

10. Terapia celular en la *Diabetes mellitus*

BERNAT SORIA ESCOMS

RESUMEN

La *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) es una enfermedad crónica que se caracteriza por una deficiencia en la masa de células β , que trae consigo un fallo en la homeostasis de la glucosa. Ambas circunstancias dan lugar a una variedad de complicaciones severas y a un acortamiento en la expectativa de vida. La normalización de la homeostasis de la glucosa puede conseguirse mediante trasplante del páncreas o de los islotes, pero la escasez de donantes ha propiciado gran interés por el estudio de fuentes alternativas de células β , lo cual ha estimulado la investigación de las células madre apropiadas. Por tanto, la diabetes representa una candidata atractiva para la terapia celular. Tanto las células madre embrionarias como las adultas han sido utilizadas para generar sustitutos celulares, que podrían potencialmente restaurar el funcionamiento de las células β . Diversos estudios han descrito la generación de células secretoras de insulina procedentes de células madre embrionarias y adultas, que normalizaron los valores de glucosa sanguínea cuando se trasplantaron a modelos de animales diabéticos. Debido a la complejidad de las células β , las células productoras de insulina generadas a partir de las células madre no poseen todos los atributos de las células β . Esto indica la necesidad de desarrollar métodos para la diferenciación y selección de células β con funcionalidad completa. Mientras se superan estos problemas, los pacientes diabéticos pueden beneficiarse de estrategias terapéuticas basadas en terapias autólogas con células madre, dirigidas a las complicaciones diabéticas tardías. En este artículo se discuten los pro-

gresos recientes en la generación de células productoras de insulina a partir de células madre adultas y embrionarias, unidos a los desafíos para el futuro uso clínico de la terapia con células madre.

ABSTRACT

Diabetes mellitus type 1 (DM1) is a chronic disease characterized by a deficit in β -cell mass and a failure of glucose homeostasis. Both circumstances result in a variety of severe complications and an overall shortened life expectancy. Glucose homeostasis can be achieved through pancreas and islet transplantation, but shortage of donor organs has prompted an intensive search for alternative sources of β cells. This achievement has stimulated the search for appropriate stem cell sources. Both embryonic and adult stem cells have been used to generate surrogate β cells to potentially restore β cell function. In this regard, several studies have reported the generation of insulin-secreting cells from embryonic and adult stem cells that normalized blood glucose values when transplanted into diabetic animal models. Due to β -cell complexity, insulin-producing cells generated from stem cells do not possess all β -cell attributes. This indicates the need for further development of methods for differentiation and selection of completely functional β cells. While these problems are overcome, diabetic patients may benefit from therapeutic strategies based on autologous stem cell therapies addressing late diabetic complications. In this article, we discuss the recent progress in the generation of insulin-producing cells from embryonic and adult stem cells, together with the challenges for the clinical use of diabetes stem cell therapy.

1. INTRODUCCIÓN

Las células β son un tipo de células del páncreas que se encuentran en los llamados «islotos de Langerhans» y se encargan de sintetizar la insulina, una hormona que una vez liberada en el torrente circulatorio, controla los niveles de glucosa en la sangre (Figura 1). El proceso de generación de la insulina se realiza en diferentes etapas: primero se sintetiza la proinsulina, precursora de la insulina, que después se hidro-

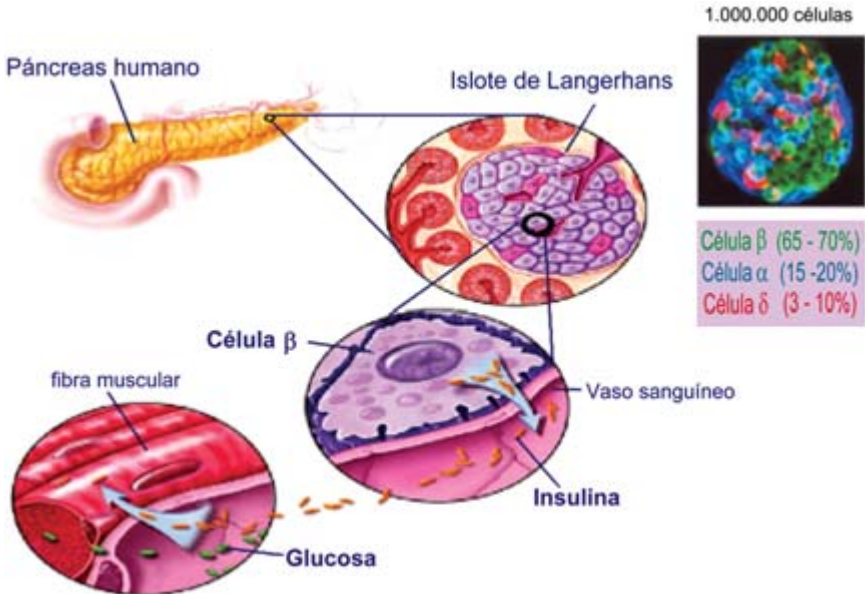


FIGURA 1. Los islotes de Langerhans, ubicados en el páncreas, son microórganos que contienen células β , células α y células δ . Las células β son las que sintetizan insulina y la liberan al torrente circulatorio y (en la figura) llegan al músculo. Las células α fabrican glucagón y las células δ fabrican somatostatina. A la derecha se muestra un islote. El número de islotes en el páncreas se cifra en 1.000.000.

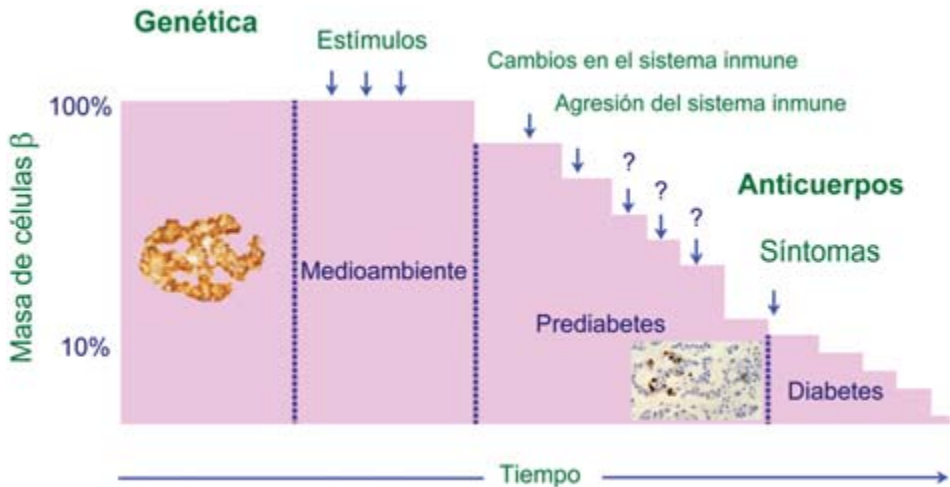


FIGURA 2. Causas que provocan la disminución cronológica de la masa de células β en las distintas etapas del desarrollo de la diabetes mellitus.

liza a insulina mediante la sustracción del péptido C: proinsulina → insulina + péptido C. Las células β son las primeras que desaparecen en los pacientes que padecen la diabetes del tipo 1, una vez que el propio sistema inmunitario del cuerpo las ha destruido por un proceso autoinmune. En la diabetes de tipo 2, la insulina que producen las células β del páncreas actúa incorrectamente, ya que suele desarrollarse una resistencia a su acción.

