



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO DE FIN DE GRADO

NUEVAS TERAPIAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1)

Paula Ávila Fernández

Grado de Bioquímica

Facultad de Ciencias

Año Académico 2020-21

Nuevas terapias para el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1)

Paula Ávila Fernández

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Ciencias

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2020-21

Palabras clave del trabajo:

Diabetes mellitus type 1, Cell therapy, Gene therapy, Stem cell, Transdifferentiation, iPSC, Insulin gene therapy, Immune

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo Antonia Picornell Rigo

Nombre Tutor/Tutora (si procede)

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Resumen

La Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad autoinmune que ataca las células β -pancreáticas y genera un estado de hiperglucemia como consecuencia de la disminución en la síntesis y secreción de insulina. Las terapias actuales, basadas en la administración de insulina exógena y en el trasplante de la totalidad del páncreas o de sus islotes, no son eficaces debido a que no permiten, en el primer caso, un buen control glucídico o bien debido a la necesidad de inmunosupresión, riesgo de rechazo por parte del paciente o falta de donantes, en el segundo.

En los últimos años, terapias emergentes como son la terapia celular y la terapia génica han permitido el abordaje de distintas enfermedades desde distintos puntos de vista, incrementando así el número de tratamientos disponibles. Este trabajo pretende realizar una revisión de los distintos tratamientos que se están llevando a cabo en el campo de la terapia celular y génica aplicada a la DM1. Estos implican desde la diferenciación de células madre adultas en células β -pancreáticas, hasta la reeducación de las células del sistema inmune, pasando, entre otros, por la transdiferenciación de distintos tipos celulares adultos en células β y la incorporación del gen de la insulina a células hepáticas. Se ha podido observar variabilidad en la eficiencia de reversión de la DM1 en función del tipo de terapia aplicada. Es el caso de las terapias celulares directas, en las que se han llevado a cabo ensayos clínicos con humanos en los que se consigue una reversión de hasta 31 meses, mientras que las que implican protocolos de diferenciación han permitido un control de la glucemia de tan solo 8 semanas. Por otro lado, prometedores estudios basados en terapia génica permiten la reversión de la hiperglucemia, en mayor o menor medida, mediante la secreción de insulina en tejidos extra pancreáticos como por ejemplo el hígado, así como la modulación del sistema inmune mediante la generación de linfocitos T reguladores quimeras afines a autoantígenos como la insulina.

ABSTRACT

Type 1 Diabetes Mellitus (DM1) is an autoimmune disease that attacks β -pancreatic cells and generates a state of hyperglycemia because of the decrease in the synthesis and secretion of insulin. Current therapies, based on the administration of exogenous insulin and the transplantation of the entire pancreas or its islets, are not effective because they do not allow, in the first case, a good glucose control or due to the need for immunosuppression, risk of rejection by the patient or lack of donors, in the second.

In recent years, emerging therapies such as cell therapy and gene therapy have allowed the approach to different diseases from different points of view, thus increasing the number of available treatments. This study aims to perform a review of the different treatments that are being carried out in the field of cell and gene therapy applied to DM1. These involve from the differentiation of adult stem cells into β -pancreatic cells, to the reeducation of cells of the immune system, passing, among others, through the transdifferentiation of different adult cell types into β cells and the incorporation of the insulin gene into liver cells. Variability in the reversion efficiency of DM1 has been observed depending on the type of therapy applied. This is the case of direct cell therapies, in which clinical trials have been carried out with humans in which a reversal of up to 31 months is achieved, while those that involve differentiation protocols have allowed a glycemic control of as much only 8 weeks. On the other hand, promising studies based on gene therapy allow the reversal of hyperglycemia, to a greater or lesser extent, through the secretion of insulin in extra-pancreatic tissues such as the liver, as well as the modulation of the immune system through the generation of lymphocytes T regulatory chimeras related to autoantigens such as insulin.

Índice

Abreviaciones	6
Introducción	7
1. Diabetes Mellitus	7
1.1. Definición de la Diabetes Mellitus.....	7
1.2. Clasificación de la Diabetes Mellitus.....	7
1.2.1. Diabetes Mellitus tipo I (DM1), insulino dependiente o de inicio juvenil.....	7
1.2.2. Diabetes Mellitus tipo II (DM2), no insulino dependiente o diabetes del adulto.....	8
1.2.3. Diabetes Gestacional	8
1.3. Distribución mundial de la Diabetes Mellitus	10
2. Diabetes Mellitus tipo I.....	12
2.1. Factores de predisposición a la DM1	12
2.1.1. Factores genéticos	12
2.1.2. Factores ambientales.....	13
2.2. Tratamiento de la DM1	14
3. Terapia celular.....	15
4. Terapia génica	16
Objetivo	17
Metodología	17
Resultados	18
1. Terapia celular.....	21
1.1. Tipos de células utilizadas en la terapia celular para el tratamiento de la DM1	21
1.2. Tipos de tratamientos celulares.....	21
1.2.1. Tratamientos directos.....	21
1.2.2. Tratamientos de diferenciación.....	22
1.2.2.1. Diferenciación de ESC en IPS.....	22
1.2.2.2. Diferenciación de iPSC en IPS.....	23
1.2.2.3. Diferenciación de ASC en IPS	24
1.2.3. Tratamientos de transdiferenciación.....	24
1.3. Retorno al paciente.....	25
2. Terapia génica	26
2.1. Células diana	26
2.2. Tipo de modificación realizada	26
2.2.1. Obtención de IPS.....	26
2.2.1.1. Incorporación del gen de la insulina	27
2.2.1.2. Incorporación de factores de transcripción característicos de células β -pancreáticas	28

2.2.2. Modulación del sistema inmune	28
2.2.2.1. Modificación de las células β -pancreáticas.....	29
2.2.2.2. Modificación de las células del sistema inmune	29
2.3. Transferencia <i>ex vivo/in vivo</i>	30
Conclusiones	31
Bibliografía	32

ABREVIACIONES

- **ASC:** *Adult Stem Cells* o Células Madre Adultas
- **AAV:** Vector vírico adenoasociado no integrativo
- **CAR:** Receptores de antígenos quimera
- **CPA:** Célula presentadora de antígenos
- **CTLA-4:** Gen codificante de la proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico
- **DG:** Diabetes Gestacional
- **DM:** Diabetes Mellitus
- **DM1:** Diabetes Mellitus tipo I
- **DM2:** Diabetes Mellitus tipo II
- **ESC:** *Embryonic Stem cells* o Células Madre Embrionarias
- **FDA:** *Food and Drug Administration* o Administración de Alimentos y Medicamentos
- **GAD:** Ácido glutámico descarboxilasa
- **HLA:** *Human Leukocyte Antigen* o Antígeno leucocitario humano
- **HLA I:** HLA de clase I
- **HLA II:** HLA de clase II
- **HSC:** *Hematopoietic Stem Cells* o Células Madre Hematopoyéticas
- **IDF:** *International Diabetes Federation* o Federación Internacional de Diabetes
- **IGF-1:** Factor de crecimiento similar a la insulina 1
- **IL-4:** Interleucina 4
- **IL-10:** Interleucina 10
- **INS:** Gen codificante de la insulina
- **IPS:** *Insulin-producer Cells* o Células productoras de insulina
- **iPSC:** *induced Pluripotent Stem cells* o Células Madre Pluripotentes inducidas
- **MHC:** *Major Histocompatibility Complex* o Complejo Mayor de Histocompatibilidad
- **MSC:** *Mesenchymal Stem/Stromal Cells* o Células Madre Mesenquimales
- **Ngn3:** Neurogenina 3
- **TCR:** Receptor de antígenos de linfocitos T
- **TGF- β :** Factor de crecimiento transformante β
- **Th2:** Células T ayudantes de tipo 2
- **Treg:** Células T reguladoras
- **VDRE:** Elementos de respuesta a la vitamina D
- **VNTR:** Número Variable de Repeticiones en Tándem

INTRODUCCIÓN

1. Diabetes Mellitus

1.1 Definición de la Diabetes Mellitus

El término de Diabetes Mellitus (DM) hace referencia al síndrome metabólico causado por defectos en la secreción de la insulina, en su acción o en ambas^{1,2}, generando así, un estado hiperglucémico crónico³. Juntamente con el estado hiperglucémico, la alteración del metabolismo de la insulina provoca alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas¹, dando lugar a toda una serie de manifestaciones tanto a corto, como a largo plazo.

Mientras que a corto plazo se produce poliuria (incremento en la secreción de orina), polidipsia (incremento en la cantidad de líquido ingerido), polifagia (incremento en la cantidad de comida ingerida) y pérdida de peso y de visión², a largo plazo se generan daños en una gran diversidad de órganos y tejidos como son los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos^{1,2,4}. No obstante, cabe destacar el hecho de que las complicaciones más frecuentes en pacientes diabéticos y que, por tanto, provocan una disminución de la vida útil, son: la pérdida de visión, fallos renales, úlceras y cardiopatías^{1,2,4}.

A pesar de que agrupemos bajo un mismo término un conjunto de alteraciones metabólicas que convergen en el estado hiperglucémico, estas pueden deberse a distintos motivos y, por lo tanto, requerir tratamientos diferentes. Es decir, nos encontramos ante un síndrome metabólico de etiología múltiple pero que resulta en una misma característica: hiperglucemia crónica^{1,5}. Es por ello por lo que clasificamos la diabetes en distintos tipos.

1.2 Clasificación de la Diabetes Mellitus

La clasificación de los distintos pacientes diabéticos no siempre es fácil, ya que esta suele depender de las circunstancias presentes en el momento del diagnóstico y estas, a su vez, pueden dar lugar a confusión². Sería el caso, por ejemplo, del diagnóstico erróneo de una diabetes gestacional (DG) como consecuencia de la aparición del estado hiperglucémico durante el periodo de gestación, siendo realmente una Diabetes Mellitus tipo II (DM2)². Es por ello por lo que, en algunos casos, es necesario realizar pruebas adicionales a la determinación de la glucemia en sangre (determinación de la glucosa basal o determinación de la glucosa postprandial mediante test de tolerancia a oral a la glucosa)⁶ para acabar de determinar la causa y, por lo tanto, el tipo de diabetes con el objetivo de poder aplicar el tratamiento correcto.

Encontramos 4 grandes bloques en los que podemos clasificar los distintos pacientes diabéticos². No obstante, uno de ellos (“Otros tipos específicos de diabetes”), recoge aquellos tipos de diabetes que no se ciñen a la descripción de los otros³. Es por ese motivo por el cuál a continuación explicaremos 3 de los 4 bloques, las características principales de los cuales se encuentran recogidos en la **Tabla 1**.

1.2.1 Diabetes Mellitus tipo I (DM1), insulino dependiente o de inicio juvenil

La DM1 supone entre el 5-10% de los casos de diabetes a nivel mundial y se caracteriza por deberse a una respuesta autoinmune². En ella, el propio sistema inmune ataca a las células β -pancreáticas de los islotes de Langerhans provocando suficiente daño y destrucción como para reducir o eliminar la producción de insulina⁷. A pesar de que la destrucción autoinmune tiene

un importante factor genético, se ha podido observar la intervención de factores ambientales aunque estos no están, todavía, bien definidos².

Como su nombre indica, este tipo de diabetes es frecuente en niños y adolescentes pero no excluye el hecho de que también se pueda dar en pacientes de edad avanzada, aún en muy baja frecuencia².

Al tratarse de una patología autoinmune, alrededor del 90% de los pacientes presentan autoanticuerpos². Entre ellos, destacan los autoanticuerpos contra la insulina, las tirosinas fosfatasas IA-2 y IA-2 β , el enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD)^{2,7,8} y el transportador de zinc 8 (ZnT8)⁷. Estos actúan como marcadores predictivos, de manera que su presencia en plasma es indicativo de una posible futura diabetes⁸. Así pues, el riesgo de padecer esta enfermedad dependerá del número y del tipo de autoanticuerpos presentes, siendo la presencia de autoanticuerpos IA-2 el indicador de mayor riesgo⁸.

Por otro lado, la velocidad de destrucción de las células β -pancreáticas difiere entre pacientes, siendo más rápida, generalmente, en niños y más lenta en adultos². Así pues, a mayor velocidad de destrucción, antes se manifestará el estado de hiperglucemia y de cetoacidosis como consecuencia de una función residual de las células β -pancreáticas menor². Este hecho hace indispensable la administración de insulina exógena para poder sobrevivir².

1.2.2 Diabetes Mellitus tipo II (DM2), no insulino dependiente o diabetes del adulto

La DM2 supone un 90-95% del total de pacientes diabéticos a nivel mundial². Estos se caracterizan por presentar resistencia a la insulina y, a la larga, una disminución en la secreción de ésta².

La resistencia a la insulina implica una disminución de la respuesta de los receptores de los distintos tejidos a la acción de dicha hormona⁶. Generalmente, este tipo de resistencia está asociado a un estado de obesidad que, además, implica una disminución de los receptores insulínicos⁶. Es por ello por lo que en las primeras etapas de la diabetes encontraríamos un estado hiperinsulínico². No obstante, a la larga, el estado de resistencia conlleva a un agotamiento de las células β -pancreáticas debido a que se les fuerza a una mayor secreción de insulina, dando lugar a un descenso en la secreción de ésta⁶.

Al estar la resistencia a la insulina asociada, en la mayoría de los casos, a un estado de obesidad, así como a un incremento en el índice de grasa abdominal y no en una destrucción de las células β -pancreáticas, la disminución del peso mediante una dieta específica y ejercicio, suele ser suficiente para regular los niveles de glucosa en sangre, haciendo innecesario la utilización de insulina exógena².

