

TEMA PEDIÁTRICO

Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación,
morfogénesis y especificación celular endocrina.
¿Regeneración?

Pancreas and β cells: Differentiation mechanisms, morphogenesis and endocrine cellular specification. Regeneration?

Claudia Patricia Olvera-Granados, Guillermo Enrique Leo-Amador, Hebert Luis Hernández-Montiel

Laboratorio de Neurobiología y Bioingeniería Celular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Resumen

La diabetes mellitus tipo 1 es una enfermedad metabólica multifactorial en la que los mecanismos inmunológicos juegan un papel fundamental. Una vez desarrollada la enfermedad, los pacientes son dependientes de la administración exógena de insulina. Actualmente, el campo de la investigación experimental ha identificado una población pancreática con características de células madre. Esta población de células positivas a nestina, se expresa bajo ciertas condiciones especiales y abre la posibilidad de desarrollar técnicas para la obtención de nuevas células β que pudieran regenerar el tejido dañado. Este trabajo es una revisión acerca del desarrollo embrionario del páncreas, las células madre pancreáticas embrionarias, los modelos actuales de lesión para la inducción de la expresión de células madre en páncreas adultos, el papel de los radicales libres sobre la expresión de nuevas células madre y las terapias experimentales actuales para mejorar la expresión de estas células.

Palabras clave. Diabetes mellitus; células madre pancreáticas; nestina; modelos de lesión y terapias experimentales.

Summary

Diabetes mellitus type 1 is a multifactorial metabolic disease in which immunological mechanisms play an essential role. Once the disease is fully established, affected individuals are dependent upon exogenous insulin administration. Current research has identified a pancreatic population resembling stem cells features. This population of nestin-positive cells is activated under specific circumstances and opens the possibility of developing procedures for obtaining new β cells for the regeneration of the pancreatic islets. In this work we review the embryonic development of pancreas, pancreatic stem cells, the current models for the induction of stem cells in adult pancreas, the role of free radicals on the induction of new stem cells, and the current therapeutic procedures to improve the expression of these cells.

Key words. Diabetes mellitus; pancreatic stem cells; nestin; lesion models and current experimental therapies.

www.medigraphic.com

Solicitud de sobretiros: Hebert Luis Hernández Montiel, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Querétaro, Clavel Núm. 200, Col. Prados de la Capilla, Santiago de Querétaro, C. P. 76170, Querétaro, México.

Fecha de recepción: 12-10-2007.

Fecha de aprobación: 04-06-2008.

La diabetes mellitus (DM) engloba varios padecimientos crónico-degenerativos que actualmente han ido en aumento y constituyen un serio problema de salud pública. La DM tipo 1 y la tipo 2 comparten como característica común la hiperglucemia, ya sea debido a una disminución y deterioro progresivo de la masa de células β en los islotes pancreáticos o a una disminución en la eficacia de los mecanismos de señalización.

En la DM 1 existe un daño a las células β pancreáticas por un ataque selectivo del sistema inmunitario que conlleva la generación excesiva y prolongada de radicales libres. Actualmente, se ha descrito que el páncreas tiene la capacidad de responder a distintos tipos de daño celular con la expresión de un grupo de células que son marcadas con nestina. Recientemente, se ha relacionado a este linaje celular con la posibilidad de comportarse como células madre pancreáticas. Este trabajo hace una revisión acerca de los conocimientos actuales sobre las células nestina positivas y sus potenciales aplicaciones en el campo de la medicina.

La DM tipo 1 afecta a millones de personas en todo el mundo y su incidencia y prevalencia continúan aumentando.¹ Esta enfermedad se caracteriza por un período prodrómico de duración variable durante el cual se presenta una pérdida selectiva de células β .² Se han identificado algunos factores intrínsecos y extrínsecos que podrían estar relacionados, como por ejemplo: a) el hecho de que menos de 10% de los individuos enfermos presentan susceptibilidad asociada con HLA, b) existe una concordancia de DM tipo 1 menor de 40% entre gemelos monocigóticos, c) una incidencia 10 veces más en caucásicos viviendo en Europa, d) un aumento en la incidencia en los últimos 50 años, y e) en estudios de migración indican que hay un aumento en la incidencia de la enfermedad en los grupos poblacionales que se han movido de un lugar de baja incidencia a una región de gran incidencia. Esto sugiere que la susceptibilidad genética puede existir, pero que los factores externos juegan un papel al parecer más importante.²

El mecanismo que inicia el proceso de destrucción inmunológica progresiva e irreversible de las células β no está del todo comprendido. Una de las teorías es que existen autoanticuerpos dirigidos de forma específica contra distintos componentes de las células β , linfocitos T con una capacidad regulatoria disminuida o la implicación de algún virus del medio ambiente.³ Todo esto combinado con una pobre expresión de enzimas antioxidantes pancreáticas, que le confieren una baja resistencia contra insultos oxidativos.⁴ Entre los autoantígenos se encuentran la insulina, ácido glutámico descarboxilasa (GAD65), tirosín fosfato, antígeno de insulinoma (IA)-2 e IA-2 β , carboxipeptidasa H, antígeno de los islotes pancreáticos (ICA-69), gangliósidos GM, autoantígeno 38-kd y Sox-13. La gravedad en el desarrollo de la DM tipo 1 se relaciona directamente con el número de autoantígenos presentes por individuo.⁵

Esta destrucción directa hacia la masa de células β provoca que su porcentaje sea apenas de 2% en la DM tipo 1, a diferencia de 40 a 60% que queda en la DM tipo 2, sin embargo, la pérdida es progresiva en el orden de 4 a 10% por año en esta última.⁶

Cuando la capacidad para secretar insulina disminuye, se presenta la hiperglucemia, que puede propiciar la acumulación de radicales libres a través de la auto oxidación y de la glucosilación no enzimática de las proteínas.^{7,8} Por tanto, la generación de radicales libres a partir de las citoquinas que se generan en el proceso autoinmune junto con la cronicidad de la enfermedad, hacen que el paciente diabético esté expuesto a un aumento del estrés oxidativo, ocasionando daños a biomoléculas como los lípidos, carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos y macromoléculas del tejido conectivo, interfiriendo de esta manera con la función celular.⁹

Hasta hace pocos años se encontró que el tejido pancreático muestra cierta capacidad de regeneración. Estudios realizados por Rosenberg y Vinik¹⁰ en 1989, ya sugerían esta posibilidad. En distintos ensayos realizados con agentes lesivos pancreáticos

mostraron cierta capacidad de regeneración de las células de los islotes de Langerhans.¹¹

El tratamiento hasta ahora para la DM tipo 1 es a base de insulina exógena; sin embargo, se han propuesto alternativas para la obtención de células β para sustituir la escasez de este linaje celular a partir de células madre embrionarias¹² o de células madre de tejido adulto como páncreas, hígado, sistema nervioso central, médula ósea, y adipositos, así como también de las células madre del mesénquima.¹³

Estructura pancreática

El páncreas es una glándula mixta, contiene tejido exocrino conformado por células acinares productoras de enzimas digestivas; y también presenta un tejido endocrino compuesto por las células de los islotes de Langerhans, que producen hormonas que mantienen la homeostasis de la glucosa (Fig. 1). En conjunto, los islotes representan alrededor de 1% del peso de la glándula.

El páncreas está cubierto por una capa de tejido conectivo, rico en células mesoteliales, con finos tabiques que dividen a la glándula en lóbulos. Las células de los islotes están delimitadas en for-

ma incompleta por una capa delgada de tejido conectivo reticular que se continúa en el interior de los islotes en escasa cantidad.¹⁴ El tejido endocrino adulto contiene cuatro tipos celulares diferentes, con mayor densidad en la zona de la cola.¹⁵ Estas células son: células productoras de insulina o β , que representan 70%; células productoras de glucagón o α , que representan 20%; las células productoras de somatostatina o δ , que representan entre 5 a 10%, y las células productoras del polipéptido pancreático o PP, que abarcan alrededor de 2%.¹⁴ Existen algunos tipos celulares secundarios, las células productoras del polipéptido intestinal vasoactivo (VIP o células DI) y las células secretoras mixtas (EC o enterocromafines).¹⁵ Estos grupos están contenidos en una estructura altamente organizada, donde las células β están en el interior del islote y el resto de los grupos celulares se encuentra en la periferia. La organización del aporte vascular permite llevar la sangre del núcleo a la periferia y se le conoce como BAD (β - α - δ) por su forma centrífuga de aporte vascular.⁴ Otro tipo celular, recientemente encontrado en la periferia del islote pancreático, es el parecido a las células neuronales de Schwann, ocupan menos de 1% y se cree que podrían ser importantes en la regeneración pancreática.

