

Un control riguroso de la glucemia, principalmente en los pacientes con diabetes tipo 1, requeriría la regeneración funcional del páncreas dañado. Los estudios clínicos recientes sobre implante de islotes pancreáticos procedentes de donantes en pacientes diabéticos han alimentado las expectativas de un tratamiento generalizado basado en esta metodología; no obstante, existe una gran desproporción entre los posibles donantes y el número de pacientes con diabetes que podrían recibir este tratamiento. Esta falta de órganos y tejidos que podría permitir una terapia celular, no sólo para la diabetes sino para otras enfermedades que requieren igualmente un recambio celular, ha relanzado recientemente la investigación sobre las posibilidades terapéuticas de las denominadas células madre pluripotenciales. La presente revisión incluye algunos resultados previos de nuestro laboratorio sobre la obtención de células productoras de insulina a partir de células madre embrionarias de ratón y su utilización en ratones diabéticos.

## CELLULAR THERAPY IN DIABETES MELLITUS

**Optimal control of blood glucose, mainly in patients with type 1 diabetes, would require functional regeneration of the damaged pancreas. Recent clinical trials of islet transplantation in diabetic patients have increased expectations for a generalized treatment based on this methodological approach. Nevertheless, the demand for pancreases outweighs their availability. This scarcity of organs and tissues for cellular therapy, not only for type 1 diabetic patients but also for the treatment of other diseases in which cellular replacement is also required, has recently increased research into the therapeutic possibilities of pluripotent stem cells. The present review includes previous results from our laboratory on the harvesting of insulin-producing cells from mouse embryonic stem cells and their utilization in diabetic mice.**

*Key words:* Stem cells. Cellular therapy. Diabetes. Islet transplantation. Insulin.

## TRASPLANTES Y TERAPIA CELULAR

La terapia celular supone la transferencia de células mediante autotrasplante o alotrasplante con fines terapéuticos y surge con los primeros trasplantes de órganos hace más de 35 años. Hoy día, principalmente los trasplantes de corazón, riñón, hígado y médula ósea están permitiendo la curación de enfermos de diversa índole en una fase avanzada de una enfermedad que limitaba sus expectativas de vida. Los dos principales problemas que plantea esta terapia son, por una parte, la desproporción entre donantes y posibles receptores y, por otra, el previsible rechazo inmunológico, lo que conlleva la medicación con agentes inmunodepresores cuyos efectos a medio plazo no son del todo satisfactorios. Los trasplantes de páncreas han supuesto una forma de curación más reciente para algunos pacientes diabéticos; la cirugía ha sido accesible de forma generalizada en distintos hospitales del mundo desde 1978<sup>1</sup>, tanto mediante un trasplante de órgano aislado como a través de uno doble, de páncreas y riñón, con una tasa de éxito mayor del 80%<sup>2</sup>, lo que supone una independencia de insulina por un tiempo superior a 12 meses. Sin embargo, la complejidad quirúrgica de esta técnica y los problemas del manejo de órganos supuso hace más de 10 años la puesta a punto de una técnica alternativa que permitiera el implante de islotes purificados del páncreas de un donante inyectados a través de la vena porta, para permitir su implantación en el hígado del paciente. Los primeros experimentos de este tipo no fueron muy alentadores, principalmente por la utilización de

Correspondencia: Dr. J.A. Reig.  
 Instituto de Bioingeniería. Facultad de Medicina.  
 Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.  
 Universidad Miguel Hernández.  
 Campus de San Juan. 03550 Alicante.  
 Correo electrónico: jareig@umh.es

*Palabras clave:* Células madre. Terapia celular. Diabetes. Trasplante de islotes. Insulina.

Recibido el 19-4-2002; aceptado para su publicación el 9-7-2002.

esteroides inmunodepresores, como la prednisona, que son aparentemente más lesivos sobre los islotes inyectados que sobre el órgano completo trasplantado. Menos de un 10% de estos pacientes fue catalogado como independiente de insulina<sup>2</sup>. Sin embargo, recientemente se hizo público un experimento clínico conocido como Protocolo de Edmonton, dirigido por el Dr. James Shapiro en la Universidad de Alberta<sup>3</sup>, que introducía dos variantes importantes, primero una técnica más depurada de obtención de islotes e implantación de una masa de islotes que incrementa las posibilidades del implante y, en segundo lugar, una terapia inmunodepresora sin glucocorticoides ni ciclosporina, fármacos conocidos por sus efectos lesivos sobre las células pancreáticas<sup>4</sup>. Como inmunodepresor se empleó daclizumab, un anticuerpo monoclonal contra el receptor de la interleucina-2 y agentes relacionados con la ciclosporina, como tacrolimus a dosis bajas y sirolimus, que inhiben la calcineurina y bloquean la activación de las células T. Las ventajas de esta técnica sobre el trasplante de páncreas son evidentes, ya que el paciente requiere sólo una breve hospitalización y una intervención con anestesia local de menos de una hora de duración, que puede repetirse en función de la respuesta conseguida. El seguimiento de los pacientes trasplantados dentro de este ensayo clínico inicial puso de manifiesto que, en gran medida, los 7 pacientes estudiados fueron independientes de la administración de insulina durante un período superior a 12 meses, éxito que ha sido confirmado en seguimientos posteriores<sup>5</sup>.

