



AVANCES EN DIABETOLOGÍA

www.elsevier.es/avdiabetol



REVISIÓN BREVE

Estrategias de terapia celular para el tratamiento de la diabetes tipo 1: dónde estamos y qué podemos esperar

Miguel Barajas

Área de Terapia Celular, Clínica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra, Pamplona, Navarra, España

Recibido el 20 de abril de 2011; aceptado el 31 de agosto de 2011

Disponible en Internet el 18 de noviembre de 2011

PALABRAS CLAVE

Diabetes;
Célula troncal;
Islote pancreático;
Terapia celular

Resumen La diabetes mellitus tipo 1 es un síndrome orgánico multisistémico crónico que se caracteriza por un aumento de los niveles de glucosa en la sangre que tiene lugar como resultado de concentraciones bajas de la hormona insulina debido a una eliminación selectiva de las células beta pancreáticas como consecuencia de una respuesta autoinmune aberrante. Los resultados obtenidos con el trasplante de islotes pancreáticos en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 han provocado un interés creciente en este campo. Esta técnica precisa de un número importante de islotes pancreáticos para conseguir el objetivo de insulino independencia. Así pues, el estudio de estrategias que permitan preservar la masa de células beta en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 o generar células beta *de novo* para su posterior trasplante representa un objetivo de primera necesidad. En este sentido, las estrategias de terapia celular basadas en las células troncales constituyen una alternativa muy esperanzadora.

© 2011 Sociedad Española de Diabetes. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Diabetes;
Stem cell;
Pancreatic islet;
Cell therapy

Cell therapy strategies for the treatment of diabetes mellitus type 1: where we are and what we can expect

Abstract Diabetes mellitus type 1 is a multisystem chronic organic syndrome characterized by increased blood glucose levels that occur as a result of low concentrations of insulin hormone due to selective elimination of pancreatic beta cells as a consequence of an aberrant autoimmune response. The results of clinical trials based on islet transplantation performed in patients with diabetes mellitus type 1 have greatly increased the interest in this field. This technique requires a significant number of pancreatic islets to achieve the objective of insulin independence. Thus, the current strategies seek to preserve beta cell mass in patients with diabetes mellitus type 1 or generate *de novo* beta cells for transplantation. In this regard, cell therapy strategies based on stem cells represent a very promising alternative.

© 2011 Sociedad Española de Diabetes. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Correo electrónico: mbarajas@unav.es

Introducción

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas cuyo nexo en común es la hiperglucemia secundaria a un déficit en la secreción de insulina, a un defecto de su actividad metabólica, o a ambos. La hiperglucemia mantenida de forma continuada ocasiona complicaciones crónicas de tipo macrovascular, microvascular y/o neuropático, que son comunes a todos los tipos de DM y que conllevan elevadas tasas de morbilidad y mortalidad. En la DM tipo 1 (DM1), la pérdida de las células beta pancreáticas tiene lugar como consecuencia de una destrucción autoinmune con el consecuente deterioro progresivo de estas, que hace que cada vez haya una mayor demanda de insulina y un menor número de células beta capaces de regenerarse y reponer la masa de células beta pancreáticas perdida.

Sin duda, la DM se ha convertido en uno de los problemas sanitarios más graves de nuestro tiempo. Sus proporciones son ya epidémicas en la mayor parte del mundo, estimándose que en la actualidad existen cerca de 250 millones de personas afectadas, con predicciones de aumento en los años venideros. Estudios recientes llevados a cabo en España, tales como el estudio Di@bet.es y otros¹, han detectado prevalencias cercanas al 12%. Aunque la DM1 representa solo un 10% de la población total de pacientes con DM, su incidencia también está aumentando considerablemente.

El tratamiento estándar para la DM1 se basa en la administración de insulina acompañado de un riguroso control de los niveles de glucosa en sangre. Sin embargo, la insulino-terapia difícilmente es capaz de conseguir un buen control glucémico, estando frecuentemente asociada a episodios de hipoglucemia severa, ya que la insulina exógena no es capaz de simular la fisiología de la secreción de insulina por parte de las células beta. Por esta razón, la búsqueda de nuevas fuentes de células que puedan suplir las células beta eliminadas en los pacientes con DM1 se ha convertido en un objetivo de primera necesidad.

En los últimos años, la medicina regenerativa ha sufrido un desarrollo considerable. Los avances en este campo se han vinculado estrechamente con los nuevos conocimientos adquiridos sobre las células troncales y su capacidad para convertirse en células con características propias de otros tejidos. En este sentido, la DM1 es una de las enfermedades que más podrían beneficiarse de intervenciones de medicina regenerativa, debido principalmente a que el origen de la enfermedad se encuentra en la alteración de un único tipo celular, la célula beta productora de insulina.

Terapia sustitutiva

Trasplante de islotes (Protocolo de Edmonton)

El primer trasplante de islotes pancreáticos realizado con éxito en animales de experimentación tuvo lugar en 1972^{2,3}. Dos años después se llevó a cabo el primer trasplante de islotes en un paciente diabético⁴. Sin embargo, a lo largo del tiempo esta aproximación terapéutica no se ha consolidado como una alternativa al trasplante de órgano sólido. De hecho, durante los 25 años posteriores al primer trasplante solo se realizaron unos 300 trasplantes de islotes en

pacientes con DM1⁵. En el año 2006, Shapiro et al.⁶ presentaron los resultados de un ensayo clínico multicéntrico donde se habían incluido 36 pacientes con DM1 trasplantados con islotes con el que consiguieron que un 67% de los mismos (n=24) mostraran al menos una función parcial de los islotes trasplantados. La insulino independencia al año del trasplante se consiguió en 58% de los pacientes (n=21). Este porcentaje disminuyó al 13,9% (n=5) trascurridos 2 años desde el momento del trasplante. Sin embargo, los niveles de péptido C fueron detectables (>0,3 ng/ml) en un 70% de los pacientes incluidos en este estudio a los 2 años del trasplante, lo que indica que los islotes trasplantados eran funcionales aunque insuficientes para normalizar la glucemia⁷. En este sentido, muchos de estos pacientes necesitaron 2 o 3 infusiones de islotes para conseguir la independencia de la insulina que, como ya se ha mencionado, en la mayoría de los casos no se mantuvo más de un año⁶.

Aunque los resultados obtenidos tras más de 1.000 intervenciones realizadas de trasplante de islotes a nivel mundial muestran el potencial terapéutico de esta estrategia, este procedimiento no ha llegado a convertirse en el tratamiento estándar para DM1 debido a: 1) la variabilidad en la calidad de los órganos donantes para proceder al aislamiento de los islotes, 2) la dificultad de la técnica para conseguir aislar un número suficiente de islotes y con un grado de viabilidad adecuado, 3) el alto coste que supone esta técnica, así como el mantenimiento de un laboratorio con personal altamente especializado y 4) la necesidad por parte del paciente receptor de vivir con un régimen inmunosupresor de por vida. Por esta razón, el trasplante de islotes es una estrategia terapéutica aplicada solo a un grupo reducido de pacientes caracterizados por una inestabilidad glucémica severa, hipoglucemia recurrente y poca capacidad para detectar los síntomas previos a la aparición de la hipoglucemia. En estos pacientes, el trasplante de islotes ha demostrado reducir la frecuencia de episodios de hipoglucemia mejorando la capacidad para detectar los momentos previos a un estadio de hipoglucemia.

