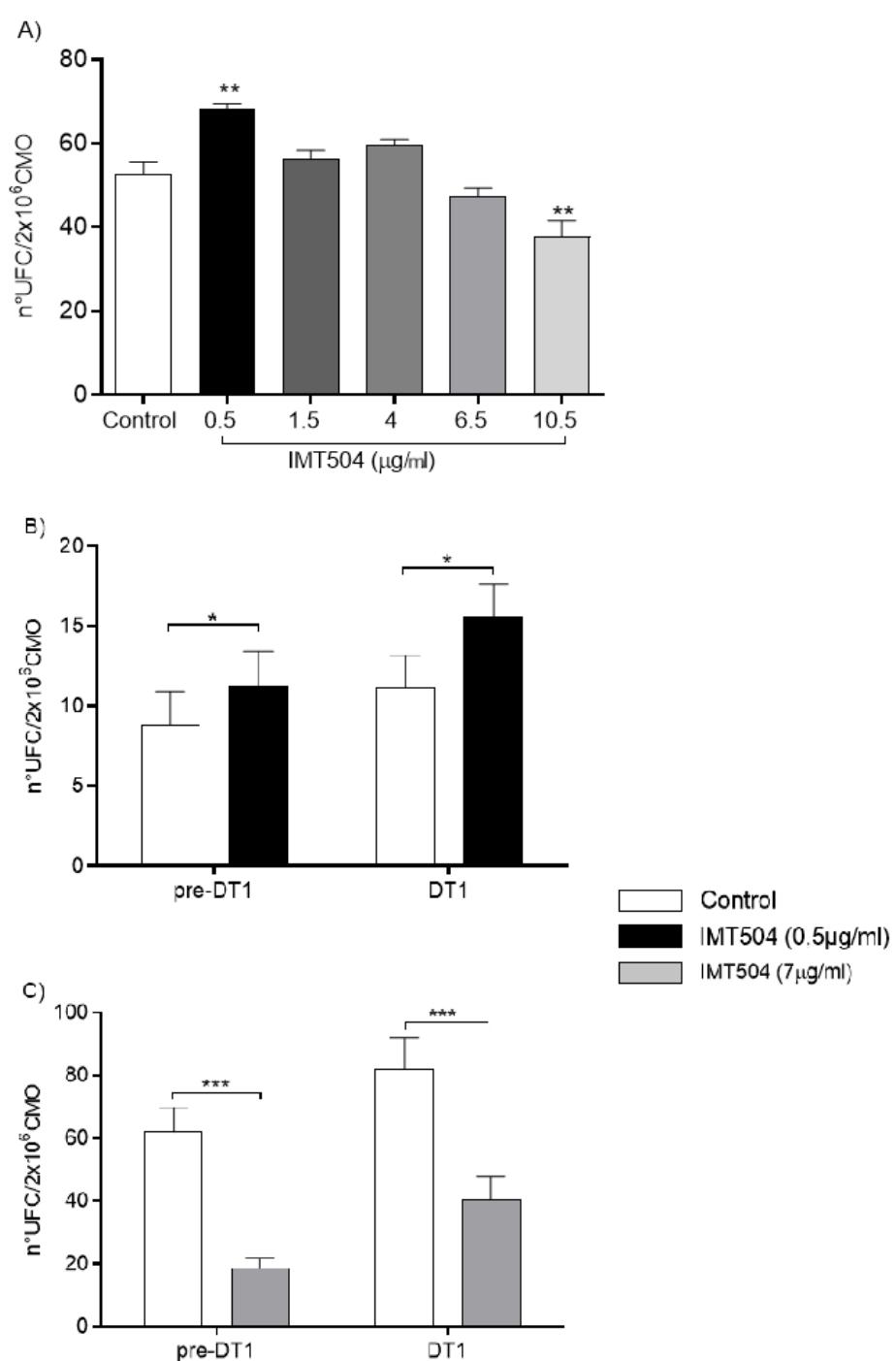


Figura 16: Efecto del IMT504 sobre la capacidad formadora de colonias de células de médula ósea de ratones NOD pre-DT1 y DT1. Determinación de la concentración efectiva de IMT504 ($\mu\text{g/ml}$). **(A)** Curva dosis respuesta en MSCs de animales pre-DT1. **(B)** Efecto de una dosis baja (0,5 $\mu\text{g/ml}$) y, **(C)** una dosis alta (6,5 $\mu\text{g/ml}$) de IMT504 sobre MSCs de animales pre-DT1 y DT1. Por grupo experimental se trabajó con un n=6. ANOVA de una vía y Holm-Sidak's para comparaciones múltiples en la figura de **A**) y ANOVA de dos vías y Sidak's para comparaciones múltiples en las figuras **B** y **C**): *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Estudios previos han demostrado que el IMT504 tiene efectos en la viabilidad de células B humanas de pacientes con leucemia linfocítica crónica¹⁵³, por lo que decidimos evaluar el efecto del ODN sobre la viabilidad de MSCs de MO de ratones NOD pre-DT1 y DT1.

En primer lugar, determinamos que no hay un efecto citotóxico del IMT504 sobre las MSCs con ninguna de las concentraciones utilizadas (**Figura 17 A Y B**). Más aun, concentraciones bajas de IMT504 (0,5 y 1,5 µg/ml) incrementan significativamente la viabilidad/supervivencia en MSCs de animales pre-DT1 (**Figura 17A**). Por otro lado, en MSCs provenientes de ratones diabéticos, no detectamos efecto alguno con ninguna de las concentraciones/dosis evaluadas (**Figura 17B**). Si bien no hay diferencias significativas se puede observar un leve aumento en la viabilidad de MSCs estimuladas con dosis bajas de IMT504. Esta tendencia o ausencia de significancia podría relacionarse con una menor capacidad de respuesta de MSCs extraídas de animales con esta patología^{154,155}.

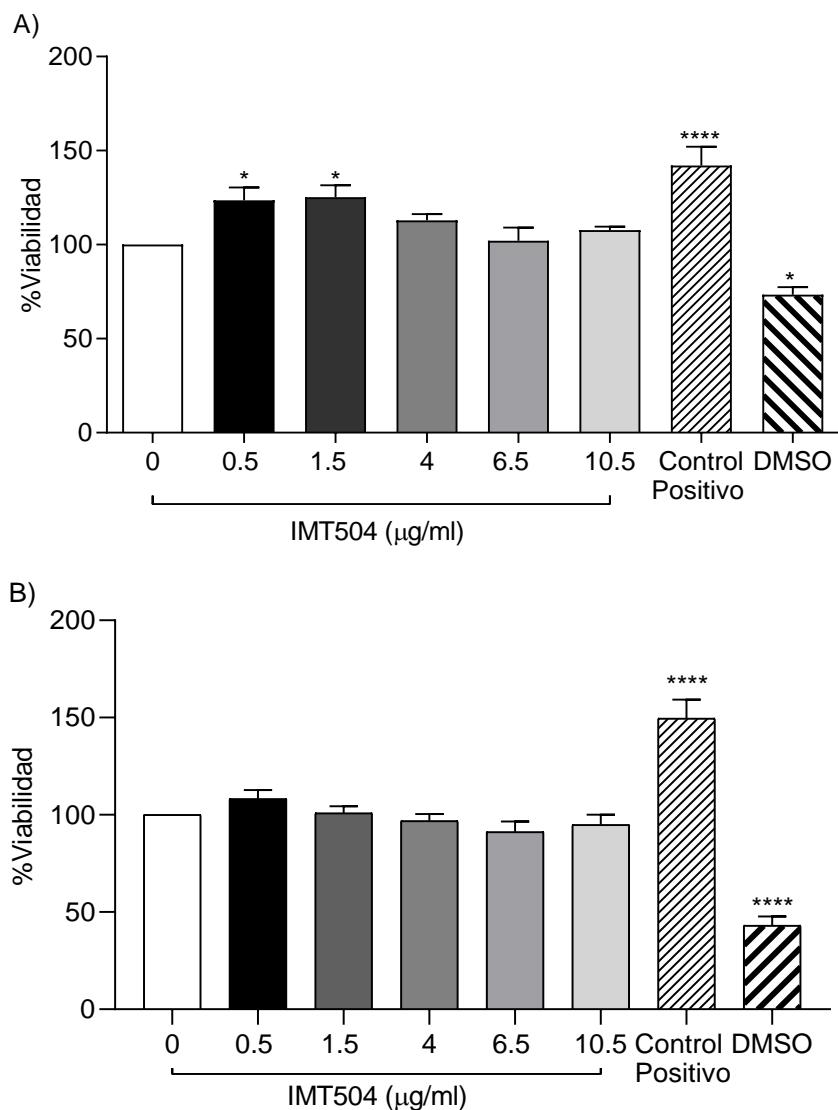


Figura 17: Efecto del IMT504 sobre la viabilidad de las MSCs de médula ósea de ratones NOD (A) prediabéticos y (B) diabéticos. Como control positivo se utilizó medio completo con 10% SFB y como control de muerte medio con DMSO al 5%. Para cada grupo experimental n=6. ANOVA de 1 vía y Dunnett's para comparaciones múltiples, *p<0,05; ****p<0,0001.

Luego, se estudió el efecto del IMT504 sobre la apoptosis en MSCs de ratones DT1. Para ello, cuantificamos la proporción de células apoptóticas luego de la estimulación con IMT504 durante 4 hs. Evaluamos tres condiciones experimentales, a saber: DMEM baja concentración de glucosa (“baja”) + 20% SFB, como control de viabilidad; DMEM baja + 10% DMSO, como control de apoptosis; y DMEM baja +

IMT504 0,5 µg/ml, como grupo experimental. El porcentaje de células apoptóticas fue del 8%, 75% y 37% respectivamente (**Figura 18**). Si bien no hay evidencias significativas, se puede observar que el porcentaje de células viables es mayor en los grupos tratados con SFB e IMT504. Aunque debemos resaltar que el porcentaje de células apoptóticas es tres veces mayor en presencia de IMT504 respecto al grupo con SFB. Además, el efecto protector de la apoptosis que muestra el IMT504 se ha descripto en modelos de diabetes inducida¹⁵⁶. Si consideramos los datos de viabilidad y apoptosis en MSCs extraídas de animales DT1 luego del tratamiento con IMT504, podemos inferir que el aumento en el número de células apoptóticas no nos permite detectar diferencias en los ensayos de viabilidad.

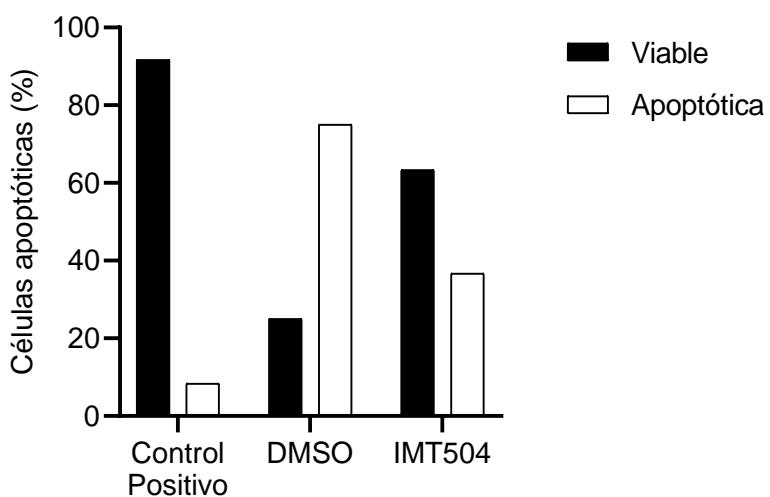


Figura 18: Efecto del tratamiento con IMT504 en la inducción de células apoptóticas. MSCs de ratones NOD DT1 (n=2) se estimularon, durante 4 hs, con DMEM + 0,5 µg/m IMT504, DMEM+20%SFB y DMEM+10%DMSO. Las barras muestran % de células viables y apoptóticas.

1.4.2 Sitio de unión del IMT054 en las células madre mesenquimales

Sabiendo que el IMT054 actúa sobre las MSCs de ratones NOD pre-DT1 y DT1, decidimos esclarecer la vía por la cual actúa el IMT504, es decir, determinar cuáles son los sitios de acción del ODN en la célula. Por un lado, estudiamos por inmunofluorescencia si había colocalización entre IMT504* y marcadores citoplasmáticos y nucleares a 37°C. Observamos que, tanto en animales pre-DT1 como DT1, tanto el citoplasma como el núcleo aparecen marcados con el IMT504* luego del tratamiento (**Figura 19**).

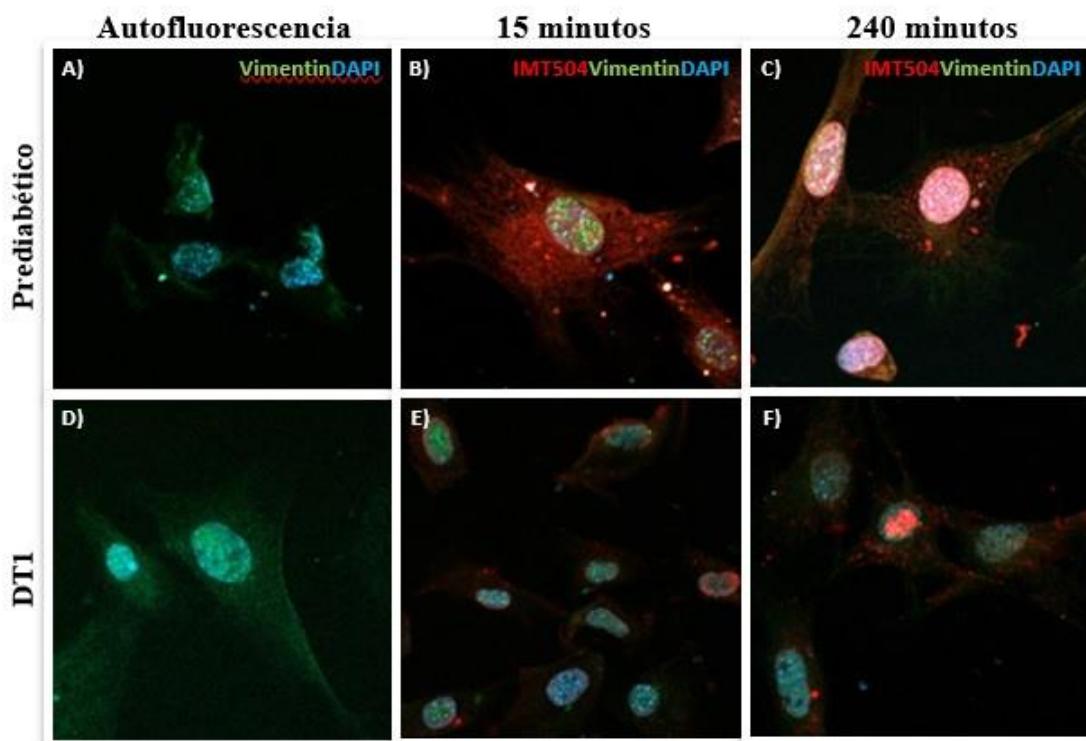


Figura 19: Inmunofluorescencia en MSCs de ratones NOD prediabéticos y diabéticos tratados con IMT504 marcado a 37°C. **A** y **D**) MSCs sin tratamiento, autofluorescencia. MSCs tratadas con 0,5µg/ml de IMT504 marcado durante **B** y **E**) 15 minutos y **C** y **F**) 240 minutos. Luego se fijaron las células y se tiñeron con marcadores citoplasmático (anti-vimentin) y nuclear (DAPI) 40X.

Sin embargo, se observa un cambio en la intensidad de la marca citoplasmática y nuclear según el tiempo de incubación. A los 15 minutos, la intensidad de IMT504* es mayor en el citoplasma mientras que, a tiempos más largos, el núcleo presenta mayor

intensidad (**Figura 19 B y C**). Si bien la intensidad del fluoróforo es levemente menor en MSCs DT1, la marcación se encuentra principalmente en el citoplasma a los 15 min., mientras que a los 240 min. se la observa en mayor medida en el núcleo (**Figura 19 E y F**), por lo que sigue el mismo patrón que en MSCs pre-DT1.

Por otro lado, decidimos estudiar si el ingreso del IMT504* a las MSCs está mediado por un transporte activo. Para ello, repetimos el ensayo de inmunofluorescencia anterior, pero a 4°C. Observamos que el ingreso del IMT504* es menor, tanto al núcleo como al citoplasma de MSCs de animales pre-DT1 y DT1, aunque existe (**Figura 20**). Esto podría indicar que solo una menor proporción del ODN ingresa a las células por difusión.

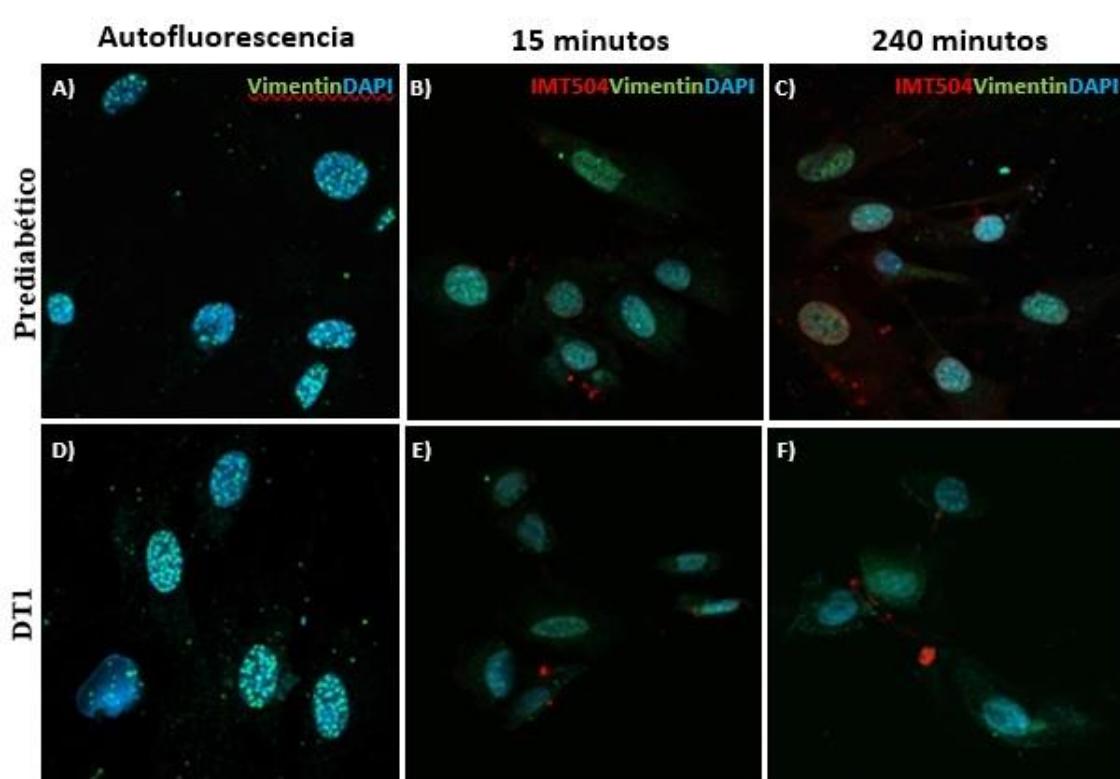


Figura 20: Inmunofluorescencia en MSCs de ratones NOD prediabéticos y diabéticos tratados con IMT504 marcado a 4°C. **A y D)** MSCs sin tratamiento, autofluorescencia. MSCs tratadas con 0,5µg/ml de IMT504 marcado durante **B y E)** 15 minutos y **C y F)** 240 minutos. Luego, se fijaron las células y se tiñeron con marcadores citoplasmático (anti-vimentin) y nuclear (DAPI) 40X.

1.4.3 Efecto del IMT504 sobre la movilización de las células madre mesenquimales

Se ha establecido que el tratamiento *in vivo* con IMT504 revierte la condición diabética en diferentes modelos animales de diabetes (incluidos ratones NOD), donde se observa que mejoran los parámetros tanto endocrinológicos inmunes como histológicos (preservación/recuperación de islotes pancreáticos)¹⁰⁹. Además, en modelos de dolor neuropático, se ha determinado que la disminución del dolor en las zonas de inflamación está relacionada con la llegada de MSCs al sitio de lesión¹⁵⁷. Por estos motivos, decidimos estudiar si las MSCs obtenidas a partir de ratones NOD pre-DT1 y DT1 modificaban su patrón de migración luego del tratamiento con IMT504.

Primero, evaluamos el efecto a largo plazo del IMT504 (18hs) sobre la movilización de las MSCs (**Figura 21**). Observamos que el tratamiento con dosis bajas del ODN (0,5 y 4 µg/ml) induce la movilización de MSCs pre-DT1 (**Figura 21A**) y DT1 (**Figura 21B**) a partir de las 12 horas. Por otro lado, dosis altas de IMT504 no inducen la migración de las MSCs en ninguno de los grupos experimentales, por lo que el porcentaje de herida abierta permanece constante durante todo el ensayo.

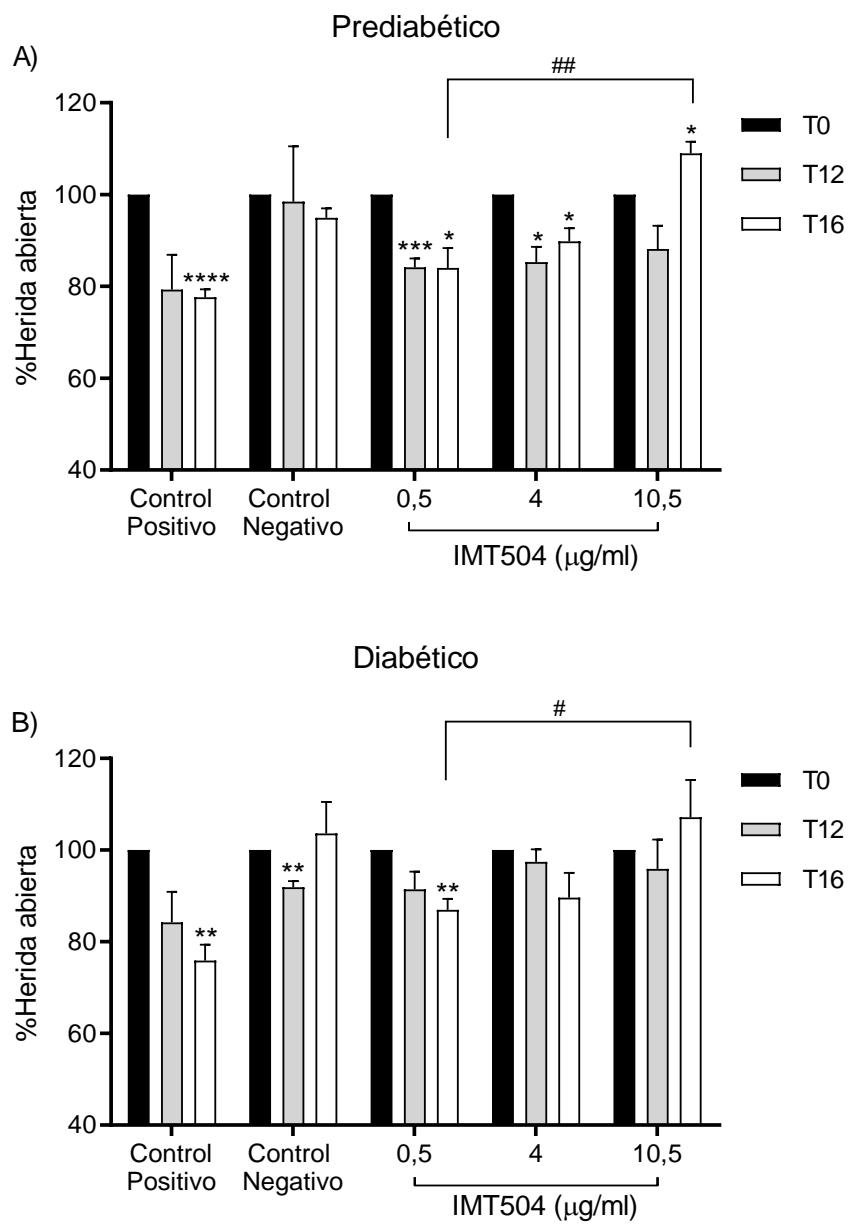


Figura 21: Efecto generado por una estimulación prolongada con IMT504 sobre la migración de las MSCs. Porcentaje de herida abierta al inicio (T0), a las 12 (T12) y 16 (T16) horas del tratamiento con IMT504 sobre MSCs de animales NOD (A) prediabéticos y (B) diabéticos. Los controles positivo y negativo corresponden a medio completo con y sin 20% SFB, respectivamente. Para cada grupo n=6. ANOVA de dos vías y Dunnett's para comparaciones múltiples: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 T0 vs T12/T16 para cada grupo. #p<0,05; ##p<0,01 IMT504 0,5 $\mu\text{g/ml}$ vs 10,5 $\mu\text{g/ml}$ a T16.

En segundo lugar, se evaluó si el tratamiento a corto plazo con IMT504 era suficiente para inducir la movilización celular (**Figura 22**). Se observó el mismo patrón que con el tratamiento a largo plazo. Esto es, MSCs pre-DT1 tratadas durante 2hs con 0,5 µg/ml de IMT504 inducen la migración celular (**Figura 22A**). En contraposición con lo observado en estimulaciones prolongadas con IMT504, los resultados no muestran diferencias significativas con concentraciones de 10,5 µg/ml, lo que indicaría que no hay efecto en la movilidad de las MSCs (**Figura 22A**). En el caso de MSCs DT1 se puede observar la misma tendencia que en MSCs prediabéticas, aunque las diferencias observadas no fueron significativas (**Figura 22B**).