2. TERAPIA CELULAR PARA LA *DIABETES MELLITUS*

Al considerar que ni la predicción ni la prevención sirven para evitar la aparición de la DM1, la sustitución de las células β por islotes procedentes de cadáveres es la única terapia disponible que permite el control de la glucosa sanguínea sin recurrir a la terapia exógena con insulina (Figura 3). El alotrasplante de islotes pancreáticos se ha demostrado que es capaz de normalizar los niveles de glucosa sanguínea y de bloquear el progreso de las complicaciones que van asociadas a esta enfermedad. Por tanto, es el trasplante de islotes pancreáticos procedentes de donantes lo que ha establecido la terapia celular en la *diabetes*



FIGURA 3. Con los conocimientos actuales, ni la predicción ni la prevención sirven para evitar la aparición de la diabetes mellitus tipo 1, la sustitución de las células β por islotes procedentes de cadáveres es la única terapia disponible que permite el control de la glucosa sanguínea sin recurrir a la inyección de insulina.

mellitus. En un número pequeño de casos, en los cuales los islotes pancreáticos fueron de origen autólogo, por ejemplo, islotes aislados después de la eliminación del páncreas del propio paciente, fue suficiente el trasplante de 300.000 islotes para lograr que el enfermo se independizara de la insulina. Sin embargo, en los casos de trasplante de islotes heterólogos la cantidad necesitada fue de unos 600.000 islotes o incluso más. Esto supone necesitar un número de islotes mucho mayor cuando se trata de trasplantes heterólogos, que son los más comunes. Los protocolos se basan en trasplantar islotes preparados frescos (10.000 islotes/kg), en dos o más veces, implantándolos en el área del hígado y utilizando un protocolo inmunosupresor libre de esteroides (tacrolimus, sirolimus, dacliumulab) (1,2).

El progreso del trasplante de islotes depende de conseguir métodos eficientes y prácticos de obtención de los mismos, para poder suministrar las cantidades necesarias y suficientes de las células de los islotes. En los avances conseguidos en el desarrollo de la terapia de los trasplantes de islotes pueden identificarse dos etapas: la primera, es la relativa a la investigación experimental en animales y humanos, que se centra en los procedimientos de aislamiento de los islotes en especies diferentes, pues ya se había comprobado que los islotes trasplantados tenían capacidad de revertir la enfermedad. La segunda etapa es la del protocolo de Edmonton, enfocado en la estandarización de los métodos de aislamiento e introducción de nuevos fármacos inmunosupresores para mantener el trasplante. Aunque los resultados del protocolo de Edmonton llegaron a conseguir en los pacientes diabéticos casi un 100% de independencia de la insulina después de 12 meses, posteriormente se demostró una disminución al 50% a los 3 años y al 15% a los 5 años (3,4). Es decir, que la sustitución celular (terapia celular) permite temporalmente el control de la glucosa. Sin embargo, en estas dos etapas se concluyó que el trasplante de islotes, a pesar de sus efectos positivos en revertir la enfermedad y la dependencia de la insulina, presentaba dos defectos importantes: primero, la necesidad de inmunosupresión indefinidamente y, segundo, la escasez de islotes humanos, lo cual hacía necesario buscar una fuente alternativa de islotes para superar esta escasez. Por ejemplo, en España, donde el número de donantes de órganos es el mayor en el mundo (40-50 donantes /millón/año) y con una prevalencia de diabetes no muy elevada, la producción de islotes procedentes de cadáveres nunca será suficiente para cubrir las necesidades (1).

Tanto la necesidad de inmunosupresión, como la insuficiente cantidad de tejido necesario para cubrir la demanda de una enfermedad con una elevada prevalencia, nos ha llevado a investigar fuentes alternativas, lo que significa la búsqueda de estrategias para fabricar células secretoras de insulina a partir de células madre. Con todas estas expectativas, hasta la fecha no se ha conseguido, sin embargo, un procedimiento que cure la *diabetes mellitus* tipo 1.

TABLA 1. *Estrategias para mantener y/o recuperar la masa de células β (1)*

PREDICCIÓN

Genética

Factores ambientales

Anticuerpos

PREVENCIÓN

Vacunación

Anti-CD3

TERAPIA CELULAR

Trasplantes de islotes

Terapia con células madre

REGENERACIÓN DEL PÁNCREAS

3. LAS CÉLULAS β SE UBICAN EN UN MICROÓRGANO COMPLEJO DENOMINADO EL ISLOTE PANCREÁTICO

Como cualquier célula del organismo, las células β son únicas. Las células β pancreáticas están diseñadas para sintetizar, procesar y liberar insulina. La liberación de insulina inducida por nutrientes es un proceso muy preciso mediante el cual la célula β percibe la concentración de la glucosa en la sangre y libera la cantidad exacta de insulina necesaria para normalizar la concentración sanguínea de glucosa. Las respuestas de las células β integran diferentes mecanismos intracelulares. La ma-

quinaria exocitótica de estas células es similar a la de otras células secretoras (5-7, 8), pero responde a un ensamblaje integrado de señales, tales como movimientos de calcio (5, 9-10), mensajeros inducidos por el metabolismo de la glucosa (11) y cambios nucleares (12), unidos a mensajes extracelulares (13). Además, la modulación de conductos *gap-junction* (14,15) entre las células β significa que durante la activación por nutrientes, los grupos de células β , no solo llegan a ser isopotenciales, sino que también entran en oscilaciones sincronas de Ca^{2+} (6- 10). Esto constituye la base estructural y fisiológica de la secreción pulsátil de la insulina (Figura 4). Al contrario que otras células endocrinas, la insulina se libera mediante un proceso momento-a-momento en el cual las señales intra y extracelulares crean una respuesta suave de tipo sigmoideo, que mantiene la glucosa sanguínea en concentraciones alrededor de 5 mM. Las respuestas integradoras de las células β y no β son incorporadas por la arquitectura funcional de los islotes pancreáticos. Los islotes pancreáticos son unos microórganos profusamente vascularizados e inervados en los cuales se encuentran cuatro tipos celulares (α , β , δ y células PP). Al contrario que las células tipo no- β , la población