Por otra parte, para poder hacer frente a la enorme demanda, debido al potencial número de receptores de trasplante, sería necesario disponer de sistemas de expansión de los islotes *in vitro*, o de fuentes alternativas de células productoras de insulina. En este sentido, las células troncales podrían jugar un papel relevante.

Células troncales

Características propias de las células beta

La extraordinaria sofisticación de las células beta pancreáticas surge como resultado de una compleja evolución. Estas células son capaces de regular de forma muy precisa la producción de insulina, con el objetivo de mantener los niveles de glucosa en plasma en un margen muy estrecho (entre 4 y 8 mM) en sujetos sanos. La precisión y rapidez con la que se controla esta secreción es extraordinaria, incrementando los niveles de insulina en sangre más de 50 veces tras la ingesta de alimento. Además, no solo se consiguen niveles elevados de insulina en un corto espacio de tiempo, sino que la capacidad de disminuir su secreción cuando su acción ya no es requerida tiene lugar de manera igualmente rápida, evitando así situaciones de hipoglucemia posprandial.

Tabla 1 Características específicas de una célula beta

Síntesis y acumulación de insulina e IAPP. Actividad de las convertasas PC1 y PC2 para procesar proinsulina
Secreción regulada: grandes cantidades de insulina liberadas de manera rápida frente al estímulo de la glucosa, así como otros nutrientes
Patrón de secreción de insulina: liberación temprana de insulina de forma bifásica incluyendo los siguientes componentes
1. Mecanismo de secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) dependiente de la actividad de: GLUT2/GLUCOKINASA, acoplados para el reconocimiento preciso de la insulina
2. Canal de potasio dependiente de ATP (KATP), incluyendo el poro del canal (KIR6.2) y la subunidad reguladora (SUR-1), que permita la depolarización de la membrana
3. Canales de calcio tipo L dependientes de voltaje
4. Proteínas SNARE responsables de la exocitosis de los gránulos de insulina
Bajos niveles de gluconeogénesis
Producción de lactato en bajos niveles
Bajo ratio de síntesis de ácidos grasos
Respuesta a incretinas: GLP-1 & GIP
Regulación precisa de la masa de células beta
Características específicas de una célula beta que presumiblemente deberían estar presentes en cualquier célula troncal que, tras ser convenientemente manipulada, pretenda ser utilizada en terapia celular sustitutiva para el tratamiento de la DM1.

Debido a la urgencia para desarrollar células capaces de producir insulina, han surgido múltiples estrategias, algunas de las más relevantes se comentarán a continuación. Sin embargo, hasta la fecha, lamentablemente ninguna de estas estrategias ha sido llevada a la clínica con éxito. La razón de ello es que ninguna de ellas ha conseguido generar verdaderas células beta. En la **tabla 1** se citan algunas de las propiedades que deberían cumplir las células beta generadas a partir de diferentes fuentes de células troncales para ser consideradas como tales⁸.

Además de cumplir todas las características citadas en la **tabla 1**, una vez encontrada la «célula ideal» capaz de detectar de forma precisa los niveles de glucosa y regular la secreción de insulina con una respuesta rápida y adecuada, es importante que esta célula pueda implantarse correctamente en localizaciones anatómicas diferentes al páncreas, siendo suficientemente resistente a fenómenos como la hipoxia, la inflamación y el ataque por parte del sistema inmunitario del hospedador⁸.

Células troncales pluripotentes

Células troncales embrionarias. La extraordinaria capacidad de diferenciación atribuida a las células troncales embrionarias (ESC)^{9,10} ha hecho que numerosos grupos de investigación se hayan centrado en estas células como base para la obtención de células productoras de insulina. La mayor parte de estos trabajos sugieren que el éxito en el proceso de diferenciación para obtener células beta se basa en la recapitulación *in vitro* de los pasos que tienen lugar

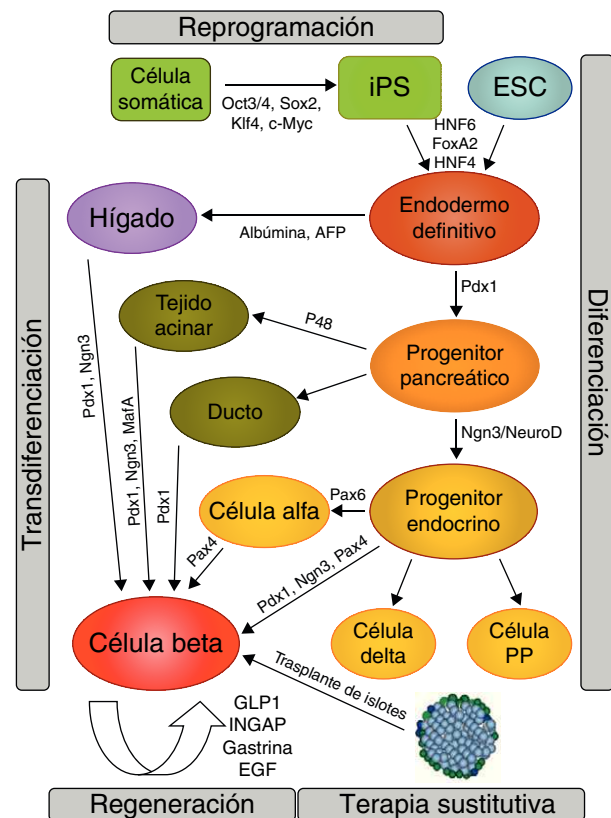


Figura 1 Estrategias utilizadas con diferentes tipos de células troncales para el tratamiento de la DM1. Dependiendo del tipo celular de partida, los factores que intervienen y las estrategias utilizadas son diferentes. Entre las más utilizadas destacan la reprogramación celular, diferenciación, transdiferenciación, regeneración y sustitución del tejido dañado (trasplante de islotes).

durante el desarrollo normal del páncreas *in vivo*^{11,12} (**fig. 1**). De acuerdo con estos estudios, los primeros pasos durante el desarrollo del páncreas consisten en la inducción del endodermo definitivo, paso que requiere de las señales inducidas por proteínas de la familia de TGF- β , tales como activina o nodal¹³. Aplicando estos conocimientos al proceso de diferenciación de ESC, recientemente se ha descrito que, tanto ESC de ratón como humanas, pueden ser convertidas a endodermo mediante el tratamiento con activina^{14,15}. Los pasos posteriores a la obtención de endodermo definitivo tienen como objetivo guiar el fenotipo de estas células prediferenciadas hacia la especificación pancreática, para continuar con la obtención de linaje endocrino y posterior maduración de las células beta pancreáticas^{12,16,17} (**fig. 1**). En este sentido, el grupo del Dr. Baetge inicialmente demostró que es posible obtener células progenitoras pancreáticas a partir de ESC, aunque estas células no eran capaces de producir insulina, siendo consideradas bastante inmaduras¹⁸. Recientemente, este mismo grupo de investigadores ha mejorado el proceso de diferenciación, llegando a obtener progenitores pancreáticos que, una vez trasplantados bajo la cápsula renal de ratones diabéticos, son capaces de diferenciarse hacia células beta maduras protegiendo a estos ratones de la hiperglucemia inducida tras la administración de estreptozotocina¹⁹.

