

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Caminhando para a cura da Diabetes Mellitus tipo 1

Marta Sousa de Sá Marques

Orientador: Dr. Jorge Manuel Dores

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar da
Universidade do Porto em Medicina

Dissertação – Artigo de Revisão Bibliográfica

Mestrado Integrado em Medicina – 2016/2017

Caminhando para a cura da Diabetes Mellitus tipo 1

Autor: Marta Sousa de Sá Marques, Estudante do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina no Instituto De Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto.

Orientador: Dr. Jorge Manuel Dores, Assistente Graduado Endocrinologia, Professor das Unidades Curriculares de Terapêutica I e II do 4º ano do Mestrado Integrado em Medicina no Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar/ Centro Hospitalar e Universitário do Porto, Portugal.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de expressar um agradecimento sentido ao meu orientador Dr. Jorge Dores, que sempre se demonstrou disponível para auxiliar nas questões desta dissertação, incentivando o aperfeiçoamento da mesma com as mais recentes descobertas científicas. Agradeço, também, a suasimpatia e contagiante boa disposição. Foi um grande privilégio trabalhar com alguém que admiro pelo seu sentido prático de refletir sobre os vários temas que espero, num futuro próximo, ter novas oportunidades de voltar a fazer, já que a endocrinologia é uma área que me desperta um grande interesse.

Ao meu namorado, André, um agradecimento especial pelo amor e carinho partilhados que me ajudaram a ultrapassar os vários obstáculos ao longo deste percurso. Agradeço toda a força e incentivo que me deu, diariamente, e que me ajudaram a alcançar os meus objetivos, sendo o primeiro a valorizar o meu esforço e empenho.

Agradeço também a quem me inspirou a fazer esta dissertação relativa a este tema, o meu primo Ricardo, que tem Diabetes Mellitus tipo 1, desde os 8 anos de idade. O facto de ter acompanhado de perto o início da doença e o seu tratamento, estimulou-me a procurar novas descobertas no âmbito do seu tratamento, de forma a transmitir-lhe a existência da possibilidade de cura no futuro.

Não poderia deixar de referir ainda os meus amigos, que me enchem o coração de alegrias. A eles deixo um sincero obrigado pela amizade e companheirismo ao longo destes anos.

Por fim, mas não menos importante, manifesto aqui o meu profundo agradecimento à minha família que se revelou ser o meu pilar ao longo destes 6 anos académicos e que me orientou em todo o meu percurso. Obrigada por reconhecerem o meu trabalho e por acreditarem no meu valor, proporcionando-me as melhores condições para que possa alcançar os meus sonhos. As palavras são, de facto, pequenas para o tamanho da minha gratidão.

A todos aqueles que referi, dedico este trabalho.

Índice

Resumo.....	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Patofisiologia.....	7
Diagnóstico.....	8
Complicações	8
Metodologia.....	9
Tratamento Atual: Administração Exógena de Insulina.....	9
Transplante total de pâncreas	12
Transplante de Ilhotas.....	13
Regeneração de células beta	16
Neogénese.....	17
Replicação	17
Transdiferenciação.....	18
Células estaminais.....	19
Células Estaminais Embrionárias Humanas.....	19
Células Estaminais Pluripotenciais Induzidas Humanas.....	21
Células Estaminais Mesenquimatosas	22
Células Epiteliais Amnióticas Humanas.....	24
Vacina GAD65.....	24
Conclusão	26
Bibliografia	27

Resumo

Introdução – A diabetes mellitus é uma doença muito prevalente mundialmente. A diabetes mellitus tipo 1 corresponde a 5-10% de todos os casos e a sua incidência está a aumentar. O tratamento, atualmente realizado para esta doença, é capaz de manter a normoglicemia mas está associado a um risco aumentado de hipoglicemias. Apesar do aparecimento de novos dispositivos, como os sistemas de ansa fechada, que refletem um controlo da glicemia fisiologicamente mais semelhante, o doente diabético continua a ser sujeito a auto-monitorização invasiva e tratamento crónico desprovido de meios completamente automáticos, obrigando a uma supervisão atenta e constante no seu quotidiano, afetando a sua qualidade de vida. Por essa razão, novas abordagens têm sido desenvolvidas de forma a alcançar a cura desta doença.

Objetivo – Revisão do tratamento atual da diabetes mellitus tipo 1 e das várias abordagens e progressos para a cura desta doença.

Discussão – O transplante do pâncreas permaneceu, durante muitas décadas, a única abordagem com potencial curativo da diabetes mellitus tipo 1. O transplante de ilhotas pancreáticas surgiu, posteriormente, como uma técnica menos invasiva. Ambos os transplantes exigem terapêutica imunossupressora agressiva. No entanto, foram desenvolvidas macro, micro e nanocápsulas que promoveram o imunoisolamento das ilhotas, tornando-as, assim, uma abordagem mais promissora. Foi, também, abordada a possibilidade de processos de regeneração de elementos pancreáticos. Finalmente, a investigação e manipulação das propriedades das células estaminais representa o último avanço para a descoberta da cura da diabetes.

Conclusão – As células estaminais surgem como a mais recente abordagem com intenção de cura desta doença. No entanto, mais estudos são necessários para contemplar a segurança e viabilidade destas células. As técnicas de isolamento como as micro e nanocapsulas também adquirem particular relevo na sobrevivência quer das células estaminais, quer das ilhotas alotransplantadas.

Palavras-Chave – Diabetes Mellitus tipo 1, tratamento, cura, transplante de pâncreas, transplante de ilhotas, regeneração células beta, células estaminais

Abstract

Introduction - Diabetes mellitus is a prevalent disease worldwide. Type 1 diabetes mellitus corresponds to 5-10% of all cases and its incidence is increasing. The current treatment for this disease is intended to maintain the normoglycemia but is associated with a high risk of hypoglycemia. Despite the emergence of new devices, such as closed loop systems, which reflect a more physiologically similar glycemic control, the diabetic patient still needs to perform an invasive self-monitoring and chronic treatment without completely automatic means, requiring close and continuous supervision in their daily life, affecting their quality of life. For this reason, new approaches have been developed ~~in order~~ to achieve this disease's cure.

Objective - To review the current type 1 diabetes mellitus' treatment and the several approaches and progress to the cure of this disease.

Discussion - Pancreas transplantation remained, for many decades, the unique curative approach for type 1 diabetes mellitus. Later emerged the pancreatic islet transplantation as a less invasive technique. Both transplants required aggressive immunosuppressive therapy. However, macro, micro and nanocapsules were developed to promote immunoisolation of the islets, making them a more promising approach. It was also addressed the possibility of regeneration processes of pancreatic elements. Finally, research and manipulation of stem cells properties represents the latest progress for the discovery of diabetes's cure.

Conclusion - Stem cells emerge as the latest approach intending to cure this disease. However, more studies are needed to consider cell safety and viability. Isolation techniques such as micro and nanocapsules also have a particular relevance in the survival of stem cells as they have in the allotransplanted islets.

Key Words - Type 1 Diabetes Mellitus, treatment, cure, pancreas transplantation, islet transplantation, beta cell regeneration, stem cells

Introdução

A diabetes mellitus é uma doença extremamente comum na população mundial cuja incidência tem vindo a aumentar. A sua prevalência aumentou de 108 milhões em 1980 para 422 milhões em 2014.[1] Estima-se que em 2030, a diabetes mellitus seja a sétima causa de morte a nível mundial.[2] A diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) corresponde a 5-10% de todos os casos de diabetes. É uma doença autoimune do pâncreas, crónica e multifatorial, que leva à destruição progressiva das células β secretoras de insulina. Estimava-se em 2015 que a doença afetava, globalmente, 36 milhões de pessoas.[3-5] A sua incidência tem também aumentado, tendo um pico de ocorrência de diagnóstico por volta dos 5-9 anos.[6]

Patofisiologia

Vários eventos imunológicos silenciosos ocorrem antes do aparecimento da sintomatologia típica da DMT1. Numa fase pré-diabética, podem ser detetados autoanticorpos e linfócitos T CD4+ e CD8+ ativos que se infiltram as ilhotas de Langerhans, destruindo as células beta.[7] Na altura do diagnóstico, 85-90% dos indivíduos possui um ou mais marcadores de destruição autoimune das células- β que incluem, autoanticorpos para as ilhotas, para a insulina, para o ácido glutâmico descarboxilase, para o transportador do zinco 8 e para a tirosina fosfatase IA-2 e IA-2 β . [3, 8]

O complexo de histocompatibilidade major (HLA) é considerado como contribuinte etiológico em cerca de metade dos casos familiares, principalmente o de classe II.[9] Estes genes codificam proteínas de superfície que são necessárias à interação com as células do sistema imune e estão envolvidas no reconhecimento e destruição imunológicos. A suscetibilidade à doença é altamente relacionada com a herança dos alelos HLA DR3 e DR4, assim como dos alelos DQ2 e DQ8. Mais de 90% dos doentes com DMT1 expressam ou DR3DQ2 ou DR4DQ8.[10]

Existem, ainda, outros genes de suscetibilidade e fatores ambientais desencadeantes, como infeções víricas e bacterianas, que remetem para a base etiológica da doença.[11] Deste modo, indivíduos geneticamente suscetíveis, que são expostos a certos agentes precipitantes, desenvolvem autoimunidade contra as ilhotas pancreáticas, que leva ao declínio na massa de células beta, ao desenvolvimento de autoanticorpos, à hiperglicemia e, eventualmente, à perda da capacidade de secreção de insulina.[12]