Uno de los problemas iniciales que afronta esta metodología es la falta de buenos rendimientos de aislamiento de islotes, ya que del millón de islotes que posee el páncreas humano sólo un 50% puede recuperarse de forma efectiva para el trasplante. Este inconveniente puede subsanarse realizando implantes sucesivos en los pacientes que deben recibir al menos 10.000 islotes/kg para garantizar un cierto grado de éxito<sup>5</sup>. En términos de donantes, esto supone, en el mejor de los casos, la necesidad de contar al menos con dos páncreas para cada trasplante. España es el país con la mayor tasa de donantes, 33 por millón de habitantes; sin embargo, existen más de 100.000 enfermos afectados de diabetes tipo 1. Por otra parte, en los EE.UU., donde se produce el mayor número de trasplantes de páncreas, existen 800.000 enfermos afectados de esta enfermedad y se producen unas 3.000 donaciones de páncreas al año. Por tanto, se atienden las necesidades de unos 1.300 enfermos anualmente. En julio del año 2000, el presidente Clinton anunció la creación de una red<sup>6</sup> en la que 10 centros hospitalarios de los EE.UU. y Europa participan en un ensayo clínico para evaluar el grado de tolerancia a medio y largo plazo de los enfermos frente a este tipo de implante, utilizando el mencionado protocolo de Edmonton<sup>3</sup>. No obstante, a pesar de esta importante iniciativa, no cabe duda que se deben buscar fuentes alternativas de células productoras de insulina que

permitan extender los implantes a la mayor cantidad posible de pacientes<sup>7</sup>. Las dos alternativas más estudiadas en la actualidad son, por una parte, los xenotrasplantes, utilizando fundamentalmente islotes de origen porcino y, por otra parte y de manera más reciente, la utilización de células madre embrionarias o adultas<sup>8</sup>.

## XENOTRASPLANTES

Aunque existen antecedentes sobre xenotrasplantes de islotes pancreáticos en pacientes con diabetes<sup>9</sup>, las autoridades sanitarias de los EE.UU. han detenido cualquier estudio clínico al respecto hasta tener la seguridad de que no existe riesgo de infección por retrovirus endógenos que pudieran originar una infección permanente en la especie humana. El otro gran inconveniente de este tipo de trasplante es la mayor barrera inmunológica que existe entre el material implantado y el huésped. El desarrollo de animales transgénicos podría suponer un avance importante para la posible aplicación de esta metodología<sup>10</sup>. Como alternativa, se ha utilizado con éxito, en diferentes experimentos en ratones<sup>11</sup> y primates<sup>12</sup> el encapsulamiento de islotes con diferentes materiales para evitar el ataque del sistema inmunológico del huésped. No obstante, esta aproximación no parece evitar el riesgo de infección viral, que deberá ser descartado antes de que se pueda permitir este tipo de experimentos clínicos en pacientes.

## CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Las células madre embrionarias tienen la propiedad de, en determinadas condiciones, dividirse simétricamente por largos períodos de cultivo y diferenciarse en respuesta a estímulos concretos hacia linajes o estirpes particulares<sup>13</sup>. Esta potencialidad proliferativa, unida a la capacidad de producir en teoría cualquiera de los más de 200 tipos de células especializadas que existen en el ser humano, hace de estas células una fuente única para la regeneración de tejidos y órganos dañados por diferentes causas. En el contexto del desarrollo humano, tras la fecundación, el cigoto resultante es "totipotente", es decir, tiene la capacidad de originar cualquier célula del organismo, incluidos los trofoblastos de la placenta. Esto ocurre para las células resultantes de las primeras divisiones, en las primeras horas de la fecundación. Cualquiera de las células resultantes, si se instalara en el útero, tendría el potencial de desarrollar un feto, como ocurre en los gemelos que se desarrollan cuando células totipotentes se separan en un estadio temprano, desarrollándose dos seres humanos genéticamente iguales. Aproximadamente 4 días después de la fecundación, tras varios ciclos de división, estas células totipotentes empiezan a especializarse, formando el blastocisto. En el ratón constituye una masa de unas 150 células con una capa externa, una cavidad y un grupo de células en su inte-

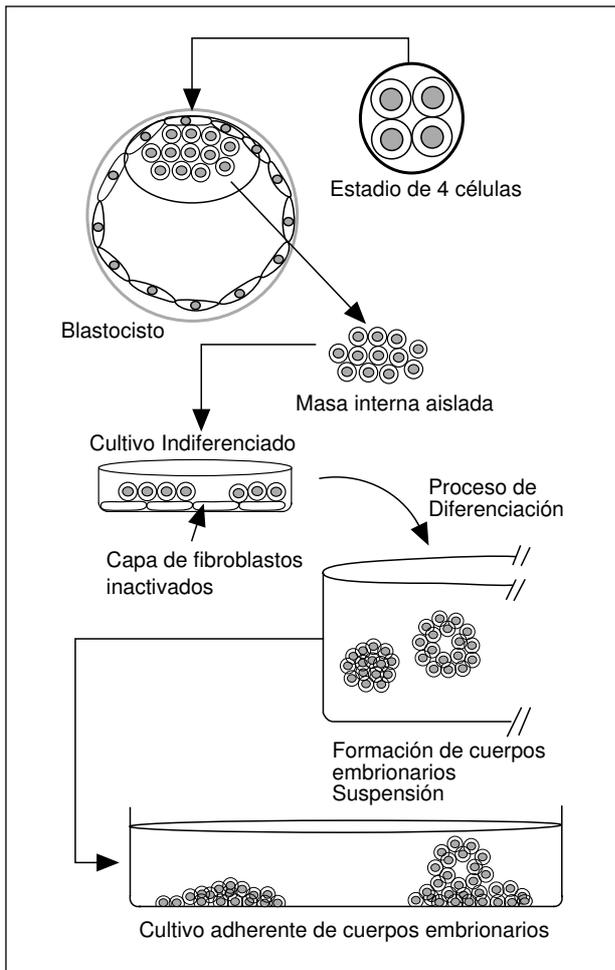


Fig. 1. Esquema del proceso de obtención, cultivo, aislamiento y diferenciación de células madre embrionarias.

rior que constituye la masa interna. La capa externa desarrollará la placenta y otros tejidos para el desarrollo fetal en el útero. Las células de la masa interna, de las que se obtienen las células madre embrionarias (fig. 1), tienen la capacidad de formar cualquier célula del ser humano, incluida la línea germinal, por lo que se dice que son "pluripotentes". Sin embargo, no podrían dar lugar a un feto si se instalasen en un útero, pues carecen del potencial necesario.