Otras estrategias utilizadas para diferenciar ESC y así obtener células productoras de insulina, se han basado en la sobreexpresión de factores de transcripción clave en el desarrollo pancreático, tales como Pdx-1 o Pax-4^{20,21} o en la selección de ESC, previamente sometidas a un proceso de diferenciación, mediante el uso de promotores pancreáticos específicos, tales como el de la insulina, que dirigen la expresión de proteínas que confirieren resistencia a antibióticos²².

Los actuales protocolos de diferenciación que parten de ESC para obtener células productoras de insulina utilizan más de 10 proteínas recombinantes (citoquinas e inhibidores)²³. Aunque esta estrategia ha dado notables resultados, sin embargo, su aplicación a gran escala resulta inviable, en primer lugar por el coste de las citoquinas y los factores de crecimiento y la diferenciación que deberían producirse en condiciones aptas para su uso clínico, así como por el número de células necesarias para su trasplante. Por esta razón, las estrategias actuales se basan en el uso de pequeñas moléculas que es posible generar a gran escala en condiciones aptas para su uso clínico, de manera reproducible y con capacidad para dirigir la diferenciación de estas células hacia células beta de manera eficiente^{24,25}.

Sin embargo, todavía quedan por resolver varios aspectos que dificultan la aplicación clínica de las ESC para el tratamiento de la DM1. Entre estos, las consideraciones éticas respecto a su origen, la formación de teratomas y la dificultad para obtener verdaderas células beta que secreten la cantidad adecuada de insulina en respuesta a glucosa, son los principales problemas que impiden su aplicación.

Células troncales pluripotentes inducidas. Las investigaciones lideradas por el Dr. Yamanaka en la Universidad de Kyoto han supuesto un auténtico cambio de paradigma en la biología de las células troncales. Los resultados de su investigación demuestran que es posible revertir el destino de las células ya especializadas, algo hasta hace poco tiempo considerado imposible. La sobreexpresión de cuatro genes (Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc) en células somáticas ha permitido obtener células con características similares a las ESC, denominadas «*induced Pluripotent Stem cells*» (iPS), en cuanto al patrón de genes expresados y su potencial de diferenciación^{26,27}. El desarrollo de esta tecnología permitiría generar células pluripotentes a partir de células somáticas del propio paciente para su posterior trasplante, una vez diferenciadas hacia el tejido deseado. De esta manera, estas células no serían rechazadas por el sistema inmunitario del hospedador. En este sentido, ya se ha logrado generar iPS a partir de fibroblastos obtenidos de pacientes con DM1²⁸. Además, recientemente se ha demostrado que es posible generar células productoras de insulina a partir de iPS²⁹⁻³² así como revertir la hiperglucemia inducida experimentalmente en ratones³⁰.

Células troncales adultas

Células troncales hematopoyéticas. Las células troncales derivadas de la médula ósea (BM), principalmente las células troncales hematopoyéticas (HSC), poseen la capacidad de reconstituir el sistema hematopoyético. Estudios recientes sugieren que estas células pueden dar lugar a múltiples linajes celulares, incluyendo hepatocitos, neuronas, piel y músculo^{33,34}. De igual manera, algunos autores han sugerido que células procedentes de este tejido son capaces de

transdiferenciarse para dar lugar a células beta funcionales³⁵. Mediante el sistema Cre-LoxP, el grupo dirigido por el Dr. Hussain ha demostrado que, aunque con una baja frecuencia, células derivadas de la médula ósea pueden contribuir a la formación de nuevas células beta, que no son el resultado de procesos de fusión celular³⁵. Sin embargo, existe cierta controversia sobre el potencial de diferenciación de estas poblaciones celulares presentes en la médula ósea. En este sentido, varios grupos de investigación han mostrado que las células de médula ósea no tienen el potencial para generar células productoras de insulina. Aun así, se ha observado cierta mejoría al ser trasplantadas en ratones diabéticos³⁶⁻³⁸. Hasta la fecha se desconoce el mecanismo responsable de este fenómeno, aunque algunos investigadores sugieren que las células troncales derivadas de la médula ósea, pese a no diferenciarse a células beta, sí son capaces de inducir la regeneración de los islotes de manera indirecta³⁹.

Además de la supuesta capacidad de diferenciación atribuida a las células troncales de la médula ósea, algunos investigadores han sugerido que el potencial de estas células para reconstituir el sistema hematopoyético podría ser utilizado para el tratamiento de la DM1. En el año 2003, el grupo liderado por el Dr. Voltarelli llevó a cabo un ensayo clínico en fase I/II donde trataron a pacientes con DM1 de reciente diagnóstico con altas dosis de inmunosupresión acompañado de la administración de HSC⁴⁰. El objetivo principal de esta estrategia consistía en frenar el ataque inmunológico al que estaban sometidas las células beta de estos pacientes, mediante el uso de fármacos inmunosupresores, y restaurar el sistema inmunológico dañado utilizando HSC autólogas. Los investigadores mostraron resultados esperanzadores en 15 pacientes después de su seguimiento entre 7 y 36 meses, demostrando el potencial inmunomodulador de las células troncales de la médula ósea para el tratamiento de la DM1⁴⁰. Recientemente, este mismo grupo de investigación ha publicado resultados de la ampliación del ensayo clínico inicial, mostrando que 12 de los 20 pacientes con DM1 incluidos en este nuevo ensayo permanecieron libres del tratamiento con insulina exógena durante 31 meses (rango entre 14-52 meses)⁴¹. Aunque en un principio existió cierta controversia con los resultados obtenidos por estos investigadores, recientemente Snarski et al. han demostrado que el trasplante de células CD34+ autólogas junto con el tratamiento con ciclofosfamida y globulina anti-timocitos mejora el control glucémico en pacientes con DM1, disminuyendo el porcentaje de HbA1c tanto a 3 como 6 meses postrasplante⁴².

Células troncales mesenquimales. Las células troncales mesenquimales (MSC) fueron aisladas originariamente como una población con morfología fibroblástica capaz de dar lugar a precursores osteogénicos⁴³. Posteriormente se amplió su definición, siendo consideradas como una población de células multipotentes no-hematopoyéticas presentes en una baja proporción en la médula ósea con la capacidad de diferenciarse hacia múltiples linajes de origen mesenquimal, incluyendo hueso, grasa y cartílago⁴⁴. Aunque hasta la fecha no se ha identificado un marcador de membrana específico que defina las MSC, existe cierto consenso respecto a las características fenotípicas que definen esta población celular⁴⁵.