Diagnóstico

Os níveis de glicemia e de hemoglobina glicosilada (HbA1c) são utilizados para o diagnóstico da diabetes mellitus. A glicemia normal em jejum é mantida entre 70 e 126 mg/dL e a glicemia pós-prandial após duas horas da refeição entre 110 e 140 mg/dL. O teste de tolerância oral à glicose é utilizado para confirmar o diagnóstico, através da ingestão de 75g de glicose, medindo a glicemia duas horas após, com valores superiores a 200 mg/dL. Valores de HbA1c $\geq 6,5\%$ remetem também para o diagnóstico de diabetes mellitus. Para além destes critérios, a DMT1 tem, especificamente, outros achados que corroboram este diagnóstico, nomeadamente, a perda de peso inexplicada e os baixos níveis do peptídeo-C que são o mais fidedigno indicador diagnóstico deste tipo de diabetes, uma vez que este peptídeo é um marcador indireto da secreção insulínica. Por fim, a medição dos vários autoanticorpos supra-mencionados são um teste confirmatório da DMT1.[3, 4, 13]

Complicações

A evolução da DMT1 causa, com frequência, disfunção multi-orgânica progressiva através do atingimento microvascular e macrovascular. Ao nível dos pequenos vasos destaca-se a retinopatia diabética, a neuropatia periférica e a nefropatia diabética e, relativamente aos grandes vasos, a doença arterial coronária, a doença cerebrovascular e a doença vascular periférica.[14]

Tendo em conta a progressão, o impacto da DMT1 e o seu tratamento atual que, além de ser complexo e implicar automonitorização, ainda apresenta dificuldade em alcançar um controlo euglicémico fisiológico, torna-se evidente a necessidade premente de se encontrarem caminhos para a cura desta doença, nomeadamente, através de tratamentos que substituam a função das células β destruídas.

Metodologia

Para a elaboração deste artigo de revisão bibliográfica foi efetuada uma pesquisa de artigos científicos na base de dados bibliográfica *MEDLINE*, *PUBMED*, *UpToDate* e alguns livros. A pesquisa bibliográfica dos artigos científicos foi realizada entre os meses de Julho de 2016 e Maio de 2017. As palavras-chave usadas foram: Diabetes Mellitus tipo 1, tratamento, cura, transplante de pâncreas, transplante de ilhotas, regeneração células beta e células estaminais.

Os artigos foram selecionados ou excluídos conforme o conteúdo do título e/ou resumo. Foram selecionados artigos publicados em inglês, entre o período de 1980 -2017 com predomínio de artigos a partir de 2010.

Tratamento Atual: Administração Exógena de Insulina

O controlo da glicemia, de modo a prevenir a doença micro e macrovascular, é o objetivo principal do tratamento atual da DMT1, através de injeções diárias de insulina e da auto-monitorização da glucose sanguínea (SMGB).[15]

As várias formulações insulínicas disponíveis no mercado aumentaram, drasticamente, a qualidade de vida dos doentes com DMT1. A base da administração insulínica assenta num regime basal-bólus, isto é, uma ou duas injeções por dia de análogos insulínicos de longa duração de ação (Detemir ou Glargina) combinados com análogos de insulina de ação rápida antes das refeições (Lispro, Aspart ou Glulisina). Os análogos da insulina têm um perfil de ação mais rápido e menos variável em relação às anteriores insulinas humanas, reduzindo as taxas de hipoglicemia.[16-18]

No entanto, as hipoglicemias iatrogénicas ainda são o fator limitante no controlo da glicemia na DMT1. São responsáveis por morbidade recorrente nestes doentes podendo ser, por vezes, fatais. [19] Um estudo realizado em 2015 constatou que 8% das mortes em doentes diabéticos jovens eram devidas a episódios hipoglicémicos.[20] A hipoglicemia atenua as respostas simpático-adrenais e sintomáticas para o mesmo nível de hipoglicemia subsequente, causando, assim, insuficiência autonómica associada à

hipoglicemia na diabetes.[21, 22] Quanto maior a duração da DMT1 maior é a prevalência da diminuição da percepção da hipoglicemia. Esta observação remeteu para o uso urgente de novas abordagens no controlo das hipoglicemias.[23]

A administração insulínica não é considerada cura mas mantém-se como pilar da terapêutica desta doença, desde a sua descoberta em 1921, perdurando mais alguns anos e, provavelmente, será utilizada como suplemento de outras terapêuticas.[24]

As **bombas insulínicas** consistem numa infusão subcutânea contínua de insulina (CSII). O local de administração é alterado, em média, a cada 3 dias. Apenas é utilizada insulina de ação rápida, preferencialmente na forma análoga.[25] Os bólus de insulina podem ser administrados ao longo de alguns minutos ou horas, cobrindo as refeições e corrigindo os picos de glicemia. Para que a bomba seja capaz de calcular corretamente a quantidade de insulina a administrar, é necessário inserir o teor de carboidratos das refeições, assim como a glicemia. A bomba também liberta insulina basal programada, de acordo com o perfil de 24 horas da glucose plasmática ou do líquido intersticial. Quase todas as bombas têm a capacidade de programar as taxas basais que podem ser modificadas a cada hora e também possuem uma taxa basal temporária aplicável em situações específicas.[26]

Posteriormente, surgiu a infusão intraperitoneal de insulina contínua (CIPII). Com este dispositivo, a insulina administrada é praticamente toda absorvida pelo sistema portal, resultando numa maior concentração de insulina na área de captação da veia porta, maior captação hepática de insulina e concentrações periféricas de insulina mais reduzidas, mimetizando, assim, a normal fisiologia.[27] Foi possível observar que estes dispositivos têm efeitos mais favoráveis na concentração de HbA1c comparativamente aos CSII.[28]

Em comparação com as injeções de múltiplas doses de insulina, as bombas insulínicas promovem uma entrega de insulina programada que se assemelha mais com as necessidades fisiológicas, reduzem a variabilidade da glicemia e melhoram o controlo da mesma, diminuem o risco de hipoglicemia grave, a necessidade de hospitalização e melhoram a qualidade vida e a satisfação face ao tratamento.[26]

São dispositivos eficazes no melhor controlo da DMT1 apesar de vários doentes permanecerem com HbA1c > 7%. [29] São, essencialmente, indicadas nos doentes que têm um controlo sub-ótimo com as clássicas injeções basal-bólus, apesar da máxima

adesão por parte do doente na administração de múltiplas injeções diárias, hipoglicemias graves ou sem sinais de alarme e hiperglicemia do amanhecer marcada.[30]

A **monitorização contínua de glicose (CGM)** surgiu de forma a superar algumas limitações da auto-monitorização da glicemia capilar (SMGB). É composta por um sensor de glucose, um eléctrodo impregnado com glucose oxidase que é colocado no tecido subcutâneo através de um cateter flexível que pode ser tolerado por 3 a 14 dias e um monitor que está conectado ao sensor e que pode ser usado no interior do vestuário ou cinto.[31] O eléctrodo revestido com a enzima mede a concentração de glucose intersticial e converte esses valores através da calibração em níveis de glucose sanguínea.[32] Os primeiros sistemas recebiam e armazenavam os dados da glucose intersticial até ser realizado o seu carregamento para um dispositivo onde podiam ser observados e analisados posteriormente. Atualmente, os sistemas de CGM são capazes de exibir os valores de glucose em tempo real (RT-CGM).[33]

Através da CGM é possível distinguir padrões de glicemia anormal independentemente do uso de terapêutica com bomba insulínica ou injeções insulínicas. Observou-se que é necessário fazer ajustes às recomendações da terapêutica prévia para que os níveis glicémicos se mantenham dentro de valores normais. Essas alterações levam a um melhor controlo glicémico, tendo por base a avaliação do nível de HbA1c.[31]

A CGM deve, de facto, ser usada, essencialmente, em doentes com DMT1 com diminuição da sintomatologia de hipoglicemia, visto que promovem um melhor controlo glicémico, diminuindo o tempo gasto em estados hipo e hiperglicémicos e diminuindo, também, a hipoglicemia grave.[34]

Os **sistemas de ansa fechada** surgiram quando os sensores de monitorização contínua de glucose foram acoplados às bombas insulínicas, designando-se de pâncreas artificial. Estes sistemas modulam a entrega de insulina em intervalos de 1 a 15 minutos.[35] É frequente os doentes com DMT1 inicialmente utilizarem as bombas insulínicas e só posteriormente associarem a RT-CGM.[29] Estes sistemas promovem um melhor controlo metabólico, associado à maior segurança do tratamento, na medida em que pode existir suspensão automática da entrega insulínica (incluindo a taxa basal) quando os níveis de glucose são baixos, evitando as hipoglicemias características das múltiplas injeções insulínicas diárias.[33]

As desvantagens inerentes à infusão insulínica subcutânea são responsáveis pelo atraso na resposta à hiperglicemia pós-prandial. Por esta razão, foram desenvolvidos avisos de refeição para despoletar a infusão. Por outro lado, se a infusão insulínica for intensificada podemos observar hipoglicemia, o que levou ao desenvolvimento de bombas hormonais duplas, tendo em consideração o glucagon e a insulina. A administração deveria ser intraportal ou intraperitoneal de forma a mimetizar a via secretora do pâncreas. No entanto, os riscos associados a infeção e à colocação invasiva do dispositivo tornam-se grandes obstáculos à sua maior utilização.[35]

As abordagens até agora referidas pertencem ao domínio do tratamento da DMT1 mas não correspondem, efetivamente, à cura da doença, uma vez que esta implica o restabelecimento da saúde sem que a pessoa necessite de ter qualquer ação diária para a manutenção da mesma. Para além disso, a administração subcutânea de insulina exógena é imprecisa e até as melhores bombas insulínicas falham em restabelecer um controlo glicémico fisiológico.