Hace más de 20 años que se están estudiando estas células, aisladas principalmente de la masa interna del blastocisto de embriones de ratón de 4-5 días<sup>14</sup>, pero hace sólo 4 años que se han podido aislar y cultivar a partir de la masa interna de embriones humanos resultantes de procesos de fecundación *in vitro* procedentes de clínicas de fertilización asistida<sup>15</sup>. Este trabajo ha permitido establecer, en aquellos países que cuentan con el apoyo legal, diferentes líneas cuya potencialidad clínica aún debe ser evaluada.

Se pueden obtener células madre igualmente a partir de células de la línea germinal procedentes de las gónadas de embriones más desarrollados, que son igual-

mente pluripotentes<sup>16</sup>, así como a partir de carcinomas embrionarios cuya utilidad con fines terapéuticos es más limitada<sup>17</sup>.

Las células madre embrionarias pueden mantenerse indiferenciadas en medios de cultivo que contienen suero fetal bovino y una capa de fibroblastos inactivados, o bien añadiendo en los medios de cultivo una citocina denominada LIF (*leucemia inhibitory factor*) que inhibe los procesos de diferenciación. Sin embargo, cuando se retira el LIF de los medios de cultivo, las células experimentan procesos espontáneos y heterogéneos de diferenciación hacia diversos linajes correspondientes a las tres capas embrionarias (fig. 1)<sup>18</sup>.

## CUERPOS EMBRIONARIOS Y DIFERENCIACIÓN

Cuando las células embrionarias son disgregadas con tripsina y transferidas, en ausencia de LIF, a cultivos en suspensión en placas no adherentes, comienzan a formar agregados celulares denominados cuerpos embrionarios (fig. 1), constituidos tanto por células indiferenciadas como parcialmente diferenciadas. Estas estructuras evolucionan en cultivo, dando lugar a procesos de diferenciación puntuales. Su morfología a partir del séptimo día demuestra la presencia de una clara variabilidad celular, con la presencia de cavidades internas características (fig. 2). Desde un primer momento, las interacciones célula-célula que ocurren *in vitro* parecen ser semejantes a las que se producen durante el desarrollo normal del embrión, condicionando un proceso de diferenciación cuyas pautas están empezando a ser estudiadas<sup>19</sup>. Cuando al cabo de varios días los cuerpos embrionarios se esparcen y se cultivan en placas convencionales, las células se adhieren y empiezan a aparecer células de diversos linajes (fig. 1), desde cardiomiocitos con contracción rítmica característica<sup>20</sup> hasta neuronas que liberan dopamina<sup>21</sup>. Esta plasticidad se ha demostrado de manera más reciente con células procedentes de embriones humanos<sup>22</sup>. Naturalmente, el principal reto para buscar una aplicación terapéutica a esta metodología es tratar de canalizar y dirigir este proceso promoviendo una diferenciación homogénea hacia células concretas cuya funcionalidad se pretende aplicar a un paciente trasplantado.

## CÉLULAS MADRE ADULTAS

Además de las células pluripotenciales de origen embrionario, que pueden originar cualquier tejido del feto, existen células madre indiferenciadas con cierta similitud a las embrionarias en muchos tejidos adultos especializados<sup>23</sup>. Estas células permiten mantener la homeostasis de los tejidos regenerando y reemplazando las células que se destruyen continuamente por diferentes causas. Las células madre adultas conservan