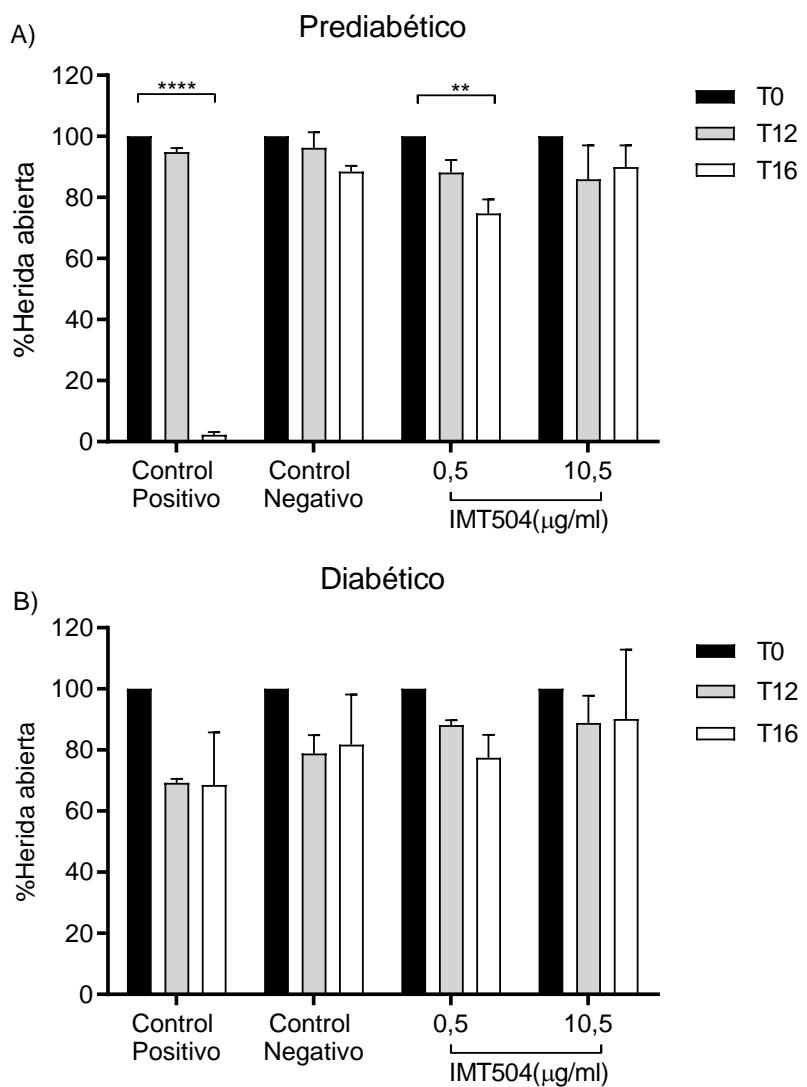


Figura 22: Efecto generado por la estimulación corta (2hs) con IMT504 sobre la migración de MSCs de ratones NOD. Porcentaje de herida abierta al inicio (T0), a las 12 (T12) y a las 16 (T16) horas de generar la herida en la monocapa de MSCs de animales **(A)** prediabéticos y **(B)** diabéticos. Los controles positivo y negativo corresponden a medio completo con y sin 20% SFB, respectivamente. Para cada grupo n=6. ANOVA de dos vías y prueba de comparaciones múltiples Dunnett's: *p<0,05; ****p<0,0001 vs T0.

1.4.4 Efecto del IMT504 en la expresión génica de las células madre mesenquimales

Las MSCs son células multipotentes de gran interés por su posible desarrollo en nuevas terapias celulares y el tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes. Sus efectos están mediados por citoquinas y quimioquinas que orquestan las funciones desempeñadas por las MSCs. Dentro de estos mediadores, se sabe que la IL-6 y TGF- β cumplen un rol fundamental en la regulación de la proliferación, diferenciación, migración, apoptosis e inmunomodulación. Se sabe que la síntesis/secreción de TGF- β por las MSCs participa en el silenciamiento de la respuesta inflamatoria. Además, induce en las MSCs su proliferación y migración hacia el sitio de lesión¹⁵⁸. Por su parte, la presencia de IL-6 está relacionada con la incapacidad de apagar la respuesta inmune¹⁵⁹. También, se sabe que la producción de IL-6 está relacionada con estadios más indiferenciados de las MSCs¹⁶⁰. Por todo lo dicho, decidimos evaluar la expresión de estos genes en MSCs extraídas de ratones NOD pre-DT1 y DT1.

El tratamiento de MSCs con IMT504 cambia el perfil de expresión génica entre los animales pre-DT1 y DT1. En ratones prediabéticos y diabéticos, al utilizar ODN control, observamos para IL-6 y TGF- β una tendencia clara hacia la disminución de la expresión génica (**Figura 23**). Contrariamente, el uso de IMT504 invierte el sentido de expresión de los genes en MSCs DT1 respecto de las pre-DT1. Podemos ver que el tratamiento con 10,5 μ g/ml de IMT504 inhibe la expresión de IL-6 y TGF- β en MSCs pre-DT1, mientras que 0,5 μ g/ml de IMT504 estimula la expresión de IL-6 sin alterar TGF- β (**Figura 23A**). En MSCs de animales DT1 podemos ver que el tratamiento con 10,5 μ g/ml de IMT504 induce la expresión de IL-6 y TGF- β , y que 0,5 μ g/ml tienden a disminuir IL-6 e inducir significativamente la expresión de TGF- β (**Figura 23B**). En base

a estos resultados podemos inferir que el IMT504 modula la expresión de los genes evaluados y, además, su efecto depende del microambiente en el que esas células se encuentran.

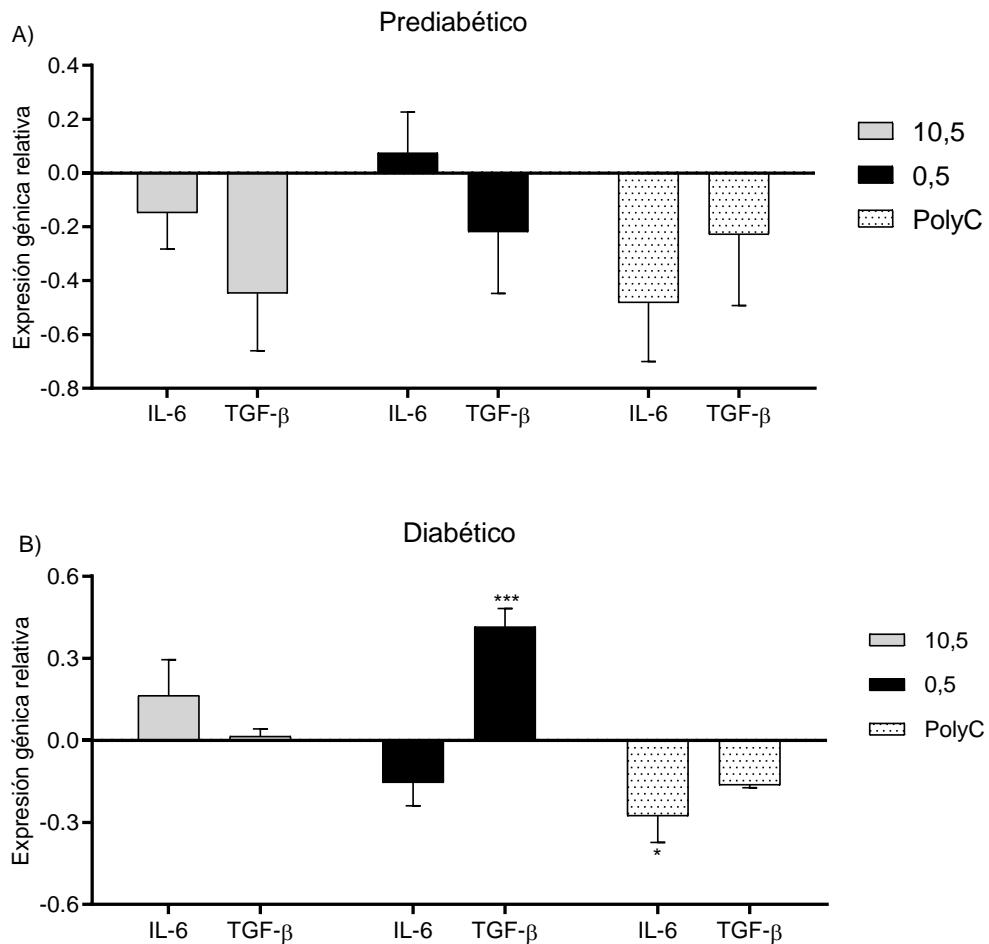


Figura 23: Cuantificación de la expresión génica de IL-6 y TGF- β en MSCs de médula ósea de ratones NOD (**A**) prediabéticos y (**B**) diabéticos, luego de la estimulación durante 2hs con ODNs. Los grupos de ODN corresponden a 10,5 μ g/ml y 0,5 μ g/ml de IMT054 y 4 μ g/ml de PolyC. La expresión génica relativa representa el logaritmo del grado de cambio (del inglés fold change). ANOVA de dos vías y prueba de comparaciones múltiples Dunnett's. *p<0,05-, ***p<0,0001 vs control (DMEM).

1.5 Discusión

En estudios preclínicos realizados en diversas enfermedades inflamatorias se ha demostrado que las MSCs son efectivas como terapias celulares. En los modelos animales utilizados, estas células logran modular la respuesta inmune de acuerdo con el microambiente, e inducir la regeneración de tejidos y/o directamente regenerar el tejido. Sin embargo, el uso de estas terapias en ensayos clínicos es sumamente invasivo, ya que implica la extracción por punción medular de MSCs, el cultivo y tratamiento de las mismas *in vitro*, para luego comenzar los procedimientos de trasplante celular en el paciente. Por este motivo surge como alternativa del trasplante el uso de drogas sintéticas que tengan la capacidad de estimular las MSCs endógenas.

Estudios previos sugieren que el IMT504 actúa sobre las MSCs tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. En modelos de lesión de nervios periféricos realizados en ratas se observó que el tratamiento con IMT504 disminuye significativamente el dolor neuropático¹⁰⁸. En el caso de la osteoporosis, el tratamiento de ratas con el ODN logró recuperar la estructura ósea, es decir, se observaron mejoras en indicadores morfométricos como, por ejemplo, volumen y densidad trabecular. En modelos de sepsis, el IMT504 reduce los niveles séricos de IL-6 y la carga de sepsis bacteriana en el hígado, bazo y pulmón¹⁰⁴. En modelos de lesión ósea, nuestro grupo ha determinado que el tratamiento sistémico con IMT504 incrementa el porcentaje de células y la capacidad osteogénica de las MSCs, efecto que lleva a la recuperación del hueso¹⁴⁴. Otra condición es la alodinia, donde se ve el efecto claro del IMT504 sobre la inflamación y MSCs. Esto significa que el ODN provoca un efecto antinflamatorio en el nervio lesionado y, además, promueve la migración de MSCs, células que van a terminar potenciando el efecto inmunológico y la reparación de los tejidos dañados¹¹¹. Finalmente, en un modelo de diabetes inducida por estreptozotocina en ratas, el tratamiento con IMT504 revierte el

daño pancreático, fenómeno que se evidencia al observar una disminución de la glucemia y un aumento en la producción de insulina hasta niveles normales. Todos los efectos observados de la droga se asocian a funciones de las MSCs, como puede ser la inmunomodulación y/o regeneración celular. Específicamente, el IMT504 induce la expansión, activación, reclutamiento y diferenciación de las MSCs, que logran mejorar el estado inflamatorio agudo en estas patologías.

Sabiendo que el ODN tiene la capacidad de revertir o mejorar la condición diabética en modelos de diabetes inducida y que dichos cambios se relacionaron, en parte, con efectos producidos por las MSCs, decidimos estudiar que ocurría en un modelo que se asemeja a la diabetes autoinmune. Entonces, en esta sección evaluamos la potencialidad del IMT504 de promover las MSCs endógenas de ratones NOD pre-DT1 o DT1.

En primer lugar, logramos determinar que las MSCs responden al tratamiento *in vitro* con IMT504 en este modelo de DT1 y que esa respuesta es dosis dependiente. A bajas concentración del ODN los efectos son más alentadores para mejorar el estado de daño. En nuestros resultados, con 0,5 µg/ml de IMT504 observamos una estimulación de MSCs endógenas y un aumento de su capacidad proliferativa, mientras que con dosis altas (mayor a 6,5 µg/ml) ocurrió el efecto inverso. Estos datos coinciden con resultados publicados en un modelo de diabetes inducida, donde demuestran que el tratamiento *in vivo* con IMT504 induce una respuesta diferenciada según la dosis¹⁰⁹. Además, determinamos que el IMT504 no tiene un efecto citotóxico, no observamos un efecto proapoptótico ni tampoco la disminución en la viabilidad celular. Es más, vimos que con dosis bajas (0,5/ 1,5 µg/ml) de IMT054 hay un aumento significativo en la viabilidad de las MSCs.

En segundo lugar, evaluamos la capacidad del IMT504 de ingresar a la célula. En ensayos de microscopía, observamos que las MSCs internalizan el IMT504 marcado de forma diferencial según el tiempo y la temperatura de incubación. A tiempos cortos (15 minutos) y 37°C el IMT504 que ingresa se encuentra mayoritariamente en el citoplasma de las MSCs, mientras que a tiempos largos (4hs) casi todo el ODN se encuentra en el núcleo. Cuando la incubación fue a 4°C, en cambio, el IMT504 se detecta solo en algunas células y en menor proporción. Estos resultados sugieren que la temperatura es indispensable en la permeabilidad y/o fluidez que permite el ingreso del IMT504. Nuestros resultados se contradicen con estudios en MSCs de ratas y de humanos, los cuales demostraron que cuando el IMT504 entra a estas células se ubica exclusivamente en el citoplasma¹⁵⁷. Esto podría explicarse debido a que los autores de dicho trabajo utilizaron una concentración 14 veces mayor (7 µg/ml) durante más tiempo (16hs), donde se podrían estar activando mecanismos para eliminar el ODN y, por ende, observar solo los restos del IMT504. Sin embargo, más experimentos deben realizarse para confirmar esta hipótesis.

Por último, evaluamos el efecto del IMT504 sobre su capacidad migratoria e inmunomoduladora de las MSCs. Antecedentes de nuestro grupo demostraron que el tratamiento de animales NOD DT1 con IMT504 mejoró el estado diabético. Dicho cambio se asocia a una mejora en la capacidad de regular la glucemia, que está acompañada de un incremento en el número y funcionalidad de las células β pancreáticas (preservación/regeneración) y de una disminución del infiltrado leucocitario inflamatorio en los islotes pancreáticos^{161,162}. Nos preguntamos entonces si estos efectos podían estar mediados o relacionados con la función de las MSCs. Al analizar la capacidad migratoria, observamos que las MSCs aisladas de animales pre-DT1 y DT1 y tratadas *in vitro* con 0,5 µg/ml de IMT504 durante 18hs inducen su movilización. Cuando evaluamos el efecto

a tiempos cortos (4hs), el ODN no indujo la migración de MSC de NOD DT1. Esto podría vincularse con lo propuesto por otros autores, que las MSC aisladas de animales con una diabetes establecida presentan una condición menos respondedora, es decir, que su capacidad de respuesta o funciones fisiológicas frente a estímulos endógenos o exógenos se ven disminuidas, posiblemente debido al microambiente desfavorable en el que se encuentran¹⁶³. Podemos decir, entonces, que las MSCs en animales DT1 necesitan tiempos más largos de estimulación para responder mientras que las MSCs de animales pre-DT1 son más reactivas y con 4hs de estímulo es suficiente para inducir la migración y “*homing*” (habilidad de ciertos tipos celulares de ingresar y localizarse en un determinado nicho)^{164,165}. Respecto a la capacidad inmunomoduladora de las MSCs y sabiendo que con el tratamiento de IMT504 hay cambios en la respuesta inmune de los animales DT1, tanto del modelo NOD con una respuesta autoinmune espontánea como en la diabetes inducida por múltiples dosis bajas de STZ, evaluamos los genes que podrían estar involucrados en estos mecanismos. Pudimos determinar que el tratamiento con 0,5 µg/ml de IMT504 inhibe la producción de IL-6 y aumenta significativamente la producción de TGF-β. Estudios previos demostraron que la presencia de IL-6 impide la inactivación del sistema inmune, funcionando como citoquina proinflamatoria¹⁵⁹. Además, TGF-β induce la migración de las MSCs¹⁵⁸. Nuestros resultados van en línea con estos antecedentes, ya que en presencia de IMT504 (0,5 µg/ml) disminuye la expresión de IL-6 y aumenta la expresión de TGF-β, lo que explicaría la disminución en la actividad del sistema inmune (y menos infiltrado inflamatorio) y el aumento en el número de células β (regeneración)^{108,114}.

Por todo lo expuesto, podemos concluir que el IMT504 tiene un efecto sobre las MSCs y que ese efecto podría participar en la reversión del estado diabético de los animales NOD DT1.

Capítulo 2

2.1 Efecto del IMT504 en células del sistema inmunológico

El sistema inmunológico (SI) es una compleja red de factores humorales, células, tejidos y órganos que median la resistencia a patógenos, intervienen en procesos de autoinmunidad y pueden mediar la respuesta a tumores. La integridad de los organismos depende del SI, que se encarga de mantener la homeostasis. Los mecanismos de defensa de primera línea del SI son las barreras físicas y componentes de la inmunidad innata, que reconocen patrones asociados a patógenos y despiertan una respuesta inespecífica. Otros mecanismos de defensa son los inducidos o estimulados por sustancias específicas presentes en el patógeno, que constituyen la inmunidad adquirida. Dicha inmunidad está mediada por LB y LT, células presentadoras de antígeno (APC), anticuerpos o inmunoglobulinas, sistema del complemento y citoquinas. Así, el SI es capaz de reconocer a los componentes del agente patógeno e iniciar una serie de respuestas encaminadas a eliminarlo, cuyas características fundamentales son la especificidad y la memoria¹⁶⁶.

Las células que forman parte del SI se organizan a su vez en tejidos y órganos, estructuras que reciben el nombre de sistema linfoide. Los tejidos y órganos linfoideos se pueden dividir en primarios y en secundarios o periféricos. Los órganos primarios son los lugares de la linfopoyesis, mientras que los periféricos son los lugares de interacción entre las distintas células inmunes y los patógenos. Por ende, los órganos tienen como misión proveer un ambiente favorable para que se desencadene la respuesta inmunitaria y, en condiciones normales, una respuesta que protege al organismo de los antígenos nocivos. Sin embargo, frente a ciertos patógenos o condiciones, la respuesta inmune puede ser limitada. Aunque conocemos bastante sobre la fisiopatología del SI, aún quedan por dilucidar complejos mecanismos que podrían contribuir al desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas¹⁶⁷.

La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune en donde los LT autorreactivos destruyen de forma masiva las células β pancreáticas. El desarrollo de la enfermedad inicia porque las APC presentan péptidos de las células β . Es decir, las APC reconocen proteínas propias en el páncreas, migran a los nódulos linfáticos y presentan estos autoantígenos a los LT colaboradores ($CD4^+$). Estos, a su vez, median la activación de LT autorreactivos efectores ($CD8^+$). Luego, los LT $CD8^+$ vuelven al páncreas y lisan las células β que expresan autoantígenos en el complejo mayor de histocompatibilidad 1 (CMH-I). La liberación de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno por células innatas (macrófagos, células NK y neutrófilos) que infiltran el páncreas exacerba la destrucción de células β . Además, las células T reguladoras no suprimen la respuesta autoinmune de forma efectiva, lo que intensifica el proceso. Los LT activados dentro de los nódulos linfáticos pancreáticos estimulan en LB la producción de autoanticuerpos contra proteínas específicas de células β ¹⁶⁸ (**Figura 24**). Estos autoanticuerpos suelen estar dirigidos contra la insulina, la enzima glutamato decarboxilasa (GAD), el antígeno de insulinoma 2 (IA-2) y el transportador de zinc 8 (ZnT8), y son utilizados como biomarcadores de la enfermedad¹⁶⁹.

Nuevas evidencias sostienen que la DT1 no puede ser el resultado, únicamente, del mal funcionamiento de las células T, y argumentan que debe haber una participación clara de las células β . Por un lado, se observó que pacientes sanos presentan LT autorreactivos, que tiene menos avidez en sus receptores y, entonces, no desarrollan la enfermedad. Por otro lado, en pacientes sanos versus diabéticos, hay muchas diferencias en la histología y funcionamiento del páncreas, particularmente de las células β ¹⁶⁹.

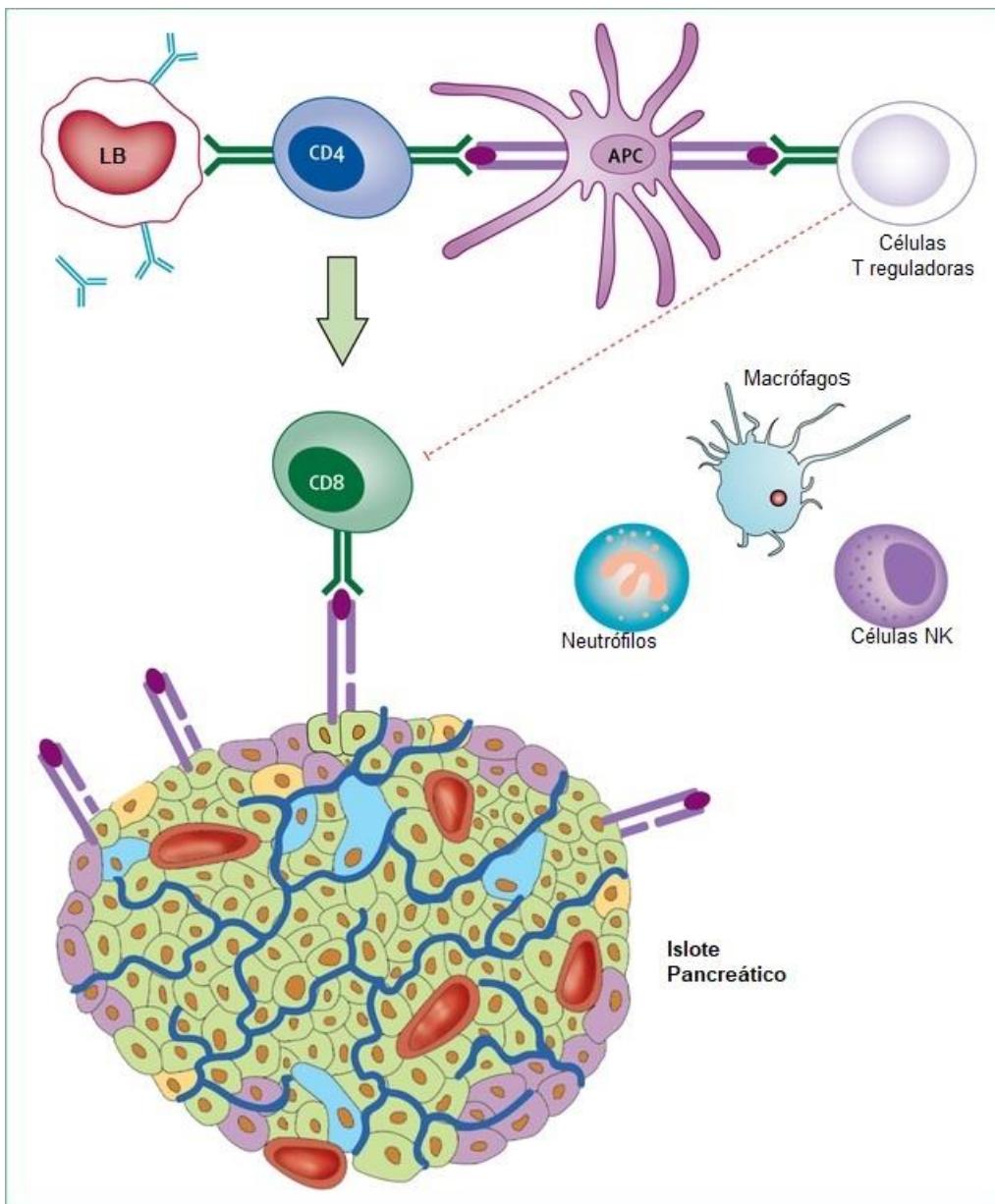


Figura 24: Immunopatogénesis de la diabetes tipo 1. Interacción entre células del sistema inmune y las células de los islotes pancreáticos. Imagen adaptada de Linda A DiMeglio et al The Lancet 2018.

En la búsqueda de nuevas terapias, que permitan resolver fallas y/o mejorar el funcionamiento del SI, surgen los ODNs como estrategias para el tratamiento de enfermedades inflamatorias⁸⁶. Los ODN aparecen como moléculas inmunoestimuladoras, ya que funcionan como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), simulando el ADN bacteriano¹⁷⁰. Como se mencionó en la Introducción, dentro de los ODN se conocen dos grandes familias, los ODN que tienen en su secuencia motivos de activación

CpG y los que no-CpG (PyNTTTGT). En nuestro laboratorio se realizaron ensayos con el IMT504, que es el prototipo de esta última subfamilia de ODNs PyNTTTGT.