Transplante total de pâncreas

O transplante do pâncreas foi iniciado em 1966 e foram obtidos casos de sucesso com um rápido controlo da hiperglicemia e com suspensão da administração de insulina.[4] Foi demonstrado que o transplante de pâncreas bem sucedido restaura a normal homeostasia da glucose, não tendo o risco de hipoglicemias que sucede na administração injetável de insulina, e previne, interrompe ou reverte o desenvolvimento e progressão das complicações secundárias a esta doença.[36]

Existem 3 categorias de transplante pancreático: transplante isolado de pâncreas (PTA), transplante de pâncreas após transplante renal e transplante renal e pancreático em simultâneo (SPK). Nas últimas décadas, a sobrevivência dos doentes e a função do transplante tem melhorado, significativamente, nas 3 categorias mas com melhores resultados na última categoria referida. A sobrevivência do órgão transplantado chegou até aos 81.5% após um ano da realização do transplante.[37] Este procedimento é usualmente proposto a doentes com insuficiência renal grave que requerem transplante renal concomitante.[2] De facto, devido a vários fatores como uma melhor técnica cirúrgica, imunossupressão, seleção de doadores e recetores e vigilância do transplante, foi possível que a semivida do transplante SPK aumentasse para mais de 14 anos.[38]

O obstáculo do transplante de pâncreas isolado continua a ser a elevada taxa de rejeição imunológica do enxerto. De forma a contorná-lo, é necessária imunossupressão. No entanto, são de evidenciar os efeitos laterais da imunossupressão anti-rejeição do transplante atualmente utilizada, como aumento da incidência de infeções, atraso da cicatrização de feridas e disfunção renal.[39] Devido a este último efeito lateral, na ausência de nefropatia diabética avançada, a opção de PTA não é, largamente, aceite.[40] A substituição da clássica imunossupressão com ciclosporina/azatioprina por tacrolimus/micofenolato de mofetil combinados com terapia anti-células T têm vindo a contribuir para melhores resultados a longo prazo.[40]

Apesar do seu potencial curativo, o transplante de pâncreas permanece um procedimento bastante complexo associado a morbilidade cirúrgica e mortalidade significativa (22%,10 anos após o transplante). Para além disso, há uma grande limitação relativamente à baixa disponibilidade de órgãos para transplante e à qualidade dos mesmos, sendo que a idade avançada do dador pode até ser aceitável para resultados a curto prazo, mas o seu impacto em complicações técnicas e nos resultados a longo prazo não são desprezáveis.[41-43]

Transplante de Ilhotas

As desvantagens do transplante total de pâncreas levaram a que novas técnicas fossem desenvolvidas, nomeadamente, a extração de ilhotas com transplantação. O primeiro transplante alogénico de ilhotas surgiu em 1980.[44]Esta foi uma técnica pouco eficiente até ao ano 2000, altura em que Shapiro et al. surgiu com um estudo inovador, introduzindo o “Protocolo Edmonton”e no qual obteve independência insulínica durante 1 ano em todos os 7 pacientes transplantados. Neste protocolo eram usados 2 imunossupressores, sirolimus e tacrolimus, e um anticorpo monoclonal, daclizumab.[45]Esta é uma técnica menos invasiva, associada a menor morbilidade. As ilhotas são separadas de um pâncreas removido de um dador cadáver e são colocadas em meio de cultura. Posteriormente, realiza-se o transplante apenas da porção endócrina, sendo injetadas na veia porta e transportadas através do fluxo sanguíneo para o fígado onde se mantêm neste, por ser um órgão bastante acessível e pelo bom aprisionamento destas nos sinusoides. [46, 47] De forma a se observar o efeito metabólico adequado após o transplante, são necessárias mais de 5000 equivalentes de

ilhotas por quilograma de peso do recetor, o que pode implicar a necessidade de obter ilhotas de mais do que um pâncreas.[48]

Apesar de existir um potencial risco de trombose da veia porta com o transplante de ilhotas intra-hepático, tal pode ser ultrapassado com a adesão a estreitos protocolos de heparinização.[49] Para além disso, as complicações que possam advir desta abordagem, como a ligeira subida transitória das transaminases a microesteatose ou contaminação bacteriana da preparação final das ilhotas purificadas, são reversíveis ou não têm significado clínico.[50, 51] Poderá existir ainda uma ampla sensibilização aos antígenos HLA dadores, mas essa resposta pode ser minimizada com a utilização de terapias indutoras de depleção de células T, imunossupressão com tacrolimus e seleção de dadores sem reações cruzadas de antígenos HLA. No entanto, é necessário ter em consideração a possibilidade de malignidades com o uso prolongado de imunossupressão.[52] Assim, devido aos seus riscos mínimos o transplante de ilhotas torna-se bastante atrativo.

De forma a contornar o uso de fármacos imunossupressores e os seus efeitos laterais após o transplante de ilhotas, surgiu a ideia de encapsular as células numa membrana protetora semipermeável. Foram desenvolvidas duas abordagens ao nível do encapsulamento: as macrocápsulas que contêm um grande número de ilhotas num dispositivo implantável e as microcápsulas que apenas contêm 1 a 2 ilhotas em cada dispositivo e, neste caso, necessitam de um grande número de microesferas a serem transplantadas. [53]

Como desvantagens das macrocápsulas, pode-se evidenciar a baixa relação superfície/volume e a interferência com a difusão ótima de nutrientes e oxigénio. As macrocápsulas de alginato-Beta-O₂, protegidas por uma membrana de Teflon, podem contornar este obstáculo, na medida em que incluem uma tecnologia de fornecimento de oxigénio para as ilhotas na cápsula.[54] De momento, existem formas intra e extravasculares, sendo que as primeiras possuem alto risco de trombose e necessidade de cirurgia major, tornando-as menos adequadas para uso clínico.

Novas técnicas de micro encapsulamento deram origem, recentemente, ao termo nanoencapsulamento.[55] As características desta membrana têm de ser bastante específicas, isto é, os poros da mesma devem ser tão pequenos que bloqueiem as moléculas e células responsáveis pela rejeição imune do transplante, mas os mesmos também necessitam de ter um tamanho adequado, de modo a permitir a passagem de O₂, glucose e insulina.[56]

No que diz respeito às membranas de alginato, a espessura das mesmas ainda limita a difusão de insulina, glicose, oxigênio e nutrientes uma vez que a espessura não deveria ser superior a 150 μm . O tamanho largo dos poros deste material polimérico pode, também, ser um problema para o imuno isolamento a longo prazo. Por outro lado, os nanoporos das membranas inorgânicas de silicone, alumínio e titânio têm um tamanho adequado e espera-se que desempenhem um melhor papel na imuno proteção. De qualquer forma, a investigação neste campo ainda está num nível muito inicial, mas poderá levar a interessantes resultados num futuro próximo. [56-58]

Nesta área, Tomei et al. investigou a utilização de hidrogéis elásticos como material de encapsulamento de ilhotas humanas que se adaptavam à forma e tamanho de cada ilhota, promovendo, assim, um material com a espessura adequada. Estas ilhotas encapsuladas foram transplantadas em roedores e foi possível alcançar a euglicemia em aproximadamente 40 dias após o transplante que foi mantido durante 72 dias. [59]

Para além da biocompatibilidade e do modelo, outras abordagens podem ajudar a produzir cápsulas com ilhotas ou células β duradouras: prevascularização das macrocápsulas anteriormente ao transplante, utilização de fatores de crescimento e materiais que geram oxigênio ou disposição das células beta em grupos de tamanho controlado. [60-62]

As ilhotas microencapsuladas foram também revestidas pela quimiocina CXCL12. Esta é fortemente quimiotática para as células T reguladoras da supressão do sistema imune que repelem as células T efetoras, promovendo, assim, o isolamento imune local das células transplantadas. Foi demonstrado que o revestimento com CXCL12 de ilhotas encapsuladas prolongou a função das mesmas em roedores diabéticos, protegendo, efetivamente, as ilhotas alogénicas ou xenogénicas da rejeição aguda mediada por células. No entanto, não foram capazes de impedir a imunidade humoral com anticorpos anti-ilhotas. No futuro, esta quimiocina poderá funcionar em conjunto com outros imunomoduladores locais de forma a permitir a sobrevivência do transplante. [63]