Además de la capacidad de las MSC para diferenciarse hacia tejido adiposo, hueso o cartílago⁴⁶, estas células son

capaces de sintetizar y secretar factores de crecimiento y citoquinas, tales como interleuquina (IL)-6, IL-11, IL-15 y VEGF, estando implicadas en la regulación de la hematopoyesis, en procesos de señalización celular y en la modulación de la respuesta inmunitaria⁴⁷. Es precisamente esta última propiedad la que las hace especialmente interesantes para su aplicación en el tratamiento de enfermedades de origen autoinmune, como es el caso de la DM1. Varios grupos de investigación han demostrado que el tratamiento de ratones NOD con MSC protege los islotes pancreáticos retrasando así la aparición de la enfermedad⁴⁸⁻⁵⁰. En este sentido cabe destacar que son varios los grupos que, aprovechando estas propiedades inmunomoduladoras de las MSC, han iniciado ensayos clínicos en pacientes con DM1 de reciente diagnóstico utilizando MSC derivadas tanto de médula ósea como de tejido adiposo (tabla 2).

Por otra parte, algunos grupos de investigación han sugerido que, aplicando determinados protocolos de diferenciación, es posible obtener células productoras de insulina a partir de MSC⁵¹⁻⁵³ que, una vez trasplantadas en modelos animales de diabetes, son capaces de revertir la hiperglucemia⁵³. Sin embargo, existen ciertas discrepancias sobre la robustez de los resultados obtenidos y la reproducibilidad de los mismos por otros grupos de investigación, no siendo, pese a la facilidad de obtención y crecimiento de las MSC, una de las estrategias comúnmente utilizada. No obstante, el grupo liderado por el Dr. Prockop ha demostrado que las MSC podrían jugar un papel relevante en la regeneración de los islotes pancreáticos dañados en un modelo de diabetes inducida artificialmente mediante el uso de estreptozotocina en ratones NOD/scid³⁹.

Células troncales de cordón umbilical. La sangre del cordón umbilical (UCB) contiene muchos tipos de células troncales entre las que se incluyen las HSC, MSC, células progenitoras endoteliales, monocitos y células troncales multipotentes derivadas de la sangre de cordón (CB-SC). Estas células han sido utilizadas en diferentes tipos de estrategias en medicina regenerativa⁵⁴. Además, la amplia experiencia clínica que se tiene en el uso de CB-SC sin ningún efecto adverso reportado en los pacientes trasplantados, hace que su aplicación, gracias al uso de bancos de células, sea inmediata⁵⁵. En este sentido, una de las enfermedades que más podría beneficiarse de las propiedades de estas células es la DM1⁵⁶. A nivel experimental, las 2 estrategias que se han ensayado utilizando CB-SC han sido la generación de células productoras de insulina^{57,58} y la inmunomodulación^{54,59}. Los resultados obtenidos en los estudios preclínicos han demostrado que las CB-SC son biológicamente seguras y efectivas en modelos de DM1⁵⁹. Por esta razón, se han iniciado varios ensayos clínicos en los que se pretende trasplantar células derivadas de cordón umbilical en pacientes con DM1 (tabla 2).

Células troncales del páncreas. Diversos estudios han permitido evidenciar que, bajo ciertos estímulos, la generación de nuevos islotes pancreáticos tiene lugar a partir de células troncales progenitoras que parecen emerger a partir de los ductos pancreáticos. De hecho, varios estudios *in vitro* han demostrado que es posible generar células productoras de insulina a partir de tejido ductal pancreático adulto^{60,61}. Estas células parecen tener capacidad para diferenciarse no solo hacia tejido endocrino sino también hacia tejido acinar pancreático y órganos de diferentes orígenes como

el hígado, el estómago y el intestino. Sin embargo, este fenómeno parece ser poco frecuente *in vivo* y dependiente del estímulo aplicado, siendo en muchos casos las propias células beta preexistentes las responsables de la formación de nuevas células productoras de insulina⁶². Otros autores afirman que existen células precursoras multipotentes en el páncreas capaces de dar lugar a células productoras de insulina⁶³. Estas células son capaces de proliferar *in vitro* formando colonias que se expanden de manera clonal y que coexpresan tanto marcadores pancreáticos como neurales.

Hasta la fecha no hay un consenso sobre la existencia de un progenitor de origen pancreático responsable de la regeneración del tejido endocrino, ni sobre los marcadores que debería expresar este hipotético progenitor. Sin duda, la baja tasa de renovación del propio páncreas está dificultando la localización de esta supuesta célula troncal pancreática.

Transdiferenciación celular

El término transdiferenciación se define como la conversión de un tipo celular totalmente desarrollado hacia otro que presenta un fenotipo completamente diferente^{64,65} (fig. 1). Tradicionalmente, solo aquellos tejidos que derivan de las regiones adyacentes de una misma capa embrionaria poseen el potencial de transdiferenciarse. Así, por ejemplo, se ha demostrado que los hepatocitos, que derivan del endodermo, son capaces de dar lugar a células que también se originan a partir de esta capa embrionaria, tales como las células beta pancreáticas⁶⁶. En comparación con las ESC, si utilizamos células cuyo origen embrionario es cercano al páncreas como punto de partida de la diferenciación, el número de pasos requeridos durante el proceso de transdiferenciación para conseguir el tejido definitivo es relativamente menor y, de igual manera, el tiempo necesario para completar este proceso. En este sentido, el uso de vectores virales para sobreexpresar genes importantes en el desarrollo del páncreas endocrino en tejidos como el hígado ha permitido generar células beta pancreáticas a partir de hepatocitos. De esta manera, mediante la expresión del factor de transcripción Pdx1, decisivo en el desarrollo del páncreas⁶⁷, se han obtenido células capaces de producir insulina en el hígado⁶⁸. Por otra parte, el grupo liderado por el Dr. Chan⁶⁹ utilizó un adenovirus que codificaba para el gen Neurogenina-3 en ratones diabéticos, pudiendo observar la generación de células productoras de insulina en el hígado, concretamente células situadas en las áreas periportales del hígado.

En este mismo sentido, la transferencia de 3 factores de transcripción (Pdx-1, Ngn3 y MafA) en el tejido acinar pancreático ha permitido obtener células beta con una eficiencia mayor que la observada a partir del tejido hepático⁷⁰. La mayor cercanía, en cuanto al origen del tejido acinar, respecto al tejido endocrino podría explicar los resultados obtenidos (fig. 1).