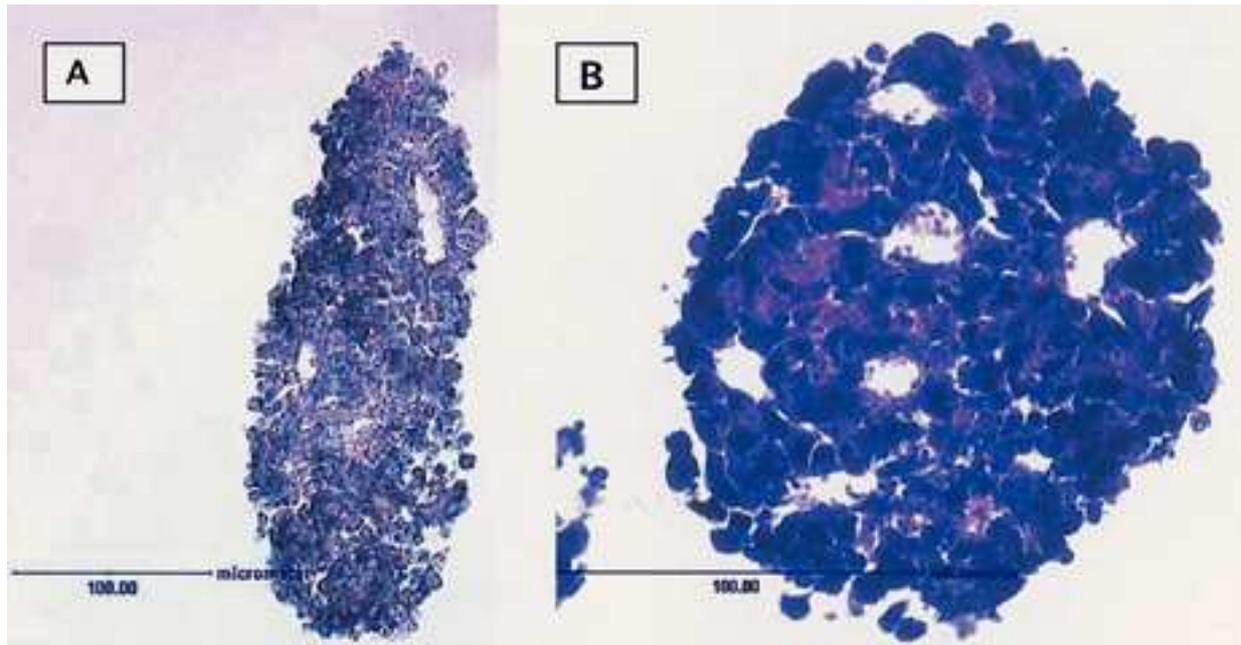


Fig. 2. Microfotografía de cuerpos embrionarios de ratón obtenidos tras 5 días en cultivo en ausencia de LIF. A: tinción con fosfatasa alcalina. B: tinción con hematoxilina/eosina.

dos características previamente mencionadas: pueden proliferar, aunque de manera más lenta que las embrionarias y, por otra parte, dan lugar a células maduras especializadas, generando durante el proceso células progenitoras en estadios intermedios de diferenciación. Es muy difícil distinguir en un tejido determinado unas células de otras por la ausencia de marcadores definidos. Estas células madre adultas tienen, por otra parte, un crecimiento más limitado en cultivo y su capacidad diferenciadora *in vitro* está aparentemente limitada a aquellas células relacionadas con el tejido de procedencia, denominándose células “multipotentes”. Las propiedades de estas células dependen en gran medida de su localización. Las células precursoras hematopoyéticas están siendo generadas constantemente en la médula ósea y es fácil su aislamiento. Sin embargo, las células madre procedentes de tejidos del endodermo embrionario, como las intestinales<sup>24</sup> o las hepáticas<sup>25</sup>, son estacionarias y están físicamente separadas de las células diferenciadas. Su aislamiento y caracterización son más complejos por dificultades inherentes a su identificación y cultivo. Las células madre adultas tienen una enorme ventaja para posibles tratamientos terapéuticos. En primer lugar, por sus propiedades proliferativas, pero igualmente interesante es el hecho de que las células diferenciadas que se obtienen *in vitro* podrían ser reimplantadas en los propios pacientes sin problemas de rechazo inmunológico. Se han utilizado células madre de origen mesodérmico procedentes de músculo esquelético o de células mesenquimales de médula ósea para originar por diferenciación *in vitro* o *in vivo* distintos tejidos,

como músculo, hueso, cartílago o tejido adiposo<sup>26,27</sup>, que podrían ser reimplantados en el propio paciente del que se han aislado las células madre originales. Existen antecedentes que demuestran una buena integración de estas células dentro del órgano implantado cuando se trata, por ejemplo, del corazón<sup>28</sup>. En aquellos tejidos en los que es fácil su purificación y cultivo, como la médula ósea, se han hecho grandes esfuerzos para estudiar el grado de pluripotencialidad de estas células, tratando de demostrar, por ejemplo, si células madre adultas son capaces de generar células especializadas de un tejido distinto del que han sido obtenidas o incluso originar tejidos de una capa embrionaria diferente. Este proceso de plasticidad o transdiferenciación sólo se ha demostrado en experimentos *in vivo*<sup>29</sup>. Se ha descrito que células madre derivadas de médula ósea pueden diferenciar hacia un tejido hepático<sup>30</sup> o neural<sup>31</sup>, y viceversa<sup>32</sup>. Estos trabajos iniciales permitirían imaginar la posibilidad de aislar células madre de médula ósea y dirigir su posible diferenciación hacia células productoras de insulina. Sin embargo, estos estudios de plasticidad son muy recientes y deben ser contrastados antes de poder conocer el alcance real que podrían tener. Trabajos recientes sugieren la existencia de procesos de fusión celular *in vitro* entre células madre embrionarias y células madre adultas progenitoras de distinto origen<sup>33</sup>, algo que llevaría a la revisión de trabajos anteriores, en los que se propone la posible plasticidad de estas células madre adultas.

## DESARROLLO DEL PÁNCREAS Y DIFERENCIACIÓN DIRIGIDA DE CÉLULAS EMBRIONARIAS Y DE PROGENITORES PANCREÁTICOS

En los seres humanos, el páncreas surge como una prominencia a partir del intestino. Durante el desarrollo fetal nuevas células endocrinas surgen a partir de células ductales en el páncreas como consecuencia de una conjunción de señales y factores de crecimiento, como la activina beta-B y el FGF2 (*fibroblast growth factor 2*)<sup>34</sup>. Estos factores de crecimiento inducen la aparición de precursores de células beta caracterizados por la expresión de una serie de factores de transcripción, entre los que se encuentra *pdx-1*, que regula la expresión de insulina y el desarrollo del páncreas<sup>35</sup>. Una posibilidad de obtener células beta o incluso islotes de Langerhans a partir de células madre embrionarias podría ser tratando de dirigir el proceso de diferenciación mediante la adición a los medios de cultivo de aquellos metabolitos y factores de crecimiento necesarios para inducir el proceso. Este tipo de aproximación no ha sido, por el momento, la más adecuada para obtener células de origen ectodérmico o endodérmico<sup>36</sup>. No obstante, en algunos trabajos previos se describe la obtención, mediante esta estrategia dirigida en cultivo, de células similares a islotes pancreáticos a partir de células embrionarias de ratón que, sin embargo, no fueron capaces de corregir la hiperglucemia una vez implantadas en ratones diabéticos<sup>37</sup>. Por otra parte, la diferenciación hacia células beta o islotes de Langerhans partiendo de progenitores pancreáticos<sup>38</sup> o células ductales<sup>39</sup> sería una alternativa. Sin embargo, el problema de la falta de donantes, antes mencionado, y la escasa proliferación de estos cultivos condicionarán a la puesta en práctica de esta metodología.

