

Perspectivas en la terapia celular de la diabetes mellitus

B. Soria

CABIMER (Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa). Isla de la Cartuja. Sevilla.

INTRODUCCIÓN

Los estudios de tipo prospectivo y epidemiológico (DCCT, UKPDS)^{1,2} han demostrado que el control intensivo de la glucemia en pacientes diabéticos adultos disminuye de forma significativa la aparición de complicaciones microvasculares (retinopatía, nefropatía, neuropatía). Sin embargo, la terapia intensiva con insulina precisa de pacientes adultos, entrenados y muy motivados y a demás aumenta el riesgo de sufrir hipoglucemias. El tratamiento intensivo intenta reproducir el control fisiológico (permanente, preciso y regulado) de la glucemia sanguínea, para ello el paciente debe someterse a un control permanente de la glucemia y a la administración intensiva (4-6 veces día) de insulina. La tarea que el páncreas endocrino realiza de forma continua es sustituida por la conducta de un paciente entrenado y motivado, como afirma María de Alva, diabética y ex-Presidenta de la International Diabetes Federation: "my brain is my pancreas", reforzando el irremplazable papel de la Educación Diabetológica. Los distintos modelos de "bombas de insulina" representan una aproximación similar. Sin embargo, una terapia que conduzca a que no se pierda o se recupere la homeostasis de la glucosa en la diabetes mellitas tipo 1 sólo puede venir de:

- la protección de destrucción de la población celular beta mediante la predicción y prevención de su desaparición;
- la reposición de la población celular beta mediante la terapia celular substitutiva, o
- la regeneración pancreática.

PPREDICCIÓN Y PREVENCIÓN DE LA DESAPARICIÓN DE LA MASA CELULAR BETA

Predicción de la DM tipo 1

Estudios genéticos

El objetivo de estos estudios es identificar los genes que determinan el riesgo de padecer Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1). El "Type 1 Diabetes Genetics Consortium (T1DGC) (www.t1dgc.org) es un esfuerzo internacional dirigido a caracterizar y localizar dichos genes en grupos multiétnicos. El grupo europeo (www.et1dgn.org) persigue establecer los mecanismos que permiten el trabajo colaborativo en genética y patogenia de la DM1. Aunque existen dudas razonables acerca de su capacidad predictiva³ este tipo de estudios permitirá saber más de la genética de la DM1.

Determinación de autoanticuerpos

La segunda estrategia es la determinación de autoanticuerpos (Anti-Insulina, Anti-GAD65, IA-2, etc.). Se trata de un marcador de la actividad linfocitaria CD4+ que inicia el ataque autoinmune tras la presentación de antígenos⁴ y que en algunos casos puede aparecer hasta diez años antes del inicio de la DM1. Un estudio multicéntrico cuidadoso exige acreditar los laboratorios de forma que la sensibilidad y especificidad de las determinaciones sean aceptables y similares, de otro modo resulta imposible establecer correlaciones y concordancias. Se puede concluir que la combinación de tres au-

Correspondencia: Dr. Bernat Soria
CABIMER (Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa).
Américo Vesputio, s/n. 41092 Isla de la Cartuja, Sevilla.
Correo electrónico: bsoria@cabimer.es

toanticuerpos posee un alto valor predictivo⁵ de la pérdida de masa celular beta y de las futuras necesidades de insulina.

Determinantes medioambientales

Se acepta que la patogenia de la DM1 exige tras un primer contacto (iniciación pero sin autoinmunidad) la exposición a factores medioambientales entre los que se incluyen factores de la dieta (proteínas de la leche de vaca), toxinas (N-nitrosamina), virus (parotiditis, rubéola, CMV, enterovirus, virus Coxsakie), bacterias, etc. promueve la aparición de la diabetes clínica. La identificación de los factores medioambientales es extremadamente compleja y exige estudios epidemiológicos como los estudios DIPP ("Diabetes Prediction and Prevention Study") y TEDDY (The Environmental Determinants of Diabetes in the Young). La identificación del "trigger", de los antígenos o de los factores medioambientales puede ayudarnos a impedir la aparición o el progreso de la DM1.

Prevención de la DM tipo 1

Vacunación

Si el factor acompañante es una infección viral una de las estrategias de prevención puede ser la vacunación. Existen bastantes datos que apuntan hacia la conexión entre un enterovirus (virus Coxsakie B4) y la DM1⁶. La vacunación también puede ser una estrategia terapéutica para reprogramar la auto-tolerancia a las propias células beta.