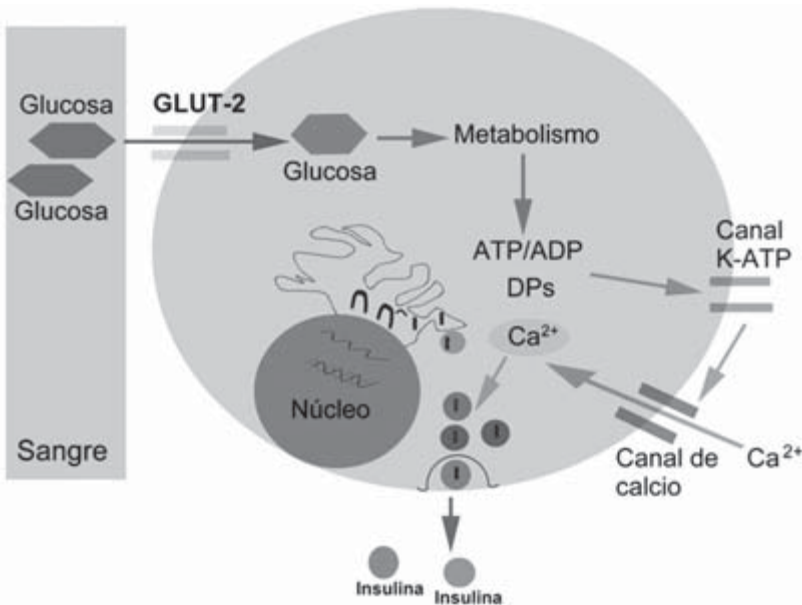


FIGURA 4. *Acoplamiento estímulo-secreción en la célula β pancreática. (1)*

de las células β se organiza a sí misma en un sincitio funcional. Desde un punto de vista funcional, los agregados de células en el islote responden de una manera apropiada, mientras que las células β en solitario no lo hacen. Merece la pena intentar conseguir agregados de células tipo β o incluso una mezcla equilibrada de células β y no- β para formar los sustitutos de los islotes.

4. CÉLULAS SECRETORAS DE INSULINA PROCEDENTES DE CÉLULAS MADRE.

Las células madre se caracterizan por dos propiedades básicas: autorrenovación y capacidad de diferenciarse en otros tipos celulares. Potencialmente, estas células tienen la capacidad de colonizar y repoblar los tejidos. La diferenciación *in vitro* ha demostrado que las células madre pluripotentes de diferente origen pueden ser inducidas a generar células insulina-positivas (16,19,21-23). Sin embargo, no es posible obtener células que puedan reemplazar de manera eficiente los islotes en pacientes con diabetes tipo 1. De acuerdo con la literatura, las células insulina-positivas pueden obtenerse de las células madre embrionarias (ESC), partiendo de progenitores intrapancreáticos o de células procedentes de las tres hojas embrionarias (Tabla 2). Desafortunadamente, en términos prácticos, los resultados obtenidos por algunos grupos de investigadores parece que son difíciles de reproducir, y no dan lugar a una célula totalmente diferenciada que pueda ser utilizada en terapia celular. Además, la existencia de progenitores pancreáticos ha sido cuestionada. El mantenimiento de la masa de células β en el adulto sano se sostiene mediante un reservorio de células diferenciadas que poseen una capacidad de replicación lenta (17,18). El medio de promover la diferenciación *in vitro*, se basa en la combinación de varias técnicas, por ejemplo, la expresión de un gen maestro tal como Pax4 (19) dirige la expresión de un gran grupo de genes y determina la aparición de tipos celulares diferenciados y estructuras más complejas; el uso de factores de crecimiento y otros factores que modulan la expresión génica (16,21-23); y técnicas de cultivo por las cuales algunos progenitores crecen mejor que otros. Después de la publicación pionera de nuestro grupo en el año 2000 (16), más de 90% de las publicaciones han descrito datos originales que sugieren que las células productoras de insulina pueden derivar

de las ESC (38 publicaciones, la mayoría de ella utilizan ESC de ratón). También se ha descrito la obtención de células productoras de insulina a partir de progenitores intrapancreáticos (19 publicaciones), a otras células derivadas del endodermo, tales como el hígado (11) o el intestino (3). Además, pueden ser utilizados los tejidos derivados del mesodermo, tales como la médula ósea (10), cordón umbilical (3), sangre periférica (1) o células madre mesenquimales (5). También, pueden ser utilizadas células derivadas del endodermo (2 publicaciones) (Tabla 2) (1).

TABLA 2. *Fuentes de células madre y progenitoras para obtener células productoras de insulina*

	<i>Número de Manuscritos</i>
De ESC	38
ESC de ratón	29
ESC de humanos	9
De células madre adultas y progenitores	54
(i) Progenitores intrapancreáticos	19
(1) Tejido exocrino	
(2) Células ductales	
(3) Progenitores intra-islotos	
(ii) De tejidos extra-pancreáticos derivados del endodermo	
(1) Hígado	11
(2) Intestino	3
(iii) De tejidos derivados del mesodermo	
(1) Médula ósea	10
(2) Cordón umbilical	3
(3) Sangre periférica	1
(4) Células madre mesenquimales	5
(iv) De tejidos derivados del ectodermo	2

(Lista completa en <http://www.cabimer.es/es/docs/tcymr/prcldm.htm>) (1).

5. CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA PROCEDENTES DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS (ESC)

Las ESC pueden ser inducidas para diferenciarse en diferentes linajes por medio de protocolos específicos para diferenciación. Se considera que las células β pancreáticas se desarrollan a partir del endodermo primigenio del intestino superior. Una *orquesta* integrada de señales

intra- y extracelulares crea las pautas del desarrollo y conduce las ESC pluripotenciales a formar endodermo pancreático definitivo. Nuestro grupo ha descrito que la formación de agregados flotantes o cuerpos embrioides, junto con la nicotinamida, conduce a las ESC a convertirse en células productoras de insulina (16, 24). Los protocolos dirigidos a la diferenciación se basaron en la identificación de señales extracelulares (tales como activina, butirato sódico, *sonic hedgehog*, factor de crecimiento de fibroblastos básico, nogina, glucosa y péptido tipo glucagón) e intracelulares (Pax4), que instruyen a las células madre a través de esta vía (19). Alguno de estos protocolos se han aplicado recientemente a las ESC humanas (24-26), y se han obtenido células que contienen insulina y péptido C. Las células que expresan insulina, obtenidas por el protocolo de D'Amour *et al.* (24) poseen buen contenido de insulina, pero la liberación de insulina no se detecta en respuesta a la glucosa. Los grupos de células tipo islotes obtenidos por el protocolo de Jiang *et al.* (25), muestran un elevado grado de diferenciación, liberan el péptido C y presentan respuesta a la glucosa. Estos dos protocolos necesitan ser comprobados *in vivo*. La variabilidad de los resultados obtenidos hasta la fecha sugiere que no tenemos aún la «receta» para crear una célula β madura procedente de una célula madre y que el proceso tiene que ser perfeccionado para que sea lo suficientemente eficiente para generar la biomasa de células β necesaria, que se estima en 10^9 células con propiedades de células β .