Existe uma grande discrepância entre o número de ilhotas necessárias para transplante e a sua disponibilidade, o que evidencia a urgência em encontrar outras fontes de ilhotas. Atualmente, várias células estão a ser utilizadas para superar este problema, nomeadamente, através da expansão de células beta humanas já existentes, diferenciação de células estaminais embrionárias humanas em células beta e células de ilhotas animais, particularmente, porcinas uma vez que há homologia entre a insulina e

as ilhotas de ambas as espécies.[64-66]De facto, um dos focos da investigação tem sido o xenotransplante. O uso de células animais como fonte de células β é bastante atrativo, uma vez que proporciona uma fonte ilimitada de ilhotas. No entanto, a sua utilização é desafiante no que diz respeito à imunogenicidade das mesmas e rejeição pelo hospedeiro.[67] A possibilidade de existir transferência de zoonoses também se mantém uma preocupação adicional. De forma a contornar estes obstáculos, a engenharia genética é utilizada nas células porcinas dadoras para diminuir a reação inflamatória imediata mediada pelo sangue. Esta reação causa destruição pela ativação do complemento e da coagulação e, também, de outras vias inflamatórias.[53]

Em 2016, um ensaio clínico de fase 3 de transplante de ilhotas alogénico alcançou uma HbA1c <7% em 87.5% dos doentes após 1 ano e em 71% após 2 anos. A independência insulínica foi de 52% após 1 ano e 42% após 2 anos. Este estudo fornece importante evidência clínica do transplante de ilhotas alogénico como uma terapêutica comprovada e não só experimental para o tratamento DMT1.[68] Para além disso, centros com vasta experiência obtiveram resultados nas taxas de independência insulínica a 1 e 5 anos comparáveis às do transplante de pâncreas total, sendo de 70% e 50%, respetivamente. A maioria destes centros utilizou imunoterapia de indução potente, com depleção de células T e inibição do TNF- α .[69, 70]

Deste modo, em centros experientes, o transplante de ilhotas alogénico é já uma abordagem prática para a cura da DMT1.[71] No entanto, o transplante de ilhotas tem protocolos quer de isolamento quer de manutenção da viabilidade após criopreservação bastante complexos e, por isso, deve ser indicado a adultos com DMT1 instável (recorrência de hipoglicemias graves, labilidade glicémica e complicações relacionadas com a diabetes).[72]

Regeneração de células beta

A regeneração de compartimentos pancreáticos foi já descrita quer após o nascimento, quer após lesão pancreática.[73, 74] Existem três mecanismos principais que visam explicar a regeneração das células β : Neogénese (diferenciação de ilhotas a partir de progenitores pancreáticos), replicação de células β pré-existentes e transdiferenciação (conversão de um tipo celular noutra).[75, 76]

Neogénese

Foi amplamente considerado o principal processo responsável pelo desenvolvimento embrionário, no entanto, o seu envolvimento no pâncreas adulto ainda está sob investigação.[75] Vários estudos descrevem a existência de um reservatório de células progenitoras no pâncreas exócrino humano.[72] As células acinares representam a população major do pâncreas humano e, por isso, o seu papel, como possíveis progenitores, tem particular interesse.[77] Vários estudos evidenciaram o potencial destas células para desenhar protocolos de transdiferenciação *in situ*, nomeadamente Bonfantiet al. que desenvolveu um protocolo baseado em citocinas (envolvendo fator de crescimento epidermal e fator neurotrófico ciliar) para contornar o uso de adenovírus de estudos prévios. Foi possível observar que 65% dos roedores diabéticos aumentaram os seus níveis de insulina sérica e normalizaram a glicemia durante 5 dias, sendo detetado que células acinares estavam na origem das novas células β . [78]

Além das células acinares, as células ductais pancreáticas também se apresentam com características interessantes para a regeneração de componentes pancreáticos. Constituem cerca de 35% da massa de células pancreáticas, são facilmente purificadas e resistentes a procedimentos de isolamento.[72] A re-expressão da neurogenina 3 (NGN3) nesta subpopulação de percussores pancreáticos foi identificada como sendo um passo essencial na antecipação do processo regenerativo e para a diferenciação destas células em células β funcionais.[79] Porém, é necessário, ainda, determinar a funcionalidade destas células a longo prazo.

Replicação

Outro mecanismo que poderá ter um papel na reposição de tecido pancreático é a replicação de células β pré-existentes. A mesma é, usualmente, controlada por ativação de proteínas que regulam o ciclo celular.[80] Por exemplo, foi demonstrado que p16, p27, ciclinas D1, D2 e D3 têm um papel central na regeneração do pâncreas, controlando o potencial replicativo de massa de células β . [72] A utilização em roedores da molécula WS6 possibilitou, após 6 semanas, um aumento de cerca de 50% da massa de células β e decréscimo paralelo da hiperglicemia, sem afetar a sua diferenciação e viabilidade.[81] No entanto, pouca evidência foi demonstrada da aplicação deste mecanismo em humanos. Neste sentido, foi descrito em 2011 um processo *in vitro* de desdiferenciação, expansão e rediferenciação de células β humanas com o objetivo de obter um grande número de células produtoras de insulina funcionais. As células β

desdiferenciadas adquiriram marcadores mesenquimatosos, sugerindo uma transição mesenquimatosa epitelial (TME). A manutenção de memória epigenética permitiu uma rediferenciação rápida de células produtoras de insulina derivadas de células β a partir de uma combinação de fatores solúveis, glucose, nicotinamida, exendina-4 e activina A.[82] Quando transplantadas em roedores diabéticos observou-se uma diminuição da glicemia e a detecção de peptídeo-C.[83] Estas observações propõem, assim, um novo sistema de produção e expansão de uma fonte de células β funcionais a partir de culturas primárias de ilhotas humanas adultas.

Transdiferenciação

Este mecanismo explica uma das formas de reposição de massa de células β . As células hepáticas e do intestino delgado partilham a mesma linhagem de origem das células pancreáticas e, por isso, têm sido testadas na restituição de células produtoras de insulina.[84-86] A maior parte dos estudos realizados são focados nas células hepáticas. A descoberta de mecanismos de detecção de glucose e de transdução de sinal nestas células despoletou os primeiros testes de transdiferenciação celular de forma a obter células produtoras de insulina a partir dos hepatócitos.[72, 87] Vários estudos tiveram sucesso em modelos de roedores, utilizando a transferência isolada do gene PDX1 mediada por adenovírus ou em associação com os genes NeuroD e MafA (genes essenciais na diferenciação e funcionamento das células β).[88-90] Apesar dos resultados positivos desta técnica, a sua transição para humanos não é aplicável devido a questões de segurança relacionadas com o uso de adenovírus. Para além disso, a transdiferenciação in vitro levou ao aparecimento de células com um fenótipo hépato-pancreático híbrido, incapazes de regular a secreção de insulina de acordo com as variações da glicemia. Por estas razões, serão necessários mais estudos nesta área para que as células hepáticas possam substituir no futuro a função das células β . [91]

A transdiferenciação celular foi, também, utilizada em 2009 para converter células produtoras de glucagon(células α) em células β funcionais após a sobreexpressão de PAX4 ou inibição seletiva do gene ARX em células α . [92, 93] Mais recentemente, outros grupos conseguiram converter células α em células β sob condições específicas mas com baixo rendimento.[94] De igual forma neste caso, questiona-se a possibilidade de utilização em humanos e se existe potencial de ser transposta para protocolos farmacêuticos.[95]

Células estaminais

A pesquisa de melhores formas de substituição de células β focaram-se em dois aspectos: criar uma fonte ilimitada de células β e eliminar a necessidade de imunossupressão crônica para proteger essas células das respostas alo e autoimunes. [96] As células estaminais são uma abordagem mais recente que tem como objetivo criar a fonte ilimitada de células β , uma vez que, através das mesmas, podem-se obter células secretoras de insulina que substituam as células β . Estas células têm um potencial terapêutico significativo devido não só à sua capacidade regenerativa intrínseca, mas também ao seu potencial imunomodulador. A capacidade regenerativa pode ser utilizada no transplante, para a produção de células secretoras de insulina responsivas à glucose. As propriedades imunomoduladoras podem, possivelmente, ser aproveitadas para impedir a destruição das células β , preservar a massa residual destas células, facilitar a regeneração endógena das células β , diminuir a rejeição do transplante e prevenir a recorrência de autoimunidade. [97-100]

Várias são as fontes de células estaminais que têm sido testadas, entre elas podemos encontrar as células estaminais embrionárias humanas (hESCs), as células estaminais pluripotentes induzidas humanas (hiPSCs), as células estaminais mesenquimatosas (MSCs), as células epiteliais amnióticas humanas (hAECs), as células estaminais hematopoiéticas derivadas da medula óssea (HSCs) e as células precursoras multipotentes derivadas do pâncreas. [4, 101]

A maior parte dos ensaios utilizam, principalmente, as hESCs e hiPSCs, devido à sua proliferação teoricamente ilimitada e ao seu potencial proliferativo. [102] O maior desafio é descobrir a via de sinalização até se alcançar a célula β .