El diagnóstico de la DM2 suele ser tardío debido a que el estado de hiperglucemia causado por la resistencia a la insulina se desarrolla gradualmente, de manera que cuando el paciente presenta síntomas, el estado hiperglucémico se ha instaurado hace años². Además, a pesar de que el riesgo de padecer este tipo de diabetes incrementa con la edad, así como por la presencia de factores como la obesidad y el sedentarismo, se ha visto que también presenta una fuerte predisposición genética².

1.2.3 Diabetes Gestacional

La DG hace referencia al estado hiperglucémico que se origina en mujeres, que no presentan un diagnóstico diabético previo, durante el embarazo^{9,10}, desapareciendo al finalizar éste y afectando, según la Federación Internacional de Diabetes (IDF, *International Diabetes*

Federation), en 2017, al 14% de las mujeres embarazadas a nivel mundial⁹. Al tratarse de una complicación del embarazo que implica toda una serie de riesgos tanto para la salud de la madre como para la del bebé⁹, es necesaria la realización de controles rutinarios para asegurarse del correcto control de la glucemia. Algunas de las complicaciones que puede suponer la DG para la madre, a corto plazo, son la acumulación de líquido amniótico (hidramnios), incrementando el riesgo de parto prematuro⁶ y la preeclampsia, caracterizada por una tensión elevada⁹. Por otro lado, las enfermedades cardiovasculares y la instauración de la DM2, son considerados riesgos a largo plazo⁹. Las afectaciones que supone la DG al bebé incluyen desde la muerte fetal⁶, la macrosomía^{6,9} y malformaciones congénitas⁶ a corto plazo, hasta la instauración de la DM2, enfermedades cardiovasculares u obesidad a largo plazo⁹.

El metabolismo de los carbohidratos varía durante el embarazo⁹. En el primer trimestre se produce un almacenamiento de la glucosa con el objetivo de poder utilizarla, posteriormente, como fuente de energía⁹. Así pues, en esta etapa, la sensibilidad a la insulina incrementa, permitiendo así la entrada a los adipocitos, de la mayor cantidad de glucosa posible⁹. Con el avance del embarazo, las hormonas de la placenta alteran la sensibilidad a la insulina, disminuyéndola, provocando así un incremento de glucosa en sangre (hiperglucemia)⁹. Además, como consecuencia de la disminución de la sensibilidad a la insulina, se iniciará un proceso de síntesis endógena de glucosa, incrementando más aún la glucemia⁹. Ante esta situación, con el objetivo de controlar la concentración de glucosa en sangre y, en el caso de una embarazada sin DG, el organismo responde mediante la hipertrofia e hiperplasia de las células β -pancreáticas⁹. En contraposición, las embarazadas que desarrollen DG presentarán elevadas concentraciones de glucosa en sangre como consecuencia, principalmente, de la incapacidad de respuesta por parte de sus células β -pancreáticas¹⁰. No obstante, dicha complicación también puede darse como consecuencia de una disfunción en las redes neurohormonales relacionadas con el apetito, la tasa metabólica basal, etc., implicando una resistencia a la leptina y, por lo tanto, conduciendo a un incremento en la ingesta, o una disminución de la adiponectina circulante, hecho que se asocia a la resistencia a la insulina⁹. Además, se ha podido observar una estrecha relación entre la obesidad y el desarrollo de la DM2 y la DG⁹. Es por ello por lo que es más frecuente que la DG aparezca en embarazos que presentan una gran reserva de tejido adiposo⁹. Dicha relación se basa en el perfil de citoquinas proinflamatorias que secretan los adipocitos en el estado obeso, induciendo, mediante una serie de mecanismos, la resistencia a la insulina en tejidos periféricos⁹.

Debido a las grandes complicaciones que esta situación puede provocar no sólo a la madre, sino también al feto, en caso de prolongarse en el tiempo, es importante su detección precoz. Para ello, es recomendable la realización de una prueba de intolerancia a la glucosa a las 24-28 semanas de gestación. Los valores de referencia se distribuyen en lo que se conoce como curva de O'Sullivan, en la que dos o más valores superiores a los valores de referencia diagnostican la presencia de DG.

Al tratarse, como en el caso de la DM2, de una hiperglicemia como consecuencia de una situación de resistencia a la insulina, el tratamiento que se puede aplicar a estas madre con el objetivo de disminuir la glucemia y, por lo tanto, los efectos perjudiciales en el feto, es un cambio en el estilo de vida (dieta y ejercicio) y, de manera ocasional, administración de insulina exógena⁹.

Tabla 1. Tabla resumen con las características diferenciales de los 3 grandes grupos en los que se clasifica la diabetes^{2,9}.

<i>Tipos / Características</i>	Diabetes tipo I	Diabetes tipo II	Diabetes gestacional
<i>Rango de edad</i>	Niñez y adolescencia, aunque en algunos casos en la edad adulta.	Edad adulta	>edad de la gestante
<i>Frecuencia en la población</i>	5-10%	90-95%	14% de las mujeres embarazadas
<i>Marcadores de predicción</i>	Autoanticuerpos	Situación de prediabetes (niveles de glucosa superiores al normal, pero sin llegar a ser considerado patológico)	Valores de glucosa superiores a los estándares en las curvas de O'Sullivan
<i>Tratamiento</i>	Insulina exógena	Dieta y ejercicio suele ser suficiente, por lo que la insulina no es imprescindible	Dieta y ejercicio. Ocasionalmente insulina
<i>Niveles de insulina</i>	Bajos o nulos	Elevados, normales o bajos (dependiendo de la fase de la patología)	--

1.3 Distribución mundial de la Diabetes Mellitus

La prevalencia de la DM, en el *Atlas de la Diabetes de la IDF (novena edición, 2019)*, se estima en un total de 463 millones de personas afectadas, con una previsión de llegar a los 700 millones de afectados en 2045¹¹. Se debe tener en cuenta que en la estimación se incluyen todos aquellos adultos (20-79 años) que han sido, o no, diagnosticados con DM1 o DM2¹¹. Es frecuente que los individuos que padecen DM2 sean diagnosticados tarde, cuando ya se manifiestan toda una serie de síntomas. No obstante, el hecho de que no hayan sido diagnosticados no significa que no padezcan la enfermedad. Además, se debe tener en cuenta que las pruebas de diagnóstico no pueden llegar a todas las regiones del mundo debido a dificultades geográficas o bien por la situación del territorio, en el que se prioriza otro tipo de pruebas¹¹. Así pues, la estimación de la prevalencia llevada a cabo por la IDF tiene en cuenta este porcentaje de individuos, que posiblemente se encuentren afectados a pesar de no ser diagnosticados, en la estimación global de la enfermedad.

La distribución mundial de la DM puede observarse en la **Figura 1**. En ella, destaca la región geográfica del Pacífico Oriental, como la región con mayor número de adultos diabéticos, con 163 millones de personas afectadas por la enfermedad en 2019 y una estimación de 212 millones de afectados en 2045. En contraposición, la región geográfica con menor número de adultos diabéticos es África, con 19 millones de adultos afectados por la enfermedad en 2019 y una estimación de 47 millones de afectados en 2045. Finalmente, cabe destacar el hecho de que se estima un incremento del 51% en el número de adultos diabéticos para 2045 a nivel mundial, destacando la región de Oriente Medio y el Norte de África con un incremento estimado del 96%.

Debido a elevada prevalencia que presenta esta enfermedad a nivel mundial, así como por el hecho de que no se ha encontrado una solución óptima a largo plazo, es necesario seguir estudiando e investigando esta patología.

Cantidad de adultos (20-79 años) con diabetes a nivel mundial

América del Norte y Caribe

2045 **63 millones** ↑ **33%** de incremento
 2030 **56 millones**
 2019 **48 millones**

- En esta región, 1 de cada 6 adultos está en riesgo de desarrollar diabetes tipo 2
- El 43% del gasto sanitario relacionado con la diabetes a nivel mundial ocurre en esta región

América del Sur y Central

2045 **49 millones** ↑ **55%** de incremento
 2030 **40 millones**
 2019 **32 millones**

- 2 de cada 5 personas con diabetes no están diagnosticadas
- En esta región, sólo ocurre el 9% del gasto sanitario relacionado con la diabetes a nivel global

África

2045 **47 millones** ↑ **143%** de incremento
 2030 **29 millones**
 2019 **19 millones**

- 3 de cada 5 personas con diabetes no están diagnosticadas
- 3 de cada 4 muertes ocasionadas por la diabetes se produjeron en personas menores de 60 años

Oriente Medio y Norte de África

2045 **108 millones** ↑ **96%** de incremento
 2030 **76 millones**
 2019 **55 millones**

- 1 de cada 8 adultos tiene diabetes
- 1 de cada 2 muertes ocasionadas por la diabetes se produjeron en personas menores de 60 años

Sudeste Asiático

2045 **153 millones** ↑ **74%** de incremento
 2030 **115 millones**
 2019 **88 millones**

- 1 de cada 5 adultos con diabetes vive en esta región
- 1 de cada 4 nacidos vivos resulta afectado por la hiperglucemia en el embarazo

MUNDO

2045 **700 millones** ↑ **51%** de incremento
 2030 **578 millones**
 2019 **463 millones**

Europa

2045 **68 millones** ↑ **15%** de incremento
 2030 **66 millones**
 2019 **59 millones**

- 1 de cada 6 nacidos vivos resulta afectado por la hiperglucemia en el embarazo
- La región registra el mayor número de niños y adolescentes (0-19 años) con diabetes tipo 1: 297.000 en total

Pacífico Occidental

2045 **212 millones** ↑ **31%** de incremento
 2030 **197 millones**
 2019 **163 millones**

- 1 de cada 3 adultos con diabetes vive en esta región
- 1 de cada 3 muertes por diabetes ocurre en esta región

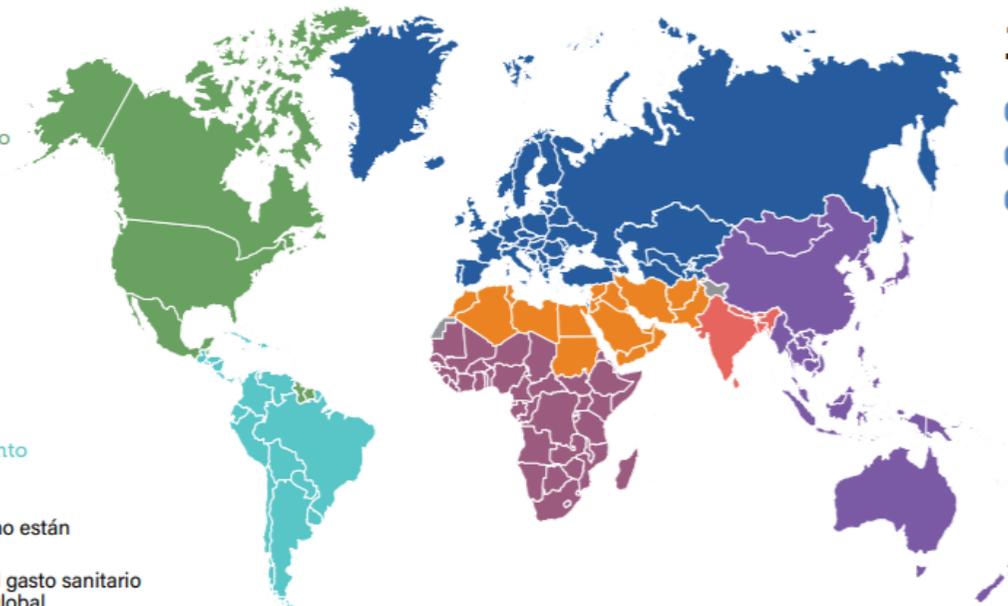


Figura 1: Gráfico en el que se representa una estimación de la cantidad de adultos diabéticos a nivel global, así como por regiones geográficas. La estimación se centra en los años 2019, 2035 y 2045, pudiendo ver así el incremento porcentual de los afectados por la patología en base a la región geográfica en la que estos residen. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 9th edn.* Brussels, Belgium: 2019. Disponible en: <https://www.diabetesatlas.org>. Consultado día 12/04/2021.

2. Diabetes Mellitus tipo I

2.1 Factores de predisposición a la DM1

Dentro de los factores que explican la aparición de la patología, debemos diferenciar entre aquellos que son genéticos, haciendo al individuo más o menos susceptible a padecer la enfermedad y aquellos que son ambientales. Así pues, estamos ante una enfermedad compleja en la que ambos tipos de factores interactúan entre sí, culminando en la aparición de la enfermedad. No obstante, se debe tener en cuenta que, a pesar de que ambos factores sean necesarios para el desarrollo de la diabetes, dependiendo de la susceptibilidad génica del paciente, será necesaria la participación de un mayor o menor número de factores ambientales⁷.

2.1.1 Factores genéticos

Diversos son los genes que predisponen al individuo a desarrollar DM1. De hecho, han sido identificadas hasta 50 regiones que confieren susceptibilidad a la enfermedad¹². A pesar de la multitud de factores genéticos que pueden intervenir en el desarrollo de esta patología, en este trabajo se comentarán aquellos que confieren una mayor susceptibilidad al individuo de desarrollar dicha enfermedad.

- **Genes HLA (*Human Leukocyte Antigen*).**

Los genes HLA son una familia génica constituida por, aproximadamente, 200 genes localizados en el cromosoma 6p21.3¹² que codifican, en conjunto, lo que se conoce como MHC (*Major Histocompatibility Complex*)¹³ o plataforma de presentación de antígenos. Dichas plataformas expresan en superficie autoantígenos o antígenos exógenos, participando así en el reconocimiento autoinmune y no autoinmune, respectivamente¹². Las plataformas que expresan los antígenos propios reciben el nombre de MHC I, de manera que vienen codificadas por los genes HLA de clase I (HLA I), mientras que las plataformas que expresan en superficie los antígenos exógenos reciben el nombre de MHC II y vienen codificadas, por lo tanto, por los genes HLA de clase II (HLA II).