La Figura 5 muestra las dos rutas seguidas por las ESC a través de vías endo y ectodérmicas. En la vía endodérmica las células adquieren progresivamente los marcadores del endodermo definitivo, del endodermo pancreático y de las células de los islotes (16, 20, 27, 28). La vía ectodérmica se basa en la expansión de los progenitores positivos para nestina.

Las ESC de ratón representan un buen modelo para analizar cuál es la ruta seguida. Los ratones poseen dos insulinas diferentes: la insulina I presente solo en las células del islote, y la insulina II presente en los islotes y en los tejidos neurales. El uso de protocolos para expandir los progenitores nestina (29), han demostrado que las células que expresan insulina II, pero no insulina I, son también positivas para marcadores neurales, tales como GFAP, N-200, nestina y AChE. Por el contrario, la vía endodérmica puede acabar en células que producen insulina que

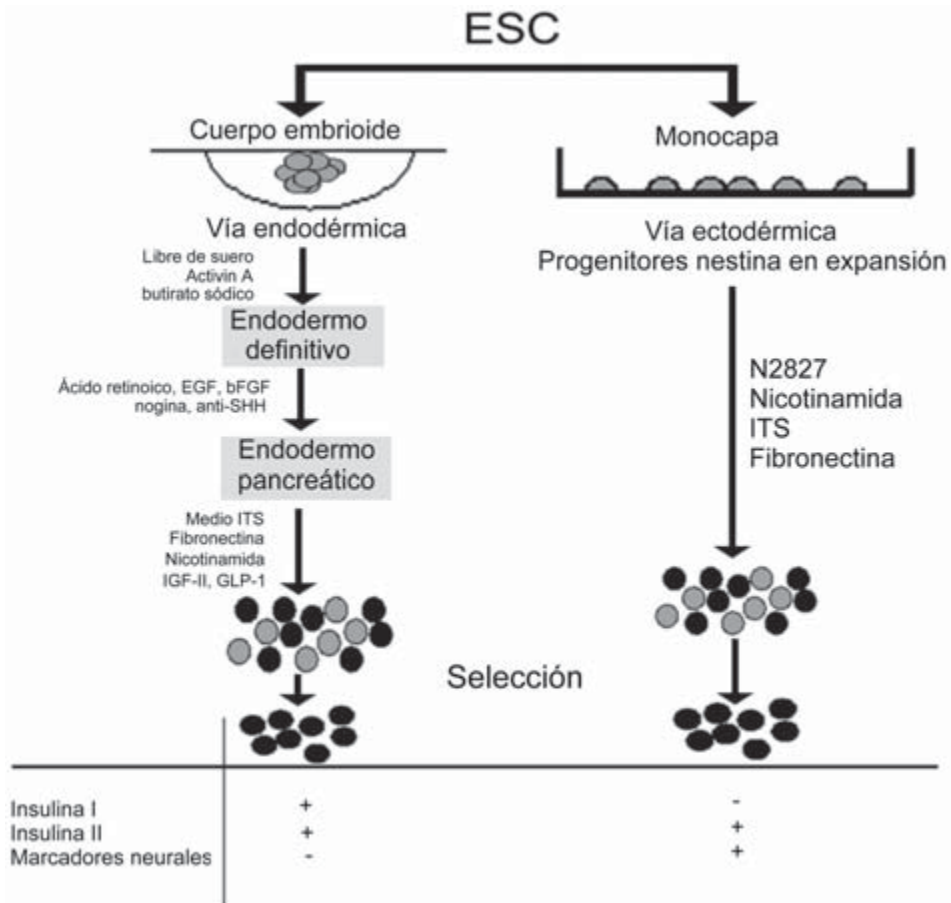


FIGURA 5. Diferenciación in vitro de las células productoras de insulina: vías endodérmica y ectodérmica; EGF, factor de crecimiento epidérmico; bFGF, factor de crecimiento de fibroblastos básico; IGF-II, factor insulina-like II, GLP-1, péptido similar al glucagón; ITS, medio insulina+transferrina+selenio, Anti-SSH, anti Sonic hedgehog (1, 29)

comparten muchas propiedades con células totalmente diferenciadas (16, 21, 22, 27).

Utilizando un sistema atrapador de células cuyo gen de la insulina esté activo, hemos sido capaces de obtener células productoras de insulina a partir de las ESC. Las células productoras de insulina corrigen la hiperglucemia cuando se trasplantan a modelos de animales diabéticos (16, 21, 22). Recientemente, hemos publicado un protocolo en el cual un factor soluble fetal presente en el rudimento pancreático, fue utilizado

para dirigir la diferenciación de las ESC hacia células productoras de insulina, las cuales fueron posteriormente seleccionadas con una construcción *promotor-bgeo/PGKhygro* de la insulina humana (21). Además, la expresión de algunos factores de transcripción implicados en el desarrollo de las células β puede promover la diferenciación de las células tipo β , por ejemplo, la expresión constitutiva de Pax4 (19). Se necesita optimizar los procedimientos de selección de la diferenciación y ello permitirá lograr mejores resultados.

6. SELECCIÓN DE ESTIRPES CELULARES

Un problema común a todos los procesos de diferenciación *in vitro* es que el resultado del proceso da lugar siempre a una mezcla del tipo celular deseado con otros tipos celulares, entre los que se incluyen las propias células indiferenciadas. No existe, hasta el momento, un procedimiento que genere el 100% de células diferenciadas (24). Las células no diferenciadas acarrearán un alto riesgo de formación de teratoma. Por tanto, se necesita conseguir una buena selección de métodos para poder obtener poblaciones celulares puras. La selección de los métodos puede basarse en procedimientos de crecimiento celular, en la inmunoseparación con anticuerpos específicos o en la expresión de un gen marcador (16, 21). Las células madre son transfectadas con un vector que contiene dos *cassettes* de selección; uno que controla la expresión de la resistencia a antibióticos, que permite la selección de las células transfectadas, y el otro un gen quimérico que contiene un promotor funcionalmente específico que conduce la expresión de un gen estructural el cual codifica la resistencia a antibióticos, permitiendo la selección de las células que expresan el gen seleccionado. Este método se ha demostrado que funciona con promotores de la insulina y Nkx 6.1 (16, 21-23).