Células Estaminais Embrionárias Humanas

As hESCs derivam da massa do blastocisto e são pluripotenciais, uma vez que têm a capacidade de se diferenciar nas 3 camadas germinativas. Para além disso, têm uma elevada capacidade proliferativa e de auto-renovação. [103] Foram isoladas de um blastocisto humano e utilizadas pela primeira vez em meio de cultura em 1998. [104] Existe um debate ético sobre a utilização de hESCs, o que tornou controversa

a investigação nesta área. Por essa razão, a maioria dos estudos são realizados em modelos animais.[103]

Vários estudos focaram-se na descoberta da combinação ideal de fatores que produzissem células endodérmicas a partir destas células. Em particular, o estudo de D'Amouret al. e Kroon et al. definiram os protocolos *in vitro* para a indução de células pancreáticas que recapitularam cada fase do desenvolvimento de células de ilhotas, desde hESC a endoderme, a progenitores pancreáticos e, finalmente, a células do tipo β produtoras de insulina. [105-107]

Foi possível observar que o transplante de progenitores pancreáticos derivados das hESCs em vez da utilização de células β derivadas das hESCs completamente diferenciadas foi mais eficaz em restaurar a normoglicemia através da libertação insulínica dependente de glucose.[108] Isto sugere que é possível existirem sinais de diferenciação importantes intrínsecos ao microambiente pancreático que são, atualmente, desconhecidos e que desempenham um papel crucial no desenvolvimento da linhagem celular e função das células β . [109] Também se poderá considerar que as células progenitoras retêm um perfil estaminal favorável para a maturação de células produtoras de insulina que podem proporcionar uma resposta adequada à hiperglicemia. Outros fatores que permitem uma diferenciação de células β eficiente *in vivo* e que são difíceis de reproduzir *in vitro*, poderão estar relacionados com a vascularização e a interação com tecidos contíguos.[108]

No entanto, é necessário avaliar a segurança deste processo, uma vez que o transplante de células não completamente diferenciadas derivadas das hESCs possui um risco oncogénico, especialmente no que diz respeito à formação de teratomas.[110] De forma a contornar este problema, estudos atuais investigam a possibilidade de triagem de progenitores pancreáticos do resto da população de células [111] e métodos baseados em anticorpos para a ablação de células tumorais.[112] As técnicas de purificação celular, como a triagem de células ativadas por fluorescência ou magneticamente, a seleção genética ou os marcadores de superfície celular, podem prevenir a implantação de células indiferenciadas, diminuindo, assim, o risco de oncogénese.[113]

A utilização de procedimentos de encapsulamento, já suprarreferidos, é uma alternativa interessante para garantir a segurança e funcionamento dos percursos de células beta e de derivados das hESCs, protegendo o doente de qualquer risco tumoral e permitindo a remoção do transplante em caso de mau funcionamento do mesmo.[114]

Recentemente, foram transplantadas, intraperitonealmente em roedores, células β derivadas de hESC utilizando encapsulamento de alginato. O transplante foi funcional durante 174 dias, com efeitos significativos na secreção do peptídeo-C que se refletiram na homeostase da glucose.[115] Estes resultados evidenciam o potencial destas células mas mais estudos serão necessários.

Células Estaminais Pluripotenciais Induzidas Humanas

A produção de células estaminais pluripotentes pode ser realizada, sob condições específicas, a partir de uma reprogramação de células somáticas. A indução de pluripotência foi alcançada através da expressão dirigida de fatores de transcrição específicos. Nestas células pode-se observar uma alta atividade da telomerase, semelhante à das hESCs, e hipometilação de promotores de genes. Estas células representam uma ótima opção para o tratamento celular da DMT1, uma vez que são específicas do doente, eliminando, assim, a possibilidade de rejeição.[116, 117]

A produção de iPSCs foi tradicionalmente realizada através da inserção dos fatores de transcrição necessários por um retrovírus no DNA. No entanto, a integração retroviral e o risco de tumorigênese associado a fatores proto-oncogênicos limitam a sua aplicação clínica. De forma a prevenir a mutagênese de inserção relacionada com a reprogramação direta, surgiram os plasmídeos episomais. Esta é uma área de estudo atual que demonstrou reprogramar fiavelmente fibroblastos e células sanguíneas.[118] Os plasmídeos têm o potencial de produzir células de valor clínico, tendo baixas taxas de aneuploidia relativamente à transdução retroviral. Porém, outros agentes, nomeadamente o RNA baseado no vírus Sendai (SeV), proporciona ainda uma melhor integração genética. Os métodos de reprogramação com este vírus são muito fiáveis e, por oposição aos vetores retrovirais, este vírus replica-se fora do ciclo celular prevenindo a sua integração no DNA do hospedeiro. Infelizmente a transição para a clínica é complicada, uma vez que não está disponível comercialmente. Dos métodos utilizados atualmente, a reprogramação do RNA, quando bem sucedida, é a que produz menor taxa de aneuploidia nas iPSCs. No entanto, este método apenas produz um número limitado de iPSCs a partir de fibroblastos, sendo incapaz de produzir estas células a partir de células sanguíneas.[119]

A conversão bem sucedida de iPSCs em células pancreáticas maduras produtoras de insulina pode ser avaliada pela expressão de vários fatores, principalmente pelo PSX1 e NKX6-1, que são essenciais na função de células β maduras.[120]Pagliuca et al. foi capaz de produzir células β derivadas das iPSCs (células SC- β) que expressavam estes genes e retinham a produção insulínica após transplantação nas cápsulas renais de roedores afetados.[121] Porém, apesar destas células serem capazes de secretar insulina apropriadamente, contornar a rejeição imune das células transplantadas permanece um desafio. De facto, apesar de ser possível obter as células SC- β a partir das células somáticas do próprio doente, as células transplantadas permanecem vulneráveis à autoimunidade presente na DMT1. De forma a aumentar a sobrevivência in vivo do material transplantado, as células SC- β foram introduzidas em microcápsulas e foram incorporados imunomoduladores específicos. Assim, microcápsulas com células SC- β foram transplantadas concomitantemente com MSCs, células T reguladoras e células de Sertoli numa tentativa de desvanecer a imunogenicidade do transplante.[63] Recentes estratégias incorporaram agentes imunossupressores na membrana da microcápsula. A integração do ácido ursodeoxicólico, um ácido biliar terciário que inibe a ativação imune e fagocitose de tecidos alogénicos, proporcionou uma melhor viabilidade das células β encapsuladas sem afetar negativamente a integridade da microcápsula. Na verdade, a associação deste ácido sugeriu diminuir o edema celular e otimizar a durabilidade da microcápsula.[122] A quimiocina CXCL12 utilizada no revestimento das células das ilhotas microencapsuladas também pode aqui ser utilizada dado que esta pode funcionar como um revestimento protetor das células SC- β encapsuladas.[63]

Os vários estudos abordam as preocupações éticas e de segurança que giram em torno da terapia com hiPSCs assim como evidenciam a sua potencial eficácia no tratamento da DMT1.

Células Estaminais Mesenquimatosas

As MSCs são células multipotentes e podem derivar de vários tecidos e órgãos, nomeadamente, sangue do cordão umbilical, placenta, cartilagem e tecido adiposo.[123] Apesar de serem raras nestes tecidos, a sua grande capacidade de auto-renovação permite a expansão eficiente destas células *in vitro*. As MSCs humanas têm

uma grande função imunomoduladora uma vez que inibem a proliferação e função das populações major de células do sistema imune como as células T, B e NK, induzem as células Treguladoras CD4+/CD8+, Foxp3+ e modulam as atividades das células. Assim, sendo pouco imunogênicas e com tolerância imune, estas células tornam-se promissoras no tratamento da DMT1. [99, 124]

Estas células têm propriedades citoprotetoras, uma vez que secretam fatores solúveis que inibem a apoptose e promovem a angiogênese e a sobrevivência das células.[125] Deste modo, a sua associação ao transplante de ilhotas pode ser benéfica, prevenindo a perda significativa de ilhotas devido à reação inflamatória inicial, à hipoxia e lesão de reperfusão pós isquemia.[126]Estudos demonstraram um efeito anti-apoptótico associado à expressão de Bcl-2 e a baixos níveis de caspase 3 clivada e uma melhor angiogênese com maior detecção do fator de crescimento vascular (VEGF).[125]

Recentemente, dois grupos dirigiram uma abordagem mais direta para identificar os fatores derivados das MSC que poderiam estar associados ao melhor funcionamento das ilhotas in vivo. Identificaram uma proteína sobreexpressa, a Anexina A1. Esta aumentou a secreção de insulina estimulada pela glicose e reduziu a atividade da caspase 3/7 in vitro. No entanto, uma ausência desta proteína não aboliu o efeito protetor das MSC, sugerindo um papel de outros fatores.[127] Também identificaram biomarcadores de capacidade regenerativa das ilhotas como a interface de elastina microfibrila 1 e a proteína cinase ligada à integrina que são altamente expressos em algumas MSC.[128]Mais estudos com ausência ou sobreexpressão destas proteínas são necessários para demonstrar a importância das mesmas em modelos pré-clínicos de DMT1 e no transplante de ilhotas.[126] Assim, é fundamental perceber a via de administração ótima e o número de MSC necessárias para uma terapêutica bem-sucedida. É de igual forma imperativo a compreensão detalhada de como é mediada a função protetora das MSC no transplante de ilhotas para uma melhor aplicação das mesmas. [126]