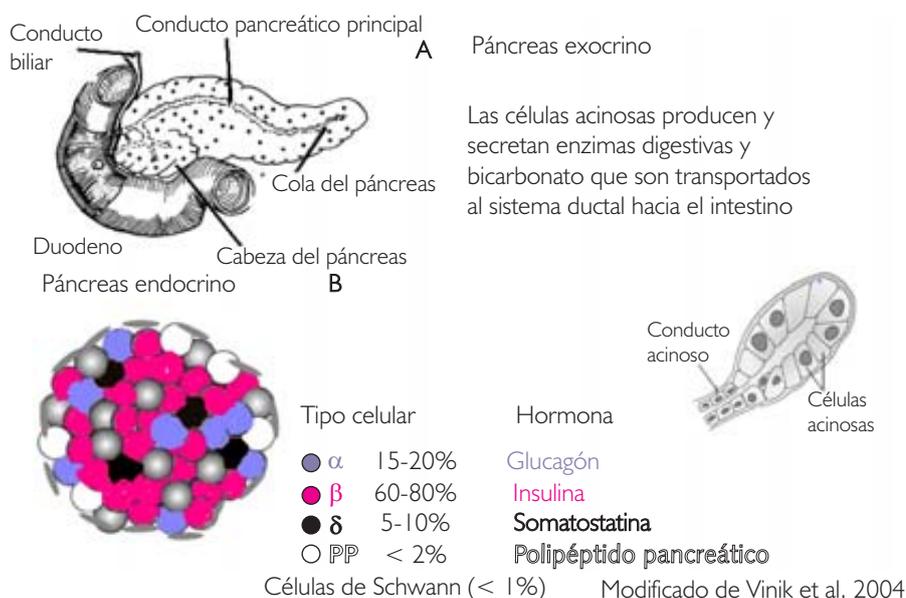


Figura 1. Representación de la anatomía e histología pancreática. Se aprecia su localización en la segunda porción del duodeno, el conducto pancreático principal y las divisiones del páncreas (cabeza, cuerpo y cola) (A). En B se observan las células acinosas del tejido exocrino y en el esquema inferior se observa la representación esquemática de un islote de Langerhans con los respectivos porcentajes de células endocrinas: α -productoras de glucagón, β -productoras de insulina, δ -productoras de somatostatina, PP-productoras de polipéptido pancreático y más recientemente encontradas: las células de Schwann.

En aves, las células ductales intercaladas (CDI), que pertenecen al tejido exocrino pancreático, están involucradas en la protección de las células endocrinas contra sustancias tóxicas y al parecer participan en la regulación del metabolismo de la glucosa.¹⁶ Así mismo, se observó que en mamíferos estas células se encuentran muy cercanas a los islotes pancreáticos y ambos tipos celulares expresan la proteína S-100.¹⁷

Desarrollo embrionario

El páncreas es un derivado de los brotes endodérmico dorsal y ventral que surgen de la parte caudal del intestino anterior y que se fusionan durante la rotación del estómago e intestino. Cada brote tiene un sistema de conductos. El brote endodérmico dorsal formará la mayor parte del páncreas (cabeza, cuerpo y cola). El brote ventral desarrollará la apófisis uncinada y parte de la cabeza del páncreas.¹⁸ El primer paso para el desarrollo del páncreas es que se excluyan genes que dictan la diferenciación intestinal (Sonic e Indio). Los factores excluyentes son la actina β y el factor de crecimiento fibroblástico.¹⁹ El desarrollo normal del páncreas está en relación directa con la interacción cercana entre las células epiteliales y el mesénquima que forman el primer brote; así mismo, ambos tipos celulares expresan el factor del islote 1 (Isl-1) y nestina.¹³ La proteína Isl-1 forma parte importante en la diferenciación pancreática.²⁰

Para promover la diferenciación hacia células endocrinas se inactiva su receptor y comienza a expresar neurogenina-3 y nestina.²¹ Durante la diferenciación, las células migran hacia el mesénquima adyacente donde se agrupan y esperan señales inductivas para diferenciarse (entre ellas se encuentra la proteína asociada a la neogénesis de los islotes-INGAP) a los distintos tipos celulares endocrinos.⁴ Demasiados factores de transcripción participan en el desarrollo y diferenciación de los diferentes linajes celulares.²²⁻²⁴

El HNF3 β es un factor que puede iniciar la respuesta positiva a las señales inductivas y es expresado en el feto de ratón antes de la expresión de Pdx-1 en el día ocho embrionario (8E).²⁵ Para el día 13E incrementa el número de células y comienzan a expresar marcadores específicos de los islotes de Langerhans²⁶ como Glut2, antes de desarrollar la capacidad de secretar la hormona; es por eso que ha servido como marcador de células primordiales en el sistema ductal.^{27,28} Cada estirpe endocrina depende de un tiempo apropiado de expresión de algunos genes, entre los que se encuentran Pax 4, Pax 6 y Pdx-1.²⁹ El HNF-1 α es necesario para mantener la expresión específica de las células de los islotes ya que es requerido durante toda la vida.³⁰ El desarrollo de la sensibilidad a la glucosa empieza a las dos semanas de vida postnatal.

El Pdx-1 ó factor 1 homeobox pancreático y duodenal es un factor de transcripción expresado en varios tejidos, se aisló como regulador transcripcional de insulina y somatostatina.³¹ Se ha detectado en todas las células embrionarias protodiferenciadas y durante la neogénesis.³² Mientras continúa el desarrollo pancreático, se va restringiendo progresivamente a los islotes, produciéndose 90% en las células β , 15% en las células δ y 3% en las células α ;³³ se requiere para la expresión, procesamiento y secreción de insulina, y es regulado por los niveles de glucosa.^{34,35} Su sobreexpresión permite la expresión de glucagón y no de insulina.²³

La abolición de Pdx-1 en las células β diferenciadas en ratones da como resultado la pérdida del fenotipo y la incapacidad para expresar Glut2 y glucocinasa, que son requeridas para la producción de insulina en respuesta a la glucosa.²⁰ Las mutaciones del gen que codifica para Pdx-1 es causa de la diabetes tipo MODY tipo 4.³⁶

La neogénesis se puede producir como resultado de la ligadura ductal, pancreatectomía parcial y sobreexpresión del factor transformador de crecimiento α ³⁷ o interferón γ .³⁸

Se ha visto que con ciertos estímulos se puede afectar el patrón de neogénesis, particularmente con la administración de estreptozotocina, en donde se observa que la neogénesis proviene de los largos conductos pancreáticos, a diferencia de lo que ocurre después de la administración con INGAP (*Islet Neogenesis Associated Protein*, por sus siglas en inglés), en donde el desarrollo proviene de las células protodiferenciadas adultas de los conductos pequeños y de las células acinares,³⁹ sugiriendo que las integrinas están involucradas en el proceso de desarrollo.⁴⁰

Algunos factores, como el factor de necrosis tumoral y la interleucina-6, son importantes reguladores en la expresión de la proteína INGAP.⁴¹ También están los adenovirus que median la expresión de neurogenina-3, el cual es un factor crítico en el desarrollo embrionario del páncreas de ratón; así mismo, se puede inducir la expresión de genes o de proteínas como la $\beta 2$ /NeuroD, Pax4, Nkx2,2, Pax6 y Nkx6,1 en las células ductales del adulto humano para la diferenciación de las células β .^{40,41}

El paso δ -Notch que controla la embriogénesis en el ratón, también es válido para los humanos, dando a las células ductales un fenotipo neuroendocrino.⁴²

Cuando se activa Pdx-1, regula junto con el factor de crecimiento fibroblástico, la sensibilidad a la glucosa, expresando el transportador Glut2 y la maquinaria de conversión de la proinsulina.⁴³ Su expresión va aumentando después del nacimiento, contrariamente con las células ductales, en donde disminuye ésta en los mismos días.⁴⁴ Pdx-1 promueve la diferenciación de las células madre embrionarias humanas (CMEH) hacia células endocrinas y exocrinas bajo el control de Foxa2.⁴⁵ Pdx-1 se une al promotor de insulina junto con otros factores de transcripción (Pax4 y Nkx2,2), permitiendo la expresión de insulina.

El Foxa2, o factor de transcripción endodérmico, se expresa temprano en el desarrollo de la capa del endodermo, de donde posteriormente deriva el páncreas.⁴⁶ Su disrupción afecta la expresión de

otros factores de transcripción en la célula β , afectando desde etapas muy tempranas.⁴⁷ Su sobreexpresión, en células madre de ratón, muestra un aumento en la diferenciación hacia el linaje endocrino.

Aunque la expresión de Glut-2 se localiza en la membrana celular de las células β , también se han observado células Glut-2⁺ dentro de los conductos pancreáticos en el nacimiento; sin embargo, descienden durante el período postnatal.⁴⁴

La neurogenina-3 (*Ngn3*) es un factor de transcripción que se requiere para el desarrollo de los islotes pancreáticos. Tiene un papel crítico en la transcripción de productos hormonales de las células de los islotes, especialmente las células α y β . Su delección, al menos en ratones, resulta de una pérdida completa de las células endocrinas pancreáticas, así como del inicio de diabetes; su sobreexpresión en el desarrollo pancreático resulta de un aumento de las células endocrinas. *Ngn3* está directamente regulada por HNF6, *Hes1*, y por la propia *Ngn3*. Además, *Ngn3* ha sido implicada para regular directamente la expresión de *NeuroD1*, *Pax4*, y *Nkx2,2*.⁴⁸ *Pax6* es inducida en etapas más tardías de los cuerpos embrionarios.