7. CÉLULAS SECRETORAS DE INSULINA PROCEDENTES DE CÉLULAS MADRE ADULTAS

Parece ser que las células madre procedentes de tejidos adultos poseen una plasticidad mayor de lo esperado. Las células adultas multipotentes, células de la médula ósea, o células de tejido adiposo deri-

vadas del estroma mesenquimal, y otras, exhiben *in vitro*, la capacidad de ser transformadas en células con un fenotipo diferenciado. La transdiferenciación de células adultas en células productoras de insulina, también proporciona otra buena oportunidad para la expansión de las células β . Recientemente, nuestro grupo ha publicado un estudio en el que se describe la obtención de células β a partir de leucocitos mediante la reprogramación de monocitos sanguíneos en presencia del factor de crecimiento estimulador de colonias de macrófagos e interleuquina 3, incubados con factor de crecimiento epidérmico y nicotinamida. Estas células mostraron *in vitro* secreción de insulina dependiente de glucosa y fueron capaces de normalizar los niveles de glucosa plasmática en ratones diabéticos (30). Aunque estas estrategias son prometedoras, se necesitan estudios más profundos. Sin embargo, a pesar de la enorme cantidad de métodos para generar células productoras de insulina a partir de células madre, no se ha iniciado aún prueba clínica alguna en la cual se hayan utilizado células productoras de insulina obtenidas *in vitro*. ¿Por qué? Para ser utilizadas en pruebas clínicas, las células derivadas de las ESC tienen que ser muy cercanas a las células totalmente diferenciadas, para constituir una población homogénea, que pueda ser producida mediante prácticas de fabricación rutinaria. Es obvio que el acuciante desafío de fabricar un sustituto de células β clínicamente útil no se ha conseguido aún.

8. TERAPIA CELULAR DE LAS COMPLICACIONES DIABÉTICAS. ISQUEMIA CRÍTICA DE LOS MIEMBROS

Mientras esperamos que se resuelvan estos problemas ¿qué puede hacer la terapia celular por los pacientes? El ejemplo más inmediato sería la terapia celular para una de las complicaciones: la isquemia crítica de los miembros debida a la diabetes o el «pie diabético». La isquemia crítica de los miembros se ha definido como «isquemia crónica con dolor en reposo, úlceras o gangrena, que se atribuyen a enfermedad oclusiva probada objetivamente» (31-44). Como una manifestación severa de la aterosclerosis, los factores de riesgo de la isquemia crítica de los miembros incluyen principalmente el tabaco y la diabetes, pero también la hipercolesterolemia, la hipertensión y la predisposición genética. El pronóstico para los pacientes con isquemia

crítica de los miembros es bastante pobre. Después de que aparece la manifestación clínica, menos del 50% de los pacientes podrá evitar la muerte o la amputación antes de un año. La mortalidad es uno de los mayores problemas en esta población, con valores tan dramáticos como el 25% después de un año, 31,6% después de 2 años y el 60% después de 3 años. La amputación se asocia con una tasa elevada de mortalidad perioperativa: 5-10% cuando se llevó a cabo por debajo de la rodilla y 15-20% cuando fue por encima de la rodilla (33). La meta principal para el tratamiento de la isquemia crítica de los miembros es la revascularización, bien por cirugía o por angioplastia. Sin embargo, en una gran proporción de estos pacientes (estimada en un 20-30%), el alcance anatómico y la distribución de la enfermedad oclusiva arterial hace que los pacientes sean inapropiados para la cirugía o la angioplastia (34). El tratamiento farmacológico, como la opción única para los pacientes no apropiados para la revascularización, no se ha demostrado que afecte de manera favorable la historia clínica de la isquemia de los miembros (35, 36). A pesar de su morbilidad, mortalidad e implicaciones funcionales asociadas a la amputación, no queda más remedio que recomendarla a menudo como única solución a los síntomas de la isquemia crítica de los miembros (37). Por consiguiente, la necesidad de estrategias alternativas para el tratamiento de los pacientes con isquemia crítica de las extremidades es un desafío de acuciante necesidad. El objetivo del uso de células madre en el tratamiento de la isquemia crítica de los miembros es la estimulación de la neovascularización en el área de la isquemia severa. La angiogénesis terapéutica puede promover la formación de vasos colaterales en las áreas con severa isquemia. El potencial de la angiogénesis terapéutica procede del desarrollo de nuevos capilares (vasculogénesis) y del crecimiento de vasos colaterales preexistentes (angiogénesis) (38).

Se han descrito dos estrategias para promover la angiogénesis terapéutica: la terapia génica y la terapia con células madre (39). La terapia génica está diseñada para inducir la producción de factores de crecimiento en aquellos pacientes que debido a la avanzada edad, la diabetes o la hipercolesterolemia, son incapaces de regular de manera apropiada la expresión de citoquinas en respuesta a la isquemia tisular. Sin embargo, la terapia génica no ha estado libre de preocupaciones de seguridad, tales como la posibilidad de inducir crecimiento patológico de los vasos

(retinopatía, mayor neovascularización tumoral o mayor carga de las placas ateroscleróticas). Por otra parte, las terapias con células madre ensayadas hasta la fecha, consisten en la administración de células derivadas de la médula ósea o células mononucleares de la sangre periférica, esta última después de estimulación con factor estimulador del crecimiento de colonias de granulocitos. El tratamiento con células mononucleares derivadas de la médula ósea implica la administración de células progenitoras endoteliales (células CD34+, CD133+/VEGFR2+) combinadas con una fracción liberadora de citoquinas. Las células CD34 liberan factores de crecimiento angiogénicos (VEGF) y angiopoyetina-1. Las células mononucleares parecen actuar de manera sinérgica. Estos efectos combinados no solo permiten la obtención de nuevos vasos que suministren sangre a las áreas isquémicas, sino también la formación de vasos capilares muy estables (38, 40).