No entanto, é importante nomear as limitações do uso destas células. Em primeiro lugar, os níveis de peptídeo-C de células diferenciadas foram baixos e não conseguiram manter a normoglicemia em roedores diabéticos, indicando a necessidade de melhorar quer qualitativamente, quer quantitativamente, a massa de células produtoras de insulina. A este respeito, a diferente camada germinativa de derivação de MSCsdificulta a interpretação de protocolos de diferenciação para células produtoras de insulina. [129]Para além disso, os clones de MSCs exibem diferentes taxas de

proliferação que dificultam a consolidação de protocolos padrão para a obtenção de células *betalike*. [123]

Células Epiteliais Amnióticas Humanas

O tecido placentário representa uma fonte abundante de células estaminais. São vários os estudos que demonstram que as hAECs expressam marcadores de células estaminais e retêm a capacidade de se diferenciar nas 3 camadas germinativas. Por esta razão, a bolsa amniótica tem sido proposta com uma fonte biológica de células estaminais para a medicina regenerativa. As vantagens da utilização de células derivadas da placenta incluem disponibilidade universal de amostras, utilização de técnicas de recolha e manuseamento de células não invasivo, ausência da questão ética (associada, por exemplo, ao uso de células embrionárias) e o baixo risco de doença enxerto versus hospedeiro (DEVH). Estudos foram capazes de diferenciar hAECs em células produtoras de insulina em resposta à glucose.[130, 131]

Devido às suas peculiaridades, as células estaminais são, então, consideradas as candidatas mais promissoras para a futura abordagem curativa da DMT1.[104]

Vacina GAD65

De forma a preservar, em estadios iniciais da DMT1, a função das restantes células β , foram desenvolvidas estratégias imunomodeladoras dentro das quais o GAD-alum se destacou. Esta estratégia remete para a modulação da resposta imune através da apresentação de antígenos de forma a que o sistema imune substitua o processo destrutivo para uma tolerância aos mesmos, como ocorre na maior parte das alergias.[132, 133]

O ácido glutâmico descaboxilase é considerado um auto-antígeno major na autoimunidade da DMT1 e, em modelos animais, a administração de GAD65 foi capaz de prevenir a destruição autoimune das células β pancreáticas. É uma abordagem segura, uma vez que não foram mencionados efeitos adversos e pode ser administrada por via subcutânea ou, de forma mais eficaz, nos gânglios linfáticos. O desvio da

imunidade de Th2 para Th1 pode ser o mecanismo responsável para o efeito clínico. No entanto, até ao momento, a sua eficácia foi insuficiente e futuros estudos são necessários para determinar em que subpopulações esta vacina poderá ser eficaz, utilizando-a em combinação com outras terapias e investigando outras possíveis formas de administração.[133]

Conclusão

Atualmente, o tratamento realizado na DMT1 com substituição exógena insulínica é relativamente eficaz na manutenção da normoglicemia e no controlo das complicações a longo prazo, sendo, contudo, condicionada pelo risco inerente das hipoglicemias. O aperfeiçoamento do controlo glicémico com as bombas de insulina acopladas a sensores de monitorização contínua da glicose em ansa fechada perfilam-se para melhorar a qualidade de vida dos doentes com diabetes tipo 1, evitando as temíveis hipoglicemias. No entanto, não podemos considerar tal abordagem a cura da diabetes, uma vez que implica um tratamento crónico associado a manipulação e monitorização por parte do doente.

O transplante total de pâncreas é a única opção de cura mundialmente aceite para a DMT1. Porém, o risco de morbilidade e mortalidade associado ao procedimento cirúrgico não são desprezíveis, sendo necessária uma alternativa com menor morbimortalidade. Nesse sentido, o transplante de ilhotas pode ser promissor, sobretudo se associado a técnicas de isolamento com micro ou nanocapsulas.

As células estaminais estão a emergir como a chave para substituição de células β . Estas possuem um grande potencial para se diferenciarem em células produtoras de insulina quando expostas aos fatores de transcrição adequados.

Apesar dos vários resultados animadores apresentados na última década relativamente à utilização das células estaminais, existe, ainda, um longo caminho a percorrer para se alcançar uma terapêutica celular segura para a DMT1. Os atuais e futuros estudos devem tentar superar os desafios major da terapia celular que estão relacionados com a segurança e a eficiência das células transplantadas.

Bibliografia

1. Roglic, G. and World Health Organization, *Global report on diabetes*. 2016, Geneva, Switzerland: World Health Organization. 86 pages.
2. Johannesson, B., et al., *Toward beta cell replacement for diabetes*. EMBO J, 2015. **34**(7): p. 841-55.
3. American Diabetes, A., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2009. **32 Suppl 1**: p. S62-7.
4. Vanikar, A.V., H.L. Trivedi, and U.G. Thakkar, *Stem cell therapy emerging as the key player in treating type 1 diabetes mellitus*. Cytotherapy, 2016. **18**(9): p. 1077-86.
5. Aghazadeh, Y. and M.C. Nostro, *Cell Therapy for Type 1 Diabetes: Current and Future Strategies*. Curr Diab Rep, 2017. **17**(6): p. 37.
6. Wojcik, M., et al., *Incidence of type 1 diabetes mellitus during 26 years of observation and prevalence of diabetic ketoacidosis in the later years*. Eur J Pediatr, 2015. **174**(10): p. 1319-24.
7. Roep, B.O., *The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure*. Diabetologia, 2003. **46**(3): p. 305-21.
8. Askenasy, E.M. and N. Askenasy, *Is autoimmune diabetes caused by aberrant immune activity or defective suppression of physiological self-reactivity?* Autoimmun Rev, 2013. **12**(5): p. 633-7.
9. Todd, J.A., *Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genome approaches*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(19): p. 8560-5.
10. Szablewski, L., *Role of immune system in type 1 diabetes mellitus pathogenesis*. Int Immunopharmacol, 2014. **22**(1): p. 182-91.
11. Stene, L.C. and M. Rewers, *Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: the enterovirus link to type 1 diabetes: critical review of human studies*. Clin Exp Immunol, 2012. **168**(1): p. 12-23.
12. van Belle, T.L., K.T. Coppieters, and M.G. von Herrath, *Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies*. Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 79-118.
13. Chiang, J.L., et al., *Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association*. Diabetes Care, 2014. **37**(7): p. 2034-54.
14. Bjornstad, P., et al., *Insulin sensitivity and complications in type 1 diabetes: New insights*. World J Diabetes, 2015. **6**(1): p. 8-16.
15. Toschi, E. and H. Wolpert, *Utility of Continuous Glucose Monitoring in Type 1 and Type 2 Diabetes*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2016. **45**(4): p. 895-904.
16. Gough, S.C., *A review of human and analogue insulin trials*. Diabetes Res Clin Pract, 2007. **77**(1): p. 1-15.
17. Pedersen-Bjergaard, U., et al., *Effect of insulin analogues on risk of severe hypoglycaemia in patients with type 1 diabetes prone to recurrent severe hypoglycaemia (HypoAna trial): a prospective, randomised, open-label, blinded-endpoint crossover trial*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2014. **2**(7): p. 553-61.
18. Valla, V., *Therapeutics of diabetes mellitus: focus on insulin analogues and insulin pumps*. Exp Diabetes Res, 2010. **2010**: p. 178372.
19. Cryer, P.E., *The barrier of hypoglycemia in diabetes*. Diabetes, 2008. **57**(12): p. 3169-76.
20. Writing Group for the, D.E.R.G., et al., *Association between 7 years of intensive treatment of type 1 diabetes and long-term mortality*. JAMA, 2015. **313**(1): p. 45-53.
21. Cryer, P.E., *Mechanisms of hypoglycemia-associated autonomic failure in diabetes*. N Engl J Med, 2013. **369**(4): p. 362-72.