Con un total de 9.546 polimorfismos descritos, los genes HLA, concretamente los de tipo II, se han convertido en los genes que presentan una mayor contribución al desarrollo de la DM1 (40-50%)¹². A pesar de que para este trabajo únicamente nos centraremos en los polimorfismos que otorgan susceptibilidad al desarrollo de la patología, como el caso del alelo DRB1*0402, también hay polimorfismos que protegen frente al desarrollo de la DM1, como por ejemplo el alelo DRB1*0403¹². La extrema variabilidad polimórfica viene dada por el hecho de que cada plataforma se encuentra codificada por 3 locus^{12,13}. Para el MHC I tenemos los locus HLA (A, B y C) y, para el MHC II, los locus HLA (DP, DQ y DR)^{12,13}. Además, para cada uno de estos locus habrá distintos alelos que serán los que conferirán o no susceptibilidad al individuo a desarrollar la DM1.

Además de presentar en superficie antígenos con procedencia diferente, cabe destacar las diferencias en su distribución celular. Mientras que el MHC I se encuentra ubicuo en todas las células del organismo, el MHC II únicamente se encuentra en aquellas con capacidad de presentar antígenos exógenos, es decir, macrófagos, células B y células presentadoras de antígenos (CPA).

A pesar de que no se conoce el mecanismo a partir del cual determinados alelos HLA II confieren susceptibilidad al desarrollo la DM1¹², se cree que se produce un cambio de conformación en la región de unión del MHC II al antígeno exógeno, adquiriendo una mayor

afinidad por los péptidos característicos de la diabetes, es decir, los autoantígenos^{12,13}. De esta manera, se tendrían por exógenos antígenos propios y se iniciaría una respuesta inmunológica en contra de ellos, conduciendo a la destrucción de las células β -pancreáticas debido a la expresión de dichos autoantígenos en superficie.

- **Gen de la insulina (*INS*).**

El gen de la insulina (*INS*), con una contribución del 10% a la susceptibilidad de desarrollar DM1 y localizado en el cromosoma 11p15.5¹², es considerado el segundo gen más importante en el desarrollo de esta patología⁸.

La importancia de dicho gen se basa en la presencia de una región polimórfica en el extremo 5', concretamente, en la región promotora⁷. La susceptibilidad reside en lo que se conoce como VNTR (Número Variable de Repeticiones en Tándem)^{7,12}. Dependiendo del número de repeticiones, podemos clasificar el VNTR en clase I, II y III, siendo el de clase I el que presenta menor número de repeticiones y el de clase III el que presenta un número de repeticiones mayor^{7,12}. El mecanismo que subyace a la relación entre la repetición de estas secuencias en tándem y la susceptibilidad a la DM1 es desconocida⁹. No obstante, se cree que hay una relación entre el número de repeticiones y la capacidad de unión del factor de regulación autoinmune (AIRE) a la secuencia promotora de *INS*, regulando así el número de copias de mRNA del gen de la insulina⁷ tanto en el timo como en el páncreas⁹.

Como hemos comentado, el VNTR de clase I supone un menor número de repeticiones en tándem, hecho que conlleva a un menor número de copias de mRNA del gen de la insulina en el timo¹². Esta situación da lugar a una selección de los timocitos defectuosa, permitiendo así la migración de linfocitos autorreactivos para el autoantígeno insulina¹². En contrapartida, en el caso del VNTR de clase III, el mayor número de repeticiones en tándem permite una mayor transcripción del gen y una selección negativa de los timocitos autoreactivos¹². Es por ello por lo que el VNTR III es considerado un factor protector que disminuye el riesgo de desarrollar la patología^{7,12}.

- **Gen *CTLA-4* (proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico)**

El gen que codifica para esta proteína, localizado en el cromosoma 2q33, es considerado el tercero más importante en generar susceptibilidad para el desarrollo de la DM1⁸. La importancia de este gen reside en su papel en la regulación de la respuesta inmune por parte de las células T, siendo éste un regulador negativo⁷. La proteína codificante es un receptor de membrana de las células T y su función es interrumpir la coestimulación que se da entre dichas células y las CPA¹². De esta manera, se podría impedir que las células T continúen activas y favorecer la disminución de su reactividad.

Conociendo su importante función en la regulación de la respuesta inmune podemos entender el hecho de que cambios en la expresión de CTLA-4, como consecuencia de mutaciones o polimorfismos, pueden alterar la respuesta inmune y propiciar la patología¹². Es el caso, por ejemplo, del polimorfismo CTLA-4 A49G, el cual implica la expresión de una proteína aberrante que no puede expresarse en la membrana^{7,12}. La disminución en la membrana de esta proteína conlleva al mantenimiento de la coestimulación y a una activación constante de las células T reactivas.

2.1.2 Factores ambientales

Los factores ambientales no tienen la capacidad de causar el inicio de la patología sin un *background* genético adecuado para ello¹². No obstante, el inicio de la DM1 no se debe única y

exclusivamente a la presencia de factores genéticos. De hecho, hay distintas evidencias que indican la importancia de los factores ambientales en el desarrollo de la DM1, entre las que destacan: la baja correlación en el desarrollo de la patología en gemelos monocigóticos, el bajo porcentaje de pacientes con predisposición genética para los genes HLA II que desarrollan la patología y estudios poblacionales que demuestran que el riesgo de padecer diabetes incrementa después de migrar a regiones con una elevada incidencia¹².

A pesar de que nos centraremos en las infecciones víricas y en el déficit de vitamina D como factores ambientales asociados al desarrollo de la DM1, cabe destacar la presencia de otros factores ambientales que también han sido relacionados con el desarrollo de la DM1, como la leche de vaca, las proteínas de trigo, el estrés psicológico o el peso corporal¹².

Las infecciones víricas, concretamente las infecciones por el enterovirus Coxsackie⁷, son los principales factores ambientales desencadenantes de la DM1 debido a su capacidad de activar el sistema inmune¹³. El mecanismo subyacente a la activación del sistema inmune es, entre otros, el mimetismo molecular^{12,13}. Dicho mecanismo se basa en la presencia de proteínas víricas que presentan cierta homología con proteínas propias de las células β -pancreáticas^{12,13}. Es el caso de la proteína vírica P2-C y el autoantígeno GAD65¹². Así pues, la proteína vírica es presentada por las CPA dando lugar a la activación del sistema inmune, cuyas células no sólo reconocerán y destruirán la partícula vírica sino que también la proteína propia con la que se mimetiza (proteína expresada sobre una superficie celular)¹⁴.

Por otro lado y, con respecto a la relación entre la vitamina D y la DM1, se ha podido relacionar el desarrollo de la DM1 con ciertos polimorfismos en genes que codifican para enzimas que intervienen en el metabolismo de la vitamina D⁷. Esto es debido a que se ha observado que en la secuencia promotora de algunos alelos¹⁵ del gen HLA-DRB1, por ejemplo el alelo 0301, hay un elemento de respuesta a la vitamina D (VDRE)⁷. La deficiencia de esta vitamina en etapas tempranas del desarrollo¹⁵, como consecuencia de la falta de enzimas que intervienen en su metabolismo, supondría una disminución en la expresión de dicho gen en el timo, hecho que se ha visto asociado con el desarrollo de la DM1⁷ debido a que no se lleva a cabo la correcta eliminación de las células T autoreactivas¹⁵. De esta manera, se podría pensar que aquellos alelos que presentan en su región promotora elementos VDRE, confieren una mayor susceptibilidad a desarrollar la patología que no aquellos que no los presentan y que, por lo tanto, son independientes de la vitamina D.

2.2 Tratamiento de la DM1

Al ser la DM1 una patología autoinmune, en la cual se destruyen las células productoras de insulina, el tratamiento clínico se basa en el aporte de insulina exógena⁵. No obstante, a pesar que desde su descubrimiento ha permitido salvar la vida de muchos diabéticos, no permite un perfecto control de la glucemia, derivando, a la larga, en diversas complicaciones secundarias⁵.

Al margen de la utilización de insulina exógena, existen otros posibles tratamientos para la DM1, como son los trasplantes, ya bien sea de la totalidad del páncreas o bien de islotes pancreáticos individuales^{5,16}. Dicho tratamiento permite mimetizar el mecanismo de secreción de las células β -pancreáticas, pero debemos tener en cuenta que los donantes de páncreas o de islotes son escasos y, por otro lado, la necesidad de administrar fármacos inmunosupresores al paciente, pudiéndole provocar efectos secundarios importantes^{5,16}.

Como consecuencia de las dificultades e inconvenientes que suponen los trasplantes, estos procedimientos únicamente se llevan a cabo en situaciones excepcionales, hecho que convierte al aporte de insulina exógena en el tratamiento clínico por excelencia⁵. No obstante, es muy complicado que dicho tratamiento permita un correcto control de la glucemia⁵ debido

a que el aporte de insulina dependerá, por ejemplo, de la ingesta así como del ejercicio. En caso de alterar alguno de estos a la baja (comida) o al alta (ejercicio), tendríamos una mayor cantidad de insulina que de glucosa, conduciendo a una situación de hipoglucemia. De la misma manera, en caso de ingerir más comida o realizar menos ejercicio al estipulado por la cantidad de insulina suministrada, la concentración de insulina no será suficiente y se conducirá a un estado de hiperglucemia. Es por ello por lo que se acude a la investigación en otros campos como la terapia celular o génica con el objetivo de hallar un nuevo tratamiento que no sólo permita el control glucémico, sino que evite las complicaciones secundarias que se originan con el tratamiento insulínico.

3. Terapia celular

La terapia celular permite, mediante la utilización de células sin modificación del genoma, la sustitución o reparación de órganos o tejidos dañados¹⁷. Las células utilizadas en terapia celular son, mayoritariamente, células que presentan cierto estado de indiferenciación¹⁷, permitiendo así procesos de diferenciación específicos en función del tipo celular deseado. Por este motivo, en las últimas décadas el interés respecto las células madre embrionarias (ESC, *Embryonic Stem cells*) y células madre adultas (ASC, *Adult Stem Cells*) ha incrementado considerablemente. Mientras que las células que constituyen los órganos y tejidos de un individuo adulto son células diferenciadas, presentando un fenotipo característico como consecuencia de la activación y el silenciamiento de toda una serie de genes, las ASC y ESC son células que presentan, cada cual, un estado de indiferenciación superior¹⁸. Así pues, gracias a su capacidad de diferenciación en distintos tipos celulares, así como por su actividad proliferativa mantenida¹⁸, dichas células son óptimas para este tipo de terapias.

Tal y como se ha comentado, las ESC presentan un estado de indiferenciación superior a las ASC (estado de pluripotencia vs. estado de multipotencia)⁵. Así pues, a partir de las ESC pueden obtenerse células de las tres capas germinales mientras que a partir de las ASC, únicamente se pueden obtener células pertenecientes a un mismo linaje celular⁵. A pesar de las ventajas que supondría la utilización de las ESC como tratamiento para diversas patologías, éstas presentan un gran dilema ético y moral debido a que se obtienen a partir de la masa celular interna del embrión en estado de blastocisto¹⁹, hecho que implica la destrucción de embriones. Así pues, debido a que no conllevan tantos dilemas éticos y que permiten una terapia celular autóloga sin riesgo de una reacción autoinmune, las células más utilizadas en terapia celular son las ASC^{18,19}. No obstante, debido al gran potencial que presentan las células pluripotentes, se llevaron a cabo toda una serie de investigaciones que permitieron la obtención de células pluripotentes inducidas (iPSC, *induced Pluripotent Stem cells*) a partir de la utilización de toda una serie de factores que inducen la pluripotencia de células diferenciadas como los fibroblastos⁵. Éstas, a pesar de ser una alternativa al uso de ESC, siguen en vías de investigación debido a la presentación de efectos secundarios como por ejemplo, la formación de tumores⁵ como consecuencia de la aparición de patrones de expresión incorrectos o incompletos²⁰. Con el objetivo de evitar tal efecto, es aconsejable la realización de diversas comprobaciones antes de trasplantar dichas células al paciente, como por ejemplo: comprobar que el estado de diferenciación es el correcto así como que no presentan capacidad de proliferación que pueda dar lugar a tumores²⁰ o la realización de cariotipos para comprobar que no se han generado duplicaciones o deleciones cromosómicas importantes que pueda conllevar a tal efecto²⁰.

Además de los procesos de diferenciación, dentro del campo de la terapia celular también se llevan a cabo procesos de transdiferenciación, los cuales permiten la obtención del tipo celular deseado a partir de células diferenciadas mediante la utilización de los factores ambientales óptimos y sin la necesidad de utilizar células madre²¹. No obstante, también se puede

promover la transdiferenciación de células madre, obteniéndose así células que no corresponden con el linaje celular de la célula madre utilizada²². De esta manera, la transdiferenciación podría llevarse a cabo en aquellos casos en los que no se pueden obtener las células madre correspondientes el linaje celular necesario para el tratamiento.

Enfermedades sanguíneas, como por ejemplo las leucemias o linfomas, presentan actualmente tratamiento mediante terapia celular²³. Para éstas, se utilizan células madre obtenidas a partir de cordones umbilicales compatibles y se trasplantan al sujeto receptor²³. Cabe destacar el hecho de que la utilización de células procedentes de otros pacientes, así como los productos derivados de éstas, deben ser aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, *Food and Drug Administration*)²³. En el caso de las leucemias o linfomas, la FDA ha aprobado distintos productos derivados de la terapia celular como por ejemplo Hemacord, Allocord o Clevecord, los cuáles consisten en células progenitoras hematopoyéticas y difieren en la empresa fabricante²³.