Inmunointervención

La historia natural de la DM1 muestra que tras la infiltración del páncreas hay una disminución de la respuesta insulínica, aunque las células beta continúen en el páncreas. Es decir que existe una ventana temporal para la inmunointervención. En la década de los 80 se pudo demostrar que la administración de inmunosupresores como la ciclosporina preservaba la función celular beta durante períodos de hasta 12 meses⁷⁻⁹. Sin embargo los inhibidores de la calcineurina son muy nefrotóxicos, lo que imposibilitaba este tipo de estudios. La inmunosupresión disminuye todas las respuestas inmunes, necesita de un tratamiento continuado y posee muchos efectos secundarios (aumenta la incidencia de infecciones, tumores, nefrotoxicidad, etc.). Es más, muchos inmunosupresores son tóxicos para el islote y producen diabetes (Diabetes Post-Trasplante). Por el contrario, la inmunomodulación permite tratamientos cortos dirigidos a uno de los mediadores del proceso. En un ensayo clínico más reciente, basado en un estudio experimental muy robusto^{10,11} el uso de un anticuerpo anti-CD3 permitió preservar la función pancreática y disminuir las necesidades de insulina en pacientes

DM1 recién diagnosticados y con una función residual beta suficientemente alta¹².

TERAPIA CELULAR SUSTITUTIVA

Trasplante de islotes pancreáticos

El alotrasplante de islotes pancreáticos ha sido propuesto como una técnica que permite la curación de la diabetes. La simplificación del procedimiento quirúrgico, comparado con el trasplante de páncreas, así como la posibilidad de realizar trasplantes sucesivos (hasta dos o tres) en el mismo paciente, en función de sus necesidades, ha estimulado los esfuerzos en esta dirección. Si se consideran aparte los autotrasplantes con más de 300.000 islotes trasplantados (1) (en los que se registró un porcentaje alto de independencia de insulina para períodos superiores a doce meses), la esperanza de alcanzar la curación mediante este procedimiento no ha sido alcanzada. Los datos del grupo de Edmonton, que se aproximaban al 100% de independencia de insulina a los 12 meses, muestran una disminución al 50% a los tres años y al 15-20% a los cinco años^{13,14}. Cifras muy inferiores a las del doble trasplante riñón-páncreas que, a pesar de su mayor complejidad quirúrgica y del uso de inmunosupresores convencionales, alcanza un éxito del 80%. ¿A qué se debe esta diferencia? No tenemos una respuesta para esta pregunta pero es probable que la recurrencia del proceso autoinmune, el sitio de trasplante (alta concentración de inmunosupresores en el hígado) o la ausencia de progenitores en los preparados que se implantan tengan algo de responsabilidad. En cualquier caso el trasplante de islotes pancreáticos ha demostrado que la terapia sustitutiva permite el control de la glucemia y la disminución de las complicaciones micro y macrovasculares.

Futuro de los Trasplantes de Islotes Pancreáticos:

1. Los pacientes con nefropatía subsidiaria de diálisis funcionan más adecuadamente con un trasplante doble de páncreas y riñón. Esta técnica, no exenta de complicaciones, ya que se trata de cirugía mayor, tiene un 80% de éxitos (independencia de insulina) y está plenamente justificada. Las características del donante y del receptor limitan esta técnica a un grupo de pacientes. Se puede afirmar que se trata de un protocolo establecido¹⁶ pero cuyo potencial de crecimiento es muy limitado. Al contrario, el trasplante de islotes, aunque presenta muchas limitaciones posee un alto potencial de innovación, puede utilizar los órganos que se descartan en el trasplante de órgano sólido y es mucho más factible desde el punto de vista quirúrgico.

(1) Dado que los islotes humanos son muy variables en su tamaño, se viene utilizando el IEQ o equivalentes de islotes, este índice se obtiene sumando los diversos diámetros de islotes y dividiendo por su valor promedio (150 µm).

2. El alotrasplante de islotes pancreáticos está justificado en ese momento en aquellos pacientes diabéticos cuyo riesgo vital es superior a los efectos secundarios de los inmunosupresores. La diabetes inestable o el trasplante de islotes a diabéticos trasplantados renales son indicaciones obvias.

