

patients were classified as normal (N) or abnormal (A) based on IMT values below or over 0.8 mm respectively. Blood samples were collected and separated into plasma and PBMCs.

**Results:** The subjects with abnormal IMT showed higher levels of circulating oxidated DNA and lower mtDNA content in PBMCs than normal IMT subjects suggesting increased mitochondrial dysfunction in these subjects. Consistently, targeted gene expression analysis of PBMCs further showed that subjects with abnormal IMT had significantly lower expression levels of SOD2 a mitochondrial antioxidant than normal IMT subjects, indicative of poor mitochondrial antioxidant control. Nevertheless, systemic antioxidant capacity was not reduced in abnormal IMT subjects as indicated by the evaluation of total antioxidant capacity in plasma samples. These alterations were associated with a significantly increased ND4/ND1 mitochondrial-gene ratio in abnormal IMT subjects detectable in plasma samples, suggesting increased mtDNA instability in these subjects. Furthermore, gene expression correlation analysis of PBMCs samples showed that the adjusted linear regression of PDK4, fatty acid oxidation biomarker, with PRDX3, a mitochondrial oxidative stress biomarker, was significantly altered in abnormal IMT subjects, that displayed higher PRDX3 levels for an any given PDK4 value than normal IMT subjects, further indicating the presence of enhanced mitochondrial oxidative stress in abnormal IMT subjects. Importantly, the evaluation of inflammatory markers showed that the expression levels of the anti-inflammatory cytokine IL-4 were significantly lower in PBMCs of abnormal IMT subjects and the correlation analysis with PDK3 showed a similar pattern to that observed with PDK4, suggesting that enhanced mitochondrial oxidative stress may be related to the lower IL-4 levels observed in abnormal IMT subjects.

**Conclusions:** IMT is associated with increased signs of mitochondrial dysfunction, oxidative stress and mtDNA damage that may be related with an altered inflammatory profile that could be relevant in CVD development in T2D subjects despite of the preservation of a good control of glucose levels.

## CO-002. MODULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA AUTOINMUNIDAD EN DIABETES TIPO 1: MIR-30D-5P PROMUEVE LA INMUNORREGULACIÓN EN LINFOCITOS T Y LA REGENERACIÓN DE CÉLULAS BETA

D. Klein<sup>b</sup>, L. Gómez Muñoz<sup>a</sup>, D. Perna Barrull<sup>a</sup>, M. Doke<sup>b</sup>, J. Domínguez Bendala<sup>b</sup>, R. Pastori<sup>b</sup> y M. Vives Pi<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Investigación Germans Trias i Pujol, Badalona, España. <sup>b</sup>Diabetes Research Institute, Miami, EE. UU.

La diabetes tipo 1 (DT1) es una enfermedad autoinmunitaria compleja. Tras iniciar el tratamiento con insulina, la mayoría de los pacientes pediátricos experimentan un periodo de remisión parcial (RP), conocido como «luna de miel». Durante esta fase, las células  $\beta$  pancreáticas recuperan parcialmente su función, reduciendo la necesidad de insulina exógena y mejorando el control glucémico. Los mecanismos implicados podrían incluir menor estrés celular, regeneración de células  $\beta$ , regulación inmunitaria y mayor sensibilidad a la insulina. Previamente, en pacientes pediátricos, identificamos una firma de microARNs en plasma específica de la RP, en la que miR-30d-5p mostró la mayor concentración en comparación con los pacientes recién diagnosticados o sin RP. Además, la administración del inhibidor del miR-30d-5p en el ratón NOD (modelo experimental de DT1) mostró tendencia a aumentar el grado de insulinitis. Con el fin de determinar los mecanismos subyacentes a esta modulación, nuestro objetivo fue determinar el papel de miR-30d-5p en la inmunorregulación de los linfocitos T y la regeneración y recuperación funcional de las células  $\beta$  *ex vivo*. Para ello, electroporamos linfocitos T de controles o pacientes pediátricos previamente aislados y activados con un inhibidor del hsa-miR-30d-5p (oligonucleótido