4. Terapia génica

La terapia génica permite, mediante una serie de técnicas, la manipulación del genoma celular del paciente con el objetivo de hacer frente a una patología²⁴. Las modificaciones que pueden llevarse a cabo en las células de un individuo con dicho objetivo son muy variadas y van a depender, en primera instancia, de la enfermedad en cuestión²⁴. Así pues, entre las múltiples modificaciones destacan: la incorporación de un gen con el objetivo de incrementar la expresión de éste en la célula diana; la incorporación de oligonucleótidos anti-sentido que disminuyan la expresión del gen causante de la enfermedad y la edición genómica mediante sistemas como el CRISPR-Cas9^{24,25}. Esta última permite desde la sustitución de genes alterados por sus respectivos genes funcionales hasta la disminución de la expresión del gen causante de la patología²⁴. Se trata de la modificación más novedosa y la que permite la realización de modificaciones dirigidas en el genoma debido a la presencia de un RNA guía, complementario a la región donde se quiere realizar la modificación, que dirige la endonucleasa al lugar específico²⁴.

La incorporación del material exógeno a las células diana se puede llevar a cabo mediante transferencia *ex vivo* o *in vivo*²⁴. Mientras que la *ex vivo* hace referencia a la “incorporación de genes exógenos en células extraídas del paciente, para su posterior introducción”, la transferencia *in vivo* se basa en la “administración de genes exógenos directamente a las células del paciente”²⁴. Además de poderse realizar transferencias *ex vivo* o *in vivo*, las moléculas que se utilizan para la manipulación del genoma pueden incorporarse a las células en forma de DNA desnudo o bien mediante vectores, los cuales facilitan la entrada de la molécula al interior celular²⁴. Entre los vectores utilizados en terapia génica encontramos los vectores virales, que se caracterizan por una mayor eficiencia en la transducción²⁴. No obstante, al generar una reacción por parte del sistema inmune así como por el hecho de presentar riesgo de mutagénesis insercional, han empezado a ser utilizados otros vectores (vectores no virales)²⁴. Estos últimos, a pesar de no ser ni tóxicos ni inmunogénicos, presentan una eficiencia de transducción *in vivo* baja²⁴.

Es frecuente la combinación de la terapia génica con la terapia celular sobre todo en aquellos casos en los que el paciente presenta una disfunción en un órgano como consecuencia de una alteración genética¹⁸. De esta manera, se puede corregir el defecto y, gracias a las propiedades de las células madre, regenerar el órgano¹⁸. En esta situación es importante la integración del material exógeno en el genoma de la célula diana con el objetivo de que, al replicarse, las células hijas mantengan el material incorporado²⁵.

La primera aplicación de la terapia génica en humanos se llevó a cabo en 1990 para tratar a una niña de 4 años que presentaba un déficit en la adenosina desaminasa (ADA)²⁴. A partir de ese momento, han sido aprobados por la FDA distintos protocolos de terapia génica para el tratamiento, principalmente, de distintos tipos de cánceres²³. Concretamente, el cáncer de próstata en estado avanzado fue la primera patología que obtuvo un tratamiento mediante terapia génica aprobado por la FDA (PROVENGE)²³. Dicho tratamiento se basa en la generación de células dendríticas con capacidad de reconocer las células cancerosas y provocar su degradación, es decir, promueve el reconocimiento de las células cancerosas por parte del sistema inmune²³. Al principio, el tratamiento permitía alargar la vida de los pacientes 4 meses, no obstante, a los 3 años se consiguió que los pacientes tratados sobreviviesen un 50% más que los controles, convirtiéndose en el único tratamiento capaz de conseguir estos resultados²³.

OBJETIVO

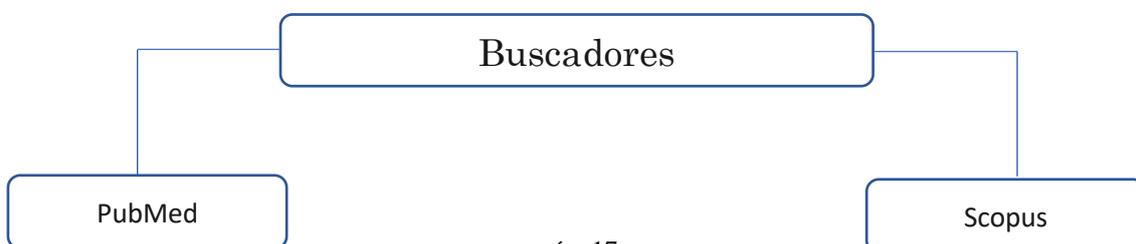
El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre las terapias emergentes en el campo de la terapia celular y de la terapia génica para el tratamiento de la DM1, profundizando en los mecanismos moleculares en los que se basan y en su posible implementación en humanos a corto plazo.

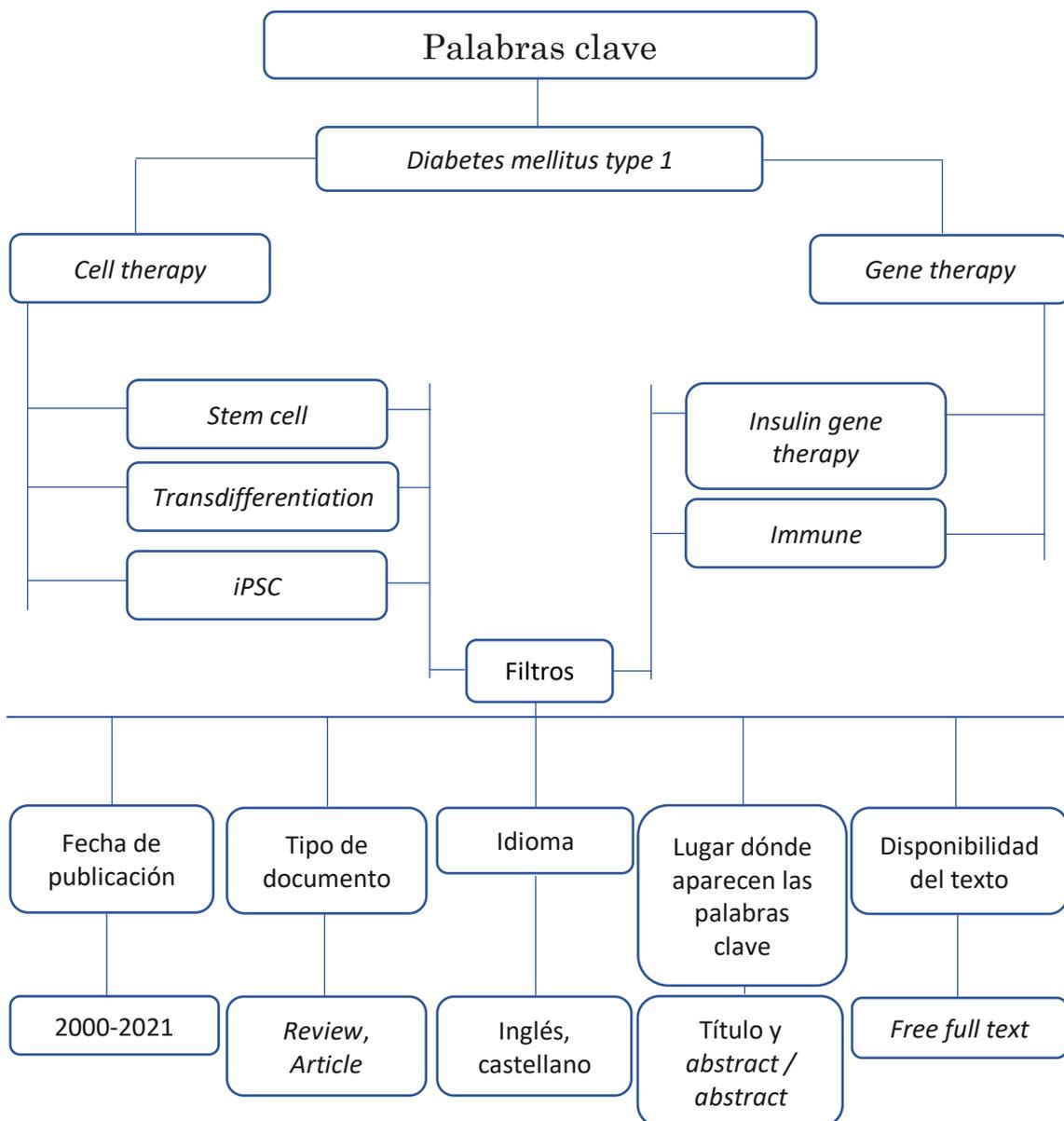
METODOLOGÍA

La búsqueda bibliográfica ha sido diseñada con el objetivo de poder obtener una visión general de las diferentes técnicas emergentes en cuanto a terapia celular y génica se refiere para el tratamiento de la DM1.

Los artículos utilizados para llevar a cabo la revisión bibliográfica han sido obtenidos a partir de los buscadores PubMed y Scopus. Tal y como puede observarse en el esquema, la palabra que encabeza la búsqueda es *Diabetes mellitus type 1* a partir de la cual se van añadiendo otras como *Cell therapy* o *Gene therapy*. Una vez se ha delimitado la búsqueda a terapia celular o a terapia génica, se añaden otras palabras como: *stem cell*, *transdifferentiation* o *iPS* obteniendo así la combinación, por ejemplo, de: *Diabetes mellitus type 1, cell therapy, stem cell*. Este mismo procedimiento se llevaría a cabo con la rama de terapia génica y las palabras *insulin gene therapy* y *immune*.

Además de seleccionar mediante las palabras clave, la búsqueda ha sido acotada restringiendo los años de los artículos (2000-2021), el tipo de documento (*Review* y *Article*), el idioma (inglés y castellano), el lugar dónde aparecen las palabras clave (*abstract/título* y *abstract*) y la disponibilidad del texto (*free full text*). A pesar de que toda la búsqueda se ha acotado con los mismos filtros, cabe comentar una serie de excepciones. En primer lugar, el filtro de “lugar de aparición de las palabras clave” difiere entre el buscador PubMed y Scopus, teniendo que aparecer las palabras clave en el *abstract* o en el título y *abstract*, respectivamente. Además, y centrándonos en el buscador Scopus, para todas las combinaciones las palabras clave tenían que estar localizadas en el título y en el *abstract* del propio artículo a excepción de la combinación con *transdifferentiation* y *iPS* en la que, además, se tenía en cuenta la presencia de estas palabras en las “palabras clave” del propio artículo.





RESULTADOS

La revisión bibliográfica sobre las nuevas terapias para la DM1 ha sido realizada a partir de los artículos que, bajo los filtros comentados anteriormente, se encontraban disponibles el día 16 de abril del 2021 en los buscadores PubMed y Scopus. Dichos resultados se encuentran recogidos en la **Tabla 2**, dónde el color azul y verde representan los buscadores PubMed y Scopus, respectivamente. Además de presentar el número de artículos disponibles en función del buscador y de las palabras clave, en la **Tabla 2** se discrimina entre el número de artículos obtenidos sin filtro (primera fila), así como los obtenidos después de su aplicación (segunda fila).

Los artículos resultantes del proceso de selección (última fila de la **Tabla 2**) fueron incorporados en el programa Microsoft Excel para proceder a su análisis. De los 1382 artículos que fueron introducidos, 375 se encontraban repetidos y, por lo tanto, fueron eliminados. Es por ello por lo que el análisis de resultados se realizó sobre los 1007 artículos restantes.

Tabla 2. Tabla en la que se recogen los artículos disponibles, a día 16 de abril de 2021, en función de las palabras clave en los buscadores PubMed y Scopus, azul y verde respectivamente. Las palabras clave son acumulativas, así pues y como ejemplo aplicable a las otras palabras clave, los resultados que se observan en el apartado de *stem cell* representan los artículos publicados bajo las palabras clave *Diabetes mellitus type 1, cell therapy, stem cell*, así como antes y después de aplicar los filtros (primera y segunda fila, respectivamente).

		Palabras clave				
		<i>Diabetes mellitus type 1</i>				
Resultados		81710 677359				
		17064 14010				
		<i>Cell therapy</i>		<i>Gene therapy</i>		
		6528 202364		1925 129953		
		2074 635		700 164		
		<i>Stem cell</i>	<i>Transdifferentiation</i>	<i>iPS</i>	<i>Insulin gene therapy</i>	<i>Immune</i>
		945 37617	62 2967	17 1162	1158 96046	540 42465
		382 131	25 68	8 14	394 106	233 21

El número de artículos obtenidos a partir de las distintas bases de datos se ilustra, en la **Figura 2**, en base a las distintas combinaciones de palabras clave utilizadas. Puede observarse una clara diferencia entre el número de artículos publicados en el buscador PubMed respecto al buscador Scopus. Siendo este último el que proporciona, a la revisión bibliográfica, un menor número de artículos en la mayoría de las combinaciones de palabras clave a excepción de aquellas con *transdifferentiation* e *iPS*.

Con el objetivo de poder observar el número de publicaciones que se incorporan anualmente en ambas bases de datos y para cada una de las combinaciones de palabras clave, así como para poder analizar el interés que este tema genera en el ámbito biomédico, se han realizado las **Figuras 3 y 4**.