## OBTENCIÓN DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA A PARTIR DE CÉLULAS EMBRIONARIAS DE RATÓN

Una posibilidad adicional para inducir la diferenciación de las células embrionarias hacia un linaje específico consiste en una aproximación de ingeniería genética, transfectando las células e incorporando en sus cromosomas una construcción quimérica que incluya la región promotora o reguladora de un gen que se exprese específicamente en las células que interesa obtener y controlando la expresión de una proteína que confiera a las células, al mismo tiempo, resistencia a un determinado antibiótico. Esta aproximación fue utilizada inicialmente para obtener cardiomiocitos<sup>40</sup>. En estudios realizados en nuestro laboratorio para tratar de obtener células productoras de insulina se utilizó una construcción genética que contenía las regiones reguladoras del gen humano de la insulina, controlando un factor de resistencia a neomicina (fig. 3)<sup>41</sup>. La construcción tiene un segundo promotor ubi-

cuo que permite la expresión de resistencia a otro antibiótico distinto, la higromicina. Células embrionarias indiferenciadas de ratón de la línea R1 fueron transfectadas y seleccionadas, primero con higromicina y seguidamente forzando la diferenciación en ausencia de LIF con neomicina. Tras un período de diferenciación como cuerpos embrionarios en estas condiciones, los clones resistentes al antibiótico fueron madurados y expandidos en presencia de nicotinamida y concentraciones bajas de glucosa (fig. 3). Se pudieron seleccionar algunos clones celulares con una capacidad de proliferación prácticamente nula al final del proceso y con la suficiente cantidad de insulina para llevar a cabo ensayos posteriores, entre 10-13 µg de proteína, lo que representa aproximadamente el 80% del contenido de insulina de los islotes de ratón. Los estudios de secreción *in vitro* con los clones seleccionados permitieron comprobar que la respuesta secretora era del orden del 55% de la que se observa en el islote y que el umbral y la cinética de secreción hormonal inducida por glucosa eran muy similares a las observadas en islotes de ratón adulto, lo que permitía plantear la posibilidad de corregir la hiperglucemia *in vivo* mediante el implante de estas células en ratones diabéticos. El principal problema de dicha estrategia reside en el escaso número de clones que se ha podido obtener hasta el momento con una cantidad apreciable de insulina, sólo 8 clones después de 140 seleccionados tras el tratamiento con neomicina. La variabilidad de los lotes de sueros utilizados en los cultivos y, principalmente, la posible presencia de células con bajo contenido de insulina que no sean precursoras de células endocrinas pueden explicar en parte este resultado previo. Se están llevando a cabo experimentos alternativos que permitan obtener un mayor porcentaje de precursores con una cantidad suficiente de insulina, seleccionando el inicio del tratamiento con neomicina en el momento de mayor expresión de la hormona, que en los cuerpos embrionarios alcanza su máximo entre los días 10 y 13 en cultivo. Por otra parte, se están empleando protocolos de maduración más efectivos que incluyen medios condicionados o factores que inducen el desarrollo del páncreas endocrino.

## IMPLANTE DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA EN RATONES DIABÉTICOS

Los clones seleccionados, como se ha comentado, fueron cultivados hasta formar agregados celulares. Se inyectaron 1 millón de células en el bazo de 12 ratones en los que se había inducido previamente la diabetes mediante una inyección única de estreptozotocina. Los animales trasplantados recuperaron valores normales de glucemia al cabo de 24 h, manteniendo estas concentraciones de normoglucemia durante un período de 3 semanas. Además, presentaron una respuesta a los tests de tolerancia a la glucosa muy semejantes a los animales control. No obstante, al cabo de este perí-