antisentido) o una sonda irrelevante como control negativo. La inhibición de miR-30d-5p demostró que es esencial para la expresión de diversas moléculas inhibitoras incluyendo PD-1, CTLA-4, CD200, TIM-3 y LAG-3, así como para la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T tanto de pacientes con DT1 como de controles. Estos datos apoyan el potencial inmunorregulador de miR-30d-5p para frenar la autoinmunidad. Además, llevamos a cabo estudios de trazado de linaje en *slices* (rodajas) pancreáticas humanas (HPs) utilizando un adenovirus específico de linaje que expresa Cre (Ad-Cre) bajo el promotor de insulina. En esta prueba de concepto, la transfección de miR-30d-5p mimic en las HPs demostró su capacidad de estimular la formación de nuevas células  $\beta$  que expresan insulina. Los experimentos preliminares de perfusión dinámica también revelaron que la expresión del miRNA podría ser necesaria para la secreción de insulina, según se determinó mediante el análisis del péptido C. Por último, mediante la secuenciación del ARN (bulk RNA-seq) comprobamos que el miR-30d-5p puede regular genes relacionados tanto con la función como con la regeneración de las células  $\beta$  humanas. De hecho, la inhibición del miR-30d-5p en las HPs se relaciona con una menor expresión de *BMPR1B*, señalización a través del cual es clave para la expresión de genes específicos de célula  $\beta$  en progenitores pancreáticos. En conclusión, hemos descrito por primera vez el efecto del miR-30d-5p en la inmunorregulación y en la función y regeneración de las células  $\beta$  humanas, lo que puede abrir nuevas vías para estrategias terapéuticas dirigidas a mejorar la preservación de las células  $\beta$ .

## CO-003. EL LNCRNA ASOCIADO A DIABETES TIPO 1 LINCOS-LG REGULA LA APOPTOSIS DE LA CÉLULA BETA PANCREÁTICA

L. Bergara Muguza<sup>a,b</sup>, J. Mentxaka Salgado<sup>a,b</sup>, A. Castellanos Rubio<sup>a,b,c,d</sup> e I. Santín Gómez<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Universidad del País Vasco, Leioa, España. <sup>b</sup>Instituto de Investigación Sanitaria Biobizkaia, Barakaldo, España. <sup>c</sup>CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Madrid, España. <sup>d</sup>Ikerbasque Basque Foundation for Science, Bilbao, España.

**Introducción y objetivos:** La diabetes tipo 1 (DM1) es una enfermedad autoinmune compleja que se desarrolla en individuos genéticamente susceptibles tras la exposición a factores ambientales, como infecciones virales. Varias variantes genéticas asociadas a la susceptibilidad a la T1D se encuentran en regiones no codificantes del genoma humano, incluyendo ARN largos no codificantes (lncRNAs). Una de estas, el ARN largo no codificante del ligando coestimulador inducible de linfocitos T (lncICOS-LG), presenta un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) (rs6518350) asociado a la DM1. El objetivo de este estudio es caracterizar la función de lncICOS-LG en las células  $\beta$  pancreáticas, en el contexto de la inflamación y las infecciones virales, y desvelar su posible papel en la patogénesis de la T1D.

**Material y métodos:** Se realizó un RNAseq en células EndoC- $\beta$ H1 que expresaban el lncRNA con el alelo de riesgo o de protección para DM1 para identificar rutas regulados por el lncRNA. Se realizaron estudios funcionales *in vitro* basados en la sobreexpresión y disrupción del lncRNA para caracterizar la función del mismo.

**Resultados:** El lncRNA lncICOS-LG se expresa ampliamente en varios tejidos humanos, incluidas las células de los islotes pancreáticos y las células  $\beta$ . Su expresión aumenta en las células  $\beta$  pancreáticas humanas en respuesta al ácido poliinosínico-policitidílico (PIC), un análogo sintético de ARN de doble cadena que simula infecciones virales. Además, encontramos que su expresión es mayor en las fracciones celulares citoplásmicas tras la exposición intracelular al PIC. En el contexto de la inflamación, la expresión

de lncCOS-LG también aumenta tras la adición de citoquinas proinflamatorias. Los datos de RNAseq revelaron varios genes diferencialmente expresados en base al genotipo del SNP asociado a DM1, incluidos genes relacionados con la apoptosis y el estrés del retículo endoplásmico. En este sentido, la sobreexpresión de la forma protectora de lncCOS-LG disminuía la expresión inducida por PIC de ATF3, un factor de transcripción proapoptótico en células  $\beta$ . En la misma línea, la sobreexpresión de la forma protectora de lncCOS-LG protege a las células  $\beta$  de la apoptosis inducida por PIC. Se ha observado que el lncRNA interacciona con ATF3 en situación basal, pero que esta interacción desaparece en presencia de una infección viral.