Desde 2003, se han realizado cinco ensayos clínicos que incluían pacientes diabéticos con isquemia crítica de miembros, para comprobar la eficacia y seguridad de la administración, generalmente por vía intramuscular. En tres de estos estudios las células madre fueron células mononucleares de la médula ósea y en los dos restantes, las células madre procedían de células mononucleares de sangre periférica. La administración fue por vía intramuscular en todos los casos. Los resultados positivos respecto a la eficacia y seguridad fueron concordantes en todos los estudios. La administración de células madre promovió un incremento del suministro de sangre a regiones diana afectados por la isquemia crítica de los miembros (41-45). Estos estudios preliminares sobre seguridad y posibilidad de ejecución no pueden proporcionar una respuesta clara acerca de la eficacia y seguridad a largo plazo de la angiogénesis terapéutica. Diversas preguntas permanecen sin respuesta, tales como ¿Qué candidatos han de ser considerados los mejores para la terapia celular? ¿Cuál es la mejor vía de administración de las células madre? ¿Será segura la respuesta a largo plazo de estos pacientes? En la actualidad, los estudios que se llevan a cabo con células madre para el tratamiento de la isquemia crítica se encuentran en fase preliminar. En los dos próximos años, más de 200 pacientes con isquemia crítica de miembros se incluirán en estos tratamientos y alguna de las cuestiones sin resolver hoy tendrán su respuesta. Un resumen de las pruebas con

terapia celular que se están llevando a cabo en este momento se muestra en la Tabla 3.

9. CONSIDERACIONES FINALES

La situación actual del trasplante de islotes pancreáticos puede resumirse como sigue:

Hay que considerar en primer lugar que cada paciente diabético necesita recibir unos 10.000 islotes/Kg de peso para tener una respuesta efectiva, es decir, para normalizar la glucemia permanentemente. Un adulto de 60 kg necesita un aporte de unos 600.000 islotes. Actualmente se extraen de cada páncreas de cadáver unos 300.000 islotes útiles, lo que significa que para cada paciente se necesitan, al menos, los islotes de dos donantes. Es un hecho demostrado que el trasplante de los islotes pancreáticos detiene la progresión de las complicaciones y esta es la principal ventaja de la terapia, por encima incluso de la independencia de la insulina.

TABLA 3. *Pruebas clínicas en curso usando células madre autólogas en enfermos con isquemia crítica de los miembros*

<i>Ensayos Clínicos</i>	<i>Incorporación pacientes</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Inyección</i>	<i>Población</i>	<i>Punto final primario</i>
UMC Utrecht, Holanda	2006-2009	BMMNC	intraarterial	55-55	amputación
Universidad Indiana, USA	2004-2007	BMMNC	intramuscular	20	MAE
Kobe, Japón	2003-2008	PBMNC, CD34+	intramuscular	15	amputación
Universidad de Napoles, Italia	2005-2006	BMMNC		20	ABI, úlcera
Universidad Northwestern, Chicago, USA	desde 2004	CMH		12	supervivencia
Universidad Goethe, Frankfurt, Alemania	2005-2007	BMMNC	intraarterial	20-20	ABI

BMMNC, células mononucleares de la médula ósea; PBMNC, células mononucleares de sangre periférica; MAE, eventos adversos principales a las 12 semanas; CMH, células madre hematopoyéticas, ABI, índice tobillo-poplíteo (1)

Evitar la dependencia de la insulina y la necesidad permanente de autocontrol al que están sometidos los diabéticos (análisis, horarios, restricción de comidas, etc.), es también importante y se vive por los pacientes como algo inalcanzable. Sin embargo, como anteriormente se

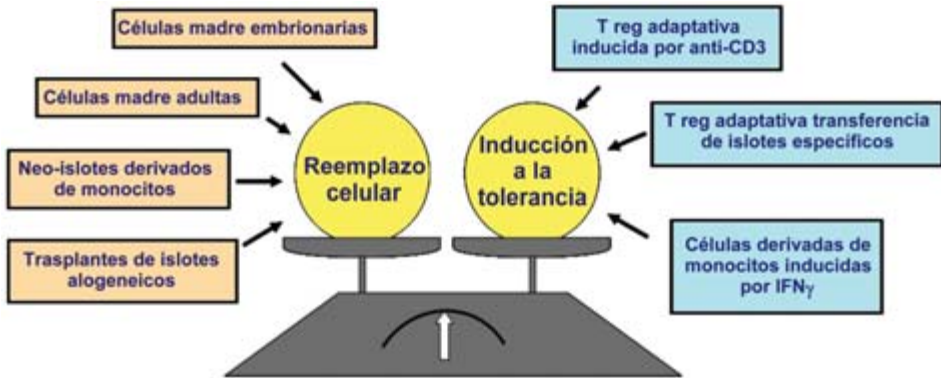


FIGURA 6. *Hacia la terapia celular en la diabetes mellitus. En la terapia celular hay que considerar dos aspectos, el reemplazo celular y la inducción a la tolerancia (45).*

comentó, pasados 5 años de los primeros trasplantes realizados con el protocolo de Edmonton, solo un 10% de los pacientes permaneció totalmente liberado de la insulina. Del resto de los pacientes trasplantados, el 80% siguió padeciendo la enfermedad, aunque de forma más estable gracias a que se mantiene alguna secreción de insulina, lo que mejora su calidad de vida y retrasa las complicaciones.

Los principales problemas del trasplante de islotes pancreáticos para su implantación masiva son dos: la insuficiencia de donantes y la necesidad de someterse a un tratamiento inmunosupresor de por vida. Esto hace que este tratamiento no puede ser aplicado a muchas personas (entre ellas los niños), hasta que no se resuelvan las reacciones de rechazo. Las siguientes consideraciones han de ser tenidas también en cuenta:

1. El trasplante de islotes pancreáticos es una terapia aún en desarrollo y, por tanto, no está incluida entre las prestaciones de la sanidad pública en España.
2. No hay ni puede haber suficientes donantes para efectuar todos los trasplantes de islotes pancreáticos que se requieren, dadas las actuales tasas de incidencia de la diabetes.
3. En el año 2000 nuestro grupo publicó una serie de experimentos en los que se implantaron en ratones diabéticos varios clones de células productoras de insulina obtenidas a partir de células madre embriona-

rias. Con ello conseguimos la normalización de la glucemia en todos los ratones en 24 horas. Aunque un 40% de los animales volvieron a padecer hiperglucemia, el 60% restante mantuvo glucemias normales durante las 42 semanas que duró el ensayo (un ratón vive unas 120 semanas).

4. Desde entonces se está intentando obtener células productoras de insulina a partir de células embrionarias humanas, pero también se están explorando otras posibilidades, como la de utilizar células madre adultas que hagan la función de las células β , tratando de *engañar* así al sistema inmune para evitar el rechazo.

5. Estamos intentando solventar los problemas de rechazo, pero también hay que perfeccionar los sistemas de obtención de islotes del cadáver donante, para conseguir alcanzar la relación 1 donante/ 1 receptor (Figura 6).

6. Aunque se ha publicado un caso de donación parcial de páncreas inter-vivos (ver www.sodicar.com), hoy no se considera viable esta técnica por condicionantes éticos y científicos.

