

# Células madre y diabetes. Visión desde la diabetología pediátrica

F. Martín, P. Vaca, G. Berná y B. Soria

Instituto de Bioingeniería. E-03550 San Juan de Alicante. España.

### INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es un problema de salud que afecta a todas las sociedades independientemente de su grado de desarrollo. Además, el coste humano, social y económico que desarrolla es importante.

En España casi 2.500.000 personas padecen diabetes mellitas. Esto supone aproximadamente un 6% de la población. La incidencia de diabetes tipo 1 es de 10-12 casos nuevos/100.000 habitantes/año, de los cuales aproximadamente 9 son menores de 15 años. Se estima que la incidencia de la diabetes tipo 1 en menores de 14 años es del 0.092%. Además, existen datos que sugieren un aumento progresivo de la incidencia, siendo la pubertad, la edad de máximo riesgo de aparición. Con respecto a la diabetes tipo 2, el número de casos nuevos por año es de 60-150/100.000 habitantes/año. Los cambios ocasionados en los hábitos de vida (comida excesiva e inadecuada y sedentarismo) están ocasionando un incremento, en el mundo occidental, en la incidencia de este tipo de diabetes en niños y adolescentes.

Algunos otros datos de interés para España señalan que la retinopatía diabética afecta al 40-50% de los diabéticos, la prevalencia de enfermedad coronaria es mucho mayor en diabéticos, el 50% de los diabéticos presentan hipertensión arterial, el 2,1% de los diabéticos sufren amputaciones y que esta enfermedad es la 3.<sup>a</sup> causa de muerte en mujeres y la 7.<sup>a</sup> en hombres.

Todos estos números suponen que el 7% del gasto sanitario está dedicado a la diabetes y sus complicaciones.

Los estudios del UKPDS<sup>1</sup> han demostrado que el control intensivo de la glucemia disminuye de forma significativa la aparición de complicaciones microvasculares de la diabetes mellitus, pero para ello el paciente debe someterse a un control permanente de la glucemia y a la administración intensiva (cinco o seis veces día) de insulina. Esto supone pacientes muy entrenados y motivados. Por otro lado, a pesar de todo, la terapia intensiva con insulina es incapaz de normalizar completamente los niveles de hemoglobina glicosilada y aumenta en

aproximadamente tres veces el riesgo de sufrir hipoglucemias severas. Además, no libera a los pacientes de la dependencia de insulina, algo que sería esencial en los niños.

Recientemente, Shapiro et al<sup>2</sup> demostraron que usando una terapia inmunosupresora sin glucocorticoides, combinada con un trasplante adecuado de una masa suficiente de islotes frescos y libres de xenoproteínas era posible mantener pacientes libres de insulina exógena y con un buen control metabólico por un periodo superior a un año. Este nuevo protocolo, que ha supuesto un enorme avance en el trasplante de islotes, deja sin embargo dos puntos abiertos. El primero es que los diabéticos trasplantados necesitan terapia inmunosupresora continua, algo que de nuevo es mas importante en un niño que en una persona mayor, dado el mayor tiempo de administración de los inmunosupresores en los primeros. En segundo lugar, para cada diabético se necesitan, como mínimo, de uno a dos donantes. Dado que las cifras de donantes, incluso en países como España, con un alto nivel de donación de órganos, nunca alcanzarán las necesidades de la población de diabéticos, se impone la necesidad de buscar otras fuentes de células  $\beta$  pancreáticas para poder ser trasplantadas. En este sentido, una posible solución es la terapia celular, cuyo objetivo es la obtención de sustitutos biológicos que puedan restaurar, mantener o mejorar la función de los tejidos dañados, las células  $\beta$  en el caso de la diabetes.

Por otro lado, el diseño de células secretoras de insulina, a partir de células madre, ofrece una serie de ventajas potenciales con respecto al uso de islotes de donantes cadavéricos: *a)* la posibilidad de crecerlas a bajo coste y en una cantidad ilimitada; *b)* pueden cultivarse en un medio libre de patógenos; *c)* al ser clonales retienen características funcionales muy reproducibles y se pueden seleccionar y *d)* se pueden manipular genéticamente para modificarlas según nuestros intereses, por ejemplo, hacerlas menos susceptibles a ataques inmunes, con lo cual se podría evitar utilizar inmunosupresores.