22. Dagogo-Jack, S.E., S. Craft, and P.E. Cryer, *Hypoglycemia-associated autonomic failure in insulin-dependent diabetes mellitus. Recent antecedent hypoglycemia reduces autonomic responses to, symptoms of, and defense against subsequent hypoglycemia.* J Clin Invest, 1993. **91**(3): p. 819-28.
23. Olsen, S.E., et al., *Hypoglycaemia symptoms and impaired awareness of hypoglycaemia in adults with Type 1 diabetes: the association with diabetes duration.* Diabet Med, 2014. **31**(10): p. 1210-7.
24. Jurdjevic, M. and C. Tillman, *E. C. Noble in June 1921, and his account of the discovery of insulin.* Bull Hist Med, 2004. **78**(4): p. 864-75.
25. Radermecker, R.P. and A.J. Scheen, *Continuous subcutaneous insulin infusion with short-acting insulin analogues or human regular insulin: efficacy, safety, quality of life, and cost-effectiveness.* Diabetes Metab Res Rev, 2004. **20**(3): p. 178-88.
26. McAdams, B.H. and A.A. Rizvi, *An Overview of Insulin Pumps and Glucose Sensors for the Generalist.* J Clin Med, 2016. **5**(1).
27. Schaepelynck Belicar, P., P. Vague, and V. Lassmann-Vague, *Reproducibility of plasma insulin kinetics during intraperitoneal insulin treatment by programmable pumps.* Diabetes Metab, 2003. **29**(4 Pt 1): p. 344-8.
28. Logtenberg, S.J., et al., *Improved glycemic control with intraperitoneal versus subcutaneous insulin in type 1 diabetes: a randomized controlled trial.* Diabetes Care, 2009. **32**(8): p. 1372-7.
29. American Diabetes, A., *Standards of medical care in diabetes--2014.* Diabetes Care, 2014. **37 Suppl 1**: p. S14-80.
30. Grunberger, G., et al., *Consensus Statement by the American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology insulin pump management task force.* Endocr Pract, 2014. **20**(5): p. 463-89.
31. Kaufman, F.R., et al., *A pilot study of the continuous glucose monitoring system: clinical decisions and glycemic control after its use in pediatric type 1 diabetic subjects.* Diabetes Care, 2001. **24**(12): p. 2030-4.
32. Pandit, K., *Continuous glucose monitoring.* Indian J Endocrinol Metab, 2012. **16**(Suppl 2): p. S263-6.
33. Danne, T., et al., *Prevention of hypoglycemia by using low glucose suspend function in sensor-augmented pump therapy.* Diabetes Technol Ther, 2011. **13**(11): p. 1129-34.
34. van Beers, C.A., et al., *Continuous glucose monitoring for patients with type 1 diabetes and impaired awareness of hypoglycaemia (IN CONTROL): a randomised, open-label, crossover trial.* Lancet Diabetes Endocrinol, 2016. **4**(11): p. 893-902.
35. Renard, E., et al., *Closed-loop insulin delivery using a subcutaneous glucose sensor and intraperitoneal insulin delivery: feasibility study testing a new model for the artificial pancreas.* Diabetes Care, 2010. **33**(1): p. 121-7.
36. Gremizzi, C., et al., *Impact of pancreas transplantation on type 1 diabetes-related complications.* Curr Opin Organ Transplant, 2010. **15**(1): p. 119-23.
37. Kaufman, D., *State of the art of solid organ pancreas transplantation.*, in *75th scientific sessions of American Diabetes Association.* 2015: June, Boston, MA.
38. Gruessner, R.W. and A.C. Gruessner, *The current state of pancreas transplantation.* Nat Rev Endocrinol, 2013. **9**(9): p. 555-62.
39. Penn, I., *Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression.* Drug Saf, 2000. **23**(2): p. 101-13.
40. Gruessner, R.W. and A.C. Gruessner, *Pancreas transplant alone: a procedure coming of age.* Diabetes Care, 2013. **36**(8): p. 2440-7.
41. Kandaswamy, R., Skeans, M., Gustafson, S., Carrico, R., Prentice, M., Israni, A. et al. (2016) *Pancreas.* Am J Transplant 16 47–68.

42. Gruessner, A.C., *2011 update on pancreas transplantation: comprehensive trend analysis of 25,000 cases followed up over the course of twenty-four years at the International Pancreas Transplant Registry (IPTR)*. Rev Diabet Stud, 2011. **8**(1): p. 6-16.
43. Heilman RI, M.M., Reddy KS. Immunosuppression in simultaneous pancreas-kidney transplantation: progress to date. Drugs 2010;70:793–804., <imunossupressão pancreas.pdf>.
44. Largiader, F., E. Kolb, and U. Binswanger, *A long-term functioning human pancreatic islet allotransplant*. Transplantation, 1980. **29**(1): p. 76-7.
45. Shapiro, A.M., et al., *Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen*. N Engl J Med, 2000. **343**(4): p. 230-8.
46. Vantyghem MC, Kerr-Conte J, Arnalsteen L, Sergent G, Defrance F, Gmyr V, Declerck N, Raverdy V, Vandewalle B, Pigny P, Noel C, Pattou F. Primary graft function, metabolic control, and graft survival after islet transplantation. Diabetes Care.
47. Bellin, M.D., et al., *Prolonged insulin independence after islet allotransplants in recipients with type 1 diabetes*. Am J Transplant, 2008. **8**(11): p. 2463-70.
48. Shapiro, A.M., *Islet transplantation in type 1 diabetes: ongoing challenges, refined procedures, and long-term outcome*. Rev Diabet Stud, 2012. **9**(4): p. 385-406.
49. Kawahara, T., et al., *Portal vein thrombosis is a potentially preventable complication in clinical islet transplantation*. Am J Transplant, 2011. **11**(12): p. 2700-7.
50. Gala-Lopez, B., et al., *Microbial contamination of clinical islet transplant preparations is associated with very low risk of infection*. Diabetes Technol Ther, 2013. **15**(4): p. 323-7.
51. Shapiro, A.M., M. Pokrywczynska, and C. Ricordi, *Clinical pancreatic islet transplantation*. Nat Rev Endocrinol, 2017. **13**(5): p. 268-277.
52. Rickels, M.R., et al., *HLA sensitization in islet transplantation*. Clin Transpl, 2006: p. 413-20.
53. Hatipoglu, B., *Islet Cell Transplantation and Alternative Therapies*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2016. **45**(4): p. 923-931.
54. Barkai, U., et al., *Enhanced oxygen supply improves islet viability in a new bioartificial pancreas*. Cell Transplant, 2013. **22**(8): p. 1463-76.
55. Wilson, J.T. and E.L. Chaikof, *Challenges and emerging technologies in the immunoisolation of cells and tissues*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(2): p. 124-45.
56. Desai, T.A., et al., *Nanoporous microsystems for islet cell replacement*. Adv Drug Deliv Rev, 2004. **56**(11): p. 1661-73.
57. Adiga SP, Jin C, Curtiss LA, Monteiro-Riviere NA, Narayan RJ. Nanoporous membranes for medical and biological applications. WIREs: Nanomed Nanobiotech. 2009; 1(5):568–581.
58. Williams, S.J., et al., *Reduction of diffusion barriers in isolated rat islets improves survival, but not insulin secretion or transplantation outcome*. Organogenesis, 2010. **6**(2): p. 115-24.
59. Tomei, A.A., et al., *Device design and materials optimization of conformal coating for islets of Langerhans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(29): p. 10514-9.
60. Mendelsohn, A.D., et al., *Patterning of mono- and multilayered pancreatic beta-cell clusters*. Langmuir, 2010. **26**(12): p. 9943-9.
61. Pedraza, E., et al., *Preventing hypoxia-induced cell death in beta cells and islets via hydrolytically activated, oxygen-generating biomaterials*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(11): p. 4245-50.
62. Pileggi, A., et al., *Reversal of diabetes by pancreatic islet transplantation into a subcutaneous, neovascularized device*. Transplantation, 2006. **81**(9): p. 1318-24.
63. Chen, T., et al., *Alginate encapsulant incorporating CXCL12 supports long-term allo- and xenoislet transplantation without systemic immune suppression*. Am J Transplant, 2015. **15**(3): p. 618-27.

64. Abrahante, J.E., et al., *Microbiological safety of porcine islets: comparison with source pig*. *Xenotransplantation*, 2011. **18**(2): p. 88-93.
65. Lechner, A., et al., *Redifferentiation of insulin-secreting cells after in vitro expansion of adult human pancreatic islet tissue*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **327**(2): p. 581-8.
66. Schulz, T.C., et al., *A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e37004.
67. Ekser, B., et al., *Clinical xenotransplantation: the next medical revolution?* *Lancet*, 2012. **379**(9816): p. 672-83.
68. Hering, B.J., et al., *Phase 3 Trial of Transplantation of Human Islets in Type 1 Diabetes Complicated by Severe Hypoglycemia*. *Diabetes Care*, 2016. **39**(7): p. 1230-40.
69. Barton, F.B., et al., *Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010*. *Diabetes Care*, 2012. **35**(7): p. 1436-45.
70. Bellin, M.D., et al., *Potent induction immunotherapy promotes long-term insulin independence after islet transplantation in type 1 diabetes*. *Am J Transplant*, 2012. **12**(6): p. 1576-83.
71. Jin, S.M. and K.W. Kim, *Is islet transplantation a realistic approach to curing diabetes?* *Korean J Intern Med*, 2017. **32**(1): p. 62-66.
72. Corritore, E., et al., *beta-cell replacement sources for type 1 diabetes: a focus on pancreatic ductal cells*. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2016. **7**(4): p. 182-99.
73. Chintinne, M., et al., *Contribution of postnatally formed small beta cell aggregates to functional beta cell mass in adult rat pancreas*. *Diabetologia*, 2010. **53**(11): p. 2380-8.
74. Nakamura, K., et al., *Pancreatic beta-cells are generated by neogenesis from non-beta-cells after birth*. *Biomed Res*, 2011. **32**(2): p. 167-74.
75. Bonner-Weir, S., et al., *Islet neogenesis: a possible pathway for beta-cell replenishment*. *Rev Diabet Stud*, 2012. **9**(4): p. 407-16.
76. Bonner-Weir, S., et al., *Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story*. *Diabetes*, 2010. **59**(10): p. 2340-8.
77. Pin, C.L., J.F. Ryan, and R. Mehmood, *Acinar cell reprogramming: a clinically important target in pancreatic disease*. *Epigenomics*, 2015. **7**(2): p. 267-81.
78. Bonfanti, P., et al., *Ex Vivo Expansion and Differentiation of Human and Mouse Fetal Pancreatic Progenitors Are Modulated by Epidermal Growth Factor*. *Stem Cells Dev*, 2015. **24**(15): p. 1766-78.
79. Lemper, M., et al., *Reprogramming of human pancreatic exocrine cells to beta-like cells*. *Cell Death Differ*, 2015. **22**(7): p. 1117-30.
80. Vetere, A., et al., *Targeting the pancreatic beta-cell to treat diabetes*. *Nat Rev Drug Discov*, 2014. **13**(4): p. 278-89.
81. Boerner, B.P., et al., *WS6 induces both alpha and beta cell proliferation without affecting differentiation or viability*. *Endocr J*, 2015. **62**(4): p. 379-86.
82. Russ, H.A., et al., *Insulin-producing cells generated from dedifferentiated human pancreatic beta cells expanded in vitro*. *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e25566.
83. Bar, Y., et al., *Redifferentiation of expanded human pancreatic beta-cell-derived cells by inhibition of the NOTCH pathway*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(21): p. 17269-80.
84. Kojima, H., et al., *Combined expression of pancreatic duodenal homeobox 1 and islet factor 1 induces immature enterocytes to produce insulin*. *Diabetes*, 2002. **51**(5): p. 1398-408.
85. Liang, J., et al., *Human fetal liver stromal cell co-culture enhances the differentiation of pancreatic progenitor cells into islet-like cell clusters*. *Stem Cell Rev*, 2014. **10**(2): p. 280-94.
86. Yang, L., et al., *In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(12): p. 8078-83.