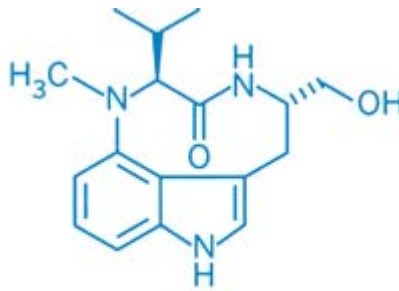
7. Mientras las terapias se perfeccionan y se resuelven los problemas planteados, es prioritario que el paciente con diabetes tome conciencia de su situación, y se cuide para llegar en las mejores condiciones físicas al momento en que el trasplante de islotes fuera el tratamiento establecido.

10. ÚLTIMAS APORTACIONES PUBLICADAS *ON LINE*

La revista *Nature Chemical Biology* acaba de publicar (marzo 2009) los experimentos de un grupo de científicos de la Universidad de Harvard (EE UU), liderados por Melton y Schreiber. Estos autores han descubierto un compuesto, el ILV (indolactam-V), que inoculado en el endodermo es capaz de crear un gran número de células con el gen Pdx1, necesario para la producción de insulina (46). Una vez generadas estas células, se implantaron a ratones en la cápsula renal y se observó que podían crear un importante número de células vivas generadoras de insulina. Este hallazgo supone un importante paso en la creación de células β , el gran objetivo de los científicos en el desarrollo de la cura de esta enfermedad metabólica. Este compuesto, un alcaloide indólico

promotor tumoral, cuya estructura se muestra en la Figura 7, podría servir para diferenciar células madre pluripotenciales en células β pancreáticas secretoras de insulina. Esta vía podría constituir una estrategia terapéutica útil y supone un hallazgo esperanzador. El mecanismo de acción sugiere que ILV actúa sobre la vía de la proteína quinasa C.

El laboratorio de Melton lo ha intentado de varias maneras; una de ellas consistió en la reprogramación de células pluripotenciales inducidas (iPS), para diferenciarlas directamente en células β pancreáticas, sin necesidad de pasar por el estado intermedio de pluripotencialidad que comporta la técnica de reprogramación. Sirviéndose de tres factores de transcripción (Ngn3, Pdx1 y Mafa), consiguieron posteriormente reprogramar las células exocrinas del páncreas para que se convirtieran en células β .



(-)-Indolactam V

FIGURA 7. Molécula de -indolactam V (ILV)

El sistema empleado recuerda al utilizado por el profesor de la Universidad de Kioto, Yamanaka (47), para convertir células adultas en células iPS, pero a diferencia de la técnica de reprogramación, el propuesto por Melton se saltaba el paso por el que se revertía el estado de maduración de una célula para que sea pluripotencial, y así pasaba directamente de un tipo de célula a otro, en este caso de una célula exocrina a una β del páncreas.

Con su nuevo trabajo, estos investigadores apuntan una nueva posibilidad, basada en el compuesto ILV. Los autores sabían que aquel trabajo constituía una prueba de concepto y que con esta versión de

reprogramación directa se podía disponer de una fuente de células relativamente accesible y abundante de ciertos tipos celulares de interés terapéutico, como el de las células β del páncreas.

11. CONCLUSIONES

Es un hecho evidente que las células productoras de insulina pueden obtenerse a partir de células madre. Las células madre pueden representar una fuente ilimitada de células y resolver el problema de la falta de donantes. Sin embargo, incluso si conseguimos una célula que se comporte como una célula β humana, y pueda ser utilizada para restaurar la función perdida, no podemos olvidar que la diabetes es una enfermedad autoinmune, y mientras la terapia celular pueda restaurar la función, sin actuar sobre el proceso autoinmune, los factores y mecanismos que destruyen las células β originales, permanecerán. La dimensión del problema requiere una combinación de expertos, condición que no posee grupo alguno en el mundo, y el esfuerzo de todos es absolutamente necesario. Mientras tratamos de resolver todos estos problemas, nuestro paciente diabético puede conseguir algún beneficio a partir de las estrategias basadas en terapias de células madre autólogas que se dirigen a complicaciones diabéticas, tales como la cardiopatía diabética o la isquemia de los miembros.

ABREVIATURAS

ABI, índice tobillo-poplíteo; bFGF, factor de crecimiento de fibroblastos básico; BMMNC, células mononucleares de la médula ósea (*bone marrow mononuclear cells*); EGF, factor de crecimiento epidérmico; ESC, células madre embrionarias (*embryonic stem cells*); IGF-I y II, factores de crecimiento insulina-like I y II; ILV, -indolactam; GLP-1, Péptido tipo glucagón-1; iPS, células pluripotentes inducidas; MAE, efectos adversos principales a las 12 semanas; Pax4, gen que interviene en la generación de insulina; PBMNC, células mononucleares de la sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells*); SHH, Sonic hedgehog; VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados resumidos en este trabajo han sido financiados en parte por proyectos del Instituto de Salud Carlos III (TERCEL RD06/0010/0025, REDIMET RD06/0015/0013), MEC (SAF2006-06673, SAF2006-13686), Junta de Andalucía (CTS 576) y Fundación Progreso y Salud (FPS/0009/06). En los últimos cinco años he desarrollado mi trabajo de investigación en el Instituto de Bioingeniería de la UMH (Alicante), la Universidad Nacional de Singapur y el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) en Sevilla. Esta revisión le debe mucho a todos mis colaboradores en dichas instituciones.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Soria B, Bedoya FJ, Tejedó JR *et al.* (2008) Cell therapy for diabetes mellitus: an opportunity for stem cells? *Cells Tissues Organs* **188**, 70-77.
2. Gomis-Barbará R (2006) Diabetes mellitus tipo 1. En: Enfermedades metabólicas. Monografía XX. (Eds. F Mayor Zaragoza y M Cascales Angosto). Real Academia Nacional de Farmacia y Fundación Ramón Areces. Madrid. Pp17-35.
3. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA *et al.* (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a corticoid-free immunosuppressive regime. *N Engl J Med* **343**, 230-238.
4. Ryan EA, Paty BM, Senior PA *et al.* (2005) Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* **54**, 2060-2069.
5. Martín F, Reig JA y Soria B (1995) Secretagogue-induced (Ca^{2+})_i changes in single-rat pancreatic-islets and correlation with simultaneously measured insulin release. *J Mol Endocrinol* **15**, 177-185.
6. Martín F, Sánchez-Andrés JV y Soria B (1995) Slow (Ca^{2+})_i oscillations induced by ketoisocaproate in single mouse pancreatic islets. *Diabetes* **44**, 300-305.
7. Martín F, Salinas E Vázquez J *et al.* (1996) Inhibition of insulin release by synthetic peptides shows that the H3 region at the C terminal domain of syntaxin-1 is crucial for Ca^{2+} -but not for guanosine '5-(γ -thio)triphosphate-induced secretion. *Biochem J* **320**, 201-205.
8. Nadal A, Valdeolmillos M y Soria B (1994) Metabolic regulation of intracellular calcium concentration in mouse pancreatic islets of Langerhans. *Am J Physiol* **267**, 769-774.
9. Martín F y Soria B (1995) Amino acid-induced (Ca^{2+})_i oscillations in single mouse pancreatic islets of Langerhans. *J Physiol* **486**, 361-371.