## CONCEPTOS Y TIPOS DE CÉLULAS MADRE

El concepto más actual que existe sobre las células madre las define como células que forman clones, los cuales son capaces de auto regenerarse y diferenciarse en múltiples tipos de tejidos, aunque no pueden formar totalmente un nuevo ser vivo. La primera propiedad supone la capacidad de dividirse de un modo continuo y prácticamente ilimitado, dando lugar a hijas que son exactamente iguales a la madre. La segunda característica, la pluripotencialidad, indica la capacidad de diferenciarse a cualquier tipo o linaje celular del organismo<sup>3</sup>. Estas dos características son las que les confieren el tremendo potencial de aplicación clínica que tienen estas células.

Las células madre se pueden clasificar sobre la base de su grado de pluripotencialidad o diferenciación y según su origen. No obstante, ambas clasificaciones están relacionadas, ya que según su origen tendrán mayor o menor capacidad de diferenciación<sup>4</sup>. Así pues, de mayor a menor grado demostrado de pluripotencialidad pueden ser: *a*) embrionarias (ESC), que derivan de la masa celular interna de un blastocisto; *b*) de la línea embrionaria germinal (EGC), que se obtienen de las gónadas de fetos que no llegan a término; *c*) obtenidas de carcinomas embrionarios (ECC) y *d*) obtenidas a partir de células madres presentes en diversos tejidos adultos, como por ejemplo sistema nervioso, músculo o médula ósea.

## OBTENCIÓN DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA A PARTIR DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENCIALES

Numerosos estudios han comprobado que "in vitro" y bajo ciertas condiciones, las células madre se pueden diferenciar espontáneamente a líneas derivadas del mesodermo, como cardiomiocitos y a líneas derivadas del ectodermo como precursores neurales<sup>5</sup>. Sin embargo, la diferenciación "in vitro" hacia células derivadas del endodermo, como por ejemplo células  $\beta$ , es bastante difícil y raramente se produce espontáneamente. No obstante, algunos grupos han presentado resultados esperanzadores en la diferenciación "in vitro" dirigida hacia células secretoras de insulina a partir de células madre pluripotenciales, usando distintos protocolos de diferenciación, selección y maduración.

Recientemente, nuestro grupo demostró con un sistema que permitía seleccionar aquellas células que producían insulina, mediante la utilización de un antibiótico, que era posible obtener células productoras de insulina que normalizaban la glucemia en animales diabéticos durante más de 40 semanas<sup>6-8</sup>. Posteriormente, ha habido otros grupos, que con mayor o menor éxito y utilizando distintas estrategias han sido capaces de obtener células productoras de insulina a partir de células madre pluripotenciales.

Las estrategias utilizadas son distintas. En este sentido, hay algunos estudios que describen que es posible obte-

ner células productoras de insulina a partir de células madre embrionarias mediante procesos de diferenciación espontánea<sup>7,9,10</sup>. Estos protocolos solo obtienen un pequeño porcentaje de células que contienen insulina y que no son capaces de liberarla. Otro camino que se puede emplear consiste en forzar la diferenciación de estas células hacia células de estirpe endocrina. Para ello se utilizan estrategias físicas (cultivar las células en presencia de distintos sustratos y materiales), químicas (cultivar las células en presencia de distintos factores de crecimiento y diferenciación) o ambas<sup>6,11-13</sup>. Otro procedimiento consiste en aumentar la expresión de genes reguladores que son fundamentales para la embriogénesis de las células beta pancreáticas<sup>14</sup>.

Un aspecto muy importante de todos estos protocolos es que hay que utilizar estrategias que nos permitan seleccionar, de entre todas las células que están en el cultivo, aquellas células que producen insulina. Para ello se suele utilizar estrategias de selección clonal. Consiste en incorporar a las células un gen quimérico que hace que las células que expresan insulina sean resistentes a un antibiótico (neomicina) y tengan una actividad beta-galactosidasa (lo cual permite teñir de azul a las células que expresan la insulina) (fig. 1).