El péptido parecido al glucagón tipo 1 podría jugar un papel importante en la generación de células β en modelos animales de diabetes. Es una hormona intestinal incretina, derivada del procesamiento del proglucagón, que ejerce acciones insulínótropicas, uniéndose a un homodímero de receptores de proteína G, específica en las células β para estimular la secreción de insulina por la vía dependiente del AMPc.⁴⁹⁻⁵¹ Se ha visto que también ejerce acción para diferenciar a células embrionarias hacia células positivas para glucagón, somatostatina y PP.¹¹ Cuando se administra GLP-1 a ratones diabéticos, éste baja los niveles de glucosa y estimula la secreción de insulina.⁵² Se ha visto que estimula el crecimiento y la diferenciación celular, al parecer induciendo la expresión de la proteína del homeodominio de *Idx-1* (homeobox de los islotes y duodeno) o *Pdx-1*.⁵³

Se cree que los receptores para GLP-1 podrían estar presentes en las células nestina positivas, ya que ambos marcadores se han visto expresados con doble inmunohistoquímica en los racimos parecidos a islotes,¹¹ y que la activación resulte en la transcripción del factor *Idx-1*,⁴⁵ y a su vez, en un aumento en la expresión de insulina. Esta activación puede ser bloqueada por las altas concentraciones de glucosa que puede haber en el microambiente.⁵³

El factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1), ha sido identificado en el citoplasma de las células endocrinas δ y en la periferia del citoplasma de las células α y β . Su receptor se ha observado en la periferia de células α y β normales de ratas, perros y de humanos.⁵⁴ Se sabe que se expresa en células endocrinas pancreáticas en proliferación o en secreción activa. Se usa como marcador en células en diferenciación.⁵⁵ Pero el marcador principal para valorar el número de replications de las células β es el bromodeoxiuridina (BrdU).⁵⁶

C-kit está implicado en el desarrollo, función y supervivencia de los islotes de Langerhans y la supervivencia de las células β .⁵⁷ Es un receptor tirosina cinasa visto en las células madre hematopoyéticas;⁵⁸ éste y su ligando factor de células madre (SCF) son importantes para las señales de transducción de las células madre hematopoyéticas.^{59,60}

Tanto C-kit como la nestina en el páncreas endocrino son relativamente abundantes antes y durante el nacimiento, pero decrecen significativamente en el primer mes de vida, coincidentemente con la aparición de células positivas para marcadores de células maduras pancreáticas.⁶¹ Mientras que C-kit se encontró en la periferia de los islotes pancreáticos, Yashpal y col.⁴⁵ encontraron que las células positivas para nestina se encontraban dentro de los islotes pancreáticos, y que ambos no se coexpresaban dentro de las mismas células. Durante la embriogénesis, estas células no son destinadas a ser células β maduras.⁶² En el período postnatal, los pequeños islotes conti-

núan creciendo para desarrollarse desde los conductos y replicarse a células β . Este desarrollo desde los conductos tiene dos etapas: primero de expansión y posteriormente de maduración y diferenciación. Hay quienes aseguran que el linaje de las células endocrinas no proviene de los conductos. La figura 2 resume las distintas etapas de desarrollo pancreático, desde la aparición del endodermo hasta la generación de las células β , incluyendo los distintos factores de transcripción que se encuentran involucrados en cada etapa.

Células madre embrionarias como precursoras de los islotes pancreáticos

Cada vez son más los estudios que se encaminan a definir el funcionamiento de las células β usando marcadores para observar la expresión de algunos genes que normalmente expresa la célula β ; así mismo, qué genes se expresan ante situaciones de estrés. Es verdad que bajo condiciones normales, las células β tienen una baja capacidad de regeneración;^{63,64} sin embargo, tanto las células endocrinas como las exocrinas se pueden regenerar regulando la expresión de varios marcadores de proliferación, entre ellos un marcador llamado nestina que se expresa en respuesta a la lesión o pérdida celular.⁶⁵⁻⁶⁸ Estos estudios sugieren que los islotes y conductos de rata y del humano contienen células progenitoras,^{69,70} ya que la presencia de este marcador dentro de los islotes pancreáticos, sin la presencia de marcadores positivos para las hormonas que secretan las células endocrinas, sugieren la existencia de células indiferenciadas.^{20,71,72}

La nestina fue descrita originalmente como un marcador de células madre en cerebro, específicamente en la cara ventricular en cerebros de mamíferos.⁷³ Es una proteína de filamento intermedio clase cuatro que se encuentra intracelularmente⁷⁴ en muchos tejidos como músculo cardíaco, testículos, dientes, hígado y médula ósea, y se ha visto que regula la expresión de células diferenciadas en estos tejidos. Este marcador es ex-

La expresión de nestina ha mostrado ser un paso intermedio en la diferenciación de las células β embrionarias.⁸⁵ Las células multipotenciales expresan, de cualquier forma, niveles muy bajos de insulina y, lo más importante, es que pierden la expresión del factor de transcripción *Ipf1/Pdx*. La expresión de nestina es levemente regulada por el factor de crecimiento transformante β , así como por las proteínas de la membrana basal, como colágena IV, laminina, fibronectina, y es posible que ejerzan una retroalimentación negativa que limite la producción excesiva de nestina.⁸⁹

Yashpal y col.⁴⁵ encontraron que la mayoría de células positivas para nestina se expresaban en el décimo octavo día embrionario de la rata, para ir decreciendo hacia el tercero al séptimo día postnatal. Para la segunda semana de nacimiento, el número decreció significativamente y para el día 28, disminuyeron aún más. En el día 18 embrionario se vieron pequeños islotes y células positivas para insulina que coexpresaban nestina y se encontraban dispersas a través del páncreas. La doble inmunofluorescencia reveló que ambos marcadores eran distintos de las células δ y PP. Los niveles de ARNm para *Ngn3* aumentaron en el día 18 embrionario y disminuyeron 7% para el día 28, coincidiendo con la disminución de expresión para nestina. Este marcador se está usando para seleccionar células embrionarias que generen insulina para diferenciarlas *in vitro*⁸⁵ y generar células insulina positivas.

La controversia surgió al ver que, en algunos estudios, las células nestina positivas no se expresaban en células progenitoras ni en células diferenciadas pancreáticas, sino en el mesénquima que rodea al tejido pancreático;⁹⁰ algunos otros estudios apoyaron la idea, con conclusiones de que las células nestina positivas eran incapaces de diferenciarse a células β . Por tal motivo, se enfocaron en caracterizar la lesión del tejido pancreático exocrino, en algunos casos, induciendo pancreatitis aguda, para concluir que cuatro días después se había observado neovascularización y proliferación ductal-ductular en páncreas y que el

marcador nestina se observó en el endotelio capilar en proliferación, en las células estrelladas rodeando las estructuras ductulares y en las células submesoteliales.⁹¹

Actualmente se acepta que las CMEH son capaces de diferenciarse a cualquier célula pancreática²² y en algunos casos, después de producir una lesión, se ha observado que la expresión de células positivas para nestina comienza a partir de los tres días post-lesión para alcanzar un pico máximo a los siete días post-lesión,⁹² así como también el concepto de que existen células β maduras que pueden retener la capacidad de proliferación y que éstas son las que aportan el mayor número de nuevas células β , al menos en modelos animales como el ratón.⁹³⁻⁹⁷

Algunos autores señalan que en realidad las células β tienen la capacidad de transdiferenciarse (cambiar de un fenotipo diferenciado a otro), ya que se ha observado que cuando el páncreas ha sido gravemente lesionado, los conductos acinares se transdiferencian a células ductales.⁹⁸ También se ha visto este fenómeno en células acinares exocrinas que se transdiferencian a células productoras de insulina *in vivo*, en modelo de ligadura de conducto en ratas, en donde se observó la presencia de marcadores para células exocrinas y endocrinas.