Regeneración

La generación de nuevas células beta a partir de la renovación de las células preexistentes se ha propuesto como una estrategia terapéutica cuyo objetivo último sería

Tabla 2 Ensayos clínicos iniciados o en fase de inicio basados en terapia celular para el tratamiento de la DM1

Referencia	Tipo celular	Cantidad	Vía administración	Edad	Nº pacientes	Patrocinador	Fechas (inicio - fin)	Estado	Investigador principal	Título
NCT01219465	MSC cordón umbilical	2×10^7 cells	IV	3-35	50	Qingdao University	Sept 2010 - Dec 2012	Activo, no reclutando	Yangang Wang	Safety and Efficacy of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Infusion for Initial Type 1 Diabetes
NCT01068951	MSC autólogas	2×10^6 cells/kg	IV	18-40	20	Uppsala University Hospital	Mar 2010 - Ene 2012	No reclutando todavía	Per-Ola Carlsson	Open Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Autologous Mesenchymal Stem Cells in Treatment of Recently Diagnosed Patients With Type 1 Diabetes Mellitus
NCT00315133	HSC autólogas	ND	IV	12-35	24	University of Sao Paulo	Dic 2003 - Dic 2012	Reclutando	Julio C Voltarelli	Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Early Onset Type 1 Diabetes Mellitus- a Phase I/II Study
NCT00788827	CD34+ autólogas	5×10^8	Páncreas	16-65	18	Imperial College London	Nov 2008 - Ene 2011	Reclutando	Charles Pusey	A Phase I Safety and Tolerability Study Following the Infusion of Autologous Expanded Progeny of an Adult CD34+ Stem Cell Subset (InsulinCytes) to Patients With Type I Diabetes Mellitus and a Successful Renal Transplant
NCT00807651	HSC autólogas	ND		14-35	30	Shanghai Jiao Tong University School of Medicine	Feb 2008 - Feb 2013	Reclutando	Guang Ning	Safety and Efficacy Study of Autologous Nonmyeloablative Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Early Onset Type 1 Diabetes-a Phase II Study

NCT01143168	BMMNC autólogas + MSC cordón umbilical		IV (3 veces, 1/semana)	18-50	24	Cellonis Biotechnology Co. Ltd.	Agos 2010 - Dic 2011	No reclutando todavía	Shi X Y	A Pilot Study on Transplantation Therapy Using Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells and Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus
NCT00690066	MSC (PROCHYMAL)	1-2 × 10E6/kg	IV	12-35	60	Osiris Therapeutics	Jun 2008 - Dic 2010	Activo, no reclutando	Osiris Therapeutics	A Phase II, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Evaluate the Safety and Efficacy of PROCHYMAL® (Ex Vivo Cultured Adult Human Mesenchymal Stem Cells) for the Treatment of Recently Diagnosed Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM)
NCT01157403	MSC autólogas	2.5 × 106 cells/kg	IV	10-40	80	Third Military Medical University	Jul 2010 - Aug 2012	Reclutando	Chen Bing	Autologous Transplantation of Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Patients With Onset of Type 1 Diabetes
NCT01121029	HSC autólogas	ND	IV	2-35	15	Hospital Universitario Dr. Jose E. Gonzalez	May 2010 - Mar 2011	Reclutando	Fernando J Lavalle	Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Type 1 Diabetes Mellitus
NCT00703599	Células madre autólogas derivadas de tejido adiposo	ND	IV	16-60	30	Adistem Ltd	Nov 2007 - Dic 2009	Reclutando	Letitia Lucero-Palma	Phase I/II Study of Intravenous Administration of Activated Autologous Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction in Patients With Type 1 Diabetes

Tabla 2 (Continuación)

Referencia	Tipo celular	Cantidad	Vía adminis- tración	Edad	Nº pacientes	Patrocinador	Fechas (inicio - fin)	Estado	Investigador principal	Título
NCT00703612	Células madre autólogas derivadas de tejido adiposo	ND	IV	40-70	34	Adistem Ltd	Nov 2007 - Dic 2009	Activo, no reclutando	Letitia Lucero- Palma	Phase I/II Study of Intravenous Administration of Activated Autologous Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction in Patients With Type 2 Diabetes
NCT00646724	MSC autólogas e islotes	ND		18-60	30	Fuzhou General Hospital	Ene 2008 - Ene 2011	Reclutando	Jianming Tan	Cotransplantation of Islet and Mesenchymal Stem Cell in Type 1 Diabetic Patients
NCT00989547	UCB autólogas	ND	IV	1-sin límite	10	Technische Universität München	Oct 2009 -	Reclutando	Anette- Gabriele Ziegler	Transfusion of Autologous Umbilical Cord Blood to Reverse Hyperglycemia in Children With Type 1 Diabetes - A Pilot Study.
NCT00873925	UCB autólogas	ND	IV	1-18	15	University of Florida	Mar 2009 - Mar 2012	Activo, no reclutando	Michael J Haller	Transfusion of Autologous Umbilical Cord Blood Plus Vitamin D and Omega 3 Fatty Acids to Preserve Beta Cell Function in Children With Recent Onset Type 1 Diabetes - A Pilot Study
NCT00445913	Células dendríticas autólogas	ND	IV	18-60	15	University of Pittsburgh	Mar 2007 - Jun 2011	Activo, no reclutando	Massimo Trucco	Autologous Dendritic Cell Therapy for Type 1 Diabetes Suppression: A Safety Study

Fuente: ClinicalTrials.gov.

incrementar la masa de células beta endógena (fig. 1). En modelos de pancreatoclectomía parcial se ha demostrado que la regeneración del tejido eliminado parece proceder principalmente de la proliferación de las células beta remanentes⁶². Sin embargo, se desconoce si esta repoblación tiene lugar a partir de la propia célula beta o de una célula troncal especializada presente dentro del islote o si todas las células beta presentes tendrían la misma capacidad de regeneración. En este sentido, la replicación de las células beta ha sido sugerida como el mecanismo presente en la expansión de la masa de célula beta en etapas temprana del desarrollo tras el nacimiento⁷¹. De igual manera, este mecanismo también parece estar involucrado en la adaptación de la masa de células beta en situaciones de mayor demanda, tales como el embarazo⁷².

Por esta razón, la búsqueda de factores tróficos implicados en la neogénesis de los islotes podría dar lugar a nuevas moléculas cuya aplicación última en la clínica sería la inducción de la replicación de las células beta endógenas. En este sentido se han identificado varias moléculas entre las que se encuentran los análogos de la incretina *glucagon-like peptide 1* (GLP-1)⁷³, la combinación del factor de crecimiento epidérmico (EGF) junto con gastrina⁷⁴, y, por último, proteínas asociadas a la neogénesis de islotes (INGAP)⁷⁵ (fig. 1).

Lamentablemente la tasa renovación de la célula beta adulta es muy baja y la regeneración de la masa de células beta a partir de las células beta preexistentes es una estrategia que presenta serias limitaciones en el tratamiento de la DM1, sobre todo teniendo en cuenta que en esta enfermedad las células beta son eliminadas de manera selectiva⁷⁶. Una posible aplicación de esta estrategia podría ser su combinación con algún tipo de tratamiento inmunosupresor que permitiera así evidenciar el verdadero efecto de la regeneración endógena de las células beta pancreáticas.

Inmunomodulación

Una de las estrategias terapéuticas donde se ha dedicado más esfuerzo en el tratamiento de la DM1 se basa en el bloqueo de la respuesta inmunitaria responsable de la destrucción de las células beta pancreáticas. El objetivo fundamental de este tipo de intervenciones es retrasar o prevenir la aparición de la enfermedad, en aquellos casos en los que hay indicios, o frenar su evolución cuando esta ya se ha instaurado. Un aspecto de gran importancia para el éxito de esta estrategia consiste en la identificación de aquellos individuos que poseen un riesgo relativo de padecer la enfermedad⁷⁷. Sin embargo, la mayoría de los pacientes con DM1 no tienen un familiar con DM1, lo cual dificulta su identificación. La habilidad para predecir la aparición de DM1 basándose en evidencias inmunológicas, genéticas y marcadores metabólicos ha sido ampliamente utilizada, aunque los resultados obtenidos no han llegado a ser realmente concluyentes⁷⁸.