**Conclusiones:** En conjunto, nuestros resultados indican una función previamente desconocida de lncCOS-LG, sugiriendo su papel en la regulación de la apoptosis de la célula  $\beta$  pancreática.

#### CO-004. LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES COMO MEDIADORAS DEL INTERACTOMA HÍGADO-PÁNCREAS EN LA ENFERMEDAD HEPÁTICA ESTEATÓSICA ASOCIADA A DISFUNCIÓN METABÓLICA Y SU CONEXIÓN CON LA DIABETES TIPO 2

A.M. Martínez Valverde<sup>a,b</sup>, C. Fernández-Hernández<sup>c</sup>, M. Nacher García<sup>b,d</sup>, A. García Fernández<sup>c</sup>, E. Montanya Mías<sup>b,e</sup>, R. Ayer de la Fuente<sup>f</sup> e I. García Martínez<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Investigaciones Biomedicas Sols-Morreale (CSIC), Madrid, España. <sup>b</sup>CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (ISCIII), Madrid, España. <sup>c</sup>Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU, Madrid, España. <sup>d</sup>Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, España. <sup>e</sup>Facultat de Medicina i Ciències de la Salut Universitat de Barcelona, España. <sup>f</sup>Departamento de Medicina, Dermatología y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid, España.

**Objetivos:** La esteatosis pancreática (EP) es frecuente en la enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica (MASLD) y puede deteriorar la función de las células beta, contribuyendo al desarrollo de diabetes tipo 2 (DT2). La EP puede progresar a inflamación y fibrosis con activación de las células estrelladas pancreáticas (PSC). Las vesículas extracelulares (sEV) desencadenan múltiples respuestas en las células diana, pero se desconoce si las sEV liberadas por los hepatocitos durante la MASLD activan las PSC y/o alteran la funcionalidad de los islotes pancreáticos. Nuestro objetivo es investigar el papel de las sEV en la activación de las PSC y en la función de las células beta pancreáticas durante la progresión de la MASLD.

**Material y métodos:** Ratones macho C57BL6 se alimentaron con dieta estándar (CHD) o dieta que induce MASLD (CDAHFD) durante tres o nueve semanas. Se analizó su perfil metabólico y las características del hígado y páncreas. Se aislaron sEV circulantes de ambos tipos de ratones (sEV<sup>CHD</sup> y sEV<sup>CDAHFD</sup>), se caracterizaron y se estudió su internalización por las PSC e islotes pancreáticos. Se evaluó la activación de las PSC y la secreción de insulina por los islotes. Se inyectaron ratones con una dosis única de ambos tipos de sEV para analizar sus efectos en hígado y páncreas. Además, se aislaron y caracterizaron sEV circulantes de individuos sanos (sEV<sup>C</sup>) y con MASLD (sEV<sup>MASLD</sup>) para evaluar sus efectos en las PSC e islotes humanos.

**Resultados:** Los ratones con MASLD presentaron daño hepático y esteatosis pancreática con infiltración de macrófagos y activación de las PSC en los islotes. Además, presentaron aumento de sEV en plasma y menores niveles de insulina, así como una disminución de la secreción de insulina por los islotes pancreáticos. Experimentos en cultivo mostraron la internalización de las sEV por las PSC, pero