3. Por último, la existencia de Unidades de Obtención de Islotes con un nivel de entrenamiento adecuado¹⁶, permite ofertar el autotrasplante de islotes pancreáticos, del que se sabe con un 71% de éxito cuando se trasplantan más de 300.000 islotes, debería ser una técnica accesible en aquellos casos en los que se necesita de la resección pancreática total y se desea evitar la diabetes yatrogénica.

Terapia celular de la diabetes mediante células madre

Una célula madre o troncal (2) es una célula progenitora de otros tipos celulares. En términos generales se acepta que una célula troncal posee dos propiedades básicas: la capacidad de renovarse a sí misma (dar lugar a células idénticas) y la capacidad de diferenciarse en otros tipos celulares. Una consecuencia de lo anterior es que dichas células poseen la capacidad para colonizar y repoblar un tejido. Las células madre pueden clasificarse por su origen y por su potencialidad. Por su origen las células madre se clasifican en embrionarias, fetales y del adulto, mientras que por su potencialidad se dividen en totipotentes (pueden dar lugar al cualquier tipo celular), pluripotentes (si pueden diferenciarse en prácticamente todos los tipos celulares), multipotentes (cuando pueden dar lugar a varios tipos celulares) y unipotentes si son los progenitores de un solo tipo celular. La potencialidad de una célula madre puede demostrarse in-vitro e in-vivo. In-vitro se comprueba mediante la aparición de perfiles de expresión génica, proteica y propiedades fisiológicas propias de células diferenciadas, mientras que in-vivo el mejor procedimiento es implantarlas en ratones inmunodeprimidos (que no las rechazarán) y observar si aparecen tumores de tipo teratoma, en los que se aprecia diferenciación hacia varios tipos celulares (por ejemplo tejido nervioso, piel, glándulas, músculo, hueso, cartílago, etc.).

Células madre embrionarias

Derivan de la masa celular interna (ectodermo primitivo o epiblasto) de un embrión preimplantatorio (blastocisto de 5-7 días en los embriones humanos y de 3 días en los de ratón). Estas células pueden diferenciarse in-vitro o in-vivo en tipos celulares propios de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ecto-

dermo) y mantienen sus propiedades proliferativas, de diferenciación y de autorenovación a lo largo del tiempo. La alta capacidad de proliferación y de diferenciación de las células madre de origen embrionario las hace especialmente atractivas ya que pueden dar lugar a cualquiera de los tipos celulares presentes en el adulto o durante el desarrollo fetal.

Diferenciación in-vitro

Mediante diferenciación in vitro se han obtenido cardiomiocitos, neuronas dopaminérgicas, motoneuronas, precursores hematopoiéticos, adipocitos, etc. Incluso estructuras más complejas, como vasos. Este último caso involucra la participación de más de un tipo celular y exigen el ensamblaje según un patrón espacial. Las técnicas para la diferenciación in-vitro se basan en la combinación varias estrategias. Por ejemplo la *expresión de genes maestros*, que a su vez dirigen la expresión de un gran grupo de genes y determinan la aparición de tipos celulares diferenciados y de estructuras complejas, el *uso de factores de crecimiento* y otros factores que modulen la expresión génica y *las técnicas de cultivo*. Los derivados del ectodermo o del mesodermo son más fáciles de obtener (in vitro) que los derivados del endodermo. La célula beta deriva del endodermo y además aparece estructurada en islotes en las últimas etapas del desarrollo fetal. El trabajo pionero de mi grupo, publicado en el año 2000, describe las líneas maestras del procedimiento para obtener células productoras de insulina a partir de células madre¹⁷ que continúan siendo utilizados en protocolos más recientes. Los trabajos publicados a continuación intentan ir resolviendo los aspectos puntuales de los procedimientos de diferenciación, selección y maduración de las células productoras de insulina¹⁷⁻²⁶. Incluyendo identificar las rutas (equivocadas) hacia exocrino²⁷ o derivados neurales²⁸.

Selección de linajes celulares

Un problema común a todos los procesos de diferenciación in-vitro es que la resultante del procedimiento es siempre una mezcla del tipo celular buscado con otros tipos celulares. No existe ningún procedimiento que genere un 100% de células diferenciadas. Algunas de las células pueden incluso no haberse diferenciado lo que conlleva el peligro de formación de teratomas si se trasplantan a otro organismo (3). Por lo

(2) El término inglés para célula madre es "stem cell". La traducción más correcta es célula troncal, sin embargo en español se ha popularizado el término célula madre, por lo que se usará indistintamente uno u otro.