En el caso de la DM1, la mayoría de las inmunointervenciones que se realizan para detener la enfermedad comienzan poco después de su identificación. El objetivo común de estas estrategias terapéuticas consiste en preservar la función de la masa de células beta remanente, permitiendo así un mejor control glucémico que evitaría futuros episodios de hipoglucemia y complicaciones a largo

plazo asociadas a la enfermedad. En la actualidad, la evaluación de la función de las células beta pancreáticas se realiza mediante la determinación de los niveles de péptido C en respuesta a un estímulo que induzca su secreción⁷⁹. En este sentido, alguna de las aproximaciones utilizadas han mostrado resultados prometedores. Entre estas se cuentan el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CD3 (teplizumab⁸⁰ y otelexizumab⁸¹), el anticuerpo monoclonal anti-CD20 (rituximab)⁸², una vacuna GAD⁸³ y aproximaciones más agresivas, que ya han sido mencionadas con anterioridad, que implican protocolos de inmunosupresión basados en tratamientos con ciclofosfamida y globulina anti-timocito en combinación con el trasplante de células de médula ósea autólogas^{40,41}.

Respecto al uso de células troncales con propiedades inmunomoduladoras para el tratamiento de la DM1, recientemente se ha probado con éxito el uso de MSC en el modelo de ratón diabético NOD⁴⁸⁻⁵⁰. Los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación demuestran que las MSC ejercen un efecto protector sobre los islotes pancreáticos, disminuyendo la insulitis y retrasando así la aparición de la enfermedad. Como ya se ha mencionado con anterioridad, estos esperanzadores resultados han animado el desarrollo de ensayos clínicos con diferentes tipos de células troncales con el objeto de frenar el ataque inmunológico y proteger o incluso restaurar la función celular beta (tabla 2).

Monitorización de la función celular beta en la diabetes mellitus tipo 1

Para el desarrollo de cualquier estrategia terapéutica en la DM1 uno de los aspectos en los que debería ponerse especial interés es la determinación precisa de la función de la célula beta. Si bien existen biomarcadores (glucosa plasmática, niveles de insulina, niveles de péptido C) que indican la función de la célula beta pancreática, desafortunadamente no pueden considerarse como predictores reales o marcadores surrogados del desarrollo de la enfermedad, dado que sus niveles dependen de muchas otras variables biometabólicas y de parámetros de comorbilidad asociados a la diabetes. Además, los mecanismos de compensación de la homeostasis glucídica hacen que las alteraciones sustanciales de los niveles de los referidos biomarcadores aparezcan demasiado tarde en el proceso de la enfermedad, por lo que no pueden emplearse como verdaderos marcadores centinela.

Un biomarcador de células beta pancreáticas debería permitir una mejor comprensión de la fisiopatología de la pérdida de estas células durante el proceso de desarrollo de la DM1. La capacidad de secreción de insulina tras sobrecarga de glucosa se emplea actualmente como una medida indirecta de la masa de células beta. Sin embargo, las mediciones de la secreción de insulina presentan diversas limitaciones, no solo por su incapacidad para predecir el desarrollo de la enfermedad, dado que el estrés metabólico o una respuesta inflamatoria reversible pueden comprometer la función de las células beta sin que exista una pérdida real de estas, sino también por su gran variabilidad⁸⁴ y por el metabolismo hepático de la insulina.

El péptido C se segrega junto a la molécula de insulina en cantidades equimolares y, a diferencia de lo que ocurre con la insulina, no sufre metabolismo hepático por lo que se

considera un marcador de la secreción endógena de insulina. Las concentraciones plasmáticas de péptido C se pueden medir en situación basal o tras estímulo con una comida mixta líquida o con glucagón⁷⁹.

La toma de muestras de células beta mediante técnicas invasivas no es solo un procedimiento invasivo técnicamente complejo, sino que además debe tenerse en cuenta la morbilidad asociada a un procedimiento que debe considerarse de elevado riesgo.

Un biomarcador adecuado de células beta mediante imagen molecular debe dirigirse frente a una diana que sea específica de dichas células y que a pesar de su baja proporción en el tejido pancreático permita no solo su identificación y visualización, sino también una cuantificación precisa.

La tomografía de emisión de positrones (PET) es una técnica utilizada frecuentemente para la visualización *in vivo* de diversos parámetros biológicos y fenómenos de neurotransmisión. Entre las ventajas sustanciales de la PET se encuentran: 1) una extraordinaria sensibilidad que permite detectar cantidades picomolares de los compuestos radiactivos directamente en el tejido diana, 2) la posibilidad de llevar a cabo estudios de cuerpo entero, 3) de hacer estudios de seguimiento longitudinal en un mismo sujeto a lo largo del tiempo, y 4) el hecho de que la traslacionalidad de los estudios en animales a estudios clínicos en seres humanos puede hacerse de manera muy rápida. En la identificación de biomarcadores para imagen molecular que permitan la cuantificación no invasiva de la masa de célula beta se han identificado una serie de marcadores que podrían ser característicos de las células beta⁸⁵. Entre estos genes destaca el del transportador vesicular de monoaminas VMAT2, que se expresa en las células beta y en las neuronas monoaminérgicas del sistema nervioso central, pero no en el páncreas exocrino^{86,87}.

Aunque hasta la fecha no existe ningún biomarcador PET establecido para la identificación y cuantificación de las células beta, se han llevado a cabo experiencias piloto con algunos compuestos tales como ¹¹C-acetato⁸⁸, dirigido frente a los transportadores aniónicos de los acinos pancreáticos, o ¹¹C-dihidrotetrabenazina (¹¹C-DTBZ)⁸⁹ o su análogo fluorado ([¹⁸F]FP-DTBZ)⁹⁰ como ligandos de VMAT2.

Ensayos clínicos con células troncales para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1

El número de ensayos clínicos basados en terapia celular para el tratamiento de pacientes con DM1 se ha incrementado considerablemente en los últimos 5 años. La mayoría de estos ensayos tiene como finalidad el bloqueo de la respuesta autoinmune desencadenante en último término de la aparición de la enfermedad. Los tipos celulares elegidos para el tratamiento de la DM1 son fundamentalmente MSC, HSC y UCB (tabla 2). La experiencia previa en el cultivo de estas células en condiciones aptas para su uso clínico, así como los buenos resultados obtenidos en otras enfermedades de origen autoinmune, sin la observación de efectos adversos no deseados, han supuesto su rápida aplicación en la DM1.

Todavía serán necesarios unos cuantos años hasta que el uso de células troncales con potencial para diferenciarse hacia células productoras de insulina sea una realidad.