Modelo de lesión para la expresión de células nestina positivas pancreáticas

Distintos modelos experimentales han sido desarrollados para investigar la fisiopatología de la DM tipo 1 y también para observar la neogénesis que existe tras la lesión con este agente lesivo; uno de ellos es utilizando a la estreptozotocina (STZ), que es un modelo ampliamente utilizado en este campo de la investigación. La STZ es una molécula con una alta capacidad alquilante que fragmenta el ADN de la célula β y produce una gran cantidad de radicales libres, dando por resultado la necrosis de la célula β .⁹⁹ Al parecer tiene varios mecanismos lesivos, entre los que se encuentran

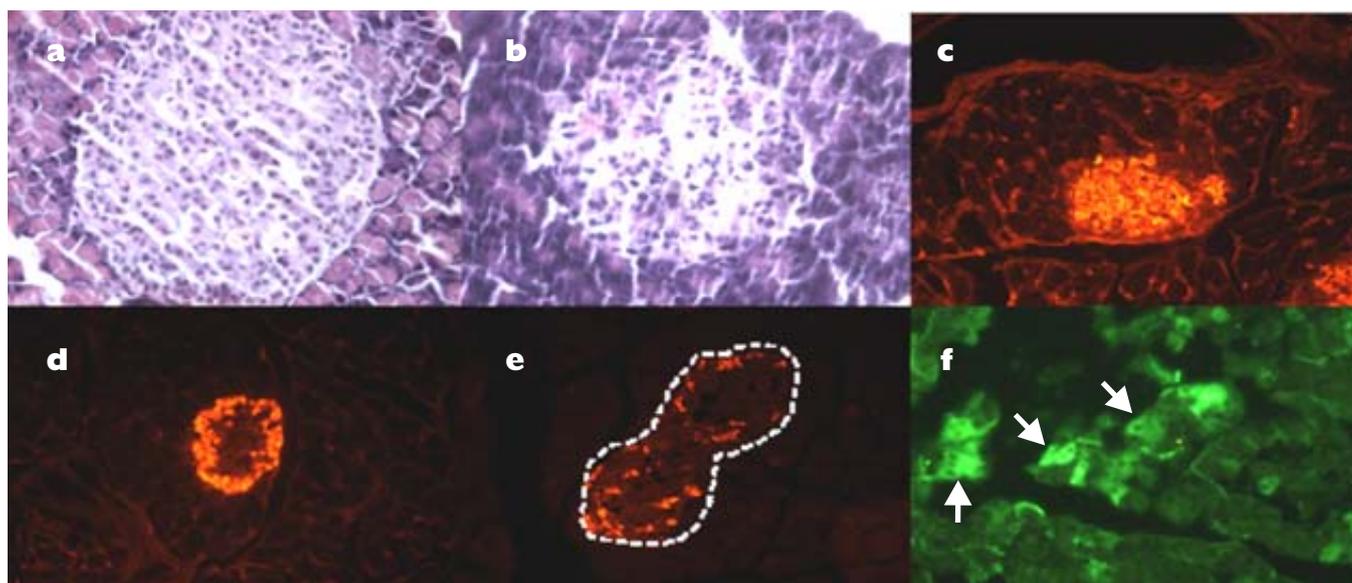


Figura 3. Inducción de la expresión de células nestina positivas. La figura (a) muestra un islote de Langerhans con tamaño y celularidad conservada, H-E, 40X. b) Cambios en el islote de Langerhans posteriores a la administración de estreptozotocina, nótese la disminución de la población celular y la presencia de apoptosis extensa, H-E, 40X. Inmunohistoquímica en los islotes de Langerhans que muestra poblaciones positivas para insulina (c), glucagón (d) y somatostatina (delimitado por las líneas punteadas) (e). La lesión con estreptozotocina induce la expresión de células positivas a nestina (f).

la lesión al GLUT-2, ya que se une a este receptor para impedir el paso de glucosa al interior de la célula β y de esta manera provoca un déficit de expresión de proinsulina.¹⁰⁰ La lesión por STZ puede ser intensa y rápida si la administración se realiza por vía intravenosa,⁹⁸ ya que se ha visto que usando una dosis de alrededor de 60 mg/kg de STZ por vía intravenosa, las células β presentan cariopícnosis con vacuolas citoplasmáticas a las tres horas, pero los cambios más graves se aprecian a las 12 horas de la lesión, ya que se observaron vaciamientos de las áreas centrales de la mayoría de los islotes pancreáticos; por otro lado, a partir de las tres y seis horas de haber ocurrido la lesión, se observaron células nestina positivas en las células de los conductos interductuales (CID) y en las células acinares (CA), así como la presencia de algunas células positivas para IGF-1 en las CID. A las seis horas post-STZ se observaron células secretoras de insulina en las CID y de los CA, posiblemente para revertir el daño o para compensar la pérdida de las células β .⁵⁵ Sin embargo, las nuevas células generadas no compensaban la se-

creción de insulina en respuesta a la hiperglucemia circulante,⁹² posiblemente debido a que estas células puedan ser afectadas por la STZ, ya que provoca la recombinación del ADN de las células precursoras.¹⁰¹

En algunos estudios se ha observado que la capacidad de regeneración seguida de un insulto tóxico como la STZ, decrece rápidamente durante los primeros cinco a siete días en ratas,^{102,103} y donde se ha observado un aumento en la proliferación de células nestina positivas y células positivas para IGF-1, colindando con los CID y CA desde el tercer día post-STZ.⁹² Al parecer, las CID protegen a las células beta de las agresiones o toxinas.⁵⁵ La figura 3 muestra la inducción de la expresión de células positivas a nestina realizadas en nuestro laboratorio.

Radicales libres

Se llaman radicales a las moléculas que poseen en su último orbital un electrón no apareado, son altamente reactivas y, en su afán por alcanzar

su estabilidad, comienzan a fragmentar macromoléculas, produciendo así un daño a éstas. La formación de radicales libres se da de manera natural en múltiples procesos fisiológicos, el daño que pueden generar es cuando son superados o poco controlados por los sistemas antioxidantes.¹⁰⁴

Los radicales libres son también conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO), entre ellos destacan el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) y entre las especies reactivas de nitrógeno (ERN) se encuentra el NO, como el más representativo, o moléculas derivadas de éste como el peroxinitrito ($-\text{OONO}$) y el dióxido de nitrógeno (NO_2).¹⁰⁵ Son moléculas que se forman cuando el oxígeno y el nitrógeno son liberados de los procesos aeróbicos mitocondriales normales; sin embargo, cuando la capacidad antioxidante es rebasada, el aumento en estas moléculas provoca una unión con los electrones de otras macromoléculas, modificando la estructura de los lípidos de las membranas citoplasmáticas, proteínas del citoesqueleto y ácidos nucleicos, para de esta manera producir aún más radicales libres, citotoxicidad, muerte celular y/o apoptosis.

Entre los mecanismos antioxidantes más importantes se encuentran: 1. Los aclaradores de ERO/ERN y de sus precursores; 2. Las uniones catalíticas de metales iónicos regularmente usados para formar ERO; y 3. La generación y regulación de las defensas de antioxidantes endógenas. Los dos grupos principales de antioxidantes endógenos son: componentes antioxidantes de bajo peso molecular (ejemplo, vitamina C y E, ácido lipoico y ubiquinonas), y las enzimas antioxidantes (ejemplo, superóxido dismutasa [SOD], superóxido reductasa [SOR], catalasa, glutatión peroxidasa [GPx] y muchas proteínas de choque térmico. El estrés oxidativo se describe como un estado de desequilibrio como resultado de una producción de ERO y ERN, que exceden la capacidad de estos sistemas antioxidantes de defensa.

Algunos tejidos han mostrado ser más vulnerables a este desequilibrio; entre ellos se encuentran los procesos de repercusión vascular en cerebro y corazón, algunas enfermedades crónicas degenerativas como las neurológicas, la DM y el cáncer.¹⁰³

Rol de los radicales sobre la expresión de nuevas células β

Estudios realizados sobre la fisiopatología de la DM tanto tipo 1 como tipo 2 han evidenciado la importancia que tienen los radicales libres en la disfunción de las células β pancreáticas; sobre todo en la tipo 1, donde producen una citotoxicidad importante debido al ataque del sistema inmune. Las células T y los macrófagos infiltran los islotes y secretan citocinas como IL-1, IFN- γ y FNT- α , que a su vez inducen la secreción de NO, $\text{HO}\cdot$, H_2O_2 y O_2 que dañan las células β . Se ha encontrado que las células β desarrollan varias etapas de lesión antes de desarrollar la DM. Inicia con una hiperplasia de las células β por mecanismos aún no bien determinados, posteriormente se pierde la capacidad para secretar insulina, llevando a un estado de glucotoxicidad.¹⁰⁶ Esta alteración permite que la célula β cambie su fenotipo por cambios en los genes y en la expresión de proteínas como la del transportador GLUT2, la glicerol fosfato deshidrogenasa y la piruvato descarboxilasa,¹⁰⁷ que normalmente mantienen el grado de especialización de las células β . Así mismo, al haber glucotoxicidad y lipotoxicidad, los genes que se mantenían suprimidos por parte de la célula β comienzan a sintetizar compuestos como la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), fructosa 1,6-bifosfatasa y lactato deshidrogenasa, que participan en la gluconeogénesis y en la producción de lactato, llevando a la célula a un estado oxidativo. Estos procesos estimulan la activación de genes apoptóticos y proapoptóticos, acompañado con un incremento en la expresión de c-myc y de la activación del factor nuclear (NF)- κB . Una vez que las células β pierden la capacidad para regene-

rarse,^{108,109} al permanecer en un medio glucotóxico, comienzan a hipertrofiarse como mecanismo compensatorio a la resistencia a la insulina.¹⁰⁸ Existe una infiltración de los islotes pancreáticos por células mononucleares del sistema inmune, en su mayoría por macrófagos y linfocitos T.¹¹⁰ Las citoquinas liberadas como la IL-1 β , FNT- α y del IFN- γ pueden actuar de manera individual o en combinación, al menos en células β *in vitro* de roedores^{111,112} y en humanos.¹¹³ Esta destrucción inducida por citoquinas puede estar mediada por los intermediarios de las especies reactivas de oxígeno como el O₂, H₂O₂ y HO \cdot , y por parte de las especies reactivas de nitrógeno se encuentra el NO.¹¹⁴