(3) Esta posibilidad ha generado muchas controversias. En nuestra experiencia trasplantando células a ratones diabéticos hemos observado que cuando se trasplantan células diferenciadas y se excluye las no diferenciadas nunca se observan tumores. Sin embargo, cuando no se seleccionan y se incorporan células no diferenciadas la posibilidad de generar tumores (teratomas) es próxima al 100%.

tanto se precisa de métodos de selección para obtener poblaciones celulares puras. Los métodos de selección pueden ser muy variados e incluyen el *cultivo en medios específicos*, donde solo crezca el tipo celular, la *inmunoseparación* si se dispone de anticuerpos contra una proteína de superficie específica de dicho tipo celular o la *expresión de un gen marcador*. Es decir, utilizando un procedimiento de selección genética basado en la incorporación de un transgen, que contenga la zona reguladora del gen de la proteína marcadora fusionado con un gen estructural que codifique una proteína que confiere resistencia a un antibiótico. Por lo tanto, sólo las células que expresen el gen serán al mismo tiempo resistentes al antibiótico. La adición del antibiótico al medio de cultivo permite la obtención de poblaciones puras. Este procedimiento se ha utilizado con éxito en la obtención de células productoras de insulina¹⁷⁻²⁶. Frente a otros métodos posee la ventaja de que selecciona células que expresan el gen y no por la presencia de una proteína, que por formar parte del medio de cultivo puede haber sido captada por endocitosis²⁹. La caracterización del tipo celular alcanzado suele realizarse analizando los transcritos de ARN mediante PCR y las proteínas mediante inmunocitoquímica. Sin embargo, sólo la caracterización funcional y sobre todo la recuperación de la función una vez trasplantadas, permiten garantizar que se alcanzó el resultado previsto.

Maduración celular

Los procedimientos de diferenciación in-vitro y de selección de un tipo celular no siempre acaban produciendo un tipo celular similar a la célula diferenciada adulta, sino que las células obtenidas pueden poseer rasgos de células fetales o de células neonatales, cuya fisiología difiere de la que conocemos en los individuos adultos. En ocasiones el proceso de diferenciación precisa de mensajes procedentes de las células vecinas y la maduración hasta célula diferenciada adulta tiene lugar tras el trasplante.

Plasticidad de las células madre del adulto

En los últimos años, y quizás ligado al cambio de paradigma introducido con el descubrimiento de la oveja Dolly³⁰, se han descrito numerosas evidencias de transdiferenciación tanto in-vivo como in-vitro, de forma que una célula de origen adulto puede adquirir una capacidad de expansión y diferenciación similar a las embrionarias. Esta posibilidad, que está siendo objeto de un estudio intenso, abre numerosas posibilidades terapéuticas.

En el adulto existen células madre específicas de aquellos tejidos que o bien están sometidos a una renovación constante (piel, epitelio intestinal, sangre, etc.) o poseen una cierta capacidad de regeneración o de aumento de masa (hígado, músculo esquelético).

TABLA 1. Células madre candidatas (“in vivo” o “in vitro”) a progenitores de células productoras de insulina

<i>Células Madre Embrionarias</i>
Ratón
Humanas
<i>Células Madre Fetales</i>
Amnion
<i>Células Madre del Adulto</i>
Hígado
Páncreas Exocrino
Epitelio Ductal
Replicación de Células Beta
Médula Ósea
Monocitos

Sin embargo, cuando se habla de las células madre del adulto se suelen referir a la plasticidad que en los últimos años se ha encontrado en células procedentes de tejidos adultos. Por ejemplo en células que hasta entonces se consideraba que no poseían capacidad de dividirse (sistema nervioso), en células de la médula ósea, etc. En este sentido puede resultar práctico separar las células madre del adulto en dos grupos: las células madre predeterminadas o comprometidas con la renovación de un tejido (progenitoras de uno o varios tipos celulares) y las células madre pluripotenciales del adulto.

Plasticidad de los monocitos

Los monocitos son un subtipo de glóbulos blancos de los que se sabe que son precursores de macrófagos, células dendríticas y osteoclastos. En colaboración con los Dres Ruhnke y Fandrich, de la Universidad de Kiel, hemos podido demostrar que en presencia de IL-3 y M-CSF durante seis días se transforman en un tipo celular al que hemos llamado PCMO (“programmable cells of monocyte origin”) que continúa mostrando características de monocitos (CD14+) pero a su vez adquieren una plasticidad no descrita previamente. Por ejemplo, pueden diferenciarse hacia células similares a los hepatocitos o hacia células productoras de insulina³¹.