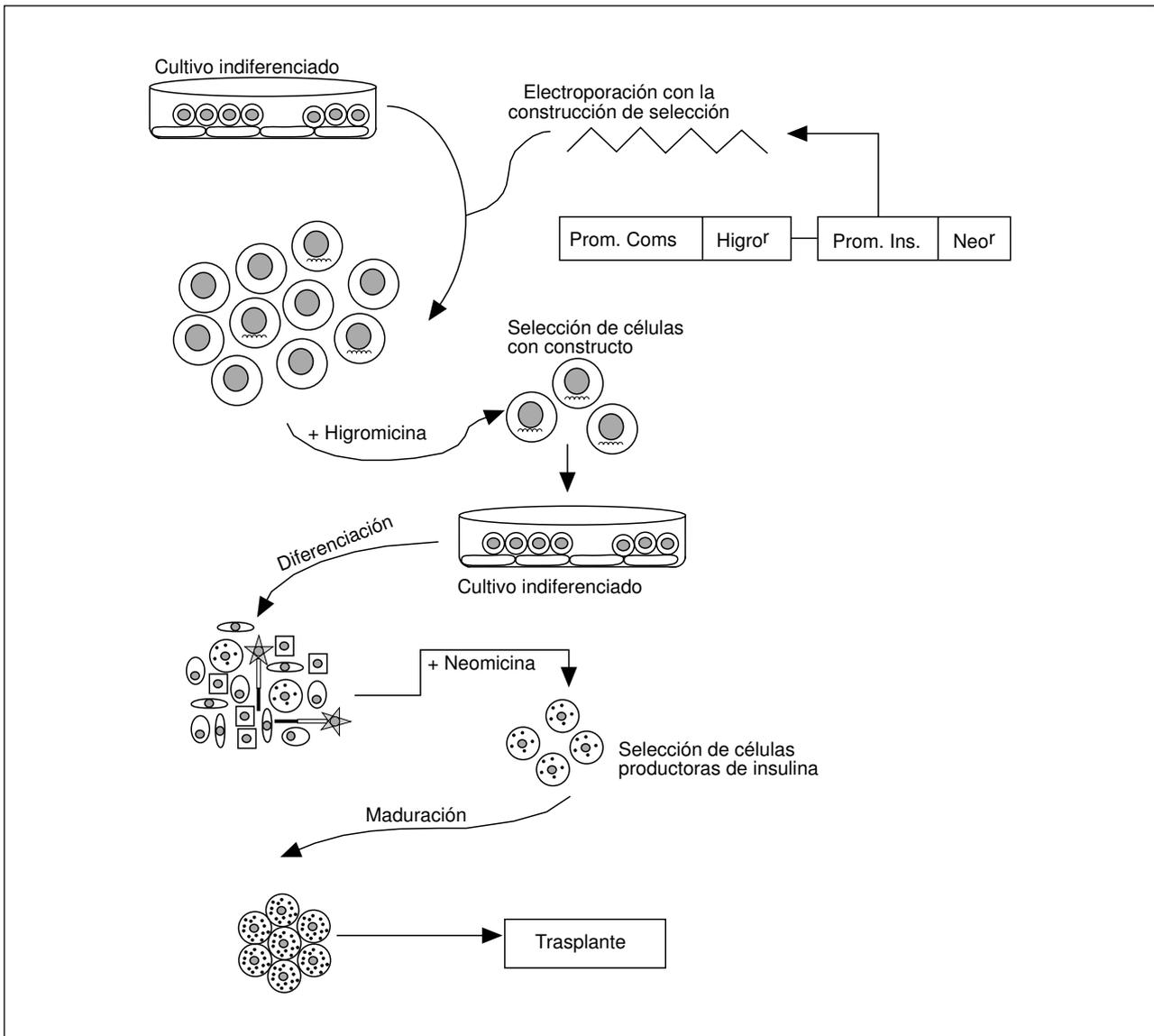


Fig. 3. Diagrama del proceso de diferenciación desde células embrionarias de ratón de la línea R1 hasta células productoras de insulina, mediante la transfección de las células con una construcción que contiene el promotor de la insulina (Prom. Ins.) que controla un factor de resistencia a neomicina (Neo<sup>r</sup>) y un promotor constitutivo (Prom. Cons.) que controla la resistencia a higromicina (Higro<sup>r</sup>).

odo, el 40% de los ratones volvió a presentar de manera gradual valores elevados de glucosa, probablemente por la destrucción o rechazo del implante (fig. 4). El resto de los animales mantuvo la respuesta normoglucémica durante las 42 semanas que duró el ensayo<sup>41</sup>. Tras el estudio se observó la presencia de células positivas a insulina por inmunocitoquímica, no sólo en el bazo, sino también en el hígado de los ratones analizados (fig. 5), lo que demuestra una cierta capacidad de migración de las células implantadas.

#### PERSPECTIVAS DE UTILIDAD CLÍNICA DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS EN EL

#### TRATAMIENTO DE LA DIABETES

Los resultados mencionados anteriormente permiten explotar una estrategia de diferenciación dirigida a partir de células madre pluripotenciales embrionarias de ratón, mediante la utilización tanto de construcciones genéticas apropiadas que permitan la selección celular como de protocolos optimizados de cultivo y maduración de células productoras de insulina, con características secretoras que las hagan susceptibles de ser utilizadas en implantes en ratones diabéticos. Naturalmente, como se ha mencionado, los resultados deben ser optimizados en términos de rendimiento celular. Asimismo, abren la posibilidad de extender los

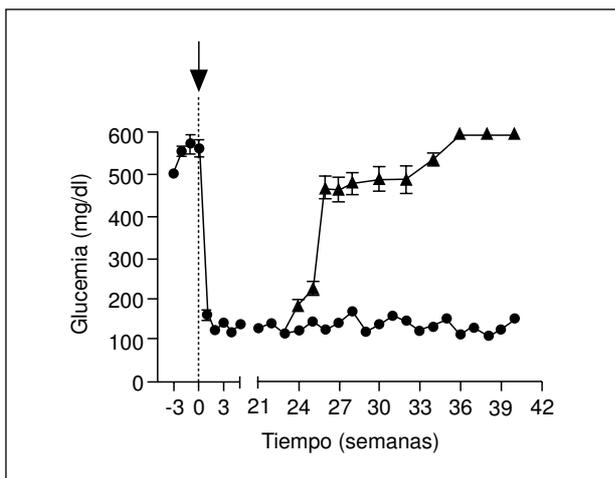


Fig. 4. Cambios en la glucemia en ratones diabéticos trasplantados con células productoras de insulina obtenidas por diferenciación a partir de células madre embrionarias de ratón, tanto en aquellos que mantuvieron la normogluceemia durante todo el experimento ( $\bullet$ ) como aquellos que se volvieron hiperglucémicos gradualmente al cabo de tres semanas ( $\Delta$ ).