Por último, tenemos que estar seguros que las células que hemos obtenidos tienen todas las características posibles de una célula beta. Para ello, en las células diferenciadas y seleccionadas hay que estudiar: *a*) presencia de genes propios de célula beta; *b*) presencia de proteínas propias de célula beta (fig. 2); *b*) contenido y secreción de insulina en respuesta a nutrientes y sulfonilureas.

Tras esto, el paso final es trasplantarlas a un modelo de animal diabético y ver que son capaces de normalizar la glucemia (fig. 3).

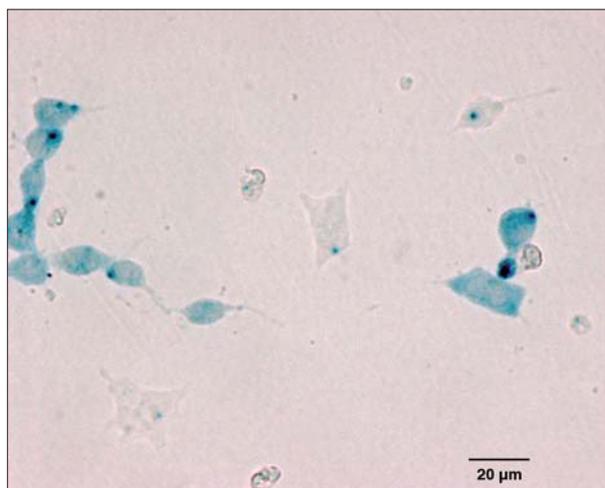
Los distintos protocolos publicados han tenido distinto éxito en estas aproximaciones.

## APROXIMACIONES FUTURAS

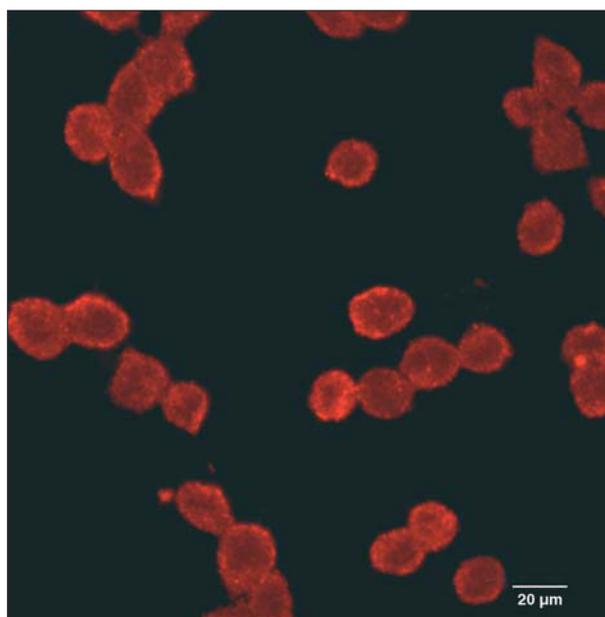
Los protocolos capaces de obtener células secretoras de insulina a partir de células madre embrionarias de ratón ya están establecidos y son repetitivos y fiables. Además, parece que las células madre embrionarias de ratón son poco inmunogénicas, por lo que la probabilidad de rechazo es prácticamente nula, evitando en este sentido la posibilidad de administrar inmunosupresores.

Los estudios llevados a cabo con células embrionarias humanas están en sus comienzos y todo lo que se ha aprendido en los modelos animales hace presuponer que la investigación con células embrionarias humanas irán a buen ritmo.

Finalmente, en los últimos años, las investigaciones en el campo de la biología celular de las células madre pluripotenciales está avanzando a gran velocidad. La obtención de líneas de células madre embrionarias a partir de procesos de transferencia nuclear permitirán generar cé-