Recientemente se han propuesto otras fuentes alternativas para generar células beta.

1. Replicación células Beta diferenciadas.
2. Diferenciación a partir de células ductales.
3. Diferenciación a partir de células acinares.
4. Diferenciación a partir de progenitores interpancreáticos
5. Diferenciación a partir de células hepáticas
6. Diferenciación a partir de progenitores de la médula ósea

¿Qué hay que trasplantar: células beta o islotes?

La célula beta es un sistema eficiente para detectar la concentración de glucosa extracelular y liberar la insulina necesaria para normalizar dicha cifra. Es decir, un implante de células beta será siempre más eficiente que la terapia intensiva con insulina. Sin embargo, se sabe que la célula beta no está en condiciones fisiológicas dispersa en el hígado o en el páncreas. Las células beta se encuentran, junto con otros tipos celulares formando islotes, u otras agrupaciones como los cuerpos de Brokman, en prácticamente todos los vertebrados. El islote pancreático es un microórgano con un alto grado de complejidad³². Se sabe que el islote pancreático es un microórgano profusamente vascularizado e inervado en el que existen cuatro tipos celulares (células α , β , δ y PP) organizadas con una arquitectura característica y con un funcionamiento integrado y regulado por la presencia de nutrientes³³⁻³⁶. La población celular β se organiza en grupos de forma que todas las células forman un sincitio funcional, gracias a la conexión mediante uniones en gap^{37,38}. Esta es la razón por la que responden de forma sincrónica a concentraciones extracelulares de glucosa que superan las cifras fisiológicas y constituye la base estructural y fisiológica de la secreción pulsátil de insulina. Por el contrario, las células δ , que responden a la ausencia, más que a la presencia, de nutrientes, no están conectadas mediante uniones en gap y responden de forma asincrónica³⁹. Las células δ , secretoras de somatostatina, cumplen un papel paracrino y regulan el funcionamiento de las células beta³². El islote de Langerhans funcionan como un integrador de señales metabólicas, nerviosas y hormonales³⁹⁻⁴², que determinan no solamente la secreción de insulina, glucagon y somatostatina, sino la expresión génica⁴¹⁻⁴³. De todo esto se deduce que el correcto funcionamiento de la célula beta supone su integración dentro del islote, algo que las técnicas de ingeniería celular deben tratar de reproducir.

La posibilidad de generar in-vitro islotes en vez de células beta aparece como una posibilidad más pertinente y atractiva que la de producir "sólo" células beta. Para ello el procedimiento más eficaz sería aislar el progenitor del páncreas endocrino y comprobar si a partir de estas células podemos regenerar islotes.

REGENERACIÓN PANCREÁTICA

Los estudios de inmunomodulación con anti-CD3 no permiten concluir que el páncreas de un individuo adulto posea capacidad de regeneración. La interpretación más plausible de los resultados es que existe una proporción de células beta que resisten el ataque autoinmune. La infiltración linfocitaria disminuye la secreción de insulina y los monoclonales anti-CD3 la restablecen. Sin embargo en otras especies, como el ratón y

la rata, el páncreas posee una cierta capacidad de regeneración tras la pancreatectomía, la lesión con estreptozotocina o el ligado del ducto pancreático. Se conocen algunos agentes extracelulares (gastrina, miembros de la familia EGF y GLP –Exendina) que promueven la regeneración. Sin embargo, los resultados dependen mucho del modelo elegido. Los mecanismos de la regeneración pancreática propuestos incluyen:

- Replicación de la célula beta.
- Desdiferenciación hacia células mesenquimales o del epitelio ductal y posterior diferenciación hacia célula beta.
- Neoformación de células beta a partir de precursores de la médula ósea.
- Neogenesis a partir de células acinares.
- Neogenesis a partir de células ductales.

Estos mecanismos no son alternativos. Es probable que sea similar a lo que ocurre en el hígado. Tras una hepatectomía parcial el hígado regenera mediante replicación de hepatocitos, pero si se compromete la proliferación se disparan otros mecanismos como la regeneración a partir de células madre hepáticas (¿células ovals?). El "pool" de células madre hepáticas sería a su vez rellenado por progenitores de la médula ósea. Hasta que punto estos mecanismos están presentes en el páncreas humano o si son susceptibles de ser activados es un tema objeto de investigación en este momento.