El ODN IMT504, con respecto a las funciones inmunológicas, actúa sobre distintas poblaciones celulares que inducen la secreción de mediadores de la respuesta innata y adaptativa. Puntualmente, actúa sobre los LB y las células dendríticas plasmacitoides (pDC: del inglés plasmacytoid dendritic cells) humanas, tipos celulares englobados con el nombre de células presentadoras de antígeno (APC, del inglés antigen presenting cells)⁹². Estas células, como su nombre lo indica, van a presentar el antígeno a otras células inmunes y así activar la respuesta inflamatoria: inducir la producción de citoquinas, activar diversos tipos celulares, estimular la producción de anticuerpos y lograr generar una memoria inmunológica. Además, el IMT504 actúa sobre células NKT (CD56⁺CD3⁺) y NK (CD56⁺CD3⁻), donde induce la secreción de GMC-FS en presencia de IL-2. Al igual que los ODN CpG, induce la secreción de INF-γ, IL-6 y TNF-α en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés peripheral blood mononuclear cells)¹⁷¹.

El uso del IMT504 como adyuvante nos permitió entender que posee un efecto inmunoestimulador, ya que promueve la respuesta inmune (aumenta el título de anticuerpos), disminuye el tiempo de respuesta y la cantidad de antígeno implementado, aumenta la diversidad de respuesta y mantiene la memoria inmune de LB¹⁰². Luego, en modelos de sepsis se demostró que el IMT504 no solo logra estimular el SI¹¹⁴, sino que puede apagar la respuesta. Además, se observó que la inducción o inhibición en la expresión de genes podía variar de acuerdo con el tiempo de estimulación. Por ejemplo, tiempos cortos de incubación (máximo 4 hs) inducen la expresión de IL-6, IL-8, IL-10 y CCL3/7; mientras que a tiempos largos (más de 16 hs) se induce IL-27, IL-35 y CCL17.

A partir de ahí se considera que el ODN es una molécula inmunomoduladora y que depende del entorno o microambiente en el que actúa.

En el modelo de diabetes autoinmune espontánea en ratones NOD se observó que el tratamiento con IMT504 tiene una actividad inmunomoduladora, además de efectos a nivel fisiológico y tisular. Brevemente, el tratamiento con IMT504 restablece los niveles de glucemia en animales con DT1 y, a nivel tisular, observamos una disminución en el infiltrado inflamatorio y un aumento tanto en el número de islotes pancreáticos como de insulina¹⁵⁶. En relación con el sistema inmunológico, determinamos que inhibe el infiltrado leucocitario a través de una disminución en células CD45⁺. Dicha inhibición podría estar relacionada con el aumento en la expresión de galectina-3 (Gal-3), ya que esta proteína ayuda a evadir el sistema inmune en condiciones patológicas autoinmunes¹⁷². Respecto a factores solubles, por un lado, el IMT504 disminuye citoquinas asociadas a la respuesta de LT colaboradores 2 (Th2) como IL-4. Las células Th2 orquestan la respuesta inmune frente a helmintos y hacia la reparación celular, pero además contribuyen al desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas¹⁷³. Por otro lado, se vio que aumenta la expresión de la subunidad p40 que, actuando como homodímero, desencadena una respuesta antiinflamatoria. El tratamiento con IMT504 también aumenta los niveles séricos de TNF- α , citoquina con capacidad de inhibir LT autorreactivos que, por ende, limita la extensión y severidad de la autoinmunidad¹⁶¹. Todos estos acontecimientos, más el efecto del IMT504 sobre las células madre, lograrían mejorar la condición diabética al regenerar las células β , recuperar los niveles de insulina y mejorar el metabolismo de glúcidos. De todas formas, es fundamental dilucidar los mecanismos y funciones por los que actúa el ODN IMT504 en distintos tipos celulares para establecer un posible tratamiento para la DT1.

2.2 Objetivos particulares

Como vimos, el objetivo de nuestro laboratorio es determinar el efecto del oligonucleótido IMT504 en ratones diabéticos no obesos (NOD/LtJ), modelo de preferencia para estudiar la DT1. Particularmente, en este capítulo y, en colaboración con el laboratorio de investigación de la Profesora. Dra. Carolin Daniel en el Helmholtz Zentrum de Múnich Alemania, evaluamos el mecanismo de acción del IMT504 en células linfoides de animales pre-DT1 y DT1 de ratones NOD/LtJ.

Nos propusimos estudiar el efecto directo del IMT504 en linfocitos T y B aislados de nódulos linfáticos y bazo de ratones NOD/LtJ pre-DT1 y DT1. Para eso evaluamos:

- El perfil linfocitario luego del tratamiento, determinando que tipo de células linfoides se ven comprometidas por efecto del IMT504.
- La capacidad de los ODN de inducir células tolerogénicas, en particular, linfocitos T reguladores.
- El perfil de citoquinas y quimioquinas involucradas en la regulación de la DT1 presente en distintas subpoblaciones linfocitarias.
- La expresión de genes involucrados en las vías intracelulares implicadas en la fisiopatología de la DT1.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Modelo animal

Se utilizaron ratones NOD/ShiLtJ (CATt#: JAX:001976, RRID: IMSR_JAX:001976, The Jackson Laboratory) y se establecieron colonias en el bioterio del Instituto de Investigación sobre Diabetes (IDF, Institut für Diabetesforschung, Helmholtz zentrum München). Los protocolos utilizados fueron aprobados por el centro de protección animal de Alemania, que sigue las normativas establecidas por el NIH (EE. UU.). Para la determinación de la glucemia, se anestesieron los animales con isoflurano (Piramal Critical Care, INC.), se extrajo una gota de sangre por punción ocular y se midió con tiras reactivas en glucómetro.

2.3.2 Disección de nódulos linfáticos y bazo, seguido de extracción de células linfoideas.

Se determinaron las glucemias de los animales previo al sacrificio (cámara de dióxido de carbono) y se establecieron dos grupos experimentales: prediabéticos (pre-DT1) y diabéticos (DT1). Se sacrificaron animales de cada grupo, se realizó una incisión en la región abdominal y se trajeron nódulos linfáticos (NL) axilares (NLax), mesentéricos (NLmes) y pancreáticos (NLP). Los mismos se colocaron en PBS 10% SFB con antibióticos y se mantuvieron en hielo. Se aislaron las células de los NL en cabinas de flujo laminar de bioseguridad 2. Para el procesamiento, se disgregaron los NL a través de filtros celulares con poros de 70 μ m. Se transfirieron las células y se centrifugaron (400 g) a 4 °C. El pellet celular se resuspendió en solución salina balanceada Hank's (HBSS, GibcoTM) y se utilizó en los siguientes ensayos.

Para la extracción del bazo, se sacrificaron animales pre-DT1 y DT1, se realizó una incisión en la zona abdominal izquierda y se extirpó el bazo completo. Luego, se colocó en PBS 10% SFB con antibióticos y se mantuvo en hielo. Para disgregar el bazo se siguieron los mismos pasos utilizados para los nódulos linfáticos. El pellet celular se resuspendió en buffer ACK (siglas para amonio-cloruro-potasio, solución hipotónica para lisar glóbulos rojos), y se lavó con PBS. De esta forma, se aislaron los esplenocitos, los cuales se resuspendieron en RPMI 10% suplementado con antibióticos para el desarrollo de los ensayos de citometría de flujo.

2.3.3 Aislamiento de células T *naïve*

La suspensión de células linfoides se incubó con el reactivo Fc-Block (BioLegend Cat. No. 156604) 1:100 en HBSS, con el cual se bloquea el fragmento cristalizable (región Fc) no específico de los anticuerpos¹⁷⁴. Se preparó una solución de anticuerpos acoplados a fluoróforos que reconocían marcadores de interés; la misma contenía: PE CD44 (1:800), PerCP-Cy5.5 CD25 (1:200), A700 CD4 (1:400) y DAPI CD8a, CD11b, CD11c, CD14c, B220 y F480 (todos 1:400). Se agregó la solución de anticuerpos a la suspensión celular con Fc-Block y se incubó a 4°C. Luego, se lavaron las células con HBSS, se centrifugaron a 4°C, se resuspendieron en HBSS y se pasaron por filtro de 40µm hacia tubos de separación de células fluorescentes activadas (FACS). Se agregó SYTOX™Blue (ThermoFischer) para marcar las células muertas, según indicaciones del fabricante. Se seleccionaron células T *naïve* ($CD4^+CD25^-CD44^{-/low}$) por citómetro de flujo de alta sensibilidad (BD FACSAria™ III). El número de células aislado varió según los ensayos. La suspensión de células T *naïve* se lavó y resuspendió en medio completo (RPMI (Gibco™, ThermoFischer) suplementado con 10% (v/v) SFB (Gibco™), 1% v/v penicilina, 1% v/v estreptozotocina y 1% L-Glutamina (Sigma-Aldrich)). EL volumen en el que se resuspendieron las células fue determinado según el total de células por pocillo de cada experimento. Para los ensayos de inducción de celulares T reguladoras se plaquearon 10.000 células por pocillo y para los ensayos de expresión génica se plaquearon 50.000 células por pocillo.

2.3.4 Activación de esplenocitos con IMT504

Para la activación de esplenocitos, se determinó el número de células en cámara de Neubauer y se sembraron 1×10^6 células por pocillo de placa de 96 pocillos en RPMI sin SFB. Se trabajó por triplicado, 3 animales por grupo (pre-DT1 y DT1). Se agregaron los tratamientos en cada pocillo según corresponde, IMT504 (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y PolyC (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - control de especificidad de secuencia), durante 16 hs a 37°C. Se sembraron pocillos para los controles de citometría, autofluorescencia (células sin marcar) e isotipo (anticuerpos conjugados sin especificidad por la diana para determinar uniones no específicas). Luego, se lavó ces con PBS, se sacó el sobrenadante y se marcó con anticuerpos (anti CD40-PE y anti CD19-FITC, Cat#:60112FI.1 Tecnolab) según las especificaciones del proveedor. Finalmente, se lavó nuevamente con PBS, se fijó en PFA 1% a 4°C y se guardó en PBS hasta la citometría.

2.3.5 Inducción de células T reguladoras

A partir de células T *naïve* seleccionadas de GLax, GLmes y GLp de ratones NOD pre-DT1 y DT1 se realizaron los ensayos de inducción de células T reguladoras. Se resuspendieron las células en medio completo (RPMI) para tener 10.000 células T *naïve* por pocillo de placa de 96 pocillos con fondo en U. La misma fue previamente adsorbida con 5 μ g/ml de anti-CD3 y anti-CD28 en solución de adsorción durante 1h a 37°C. Se agregó RPMI suplementado con citoquinas (**Tabla 5**), para simular condiciones fisiológicas o proinflamatorias según corresponda. Luego, se le agregaron los tratamientos de acuerdo con el grupo, IMT504 (0,5 μ g/ml), PolyC (4 μ g/ml) y control sin ODNs. Se incubó a 37°C en estufa de 5% CO₂ durante 18hs.

Citoquinas	Concentración final	C.F	C.P
IL-2 (50000U/ml)	100U/ml	X	X
INF-γ (0.1mg/ml)	10ng/ml		X
IL-6 (0.1mg/ml)	10ng/ml		X
IL-1β (0.1mg/ml)	10ng/ml		X

Tabla 5: Concentración de citoquinas para mimetizar *in vitro* las condiciones fisiológicas (C.F) o las condiciones proinflamatorias (C.P) de animales pre-DT1 o DT1 respectivamente.

Pasadas las 18hs de incubación, se transfirieron las células a una placa nueva no adsorbida. Se cultivó durante 36hs. Luego, se comenzó con el proceso de marcación para poder analizar la inducción por citometría de flujo. Se centrifugó la placa, se retiró el sobrenadante, se resuspendió en una solución de anticuerpos (reactivo Fc-Block + CD25 + CD4+eF480) y se incubó durante 30 minutos a 4°C. Se lavaron con HBSS, se fijaron y

permeabilizaron las células siguiendo las instrucciones del kit de marcación (eBioscience™ Foxp3, CAT#:00552300, Invitrogen™). Brevemente, se resuspendieron las células con solución fijadora, se incubaron a 4°C, se agregó solución permeabilizadora, se centrifugó, se retiró el sobrenadante, se resuspendió con solución de anticuerpos intracelulares (Foxp3- FITC 1:200, Rorγt-PE 1:200 y Ki67-Qdot 1:400, eBioscience™) diluidos en solución permeabilizadora y se incubó a 4°C. Finalmente, se lavó con solución permeabilizadora, se retiró el sobrenadante, se resuspendió en HBSS, se filtró la suspensión con filtros de 40μm y se analizó por citometría de flujo (BD FACSAria™ III).

Los valores obtenidos por animal se relativizaron al grupo control (sin ODN) y se graficó el porcentaje de células positivas para CD4/CD25/Foxp3 en el grupo tratado con IMT504 y el de PolyC.

$$\%CD4^+CD25^+Foxp3^+ = \frac{\%células\ positivas\ de\ cada\ grupo \times 100}{\%células\ positivas\ del\ grupo\ control}$$

2.3.6 Inducción *ex vivo* de citoquinas

Se aislaron células de ganglios linfáticos de ratones NOD pre-DT1, se pasaron por filtro de 70 μ m, se lavaron con HBSS y se resuspendieron en RPMI suplementado. La suspensión celular se dividió en tres, uno por cada grupo experimental. Se agregó IMT504 (0,5 μ g/ml) o PolyC (4 μ g/ml) en los grupos con tratamiento de ODNs, según corresponda y se dejó un grupo sin tratar como control. Se incubó durante 18hs a 37°C y 5% CO₂. Luego, se lavó con HBSS. Para estimular la producción de citoquinas¹⁷⁵, se resuspendió el pellet con RPMI con 1,5mM CaCl₂, 1:2000 PMA (del inglés Phorbol myristate acetate, Sigma-Aldrich) y 1:20000 ionomicina (Sigma.Aldrich) y se incubó durante 4hs a 37°C. Transcurridas las 2 primeras horas se agregó a la suspensión anterior Golgi Plug 1:1000 (BD Biosciences) para bloquear el transporte de vesicular y evitar su liberación¹⁷⁶. Finalizadas las 4hs, se lavó con HBSS. Se resuspendió el pellet con reactivo de bloqueo Fc (1:50) en HBSS y se incubó 10 minutos a 4°C. Se agregaron los anticuerpos extracelulares marcados (**Tabla 6**) a la solución y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Se lavó con HBSS y luego se fijaron y permeabilizaron las células para la marcación intracelular siguiendo las indicaciones del fabricante (eBioscience™ Foxp3, CAT#:00552300, Invitrogen™). El pellet se resuspendió en HBSS con anticuerpos intracelulares marcados (**Tabla 6**), se incubó 40 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, se lavó por triplicado, se pasó la suspensión celular por filtros de 40 μ m y se analizó por FACS.

	Detector	Anticuerpos
Anticuerpos Extracelulares	Texas-RED	CD3 (1:100)
	PerCP-Cy5.5	CD25 (1:400)
	A700	CD4 (1:200)
	DAPI	CD8, CD11b, CD11c, F4/80, B220 y CD14 (1:300); eFluor450 FVD (1:1000)
Anticuerpos Intracelulares	PE Cy7	IL-4 (1:100)
	APC	INF γ (1:100)
	FITC	Foxp3 (1:200)
	PE	Roryt (1:200)
	Qdot605	IL-17 (1:100)
	BV711	IL-10 (1:100)

Tabla 6: Anticuerpos utilizados para determinar la producción de citoquinas en linfocitos por citometría de flujo. Se muestra la concentración de trabajo y el canal en el que se estudió cada proteína

2.3.7 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Se siguieron los protocolos descriptos en el capítulo uno de aislamiento de LT y de inducción de T reguladoras (hasta el día 1) para la extracción de ARN. Brevemente, a partir de NL de ratones NOD, se aislaron LT naïve ($CD4^+CD25^-CD44^{-low}$), se sembraron 20.000 células/pocillo en placas de 96 previamente adsorbidas con anti-CD3 y anti-CD28, se agregó el tratamiento con ODNs (0,5 μ g/ml IMT504 y 4 μ g/ml PolyC) y el estímulo de citoquinas según corresponda (condición fisiológica: IL-2; condición proinflamatoria: IL-2, INF γ , IL-6, IL-1 β) en 200 μ l de RPMI suplementado. Se incubó durante 18hs. Se lavó con PBS. Se transfirieron las células a un tubo de 1.5ml para comenzar el proceso de extracción de ARN. Se agregó QIAzol (Cat#:79306 QIAGEN®) para lisar las células y mantener la integridad de los ácidos nucleicos¹⁷⁷. Luego, se siguieron las indicaciones del fabricante del kit de extracción (miRNeasy Micro Kit, QIAGEN®). Se determinó la concentración y pureza del ARN por espectrofotometría (NanoPhotometer®N120 12-Channel microvolume). Se transcribieron 200 ng de ARN a ADN copia (ADNc) por PCR de transcripción reversa en dos pasos siguiendo las recomendaciones del fabricante (iScript™ cDNA Synthesis Kit, Cat# 1708891, BIO-RAD). Se adaptaron las indicaciones del fabricante (SsoFast™EvaGreen®Supermix, cat#:172-5205, BIO-RAD) para la amplificación por qPCR. Se mezclaron 5 μ l de supermix + 0,5 μ l de sondas sentido y anti-sentido + 1 μ l ADNc + 3 μ l H₂O libre de ARN/ADNasas. Las secuencias de las sondas (Sigma) se muestran en la **Tabla 7**. Las condiciones del termociclador utilizadas fueron las recomendadas por el fabricante del kit para el equipo de qPCR CFX96™ (BIO-RAD).

Gen	Sonda Sentido (5'-3')	Sonda Anti-Sentido (5'-3')
Map3K7	CTCCTCGTCTTCTGCCAGTG	GGTCACACGTGACAACGTGC
mTOR1	TTTGAAGGCCACTCTTGACC	CAGGGATGCCAAGACACAGT
PI3Kgc	CCTCCAAGAAGAACGCCCCTG	GTAAGGCAGAAGGCACAGGT
Tbet1	AAGTGGGTGCAGTGTGGAAA	TTGGAAGCCCCCTTGTGTT
STAT3	CGAAGCCGACCCAGGTAGTG	GATATGGGGTTGGCTGCTT

Tabla 7: Secuencia de sondas utilizadas para determinar la expresión génica en linfocitos T por qPCR.

2.4 Resultados

2.4.1 Efecto del IMT504 en la activación de esplenocitos.

Estudios previos demuestran que el IMT504 actúa sobre LB y LT en humanos. Entre varios efectos estudiados, se vio que el ODN logra aumentar el porcentaje de marcadores de activación, como CD80/86 y CD40¹⁵³. Además, hemos demostrado que el IMT504 induce un perfil Th1 (LT colaboradores 1) al utilizarlo como coadyuvante¹⁰². Por lo mencionado, decidimos evaluar si el tratamiento con IMT504 tiene efecto sobre linfocitos de ratones NOD. Observamos que el porcentaje de esplenocitos activados aumenta luego del tratamiento con IMT504, tanto en animales pre-DT1 como DT1 (**Figura 25**). Puntualmente, pudimos determinar que el porcentaje de esplenocitos CD19⁻CD40⁺ (macrófagos, dendríticas y células epiteliales) aumenta significativamente luego del tratamiento con IMT504 (**Figura 25 A**). En la población CD19⁺CD40⁺ (LB) podemos observar que el tratamiento con IMT504 induce significativamente la activación de las células respecto al PolyC (**Figura 25 B**), aunque el efecto es 3 veces menor que el observado en la población CD19⁻. En términos porcentuales, esta comparación muestra que en la figura 25A la población CD19⁻ CD40⁺, luego del tratamiento con IMT504, es del 7%, mientras que en la figura 25B la población CD19⁺CD40⁺ es del 2,5%. Estos resultados sugieren que el IMT504 tienen un efecto sobre células mieloides, específicamente parte de nuestro grupo se encuentra estudiando los efectos del IMT504 sobre los macrófagos.

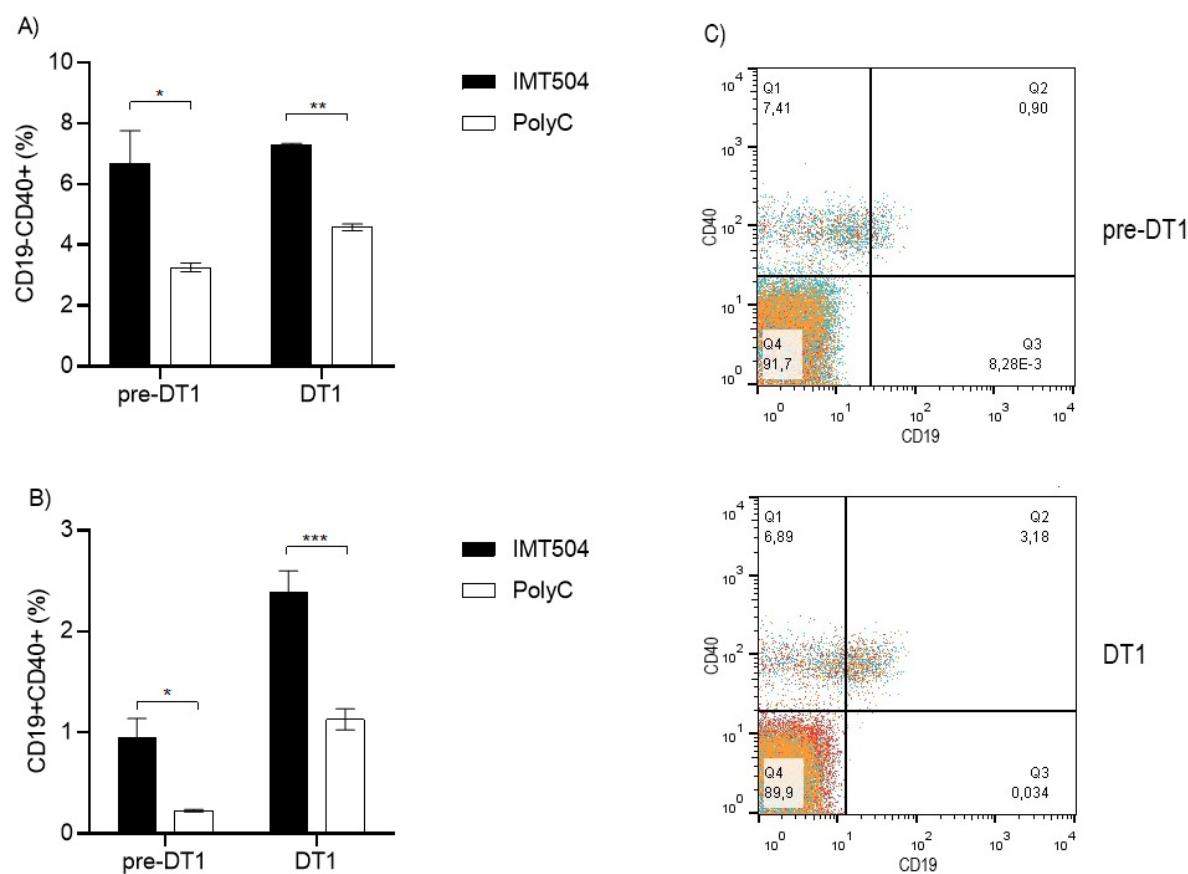


Figura 25: Efecto del IMT054 sobre esplenocitos de ratón NOD. Citometría de flujo para determinar el porcentaje de esplenocitos activados luego de la estimulación con 0,5 µg/ml de IMT054 o 4 µg/ml de PolyC durante 18 hs. Porcentaje de células (**A**) CD19⁻ y (**B**) CD19⁺ activadas (CD40⁺) luego del tratamiento con ODNs. (**C**) Gráficos de puntos representativos del análisis de citometría de esplenocitos pre-DT1 (superior) y DT1 (inferior), tratados con IMT054 . ANOVA de dos vías y prueba de comparaciones múltiples Sidak's: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 IMT054 vs PolyC.

2.4.2 Efecto del IMT504 sobre la inducción de células T reguladoras

Sabiendo que las poblaciones celulares mayoritarias dentro del bazo corresponden a linfocitos B/T y que el ODN IMT504 no activa principalmente la población celular CD19⁺ en los esplenocitos de ratones pre-DT1 y DT1, decidimos estudiar los LT. Dentro de los LT, la subpoblación de mayor interés en las enfermedades autoinmunes es la de linfocitos Treg, células encargadas de suprimir la respuesta inmune y mantener la homeostasis del sistema.

En este contexto, a partir de LT *naïve* aislados de NL de ratones NOD pre-DT1, estudiamos la capacidad del IMT504 en inducir células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺). En condiciones fisiológicas (**Figura 26**), vemos que el IMT504 estimula significativamente la inducción de células T reguladoras en los NL axilares (**Figura 26 A**). Si bien en los NL pancreáticos y mesentéricos (**Figura 26 B y C**), en condición fisiológica, no hay diferencias significativas, se aprecia una tendencia clara del IMT504 en la inducción de células Treg.