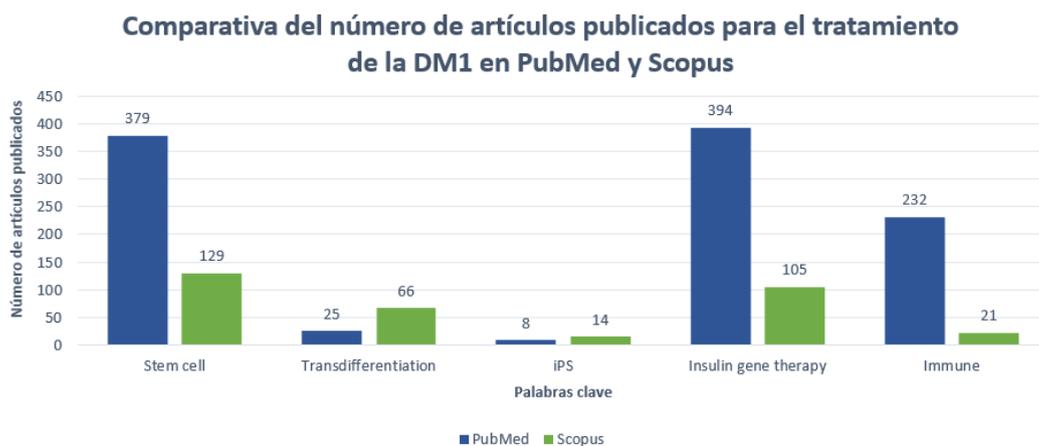


Figura 2: Gráfico de barras en el que se compara, para cada una de las combinaciones de palabras clave y después de aplicar los filtros, el número de artículos publicados en los distintos buscadores. El buscador PubMed se representa en color azul mientras que el buscador Scopus se representa en color verde. Con “para cada una de las combinaciones de palabras clave” se hace referencia a la combinación de las palabras: *Diabetes mellitus type 1, cell therapy, stem cell/transdifferentiation/iPS* o *Diabetes mellitus type 1, gene therapy, insulin gene therapy/immune*.

En la **Figura 3** puede observarse el número de artículos que se han incorporado, de manera anual, a la base de datos PubMed para cada una de las combinaciones de palabras clave desde

el año 2000, mientras que en la **Figura 4** se observa la misma información, pero referente a la base de datos Scopus.

Coincidiendo con los resultados de la **Figura 2**, puede observarse un menor número de publicaciones anuales en el gráfico en el que se hace referencia al buscador Scopus respecto al de PubMed. A pesar de que en ambas figuras el número de publicaciones anuales para la combinación de palabras con *stem cell* sea la que presenta un mayor incremento, hay diferencias entre ambas. En la **Figura 3** se puede observar un auge en el número de artículos publicados anualmente para la combinación de palabras con *insulin gene therapy* y *immune*, mientras que en la **Figura 4**, la combinación de palabras que presenta un mayor incremento en cuanto al número de publicaciones anuales, al margen de *stem cell*, es *insulin gene therapy* y *transdifferentiation*. Por otro lado, en ambas figuras, la combinación de palabras con *iPS* es la que presenta un menor incremento anual de publicaciones.

Número de publicaciones incorporadas anualmente para el tratamiento de la DM1 en la base de datos PubMed



Figura 3: Gráfico de dispersión en el que se representa el número de artículos publicados desde el 1 de enero del 2000 hasta el 16 de abril del 2021 en la base de datos PubMed para cada una de las combinaciones de palabras clave utilizadas en la revisión bibliográfica.

Número de publicaciones incorporadas anualmente para el tratamiento de la DM1 en la base de datos Scopus

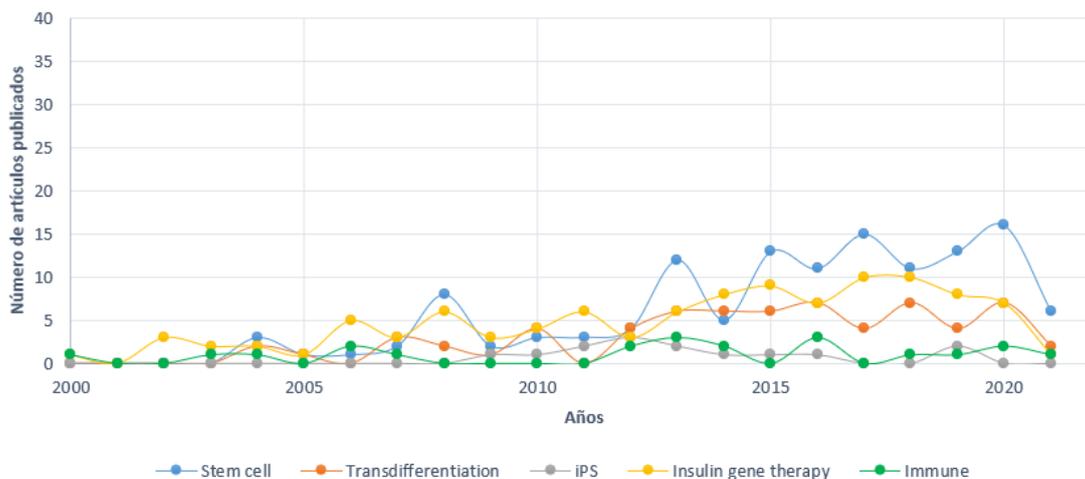


Figura 4: Gráfico de dispersión en el que se representa el número de artículos publicados desde el 1 de enero del 2000 hasta el 16 de abril del 2021 en la base de datos Scopus para cada una de las combinaciones de palabras clave utilizadas en la revisión bibliográfica.

Después de leer los títulos y los *abstracts* de los artículos analizados en las figuras superiores, han sido seleccionados 32 artículos para elaborar los distintos apartados de la revisión bibliográfica sobre las nuevas terapias para el tratamiento de la DM1.

1. Terapia celular

La utilización de insulina como tratamiento para la DM1 ha permitido el control glucémico y, por lo tanto, la supervivencia de un gran número de pacientes insulino dependientes a lo largo de los últimos 100 años²⁶. No obstante y, a diferencia de lo que sucede con el trasplante de páncreas o de sus respectivos islotes, no evita las complicaciones resultantes de la diabetes²⁷. Por otro lado, a pesar del mimetismo en la homeostasia glucídica que ofrecen dichos trasplantes, presentan toda una serie de objeciones que implican la búsqueda de nuevas terapias para el tratamiento de la DM1²⁷⁻²⁹.

La terapia celular ofrece una alternativa prometedora a estos últimos, ya bien sea de la totalidad del páncreas o de sus islotes, eliminando así la problemática que supone el bajo número de donantes, los efectos secundarios que supone la inmunosupresión del paciente con el objetivo de evitar el rechazo, así como el propio rechazo²⁹. La importancia de dicha terapia reside en la capacidad de formación de nuevas células β -pancreáticas²⁶ así como en la regeneración del páncreas dañado mediante la modulación del sistema inmune³⁰.

1.1 Tipos de células utilizadas en la terapia celular para el tratamiento de la DM1

Uno de los principales objetivos de la terapia celular es, como se ha comentado, la generación de nuevas células β -pancreáticas o, lo que es lo mismo, de células secretoras de insulina (IPS, *Insulin Producing Cells*) a partir de otros tipos celulares²⁹. Existe una gran diversidad de células que pueden ser utilizadas para la generación de IPS: desde células pluripotenciales, como por ejemplo las ESC o las iPSC, hasta células diferenciadas de tejidos maduros²⁹ (células alfa-pancreáticas, hepáticas y fibroblastos epidérmicos²⁶), pasando por células multipotenciales como son las células madre y sus distintos linajes celulares, destacando las células madre mesenquimales (MSC, *Mesenchymal Stem/Stromal Cell*)²⁸.

1.2 Tipos de tratamientos celulares

Los tratamientos aplicables a los distintos tipos de células dependerán del objetivo de la terapia, diferenciando así entre tratamientos directos, de diferenciación y de transdiferenciación.

1.2.1 Tratamientos directos

Los tratamientos directos implican el trasplante de células madre adultas las cuales no han sido sometidas a ningún proceso previo de diferenciación ni de modificación³¹. Las células madre que están siendo utilizadas en los tratamientos directos son: las células madre hematopoyéticas (HSC, *Hematopoietic Stem Cells*) y las MSC^{27,32}. Dichas células pueden obtenerse a partir de una gran variedad de tejidos, como por ejemplo la médula ósea y sangre del cordón umbilical²⁷. En caso de tratarse de MSC también pueden obtenerse a partir del tejido adiposo^{27,30}, del hígado, del líquido sinovial, de los tendones, etc.³⁰

El objetivo subyacente a la utilización de MSC como tratamiento directo reside en su capacidad inhibitoria del sistema inmune, permitiendo así la regeneración del tejido dañado y la proliferación de las células β -pancreáticas residentes³⁰. Dicha inhibición es el resultado global

de las distintas acciones que ejercen las MSC en el páncreas, entre las que destacan: la secreción de moléculas inmunomodulatorias que permiten inhibir tanto la activación de las células T (factor de crecimiento transformante β (TGF- β), la interleucina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)), como la inflamación y la maduración de las células dendríticas (interleucina 6 (IL-6) e interleucina 12 (IL-12), respectivamente); la expansión de las células T reguladoras mediante la secreción TGF- β y; la regulación en la expresión de genes anti-apoptóticos y regenerativos en las células β -pancreáticas³⁰.

El tratamiento con HSC, en cambio, consigue disminuir la reactividad del sistema inmune contra los autoantígenos mediante la restauración de la tolerancia inmunitaria y la reactivación de la función del timo³². A pesar de que el mecanismo subyacente a la modulación del sistema inmune mediante el trasplante de HSC no ha sido dilucidado, diversos estudios han demostrado su eficacia tanto en la remisión como en la prevención de la DM1³². Entre dichos estudios destaca el llevado a cabo por Voltarelli *et al.* en el que se proporcionó, previo una terapia inmunosupresora, un trasplante autólogo a 23 pacientes con DM1³². De los 23 pacientes, 20 presentaron una remisión de la enfermedad, con una media de 31 meses sin necesitar de la administración de insulina exógena³². No obstante, la eficacia de tal tratamiento es discutida por distintos investigadores. Es el caso de los resultados obtenidos por un grupo de investigadores asiático, a partir de los cuáles concluyen que realmente no hay un beneficio significativo en este tratamiento³².

1.2.2 Tratamientos de diferenciación

Múltiples son los protocolos de diferenciación que van a permitir la generación de IPS a partir de células que difieren del fenotipo y de la función característica de las células β -pancreáticas. Dichos protocolos no sólo van a diferir en función del tipo celular del cual se parta, sino que, para el mismo tipo celular, se han establecido diversos protocolos los cuales presentan eficiencias de diferenciación diferentes.

1.2.2.1 Diferenciación de ESC en IPS

Las ESC presentan dos características esenciales que las hacen óptimas para su utilización en el tratamiento de la DM1: capacidad de renovación ilimitada y posibilidad de diferenciación en cualquier tipo celular embrionario²⁹. No obstante, debido a su procedencia, presentan controversias éticas y religiosas²⁸ que dificultan su utilización en clínica.

Con el objetivo de mimetizar el desarrollo embrionario de las células pancreáticas, se han establecido distintos protocolos para la diferenciación de las ESC en IPS entre los que destacan los propuestos por D'amour *et al.*^{27-29,33}, Shi *et al.*²⁷ y Rezania *et al.*²⁹, presentando los dos primeros una eficiencia del 7 y del 14% respectivamente. Las variaciones en la eficiencia de los distintos protocolos pueden deberse al número de pasos en los que se lleva a cabo la diferenciación, así como al momento y al tipo de factores de crecimiento y citoquinas utilizados. Un ejemplo de protocolo es el establecido por Rezania *et al.*²⁹, representado en la **Figura 5**.

Los marcadores celulares que identifican a las células β -pancreáticas y, por lo tanto, cuya expresión intenta conseguirse mediante los distintos protocolos de diferenciación, son: PDX1/NKX6.1, NEUROD1 y MAFA²⁹. Es por ello por lo que, al margen de los protocolos establecidos, se ha intentado potenciar la generación de dichos marcadores. Es el caso de NEUROD1, cuya expresión es dependiente del factor de transcripción neurogenina-3 (Ngn3)²⁹, la potenciación del cual, en distintos estudios, ha resultado en la obtención de precursores pancreáticos con una expresión de insulina superior²⁹.

No obstante los múltiples esfuerzos y la obtención de un número bajo de células β -pancreáticas²⁷⁻²⁹, la secreción de insulina por parte de éstas ha resultado ser similar a las del páncreas fetal²⁹, es decir, se obtienen células β -pancreáticas inmaduras que no consiguen secretar insulina en respuesta a estímulos glucídicos *in vitro*²⁹. Además, las células obtenidas a partir de la diferenciación de ESC suelen ser polihormonales, es decir, secretan más de un tipo de hormona³⁴. Se cree que el estado inmaduro de las células β -pancreáticas, resultando en una baja secreción de insulina, es debido a que durante el proceso de diferenciación *in vitro* se carece de toda una serie de factores que, en una situación de desarrollo embrionario, viajan a través del torrente sanguíneo procedentes de tejidos periféricos, participando así en la maduración de dichas células^{28,33}. El co-cultivo de IPS derivadas de ESC con células endoteliales es una alternativa que proporciona un estado de diferenciación superior al obtenido mediante los protocolos comentados anteriormente²⁷.