PÁNCREAS BIOARTIFICIAL

El páncreas bioartificial es un dispositivo que combina células con biomateriales. Por ejemplo, la microencapsulación con biopolímeros (alginato) de islotes pancreáticos. El objetivo es permitir el paso de nutrientes y de insulina y de impedir el acceso de células (linfocitos, macrófagos) y de anticuerpos cuyo peso molecular es mucho mayor y pueden ser excluidos por la apertura de la malla ("cut-off") de la cápsula. Los intentos realizados hasta el momento se han encontrado con dificultades de oxigenación de la parte central del islote y con la imposibilidad de detener el acceso de citocinas, cuyo peso molecular es cercano al de la insulina. En la actualidad existen varios prototipos más donde recientes se ha resuelto de forma bastante eficaz la oxigenación y se han diseñado sistemas para rechazar no sólo a la fracción celular y las inmunoglobulinas sino al complemento y citocinas. Si estos dispositivos tienen éxito se podría volver a plantear el uso de islotes pancreáticos de origen porcino (xenotrasplantes) sin necesidad de tratamiento inmunosupresor. Un sistema de estas características también permitiría la administración periódica de células productoras de insulina obtenidas partir de células madre.

BIBLIOGRAFÍA

- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993;329:977-86.
- 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.
- Gillespie KM, Bain SC, Barnett AH, Bingley PJ, Christie MR, Gill GV, Gale EA. The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes. *Lancet.* 2004;364:1699-1700.
- Kent SC, Chen Y, Bregoli L, Clemmings SM, Kenyon NS, Ricordi C, Hering BJ, Hafler DA. Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. *Nature.* 2005;435:224-8.
- Krischer JP, Cuthbertson DD, Yu L, Orban T, Maclaren N, Jackson R, Winter WE, Schatz DA, Palmer JP, Eisenbarth GS. Screening strategies for the identification of multiple antibody-positive relatives of individuals with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:103-8.
- Ylipaasto P, Klingel K, Lindberg AM, Otonkoski T, Kandolf R, Hovi T, Roivainen M. Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. *Diabetologia.* 2004;47:225-39.
- Feutren G, Papoz L, Assan R, Vialettes B, Karsenty G, Vexiau P, Du Rostu H, Rodier M, Sirmaj J, Lallemand A, et al. Cyclosporin increases the rate and length of remissions in insulin-dependent diabetes of recent onset. Results of a multicentre double-blind trial. *Lancet.* 1986;2:119-24.
- Bougnères PF, Carel JC, Castano L, Boitard C, Gardin JP, Landais P, Hors J, Mihatsch MJ, Paillard M, Chaussain JL, et al. Factors associated with early remission of type 1 diabetes in children treated with cyclosporine. *N Engl J Med.* 1988;318:663-70.
- The Canadian-European Randomized Control Trial Group. Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention. Association of 1 yr of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion. *Diabetes.* 1988;37:1574-82.
- Chatenoud L. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:123-32.
- Belghith M, Bluestone JA, Barriot S, Megret J, Bach JF, Chatenoud L. TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nat Med.* 2003;9:1202-8.
- Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, Mathieu C, Kaufman L, Hale G, Gorus F, Goldman M, Walter M, Candon S, Schandene L, Crenier L, De Block C, Seigneurin JM, De Pauw P, Pierard D, Weets I, Rebello P, Bird P, Berrie E, Frewin M, Waldmann H, Bach JF, Pipeleers D, Chatenoud L. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2005;352:2598-608.
- Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a corticoid-free immunosuppressive regime. *N Eng J Med.* 2000;343:230-8.
- Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes.* 2005;54:2060-9.
- Organización Nacional de Trasplantes. Documento de consenso sobre trasplante de páncreas e islotes. Grupo Aula Médica S.L. 2005. ISBN 84-7885-397-9.
- Cuesta AL, Soria B. Trasplante de islotes pancreáticos y obtención de células productoras de insulina a partir de células troncales. *Cardiovascular Risk Factors.* 2004;13:237-42.
- 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-induced diabetic mice. *Diabetes.* 2000;49:157-62.
- Soria B, Skoudy A, Martín F. From stem cells to β -cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2001;44:407-15.
- Soria B. In-vitro differentiation of pancreatic β -cells. *Differentiation.* 2001;68:205-19.
- Martín F, Jones J, Vaca P, Berná G, Soria B. Production de cellules sécrétant l'insuline à partir de cellules souches. *Flammarion Médecine-Sciences. Journées de Diabetologie.* 2002. *Diabetologie.* 2003; 23-30. Flammarion ISSN 0075-4439; ISBN 2-257-10842-6.
- Vaca P, Berna G, Martín F, Soria B. Nicotinamide induces both proliferation and differentiation of embryonic stem cells into insulin producing cells. *Transplant Proc.* 2003;35:2021-3.
- Roche E, Burcin MM, Esser S, Rüdiger M, Soria B. The use of gating technology in bioengineering insulin-secreting cells from embryonic stem cells. *Cytotechnology.* 2003;41:145-51.
- Roche E, Sepulcre P, Ensenat-Wasser R, Maestre I, Reig JA, Soria B. Bioengineering insulin secreting cells from embryonic stem cells: a review of progress. *Med Biol Eng Comput.* 2003;41:384-91.
- León-Quinto T, Jones J, Skoudy A, Burcin M, Soria B. In-vitro directed differentiation and selection of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Diabetologia.* 2004;47:1442-51.
- Soria B, Bedoya FJ, Martín F. Pancreatic stem cells. *Amer J Physiol.* 2005;289:177-80.
- Soria B, Roche E, Reig JA, Martín F. Generation of insulin-producing cells from stem cells. En: *Stem cells: nuclear reprogramming and therapeutic applications.* 2005. ISBN: 0-470-091436. Vol 265: 158-173
- Skoudy A, Rovira M, Savatier P, Martín F, León-Quinto T, Soria B, Real FX. TGF beta, FGF and retinoid signalling pathways promote pancreatic exocrine gene expression in mouse embryonic stem cells. *Biochem J.* 2004;379:749-56.
- Roche E, Sepulcre P, Reig JA, Santana A, Soria B. Ectodermal commitment of insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells. *FASEB J.* 2005;19:1774-86.
- Rajagopal J, Anderson WJ, Kume S, Martinez OL, Melton DA. Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science.* 2003;299(5605):363.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature.* 1997;385:810-13.
- Runhke M, Ungefroren H, Nussler A, Martín F, Brulport M, Schorman W, Hengstler JG, Klapper W, Ulrichs K, Hutchinson JA, Soria B, Parwaresch RM, heeck P, Kremer B, Fandrich F. Reprogramming human peripheral blood monocytes into functional hepatocyte and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology.* 2005;128:1774-86.
- Soria B, Andreu E, Berná G, Fuentes E, Gil A, León-Quinto T, Martín F, Montanya E, Nadal A, Reig JA, Ripoll C, Roche E, Sanchez-Andrés JV, Segura J. Engineering pancreatic islets. *Pflügers Archiv-European J Physiol.* 2007;440:1-18.
- Santos R, Rosario LM, Nadal A, García-Sancho J, Soria B, Valdeolmillos M. Widespread [Ca²⁺]_i oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflügers Arch-Eur J Physiol.* 1991;418:417-22.