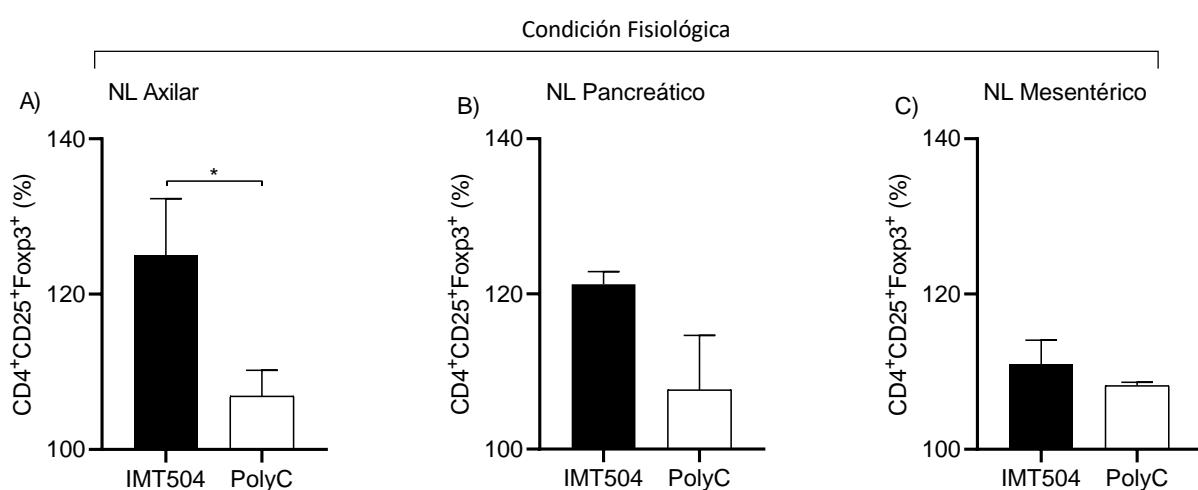


Figura 26: Efecto del IMT504 en la inducción de células T reguladoras. Células T naïve aisladas de nódulos linfáticos (**A**) axilares, (**B**) pancreáticos y (**C**) mesentéricos de ratones NOD pre-DT1 fueron estimuladas con IMT504 o PolyC, en presencia de IL-2. Se determinó el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg) al finalizar la inducción. T-test: *p<0.05.

Con el objetivo de replicar el entorno en el que se encuentran las células de individuos diabéticos, agregamos al medio de cultivo citoquinas proinflamatorias (IL2, IL6, IL1 β e INF- γ). Observamos que, en condiciones proinflamatorias, también hay un incremento significativo en la inducción de linfocitos Treg (**Figura 27**). Además, vemos que el porcentaje de células Treg es mayor en la condición fisiológica que en la proinflamatoria, lo que podría explicarse por la intensidad del estímulo recibido por las células al agregar directamente al cultivo citoquinas proinflamatorias. De todas formas, vemos que el tratamiento con IMT504 induce la población Treg, lo que podría explicar la reducción en el infiltrado inflamatorio y la mejora en la condición diabética luego del tratamiento con el ODN.

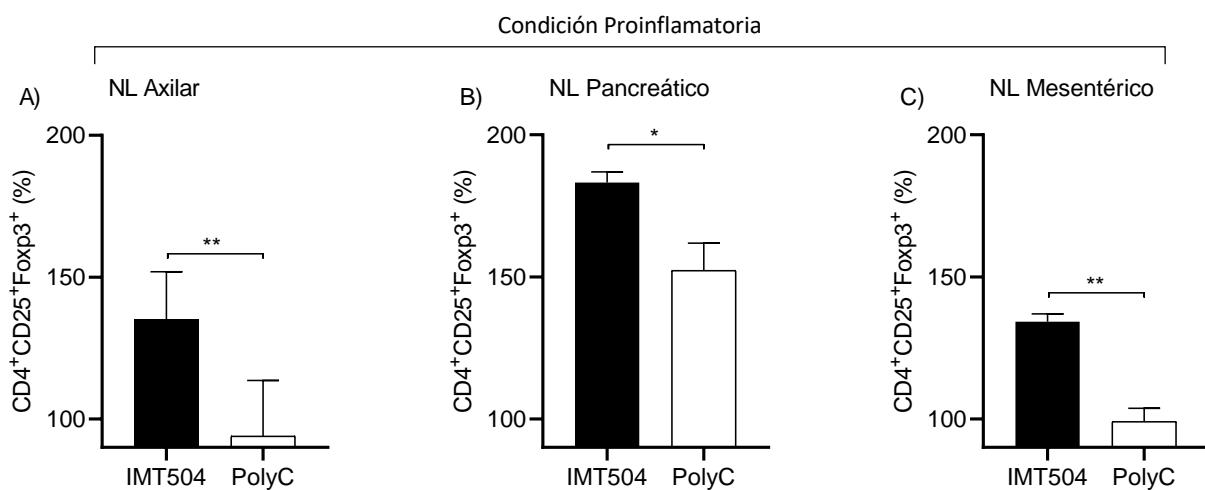


Figura 27: Efecto del IMT504 en la inducción de células T reguladoras. Células T naïve aisladas de nódulos linfáticos (**A**) axilares, (**B**) pancreáticos y (**C**) mesentéricos de ratones NOD pre-DT1 fueron estimuladas con IMT504 o PolyC, en presencia de IL-2, IL-6, IL-1 β e INF- γ . Se determinó el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg) al finalizar la inducción. T-test: *p<0.05 y **p<0.01.

2.4.3 Efecto en la síntesis de citoquinas pro y antiinflamatorias luego del tratamiento de linfocitos T con IMT504

Con el objetivo de estudiar si el IMT504 tiene un efecto en la funcionalidad de las subpoblaciones T, decidimos determinar el porcentaje de células que sintetizan citoquinas pro o antiinflamatorias. Particularmente, estudiamos las poblaciones de LT (**Figura 28A**), T colaboradores (Th) (**Figura 28 B**) y T reguladores (Treg) (**Figura 28 C**). En todos los casos, no se detectaron diferencias en la síntesis de IL-10 e IL-17 luego de la estimulación con IMT504 y, además, los valores porcentuales de dichas proteínas fueron menores al 1%. Estos resultados son interesantes porque se sabe que niveles elevados de estas citoquinas están relacionadas con un desarrollo desfavorable de la diabetes^{178,179}.

Con respecto al IFN- γ , evidencias recientes demuestran que la regeneración del tejido pancreático está asociada con un aumento en TNF- α e INF- γ que, a su vez, están relacionados con niveles bajos de citoquinas como IL-17¹⁸⁰. Nuestros resultados sugieren un aumento significativo ($p=0,0055$) en la producción/síntesis de IFN- γ por parte de linfocitos CD3 $^+$ (**Figura 28 A**), luego del tratamiento con IMT504. En el caso de linfocitos Th y Treg, la tendencia es la misma, aunque no hay significancia (Th $p=0,0569$ y Treg $p=0,0625$). En concordancia con lo propuesto por los autores mencionados, el aumento en IFN- γ está asociado con niveles bajos de IL-17.

TGF- β es una citoquina que contribuye, junto con las células Treg, en la regulación de la respuesta inmune y la autoinmunidad¹⁸¹. En relación con esto, nuestros resultados muestran un aumento significativo en la síntesis TGF- β en células Treg luego del tratamiento con IMT504 (**Figura 28 C**). Este resultado es interesante por las propiedades de TGF- β sobre las MSCs.

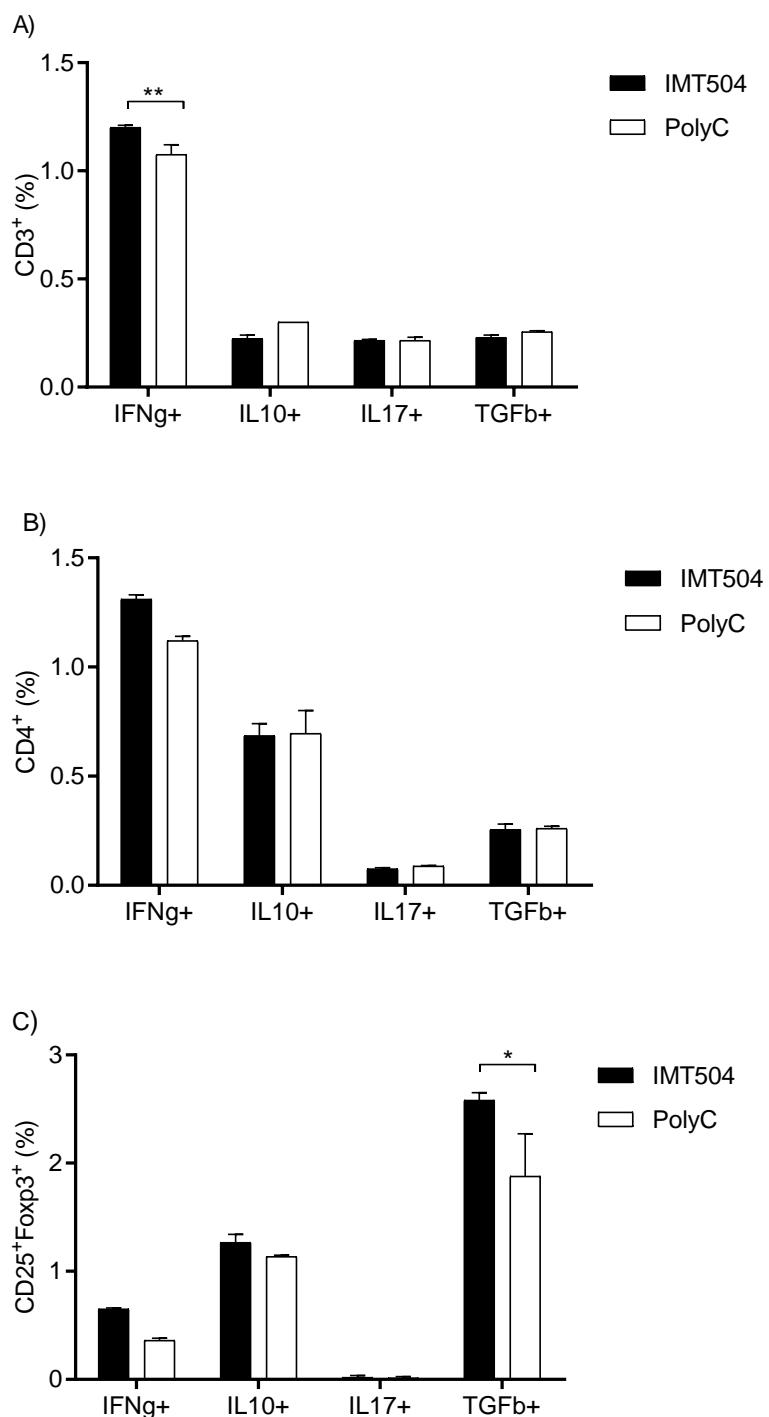


Figura 28: Efecto del IMT504 en la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en células **(A)** CD3⁺ (células T y NK), **(B)** CD4⁺ (LT colaboradores) y **(C)** CD25⁺Foxp3⁺ (T reguladoras), aisladas de nódulos linfáticos de ratones NOD prediabéticos. ANOVA: *p<0.05, **p<0.01.

2.4.4 Vías de señalización reguladas por el tratamiento de linfocitos T con IMT504.

Se estudiaron las vías de señalización involucradas en el desarrollo o establecimiento de la diabetes. En este caso, LT *naïve* aislados de NL de ratones NOD pre-DT1 fueron cultivados durante toda la noche en condiciones fisiológicas o proinflamatorias en presencia de IMT504 o de PolyC (**Figura 29**). Al comparar las condiciones podemos observar que los genes estudiados presentan un perfil de expresión opuesto. En condiciones fisiológicas están incrementados los genes correspondientes a las vías MAP3K7, mTOR y PI3k, cuya activación está involucrada en procesos fisiopatológicos, como puede ser un deterioro en la funcionalidad de las células β , mientras que la expresión de STAT3 y Tbet1 está disminuida. El equilibrio entre estos factores de transcripción está relacionado con la polarización de la respuesta Th1/Th2 (**Figura 29 A**). Contrariamente, al simular un estado diabético con citoquinas proinflamatorias, observamos que los genes correspondientes a MAP3K7, mTOR, PI3k y STAT3 están disminuidos y Tbet1 inducido (**Figura 29 B**). Los cambios en la expresión de estos genes están relacionados con alteraciones en la condición diabética, por lo que las variaciones observadas resultan interesantes.

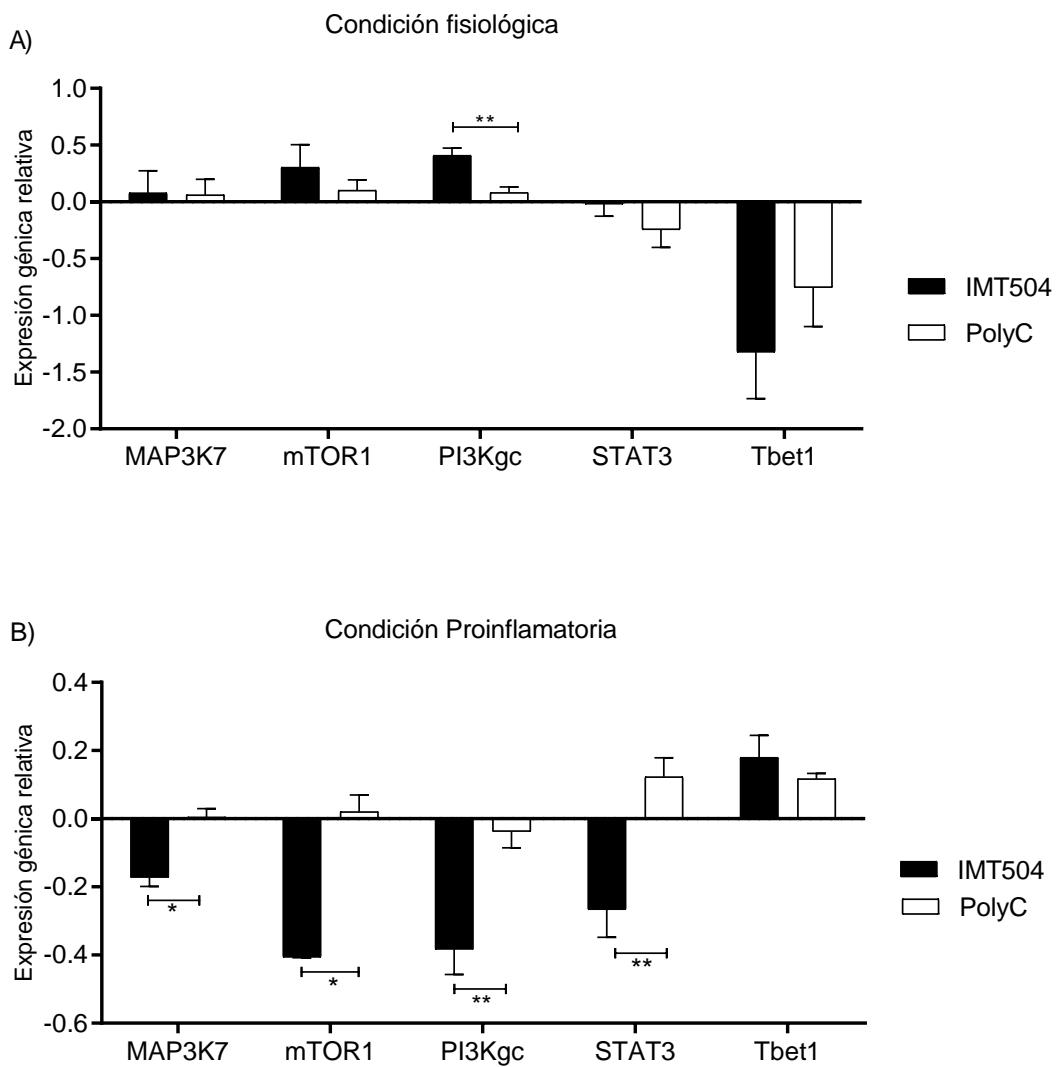


Figura 29: Expresión génica de células T tratadas con IMT504 en presencia de **(A)** IL-2 o **(B)** IL-2, IL-6, IL-1 β e INF- γ (condición proinflamatoria). Linfocitos aislados a partir de nódulos linfáticos de ratones pre-DT1. La expresión génica relativa representa el logaritmo del grado de cambio (del inglés fold change) de cada gen. T-test: *p<0.05, **p<0.01.

2.5 Discusión

Antecedentes del grupo demuestran que el tratamiento *in vivo* con IMT504 (20 mg/kg) en ratones NOD diabéticos mejora la funcionalidad de las células β , incrementa la síntesis y secreción de insulina, mejora la morfología pancreática y aumenta la cantidad de islotes de Langerhans; efectos que disminuyen los valores de hiperglucemia y por ende mejoran el metabolismo. Más aun, el tratamiento con IMT504 muestra una disminución significativa en la insulitis, dato que confirma su efecto inmunomodulador¹⁶¹.

En base a estos antecedentes es que decidimos estudiar el efecto del IMT504 sobre células del sistema inmunológico aisladas de ratones NOD pre-DT1 y DT1. Específicamente, evaluamos qué subpoblación linfoide, B y/o T, se ve alterada como consecuencia del tratamiento. Nuestros resultados reflejan que luego del tratamiento con IMT504 aumenta el porcentaje de células activadas (CD40 $^+$) tanto en animales pre-DT1 como DT1. Además, pudimos ver que el número de células CD19 $^+$ (LB) activadas aumenta a un 3% y, lo más interesante fue que una población CD19 $^-$ (células no B) activa aumentaba a un 7%.

La DT1 es una enfermedad autoinmune donde linfocitos T autorreactivos destruyen las células- β . Las células T reguladoras (CD25 $^+$ Foxp3 $^+$) son las principales mediadoras de la inmuno tolerancia periférica. Es sabido que fallas en su funcionalidad o una reducción en la proporción facilitan el desarrollo y establecimiento de la diabetes¹⁸². En nuestros estudios, determinamos que el tratamiento *in vitro* de LT naïve con 0,5 μ g/ml de IMT504 estimula significativamente la inducción de células T reguladores. Este incremento lo observamos en mayor medida en células inmunes sometidas a una condición proinflamatoria, lo que sugiere que el IMT504 podría estar estimulando la función regulatoria en un contexto autoinmune.

Hasta hoy, los efectos observados por el tratamiento con IMT504 sugieren que su efecto inmunomodulador debe involucrar mecanismos complejos de señalización y, además, debe modular la respuesta vía citoquinas y quimioquinas, proteínas con funciones pleiotrópicas que actúan sobre distintos tipos celulares. Así, el oligonucleótido podría modificar el microambiente en el que actúan las células del SI y, de esta forma, revertir el estado inflamatorio presente en la DT1. En este contexto, evaluamos el efecto directo del IMT504 sobre distintas poblaciones celulares y qué patrón de secreción muestran éstas luego del tratamiento. Puntualmente, decidimos estudiar la proporción de citoquinas sintetizadas por linfocitos CD3⁺, CD4⁺ y CD25⁺Foxp3⁺. En dichas subpoblaciones, observamos que el tratamiento con IMT504 no modifica la síntesis de IL-10 e IL-17. Esta última, no solo no presentó diferencias significativas sino que, además, el porcentaje de células sintetizando IL-17 era menor al 0,5%. Este resultado va de la mano con publicaciones de otros autores que sugieren que en individuos sanos, o en condiciones fisiológicas, el porcentaje de células Th17 es 1.1% como máximo¹⁸³. Además, hay evidencias que sugieren que la inhibición de IL-17 muestra resultados alentadores en modelos animales NOD¹⁸⁴, por lo que la ausencia de cambios en la síntesis de IL-17 luego del tratamiento con IMT504 resultó un dato alentador. Particularmente, el análisis de la subpoblación CD3⁺ (LT y NK) muestra que el tratamiento con IMT504 induce significativamente la síntesis de INF-γ, citoquina producida principalmente por células CD8⁺. Además, en el caso de la subpoblación CD4⁺, no se observa ninguna variación en la síntesis de citoquinas luego del tratamiento con el IMT504. Estos resultados podrían sugerir que el ODN no mejora la condición diabética al actuar sobre células T colaboradoras, sino que la mejoría se podría relacionar con un efecto del IMT504 sobre células CD8⁺. El resto de las citoquinas (IL-10, IL-17, TGF-β) analizadas no mostró variaciones significativas en células CD3⁺ y CD4⁺. Finalmente, al estudiar la

subpoblación CD25⁺Foxp3⁺, células especializadas en suprimir la respuesta inmune, vemos un aumento significativo en la síntesis de TGF-β. Estudios previos reflejan que esta citoquina aumenta el número de células Treg inducibles (iTreg), las cuales a su vez enlentecen el desarrollo de la diabetes tipo 1 y parte de este proceso está relacionado con su capacidad de preservar la función de células β^{181,185}. Este efecto se vio que ocurre por inhibición de células T citotóxicas, lo que permite mejorar el estado diabético. Al mismo tiempo, se ha reportado que TGF-β estimula las propiedades regenerativas, así como la migración de las MSCs. Esto podría ayudar a explicar los resultados observados en el capítulo 1, donde demostramos que IMT504 induce la capacidad migratoria de las MSCs al reducir el porcentaje de herida abierta¹⁵⁸.

En línea con la regulación humoral y celular, estudiamos qué vías moleculares podían estar involucradas en el regulación, control y desarrollo de la diabetes, luego del exponer LT *naïve* al IMT504. Cuando simulamos la condición diabética, al agregar *in vitro* citoquinas proinflamatorias, vimos que el tratamiento con IMT504 modifica significativamente la expresión de genes. En este caso, pudimos observar que hay una disminución en la expresión de genes asociados con vías de señalización que inducen el desarrollo de la diabetes como MAP3K7, mTOR, PI3k y STAT3.

Está descripto que el mecanismo por el cual TGF-β logra inhibir los LT citotóxicos (CD8⁺) es vía inhibición de mTOR. La activación de esta vía es indispensable para mantener la diferenciación y función efectora de estos linfocitos¹⁸⁶. Con respecto a STAT3, se sugiere que niveles elevados en leucocitos están relacionados con el desarrollo de complicaciones diabéticas como retinopatía y cardiopatía¹⁸⁷. Además, se ha demostrado que la expresión de STAT3 está asociada con una respuesta diabetogénica de LT citotóxicos (CD8⁺) que lleva al desarrollo de la diabetes¹⁸⁸. Otros estudios demuestran que bloquear componentes de la vía MAP3K llevan a reducir el infiltrado inflamatorio

pancreático y preservar la función de los islotes, efectos que ayudan a retardar y mejorar el estado diabético¹⁸⁹. Finalmente, se ha determinado que la inhibición de PI3K suprime significativamente la diabetes autoinmune. En el 92% de los ratones NOD, la inhibición de PI3K, evitó el desarrollo de DT1 espontánea. Dicho efecto se explica porque al inhibir PI3K se promueve la proliferación de células Treg y se inhibe un clon específico de células autorreactivas CD4⁺⁶⁰.

Los resultados obtenidos acerca de las vías de señalización son interesantes porque una menor expresión de PI3K, mTOR y STAT3 está relacionada con mayores niveles del transportador de glucosa 1 (Glut1), niveles normales de glucemia y reprogramación celular a células tipo β, respectivamente¹⁹⁰⁻¹⁹². Más aún, MAP3K está relacionada con la destrucción de células β¹⁹³, y también se encuentra disminuida luego del tratamiento con IMT504. Nuestros resultados son consistentes con estos antecedentes, donde vemos que la expresión de los genes mTOR, STAT3, PI3K y MAP3K disminuye significativamente al estimular los linfocitos con IMT504. Todos estos datos en su conjunto ayudan a entender las mejoras observadas en la condición diabética de los animales tratados con IMT504 y cuáles son sus posibles mecanismos de acción.

Capítulo 3

3.1 Efecto del IMT504 en células madre mesenquimales en un modelo hepático

El hígado es la glándula más voluminosa del organismo (corresponde al 2,5% del peso corporal de un adulto) y es de suma importancia por su diversa actividad metabólica. El hígado está dividido en 4 lóbulos que, a su vez, se dividen en lobulillos, las unidades estructurales y funcionales del hígado. Los hepatocitos son las células parenquimáticas del órgano y los encargados de la producción de bilis, la cual es liberada por el colédoco en el duodeno. Las principales funciones de los hepatocitos son el almacenamiento y/o producción de energía para el organismo a través del metabolismo de lípidos, proteínas e hidratos de carbono, y la detoxificación y eliminación de moléculas nocivas¹⁹⁴.

Las enfermedades hepáticas, como la fibrosis, cirrosis o hepatocarcinoma no tienen un tratamiento médico eficaz, y hasta el momento solo funciona el trasplante y es limitado debido al número de donantes. El desafío es el desarrollo de nuevas terapias que permitan evitar el trasplante¹⁹⁵.

La fibrosis surge como consecuencia de repetidas lesiones hepáticas y remodelado tisular, que inducen ciclos de cicatrización. Esto lleva a la acumulación excesiva de matriz extracelular (MEC) con abundantes fibras colágenas. La acumulación de matriz impide el paso de nutrientes desde los sinusoides a los hepatocitos y viceversa, generando una disfunción hepática¹⁹⁶. Si el estímulo de la lesión hepática es eliminado tempranamente se activa un mecanismo de fibrinólisis, que implica un proceso de degradación de esta matriz¹⁹⁷. Ahora, cuando el agente causante de las lesiones persiste, se estimula nuevamente el proceso inflamatorio seguido por un proceso de fibrogénesis¹⁹⁸.

La cresta neural (NC) es una población transitoria de células multipotentes con alta capacidad migratoria que se delaminan del techo del tubo neural durante el desarrollo.

La NC se caracteriza por su notable plasticidad (capacidad para originar células de diversos linajes) y su alta motilidad¹⁹⁹. Las células de la cresta neural (NCCs) originan los siguientes fenotipos celulares en el sistema nervioso periférico: neuronas, células de la glía y, fibroblastos endoneurales (**Figura 30**)²⁰⁰.