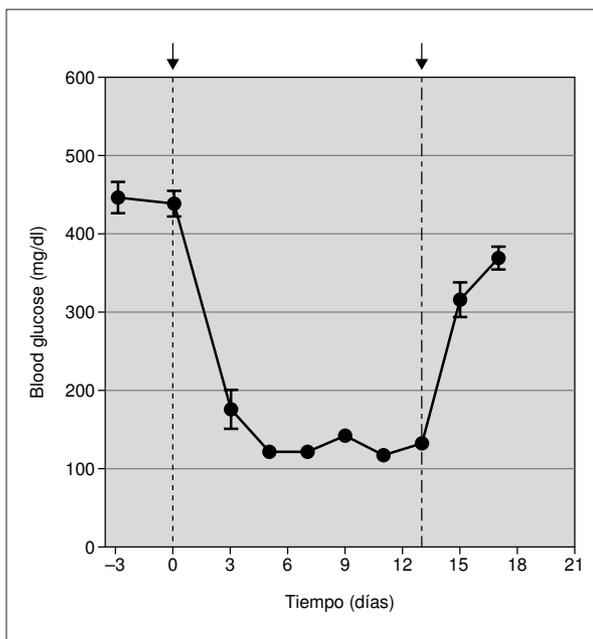


**Figura 1.** Células madre embrionarias de ratón con actividad beta galactosidasas positiva después de su selección. Las células que están expresando insulina aparecen en color azul.



**Figura 2.** Células productoras de insulina obtenidas a partir de células madre embrionarias de ratón. Se trata de una imagen de microscopía confocal donde se muestra una inmunocitoquímica con células marcadas con un anticuerpo anti-insulina unido a TRITC (rojo).

lulas madre de los propios pacientes, con lo cual se evitaría completamente el problema del rechazo. Constantemente están apareciendo nuevos estudios que añaden nuevas vías y perspectivas a la potencialidad de las células madre pluripotenciales obtenidas de tejidos adultos, las cuales, además de resolver los problemas éticos, permitirían la posibilidad del autotrasplante. No obstante, todavía es necesario continuar en la búsqueda de la cé-



**Figura 3.** Glucemias tras una noche de ayuno en animales transplantados con células productoras de insulina obtenidas a partir de células madre embrionarias. La glucemia se midió entre las 9:00 y las 11:00 am, tras obtener una gota de la cola. Se utilizó un glucómetro portátil. Los animales se hicieron diabéticos tres días antes del trasplante mediante la inyección intraperitoneal de 200 mg 7 kg de peso de streptozotocina. La primera flecha señala el día que se transplantaron  $5 \times 10^6$  células en la cápsula renal. La segunda flecha indica el día que se extrajo el trasplante.

lula madre correcta y de los protocolos de crecimiento y diferenciación adecuados. Además, para los diabéticos tipo 1 es fundamental desarrollar protocolos que produzcan un bloqueo adecuado y seguro de la autoinmunidad, ya que en ellos este proceso es tan importante como podría ser la reacción normal de rechazo al tejido transplantado.

En definitiva, la investigación con células madre ha abierto nuevos caminos que ofrecen soluciones prometedoras y que requieren todavía de un gran esfuerzo investigador antes de que pueda ser materializado su uso como aplicaciones terapéuticas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837-53.
2. Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *New E J Med* 2000;325:1371-2.

3. Berná G, León-Quinto T, Fuentes E et al. Ingeniería celular y diabetes mellitus. *Rev Clin Esp* 2001;201:548-56.
4. Berná G, León-Quinto T, Enseñat-Waser R, Montanya E, Martín F, Soria B. Stem cells and diabetes. *Biomed. Pharmacother* 2001;55:206-12.
5. Martín F, Jones J, Vaca P, Berná G. y Soria B. Production of insulin secreting cells from stem cells. En: Largeault F, ed. *Journées Annuelles de Diabetologie de L'Hotel-Dieu* 2003. París: Flammarion Médecine-Sciences, p. 23-30.
6. Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycaemia in streptozotocin-diabetic mice. *Diabetes* 2000;49:157-62.
7. Soria B, Andreu E, Berná G et al. Engineering pancreatic islets. *Pflügers Arch* 2000;440:1-18.
8. Soria B, Skoudy A, Martín F. From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia* 2001;44:407-15.
9. 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.
10. Shiroi A, Yoshikawa M, Yokota H et al. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone. *Stem Cells* 2002;20:284-92.
11. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreas islets. *Science* 2001;292:1389-94.
12. Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit J, Cahoy JD, Kim SK. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16105-10.
13. Moritoh Y, Yamato E, Yasui Y, Miyazaki S, Miyasaki J. Analysis of insulin-producing cells during in vitro differentiation from feeder-free embryonic stem cells. *Diabetes* 2003;52:1163-8.
14. Blyszczuk P, Czyz J, Kania G et al. Expression of Pax-4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:998-1003.