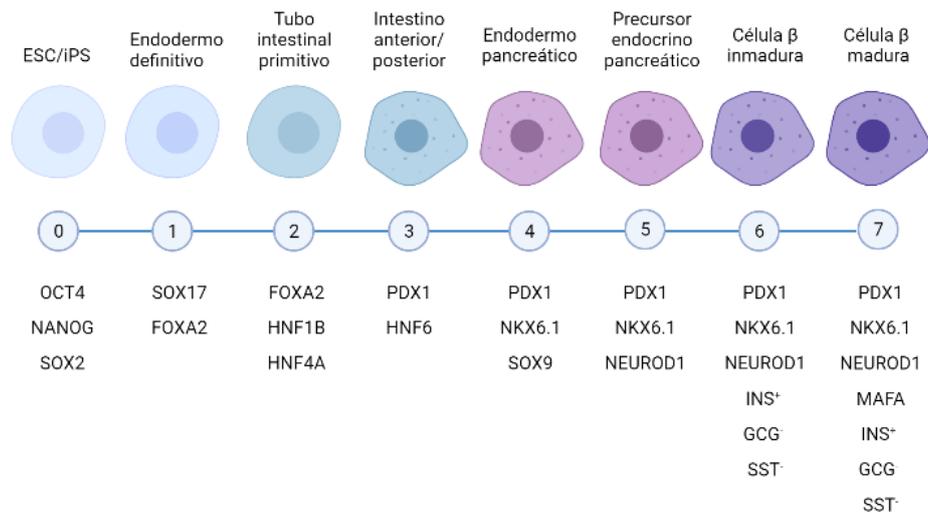


Figura 5: Eje temporal de las distintas etapas que se suceden en el proceso de diferenciación de células madre embrionarias (ESC) y células madre pluripotentes inducidas (iPSC) en células productoras de insulina (IPS)²⁹. Para cada etapa se indica el estado en el que se encuentra la célula, así como los genes que expresa. Adaptado mediante BioRender a partir del protocolo establecido por Rezania *et al.*²⁹.

1.2.2.2 Diferenciación de iPSC en IPS

Las iPSC, al igual que las ESC, son células pluripotentes con capacidad de generar cualquier tipo celular embrionario²⁸. A pesar de las características compartidas que les confiere su estado de pluripotencia, difieren en el origen debido a que las iPSC se obtienen a partir de la reprogramación de células somáticas del individuo adulto (fibroblastos, células sanguíneas, queratinocitos, etc.)²⁸. La utilización de estas células en clínica no se vería impedida por las cuestiones éticas y religiosas relacionadas con las ESC²⁹. Además, dicha utilización podría verse potenciada en aquellos casos en los que se desee realizar una terapia autóloga, evitando así un posible rechazo por parte del paciente²⁷. A pesar de las ventajas que su utilización supone, puede generar efectos adversos como por ejemplo, la inducción de tumores como consecuencia de la utilización de oncogenes como c-Myc en el proceso de reprogramación²⁸.

Destacan los experimentos de Tateishi *et al.* (2008)³⁵, en los que se consigue, por primera vez, la obtención células IPS a partir de iPSC derivadas de fibroblastos^{27,28,33}. Al tratarse de células con el mismo estado de indiferenciación que las ESC, los protocolos de diferenciación (**Figura 5**), así como los resultados obtenidos, suelen ser similares: co-expresión de distintas hormonas y secreción insulínica en respuesta a glucosa disminuida³³. Además del co-cultivo con células endoteliales²⁷, el cambio en las condiciones nutricionales del cultivo pueden conllevar a la

obtención de células β -pancreáticas maduras³⁶. Este último se debe, por ejemplo, a que la presencia de aminoácidos en el medio de diferenciación promueve la activación de mTORC1, conduciendo a un estado proliferativo (característico de las células β -pancreáticas fetales)³⁶. No obstante, al sustituir los aminoácidos por glucosa se produce la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) que inhibe, a su vez, a mTORC1, disminuyendo así la proliferación y promoviendo la maduración de las células β -pancreáticas³⁶.

1.2.2.3 Diferenciación de ASC en IPS

Las ASC se localizan en diferentes órganos y tejidos, entre los que destacan el músculo, la piel, el cerebro, la sangre, etc.³⁷. De la misma manera que las ESC, presentan capacidad de auto-renovación, no obstante, el número de tipos celulares que se pueden obtener a partir de éstas es mucho más reducido³⁷. Las ASC más estudiadas y, por lo tanto, más utilizadas en terapia celular son las obtenidas a partir de la médula ósea: HSC y MSC³⁸, siendo estas últimas las más recurrentes en tratamientos de diferenciación.

Las MSC, además de poder obtenerse a partir de la médula ósea pueden extraerse a partir del tejido adiposo (localizaciones más utilizadas para dicha extracción), endometrio, hígado, etc.³⁹. La diferenciación directa de las MSC en IPS, tanto las derivadas de la médula ósea como las del tejido adiposo, siguen un protocolo de 3 pasos^{28,39}: en el primero de ellos se obtendría un endodermo definitivo (estadio 1 de la **Figura 5**) mediante la administración de activina-A, butirato sódico y β -mercaptoetanol; en el segundo paso se conseguiría la diferenciación en un endodermo pancreático (estadio 4 de la **Figura 5**) mediante la incorporación de taurina y; en el tercer paso, se conseguiría la diferenciación en agregados celulares que expresan hormonas pancreáticas (estadio 6 de la **Figura 5**) mediante la incorporación de taurina, péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), nicotinamida y aminoácidos no esenciales²⁸.

El trasplante, a través de la vena porta, de las IPS obtenidas a partir de la diferenciación de MSC conduce a un incremento de la secreción de insulina y del péptido C en ratones diabéticos, revirtiendo así el estado hiperglucémico³¹. No obstante, dicha reversión es temporal debido a que los niveles de insulina van disminuyendo hasta la octava semana postrasplante, de manera que tendríamos un muy buen control de la glucemia las primeras semanas pero que acabaría en la reinstauración de la DM1 con el paso del tiempo (8 semanas)³¹. Los beneficios del tratamiento de diferenciación de MSC en IPS han sido comparados con el tratamiento de MSC directo y se ha podido observar que, aunque en las primeras semanas el tratamiento con IPS derivadas de MSC presentaba mejores resultados en cuanto a la secreción de insulina y, por lo tanto, a la reversión de la diabetes, el tratamiento directo permitía un control de la glucemia que, aunque no tan bueno, era más prolongado en el tiempo³¹. Es por este motivo que la diferenciación de las ASC es una práctica poco frecuente³².

1.2.3 Tratamientos de transdiferenciación

La terapia celular para el tratamiento de la DM1 no solo es posible mediante la utilización de células pluri o multipotentes, sino que también pueden utilizarse células somáticas diferenciadas procedentes de tejidos u órganos adultos²⁶. Distintas son las células que pueden ser utilizadas para la obtención de células β -pancreáticas mediante transdiferenciación: fibroblastos, hepatocitos, células α y δ -pancreáticas, células del páncreas exocrino, etc²⁶.

Uno de los tratamientos de transdiferenciación que ha resultado en la obtención de células β -pancreáticas es el llevado a cabo a partir de fibroblastos. El proceso de transdiferenciación llevado a cabo por Pereyra-Bonet *et al.* se basa en 4 pasos a partir de los cuales se obtienen

IPS⁴⁰. A pesar de poder observar un incremento en la expresión de los genes característicos de las células β -pancreáticas, así como una disminución de aquellos específicos de los fibroblastos, no se pudo detectar la presencia del péptido-C en el medio después de la estimulación con glucosa, concluyendo así que el proceso de transdiferenciación permite únicamente la obtención de células β -pancreáticas inmaduras⁴⁰.

Por otro lado, también se han llevado a cabo tratamientos de transdiferenciación a partir de células del páncreas exocrino^{26,41}. En este caso, después del aislamiento de las células, éstas fueron cultivadas en un medio en el que se incorporó la proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7, *Bone Morphogenetic Protein 7*)^{26,41}, conduciendo a la expresión de genes característicos de las células del páncreas endocrino como por ejemplo PDX1, MAFA y NEUROD1⁴¹. Además, dichas células respondían a los estímulos glucídicos mediante la secreción de insulina tanto *in vitro* como *in vivo*, no obstante, no se pudo conseguir la reversión del estado hiperglucémico⁴¹.

1.3 Retorno al paciente

Las células obtenidas mediante tratamientos de diferenciación, así como aquellas que no han sido modificadas ni diferenciadas, pueden ser trasplantadas al organismo receptor de distintas maneras, así como en distintos órganos³⁹. La forma y el lugar del trasplante dependerá de si se trata de un experimento animal o de una aplicación clínica, de un trasplante autólogo o alogénico, si se trasplantan células libres o adheridas a una matriz o encapsuladas, etc.³⁹. Además, a la hora de introducir las células en el paciente es importante tener en cuenta la vascularización de la zona, debido a que será necesario la llegada de oxígeno y nutrientes para la supervivencia del trasplante³⁹, así como la llegada de toda una serie de factores que permitan la maduración final de las IPS que, como hemos visto, es necesaria para una secreción de insulina correcta en respuesta a un estímulo glucídico³³.

Entre las múltiples formas y tipos de trasplante, cabe destacar aquellos que se basan en el trasplante de células libres, es decir, que no se encuentran sujetas a una matriz, y aquellos en los cuáles las células son encapsuladas con el objetivo de evitar el ataque por parte del sistema inmune³³. Para los primeros, las células suelen ser incorporadas a través de la vena porta³¹ o bien se introducen en algún tejido como por ejemplo bajo la cápsula adiposa del riñón⁴¹. En este caso, si se trata de un trasplante alogénico se requerirá de la inmunosupresión del sujeto para evitar la activación del sistema inmune. No obstante, y debido a las características inmunosupresoras de las MSC, cabe la posibilidad de que se cultiven y trasplanten células diferenciadas o transdiferenciadas junto con células madre sin modificar, potenciando así una menor respuesta por parte del sistema inmune.

Además de dicha posibilidad, también puede llevarse a cabo la encapsulación de las células que van a ser trasplantadas. Concretamente, la bioencapsulación consiste en envolver las células a trasplantar con una membrana semipermeable que permita el paso de oxígeno, nutrientes y el intercambio de moléculas de pequeño tamaño pero impida el paso de anticuerpos, células del sistema inmune y proteínas del sistema del complemento³³. A pesar de incrementar la supervivencia de las células trasplantadas y hacer posible los trasplantes alogénicos²⁹ sin la necesidad de inmunosuprimir al paciente, así como los xenotrasplantes³³, es necesaria la utilización de compuestos biocompatibles como el alginato²⁹, así como asegurarse de la óptima llegada de oxígeno y nutrientes ya que en caso de no suceder, se produciría una necrosis de las células dentro de la cápsula³³.

2. Terapia génica

Los tratamientos actuales para la DM1 (administración de insulina exógena y trasplantes del páncreas o de los islotes) no permiten una cura para el paciente diabético, ya sea porque no previenen las complicaciones derivadas de ésta o bien porque implican la inmunosupresión del paciente⁴². Paralelamente, la terapia celular ha demostrado la posibilidad de obtener células productoras de insulina a partir de tipos celulares, tratamientos y protocolos diferentes. No obstante, se obtienen células inmaduras que requieren de la maduración *in vivo*, implicando el desarrollo de toda una serie de tecnologías que permitan la supervivencia del trasplante y, por lo tanto, que evadan la reacción por parte del sistema inmune, principalmente si se trata de células procedentes de otro paciente (trasplante alogénico).

Una terapia prometedora para el tratamiento de enfermedades es la terapia génica ya que permite, mediante una serie de procedimientos, la manipulación del genoma celular del paciente afectado²⁴. Una de las ventajas que ofrece dicha terapia es la incapacidad de rechazo por parte del sistema inmune una vez las células modificadas han sido trasplantadas (en caso de necesidad) debido a que se trataría de un trasplante autólogo, en el que las células no serían reconocidas como extrañas.

2.1 Células diana

La elección de las células diana va a depender del objetivo de la terapia en sí, es decir, si el objetivo de la terapia génica es la modulación del sistema inmune, las células diana para la terapia serán diferentes a si el objetivo es la producción de insulina. Por ejemplo, en caso de querer que un tipo celular exprese insulina, se buscará aquel que presente capacidad de responder, metabólicamente, a los cambios de glucosa en el medio como por ejemplo los hepatocitos⁴³ o las células L y K del epitelio gastrointestinal⁴⁴; en caso de querer obtener células β -pancreáticas se utilizarán células con un cierto carácter de indiferenciación (ESC, iPSC o ASC)^{28,39} para poder llevar a cabo un proceso de diferenciación o bien células adultas diferenciadas como por ejemplo las células α -pancreáticas⁴⁵ o las células hepáticas⁴⁶ en las que se llevaran a cabo procesos de transdiferenciación.

En contraposición, en caso de que el objetivo de la terapia sea la modulación del sistema inmune, las células diana pueden ser tanto las células β -pancreáticas, las cuáles serán modificadas para una mayor resistencia a la reacción del sistema inmune, como las propias células del sistema inmune, las cuáles serán modificadas con el objetivo de conseguir una modulación de dicha respuesta⁴⁷.

2.2 Tipo de modificación realizada

La utilización de la terapia génica en la DM1 presenta dos aplicaciones fundamentales: la obtención de IPS y la modulación del sistema inmune, ya sea para disminuir la destrucción de las células β -pancreáticas residentes o para evitar el rechazo de un futuro trasplante alogénico⁴⁸. Dichas aplicaciones van a basarse en la introducción de genes funcionales con el objetivo de conferir dichas propiedades a aquellas células en las que se lleve a cabo la terapia.

2.2.1 Obtención de IPS

La obtención de células productoras de insulina mediante la terapia génica puede implicar la incorporación del gen de la insulina a la célula diana, promoviendo la expresión y secreción de esta hormona, o bien la incorporación de factores de transcripción característicos de las

células β -pancreáticas, conllevando a la conversión de la célula diana en una célula del páncreas endocrino.