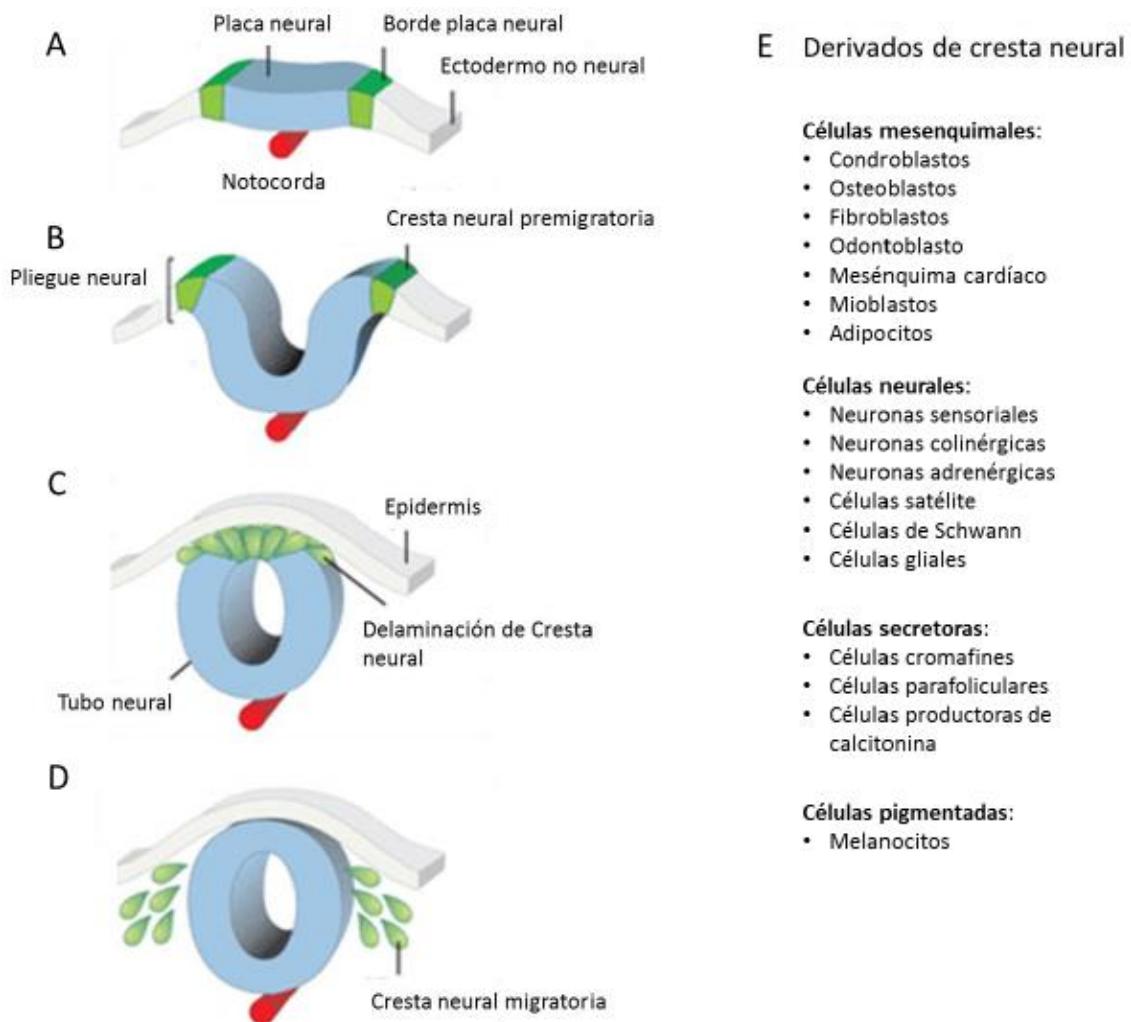


Figura 30: La cresta neural es una población celular multipotente. **(A)** El desarrollo de la cresta neural comienza en la etapa de la gástrula. **(B)** A medida que la placa neural se cierra para formar el tubo neural, los progenitores de la cresta neural se especifican en la parte dorsal de los pliegues neurales. **(C)** Despues de la especificación, las células de la cresta neural sufren la transición epitelio mesénquima y se delaminan del tubo neural. **(D)** Las células migratorias de la cresta neural siguen rutas estereotipadas alcanzando diversos destinos. **(E)** Derivados de cresta neura. Figura adaptada de Simoes-Costa & Bronner, (2015).

Existen reportes que sugieren que células derivadas de la cresta neural (NCDCs) obtenidas de la médula ósea de ratones transgénicos pueden comportarse como células madre neurales²⁰¹. También se ha demostrado que las NCDCs originan una subpoblación de células Nestina⁺ en la médula ósea, que estarían presentes y contribuirían al desarrollo de cultivos de MSCs. Además, se ha reportado que las MSCs pueden originar hepatocitos *in vitro*^{202,203}.

Los modelos animales de fibrosis permiten entender la fisiopatología de la fibrogénesis hepática y son herramientas útiles para determinar la efectividad de nuevos tratamientos. Uno de los modelos murinos utilizados es el de toxicidad crónica inducida por tioacetamida (TAA). La TAA es un potente agente hepatotóxico, una vez administrada se convierte en TAA-S-óxido, que genera necrosis hepatocitaria. La aplicación crónica de TAA induce una fibrosis pericentral. Con el modelo experimental de hepatectomía parcial podemos entender las capacidades regenerativas del hígado²⁰⁴. En dicho modelo, se extirpa el 70% del hígado y los lóbulos residuales restauran la masa hepática original una semana después de la cirugía²⁰⁵.

Un método empleado para analizar el rol de ciertos tipos celulares en distintos procesos fisiológicos y patológicos, como puede ser la regeneración hepática, se conoce como sistema Cre-LoxP, y se basa en la utilización de ratones doble transgénico que permiten el trazado de linajes celulares *in vivo*. En estos animales se busca expresar un gen reportero únicamente cuando se activa un gen específico durante el desarrollo.

Entonces, el trazado de linaje permite identificar el fenotipo y propiedades de toda la progenie de un tipo celular específico. Este modelo genético se basa en la actividad de la enzima recombinasa, cuya síntesis puede ser condicional (específica de un tipo celular) o inducible (presentan constructos que permiten la transcripción en presencia de ciertos factores, como tamoxifeno). Para aplicar esta estrategia se cruzan dos cepas de ratón, una

otorga la especificidad (permite la expresión de la enzima recombinasa bajo un promotor correspondiente a un gen activo en el tipo celular de interés) y, la otra, presenta el gen reportero que permite su detección (expresa proteínas fluorescentes o una proteína que puede ser revelada con una reacción química). En esta última cepa, el gen reportero se encuentra precedido por el promotor de un gen con expresión ubicua seguido por una construcción loxP-STOP-loxP. El gen reportero se expresa solo si hubo recombinación de estos transgenes, lo que permite identificar el linaje celular en toda la progenie, su localización, estadio de diferenciación y su aislamiento, entre otros usos.

La recombinación genética se ha utilizado para el trazado de linaje desde 1990. Esta técnica consiste en la incorporación del gen de la enzima Cre recombinasa (Cre) bajo la regulación de un promotor que se activa de forma específica. En animales en los que ambas construcciones transgénicas están presentes, Cre corta la molécula de ADN y la recomienda a nivel de los sitios loxP, liberando el codón STOP, lo que resulta en la activación específica del gen reportero en todas las células en las que Cre está expresada.

Así, las células de la progenie que hayan expresado en algún momento del desarrollo la enzima Cre estarán marcadas genéticamente. Este sistema de recombinación sitio-específica Cre-LoxP, derivado del bacteriófago P1, es empleado en combinación con diferentes genes reporteros²⁰⁶. Usualmente, los genes reporteros se expresan bajo el locus *Rosa26*. Uno de los genes reporteros utilizados es *td-Tomato* (Tom) por la intensidad de su marca fluorescente roja²⁰⁷.

En ratones con construcciones reporteras *Rosa26CAG^{tdTomato}* (***Rosa26^{Tom}***), la expresión de la proteína Tom es dirigida por el locus *Rosa26*, que permite la inserción de un promotor exógeno fuerte (CAG), lo que termina con un aumento en la expresión del gen reportero²⁰⁸. Las cepas reporteras frecuentemente utilizadas contienen un transgén que incluye el promotor de *Rosa26*, con expresión en todas las células del ratón, seguido

río abajo por una señal de STOP flanqueada por sitios LoxP, y luego por la secuencia que codifica para la expresión de *Tom* (proteína roja fluorescente) o *GFP* (proteína verde fluorescente). Por lo tanto, en ausencia de Cre el codón STOP previene la expresión del gen reportero. Al cruzarse esta cepa con ratones que expresan Cre bajo un promotor específico se produce la recombinación en la cría y se remueve ese codón STOP en las células donde ese promotor específico está activo (**Figura 31**). De esta manera, todas las células derivadas de estas células expresarán la proteína fluorescente²⁰⁸. Es decir, en todas las células en las que Cre está expresada, se activa el gen reportero específico, lo que permite generar modelos animales para el trazado de linajes.

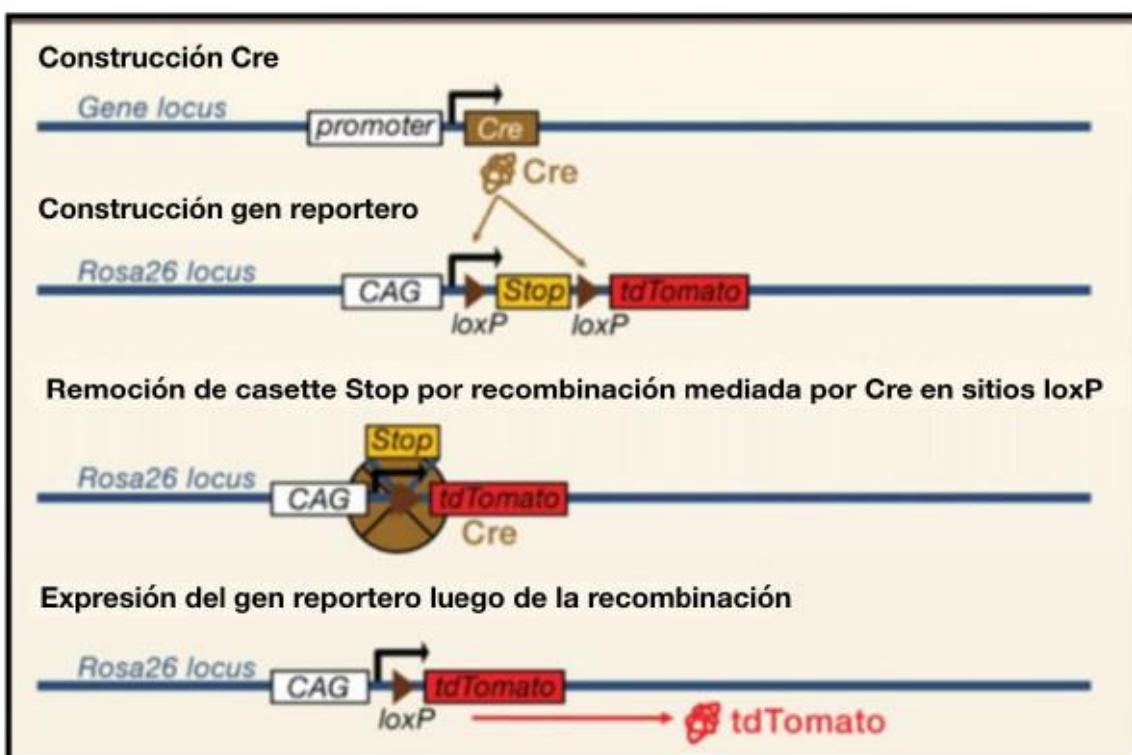


Figura 31: Recombinación sitio-específica mediante el sistema Cre-loxP. La enzima CRE recombinasa se expresa constitutivamente bajo el control de un promotor específico, de un tipo celular de interés. En esas células, Cre puede recombinar sitios loxP que flanquean a un sitio de STOP de la transcripción génica, aguas arriba de un gen reportero. Al recombinarse, el sitio STOP es removido y el promotor específico facilita la expresión del gen reportero. Imagen adaptada y traducida de Kretzschmar y Watt (2012).

La actividad de Cre puede ser controlada por recombinación inducible por ligandos como tamoxifeno o su metabolito activo 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT). De esta forma, se puede activar Cre en ratones adultos de forma selectiva por medio de un promotor que se expresa durante el desarrollo embrionario. Brevemente, Cre se fusiona al receptor estrogénico humano (ER) formando la proteína de fusión CreER. En ausencia de ligando (tamoxifeno o 4-OHT), CreER permanece asociada con proteínas de shock térmico (HSP) en el citoplasma. Ahora bien, la aplicación de tamoxifeno o 4-OHT induce un cambio conformacional en el receptor de estrógeno ER y así libera la proteína CreER de la chaperona HSP. De esta forma, CreER activado se transloca al núcleo, donde puede recombinar los sitios loxP.

A continuación, se describen las características de las cepas utilizadas durante este capítulo:

Wnt^{Cre}

Estas cepas expresan Cre bajo el promotor Wnt1, específico de células de la cresta neural²⁰⁹. El gen Wnt1 tiene también otras importantes funciones durante el desarrollo de un organismo; por ejemplo, en la formación del límite cerebro medio-cerebro posterior, en la regulación del tamaño del cerebro medio y en la generación de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio ventral.

Cepas reporteras

Las cepas reporteras frecuentemente utilizadas contienen un transgén que incluye el promotor de Rosa26, con expresión en todas las células del ratón, seguido río abajo por una señal de STOP flanqueada por sitios LoxP, y luego por la secuencia que codifica para la expresión de Tom (proteína roja fluorescente) o YFP (una variante de la proteína verde fluorescente). Por lo tanto, en ausencia de Cre el codón de STOP previene la expresión

del gen reportero. Al cruzarse esta cepa con ratones que expresan Cre bajo un promotor específico y producirse la recombinación en la cría, se remueve ese codón en las células en que ese promotor específico está activo: de esta manera, todas las células que de ellas deriven expresarán la proteína fluorescente²⁰⁹.

Los datos publicados sugieren que las células progenitoras estromales GLAST⁺ de médula ósea trazados con Wnt1 son movilizados por sangre periférica después de una lesión hepática y son reclutados en el hígado, donde se diferencian en células endoteliales o células tipo hepatocitos (HLCs, del inglés hepatocytes like cells). Asimismo, el daño hepático prolongado y repetitivo genera un fenotipo hipomórfico en los pericitos GLAST⁺ trazados con Wnt1 que persisten en la médula ósea. Estos crecen formando colonias con una densidad celular menor a la normal, probablemente a causa de una menor capacidad de proliferación²¹⁰.

En la búsqueda de nuevos tratamientos, ha cobrado interés el estudio del ODN IMT504, un compuesto que ha demostrado ser capaz de movilizar las MSCs de médula ósea hacia células derivadas de la cresta neural, en modelos de patologías hepáticas. Particularmente, evaluamos dicho efecto en animales Wnt1Cre;Rosa26Tom tratados con TAA durante dos semanas. Nos preguntamos si esta molécula podría inducir la proliferación y movilización de pericitos en el contexto de lesión hepática. En ese caso, sería posible repoblar la médula ósea con pericitos pro-regenerativas que facilitarían el proceso de regeneración tisular.

3.2 Objetivos particulares

El objetivo general de este capítulo es evaluar si el ODN IMT504 modifica ciertas propiedades, como la proliferación, migración y reclutamiento de pericitos GLAST⁺ en un modelo de daño hepático. Para determinar esto propusimos los siguientes objetivos particulares:

Estudiar si luego de una lesión hepática y/o de la aplicación del ODN IMT504 se estimula la proliferación de células derivadas de la cresta neural y/o derivadas de pericitos GLAST⁺ presentes en la médula ósea.

Evaluar si el tratamiento con IMT504 induce la movilización de células derivadas de cresta neural hacia el sitio de daño hepático y, además determinar si influye en el potencial de diferenciación de estas células.

Caracterizar el fenotipo y origen de una subpoblación de células estromales progenitoras de médula ósea y evaluar su capacidad de movilizarse y diferenciarse a células tipo hepatocitos (HLCs) y/o las células endoteliales. En particular, buscamos analizar el efecto del IMT504 sobre pericitos GLAST⁺ trazados con Wnt1 en médula ósea, su reclutamiento hacia el hígado fibrótico y su potencial de diferenciación.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Cepas de ratón y cruzas realizadas para trazado de linaje

Se utilizaron ratones $Wnt1^{Cre}$ y $GLASTCre^{ERT2}$ (cepa de The Jackson Laboratory) y $Rosa26^{Tom}$ (background C57, enviado por el Prof. Patrik Ernfors). En F0 se cruzan ratones Cre (del inglés circularization and recombination) con ratones LoxP (del inglés location of crossing over (x) in P1). Las cepas Cre solo se expresan en células/tejidos donde se expresa el promotor específico que activa la expresión del gen (Cre recombinasa). Las cepas LoxP utilizadas tiene secuencias específicas flanqueadas por secuencias LoxP, en este caso cuando se activa el promotor genérico se activa la expresión de secuencias STOP y por ende en F0 no se expresa el gen reportero. La generación F1, por el contrario, va a expresar el gen reportero (rojo) en las células derivadas de la cresta neural ($Wnt1^+$) y en pericitos ($Glast^+$).

El sistema de recombinación CreLoxP utilizado para lograr la expresión génica específica y poder trazar el linaje se logró en el laboratorio con los siguientes apareos (**Figura 32**):

- 1) $Wnt1^{Cre} \times Rosa26^{Tom}$ (celulas derivadas de la cresta neural), generación F0 del primer apareo realizado.
- 2) $GLASTCre^{ERT2} \times Rosa26^{Tom}$ (población de precitos), generación F0 del segundo apareo realizado.

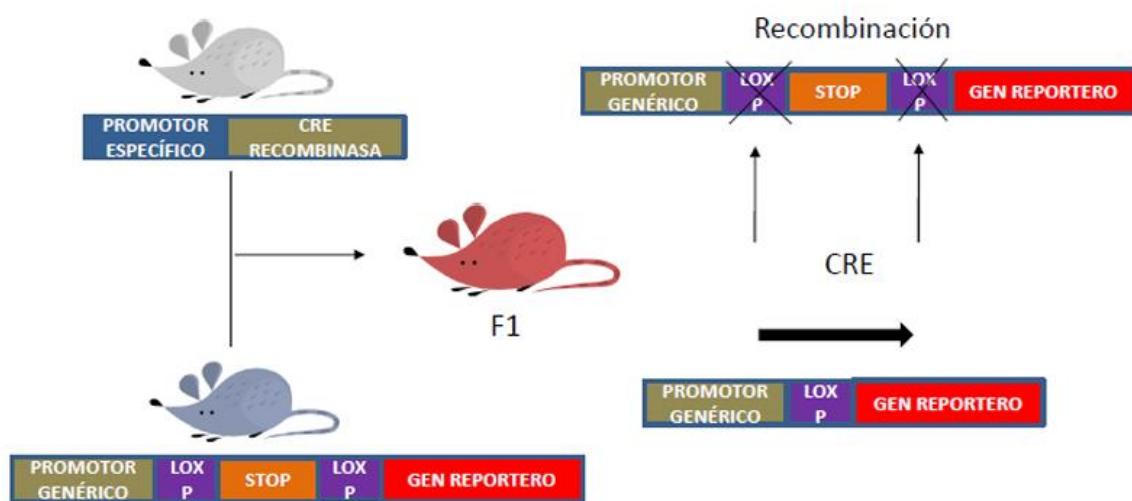


Figura 32: Esquema de apareo utilizado para el trazado de linaje. Se determinó por genotipificación la presencia o ausencia del transgén en la F1.

Se establecieron colonias en el bioterio del IIMT CONICET- Universidad Austral. El trabajo con animales siguió las normas establecidas por el NIH (EE. UU) y los protocolos fueron aprobados por el CICUAL de la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral (CICUAL 17/06 y 19/03).

3.3.2 Tratamiento con IMT504 en animales con fibrosis

La tioacetamida (TAA) se aplica como modelo químico de inducción de fibrosis hepática. El proceso implica daño oxidativo severo asociado con muerte de hepatocitos, inflamación y activación de células estrelladas hepáticas. El protocolo para la inducción de fibrosis fue: inyecciones intraperitoneales (ip) de 200 mg/kg de TAA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tres veces por semana, durante 1 (1W), 2 (2W), 4 (4W) u 8 (8W) semanas.

Con el fin de analizar el efecto de IMT504 sobre la proliferación y movilización de pericitos trazados con Wnt1, los animales recibieron una dosis subcutánea del ODN (30 μ l/g) luego de 2 hs de la última dosis de TAA. Luego de 18 horas, para los análisis de citometría de flujo y/o ensayos CFU-F, se obtuvieron muestras de sangre y médula ósea.

3.3.3 Citometría de flujo

Para estos estudios se utilizaron ratones adultos $\text{Wnt1}^{\text{Cre}};\text{Rosa26}^{\text{Tom}}$ con fibrosis establecida con TAA o con hepatectomías o controles sin patología. Algunos animales recibieron el tratamiento con IMT504 (una dosis subcutánea de 30 $\mu\text{l}/\text{g}$ luego de 2hs de la última dosis de TAA). Se extrajeron muestras de médula ósea, como se describe en el protocolo del capítulo 1, y de sangre periférica. Brevemente, se extrajeron los globos oculares para obtener sangre periférica, se colocó en un tubo Eppendorf 1.5 ml con heparina y la muestra obtenida fue diluida 1:2 en solución fisiológica. De ambas muestras/tejidos se aisló la fracción mononuclear mediante un gradiente de Ficoll (Ficoll-Paque PlusTM, 1.077 g/ml, GE Healthcare- Amersham Biosciences). Se contabilizaron las células viables por cámara de Neubauer, obteniéndose 1×10^6 células por muestra. Para la inmunomarcación, se fijaron las células en PFA 4% durante 20 minutos a 4°C. Luego, se realizaron lavados con 1 ml de buffer FACS (BSA 1% en PBS). Posteriormente, las células fueron incubadas en 100 μl del anticuerpo primario monoclonal de rata anti-CD44 acoplado al fluoróforo APC (BD Pharmingen; 1/100 en buffer FACS; que marca células estromales) por 45 minutos, seguida por una nueva fijación con PFA 4%, lavados y una segunda incubación utilizando un anticuerpo policlonal conejo anti-GLAST (abcam; 1/100) en buffer FACS y 0.1% saponina, durante 45 minutos en oscuridad. Se repitieron los lavados con buffer FACS. Se descartó el sobrenadante, y se incubó con 100 μl del anticuerpo secundario AlexaFluor 488® burro anti-conejo (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 1/100) 1/100 en buffer FACS y 0.1% saponina, durante 45 minutos en oscuridad. Finalmente, se repitieron los lavados, se fijaron las células con PFA 4%, se retiró la solución fijadora y se guardaron en 100 μl de PBS hasta su análisis.

Mediante citometría de flujo se cuantificó, por ejemplo, la fracción de células GLAST⁺ CD44⁺ Tom⁺.

3.3.4 Ensayo de unidades formadores de colonias a partir de células de médula ósea

A partir de animales adultos $Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}$ se extrajeron células mononucleares de médula ósea (protocolo detallado en materiales y métodos del capítulo dos). Las células fueron sembradas ($2-2,5 \times 10^6$) en botellas T25 (Nunc, Rochester, NY), utilizando medio D-MEM baja glucosa. Luego de 7 días de cultivo, se cambió el medio por uno fresco. Al día 14, las células fueron lavadas dos veces con PBS y luego se fijaron con metanol 100% durante 15 minutos y se tiñeron con una solución de Azur Eosin Methylene Blue (Giemsa; Merck & Co., White-house Station, NY). Las colonias fueron cuantificadas utilizando un microscopio invertido óptico (Nikon Eclypse NiE, Melville, NY, USA) Se definió una colonia como un grupo de mínimo 50 células con una disposición circular. Los resultados se representan como número total de CFU-F por 2×10^6 células mononucleares de médula ósea (BMMCs) sembradas.

Para separar y generar cultivos Tom^+ y Tom^- , se sembraron BMMCs de animales $Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}$ en botellas T25 (Nunc, Rochester, NY), a una densidad de 5×10^5 células/cm² en medio suplementado. Se realizaron cambios de medio cada 72 h hasta obtener colonias confluentes. Se realizó el pasaje celular por tripsinización (tripsina 0,25% + EDTA 1mM) y las células fueron resembradas a una densidad de 5×10^3 células/cm² en el mismo medio de cultivo. Este procedimiento se repitió hasta el pasaje celular 4. Antes del primer pasaje, se seleccionaron por microscopía las colonias cuyas células expresaban el gen reportero (Tom) y se sembraron en placas separadas para purificar las células Tom^+ .

3.3.5 Diferenciación *in vivo* de células Wnt⁺ de la médula ósea en células tipo hepatocitos y células endoteliales

Para analizar la capacidad de diferenciación de células de médula ósea Wnt1⁺, se obtuvieron células mononucleares de médula ósea de animales adultos *Wnt1*^{Cre}; *Rosa26*^{Tom} tratados o no previamente durante 4 hs con IMT504. Estas células fueron inyectadas por vía sistémica (vena de la cola; 5x10⁵ células/animal) en animales nude sin timo (LAEN:NIH(S)-FOXN1). 6 días antes de la hepatectomía. Así, los grupos experimentales fueron: CONTROL (inoculación de células mononucleares sin tratar en animales sin hepatectomía), IMT504 (inoculación de células mononucleares tratados en animales sin hepatectomía), HEP-CONTROL (inoculación de células mononucleares sin tratar en animales hepatectomizados) y HEP-IMT504 (inoculación de células mononucleares tratados con IMT504 en animales hepatectomizados).

A los días 1 o 5 postransplante celular se obtuvieron las fracciones de células parenquimatosas y no parenquimatosas a partir de los hígados de los animales hepatectomizados o control (*naïve/fisiológicos/sin hepatectomía*).