No se tiene suficiente información de que las ERO sean mediadores inducidos por las citoquinas; sin embargo, se tiene evidencia de que el NO actúa como mediador en el efecto destructivo por parte de las citoquinas hacia las células β humanas y que las ERO participan en la producción de la peroxidación lipídica y de aldehído para la destrucción mediada por citoquinas.¹¹⁵

Varias vías metabólicas han sido implicadas en la citotoxicidad, tanto en células que no son de los islotes como en células β pancreáticas.¹¹⁶ Después de la unión a receptores específicos celulares, las citoquinas inician señales que incluyen la activación de proteasas, fosfolipasas, metabolismo del ácido araquidónico, la formación de ERO y de la producción de NO. Tanto las ERO como las ERN, solas o en combinación, se piensa que inactivan a las enzimas mitocondriales y citosólicas, llevando a un decremento en la fosforilación oxidativa y en la glucólisis, disminuyendo así los niveles de ATP, y provocando la incapacidad de síntesis y secreción de insulina. El daño mitocondrial y hacia el ADN, además de la depleción de ATP y de las muertes de las células β , se cree son resultado de la producción en exceso de radicales libres. Se sabe que las células β pancreáticas son excepcionalmente vulnerables a la citotoxicidad de las ERO por sus bajos niveles de enzimas antioxidantes.¹¹⁷

La peroxidación lipídica es un mecanismo en el cual se produce toxicidad por parte de los radicales libres a los organelos y a las enzimas unidas a membranas,¹¹⁸ y la medición de MDA (malondialdehído), producto final de la peroxidación lipídica, ha sido ampliamente usado para detectar lesión celular por radicales libres.¹¹⁹ Teniendo en cuenta que la combinación de las tres citoquinas induce el aumento de MDA en islotes pancreáticos de ratas.¹¹⁵

En la figura 4 se resumen los factores etiológicos identificados hasta el momento y la fisiopatología general involucrada en la generación de la DM.

Terapias coadyuvantes contra la lesión provocada por los radicales libres en las células β

Las células β pancreáticas maduras poseen dos características que las hacen más vulnerables contra las agresiones externas e internas, una de ellas es su limitada capacidad replicativa, y la otra es que cuentan con bajos niveles de enzimas antioxidantes.¹²⁰⁻¹²³

Existen pocos estudios que se encaminen a desarrollar distintas terapias para lograr un mejor rendimiento celular que pudiera soportar la producción excesiva de radicales libres generados en el proceso inflamatorio que deriva del ataque autoinmune que se produce en la DM tipo 1.

Estudios que se han hecho para analizar las enzimas antioxidantes en hígado y pulmones demuestran que ratas diabéticas Wistar tuvieron un incremento de enzimas antioxidantes como SOD1, SOD2, catalase y GSH-Px en estos tejidos después de haber sido sometidas a un estrés oxidativo por 12 días.¹²⁴⁻¹²⁹

También se ha visto que en hígado y riñones de ratones tratados con una dosis de STZ intraperitoneal se previno la lesión al ADN y se inhibieron los aumentos de los niveles de AST, ALT y BUN después de haber sido tratados con antioxidantes como ácido ascórbico, trolox y probucol.¹³⁰

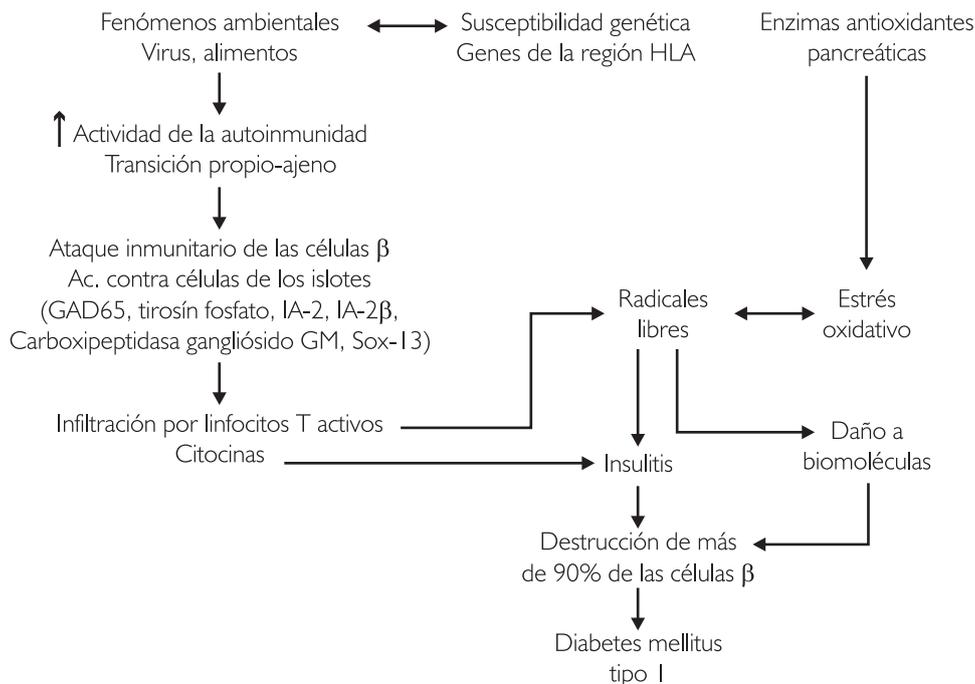


Figura 4. Etiología de la diabetes tipo I. Diversos son los factores que pueden confluír para desarrollar la diabetes mellitus. La predisposición genética se ha visto involucrada en varios de estos casos, pero los factores ambientales tales como virus, toxinas, y la dieta parecen tener una mayor influencia en el inicio de la manifestación clínica. Una vez que la autoinmunidad contra la célula β se presenta, la destrucción autoinmune da lugar al inicio de la diabetes tipo I. Los autoantígenos generados por las células β son procesados por las células presentadoras de antígenos (APC's) en asociación con las moléculas de la clase II del MHC. La producción de IL-12 proveniente de las APC activa a las células B (T precitotóxicas específicas) para convertirse en citotóxicas y liberar INF- γ , el cual puede causar que los macrófagos (M ϕ) sean citotóxicos, produciendo citoquinas contra las células β , incluyendo IL-1b, TNF- α , TNF- γ y formación de radicales libres. De esta manera se activa una cascada de eventos con aumento del estrés oxidativo, activación de apoptosis, daño a biomoléculas que juntos desencadenan la destrucción de las células β pancreáticas.

La tioredoxina es una proteína con actividad reductora,¹³¹ y es inducida bajo el estrés oxidativo celular; por lo tanto, en un estudio realizado con ratas transgénicas sobreexpresando esta proteína, mostró tener una actividad protectora en contra de un estrés oxidativo y de la apoptosis en las células β ; dando como resultado una reducción en la incidencia de DM tipo 1, pero no así en la insulinitis.^{132,133}

Por otro lado, la inducción de algunos factores como el GLP-1 en ratas tratadas con STZ, en período neonatal, mostró tener un efecto estimulante sobre la masa de células β y sobre un control basal de glucosa que permanecía hasta la etapa adulta de las ratas.¹³⁴

El factor de transcripción Pdx-1 se ha inducido genéticamente en tejido extraislote (he-

pático) para la generación de células fenotípicas de células β , mostrando una mejoría en la hiperglucemia de ratones diabéticos tratados con STZ.¹³⁵

La combinación de gastrina y del factor de crecimiento epidermal (FCE) han sido usadas para normalizar la hiperglucemia en ratones, causada por la lesión con aloxano, obteniendo una restauración de 30-40% de la masa normal de las células β dentro de los primeros siete días; sin embargo, no se observaron efectos sobre la replicación, tamaño celular o apoptosis.¹³⁶

Hubo también una proliferación de células precursoras que expresaban marcadores ductales como la citoqueratina. Se caracterizó un fenotipo intermedio que coexpresaba el marca-

dor para insulina y para citoqueratina en las células ductales exocrinas y del cual daba origen a células β .¹³⁶

En ratas pancreatectomizadas se ha administrado betacelulina, miembro de la familia del FCE, reportando un efecto positivo en la neogénesis y sobre el metabolismo de la glucosa en células β adultas de ratas.¹³⁷

Otro estudio observó que la combinación de suero antilinfocítico (SAL) y la adición de exendina-4, un factor de crecimiento de las células β , mostraron una mejoría sobre la histología de los islotes pancreáticos y una supresión inmune en ratones cepa NOD, restaurando la hiperglucemia.¹³⁸

Es por tal motivo que las terapias antioxidantes promoverían una mejor funcionalidad a la célula β para llevar a cabo la producción de insulina o disminuyendo los efectos lesivos de los radicales libres (Cuadro 1).