2.2.1.1 Incorporación del gen de la insulina

Tal y como se ha comentado, uno de los principales tejidos diana para la inducción de la expresión de insulina es el hígado, debido a su importante papel en el metabolismo de la glucosa⁴⁷, así como por la presencia de componentes que le confieren sensibilidad frente a las alteraciones de la glucemia^{43,47}. Se han utilizado distintas estrategias para conseguir dicha expresión, como por ejemplo la utilización de lentivirus⁴² o de DNA minicircular⁴³.

Los estudios llevados a cabo por Alam *et al.* se basan en la transducción de hepatocitos mediante constructos de DNA minicircular⁴³. En dicho estudio se ponen a prueba un total de 5 constructos, los cuales fueron incorporados a un vector adenoviral y utilizados para la transducción de hepatocitos *ex vivo* y poder determinar, así, cuáles de ellos permitían una mayor secreción de insulina en respuesta a la glucosa⁴³. Los vectores adenovirales seleccionados fueron utilizados para la transducción *in vivo*, observando así un descenso en las concentraciones de glucosa en sangre y un incremento en el peso de los ratones tratados⁴³. A pesar de los buenos resultados, los adenovirus no pueden ser utilizados en repetidas ocasiones debido a su carácter inmunogénico^{43,47}. No obstante, la utilización de los constructos en forma de DNA minicircular libre, no sólo mimetizan los resultados obtenidos mediante el uso adenovirus, sino que permite que éstos se alcancen con antelación (1-2 días). Además, se permite la aplicación de dicho tratamiento las veces que sean necesarias una vez el efecto empiece a desvanecerse⁴³.

Los adenovirus no son los únicos vectores utilizados en el tratamiento de la DM1 mediante terapia génica y una muestra de ello son los experimentos llevados a cabo por Ren *et al.*, en los que se consigue la reversión de la hiperglucemia mediante la transducción *in vivo* de hepatocitos mediante un vector lentiviral que contiene el gen de la insulina⁴². Pocos días después de la transducción, los niveles de glucosa de los ratones tratados no diferían de los no diabéticos y, de la misma manera que en el caso anterior, se producía un incremento del peso⁴².

A pesar de las características que hacen al hígado un órgano idóneo sobre el cuál llevar a cabo los tratamientos de terapia génica, cabe destacar la realización de distintos experimentos en los que se utilizan células L y K del epitelio gastrointestinal debido a su capacidad de respuesta sensible a la glucosa, así como por contener las enzimas necesarias para la maduración de la insulina⁴⁹. Los estudios llevados a cabo por Zhang *et al.* confirmaron la estabilización de la glucemia mediante la utilización de plásmidos que contenían el gen de la insulina y, como promotor, el del péptido inhibidor gástrico (GIP)⁴⁹, péptido expresado y secretado por las células K en respuesta a la ingesta⁴⁹. Después de la transfección *in vitro* de las células obtenidas a partir de una línea celular de tumor duodenal, de la comprobación de la secreción de insulina en respuesta a un estímulo glucídico, así como que ésta solo se expresaba en células K gracias al promotor tejido-específico, se realizó el trasplante subcutáneo de dichas células a los ratones diabéticos⁴⁹. Los sujetos tratados presentaron unos menores niveles de glucosa en sangre así como unos niveles de insulina superiores respecto a los no tratados⁴⁹. No obstante, las células del trasplante generaron tumores que causaron la muerte de los ratones⁴⁹ motivo por el cual se descarta como posible diana terapéutica⁴⁴.

2.2.1.2 Incorporación de factores de transcripción característicos de células β -pancreáticas

La incorporación de genes que codifican para factores de transcripción característicos de células β -pancreáticas permiten la diferenciación de ASC, ESC e iPSC, así como la transdiferenciación de células somáticas diferenciadas, en células productoras de insulina.

La diferenciación de ESC, iPSC o ASC en células β -pancreáticas mediante terapia génica presenta la misma filosofía que el proceso de diferenciación comentado en el apartado de terapia celular. No obstante, en este caso, en lugar de cultivar las células con una serie de factores para promover la expresión de aquellos que son característicos de las células β -pancreáticas, se transfectan/transducen las células con plásmidos o vectores víricos, respectivamente²⁸. De esta manera se incorporan al genoma celular genes que codifican para factores de transcripción propios de las células del páncreas endocrino como por ejemplo PDX1²⁸. Es el caso de los experimentos llevados a cabo por Kajiyama *et al.*, en los que transdujeron células adiposas derivadas de MSC mediante un vector retroviral para su posterior trasplante en ratones diabéticos²⁸. El 25% de las células transducidas y trasplantadas se diferenciaron en células β ²⁸, permitiendo así una mejora de la glucemia.

La transdiferenciación de células somáticas diferenciadas mediante terapia génica, así como la diferenciación de células multi o pluripotenciales, suele basarse en la incorporación de los mismos genes (PDX1, MAFA y Ngn3)^{45,46} debido a que se trata de los factores principales que intervienen en la diferenciación de las células β ⁴⁵. De hecho, Xiao *et al.* recorren a dichos factores para la transdiferenciación de las células α en β -pancreáticas⁴⁵. Para lograr tal objetivo, los investigadores utilizaron un vector vírico adenoasociado no integrativo (AAV) el cual contenía los genes que codifican para los factores PDX1 y MAFA⁴⁵. La transducción de las células diana fue posible gracias a la introducción del vector vírico a través de los conductos pancreáticos de ratones diabéticos, dando lugar a un incremento en la respuesta a la glucosa, una reversión de la hiperglucemia, un incremento de la masa de células β y una disminución en el número de células α ⁴⁵. Las células β obtenidas a partir de la transdiferenciación de las α presentaron patrones de expresión muy similares a las originales, motivo por el cual los investigadores se plantearon la transdiferenciación de células α humanas en β ⁴⁵. Los resultados obtenidos no difirieron de los anteriores además, el trasplante de dichas células a ratones diabéticos supuso un descenso en los valores de glucosa circulantes conduciendo a un incremento en la tolerancia a la glucosa⁴⁵.

Los hepatocitos también han sido utilizados para su transdiferenciación en células β -pancreáticas. Las investigaciones llevadas a cabo por Cim *et al.* ponen de manifiesto la posibilidad de transdiferenciación de estas células diana en células β -pancreáticas mediante la incorporación de 3 plásmidos⁴⁶. Cada uno de ellos contiene uno de los factores de transcripción comentados anteriormente y, únicamente la incorporación de los tres, permite la transdiferenciación del hepatocito⁴⁶. No obstante, la eficiencia de transfección de los hepatocitos mediante plásmidos y, por tanto, la capacidad de transdiferenciación en células β -pancreáticas, es menor que la obtenida mediante la transducción del páncreas exocrino mediante vectores adenovirales, sugiriendo que este último es un órgano diana más favorable para llevar a cabo procesos de transdiferenciación⁴⁶.

2.2.2. Modulación del sistema inmune

Al consistir la DM1 en una reacción excesiva por parte del sistema inmune frente a las células β -pancreáticas, una aplicación prometedora de la terapia génica es la modulación de dicho

sistema. Tal aplicación puede orientarse hacia la modificación de las células del sistema inmune o hacia la modificación de las células β , haciéndolas más resistentes frente al ataque.

2.2.2.1 Modificación de las células β -pancreáticas

La modificación de las células β -pancreáticas tiene como objetivo un incremento en la resistencia frente al ataque del sistema inmune. Algunos de los genes cuya transferencia confiere propiedades protectoras a dichas células son: factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1)⁵⁰ y la interleucina 4 (IL-4)⁵¹.

El IGF-1 es un factor mitogénico que promueve la supervivencia de las células β -pancreáticas interfiriendo además, en su diferenciación y maduración⁵⁰. Las investigaciones llevadas a cabo por Mallol *et al.* confirmaron el efecto protector de la sobreexpresión del factor IGF-1 en células β -pancreáticas mediante la utilización de un AAV en ratones diabéticos⁵⁰. La transducción de las células se realizó mediante una transferencia *in vivo* a través del conducto pancreático⁵⁰. A pesar de que todavía no se conoce el mecanismo a través del cual el IGF-1 protege a las células productoras de insulina del ataque del sistema inmune, se pudo comprobar que dicha sobreexpresión conduce a una disminución de la apoptosis debido a que se produce una menor infiltración de las células T reguladoras en los islotes⁵⁰. La disminución en la infiltración se debe a una menor expresión de citoquinas pro-inflamatorias y quimioatrayentes⁵⁰. Además, se ha podido observar una disminución de la expresión de genes HLA I y HLA II, disminuyendo así la capacidad de respuesta autoinmune⁵⁰. Todos estos acontecimientos conducen a un mantenimiento de las células β así como de los niveles de insulina, permitiendo la prevención y la reversión de la diabetes dependiendo de si la transducción se lleva a cabo en etapas previas al inicio de la patología o bien una vez ésta ya se ha instaurado⁵⁰.

La respuesta inmune que acontece en la DM1 manifiesta una deficiencia de las células T que presentan un carácter regulador y, por lo tanto, protector (células T reguladoras y células T ayudantes de tipo 2, Th2) frente aquellas que potencian la destrucción de las células β (células T ayudantes de tipo 1, Th1)⁵¹. Los estudios llevados a cabo por Rehman *et al.* han demostrado que la transferencia del gen que codifica para la IL-4 a las células β , mediante un AAV, previene y revierte la situación de hiperglucemia en roedores diabéticos debido a que dicha interleucina promueve la expresión de Th2⁵¹, equilibrando así la balanza. La transducción de las células β se llevó a cabo *in vivo* mediante la administración del AAV por vía intravenosa o mediante el conducto pancreático⁵¹. Los resultados obtenidos son muy similares a los obtenidos en el caso de transferir el factor IGF-1: disminución de la insulinitis, mantenimiento de un mayor número de células secretoras de insulina y, por lo tanto, un mayor control de la glucemia⁵¹.

2.2.2.2 Modificación de las células del sistema inmune

Cuando los mecanismos de control en el timo son defectuosos se generan células T y B autoreactivas que pueden conllevar al desarrollo de enfermedades autoinmunes. No obstante, existen distintos mecanismos, llevados a cabo por las células T reguladoras (Treg), que actúan a nivel periférico y que permiten el mantenimiento de la tolerancia: anergia, ignorancia, deleción, etc.⁵². Así pues, los Treg reconocerían mediante su receptor de antígenos de linfocitos T (TCR) el autoantígeno en concreto (el mismo que reconocen las células T y B autoreactivas) presentado sobre CMH II y provocarían una disminución de la respuesta inmune mediante distintos mecanismos como la secreción de citoquinas inmunosupresoras, muerte de las células T que hayan interactuado con el mismo autoantígeno y, en la misma célula⁵³, promoviendo una disminución del TCR y del CD28 (molécula co-estimuladora necesaria para la generación de respuesta) del linfocito autoreactivo (anergia).

En distintas enfermedades autoinmunes como es el caso de la diabetes, se ha podido observar una disminución del número de Treg frente a las células T efectoras⁵². Así pues, una terapia prometedora para la disminución de la respuesta autoinmune es la generación, *in vitro*, de Tregs con receptores de antígeno quimeras (CAR)⁵⁴. Los Treg resultantes o Treg quimeras, se caracterizan por presentar un TCR con dominios co-estimuladores y de transmisión de la señal, así como el dominio de unión al antígeno correspondiente⁵².

Los experimentos llevados a cabo por Tenspolde *et al.* se basan en la formación de Treg quimeras mediante la transducción de células Treg con un vector retroviral, el cual contenía un plásmido con todos los componentes necesarios para la formación del CAR, en este caso dirigido a los autoantígenos de insulina⁵². La transfección de las células se realizó *in vitro*, permitiendo la realización de ensayos que confirmasen el papel inmunosupresor de dichas células, así como su posterior proliferación⁵². Las células fueron incorporadas a los ratones vía intravenosa a las 12 semanas y a pesar de reducir la incidencia de manifestar la patología, esta reducción era mínima por lo que no se previene el desarrollo de la DM1⁵². Esto es debido a que la forma monomérica de la insulina, a diferencia de la hexamérica, no permitía la activación de las Treg quimeras⁵². Debemos tener en cuenta que la investigación de Tenspolde *et al.* estaba dirigida hacia el autoantígeno insulina, por lo que la no obtención del resultado esperado no significa que la generación de Treg quimeras frente otros autoantígenos característicos de la DM1 no pueda dar resultados esperanzadores.

Otra alternativa para recuperar la tolerancia del sistema inmune son los estudios llevados a cabo por Han *et al.*, en los que utilizan un adenovirus recombinado para inducir la expresión del autoantígeno GAD₍₅₀₀₋₅₈₅₎ en la musculatura esquelética⁵⁵. Los resultados obtenidos después de la inyección intramuscular del adenovirus recombinante en ratones diabéticos demostraron una disminución en la incidencia de diabetes en aquellos ratones que habían sido tratados con dicha terapia frente aquellos que ejercían como controles, así como un menor grado de insulinitis⁵⁵. Dichos resultados se basan en la capacidad del péptido GAD en inducir la actividad de los Th2, promoviendo así la expresión de IL-4 e IL-10⁵⁵. A corto plazo, la inducción de los Th2 permite la remisión de la DM1, no obstante, se ha podido observar que, a largo plazo, el péptido GAD también induce la producción de células Treg⁵⁵ con las consecuencias que eso conlleva a la regulación de la respuesta autoinmune.

2.3 Transferencia *ex vivo/in vivo*

Los tratamientos basados en terapia génica implican a menudo la utilización de vectores como son los plásmidos o virus, la eficiencia de los cuáles suele ser probada al inicio de los experimentos ya que es frecuente disponer de distintos vectores⁴³ con los que trabajar. Por este motivo, suelen darse transferencias *ex vivo* e *in vivo* en el mismo trabajo experimental⁴³.