Se analizó, por citometría de flujo, la contribución de células trazadas con HLCs, células endoteliales y gliales. Las muestras correspondientes a la fracción parenquimatosas fueron inmunomarcadas para analizar la co-expresión Tom con CD44/Vimentina, CD44/Albúmina, y CD44 /fibronectina. La fracción no parenquimatosas fue inmunomarcada para CD44/CD31 y, CD44/S100.

3.3.6 Proliferación de células de médula ósea Wnt⁺ tratadas con IMT504

Para analizar un posible efecto del IMT504 sobre la proliferación de células de médula ósea trazadas con Wnt1, se utilizaron MSCs obtenidas a partir de pericitos Tom⁺ de ratones Wnt1. Estas células fueron sembradas en placas de 24 pocillos. Se incubaron con IMT504 (0.5μg/ml) durante dos horas. Luego, se levantaron las células de diversos pocillos (uno por día, durante 5 días) para el recuento de células viables y se calculó el tiempo de duplicación *in vitro* (doubling-time assay), es decir, se determinó el tiempo que necesita una población celular para duplicar su tamaño.

Cálculo del tiempo de duplicación:

$$PDT = \frac{(T2 - T1)}{3.32 \times (\log N2 - \log N1)}$$

T: tiempo (1: inicial; 2: final)

N: número de células (1: inicial; 2: final)

Otras muestras fueron fijadas con PFA 4% para citometría de flujo utilizando el marcador de proliferación Ki67.

3.3.7 Ensayo de herida de células de médula ósea Wnt⁺ inducidas con IMT054

Para determinar el efecto del IMT504 sobre la capacidad de migración de las MSCs trazadas con Wnt1, se realizó un ensayo de herida. El protocolo utilizado fue descripto en el capítulo 1 de esta tesis doctoral. Brevemente, se sembraron MSCs en placas de 6 pocillos y se cultivaron hasta obtener una confluencia del 80%. Se incubaron con IMT504 (0.5 μ g/ml) durante 2 hs y luego se realizó una raspadura sobre la monocapa celular. Se tomaron fotografías de los pocillos a las 0, 8, 12 y 16 horas post herida. Se cuantificó el porcentaje de la herida abierta para cada tiempo y cada condición.

3.3.8 Ensayo de inducción de Wnt1 en cultivos primarios de pericitos trazados de ratones $Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}$ mediante empleo de IMT504

Para determinar si el IMT504 induce la activación *de novo* de Wnt1 en MSCs derivadas de pericitos trazadas con Wnt1 de médula ósea, se utilizaron células mononucleares de médula ósea obtenidas de animales $Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}$. Para esto, se plaquearon células en placas de 6 pocillos hasta la formación de colonias. Se tomaron fotografías de las colonias recién formadas (día 0). Se realizó el recuento sobre la totalidad de las colonias y se diferenciaron las colonias Tom positivas y negativas. Se agregó IMT504 (0.5 μ g/ml) al medio de cultivo durante dos horas. En los siguientes dos días, una vez por día, se cuantificaron las colonias totales, las Tom^+ y las Tom^- . Se calcularon los porcentajes de colonias que contenían algunas células Tom^+ luego de la inducción con IMT504.

3.4 Resultados

3.4.1 Efecto del IMT504 sobre los pericitos GLAST⁺ de médula ósea trazados con Wnt1

El laboratorio de Biología del Desarrollo y Medicina Regenerativa de la Universidad Austral, dirigido por el doctor Jorge Aquino, demostró que, luego de una lesión hepática, las células progenitoras estromales GLAST⁺ (pericitos) de médula ósea trazadas con Wnt1 son reclutadas al hígado. Posteriormente, se diferencian en células endoteliales o en células tipo hepatocitos (HLCs). Además, observaron que el daño hepático crónico induce un fenotipo hipomórfico (menos proliferación) en pericitos GLAST⁺ trazados con Wnt1 residentes de médula ósea. En este contexto, surgió la posibilidad de colaborar con el grupo del Dr. Aquino para evaluar las capacidades del IMT504 de inducir la proliferación y movilización de pericitos en el contexto de lesión hepática.

Estudiamos el efecto del IMT504 en la migración de MSCs de médula ósea en animales *Wnt1*^{Cre}; *Rosa26*^{Tom} con daño hepático, inducido por el tratamiento con TAA (tioacetamida) durante dos semanas (2w, del inglés: two weeks). Luego de 18hs del tratamiento con IMT504, se obtuvieron células mononucleares de médula ósea y sangre periférica (BMMCs y PBMCs respectivamente) y se cuantificó la incidencia de células trazadas Wnt1. La proporción de pericitos GLAST⁺ trazados con Wnt1 en animales con o sin daño hepático tratados con IMT054 resulta 20 veces mayor que en los animales sin recibir el tratamiento con ODN (**Figura 33 A**). Estos resultados sugieren la activación *de novo* del promotor de Wnt1 en células sin trazar previamente, porque no es posible completar 10/20 ciclos de división en 18hs. Más aún, la vía de señalización Wnt1 se asocia con proliferación y movilización de células progenitoras, por lo que decidimos

evaluar el efecto del IMT504 sobre BMMCs de ratones $Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}$. En este ensayo vimos que el IMT504 aumenta significativamente el número de CFU-F Tom^+ y Tom^- (**Figura 33 B y C**). Esto sugiere un efecto inductor específico del IMT504 sobre la proliferación de progenitores trazados con $Wnt1$ y/o una activación *de novo* del promotor de $Wnt1$ en células progenitoras.

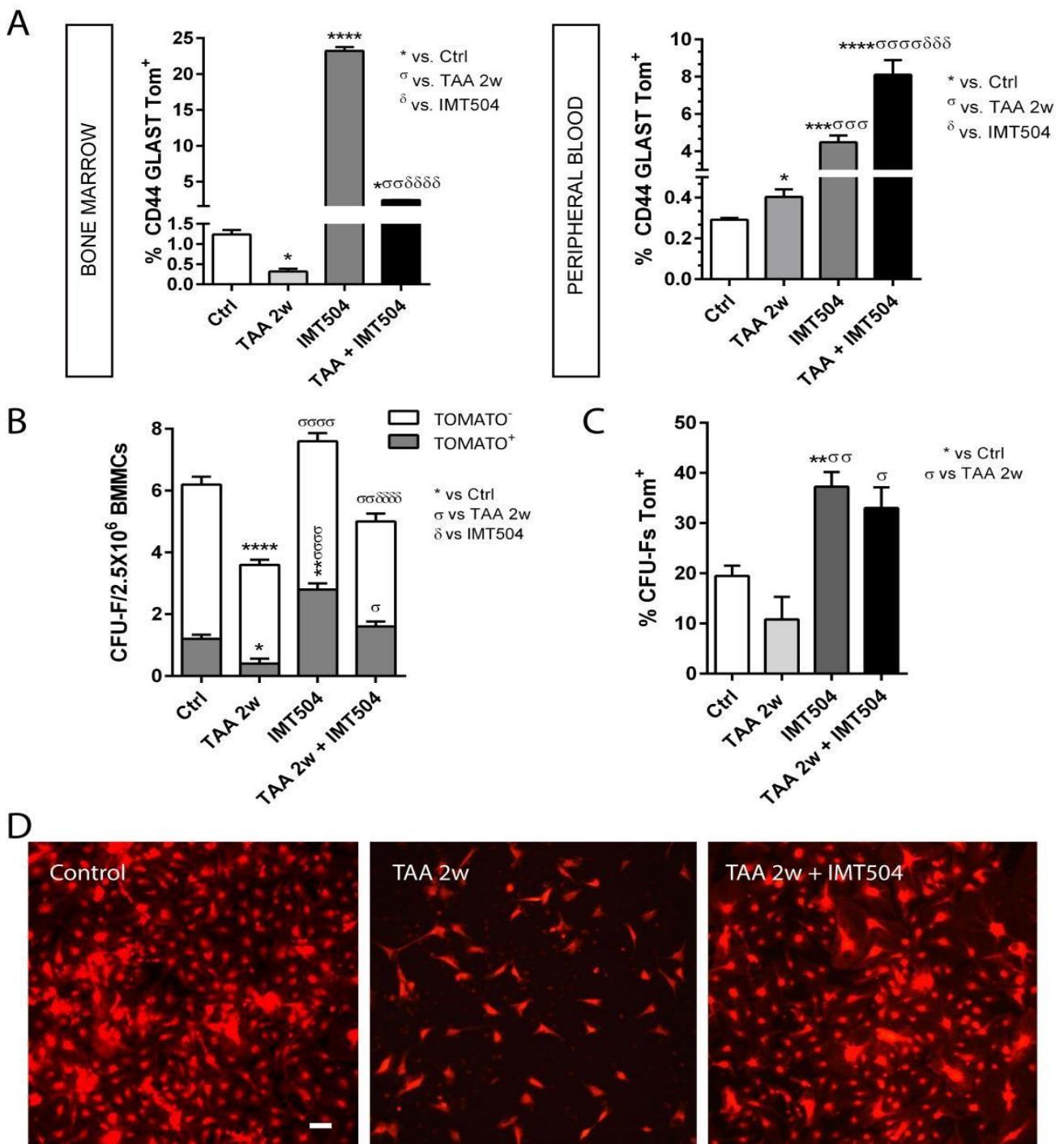


Figura 33: Efecto de IMT504 sobre pericitos trazados con Wnt1 en la médula ósea (BMMCs) y en sangre periférica (PBMCs). **(A)** Porcentaje de pericitos Tom⁺ en ratones $Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}$ en animales control naïve, TAA 2 semanas, naïve inyectados con IMT504 y TAA 2 semanas e inyectados con IMT504. **(B)** Número de CFU-Fs en los mismos grupos experimentales de A, las comparaciones estadísticas fueron hechas en colonias Tom⁺ y Tom⁻. **(C)** Fracción de las CFU-F Tom⁺. **(D)** Microfotografías de colonias representativas de colonias Control, TAA 2w y TAA 2w + IMT504. Barra de escala: 50 μ m. *,σ p<0.05; **,σσ p<0.01; ***,σσσ,δδδδ p<0.001; ****,σσσσ,δδδδδ p<0.0001; ANOVA de dos vías y prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

3.4.2 Efecto de IMT504 sobre la proliferación de células madre mesenquimales obtenidas a partir de pericitos trazados con Wnt1

Con el objetivo de corroborar que el IMT504 permite recuperar la capacidad de formar colonias de los pericitos trazados con Wnt1, realizamos ensayos específicos de proliferación celular. Para eso, MSCs generadas a partir de colonias de pericitos *Tom⁺* fueron incubadas o no con IMT504 durante 2hs. Luego, se determinó el tiempo de duplicación celular. Se observó que el tratamiento con IMT504 redujo significativamente dicha cuantificación (**Figura 34**). Estos resultados se corroboraron por citometría de flujo, donde se vio un aumento en MSCs positivas para Ki67, proteína utilizada como marcador de proliferación celular (**Figura 35**).

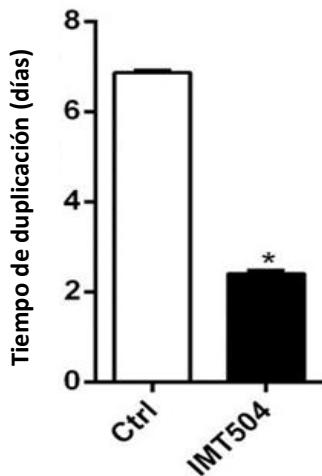


Figura 34: Efecto de IMT504 sobre el tiempo de duplicación de MSCs Tom+. MSCs fueron derivadas a partir de colonias Tom⁺ obtenidas a partir de muestras de BMMCs de ratones Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}. *p<0.05; *vs. Ctrl; t- student.

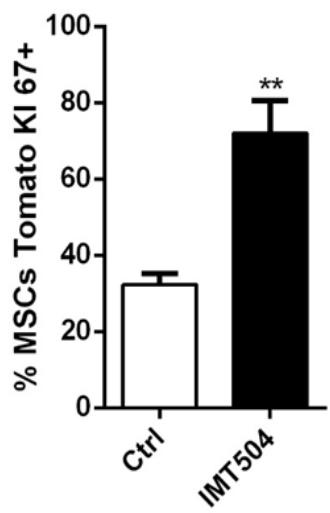


Figura 35: Efecto de IMT504 sobre la expresión de Ki67 en MSCs de la médula ósea trazadas con Wnt1. **p<0.01 vs control, t-student.

3.4.3 Efecto de IMT504 sobre la movilización de MSCs obtenidas a partir de pericitos trazados con Wnt1

Se determinó el efecto del IMT504 en la movilización de MSCs derivadas de pericitos de médula ósea trazados con Wnt1 con ensayos de herida (células MSCs rojas).

Se observó que las MSCs Tom⁺ tratadas con IMT504 lograron reducir en mayor medida el porcentaje de herida abierta respecto al grupo control (**Figura 36 A y B**). Es más, el efecto del IMT504 sobre la migración resultó significativo luego de 8 horas de generada la lesión.

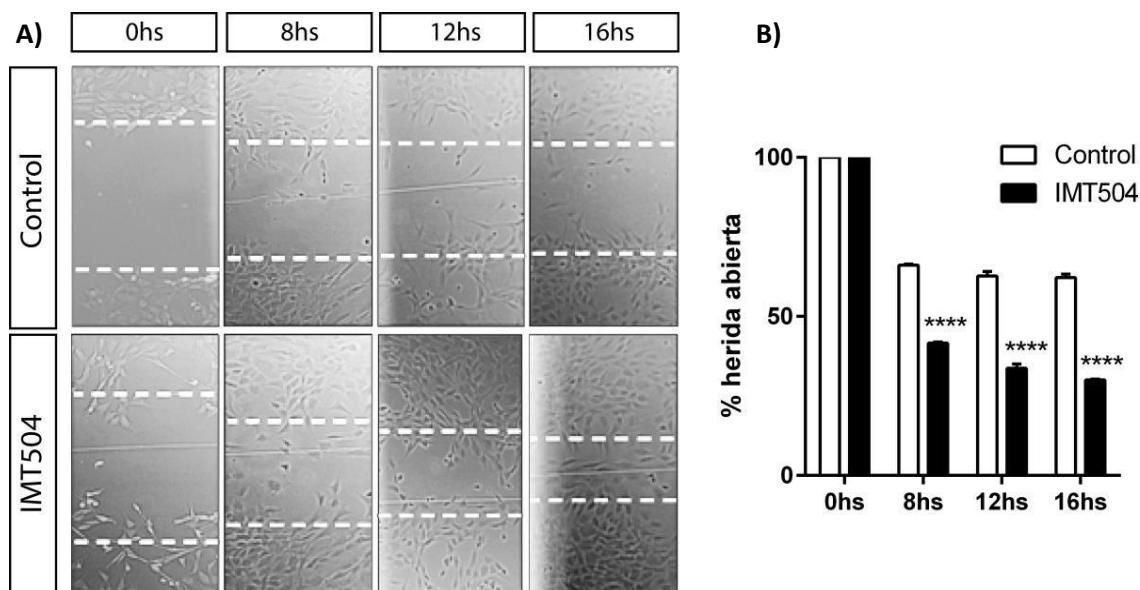


Figura 36: Efecto de IMT504 sobre la movilización de MSCs de la médula ósea trazadas con Wnt1. **(A)** Microfotografías representativas de MSCs trazadas con Wnt a las 0, 8, 12 y 16 horas luego del daño. **(B)** Gráfico de barras mostrando comparaciones estadísticas del porcentaje de herida abierta entre los grupos experimentales. ****p<0.0001 vs control; prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

3.4.4 Efecto del IMT504 sobre la activación del promotor de Wnt1 en pericitos de la médula ósea no trazados previamente

Se mencionó anteriormente que el IMT504 induce la activación de la vía Wnt1 sobre BMMCs, por lo que evaluamos si el ODN estimula la actividad del promotor de Wnt1 en pericitos *Tom⁺* presentes en las colonias de cultivo primario de BMMCs. Con ese fin, BMMCs de ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* fueron sembradas en placas de 6 pocillos y, luego de formarse las colonias, se cuantificó el número total de las mismas, distinguiendo aquellas que contenían o no células Tom⁺. Posteriormente, se incubaron los cultivos durante dos horas con IMT504. Durante los siguientes dos días, se cuantificaron a diario las colonias utilizando el mismo criterio. En esas condiciones, no se observó un cambio significativo en el porcentaje de colonias Tom⁺ (**Figura 37**).

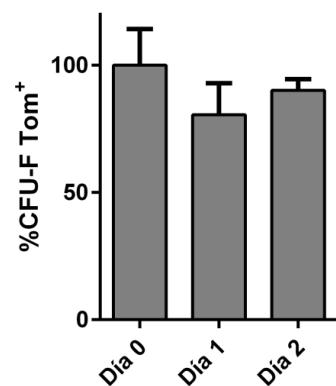


Figura 37 : Efecto de IMT504 sobre la fracción de colonias con células que expresan Tom. Porcentaje de colonias Tom⁺ en cultivos de BMMCs obtenidas de ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* previo a la inducción con IMT504 (Día 0) y, a 1 y 2 días post-inducción, los datos fueron normalizados a día 0. No se observaron diferencias significativas.

Este resultado nos permite concluir que IMT504 no induce la activación de Wnt1 en células progenitoras formadoras de colonias que no habían sido previamente trazadas con ese marcador. Por lo tanto, es probable que el ODN actúe sobre otra subpoblación celular presente en la fracción de BMMCs que, en condiciones control, carecería de las propiedades de células progenitoras mesenquimales.

3.4.5 Efecto de IMT504 sobre la diferenciación *in vivo* de pericitos de la médula ósea trazados con Wnt1 en células tipo-hepatocitos y células endoteliales

Se analizó si el IMT504 induce el reclutamiento de pericitos trazados con Wnt1 hacia el sitio de lesión hepática y, por lo tanto, si aumenta la incidencia de células tipo hepatocitos (HLCs) Tom⁺. Para ello, se obtuvieron BMMCs provenientes de ratones *Wnt1*^{Cre}; *Rosa26*^{Tom} tratados o no con IMT504 unas 2 horas antes de la extracción. Las BMMCs se aplicaron por vía sistémica en ratones *nude* hepatectomizados. A las 24 hs se sacrificaron y se estudió por citometría la incidencia de células Tom⁺ de la fracción parenquimatosa. Nuestros resultados muestran que la proporción de células Tom⁺ en hígados hepatectomizados aumentó significativamente (**Figura 38 A**). Por otro lado, no se encontró diferencia significativa en la proporción de células CD44⁺ Albúmina⁺ Tom⁺ entre las muestras de animales que recibieron BMMCs pretratadas *in vivo* o no con IMT504 (**Figura 38 B**). Sin embargo, la fracción de células CD44⁺ Fibronectina⁺ Tom⁺ en el grupo tratado con IMT504 aumentó un 50% en relación con el control (**Figura 38 C**).

Luego, se analizaron por citometría de flujo las muestras correspondientes a la fracción de células no parenquimatosas. Como se observa en la **Figura 39 A**, la proporción de células Tom⁺ aumentó significativamente en animales hepatectomizados. En la fracción Tom⁺ se analizó la co-expresión con marcadores endoteliales y se observó que, en los animales hepatectomizados, la fracción doble positiva fue mayor en el grupo tratado con IMT504 (**Figura 39 B**). Estos datos sugieren que el IMT504 recluta pericitos trazados con Wnt1 hacia el hígado.

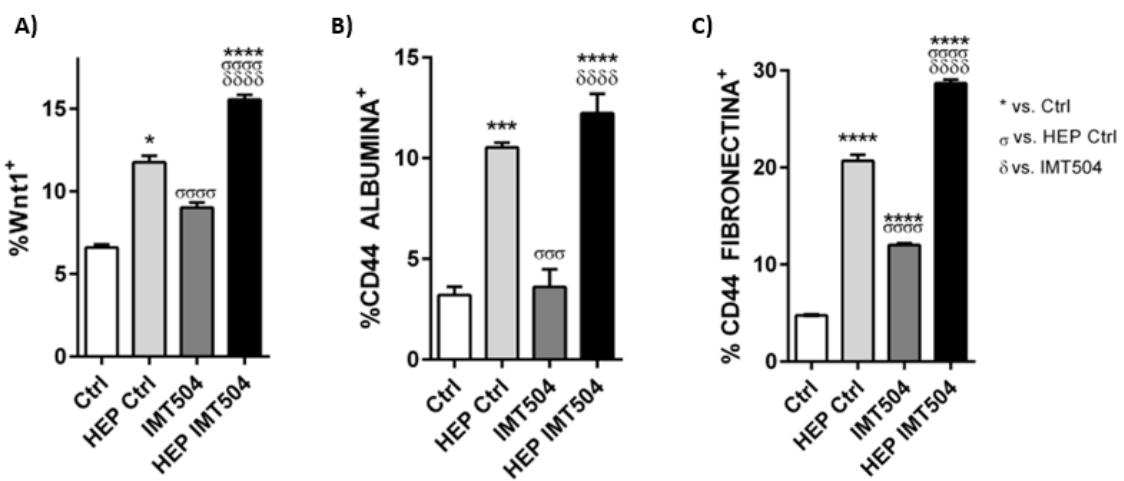


Figura 38: Efecto *in vivo* del IMT504 sobre el reclutamiento y la diferenciación en HLCs de pericitos Wnt1⁺. Porcentaje de células a partir de muestras correspondientes a la fracción parenquimática del hígado de animales nude control (Ctrl) o hepatectomizados (HEP Ctrl), trasplantados con BMMCs de ratones Wnt1 tratados o no con IMT504. Porcentaje de células Tom⁺ (**A**) positivas para albumina (**B**) y fibronectina (**C**). *p<0.05; ***,σσσ p<0.001; ****,σσσσ,δδδδp<0.0001. *vs. Ctrl; σ vs. HEP Ctrl; δ vs. IMT504. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

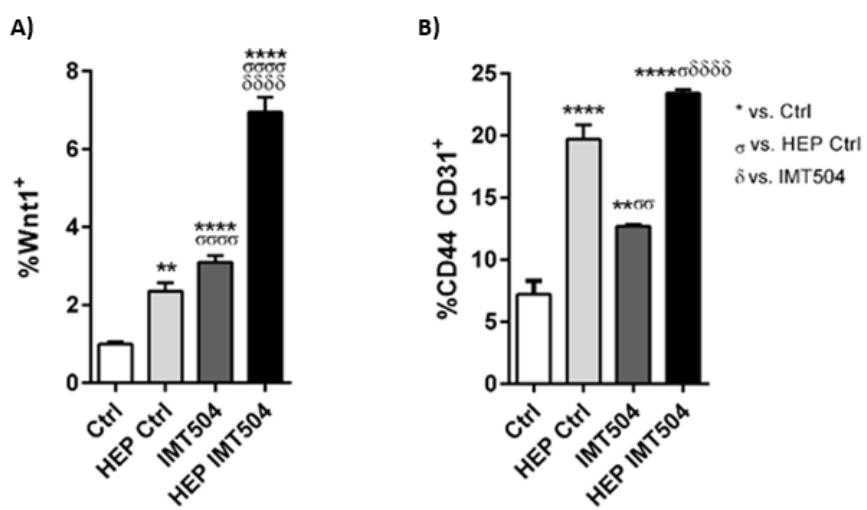


Figura 39: Efecto del IMT504 sobre el reclutamiento y la diferenciación en células endoteliales de pericitos Wnt1⁺. Citometría de flujo de células de la fracción no parenquimática de hígados de animales nude control (Ctrl) o hepatectomizados (HEP Ctrl), trasplantados con BMMCs de ratones Wnt1 tratados o no con IMT504 durante 2hs. Porcentaje de células Tom⁺ (**A**). que expresan CD44 y CD31 (**B**). *,σ p<0.05; **,σσ p<0.01; ****,σσσσ,δδδδ p<0.0001. *vs. Ctrl; σ vs. HEP Ctrl; δ vs. IMT504 *vs. Ctrl. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

3.5 Discusión

En animales Wnt1^{Cre} ; $\text{Rosa26}^{\text{Tom}}$ se observó un aumento en la proporción de células CD44^+ GLAST^+ Tom^+ de médula ósea y sangre periférica, en animales control y fibróticos, luego de 18 horas del tratamiento *in vivo* con IMT504. En los ensayos de células mesenquimales formadoras de colonias también se encontró un aumento en el número de CFU-Fs, luego del tratamiento con IMT504. Estos resultados sugieren un efecto del IMT504 sobre la capacidad proliferativa de células progenitoras estromales GLAST^+ , trazadas con Wnt1 presentes en la fracción de BMMCs.

El tratamiento con IMT504 sobre MSCs establecidas a partir de pericitos trazados con Wnt1 indujo una reducción en el tiempo de duplicación celular y un aumento en la fracción de células en división celular. Además, como vimos en los ensayos de herida, aumenta su capacidad de movilización.

El trasplante en animales atípicos con células de médula ósea trazadas con Wnt1 e inducidas con IMT504 llevó a un aumento significativo en la proporción de células Tom^+ de la fracción parenquimatosa y no parenquimatosa del hígado. Asimismo, el trasplante aumentó la incidencia de células endoteliales Tom^+ respecto a los animales hepatectomizados transplantados con células sin estimular con IMT504.

La fibrogénesis induce un proceso de gliosis que afecta la población de células de Schwann no mielinizantes residentes del hígado. La lesión hepática, tanto en modelos de fibrosis hepática como de hepatectomía parcial, induce la movilización y reclutamiento hacia el hígado de una subpoblación de pericitos GLAST^+ de la médula ósea trazados con Wnt1. En este contexto, el IMT504 induciría una reactivación del promotor de Wnt1 en pericitos de la médula ósea, lo que podría explicar en parte su mayor capacidad proliferativa y de movilización celular (**Figura 40**). El aumento en el número de CFU-F

y un posible efecto sobre su movilización, reclutamiento y diferenciación en HLCs y/o células endoteliales podría tener relevancia terapéutica para la fibrosis hepática.