Controversias

El objetivo de cualquier terapia cuya finalidad sea el tratamiento de la DM1 ha de pasar irremediablemente por la consecución de células capaces de producir y secretar insulina en respuesta a glucosa o, en el caso que sea posible, la preservación y/o regeneración de la masa de célula beta presente en el páncreas del paciente con DM1. Tal y como se ha mencionado con anterioridad, estas células podrían ser obtenidas a partir de células troncales de diferentes orígenes y con distintas propiedades o de los propios islotes pancreáticos. Aunque se han realizado ciertos avances en la aplicación de determinadas poblaciones de células troncales en pacientes con DM1 (tabla 2), todavía quedan algunas cuestiones por resolver antes de que la terapia celular sea una realidad. Entre estas destacan: 1) el potencial oncogénico de algunas poblaciones de células troncales (ESC e iPS), 2) el debate ético sobre el origen de determinados tipos de células troncales (ESC), 3) los posibles efectos adversos derivados de un control impreciso de la glucemia, 4) la inmunosupresión generalizada mediada por algunas poblaciones de células troncales (MSC, CB-SC, BM) y, a efectos prácticos, 5) la posibilidad de generar un número suficiente de células para su trasplante.

Conclusiones

Restaurar la funcionalidad de la masa de célula beta en los pacientes con DM1 es un objetivo de primera necesidad en la investigación en diabetes. El trasplante de islotes es probablemente la vía más rápida para conseguir su aplicación clínica, pero también es la alternativa que más problemas puede conllevar, entre las que destaca la escasez de islotes suficientes para tratar a todos los pacientes con DM1, sumado a las complicaciones asociadas a la medicación aplicada para evitar su rechazo. El uso de células troncales podría superar estos inconvenientes, en especial utilizando aquellas células que muestren un mayor potencial para diferenciarse hacia célula beta y cuyo origen sea autólogo. Sin embargo, hasta la fecha ninguna célula ha mostrado comportarse tal y como lo hace una célula beta. Por esta razón, muchas de las estrategias terapéuticas que en la actualidad se encuentran en fase de ensayo clínico se basan en potenciar la regeneración de la masa de células beta endógena combinado con el bloqueo de la respuesta autoinmune que desencadena la enfermedad. Con estas estrategias se pretende proteger o incluso potenciar la capacidad regenerativa del páncreas endocrino evitando así la eliminación selectiva de los islotes generados *de novo*. En este sentido, la terapia farmacológica podría potenciar los efectos beneficiosos observados con la terapia celular.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Valdés S, Rojo-Martínez G, Soriguer F. Evolution of prevalence of type 2 diabetes in adult Spanish population. *Med Clin (Barc)*. 2007;129:352–5.
- Ballinger WF, Lacy PE. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery*. 1972;72:175–86.
- Reckard CR, Barker CF. Transplantation of isolated pancreatic islets across strong and weak histocompatibility barriers. *Transplant Proc*. 1973;5:761–3.
- Najarian JS, Sutherland DE, Matas AJ, Steffes MW, Simmons RL, Goetz FC. Human islet transplantation: a preliminary report. *Transplant Proc*. 1977;9:233–6.
- Ricordi C, Strom TB. Clinical islet transplantation: advances and immunological challenges. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:259–68.
- Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med*. 2006;355:1318–30.
- Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*. 2005;54:2060–9.
- Weir GC. Can we make surrogate beta-cells better than the original? *Semin Cell Dev Biol*. 2004;15:347–57.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:8424–8.
- Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 2001;19:193–204.
- Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*. 2008;132:661–80.
- Spence JR, Wells JM. Translational embryology: using embryonic principles to generate pancreatic endocrine cells from embryonic stem cells. *Dev Dyn*. 2007;236:3218–27.
- Tremblay KD, Hoodless PA, Bikoff EK, Robertson EJ. Formation of the definitive endoderm in mouse is a Smad2-dependent process. *Development*. 2000;127:3079–90.
- D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazar S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol*. 2005;23:1534–41.
- Yasunaga M, Tada S, Torikai-Nishikawa S, Nakano Y, Okada M, Jakt LM, et al. Induction and monitoring of definitive and visceral endoderm differentiation of mouse ES cells. *Nat Biotechnol*. 2005;23:1542–50.
- Gittes GK. Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. *Dev Biol*. 2009;326:4–35.
- Murtaugh LC. Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. *Development*. 2007;134:427–38.
- D'Amour KA, Bang AG, Eliazar S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2006;24:1392–401.
- Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol*. 2008;26:443–52.
- Miyazaki S, Yamato E, Miyazaki J. Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes*. 2004;53:1030–7.
- Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, et al. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:998–1003.
- Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes*. 2000;49:157–62.
- Zhang D, Jiang W, Shi Y, Deng H. Generation of pancreatic islet cells from human embryonic stem cells. *Sci China C Life Sci*. 2009;52:615–21.
- Zaret KS. Using small molecules to great effect in stem cell differentiation. *Cell Stem Cell*. 2009;4:373–4.
- Borowiak M, Maehr R, Chen S, Chen AE, Tang W, Fox JL, et al. Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009;4:348–58.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663–76.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861–72.
- Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Goland R, et al. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:15768–73.
- Thatava T, Nelson TJ, Edukulla R, Sakuma T, Ohmine S, Tonne JM, et al. Indolactam V/GLP-1-mediated differentiation of human iPS cells into glucose-responsive insulin-secreting progeny. *Gene Ther*. 2011;18:283–93.
- Alipio Z, Liao W, Roemer EJ, Waner M, Fink LM, Ward DC, et al. Reversal of hyperglycemia in diabetic mouse models using induced-pluripotent stem (iPS)-derived pancreatic beta-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:13426–31.
- Zhang D, Jiang W, Liu M, Sui X, Yin X, Chen S, et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res*. 2009;19:429–38.
- Tateishi K, He J, Taranova O, Liang G, D'Alessio AC, Zhang Y. Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *J Biol Chem*. 2008;283:31601–7.
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001;105:369–77.
- Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000;290:1775–9.
- Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest*. 2003;111:843–50.
- Hess D, Li L, Martin M, Sakano S, Hill D, Strutt B, et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol*. 2003;21:763–70.
- Mathews V, Hanson PT, Ford E, Fujita J, Polonsky KS, Graubert TA. Recruitment of bone marrow-derived endothelial cells to sites of pancreatic beta-cell injury. *Diabetes*. 2004;53:91–8.
- Choi JB, Uchino H, Azuma K, Iwashita N, Tanaka Y, Mochizuki H, et al. Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2003;46:1366–74.
- Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:17438–43.
- Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F, et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA*. 2007;297:1568–76.
- Couri CE, Oliveira MC, Stracieri AB, Moraes DA, Pieroni F, Barros GM, et al. C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem

- cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA*. 2009;301:1573–9.
42. Snarski E, Milczarczyk A, Torosian T, Paluszewska M, Urbanowska E, Król M, et al. Independence of exogenous insulin following immunoablation and stem cell reconstitution in newly diagnosed diabetes type I. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46:562–6.
 43. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4:267–74.
 44. Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9:641–50.
 45. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7:393–5.
 46. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143–7.
 47. Caplan AL, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98:1076–84.
 48. Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, et al. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol*. 2009;183:993–1004.
 49. Jurewicz M, Yang S, Augello A, Godwin JG, Moore RF, Azzi J, et al. Congenic mesenchymal stem cell therapy reverses hyperglycemia in experimental type 1 diabetes. *Diabetes*. 2010;59:3139–47.
 50. Madec AM, Mallone R, Afonso G, Abou Mrad E, Mesnier A, Eljaafari A, et al. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia*. 2009;52:1391–9.
 51. Oh SH, Muzzonigro TM, Bae SH, LaPlante JM, Hatch HM, Petersen BE. Adult bone marrow-derived cells transdifferentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab Invest*. 2004;84:607–17.
 52. Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol*. 2004;10:3016–20.
 53. Wu XH, Liu CP, Xu KF, Mao XD, Zhu J, Jiang JJ, et al. Reversal of hyperglycemia in diabetic rats by portal vein transplantation of islet-like cells generated from bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol*. 2007;13:3342–9.
 54. Francese R, Fiorina P. Immunological and regenerative properties of cord blood stem cells. *Clin Immunol*. 2010;136:309–22.
 55. Gluckman E. History of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44:621–6.
 56. Reddi AS, Kuppasani K, Ende N. Human umbilical cord blood as an emerging stem cell therapy for diabetes mellitus. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010;5:356–61.
 57. Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PLoS One*. 2008;3:e1451.
 58. Pessina A, Eletti B, Croera C, Savalli N, Diodovich C, Gribaldo L. Pancreas developing markers expressed on human mononucleated umbilical cord blood cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;323:315–22.
 59. Haller MJ, Viener HL, Wasserfall C, Brusko T, Atkinson MA, Schatz DA. Autologous umbilical cord blood infusion for type 1 diabetes. *Exp Hematol*. 2008;36:710–5.
 60. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:7999–8004.
 61. Heremans Y, Van De Casteele M, in't Veld P, Gradwohl G, Serup P, Madsen O, et al. Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. *J Cell Biol*. 2002;159:303–12.
 62. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*. 2004;429:41–6.
 63. Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB, et al. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol*. 2004;22:1115–24.
 64. Slack JM, Tosh D. Transdifferentiation and metaplasia-switching cell types. *Curr Opin Genet Dev*. 2001;11:581–6.
 65. Eguchi G, Kodama R. Transdifferentiation. *Curr Opin Cell Biol*. 1993;5:1023–8.
 66. Horb ME, Shen CN, Tosh D, Slack JM. Experimental conversion of liver to pancreas. *Curr Biol*. 2003;13:105–15.
 67. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*. 1994;371:606–9.
 68. Ber I, Shternhall K, Perl S, Ohanuna Z, Goldberg I, Barshack I, et al. Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation. *J Biol Chem*. 2003;278:31950–7.
 69. Yechoor V, Liu V, Espiritu C, Paul A, Oka K, Kojima H, et al. Neurogenin3 is sufficient for transdetermination of hepatic progenitor cells into neo-islets in vivo but not transdifferentiation of hepatocytes. *Dev Cell*. 2009;16:358–73.
 70. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*. 2008;455:627–32.
 71. Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, Monchamp T, Galasso R, Bhushan A, et al. Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes*. 2008;57:1584–94.
 72. Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R, Rizza RA, Corradin A, Cobelli C, et al. Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia*. 2010;53:2167–76.
 73. Ghofaili KA, Fung M, Ao Z, Meloche M, Shapiro RJ, Warnock GL, et al. Effect of exenatide on beta cell function after islet transplantation in type 1 diabetes. *Transplantation*. 2007;83:24–8.
 74. Suarez-Pinzon WL, Lakey JR, Brand SJ, Rabinovitch A. Combination therapy with epidermal growth factor and gastrin induces neogenesis of human islet beta-cells from pancreatic duct cells and an increase in functional beta-cell mass. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:3401–9.
 75. Dungan KM, Buse JB, Ratner RE. Effects of therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus with a peptide derived from islet neogenesis associated protein (INGAP). *Diabetes Metab Res Rev*. 2009;25:558–65.
 76. Gianani R. Beta cell regeneration in human pancreas. *Semin Immunopathol*. 2011;33:23–7.
 77. Ziegler AG, Nepom GT. Prediction and pathogenesis in type 1 diabetes. *Immunity*. 2010;32:468–78.
 78. Skyler JS, Greenbaum CJ, Lachin JM, Leschek E, Rafkin-Mervis L, Savage P, et al. Type 1 Diabetes TrialNet—an international collaborative clinical trials network. *Diabetes TrialNet Study Group*. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1150:14–24.
 79. Greenbaum CJ, Mandrup-Poulsen T, McGee PF, Battelino T, Haastert B, Ludvigsson J, et al. Type 1 Diabetes Trial Net Research Group; European C-Peptide Trial Study Group. Mixed-meal tolerance test versus glucagon stimulation test for the assessment of beta-cell function in therapeutic trials in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2008;31:1966–71.
 80. Herold KC, Hagopian W, Auger JA, Poumian-Ruiz E, Taylor L, Donaldson D, et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2002;346:1692–8.
 81. Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, Mathieu C, Kaufman L, Hale G, et al. Insulin needs after CD3-antibody

- therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2005;352:2598–608.
82. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE, Goland R, et al. Type 1 Diabetes TrialNet Anti-CD20 Study Group. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med.* 2009;361:2143–52.
83. Ludvigsson J, Faresjö M, Hjorth M, Axelsson S, Chéramy M, Pihl M, et al. GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2008;359:1909–20.
84. Brandenburg D. History and diagnostic significance of C-peptide. *Exp Diabetes Res.* 2008, doi:10.1155/2008/576862.
85. Maffei A, Liu Z, Witkowski P, Moschella F, Del Pozzo G, Liu E, et al. Identification of tissue-restricted transcripts in human islets. *Endocrinology.* 2004;145:4513–21.
86. Fagerholm V, Mikkola KK, Ishizu T, Arponen E, Kauhanen S, Nägren K, et al. Assessment of islet specificity of dihydrotetrabenazine radiotracer binding in rat pancreas and human pancreas. *J Nucl Med.* 2010;51:1439–46.
87. Eriksson O, Jahan M, Johnström P, Korsgren O, Sundin A, Halldin C, et al. In vivo and in vitro characterization of [¹⁸F]-FE-(+)-DTBZ as a tracer for beta-cell mass. *Nucl Med Biol.* 2010;37:357–63.
88. Shreve PD, Gross MD. Imaging of the pancreas and related diseases with PET carbon-11-acetate. *J Nucl Med.* 1997;38:1305–10.
89. Souza F, Simpson N, Raffo A, Saxena C, Maffei A, Hardy M, et al. Longitudinal noninvasive PET-based beta cell mass estimates in a spontaneous diabetes rat model. *J Clin Invest.* 2006;116:1506–13.
90. Singhal T, Ding YS, Weinzimmer D, Normandin MD, Labaree D, Ropchan J, et al. Pancreatic Beta Cell Mass PET Imaging and Quantification with [(11)C]DTBZ and [(18)F]FP-(+)-DTBZ in Rodent Models of Diabetes. *Mol Imaging Biol.* 2011;13:973–84.