Para poder comprender en qué casos se lleva a cabo cada tipo de transferencia génica, cabe destacar las ventajas e inconvenientes de llevar a cabo tratamientos *ex vivo* o *in vivo*. Por un lado, la transferencia *ex vivo* permite seleccionar las células que hayan incorporado la molécula de interés, además de presentar una mayor eficiencia²⁴. No obstante, es necesario que las células puedan cultivarse, así como que consiste en un tratamiento más complicado y costoso²⁴. En contraposición, el tratamiento *in vivo* es más sencillo y menos invasivo, ya que no requiere de la biopsia del tejido u órgano diana, pero no permite controlar el proceso, además de presentar una eficiencia de transferencia inferior²⁴. Así pues, podemos considerar que la elección del método de transferencia se basa en el tipo de célula diana, de lo invasivo que sea la obtención de dichas células y del grado de eficiencia necesario.

Además, se debe tener en cuenta, en función del objetivo de la terapia, las consecuencias que ésta puede generar según se realice mediante un tipo de transferencia u otro. Por ejemplo, en caso de querer realizar una terapia génica para transdiferenciar células hepáticas en β -pancreáticas no se aconseja llevar a cabo una transferencia *in vivo* ya que la presencia de células β -pancreáticas en el hígado puede conllevar a la activación del sistema inmune y generar hepatitis⁴². No obstante, el hígado es un órgano en el que se suele llevar a cabo transferencias *in vivo* como por ejemplo para la incorporación del gen de la insulina^{42,43}. Así pues, se puede observar cómo el objetivo de la terapia génica también debe tenerse en cuenta para realizar una transferencia *ex vivo* o *in vivo*.

Mientras que para algunas terapias celulares diversos ensayos clínicos han sido realizados en humanos³², los tratamientos basados en terapia génica se están realizando en roedores. A pesar de que el método de transferencia es *in vivo*, éstos suelen presentar pasos previos *ex vivo* con la finalidad de comprobar la expresión correcta del transgén, así como que no se produce ningún efecto adversos⁴³ como por ejemplo, la transducción de células no-diana. En este caso, sería interesante la incorporación de promotores específicos del órgano diana, promoviendo así la expresión única en dicho órgano o tejido.

CONCLUSIONES

Una vez realizada la revisión sobre los distintos tratamientos en terapia celular y génica aplicados a la DM1, se concluye:

1. La bioencapsulación es una alternativa prometedora a la inmunosupresión del paciente en trasplantes alogénicos.
2. La utilización de moléculas (IL-4) y células (MSC) con características inmunosupresoras en terapia génica y celular permiten una remisión de la degradación de las células β -pancreáticas por parte del sistema inmune.
3. Las células β -pancreáticas obtenidas en procesos de diferenciación son inmaduras, incapaces de secretar insulina en respuesta a estímulos glucídicos, necesitándose la maduración *in vivo* o el desarrollo de técnicas *in vitro* que lo permita, como por ejemplo el cultivo con células vasculares y endoteliales.
4. Los procesos de terapia génica permiten la utilización de células propias del paciente, hecho que evitaría el rechazo en caso de trasplante.
5. Los tratamientos en terapia génica para la DM1 albergan la posibilidad de incorporar el gen de la insulina en órganos sensibles a los cambios de glucosa para mimetizar el mecanismo de secreción de insulina llevado a cabo por el páncreas, así como la reeducación del sistema inmune utilizando como base los autoantígenos característicos de la enfermedad.
6. Mientras que algunas terapias celulares han sido probadas en humanos (ensayos clínicos), los tratamientos en terapia génica únicamente han sido probados en roedores. A la vista de los buenos resultados en ambas terapias, es necesario seguir investigando para poder, en un futuro próximo, garantizar la seguridad y la eficiencia de dichas terapias con el objetivo de aplicarlas en humanos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberti, K.G.M.M. & Zimmet, P.Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* vol. 15, 539–553.
2. American Diabetes Association (2013). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* vol. 36, S67-S74.
3. Kerner, W. & Brückel, J. (2014). Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* vol. 122, 384–386.
4. Tao, Z., Shi, A. & Zhao, J. (2015). Epidemiological Perspectives of Diabetes. *Cell Biochem. Biophys.* vol. 73, 181–185.
5. Gimeno, M.L., Ho Hyon, S. & Argibay, P.F. (2011). Terapia celular para el tratamiento de la diabetes: más allá de las células madre. *Diabetes 267 Artic. Espec. Med. (Buenos Aires)* vol. 71, 267–273.
6. Esteban, B.M. & Castel, I.P (1987). *Las diabetes mellitus*. Madrid, España: Ediciones CEA
7. Van Belle, T.L., Coppieters, *et al.* (2011). Type 1 diabetes: Etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiological Reviews* vol. 91, 79–118.
8. Gillespie, K.M. (2006). Type 1 diabetes: Pathogenesis and prevention. *CMAJ* vol. 175, 165–170.
9. Plows, J.F., Stanley, J.L., *et al.* (2018). The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19, 3342.
10. Baz, B., Riveline, J.P. & Gautier, J.F. (2016). Gestational diabetes mellitus: Definition, aetiological and clinical aspects. *European Journal of Endocrinology* vol. 174, R43–R51.
11. Federación Internacional de Diabetes. (2019) *Atlas de la Diabetes de la FID, 9ª edición*. Bruselas, Bélgica: Federación Internacional de Diabetes.
12. Xie, Z., Chang, C. & Zhou, Z. (2014). Molecular mechanisms in autoimmune type 1 diabetes: a critical review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* vol. 47, 174–192.
13. Morran, M.P., Omenn, G.S. & Pietropaolo, M. (2008). Immunology and genetics of type 1 diabetes. *Mt. Sinai J. Med.* vol. 75, 314–327.
14. Smatti, M.K., Cyprian, F.S., *et al.* (2019). Viruses and autoimmunity: a review on the potential interaction and molecular mechanisms. *Viruses* vol. 11, 762.
15. Nolan, D., Castley, A. *et al.* (2012). Contributions of vitamin D response elements and HLA promoters to multiple sclerosis risk. *Neurology* vol. 79, 538–546.
16. Handorf, A.M., Sollinger, H.W. & Alam, T. (2015). Insulin gene therapy for type 1 diabetes mellitus. *Exp. Clin. Transplant.* vol. 13, 37–45.
17. SciELO - Salud Pública - La terapia celular: algunas consideraciones consideraciones. <https://scielosp.org/article/rpsp/1999.v5n1/41-42/es/>. Consultada 7/06/2021.
18. Asahara, T., Kalka, C. & Isner, J.M. (2000). Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Therapy* vol. 7, 451–457.
19. Elbuluk, A., Einhorn, T.A. & Iorio, R. (2017). A comprehensive review of stem-cell therapy. *JBJS Rev.* vol. 5, e15.
20. Yamanaka, S. (2020). Pluripotent stem cell-based cell therapy-Promise and challenges. *Cell Stem Cell* vol. 27, 523–531.

21. Kashofer, K. & Bonnet, D. (2005). Gene therapy progress and prospects: stem cell plasticity. *Gene Therapy* vol. 12, 1229–1234.
22. Beltrán, O., Quintero, L.O. & Chaparro, O. (2005). Plasticidad y transdiferenciación en células "stem" adultas. *Revista Med* vol. 13, 10-16.
23. Golchin, A. & Farahany, T.Z. (2019). Biological products: cellular therapy and FDA approved products. *Stem Cell Reviews and Reports* vol. 15, 166–175.
24. García, M.D.R, Segarra, C.R. & Castillo, A.L. (2017). *Técnicas de ingeniería genética*. Madrid, España: Editorial Síntesis
25. Anguela, X.M. & High, K.A. (2019). Entering the modern era of gene therapy. *Annual Review of Medicine* vol. 70, 273–288.
26. Lu, J., Xia, Q. & Zhou, Q. (2017). How to make insulin-producing pancreatic β cells for diabetes treatment. *Science China Life Sciences* vol. 60, 239–248.
27. Wen, Y., Chen, B. & Ildstad, S.T. (2011). Stem cell-based strategies for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Expert Opinion on Biological Therapy* vol. 11, 41–53.
28. Pokrywczynska, M., Krzyzanowska, *et al.* (2013). Differentiation of stem cells into insulin-producing cells: current status and challenges. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* vol. 61, 149–158.
29. Chen, S., Du, K. & Zou, C. (2020). Current progress in stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus. *Stem Cell Research and Therapy* vol. 11, 275.
30. Davis, N.E., Hamilton, D. & Fontaine, M.J. (2012). Harnessing the immunomodulatory and tissue repair properties of mesenchymal stem cells to restore β cell function. *Curr. Diab. Rep.* vol. 12, 612–622.
31. Hsiao, C.Y., Chen, T.H, *et al.* (2020). Comparison between the therapeutic effects of differentiated and undifferentiated Wharton's jelly mesenchymal stem cells in rats with streptozotocin-induced diabetes. *World J. Stem Cells* vol. 12, 139–151.
32. Sordi, V., Pellegrini, S., *et al.* (2017). Stem cells to restore insulin production and cure diabetes. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* vol. 27, 583–600.
33. Takahashi, Y., Takebe, T. & Taniguchi, H. (2016). Engineering pancreatic tissues from stem cells towards therapy. *Regenerative Therapy* vol. 3, 15–23.
34. Shahjalal, H.M., Shiraki, N., *et al.* (2014). Generation of insulin-producing β -like cells from human iPS cells in a defined and completely xeno-free culture system. *J. Mol. Cell Biol.* vol. 6, 394-408.
35. Tateishi, K., He, J., *et al.* (2008). Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.* vol. 283, 31601–31607.
36. Sun, Z.Y., Yu, T.Y., *et al.* (2021). Functional maturation of immature β cells: A roadblock for stem cell therapy for type 1 diabetes. *World J. Stem Cells* vol. 13, 193–207.
37. Gurusamy, N., Alsayari, A., *et al.* (2018). Adult stem cells for regenerative therapy. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* vol. 160, 1–22.
38. Dulak, J., Szade, K., *et al.* (2015). Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochimica Polonica* vol. 62, 329–337.
39. Ghoneim, M.A., Refaie, A.F., *et al.* (2020). From mesenchymal stromal/stem cells to insulin-producing cells: progress and challenges. *Stem Cell Reviews and Reports* vol. 16, 1156–1172.

40. Pereyra-Bonnet, F., Gimeno, M.L., *et al.* (2014). Skin fibroblasts from patients with type 1 diabetes (T1D) can be chemically transdifferentiated into insulin-expressing clusters: A transgene-free approach. *PLoS One* vol. 9, e100369.
41. Klein, D., Álvarez-Cubela, S., *et al.* (2015). BMP-7 induces adult human pancreatic exocrine-to-endocrine conversion. *Diabetes* vol. 64, 4123–4134.
42. Ren, B., O'Brien, B.A., *et al.* (2007). Long-term correction of diabetes in rats after lentiviral hepatic insulin gene therapy. *Diabetologia* vol. 50, 1910–1920.
43. Alam, T., Wai, P., *et al.* (2013). Correction of diabetic hyperglycemia and amelioration of metabolic anomalies by minicircle DNA mediated glucose-dependent hepatic insulin production. *PLoS One* vol. 8, e67515.
44. Encina, G., Ezquer, F., *et al.* (2011). Insulin is secreted upon glucose stimulation by both gastrointestinal enteroendocrine K-cells and L-cells engineered with the preproinsulin gene. *Biol. Res.* vol. 44, 301–305.
45. Xiao, X., Guo, P., *et al.* (2018). Endogenous reprogramming of alpha cells into beta cells, induced by viral gene therapy, reverses autoimmune diabetes. *Cell Stem Cell* vol. 22, 78-90.
46. Cim, A., Sawyer, G.J., *et al.* (2012). In vivo studies on non-viral transdifferentiation of liver cells towards pancreatic β cells. *J. Endocrinol.* vol. 214, 277–288.
47. Nett, P.C., Sollinger, H.W. & Alam, T. (2003). Hepatic insulin gene therapy in insulin-dependent diabetes mellitus. *American Journal of Transplantation* vol. 3, 1197–1203.
48. Yechoor, V. & Chan, L. (2005). Gene therapy progress and prospects: gene therapy for diabetes mellitus. *Gene Therapy* vol. 12, 101–107.
49. Zhang, Y., Yao, L., *et al.* (2008). Genetically engineered K cells provide sufficient insulin to correct hyperglycemia in a nude murine model. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. vol. 40, 149–157.
50. Mallol, C., Casana, E., *et al.* (2017) AAV-mediated pancreatic overexpression of IGF1 counteracts progression to autoimmune diabetes in mice. *Mol. Metab.* vol. 6, 664–680 (2017).
51. Rehman, K. K., Trucco, M., *et al.* (2008). AAV8-mediated gene transfer of interleukin-4 to endogenous β -cells prevents the onset of diabetes in NOD mice. *Mol. Ther.* vol. 16, 1409–1416.
52. Tenspolde, M., Zimmermann, K., *et al.* (2019). Regulatory T cells engineered with a novel insulin-specific chimeric antigen receptor as a candidate immunotherapy for type 1 diabetes. *J. Autoimmun.* vol. 103, 102298.
53. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., *et al.* (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* vol. 133, 775–787.
54. Zhang, Q., Lu, W., *et al.* (2018) Chimeric antigen receptor (CAR) Treg: A promising approach to inducing immunological tolerance. *Frontiers in Immunology* vol. 9, 2359.
55. Han, G., Li, Y., *et al.* (2005). Active Tolerance Induction and Prevention of Autoimmune Diabetes by Immunogene Therapy Using Recombinant Adenoassociated Virus Expressing Glutamic Acid Decarboxylase 65 Peptide GAD 500–585. *J. Immunol.* vol. 174, 4516–4524.