Implicaciones y posibles aplicaciones relacionadas con la obtención de nuevas células β

Una característica importante de las células madre es su habilidad para autorrenovarse y dife-

renciarse hacia líneas celulares específicas.²¹ La mayoría de las células del organismo tienen la capacidad de regenerarse, aunque en muchos de estos tejidos se desconoce de dónde puedan provenir las células madre que darán origen a las células perdidas y si estas células son pluripotenciales o multipotenciales. Actualmente se especula que son multipotenciales, ya que de ellas se derivan fenotipos endocrinos, exocrinos y hepáticos, pudiendo llevar a cabo medios de cultivos celulares apropiados, generalmente *in vitro* de estos tejidos, para dar origen a células β , capaces de sintetizar y secretar insulina. En algunos estudios se pretende obtener biopsias de tejido pancreático de individuos diabéticos para ganar una masa absoluta o relativa de células β a través de células progenitoras intraislote y tratarlas con ingeniería genética para evitar la autoinmunidad. Ante una pérdida de tejido pancreático, existen tejidos adultos que pudieran transdiferenciarse a células β , así como células embrionarias, por medio de la activación de genes específicos para desarrollarlas; sin embargo, la obtención de éstos pudiera ser muy limitada.¹³ Se necesitan más estudios para poder perfeccionar la obtención de estas células, sobre todo *in vivo* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Factores fisiopatológicos presentes en anomalías pancreáticas y las posibles medidas terapéuticas

Factor fisiopatológico involucrado	Tratamiento potencial
Anomalías congénitas (agenesia pancreática, alteración en la expresión de factores de transcripción, etc.)	Terapia génica
Factores de transcripción pancreáticos	Drogas agonistas: GLP-1, exendin-4
Autoanticuerpos (insulina, IA-2, IA-2 β , sox-13, etc.)	Inmunomoduladores e inmunosupresores
Radicales libres	Terapias antioxidantes
Pérdida de células β	Trasplante de páncreas
	Trasplante de tejido pancreático embrionario
	Trasplante celular (células madre pancreáticas, células madre embrionarias)

En la actualidad existen múltiples líneas de investigación que han generado posibles medidas terapéuticas para el manejo y curación de diversas enfermedades pancreáticas. Cada una de estas posibilidades terapéuticas se encuentran en desarrollo y su potencialidad para curar muchas de estas alteraciones es incuestionable^{139,140,142,144}

Conclusiones

La fisiología y la fisiopatología de las células β es un tema extenso, donde a pesar de los estudios que se han realizado a la fecha, tanto en humanos como en modelos animales, no se ha logrado comprender del todo los mecanismos por los cuales la célula β se enfrenta al nacimiento, crecimiento y muerte, y de cómo el medio externo influye para afectar el funcionamiento de las células β . Tanto la DM tipo 1 como la tipo 2 comparten características durante el progreso de esta enfermedad, por lo que nuevos hallazgos para mejorar la supervivencia y funcionamiento celular podrían aplicarse a ambas entidades.

Los modelos de experimentación en roedores, principalmente, han servido para conocer la fisiopatología, pero muchos otros estudios han permitido sentar las bases para la utilización de células madre de origen intra o extraislole y su diferenciación hacia células β .

Actualmente se trabaja en terapias de regulación para suprimir la respuesta inmune que se presenta en la DM tipo 1, así como también parar o erradicar el daño causado por radicales libres que se generan tanto en la DM tipo 1 como en la DM tipo 2. Es por tal motivo que las terapias antioxidantes promoverían una mejor funcionalidad a la célula β para llevar a cabo la producción de insulina o disminuyendo los efectos lesivos de los radicales libres.

Referencias

1. Lipsett M, Aikin R, Castellarin M, Hanley S, Jamal A, Laganiere S, et al. Islet neogenesis: A potential therapeutic tool in type 1 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38: 715-20.
2. Knip M, Veijola R, Virtanen SM, Hyöty H, Vaarala O, Åkerblom HK. Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005; 54: 125-36.
3. You S, Belghith M, Cobbold S, Alyanakian MA, Gouarin C, Barriot S, et al. Autoimmune diabetes onset results from qualitative rather than quantitative age-dependent changes in pathogenic T-cells. *Diabetes.* 2005; 54: 1415-22.
4. Vinik A, Rosenberg L, Pittenger G, Taylor-Fishwick D. Stimulation of pancreatic islet neogenesis: a possible treatment for type 1 and type 2 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes.* 2004; 11: 125-40.
5. Yoon JW, Jun HS. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am J Therap.* 2005; 12: 580-91.
6. Kloppel G, Lohr M, Habich K, Oberholzer M, Heitz P. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv Synth Pathol Res.* 1985; 4: 110-25.
7. Sakurai T, Tsuchiya S. Superoxide production from non-enzymatically glycosylated protein. *FEBS Lett.* 1988; 236: 406-10.
8. Wolff S. Diabetes mellitus and free radicals. *Br Med Bull.* 1993; 49: 642-52.
9. Domínguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care.* 1998; 21: 1736-42.
10. Rosenberg L, Vinik A. Induction of endocrine cell differentiation: a new approach to management of diabetes. *J Lab Clin Med.* 1989; 114: 75-83.
11. Ueno H, Yamada Y, Watanabe R, Mukai E, Hosokawa M, Takahashi A, et al. Nestin-positive cells in adult pancreas express amylase and endocrine precursor cells. *Pancreas.* 2005; 31: 126-31.
12. Yue F, Cui L, Johkura K, Ogiwara N, Sasaki K. Glucagon-like peptide-1 differentiation of primate embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Tissue Engineering.* 2006; 12: 2105-16.
13. Zulewski H. Stem cells with potential to generate insulin-producing cells in man. *Swiss Med Wkly.* 2006; 136: 647-54.
14. Ross, Romrell and Kaye. Título del libro?????. 3a ed. México: Panamericana; 1997. p. 511-4.
15. Stevens A, Lowe J. Texto y atlas de histología. Ciudad??? Harcourt Brace; 1998. p. 257-69.
16. Mutoh K, Wakuri H, Liu B, Seno M, Taniguchi K. Electron microscopic study of intercalated duct cells in the chicken pancreatic islet and effects of tolbutamide administration. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 1998; 75: 231-7.
17. Nagasao J, Yoshioka K, Amasaki H, Mutoh K. Expression of S-100 protein in intercalated duct cells of bovine pancreas. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 2002; 78: 229-33.
18. Mastsumara G, England M. Embriología representaciones gráficas. España: Mosby/Doyma libros; 1996. p. 208.
19. Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lóra J, Zaret K. A bipotential precursor population for pancreas and liver with in

- the embryonic endoderm. *Development*. 2001; 128: 871-81.
20. Ahlgren U, Jonsson J. Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx 1* gene results in loss of the beta cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev*. 2001; 12: 1763-8.
 21. Zulewski H, Abraham E, Gerlach M, Daniel P, Moritz W, Müller B, et al. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate *ex vivo* into pancreatic endocrine, exocrine and hepatic phenotypes. *Diabetes*. 2001; 50: 521-33.
 22. Bowens L. Cytokeratins and cell differentiation in the pancreas. *J Pathol*. 1998; 184: 234-9.
 23. Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N. The effect of over-expression of *Pdx1* and *Foxa2* on the differentiation of human embryonic stem cells into pancreatic cells. *Stem Cells*. 2006; 24: 1923-30.
 24. Rosenberg L. *In vivo* cell transformation: neogenesis of beta cells from pancreatic ductal cells. *Cell Transplant*. 1995; 4: 371-83.
 25. Edlund H. Transcribing pancreas. *Diabetes*. 1998; 47: 1817-23.
 26. Pictet R, Rutter W. Development of the embryonic endocrine pancreas in *Handbook of Physiology*, section 7. En: Steiner DF, Freinkel N, editores. *Endocrinology*. Washington, DC: American Physiological Society; 1972. p. 25-66.
 27. Lammert E, Cleaver O, Melton D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science*. 2001; 294: 564-7.
 28. Teitelman G. On the origin of pancreatic endocrine cells, proliferation and neoplastic transformation. *Tumor Biol*. 1993; 14: 167-73.
 29. Rafaeloff R, Pittenger G, Barlow S, Qin X, Yan B, Rosenberg L, et al. Cloning and sequencing of the pancreatic islet neogenesis associated protein (INGAP) gene and its expression in islet neogenesis in hamsters. *J Clin Invest*. 1997; 99: 2100-9.
 30. Shih D, Screenan S, Muñoz K, Philipson L, Pontoglio M, Yaniv M, et al. Loss of HNF-1 α function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. *Diabetes*. 2001; 50: 2472-80.
 31. Peers B, Leonard J, Sharma S, Teitelman G, Montminy M. Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1. *Mol Endocrinol*. 1994; 8: 1798-806.
 32. Guz Y, Montminy M, Stein R, Leonard J, Gamer L, Wright C, et al. Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development*. 1995; 121: 11-8.
 33. Wang R, Li J, Rosemberg L. Factors mediating the trans-differentiation of islets of Langerhans to duct epithelial-like structures. *J Endocrinol*. 2001; 171: 309-18.
 34. Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H. Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev*. 1998; 15: 1763-8.
 35. Hart A, Baeza N, Apelqvist A, Edlund H. Attenuation of FGF-signaling in mouse beta-cells leads to diabetes. *Nature*. 2000; 408: 864-8.
 36. Fajans S, Bell G, Polonsky K. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med*. 2001; 345: 971-80.
 37. Song S, Gannon M, Washington M, Scoggins C, Meszoly I, Goldenring J, et al. Expansion of *Pdx1*-expressing pancreatic epithelium and islet neogenesis in transgenic mice overexpressing transforming growth factor alpha. *Gastroenterology*. 1999; 117: 1416-26.
 38. Kritzik M, Jones E, Chen Z. *Pdx-1* and *Msx-2* expression in the regeneration and developing pancreas. *J Endocrinol*. 1999; 163: 523-30.
 39. Hoem D, Dalen H, Andrén-Sandberg A, Höstmark J. Nonadhesive organ culture of human exocrine pancreatic cells with their stroma. *Pancreas*. 2002; 25: 71-7.
 40. Taylor-Fishwick D, Rittman S, Kendall H, Roy L, Shi W, Cao Y, et al. Cloning genomic INGAP: a Reg-related family member with distinct transcriptional regulation sites. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1638: 83-9.
 41. Edlund H. Developmental biology of the pancreas. *Diabetes*. 2001; 50 Suppl. 1: S5-S92.
 42. Sender M, German M. The B cell transcription factors and the development of the pancreas. *J Mol Med*. 1997; 75: 327-40.
 43. Heremans Y, van de Casteele M, Veld P, Gradwohl G, Serup P, Madsen O, et al. Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cell expressing neurogenin 3. *J Biol Chem*. 2002; 277: 303-12.
 44. Kim S, Hebrok M. Intracellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev*. 2001; 15: 111-27.
 45. Yaspal N, Li J, Wang R. Caracterización de la expresión de *c-kit* y *nestina* durante el desarrollo de los islotes en páncreas de rata prenatal y postnatal. *Dev Dyn*. 2004; 229: 813-25.
 46. Edlund H. Pancreatic organogenesis-developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet*. 2002; 3: 524-32.
 47. Ang S, Wierda A, Wong D, Stevens K, Cascio S, Rosant J, et al. The formation and maintenance of the de-