87. Kim, H.I. and Y.H. Ahn, *Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the glucose-sensing apparatus of liver and beta-cells*. *Diabetes*, 2004. **53 Suppl 1**: p. S60-5.
88. Kaneto, H., et al., *Crucial role of PDX-1 in pancreas development, beta-cell differentiation, and induction of surrogate beta-cells*. *Curr Med Chem*, 2007. **14**(16): p. 1745-52.
89. Matsuoka, T.A., et al., *MafA regulates expression of genes important to islet beta-cell function*. *Mol Endocrinol*, 2007. **21**(11): p. 2764-74.
90. Stolovich-Rain, M., et al., *Weaning triggers a maturation step of pancreatic beta cells*. *Dev Cell*, 2015. **32**(5): p. 535-45.
91. Wang, A.Y., et al., *Adenovirus transduction is required for the correction of diabetes using Pdx-1 or Neurogenin-3 in the liver*. *Mol Ther*, 2007. **15**(2): p. 255-63.
92. Collombat, P., et al., *The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells*. *Cell*, 2009. **138**(3): p. 449-62.
93. Courtney, M., et al., *The inactivation of Arx in pancreatic alpha-cells triggers their neogenesis and conversion into functional beta-like cells*. *PLoS Genet*, 2013. **9**(10): p. e1003934.
94. Zhang, Y., et al., *PAX4 Gene Transfer Induces alpha-to-beta Cell Phenotypic Conversion and Confers Therapeutic Benefits for Diabetes Treatment*. *Mol Ther*, 2016. **24**(2): p. 251-60.
95. Napolitano, T., et al., *Pax4 acts as a key player in pancreas development and plasticity*. *Semin Cell Dev Biol*, 2015. **44**: p. 107-14.
96. Stock, P.G. and M.S. German, *A Path to Insulin Independence: "The End of the Beginning"*. *Cell Stem Cell*, 2016. **18**(4): p. 431-3.
97. Barcala Tabarozzi, A.E., et al., *Cell-based interventions to halt autoimmunity in type 1 diabetes mellitus*. *Clin Exp Immunol*, 2013. **171**(2): p. 135-46.
98. Fandrich, F. and H. Ungefroren, *Customized cell-based treatment options to combat autoimmunity and restore beta-cell function in type 1 diabetes mellitus: current protocols and future perspectives*. *Adv Exp Med Biol*, 2010. **654**: p. 641-65.
99. Fiorina, P., J. Voltarelli, and N. Zavazava, *Immunological applications of stem cells in type 1 diabetes*. *Endocr Rev*, 2011. **32**(6): p. 725-54.
100. Sims, E. and C. Evans-Molina, *Stem cells as a tool to improve outcomes of islet transplantation*. *J Transplant*, 2012. **2012**: p. 736491.
101. Murphy, S., et al., *Amnion epithelial cell isolation and characterization for clinical use*. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2010. **Chapter 1**: p. Unit 1E 6.
102. Lysy, P.A., G.C. Weir, and S. Bonner-Weir, *Concise review: pancreas regeneration: recent advances and perspectives*. *Stem Cells Transl Med*, 2012. **1**(2): p. 150-9.
103. Godfrey, K.J., et al., *Stem cell-based treatments for Type 1 diabetes mellitus: bone marrow, embryonic, hepatic, pancreatic and induced pluripotent stem cells*. *Diabet Med*, 2012. **29**(1): p. 14-23.
104. Okere, B., et al., *Cell therapies for pancreatic beta-cell replenishment*. *Ital J Pediatr*, 2016. **42**(1): p. 62.
105. D'Amour, K.A., et al., *Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm*. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**(12): p. 1534-41.
106. D'Amour, K.A., et al., *Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells*. *Nat Biotechnol*, 2006. **24**(11): p. 1392-401.
107. Kroon, E., et al., *Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2008. **26**(4): p. 443-52.
108. Van Hoof, D., K.A. D'Amour, and M.S. German, *Derivation of insulin-producing cells from human embryonic stem cells*. *Stem Cell Res*, 2009. **3**(2-3): p. 73-87.

109. Sui, L., et al., *Transplantation of human embryonic stem cell-derived pancreatic endoderm reveals a site-specific survival, growth, and differentiation*. *Cell Transplant*, 2013. **22**(5): p. 821-30.
110. Murry, C.E. and G. Keller, *Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development*. *Cell*, 2008. **132**(4): p. 661-80.
111. Kelly, O.G., et al., *Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells*. *Nat Biotechnol*, 2011. **29**(8): p. 750-6.
112. Tang, C., et al., *An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells*. *Nat Biotechnol*, 2011. **29**(9): p. 829-34.
113. Fishman, B., et al., *Targeting pancreatic progenitor cells in human embryonic stem cell differentiation for the identification of novel cell surface markers*. *Stem Cell Rev*, 2012. **8**(3): p. 792-802.
114. Lee, S.H., et al., *Human beta-cell precursors mature into functional insulin-producing cells in an immunoisolation device: implications for diabetes cell therapies*. *Transplantation*, 2009. **87**(7): p. 983-91.
115. Vegas, A.J., et al., *Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice*. *Nat Med*, 2016. **22**(3): p. 306-11.
116. Sheik Abdulazeez, S., *Diabetes treatment: A rapid review of the current and future scope of stem cell research*. *Saudi Pharm J*, 2015. **23**(4): p. 333-40.
117. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. *Cell*, 2007. **131**(5): p. 861-72.
118. Ovchinnikov, D.A., J. Sun, and E.J. Wolvetang, *Generation of Footprint-Free Induced Pluripotent Stem Cells from Human Fibroblasts Using Episomal Plasmid Vectors*. *Methods Mol Biol*, 2015. **1330**: p. 37-45.
119. Schlaeger, T.M., et al., *A comparison of non-integrating reprogramming methods*. *Nat Biotechnol*, 2015. **33**(1): p. 58-63.
120. Hrvatin, S., et al., *Differentiated human stem cells resemble fetal, not adult, beta cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(8): p. 3038-43.
121. Pagliuca, F.W., et al., *Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro*. *Cell*, 2014. **159**(2): p. 428-39.
122. Mooranian, A., et al., *Characterization of a novel bile acid-based delivery platform for microencapsulated pancreatic beta-cells*. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2016. **44**(1): p. 194-200.
123. Dominguez-Bendala, J., et al., *Concise Review: Mesenchymal Stem Cells for Diabetes*. *Stem Cells Translational Medicine*, 2011. **1**(1): p. 59-63.
124. Abdi, R., et al., *Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells: A Potential Therapeutic Strategy for Type 1 Diabetes*. *Diabetes*, 2008. **57**(7): p. 1759-1767.
125. Shin, J.Y., et al., *Transplantation of heterospheroids of islet cells and mesenchymal stem cells for effective angiogenesis and antiapoptosis*. *Tissue Eng Part A*, 2015. **21**(5-6): p. 1024-35.
126. English, K., *Mesenchymal stem cells to promote islet transplant survival*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2016. **21**(6): p. 568-573.
127. Rackham, C.L., et al., *Annexin A1 Is a Key Modulator of Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Improvements in Islet Function*. *Diabetes*, 2016. **65**(1): p. 129-39.
128. Lavoie, J.R., et al., *Brief Report: Elastin Microfibril Interface 1 and Integrin-Linked Protein Kinase Are Novel Markers of Islet Regenerative Function in Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells*. *Stem Cells*, 2016. **34**(8): p. 2249-55.
129. Alvarez, C.V., et al., *Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells*. *J Mol Endocrinol*, 2012. **49**(2): p. R89-111.
130. Bhandari, D.R., et al., *The simplest method for in vitro beta-cell production from human adult stem cells*. *Differentiation*, 2011. **82**(3): p. 144-52.

131. Okere, B., et al., *In vitro differentiation of human amniotic epithelial cells into insulin-producing 3D spheroids*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2015. **28**(3): p. 390-402.
132. Ludvigsson, J., *Adequate doses of autoantigen administered using the appropriate route may create tolerance and stop autoimmunity*. Diabetologia, 2009. **52**(1): p. 175-6.
133. Ludvigsson, J., *GAD65: a prospective vaccine for treating Type 1 diabetes?* Expert Opin Biol Ther, 2017.