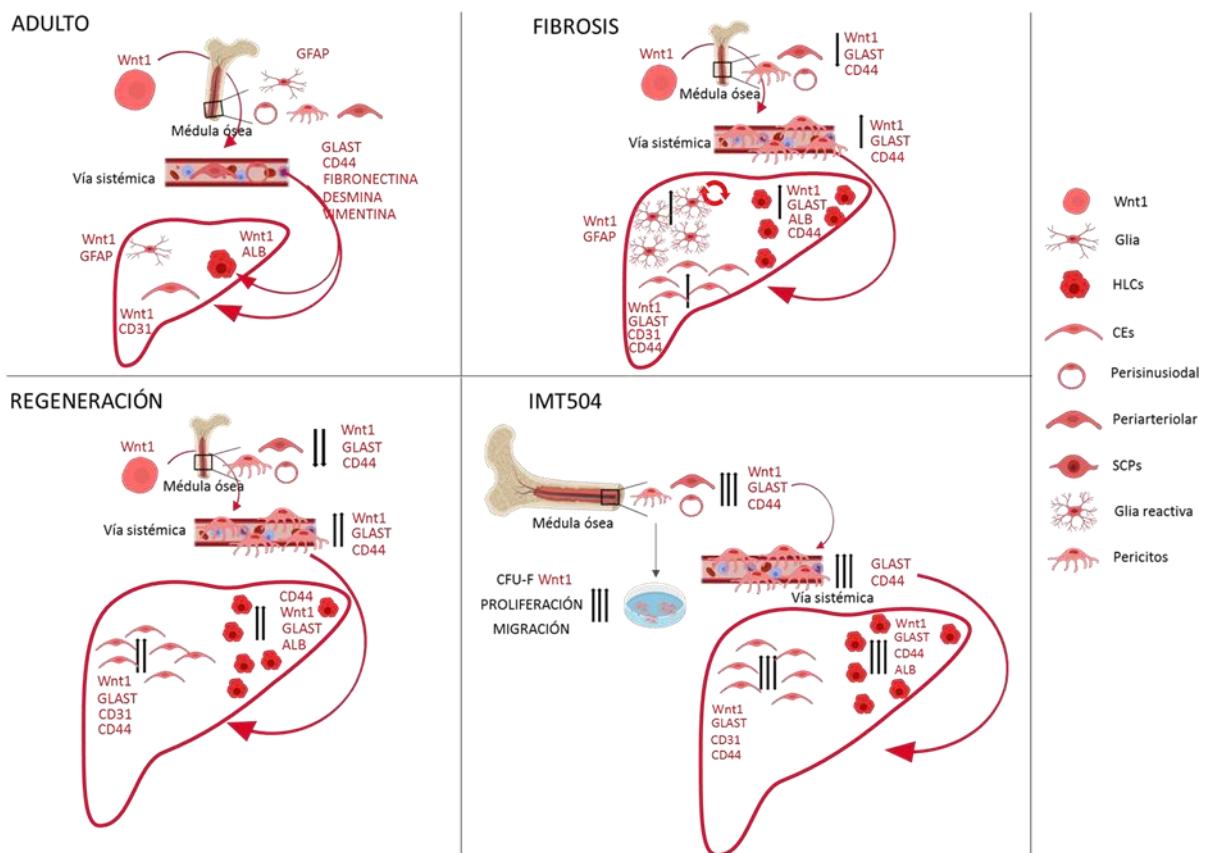


Figura 40: Esquema con los principales datos sobre la gliosis en el hígado fibrótico y sobre la contribución de pericitos $Wnt1^+$ $GLAST^+$ de médula ósea con el hígado adulto sano y en modelos de fibrosis o regeneración; con análisis del efecto del tratamiento con el ODN IMT504.

Conclusión

En el presente trabajo se muestran evidencias sobre los efectos y los mecanismos de acción del IMT504 en el tratamiento de la diabetes tipo 1 (DT1). A través de diversos experimentos, se ha logrado demostrar que el ODN IMT504 tiene un impacto significativo en la modulación de las células madre mesenquimales (MSCs) y sobre distintos tipos celulares dentro del sistema inmunológico, como pueden ser las células T. Estos efectos contribuyen a mejorar la condición diabética en ratones NOD.

En relación con las MSCs, los resultados indican que el IMT504 puede estimular su proliferación, migración y diferenciación, efectos que inducirían la regeneración de tejidos y la modulación del sistema inmune. En particular, se observa que el IMT504 tiene la capacidad de mejorar la funcionalidad y morfología de las células β pancreáticas, incrementar la síntesis y secreción de insulina, y reducir la inflamación en los islotes pancreáticos. De esta forma se logra disminuir el estado hiperglucémico característico de la patología.

Con respecto al efecto inmunomodulador del IMT504 en ratones NOD pre-DT1 y DT1, el análisis de subpoblaciones celulares revela un aumento en la activación de linfocitos B y T, así como una regulación positiva de células T reguladoras (Treg). Se observa también un efecto sobre las células inmunes, donde el ODN IMT504 inhibe las rutas de señalización clave asociadas con el desarrollo de la diabetes, tales como mTOR, STAT3, PI3K y MAP3K. Estos hallazgos, junto con la disminución en la síntesis de citoquinas proinflamatorias y el aumento de TGF- β , apoyan la hipótesis de que el IMT504 contribuiría a la preservación de la función de las células β al modular el microambiente inmune y promover la tolerancia periférica.

En conjunto, estos resultados sugieren que el IMT504 es un agente terapéutico prometedor en el manejo de la diabetes tipo 1, ya que no solo reduce el daño autoinmune, sino que también potencia los efectos moduladores y regenerativos de las MSCs. Así,

logra inducir la proliferación y preservación de la funcionalidad de las células β . Los mecanismos subyacentes parecen involucrar una compleja interacción de citoquinas, quimioquinas y vías de señalización, lo que abre nuevas perspectivas para futuras investigaciones enfocadas en optimizar su uso clínico.

Tanto en modelos de fibrosis hepática como heptatectomías parciales, las células progenitoras estromales GLAST+ de la médula ósea, trazadas con Wnt1, juegan un papel clave en la regeneración del tejido hepático tras una lesión. Se movilizan por la sangre periférica para generar células endoteliales y células tipo hepatocitos (HLCs). El tratamiento con IMT504 potencia esta movilización y mejora la capacidad de regeneración. De esta manera evita la cicatrización y promueve la funcionalidad del hígado. El análisis de estos fenómenos sugiere que el IMT504 reactiva el promotor de Wnt1. Lo interesante de estos hallazgos es que el IMT504 podría utilizarse como terapia pro-regenerativa para el tratamiento de diversas patologías, donde hay participación del sistema inmune y una necesidad de reparación celular/tisular.

En resumen, el IMT504 emerge como una alternativa prometedora a los tratamientos paliativos (insulina exógena) e invasivos (trasplante pancreático), ya que a través de la activación y modulación directa de las MSCs y linfocitos T podría mejorar significativamente la condición de la diabetes tipo 1. Sin embargo, es necesario continuar con investigaciones adicionales para explorar su aplicabilidad en ensayos clínicos y validar su eficacia y seguridad en humanos en el contexto de la diabetes.

Bibliografía

1. Diabetes - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. Accessed October 23, 2022. <https://www.paho.org/es/temas/diabetes>
2. The ADA's 2022 Standards of Medical Care in Diabetes Update | NIDDK. Accessed October 23, 2022. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/professionals/diabetes-discoveries-practice/ada-2022-standards-of-medical-care-in-diabetes-update>
3. Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell*. 1996;85(3):291-297. doi:10.1016/S0092-8674(00)81106-X
4. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National Diabetes Data Group. *Diabetes*. 1979;28(12):1039-1057. doi:10.2337/DIAB.28.12.1039
5. Gale EAM. Declassifying diabetes. *Diabetologia*. 2006;49(9):1989-1995. doi:10.1007/S00125-006-0348-7/FIGURES/3
6. Peer N, Nguyen KA, Hill J, et al. Prevalence and influences of diabetes and prediabetes among adults living with HIV in Africa: a systematic review and meta-analysis. *J Int AIDS Soc*. 2023;26(3). doi:10.1002/JIA2.26059
7. ADA 2010: Documento de estándares en la atención médica a la diabetes. | Rincón Docente de Medicina de Familia. Accessed October 23, 2022. <https://rincondocentemfyc.com/2010/01/04/ada-2010-documento-de-estandares-en-la-atencion-medica-a-la-diabetes/>
8. Gestational Diabetes - Symptoms, Treatments | ADA. Accessed October 24, 2022. <https://diabetes.org/diabetes/gestational-diabetes>
9. Bonnefond A, Unnikrishnan R, Doria A, et al. Monogenic diabetes. *Nat Rev Dis Primers*. 2023;9(1):12. doi:10.1038/S41572-023-00421-W
10. Prentice BJ, Potter KJ, Coriati A, et al. Cystic Fibrosis-Related Diabetes: Clinical approach and knowledge gaps. *Paediatr Respir Rev*. Published online 2022. doi:10.1016/J.PRRV.2022.10.001
11. IDF Diabetes Atlas 2021 | IDF Diabetes Atlas. Accessed April 10, 2023. <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>
12. International Diabetes Federation - Home. Accessed October 24, 2022. <https://www.idf.org/>
13. Bourne RRA, Steinmetz JD, Saylan M, et al. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet Glob Health*. 2021;9(2):e144. doi:10.1016/S2214-109X(20)30489-7
14. Sarwar N, Gao P, Kondapally Seshasai SR, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. 2010;375(9733):2215-2222. doi:10.1016/S0140-6736(10)60484-9

15. Harding JL, Pavkov ME, Magliano DJ, Shaw JE, Gregg EW. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia*. 2019;62(1):3-16. doi:10.1007/S00125-018-4711-2
16. (PDF) An estimation of the economic impact of chronic noncommunicable disease in selected countries. Accessed October 24, 2022. https://www.researchgate.net/publication/253888397_An_estimation_of_the_economic_impact_of_chronic_noncommunicable_disease_in_selected_countries
17. PS L. Overview of the pancreas. *Adv Exp Med Biol*. 2010;690:3-12. doi:10.1007/978-90-481-9060-7_1
18. Jennings RE, Berry AA, Strutt JP, Gerrard DT, Hanley NA. Human pancreas development. *Development*. 2015;142(18):3126-3137. doi:10.1242/DEV.120063
19. Shih HP, Wang A, Sander M. Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2013;29:81-105. doi:10.1146/ANNUREV-CELLBIO-101512-122405
20. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *The Lancet*. 2014;383(9911):69-82. doi:10.1016/S0140-6736(13)60591-7
21. Zhou Z, Jensen PE. Structural Characteristics of HLA-DQ that May Impact DM Editing and Susceptibility to Type-1 Diabetes. *Front Immunol*. 2013;4(AUG). doi:10.3389/FIMMU.2013.00262
22. Erlich H, Valdes AM, Noble J, et al. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes*. 2008;57(4):1084-1092. doi:10.2337/DB07-1331
23. Noble JA, Valdes AM, Varney MD, et al. HLA Class I and Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes: Results From the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. *Diabetes*. 2010;59(11):2972. doi:10.2337/DB10-0699
24. Bakay M, Pandey R, Grant SFA, Hakonarson H. The Genetic Contribution to Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep*. 2019;19(11). doi:10.1007/S11892-019-1235-1
25. Walker LSK. Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance. *J Autoimmun*. 2013;45(100):49-57. doi:10.1016/J.JAUT.2013.06.006
26. Qu HQ, Verlaan DJ, Ge B, et al. A cis-acting regulatory variant in the IL2RA locus. *J Immunol*. 2009;183(8):5158-5162. doi:10.4049/JIMMUNOL.0901337
27. Dariya B, Chalikonda G, Srivani G, Alam A, Nagaraju GP. Pathophysiology, Etiology, Epidemiology of Type 1 Diabetes and Computational Approaches for Immune Targets and Therapy. *Crit Rev Immunol*. 2019;39(4):239-265. doi:10.1615/CRITREVIMMUNOL.2019033126
28. Hettiarachchi K, Zimmet P, Myers M. Dietary toxins, endoplasmic reticulum (ER) stress and diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2008;4(2):146-156. doi:10.2174/157339908784220697
29. Grant WB. Epidemiology of disease risks in relation to vitamin D insufficiency. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006;92(1):65-79. doi:10.1016/J.PBIOMOLBIO.2006.02.013

30. Hyöty H, Taylor K. The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia*. 2002;45(10):1353-1361. doi:10.1007/S00125-002-0852-3
31. Houeiss P, Luce S, Boitard C. Environmental Triggering of Type 1 Diabetes Autoimmunity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13. doi:10.3389/FENDO.2022.933965
32. Howard SG, Sargis RM. Type 1 diabetes-origins and epidemiology. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020;8(5):367-368. doi:10.1016/S2213-8587(20)30106-6
33. Orešić M, Simell S, Sysi-Aho M, et al. Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes. *J Exp Med*. 2008;205(13):2975-2984. doi:10.1084/JEM.20081800
34. Norris JM, Johnson RK, Stene LC. Type 1 diabetes-early life origins and changing epidemiology. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020;8(3):226-238. doi:10.1016/S2213-8587(19)30412-7
35. Roep BO. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia*. 2003;46(3):305-321. doi:10.1007/S00125-003-1089-5
36. Butler AE, Galasso R, Meier JJ, Basu R, Rizza RA, Butler PC. Modestly increased beta cell apoptosis but no increased beta cell replication in recent-onset type 1 diabetic patients who died of diabetic ketoacidosis. *Diabetologia*. 2007;50(11):2323-2331. doi:10.1007/S00125-007-0794-X
37. Remedi MS, Emfinger C. Pancreatic β -cell identity in diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2016;18 Suppl 1(Suppl 1):110-116. doi:10.1111/DOM.12727
38. Sokołowska M, Chobot A, Jarosz-Chobot P. The honeymoon phase - what we know today about the factors that can modulate the remission period in type 1 diabetes. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab*. 2016;22(2):66-70. doi:10.18544/PEDM-22.02.0053
39. Steck AK, Dong F, Frohnert BI, et al. Predicting Progression to Diabetes in Islet Autoantibody Positive Children HHS Public Access. *J Autoimmun*. 2018;90:59-63. doi:10.1016/j.jaut.2018.01.006
40. Helminen O, Aspholm S, Pokka T, et al. OGTT and random plasma glucose in the prediction of type 1 diabetes and time to diagnosis. *Diabetologia*. 2015;58(8):1787-1796. doi:10.1007/S00125-015-3621-9
41. Helminen O, Aspholm S, Pokka T, et al. HbA1c Predicts Time to Diagnosis of Type 1 Diabetes in Children at Risk. *Diabetes*. 2015;64(5):1719-1727. doi:10.2337/DB14-0497
42. Stechova K, Bohmova K, Vrabelova Z, et al. High T-helper-1 cytokines but low T-helper-3 cytokines, inflammatory cytokines and chemokines in children with high risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007;23(6):462-471. doi:10.1002/dmrr.718
43. Melendez-Ramirez LY, Richards RJ, Cefalu WT. Complications of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(3):625-640. doi:10.1016/J.ECL.2010.05.009
44. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*. 2013;93(1):137-188. doi:10.1152/PHYSREV.00045.2011

45. Spallone V. Update on the Impact, Diagnosis and Management of Cardiovascular Autonomic Neuropathy in Diabetes: What Is Defined, What Is New, and What Is Unmet. *Diabetes Metab J.* 2019;43(1):3-30. doi:10.4093/DMJ.2018.0259
46. Papadopoulou-Marketou N, Paschou SA, Marketos N, Adamidi S, Adamidis S, Kanaka-Gantenbein C. Diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Minerva Med.* 2018;109(3):218-228. doi:10.23736/S0026-4806.17.05496-9
47. Vergès B. Cardiovascular disease in type 1 diabetes: A review of epidemiological data and underlying mechanisms. *Diabetes Metab.* 2020;46(6):442-449. doi:10.1016/J.DIABET.2020.09.001
48. Chen Y, Li W, Nong X, et al. Role of Artesunate on cardiovascular complications in rats with type 1 diabetes mellitus. *BMC Endocr Disord.* 2021;21(1). doi:10.1186/S12902-021-00682-0
49. Askenasy N. Mechanisms of diabetic autoimmunity: II--Is diabetes a central or peripheral disorder of effector and regulatory cells? *Immunol Res.* 2016;64(1):36-43. doi:10.1007/S12026-015-8725-2
50. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med.* 2015;278(4):369-395. doi:10.1111/JOIM.12395
51. Skog O, Korsgren S, Melhus Å, Korsgren O. Revisiting the notion of type 1 diabetes being a T-cell-mediated autoimmune disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2013;20(2):118-123. doi:10.1097/MED.0B013E32835EDB89
52. Clark M, Kroger CJ, Tisch RM. Type 1 Diabetes: A Chronic Anti-Self-Inflammatory Response. *Front Immunol.* 2017;8(DEC). doi:10.3389/FIMMU.2017.01898
53. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev.* 2011;91(1):79-118. doi:10.1152/PYSREV.00003.2010
54. Askenasy N. Mechanisms of diabetic autoimmunity: I--the inductive interface between islets and the immune system at onset of inflammation. *Immunol Res.* 2016;64(2):360-368. doi:10.1007/S12026-015-8753-Y
55. Pfeiffer SE, Quesada-Masachs E, Mcardle S, et al. Effect of IL4 and IL10 on a human in vitro type 1 diabetes model Institution(s) of origin. Published online 2022.
56. Vives-Pi M, Rodríguez-Fernández S. How apoptotic b-cells direct immune response to tolerance or to autoimmune diabetes: a review. doi:10.1007/s10495-015-1090-8
57. Zhou L, He X, Cai P, et al. Induced regulatory T cells suppress Tc1 cells through TGF- β signaling to ameliorate STZ-induced type 1 diabetes mellitus. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(3):698. doi:10.1038/S41423-020-00623-2
58. Lu J, Liu J, Li L, Lan Y, Liang Y. Cytokines in type 1 diabetes: mechanisms of action and immunotherapeutic targets. *Clin Transl Immunology.* 2020;9(3). doi:10.1002/CTI2.1122
59. Scherm MG, Serr I, Kaestner KH, Daniel C. The role of T cell miRNAs for regulatory T cell induction in islet autoimmunity. Published online 2019. doi:10.1016/j.molmet.2019.06.009

60. Azzi J, Thueson L, Moore R, Abdoli R, Reijonen H, Abdi R. PI3K γ Deficient NOD-Mice Are Protected from Diabetes by Restoring the Balance of Regulatory to Effector-T-Cells. *PLoS One.* 2017;12(1). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0169695
61. Flanagan SE, Haapaniemi E, Russell MA, et al. Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease. *Nature Genetics* 2014 46:8. 2014;46(8):812-814. doi:10.1038/ng.3040
62. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med.* 1986;314(21):1360-1368. doi:10.1056/NEJM198605223142106
63. The History of a Wonderful Thing We Call Insulin | ADA. Accessed March 6, 2023. <https://diabetes.org/blog/history-wonderful-thing-we-call-insulin>
64. Beck RW, Bergenstal RM, Laffel LM, Pickup JC. Advances in technology for management of type 1 diabetes. *Lancet.* 2019;394(10205):1265-1273. doi:10.1016/S0140-6736(19)31142-0
65. Warshauer JT, Bluestone JA, Anderson MS. New Frontiers in the Treatment of Type 1 Diabetes. *Cell Metab.* 2020;31(1):46-61. doi:10.1016/J.CMET.2019.11.017
66. von Scholten BJ, Kreiner FF, Gough SCL, von Herrath M. Current and future therapies for type 1 diabetes. *Diabetologia* 2021 64:5. 2021;64(5):1037-1048. doi:10.1007/S00125-021-05398-3
67. Pathak V, Pathak NM, O'Neill CL, Guduric-Fuchs J, Medina RJ. Therapies for Type 1 Diabetes: Current Scenario and Future Perspectives. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes.* 2019;12. doi:10.1177/1179551419844521
68. Cabello-Olmo M, Araña M, Radichev I, Smith P, Huarte E, Barajas M. New Insights into Immunotherapy Strategies for Treating Autoimmune Diabetes. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19). doi:10.3390/IJMS20194789
69. Sheehy DF, Quinnell SP, Vegas AJ. Targeting Type 1 Diabetes: Selective Approaches for New Therapies. *Biochemistry.* 2019;58(4):214-233. doi:10.1021/ACS.BIOCHEM.8B01118
70. Bianchi MS, Bianchi S, Hernando-Insúa A, et al. Proposed mechanisms for oligonucleotide IMT504 induced diabetes reversion in a mouse model of immunodependent diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016;311(2):E380-E395. doi:10.1152/AJPENDO.00104.2016/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH10131676200007.JPG
71. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a Non-Obese, Diabetic Strain of Mice. *Exp Anim.* 1980;29(1):1-13. doi:10.1538/EXPANIM1978.29.1_1
72. 001976 - NOD Strain Details. Accessed October 24, 2022. <https://www.jax.org/strain/001976>
73. Leiter EH. The NOD Mouse: A Model for Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Curr Protoc Immunol.* 1997;24(1). doi:10.1002/0471142735.im1509s24
74. Xiao Y, Deng C, Zhou Z. The Multiple Roles of B Lymphocytes in the Onset and Treatment of Type 1 Diabetes: Interactions between B Lymphocytes and T Cells. *J Diabetes Res.* 2021;2021. doi:10.1155/2021/6581213

75. Pearson JA, Wong FS, Wen L. The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *J Autoimmun.* 2016;66:76-88.
doi:10.1016/J.JAUT.2015.08.019
76. Serreze D v, Chapman HD, Varnum DS, Gerling I, Leiter EH, Shultz LD. Initiation of autoimmune diabetes in NOD/Lt mice is MHC class I-dependent. *The Journal of Immunology.* 1997;158(8).
77. Hattori M, Buse JB, Jackson RA, et al. The NOD mouse: recessive diabetogenic gene in the major histocompatibility complex. *Science.* 1986;231(4739):733-735.
doi:10.1126/SCIENCE.3003909
78. Acha-Orbea H, McDevitt HO. The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A beta chain is unique. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(8):2435-2439.
doi:10.1073/PNAS.84.8.2435
79. Chaparro RJ, Dilorenzo TP. An update on the use of NOD mice to study autoimmune (Type 1) diabetes. *Expert Rev Clin Immunol.* 2010;6(6):939-955. doi:10.1586/ECI.10.68
80. Calogero A, Hospers GAP, Mulder NH. Synthetic oligonucleotides: useful molecules? A review. *Pharm World Sci.* 1997;19(6):264-268. doi:10.1023/A:1008699515124
81. Ma DDF, Rede T, Naqvi NA, Cook PD. Synthetic oligonucleotides as therapeutics: the coming of age. *Biotechnol Annu Rev.* 2000;5:155-196. doi:10.1016/S1387-2656(00)05035-3
82. Franco R, Rodriguez JM, Elías F, et al. Non-clinical safety studies of IMT504, a unique non-CpG oligonucleotide. *Nucleic Acid Ther.* 2014;24(4):267-282.
doi:10.1089/NAT.2013.0479
83. Merrifield RB. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc.* 1963;85(14):2149-2154. doi:10.1021/JA00897A025
84. Letsinger RL, Mahadevan V. Oligonucleotide Synthesis on a Polymer Support1,2. *J Am Chem Soc.* 1965;87(15):3526-3527.
doi:10.1021/JA01093A058/ASSET/JA01093A058.FP.PNG_V03
85. Eckstein F. Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* 2014;24(6):374-387. doi:10.1089/NAT.2014.0506
86. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:709-760. doi:10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.20.100301.064842
87. Clavé G, Reverte M, Vasseur JJ, Smietana M. Modified internucleoside linkages for nuclease-resistant oligonucleotides. *RSC Chem Biol.* 2021;2(1):94-150.
doi:10.1039/D0CB00136H
88. Ochoa S, Milam VT. Modified Nucleic Acids: Expanding the Capabilities of Functional Oligonucleotides. *Molecules.* 2020;25(20). doi:10.3390/MOLECULES25204659
89. Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75(1):280. doi:10.1073/PNAS.75.1.280