10. Sánchez-Andrés JV, Ripoll C y Soria B (1998) Evidence that muscarinic potentiation of insulin release is initiated by an early transient calcium entry. *FEBS Lett* **231**, 143-147.
11. Martín F, Pintor J, Rovira JM *et al.* (1998) Intracellular diadenosine polyphosphates: a novel second messenger in stimulus-secretion coupling. *FASEB J* **12**, 1499-1506.
12. Quesada I, Rovira JM, Martín F *et al.* (2002) Nuclear K-ATP channels trigger nuclear Ca²⁺ transients that modulate nuclear function. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 9544-9549.
13. Nadal A, Rovira JM, Laribi O *et al.* (1998) Rapid insulinotropic effect of 17 β -estradiol via a plasma membrane receptor. *FASEB J* **12**, 1341-1348.
14. Andreu E, Soria B, y Sanchez-Andres JV (1997) Oscillation of gap junction electrical coupling in the mouse pancreatic islets of Langerhans. *J Physiol* **498**, 753-761.
15. Charollais A, Gjinovci A, Huarte J *et al.* (2000) Junctional communication of pancreatic β cells contributes to the control of insulin secretion and glucose tolerance. *J Clin Invest* **106**, 235-243.
16. Soria B, Roche E, Berna G *et al.* (2000a) Insulin-secreting cells derived from embryonic stem-cells normalize glycaemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* **49**, 157-162.
17. Brennand K, Huangfu D y Melton D (2007) All β cells contribute equally to islet growth and maintenance. *Plos Biology* **5**, 1520-1529.
18. Teta M, Rankin MM, Long SY *et al.* (2007) Growth and regeneration of adult β cells does not involve specialized progenitors. *Dev Cell* **12**, 817-826.
19. Blyszczuk P, Czyz J, Kania G *et al.* (2003) Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin- β producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 998-1003.
20. Soria B, Andreu E, Berna G *et al.* (2000) Engineering pancreatic islets. *Pflugers Arch Eur J Physiol* **440**, 1-18.
21. Leon-Quinto T, Jones J, Skoudy A *et al.* (2004) In vitro directed differentiation and selection of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Diabetologia* **47**, 1442-1451.
22. Vaca P, Martín F, Vegara JM *et al.* (2006) Induction of differentiation of ES cells into islet cells by fetal soluble factors. *Stem Cells* **24**, 258-265
23. Soria, B (2001) In vitro differentiation of pancreatic β cells. *Differentiation* **68**, 205-219.
24. D'Amour K, Bang AG, Eliazer S *et al.* (2006) Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotech* **11**, 1392-1401.
25. Jiang J, Au M, Lu K *et al.* (2007) Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells. *Stem Cells* **25**, 1940-1953.
26. Shim JH, Kim SE, Woo DH *et al.* (2007) Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate. *Diabetologia* **50**, 1228-1238.

27. Soria B, Bedoya FJ, Martin F (2005) Pancreatic stem cells. *Amer J Physiol* **289**, 177-180.
28. Soria B, Skoudy A y Martin F (2001) From stem cells to β cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia* **44**, 407-415.
29. Roche E, Sepulcre P, Reig JA *et al.* (2005) Ectodermal commitment of insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells. *FASEB J* **19**, 1774-1786.
30. Ruhnke M, Ungefroren H, Nussler A *et al.*,(2005) Reprogramming human peripheral blood monocytes into functional hepatocyte and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology* **128**, 1774-1786.
31. Dormandy JA y Rutherford RB (2000) Management of peripheral arterial disease (PAD).TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). *J Vasc Surg* **31**, S1-S296
32. Schainfeld RM e Isner JM (1999) Critical limb ischemia: nothing to give at the office? *Ann Intern Med* **130**, 442-444.
33. Dorros G, Jaff MR, Dorros AM *et al.* (2001) Tibioperoneal (outflow lesion) angioplasty can be used as primary treatment in 235 patients with critical limb ischemia: five-year follow-up. *Circulation* **104**, 2057-2062.
34. Isner JM y Rosenfield K (1993) Redefining the treatment of peripheral artery disease. *Circulation* **88**, 1534-1557.
35. Baumgartner I, Schainfeld R y Graziani L (2005) Management of peripheral vascular disease. *Annu Rev Med* **56**, 249-272.
36. Campbell WB, Johnston JA, Kernick VF y Rutter EA (1994) Lower limb amputation: striking the balance. *Ann R Coll Surg Engl* **76**, 205-209
37. Losordo DW y Dimmeler S (2004) Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part II. Cell-based therapies. *Circulation* **109**, 2692-2697.
38. Emmerich, J. (2005) Current state and perspective on medical treatment of critical leg ischemia:gene and cell therapy. *Int J Low Extrem Wounds* **4**, 234-241.
39. Shyu KG, Manor O, Magner M *et al.* (1998) Direct intramuscular injection of plasmid DNA encoding angiopoietin-1 but not angiopoietin- 2 augments revascularization in the rabbit ischemic hind limb. *Circulation* **98**, 2081-2087.
40. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T *et al.* (2002) Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* **360**, 427-435.
41. Higashi Y, Kimura M, Hara K *et al.* (2004) Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilatation in patients with limb ischemia. *Circulation* **109**, 1215-1218.
42. Huang PP, Li SZ, Han MZ *et al.* (2004) Autologous transplantation of peripheral blood stem cells as an effective therapeutic approach for severe arteriosclerosis obliterans of lower extremities. *Thromb Haemost* **91**, 606-609.
43. Saigawa T, Kato K, Ozawa T *et al.* (2004) Clinical application of bone marrow implantation in patients with atherosclerosis obliterans, and the association bet-

- ween efficacy and the number of implanted bone marrow cells. *Circ J* **68**, 1189-1193.
44. Huang P, Li S, Han M *et al.* (2005) Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes Care* **28**, 2155-2160.
 45. Kabelitz D, Geissler EK, Soria B, Schroeder IS, Fändrich F, Chatenoud L. (2008) Toward cell-based therapy of type I diabetes. *Trends Immunol.* **29**, 68-74
 46. Chen S, Borowiak M, Fox JL *et al.* (2009) A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage *Nature Chem Biol* **5**, 258-265
 47. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676.