únicamente las lipotóxicas (sEV<sup>CDAHFD</sup>) inducían su activación y la expresión de interleuquina 1beta (IL1beta). Asimismo, las sEV fueron internalizadas por islotes pancreáticos y las sEV<sup>CDAHFD</sup> disminuyeron la secreción de insulina. Estudios *in vivo* en ratones inyectados con sEV mostraron su internalización por macrófagos del hígado y páncreas. Ratones inyectados con sEV<sup>CDAHFD</sup> mostraron una infiltración de monocitos y neutrófilos en ambos tejidos y en los islotes se encontró infiltración de macrófagos y activación de PSC. El plasma de personas con MASLD presentaba mayores niveles de sEV (sEV<sup>MASLD</sup>) en comparación con los controles. *In vitro*, las sEV<sup>MASLD</sup> activaron las PSC, aumentaron la IL1beta y fueron internalizadas por islotes pancreáticos humanos.

**Conclusiones:** En este trabajo hemos evidenciado el impacto negativo de las sEV hepáticas liberadas durante la MASLD en la activación de las PSC y en el deterioro de la función de las células beta, lo que evidencia su papel en la conexión entre MASLD y DT2.

#### CO-005. EL CONTROL GLUCÉMICO EN PACIENTES CON DIABETES TIPO 2 COMPROMETE EL CONSUMO DE OXÍGENO, LOS NIVELES DE LOS COMPLEJOS OXPHOS Y LA INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO

J. Cacace<sup>a</sup>, C. Luna-Marco<sup>b</sup>, A. Hermo-Argibay<sup>a</sup>, O.A. Hernández-López<sup>a</sup>, M. Rocha<sup>a,c</sup>, S. Rovira-Llopis<sup>a,b</sup> y V.M. Víctor<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitario Peset, Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica en la Comunidad Valenciana (FISABIO), Valencia, España. <sup>b</sup>Departamento de Fisiología, Universitat de València, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España. <sup>c</sup>CIBERehd, Departamento Farmacología, Universitat de València, España.

**Introducción:** La diabetes tipo 2 (DM2) se ha asociado a un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y disfunción mitocondrial. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) desempeñan un papel clave en la inflamación asociada a esta enfermedad.

**Objetivos:** Evaluar si el control glucémico en la DM2 tiene un impacto en el consumo de oxígeno (OCR) de las PBMC, los complejos OXPHOS y el fenotipo inflamatorio estimado a través de la interacción leucocito-endotelio.

**Material y métodos:** Reclutamos 79 controles sanos, 64 pacientes con DM2 y buen control glucémico ( $HbA_{1c} < 7\%$ ) y 38 sujetos con DM2 con mal control glucémico ( $HbA_{1c} > 7\%$ ). Aislamos PBMCs para realizar técnicas de SeaHorse, *western blot* y neutrófilos para la interacción leucocito-endotelio *ex vivo* mediante un sistema de adhesión dinámica.

**Resultados:** Observamos una disminución significativa en la OCR basal de las PBMC en pacientes  $HbA_{1c} > 7\%$  en comparación con los controles ( $p < 0,05$ ). Además, la OCR máxima y la capacidad respiratoria de reserva disminuyeron en pacientes  $HbA_{1c} > 7\%$  en comparación con los controles y en comparación con pacientes  $HbA_{1c} < 7\%$  ( $p < 0,05$  para todos). Se observó una mayor producción de ROS mitocondriales en PBMC de pacientes DM2 ( $HbA_{1c} < 7\% = p < 0,05$ ;  $HbA_{1c} > 7\% = p < 0,001$ ) que en los sujetos control, aumentando aún más en pacientes  $HbA_{1c} > 7\%$  ( $p < 0,001$ ). El complejo III y V de la cadena de transporte de electrones disminuyó en pacientes  $HbA_{1c} > 7\%$  frente a controles ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ , respectivamente). Las interacciones leucocito-endotelio aumentaron en la DM2 y se exacerbaban aún más en aquellos pacientes  $HbA_{1c} > 7\%$  ( $p < 0,001$  en todos). Se encontraron correlaciones negativas significativas entre los niveles de  $HbA_{1c}$  y la respiración basal ( $r = -0,319$ ,  $p < 0,05$ ), la respiración máxima ( $r = -0,350$ ,  $p < 0,01$ ) y la capacidad respiratoria de reserva ( $r = 0,295$ ,  $p < 0,05$ ) de las PBMC.