90. Juliano RL. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(14):6518-6548. doi:10.1093/NAR/GKW236
91. Westin J, Maris MB, Jacobson CA, et al. Safety and Efficacy of a DNA Oligonucleotide Therapy in Patients with Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2022;22(1):52-59. doi:10.1016/J.CLML.2021.07.020
92. Elias F, Flo J, Lopez RA, Zorzopoulos J, Montaner A, Rodriguez JM. Strong cytosine-guanosine-independent immunostimulation in humans and other primates by synthetic oligodeoxynucleotides with PyNTTTGT motifs. *J Immunol.* 2003;171(7):3697-3704. doi:10.4049/JIMMUNOL.171.7.3697
93. Roberts TL, Sweet MJ, Hume DA, Stacey KJ. Cutting edge: species-specific TLR9-mediated recognition of CpG and non-CpG phosphorothioate-modified oligonucleotides. *J Immunol.* 2005;174(2):605-608. doi:10.4049/JIMMUNOL.174.2.605
94. Ingesson B, Söderberg D, Strid T, et al. Lymphocytes eject interferogenic mitochondrial DNA webs in response to CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides of class C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(3):E478-E487. doi:10.1073/PNAS.1711950115
95. Kim D, Kim TH, Wu G, et al. Extracellular Release of CD11b by TLR9 Stimulation in Macrophages. *PLoS One.* 2016;11(3). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0150677
96. Hernando-Insúa A, Rodriguez JM, Elías F, et al. A High Dose of IMT504, the PyNTTTGT Prototype Immunostimulatory Oligonucleotide, Does Not Alter Embryonic Development in Rats. <http://www.liebertpub.com/oli>. 2010;20(1):33-35. doi:10.1089/OLI.2009.0206
97. Kayraklıoglu N, Horuluoglu B, Klinman DM. CpG Oligonucleotides as Vaccine Adjuvants. *Methods Mol Biol.* 2021;2197:51-85. doi:10.1007/978-1-0716-0872-2_4
98. Rodriguez JM, Elías F, Fló J, López RA, Zorzopoulos J, Montaner AD. Immunostimulatory PyNTTTGT oligodeoxynucleotides: structural properties and refinement of the active motif. *Oligonucleotides.* 2006;16(3):275-285. doi:10.1089/OLI.2006.16.275
99. Zorzopoulos J, Opal SM, Hernando-Insúa A, et al. Immunomodulatory oligonucleotide IMT504: Effects on mesenchymal stem cells as a first-in-class immunoprotective/immunoregenerative therapy. *World J Stem Cells.* 2017;9(3):45-67. doi:10.4252/WJSC.V9.I3.45
100. Jaroszewski JW, Clausen V, Cohen JS, Dahl O. NMR investigations of duplex stability of phosphorothioate and phosphorodithioate DNA analogues modified in both strands. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(5):829. doi:10.1093/NAR/24.5.829
101. Clark CL, Cecil PK, Singh D, Gray DM. CD, absorption and thermodynamic analysis of repeating dinucleotide DNA, RNA and hybrid duplexes [d/r(AC)]12-[d/r(GT/U)]12 and the influence of phosphorothioate substitution. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(20):4098-4105. doi:10.1093/NAR/25.20.4098
102. Elias F, Flo J, Rodriguez JM, et al. PyNTTTGT prototype oligonucleotide IMT504 is a potent adjuvant for the recombinant Hepatitis B vaccine that enhances the Th1 response. *Vaccine.* 2005;23(27):3597-3603. doi:10.1016/J.VACCINE.2004.12.030

103. Montaner AD, Nichilo A de, Rodriguez JM, et al. IMT504: A New and Potent Adjuvant for Rabies Vaccines Permitting Significant Dose Sparing. *World J Vaccines*. 2012;2(4):182-188. doi:10.4236/WJV.2012.24025
104. Franco R, Rodriguez JM, Elías F, et al. Non-clinical safety studies of IMT504, a unique non-CpG oligonucleotide. *Nucleic Acid Ther*. 2014;24(4):267-282. doi:10.1089/nat.2013.0479
105. Hernando-Insúa A, Rodriguez JM, Elías F, et al. A High Dose of IMT504, the PyNTTTTG Prototype Immunostimulatory Oligonucleotide, Does Not Alter Embryonic Development in Rats. <http://www.liebertpub.com/oli>. 2010;20(1):33-35. doi:10.1089/OLI.2009.0206
106. Oligonucleotide IMT504 induces an immunogenic phenotype and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells - PubMed. Accessed November 16, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16555722/>
107. Zorzopoulos J, Opal SM, Hernando-Insúa A, et al. Immunomodulatory oligonucleotide IMT504: Effects on mesenchymal stem cells as a first-in-class immunoprotective/immunoregenerative therapy. <http://www.wjgnet.com/>. 2017;9(3):45-67. doi:10.4252/WJSC.V9.I3.45
108. Coronel MF, Hernando-Insúa A, Rodriguez JM, et al. Oligonucleotide IMT504 reduces neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Neurosci Lett*. 2008;444(1):69-73. doi:10.1016/J.NEULET.2008.07.045
109. Bianchi MS, Calvo V, Chasseing NA, et al. Oligodeoxynucleotide IMT504: lack of effect on immune parameters during islet regeneration in single dose streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012;28(2):156-163. doi:10.1002/DMRR.1296
110. Bianchi MS, Hernando-Insúa A, Chasseing NA, et al. Oligodeoxynucleotide IMT504 induces a marked recovery in a streptozotocin-induced model of diabetes in rats: Correlation with an early increase in the expression of nestin and neurogenin 3 progenitor cell markers. *Diabetologia*. 2010;53(6):1184-1189. doi:10.1007/S00125-010-1694-Z/FIGURES/3
111. Casadei M, Fiore E, Rubione J, et al. IMT504 blocks allodynia in rats with spared nerve injury by promoting the migration of mesenchymal stem cells and by favoring an anti-inflammatory milieu at the injured nerve. *Pain*. 2022;163(6):1114-1129. doi:10.1097/J.PAIN.0000000000002476
112. Leiguarda C, Potilinski C, Rubione J, et al. IMT504 Provides Analgesia by Modulating Cell Infiltrate and Inflammatory Milieu in a Chronic Pain Model. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2021;16(3):651-666. doi:10.1007/S11481-020-09971-2/METRICS
113. Chahin A, Opal SM, Zorzopoulos J, et al. The Novel Immunotherapeutic Oligodeoxynucleotide IMT504 Protects Neutropenic Animals from Fatal *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia and Sepsis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(2):1225. doi:10.1128/AAC.03923-14
114. Chahin A, Opal SM, Zorzopoulos J, et al. The novel immunotherapeutic oligodeoxynucleotide IMT504 protects neutropenic animals from fatal *Pseudomonas*

- aeruginosa bacteremia and sepsis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(2):1225-1229. doi:10.1128/AAC.03923-14
115. Li M, Ikebara S. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair. *Stem Cells Int*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/132642
116. Majore I, Moretti P, Stahl F, Hass R, Kasper C. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. *Stem Cell Rev Rep*. 2011;7(1):17-31. doi:10.1007/S12015-010-9165-Y
117. Gronthos S, Zannettino ACW, Hay SJ, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 9):1827-1835. doi:10.1242/JCS.00369
118. Chen Y, Yu Q, Hu Y, Shi Y. Current Research and Use of Mesenchymal Stem Cells in the Therapy of Autoimmune Diseases. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2019;14(7):579-582. doi:10.2174/1574888X14666190429141421
119. Hall B, Dembinski J, Sasser AK, Studeny M, Andreeff M, Marini F. Mesenchymal stem cells in cancer: tumor-associated fibroblasts and cell-based delivery vehicles. *Int J Hematol*. 2007;86(1):8-16. doi:10.1532/IJH97.06230
120. Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost SIGNIFICANCE STATEMENT. *Stem Cells*. 2019;37:855-864. doi:10.1002/stem.3016
121. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
122. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 11):2204-2213. doi:10.1242/JCS.02932
123. Prockop DJ, Youn Oh J. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther*. 2012;20(1):14-20. doi:10.1038/MT.2011.211
124. Le Blanc K, Samuelsson H, Lönnies L, Sundin M, Ringdén O. Generation of immunosuppressive mesenchymal stem cells in allogeneic human serum. *Transplantation*. 2007;84(8):1055-1059. doi:10.1097/01.TP.0000285088.44901.EA
125. Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*. 2007;262(5):509-525. doi:10.1111/J.1365-2796.2007.01844.X
126. Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol*. 2014;32(3):252-260. doi:10.1038/NBT.2816
127. Zanone MM, Favaro E, Miceli I, et al. Human mesenchymal stem cells modulate cellular immune response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(8):3788-3797. doi:10.1210/JC.2009-2350
128. Ribeiro A, Laranjeira P, Mendes S, et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress

- peripheral blood B, natural killer and T cells. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(5). doi:10.1186/SCRT336
129. Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy.* 2006;8(6):559-561. doi:10.1080/14653240601045399
130. Batsali AK, Georgopoulou A, Mavroudi I, Matheakakis A, Pontikoglou CG, Papadaki HA. The Role of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles (MSC-EVs) in Normal and Abnormal Hematopoiesis and Their Therapeutic Potential. *J Clin Med.* 2020;9(3). doi:10.3390/JCM9030856
131. Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells.* 2019;37(7):855-864. doi:10.1002/STEM.3016
132. Naji A, Eitoku M, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(17):3323-3348. doi:10.1007/S00018-019-03125-1
133. Khatri R, Petry SF, Linn T. Intrapancreatic MSC transplantation facilitates pancreatic islet regeneration. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1). doi:10.1186/S13287-021-02173-4
134. Lin CY, Zu CH, Yang CC, et al. IL-1 β -Induced Mesenchymal Stem Cell Migration Involves MLCK Activation via PKC Signaling. *Cell Transplant.* 2015;24(10):2011-2028. doi:10.3727/096368914X685258
135. Sordi V. Mesenchymal stem cell homing capacity. *Transplantation.* 2009;87(9 Suppl). doi:10.1097/TP.0B013E3181A28533
136. Trivanović D, Kocić J, Mojsilović S, et al. Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. *Srp Arh Celok Lek.* 2013;141(3-4):178-186. doi:10.2298/SARH1304178T
137. Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2009;106(6):984-991. doi:10.1002/JCB.22091
138. Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell.* 2009;4(3):206-216. doi:10.1016/J.STEM.2009.02.001
139. da Silva Meirelles L, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(5-6):419-427. doi:10.1016/J.CYTOGFR.2009.10.002
140. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 2014;21(2):216-225. doi:10.1038/CDD.2013.158
141. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One.* 2010;5(4). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0010088
142. Jiang Y, Zhang P, Zhang X, Lv L, Zhou Y. Advances in mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of osteoporosis. *Cell Prolif.* 2021;54(1). doi:10.1111/CPR.12956
143. Zorzopoulos J, Opal SM, Hernando-Insúa A, et al. Immunomodulatory oligonucleotide IMT504: Effects on mesenchymal stem cells as a first-in-class

- immunoprotective/immunoregenerative therapy. *World J Stem Cells.* 2017;9(3):45-67. doi:10.4252/WJSC.V9.I3.45
144. Hernando Insúa A, Montaner AD, Rodriguez JM, et al. IMT504, the prototype of the immunostimulatory oligonucleotides of the PyNTTTGT class, increases the number of progenitors of mesenchymal stem cells both in vitro and in vivo: potential use in tissue repair therapy. *Stem Cells.* 2007;25(4):1047-1054. doi:10.1634/STEMCELLS.2006-0479
145. Ding X, Su W, Ding X. Methods of Endotoxin Detection. *J Lab Autom.* 2015;20(4):354-364. doi:10.1177/2211068215572136
146. Makino S, Kunitomo K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu.* 1980;29(1):1-13. doi:10.1538/EXPANIM1978.29.1_1
147. Dominici M, le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
148. Boregowda S v., Krishnappa V, Phinney DG. Isolation of Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 2016;1416:205-223. doi:10.1007/978-1-4939-3584-0_11
149. Boregowda S V., Krishnappa V, Phinney DG. Isolation of Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 2016;1416:205-223. doi:10.1007/978-1-4939-3584-0_11
150. Pal B, Das B. In vitro Culture of Naïve Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Stemness Based Approach. *Front Cell Dev Biol.* 2017;5(AUG). doi:10.3389/FCELL.2017.00069
151. Martinotti S, Ranzato E. Scratch Wound Healing Assay. *Methods Mol Biol.* 2020;2109:225-229. doi:10.1007/7651_2019_259
152. Latifi-Pupovci H, Kuçi Z, Wehner S, et al. In vitro migration and proliferation (“wound healing”) potential of mesenchymal stromal cells generated from human CD271+ bone marrow mononuclear cells. *J Transl Med.* 2015;13(1):1-9. doi:10.1186/S12967-015-0676-9/FIGURES/5
153. Rodrigues JM, Elias F, Montaner A, et al. Oligonucleotide IMT504 induces an immunogenic phenotype and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Medicina (B Aires).* 2006;66(1):9-16. Accessed December 26, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16555722/>
154. Fernández Vallone VB, Hofer EL, Choi H, et al. Behaviour of mesenchymal stem cells from bone marrow of untreated advanced breast and lung cancer patients without bone osteolytic metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2013;30(3):317-332. doi:10.1007/S10585-012-9539-4
155. Liu J, Gao J, Liang Z, et al. Mesenchymal stem cells and their microenvironment. *Stem Cell Research & Therapy* 2022 13:1. 2022;13(1):1-10. doi:10.1186/S13287-022-02985-Y
156. Bianchi S, Martínez Allo VC, Massimino M, et al. Oligonucleotide IMT504 Improves Glucose Metabolism and Controls Immune Cell Mediators in Female Diabetic NOD

Mice. <https://home.liebertpub.com/nat>. 2021;31(2):155-171.
doi:10.1089/NAT.2020.0901

157. Casadei M, Fiore E, Rubione J, et al. IMT504 blocks allodynia in rats with spared nerve injury by promoting the migration of mesenchymal stem cells and by favoring an anti-inflammatory milieu at the injured nerve. *Pain*. 2022;163(6):1114-1129.
doi:10.1097/j.pain.0000000000002476
158. de Araújo Farias V, Carrillo-Gálvez AB, Martín F, Anderson P. TGF- β and mesenchymal stromal cells in regenerative medicine, autoimmunity and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018;43:25-37. doi:10.1016/J.CYTOGFR.2018.06.002
159. Dorronsoro A, Lang V, Ferrin I, et al. Intracellular role of IL-6 in mesenchymal stromal cell immunosuppression and proliferation. *Sci Rep*. 2020;10(1). doi:10.1038/S41598-020-78864-4
160. Pricola KL, Kuhn NZ, Haleem-Smith H, Song Y, Tuan RS. Interleukin-6 Maintains Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Stemness by an ERK1/2-Dependent Mechanism. *J Cell Biochem*. 2009;108(3):577. doi:10.1002/JCB.22289
161. Bianchi S, Martínez Allo VC, Massimino M, et al. Oligonucleotide IMT504 Improves Glucose Metabolism and Controls Immune Cell Mediators in Female Diabetic NOD Mice. *Nucleic Acid Ther*. 2021;31(2):155-171. doi:10.1089/NAT.2020.0901
162. Bianchi MS, Bianchi S, Hernando-Insúa A, et al. Proposed mechanisms for oligonucleotide IMT504 induced diabetes reversion in a mouse model of immunodependent diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016;311(2):E380-E395.
doi:10.1152/AJPENDO.00104.2016
163. Shahani P, Mahadevan A, Datta I. Fundamental changes in endogenous bone marrow mesenchymal stromal cells during Type I Diabetes is a pre-neuropathy event. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2021;1867(10):166187. doi:10.1016/J.BBADIS.2021.166187
164. Liesveld JL, Sharma N, Aljutawi OS. Stem cell homing: From physiology to therapeutics. *Stem Cells*. 2020;38(10):1241-1253. doi:10.1002/STEM.3242
165. Liesveld JL, Sharma N, Aljutawi OS. Stem cell homing: From physiology to therapeutics. *Stem Cells*. 2020;38(10):1241-1253. doi:10.1002/STEM.3242
166. McComb S, Thiriot A, Akache B, Krishnan L, Stark F. Introduction to the Immune System. *Methods Mol Biol*. 2019;2024:1-24. doi:10.1007/978-1-4939-9597-4_1
167. Yatim KM, Lakkis FG. A brief journey through the immune system. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(7):1274-1281. doi:10.2215/CJN.10031014
168. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018;391(10138):2449-2462. doi:10.1016/S0140-6736(18)31320-5
169. Roep BO, Thomaidou S, van Tienhoven R, Zaldumbide A. Type 1 diabetes mellitus as a disease of the β -cell (do not blame the immune system?). *Nat Rev Endocrinol*. 2021;17(3):150-161. doi:10.1038/S41574-020-00443-4

170. Krieg AM, Yi AK, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 1995;374(6522):546-549. doi:10.1038/374546A0
171. Montaner AD, Denichilo A, Rodríguez JM, et al. Addition of the immunostimulatory oligonucleotide IMT504 to a seasonal flu vaccine increases hemagglutinin antibody titers in young adult and elder rats, and expands the anti-hemagglutinin antibody repertoire. *Nucleic Acid Ther.* 2011;21(4):265-274. doi:10.1089/NAT.2011.0284
172. Beccaria CG, Vesely MCA, Vernengo FF, et al. Galectin-3 deficiency drives lupus-like disease by promoting spontaneous germinal centers formation via IFN- γ . *Nature Communications* 2018 9:1. 2018;9(1):1-15. doi:10.1038/s41467-018-04063-5
173. Walker JA, McKenzie ANJ. TH2 cell development and function. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(2):121-133. doi:10.1038/NRI.2017.118
174. Chakraborty M, Chu K, Shrestha A, et al. Mechanical Stiffness Controls Dendritic Cell Metabolism and Function. *Cell Rep*. 2021;34(2). doi:10.1016/J.CELREP.2020.108609
175. Ai W, Li H, Song N, Li L, Chen H. Optimal Method to Stimulate Cytokine Production and Its Use in Immunotoxicity Assessment. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(9):3834. doi:10.3390/IJERPH10093834
176. Sag D, Özkan M, Kronenberg M, Wingender G. Improved Detection of Cytokines Produced by Invariant NKT Cells. *Sci Rep*. 2017;7(1). doi:10.1038/S41598-017-16832-1
177. QIAzol Handbook - QIAGEN. Accessed April 26, 2022.
<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=61c3ddbd-69c1-4b68-ab89-a428f14a9245&lang=en>
178. Pfeiffer SEM, Quesada-Masachs E, McArdle S, et al. Effect of IL4 and IL10 on a human in vitro type 1 diabetes model. *Clin Immunol*. 2022;241. doi:10.1016/J.CLIM.2022.109076
179. Abdel-Moneim A, Bakery HH, Allam G. The potential pathogenic role of IL-17/Th17 cells in both type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother*. 2018;101:287-292. doi:10.1016/J.BIOPHA.2018.02.103
180. Khatri R, Linn T. Pancreatic mesenchymal stem cells might protect β -cells. *Nat Rev Endocrinol*. 2022;18(12):725-726. doi:10.1038/s41574-022-00763-7
181. Wan YY, Flavell RA. TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. *J Clin Immunol*. 2008;28(6):647-659. doi:10.1007/S10875-008-9251-Y
182. Jaeckel E, Mpofu N, Saal N, Manns MP. Role of regulatory T cells for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Horm Metab Res*. 2008;40(2):126-136. doi:10.1055/S-2008-1042427
183. Ryba-Stanisławowska M, Skrzypkowska M, Myśliwiec M, Myśliwska J. Loss of the balance between CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells and CD4(+)IL17A(+) Th17 cells in patients with type 1 diabetes. *Hum Immunol*. 2013;74(6):701-707. doi:10.1016/J.HUMIMM.2013.01.024
184. Emamaulee JA, Davis J, Merani S, et al. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 2009;58(6):1302-1311. doi:10.2337/DB08-1113

185. Zhou L, He X, Cai P, et al. Induced regulatory T cells suppress Tc1 cells through TGF- β signaling to ameliorate STZ-induced type 1 diabetes mellitus. *Cellular & Molecular Immunology* 2021;18(3). 2021;18(3):698-710. doi:10.1038/s41423-020-00623-2
186. Araki K, Turner AP, Shaffer VO, et al. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature*. 2009;460(7251):108-112. doi:10.1038/NATURE08155
187. Chen M, Obasanmi G, Armstrong D, et al. STAT3 activation in circulating myeloid-derived cells contributes to retinal microvascular dysfunction in diabetes. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1). doi:10.1186/S12974-019-1533-1
188. Warshauer JT, Belk JA, Chan AY, et al. A human mutation in STAT3 promotes type 1 diabetes through a defect in CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med*. 2021;218(8). doi:10.1084/JEM.20210759
189. Cao H, Lu J, Du J, et al. TAK1 inhibition prevents the development of autoimmune diabetes in NOD mice. *Sci Rep*. 2015;5. doi:10.1038/SREP14593
190. Azzi J, Thueson L, Moore R, Abdoli R, Reijonen H, Abdi R. PI3K γ Deficient NOD-Mice Are Protected from Diabetes by Restoring the Balance of Regulatory to Effector-T-Cells. *PLoS One*. 2017;12(1). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0169695
191. Asahara SI, Inoue H, Watanabe H, Kido Y. Roles of mTOR in the Regulation of Pancreatic β -Cell Mass and Insulin Secretion. *Biomolecules*. 2022;12(5). doi:10.3390/BIOM12050614
192. Yang M, Tian M, Zhang X, et al. Role of the JAK2/STAT3 signaling pathway in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus with macrovascular complications. *Oncotarget*. 2017;8(57):96958. doi:10.18632/ONCOTARGET.18555
193. Bengal E, Aviram S, Hayek T. p38 MAPK in Glucose Metabolism of Skeletal Muscle: Beneficial or Harmful? *Int J Mol Sci*. 2020;21(18):1-17. doi:10.3390/IJMS21186480
194. Tortora, Derrickson: Principles of Anatomy and Physiology, 13th Edition - Student Companion Site. Accessed December 11, 2022. <https://bcs.wiley.com/he-bcs/Books%20?action=index&bcsId=6205&itemId=0470565101>
195. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(2):209. doi:10.1172/JCI24282
196. Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2014;20(23):7312. doi:10.3748/WJG.V20.I23.7312
197. Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, et al. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nature Medicine* 2006 12:6. 2006;12(6):671-676. doi:10.1038/nm1421
198. Venkatesh SK, Torbenson MS. Liver fibrosis quantification. *Abdom Radiol (NY)*. 2022;47(3):1032. doi:10.1007/S00261-021-03396-Y
199. Breucker H. Jan Langmann: Medizinische Embryologie. *Andrologia*. 1986;18(1):96-96. doi:10.1111/J.1439-0272.1986.TB01745.X
200. Simões-Costa M, Bronner ME. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development*. 2015;142(2):242-257. doi:10.1242/DEV.105445

201. Isern J, García-García A, Martín AM, et al. The neural crest is a source of mesenchymal stem cells with specialized hematopoietic stem cell niche function. *Elife*. 2014;3. doi:10.7554/ELIFE.03696
202. Panta W, Imsoonthornruksa S, Yoisungnern T, Suksaweang S, Ketudat-Cairns M, Parnpai R. Enhanced Hepatogenic Differentiation of Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells by Using Three-Step Protocol. *Int J Mol Sci*. 2019;20(12). doi:10.3390/IJMS20123016
203. Song YM, Lian CH, Wu CS, Ji AF, Xiang JJ, Wang XY. Effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplanted via the portal vein or tail vein on liver injury in rats with liver cirrhosis. *Exp Ther Med*. 2015;9(4):1292. doi:10.3892/ETM.2015.2232
204. Hajovsky H, Hu G, Koen Y, et al. Metabolism and Toxicity of Thioacetamide and Thioacetamide S-Oxide in Rat Hepatocytes. *Chem Res Toxicol*. 2012;25(9):1955. doi:10.1021/TX3002719
205. Jin X, Li Y, Li J, et al. Acute bone damage through liver-bone axis induced by thioacetamide in rats. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2022;23(1). doi:10.1186/S40360-022-00568-4
206. Schick E, McCaffery SD, Keblish EE, Thakurdin C, Emerson MM. Lineage tracing analysis of cone photoreceptor associated cis-regulatory elements in the developing chicken retina. *Sci Rep*. 2019;9(1). doi:10.1038/S41598-019-45750-7
207. Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li N, Luo L. A global double-fluorescent cre reporter mouse. *Genesis (United States)*. 2007;45(9):593-605. doi:10.1002/DVG.20335
208. Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, et al. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature Neuroscience* 2009 13:1. 2009;13(1):133-140. doi:10.1038/nn.2467
209. Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, et al. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci*. 2010;13(1):133-140. doi:10.1038/NN.2467
210. Sierra R, Gómez Bustillo S, Kameneva P, et al. Contribution of neural crest and GLAST+ Wnt1+ bone marrow pericytes with liver fibrogenesis and/or regeneration. *Liver Int*. 2020;40(4):977-987. doi:10.1111/LIV.14401

Suplementarias

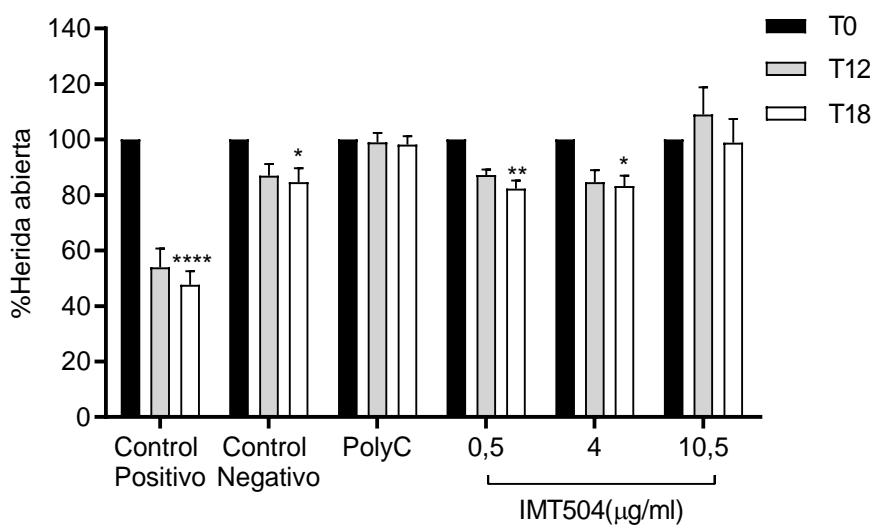


Figura 41 Efecto del ODN PolyC en la capacidad migratoria de MSCs. Ensayo HERIDA UFC MSC NOD diabéticos