- finitive endoderm lineage in the Mouse: Involvement of HNF3/fork-head proteins. *Development*. 1993; 119: 1301-15.
48. Chakrabarti S, Mirmira R. Transcription factors direct the development and function of pancreatic β cells. *Trends Endocrinol Metab*. 2003; 14: 78-84.
 49. Magliocca V, Odorico J, Treff N, Vincent R, Budde M, Victoria L, et al. Differentiation of embryonic stem cells conditionally expressing neurogenin 3. *Stem Cells*. 2006; 29: 2529-37.
 50. Ta M, Choi Y, Atouf F, Park C, Lumelsky N. The defined combination of growth factors controls generation of long-term replicating islet progenitor-like cells from cultures of adult mouse pancreas. *Stem Cells*. 2006; 24: 1738-49.
 51. Lee C, de León D, Kaestner K, Stoffers D. Regeneration of pancreatic islets after partial pancreatectomy in mice does not involve the reactivation of neurogenin-3. *Diabetes*. 2006; 55: 269-72.
 52. Drucker D. Glucagon like peptides. *Diabetes*. 1998; 47: 159-69.
 53. Stoffers D, Kieffer T, Hussain M, Drucker D, Bonner-Weir S, Habener J, et al. Insulinotropic glucagon-like peptide I agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes*. 2000; 49: 741-8.
 54. Abraham E, Leech C, Lin J, Zulewski H, Habener J. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology*. 2002; 143: 3152-61.
 55. Maake C, Reinecke M. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor 1 and 2 in the endocrine pancreas of rat, dog, and man, and their coexistence with classical islet hormones. *Cell Tissue Res*. 1993; 273: 249-59.
 56. Nagasao J, Yoshioka K, Amasaki H, Tsujio M, Taniguchi K, Mutoh K. Morphological changes in the rat endocrine pancreas within 12 h of intravenous streptozotocin administration. *Anat Histol Embryol*. 2005; 34: 42-7.
 57. Bonner-Weir S. β cell turnover. Its assessment and implications. *Diabetes*. 2001; 50 Suppl. 1: S20-4.
 58. Welsh M, Anneman C, Lindholm C, Kriz V, Oberg-Welsh C. Role of tyrosin kinase signaling for beta-cell replication and survival. *Ups J Med Sci*. 2000; 105: 715.
 59. Rachdi L, Ghazi L, Bemex F, Panthier J, Czernichow P, Scharfmann R. Expression of the receptor tyrosine kinase KIT in mature β cells and in the pancreas in development. *Diabetes*. 2001; 50: 2021-8.
 60. Keller J, Ortiz M, Ruscetti F. Steel factor (c-kit ligand) promotes the survival of haematopoietic stem/progenitor cells in absence of cell division. *Blood*. 1995; 86: 1757-64.
 61. Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, Hayashi S, Kunisada T, Sudo T, et al. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med*. 1991; 174: 63-71.
 62. Scaglia L, Smith F, Bonner-Weir S. Apoptosis contributes to the involution of β -cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology*. 1995; 136: 5461-8.
 63. Herrera P. Defining the cell lineages of the islets of Langerhans using transgenic mice. *Int J Dev Biol*. 2002; 46: 97-103.
 64. Finegood D, Scaglia L, Bonner-Weir S. Dynamics of β -cell mass in the growing rat pancreas: estimation with a simple mathematical model. *Diabetes*. 1995; 44: 249-56.
 65. Weir G, Laybutt D, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A. β -cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes*. 2001; 50 Suppl. 1: S154-9.
 66. Pipeleers D. Heterogeneity in pancreatic β -cell population. *Diabetes*. 1992; 41: 777-81.
 67. Montanya E, Nacher V, Biarnes M, Soler J. Linear correlation between β -cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of β -cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes*. 2000; 49: 1341-6.
 68. Niki T, Pekny M, Hellmans K, Bleser P, Berg K, Vaeyens F, et al. Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 1999; 29: 520-7.
 69. Vaittinen S, Lukka R, Sahlgren C, Hurme T, Rantanen J, Lendahl U, et al. The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001; 60: 588-97.
 70. Ramiya V, Maraist M, Arfors K, Schatz D, Peck A, Cornelius J. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated *in vitro* from pancreatic cells. *Nat Med*. 2000; 6: 278-82.
 71. Bonner-Weir S, Taneja M. *In vitro* cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 7999-8004.
 72. Hunziker E, Stein M. Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 271: 116-9.
 73. Soria E, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig J, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes*. 2000; 49: 157-62.
 74. Lendahl G, Zimmerman L, McKay R. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990; 60: 585-95.
 75. Wang X, Hu J, Zhao D, Wang G, Tan L, Du L, et al. Nestin^{neg}CD24^{low} population from fetal nestin-EGFP transgenic mice enriches the pancreatic endocrine progenitor cells. *Pancreas*. 2005; 31: 385-91.