estudios a células embrionarias humanas, para conocer las posibilidades terapéuticas que estas células tendrían en experimentos semejantes a los ya mencionados en el ratón. Se han realizado estudios previos sobre el grado de pluripotencialidad de las células embrionarias humanas demostrándose, por ejemplo, que durante el proceso de diferenciación espontánea, estas células son capaces de generar precursores que contienen insulina<sup>42</sup>, algunos de los cuales podrían dar lugar a células beta. Por tanto, *a priori* cabe esperar una selección factible similar a la demostrada en el ratón. Hay que destacar, no obstante, que existen diferencias notables entre las células de ambas especies; por ejemplo, cabe citar diferencias en cuanto a su morfología, su capacidad de proliferación, o los requisitos para mantener en cultivo las células indiferenciadas<sup>22</sup>.

Suponiendo que dichos estudios fueran satisfactorios y se pudiera contar con un protocolo de diferenciación dirigida desde células madre embrionarias humanas hasta células diferenciadas productoras de insulina y con capacidad de respuesta a la glucosa, se deberían evaluar en primera instancia dos importantes aspectos.

En primer lugar, la ausencia de procesos de transdiferenciación, desdiferenciación o transformación que podrían originar una falta de eficacia de las células implantadas o, en el último supuesto, la aparición de teratomas. Los estudios del cariotipo, el grado de diferenciación de las células seleccionadas y la evolución de los implantes en modelos animales deberán ser evaluados antes de cualquier posible aplicación clínica.

En segundo lugar, y a pesar de los importantes avances en terapia inmunodepresora<sup>43</sup>, cabe plantearse el posible rechazo inmunológico de las células implantadas. El grado de inmunogenicidad dependerá en

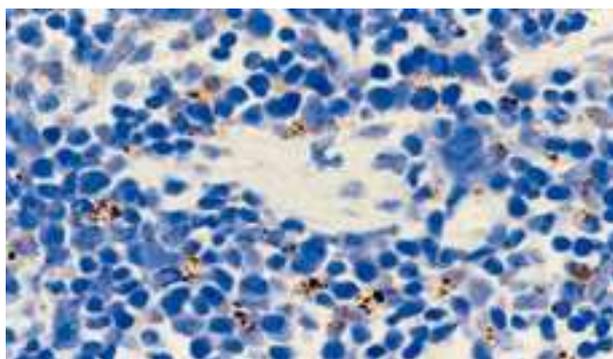


Fig. 5. Células productoras de insulina visualizadas con un anticuerpo antiinsulina en cortes de bazo procedentes de animales diabéticos implantados con células productoras de insulina, obtenidas por diferenciación de células embrionarias de ratón, después de 4 meses tras el trasplante.

gran medida de la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. Una ventaja de las células embrionarias frente a los trasplantes de órganos sería la posibilidad de su modificación genética para eliminar estos antígenos de superficie o reemplazarlos por aquellos que fueran compatibles con el receptor del implante.

Existirían otras alternativas para evitar un posible rechazo. Una ya mencionada es la encapsulación de las células en materiales que permitan la transferencia de nutrientes y hormonas, impidiendo el ataque del sistema inmunológico<sup>44</sup>. La otra alternativa sería la reprogramación genética de las células embrionarias antes del proceso de diferenciación mediante transferencia nuclear, fusionando el núcleo de una célula somática del paciente con el óvulo sin núcleo de un donante. Es lo que se conoce como clonación terapéutica y que ha sido probado en diferentes modelos animales<sup>45,46</sup>.

Los antecedentes de obtención de células productoras de insulina a partir de células madre adultas pluripotenciales se limitan a precursores pancreáticos, cuyo crecimiento en cultivo es muy limitado<sup>38</sup>. Esta circunstancia, unida a la escasez de donantes, hace que esta metodología sea una alternativa poco práctica para poder llevar a cabo una terapia celular generalizada de la diabetes tipo 1. Sin embargo, la posibilidad de obtener células productoras de insulina a una mayor escala a partir, por ejemplo, de células madre adultas es una cuestión abierta, como se ha comentado con anterioridad, y que deberá seguir siendo explorada. De hecho, se ha demostrado recientemente la presencia de marcadores de endodermo en células mesenquimales de médula ósea<sup>47</sup>.

Hace 20 años que se inició el estudio de las células madre embrionarias de ratón y en la actualidad se empieza a conocer las posibilidades terapéuticas reales de este tipo de células, concretamente en el tratamiento de la diabetes, en este modelo animal. Es lógico pensar que, si bien por lo mencionado en el presente

artículo se ha marcado un camino entre varios posibles<sup>48</sup>, el objetivo final (que deberá suponer la obtención de una masa suficiente de células beta para tratar de forma segura y efectiva al gran número de pacientes afectados por esta enfermedad<sup>49</sup>) llevará aún algunos años y debe ser una meta científica prioritaria para los países que cuentan con el potencial investigador adecuado.