34. Martin F, Soria B. Glucose-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in single human pancreatic islets. *Cell Calcium*. 1996;20:409-14.
35. Martin F, Soria B. Amino acid induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in single mouse pancreatic islets. *J Physiol (Lond)*. 1995;486:361-71.
36. Martin F, Sanchez-Andrés JV, Soria B. Slow $[Ca^{2+}]_i$ oscillations induced by ketoisocaproate in mouse pancreatic islets. *Diabetes*. 1995;44:300-5.
37. Charollais, A, Gjinovci, A, Huarte, J, Bauquis, J, Nadal, A, Martin, F, Andreu E, Sanchez-Andrés, JV, Calabrese, A, Bosco, D, Soria B, Wollheim, CB, Herrera, PL, Meda, P. Junctional communication of pancreatic beta cells contributes to the control of insulin secretion and glucose tolerance. *J Clin Invest*. 2000;106:235-43.
38. Andreu E, Soria B, Sanchez-Andrés JV. Oscillations of the gap junction electrical coupling in the mouse pancreatic islet of Langerhans. *J. Physiol. (Lond)*. 1997;498:753-61.
39. Nadal A, Quesada I, Soria B. Homologous and heterologous unsynchronicity between identified α -, β - and δ -cells within intact islet of Langerhans in the mouse. *J. Physiol. (Lond)*. 1999;517:85-93.