76. Mokry J, Nemecek S. Immunohistochemical detection of intermediate filament nestin. *Acta Med.* 1998; 41: 73-80.
77. Chou Y, Khuon S, Herrmann H, Goldman R. Nestin promotes the phosphorylation-dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis. *Mol Biol Cell.* 2003; 14: 1468-78.
78. Edlund H. Pancreas: how to get there from the gut? *Curr Opin Cell Biol.* 1999; 11: 663-8.
79. Habener J, Stoffers D. A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Proc Assoc Am Physicians.* 1998; 110: 12-21.
80. Zhang L, Hong T, Hu J, Liu Y, Wu Y, Li L. Nestin-positive progenitor cells isolated from human fetal pancreas have phenotypic markers identical to mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol.* 2005; 11: 2906-11.
81. Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284: 143-7.
82. Pittenger M, Mosca J, McIntosh K. Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000; 251: 3-11.
83. Schwartz R, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest.* 2002; 109: 1291-302.
84. Cattaneo E, McKay R. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature.* 1990; 347: 762-5.
85. Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius J, Petersen B, et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 8078-83.
86. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science.* 2001; 292: 1389-94.
87. Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, et al. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *PNAS.* 2003; 100: 998-1003.
88. Eberhardt M, Salmon P, von Mach M, Hengstler J, Brulport M, Linscheid P, et al. Multipotent nestin and Isl-1 positive mesenchymal stem cells isolated from human pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 345: 1167-76.
89. Kim H, Kang H, Messam C, Min K, Park C. Comparative evaluation of angiogenesis in gastric adenocarcinoma by nestin and CD34. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2002; 10: 121-7.
90. Sultana S, Zhou R, Sadagopan M, Skalli O. Effects of growth factors and basement membrane proteins on the phenotype of U-373 MG glioblastoma cells as determined by the expression of intermediate filament proteins. *Am J Pathol.* 1998; 153: 1157-68.
91. Selander L, Edlund H. Nestin is expressed in mesenchymal and not epithelial cells of the developing mouse pancreas. *Mech Dev.* 2002; 113: 189-92.
92. Toshiyuki I, Mitsuhiro K, Munihiro O, Takenori F, Ki-yoshi T, Taeko S, et al. Defined localization of nestin-expressing cells in l-arginine-induced acute pancreatitis. *Pancreas.* 2006; 32: 360-8.
93. Nagasao J, Yoshioka K, Amasaki H, Mutoh K. Expression of nestin and IGF-1 in rat pancreas after streptozotocin administration. *Anat Histol Embryol.* 2004; 33: 1-4.
94. Rooman I, Heremans Y, Heimberg H, Bouwens L. Modulation of rat pancreatic acinoductal transdifferentiation and expression of PDX-1 *in vitro*. *Diabetologia.* 2000; 43: 907-14.
95. Rooman I, Lardon J, Flamez D, Schuit F, Bouwens L. Mitogenic effect of gastrin and expression of gastrin receptors in duct-like cells of rat pancreas. *Gastroenterology.* 2001; 121: 940-9.
96. Rooman I, Lardon J, Bouwens L. Gastrin stimulate beta-cell neogenesis and increases islet mass from transdifferentiated but not from normal exocrine pancreas tissue. *Diabetes.* 2002; 51: 686-90.
97. Bouckenooghe T, Vandewalle B, Lukowiak B, Kerr-Conte J, Belaich S, Gmyr V, et al. Modulation of specific beta cell gene (re) expression during *in vitro* expansion of human pancreatic islet cells. *Cell Transplant.* 2003; 12: 799-807.
98. Dor Y, Brown J, Martínez O, Melton D. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature.* 2004; 429: 41-6.
99. Bouwens L, Rooman I. Regulation of pancreatic beta-cells mass. *Physiol Rev.* 2005; 85: 1255-70.
100. Yamamoto M, Kudoh A, Arishima K, Eguchi Y. Immunocytochemical changes in the fetal pancreatic islet following fetal administration of streptozotocin in the rat. *Anat Rec.* 1997; 247: 248-52.
101. Wang Z, Gleichmann H. GLUT2 in pancreatic islets. Crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes.* 1998; 47: 50-6.
102. Eizirik D, Sandler S, Ahnstrom G, Welsh M. Exposure of pancreatic islets to different alkylating agents decreases mitochondrial DNA content but only streptozotocin induces long-lasting functional impairment of β cells. *Biochem Pharmacol.* 1991; 42: 2275-82.
103. Wang R, Klöppel G, Bouwens L. Beta cell growth in adolescent and adults rats treated with streptozotocin during neonatal period. *Diabetologia.* 1996; 39: 548-57.
104. Hicks JJ, Torres-Ramos YD, Sierra-Vargas M. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Rev Endocrinol Nutr.* 2006; 14: 223-6.

105. Poon H, Calabrese V, Scapagnini G, Butterfield D. Free radicals and brain aging. *Clin Geriatr Med.* 2004; 20: 329-59.
106. Weir GC, Bonner-Weir S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes.* 2004; 53: S16-S210.
107. MacDonald MJ. Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. *J Biol Chem.* 1995; 270: 20051-8.
108. Laybutt DR, Sharma A, Sgroi DC, Gaudet J, Bonner-Weir S, Weir GC. Genetic regulation of metabolic pathways in beta-cells disrupted by hyperglycemia. *J Biol Chem.* 2002; 277: 10912-21.
109. Laybutt DR, Glandt M, Xu G, Ahn YB, Trivedi N, Bonner-Weir S, et al. Critical reduction in beta-cell mass results in two distinct outcomes over time: adaptation with impaired glucose tolerance or decompensated diabetes. *J Biol Chem.* 2003; 278: 2997-3005.
110. Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev.* 1994; 15: 516-42.
111. Campbell IL, Iscarro A, Harrison LC. IFN-gamma and tumor necrosis factor-alfa cytotoxicity to murine islets of Langerhans. *J Immunol.* 1998; 141: 2325-9.
112. Mandrup-Poulsen T, Helqvist S, Wogensén LD. Cytokines and free radicals as effector molecules in the destruction of pancreatic beta cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990; 164: 169-93.
113. Rabinovitch A, Suárez-Pinzón WL, Strynadka K. Human pancreatic islet beta-cell destruction by cytokines is independent of nitric oxide production. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 79: 1058-62.
114. Mandrup-Poulsen T, Corbett JA, McDaniel ML, Nerup J. What are the types and cellular sources of free radicals in the pathogenesis of type I (insulin-dependent) diabetes mellitus? *Diabetologia.* 1993; 36: 470-3.
115. Rabinovitch A, Suárez-Pinzón WL, Sorensen O, Bleackley RC. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in pancreatic islets of nonobese diabetic mice: identification of iNOS-expressing cells and relationships to cytokines expressed in the islets. *Endocrinology.* 1996; 137: 2093-9.
116. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Applied Pharmacol.* 2006; 212: 167-78.
117. Cornelius JG, Luttgé BG, Peck AB. Antioxidant enzyme activities in IDD-prone and IDD-resistant mice. A comparative study. *Free Radic Biol Med.* 1993; 14: 409-20.
118. Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem J.* 1984; 222: 1-15.
119. Fukunaga K, Takama K, Suzuki T. High-performance liquid chromatographic determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure. *Anal Biochem.* 1995; 230: 20-3.
120. Eizirik D, Flodstrom M, Karlsen A, Welsh N. The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. *Diabetologia.* 1996; 39: 875-90.
121. Bonfigli A, Colafarina S, Falone S, Di Giulio C, Di Ilio C, Amicarelli F. High levels of antioxidant enzymatic defense assure good protection against hypoxic stress in spontaneously diabetic rats. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38: 2196-208.
122. Bouwens L, Kloppel G. Islet cell neogenesis in the pancreas. *Virchows Arch.* 1996; 427: 553-60.
123. Bonner-Weir S. Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol.* 2000; 24: 297-302.
124. Gandy S, Galbraith R, Crouch R, Buse M, Galbraith G. Superoxide dismutase in human islets of Langerhans. *N Engl J Med.* 1981; 304: 1547-8.
125. Grankvist K, Marklund S, Taljedal I. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem.* 1981; 199: 393-8.
126. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20: 463-6.
127. Malaisse W, Malaisse-Lagae F, Sener A, Pipeleers D. Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic beta cell. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982; 79: 927-30.
128. Kroncke K, Kolb-Bachofen V, Berschick B, Burkart V, Kolb H. Activated macrophages kill pancreatic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 175: 752-8.
129. Mandrup-Poulsen T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia.* 1996; 39: 1005-29.
130. Imaeda A, Kaneko T, Aoki T, Kondo Y, Nagase H. DNA damage and the effect of antioxidants in streptozotocin-treated mice. *Food Chem Toxicol.* 2002; 40: 979-87.
131. Luthman M, Holmgren A. Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry.* 1982; 21: 6628-33.
132. Steitz TA. A mechanism for all polymerase. *Nature.* 1998; 391: 231-2.
133. Hotta M, Tashiro F, Ikegami H, Niwa H, Ogihara T, Yodoi J. Pancreatic β cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *J Exp Med.* 1998; 188: 1445-51.
134. Tourrel C, Bailbé D, Meile M, Kergoat M, Portha B. Glucagon-like peptide-1 and exendin-4 stimulate β cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improve glucose homeostasis at adult age. *Diabetes.* 2001; 50: 1562-70.

135. Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, et al. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Am Inc*. 2000; 6: 568-72.
136. Rooman I, Bouwens L. Combined gastrin and epidermal growth factor treatment induces islet regeneration and restores normoglycaemia in C57Bl6/J mice treated with alloxan. *Diabetologia*. 2004; 47: 259-65.
137. Li L, Seno M, Yamada H, Kojima I. Promotion of β -cell regeneration by betacellulin in ninety percent-pancreatectomized rats. *Endocrinology*. 2001; 142: 5379-85.
138. Ogawa N, List J, Habener J, Maki T. Cure of overt diabetes in NOD mice by transient treatment with anti-lymphocyte serum and exendin-4. *Diabetes*. 2004; 53: 1700-5.
139. Spence J, Wells J. Translational embryology: using embryonic principles to generate pancreatic endocrine cells from embryonic stem cells. *Dev Din*. 2007; 236: 3218-27.
140. Cano D, Hebrok M, Zenker M. Pancreatic development and disease. *Gastroenterology*. 2007; 132: 745-62.
141. Murtaugh L. Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. *Development*. 2007; 134: 427-38.
142. Hammerman M. Growing new endocrine pancreas *in situ*. *Clin Exp Nephrol*. 2006; 10: 1-7.
143. Tam P, Kanai-Azuma, Kanai Y. Early endoderm development in vertebrates: lineage differentiation and morphogenetic function. *Curr Opin Gen Dev*. 2003; 13: 393-400.
144. Cerf M. Transcription factors regulating β -cell function. *Eur J Endocrinol*. 2006; 155: 671-9.
145. Spagnoli F. From endoderm to pancreas: a multistep journey. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64: 2378-90.