#### AGRADECIMIENTO

El trabajo experimental ha sido financiado, en parte, con proyectos del Ministerio de Ciencia y Tecnología (PM98-0096), de la Fundación Marató TV3 (99-1210) y de la Juvenile Diabetes Foundation (JDFI 1-2000-575) de los EE.UU.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Humar A, Kandaswamy R, Granger D, Gruessner RW, Gruessner AC, Sutherland DE. Decreased surgical risks of pancreas transplantation in the modern era, *Ann Surg* 2000;232:696-703.
- Brendel M, Hering, B, Schulz A, Bretzel R. International Islet transplantation Registry Report. Giessen: Justus-Liebig University of Giessen, 1999; p. 1-20. Disponible en: <http://www.med.uni-giessen.de>
- Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a corticoid-free immunosuppressive regime. *N Engl J Med* 2000;343:230-8.
- Zeng Y, Ricordi C, Lendore J, Carrol PB, Alejandro R, Bereiter DR, et al. The effect of prednisone on pancreatic islet autografts in dogs. *Surgery* 1993;113:98-102.
- Ryan EA, Lakey JRT, Rajotte RV, Korbutt GS, Kin T, Imes S, et al. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* 2001;50:710-9.
- Immune Tolerance Network 2002. Disponible en: <http://www.immunetolerance.org>
- Soria B. Trasplante de islotes pancreáticos y de células diferenciadas a partir de células madre. *Av Diabetol* 2001;17:121-8.
- Berná G, León-Quinto T, Fuentes E, Andreu E, Nadal A, Roche E, et al. Ingeniería celular y diabetes mellitus. *Rev Clin Esp* 2001;201:548-56.
- Aebischer P, Buchser E, Joseph JM, Falere J, de Tribolet N, Lysaght M, et al. Transplantation in humans of encapsulated xenogeneic cells without immunosuppression. *Transplantation* 1994;58:1275-7.
- Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen S-H, Phelps CJ, Ball S, et al. Targeted disruption of the  $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature Biotech* 2002;20:251.
- O'Shea G, Sun AM. Encapsulation of rat islets of Langerhans prolongs xenograft survival in diabetic mice. *Diabetes* 1986;35:943-6.
- Sun Y, Ma X, Zhou D, Vacek I, Sun AM. Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. *J Clin Invest* 1996;98:1417-22.
- Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: Stem cells and their niches. *Science* 2000;287:1427-30.
- Evans M, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-6.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel TJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7.
- Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992;70:841-7.
- Andrews PW, Damjanov I, Simon D, Bauting GS, Carlin C, Dracovli NC, et al. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation *in vivo* and *in vitro*. *Lab Invest* 1984;50:147-62.
- Smith AG. Embryonic stem cells. En: Marshak DR, Gardner DK, Gottlieb D, editors. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; p. 205-30.
- Lake JA, Rathjen J, Remiszewski J, Rathjen PD. Reversible programming of pluripotent cell differentiation. *J Cell Science* 2000;113:555-66.
- Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM. Embryonic stem cells differentiate *in vitro* into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* 1993;44:41-50.
- Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotech* 2000;18:675-9.
- Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem cells* 2001;19:193-204.
- Potten CS. Stem cells. San Diego CA: Academic Press, 1997.
- Booth C, O'Shea JA, Potten CS. Maintenance of functional stem cells in isolated and culture adult intestinal epithelium. *Exp Cell Res* 1999;249:359-66.
- Yin L, Sun M, Ilic Z, Leffert HL, Sue S. Derivation, characterization and phenotypic variation of hepatic progenitor cell lines isolated from adult rats. *Hepatology* 2002;35:315-24.
- Becerra J, Andrades JA, Santamaría JA, Cifuentes M, Guerado E. Regeneración ósea, terapia celular e ingeniería tisular. *Med Clin (Barc)* 2001;116:23-34.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca SD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
- Chiu RC, Zibaitis A, Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg* 1995;60:12-8.
- Almeida-Porada G, Porada C, Zanjani ED. Adult stem cell plasticity and methods of detection. *Rev Clin Exp Hematol* 2001;5:26-41.
- Lagasse E, Connors H, Al Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 2000;6:1229-34.
- Mezey E, Chandross KL, Harta G, Maki RA, Mckercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science* 2000;290:1779-82.
- Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 1999;283:534-7.
- Ying Q-L, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002;416:545-8.
- Soria B. *In vitro* differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation* 2001;68:205-19.
- Sander M, German MS. The beta cell transcription factors and development of the pancreas. *J Mol Med* 1997;75:327-40.
- Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:11307-12.
- Lumelski N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001;292:1389-94.
- Cornelius JG, Tchnev V, Kao KJ, Peck AB. *In vitro*-generation of islets in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas. *Horm Metab Res* 1997;29:271-7.
- Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Weir GC, Tatarkiewicz

- K, Song KH, et al. *In vitro* cultivation of islets from expanded ductal tissue. Proc Nat Acad Sci USA 2000;97:7999-8004.
40. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. J Clin Invest 1996;98:216-24.
41. Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto L, Reig JA, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. Diabetes 2000;49:157-62.
42. Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. Diabetes 2001;50:1691-7.
43. Salama AD, Remuzzi G, Harmon WH, Sayegh MH. Challenges to achieving clinical transplantation tolerance. J Clin Invest 2001;108:943-8.
44. Vos Pde, Hannel AF, Tatarkiewict K. Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets. Diabetologia 2002;45:159-73.
45. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature 1996;380:64-6.
46. Colman A, Kind A. Therapeutic cloning: concepts and practicalities. Trends Biotech 2000;18:192-6.
47. Tremain N, Korkko J, Ibberson D, Kopen GC, DiGirolamo C, Phinney DG, et al. MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. Stem Cells 2001;19:408-18.
48. Soria B, Andreu E, Berná G, Fuentes E, Gil A, León-Quinto T, et al. Engineering pancreatic islets. Eur J Physiol 2000;440:1-18.
49. Serup P, Madsen OD, Mandrup-Poulsen T. Islet and stem cell transplantation for treating diabetes. BMJ 2001;322:29-32.