

## **TRANSPLANTE DE ILHÉUS PANCREÁTICOS: PASSADO, PRESENTE E O FUTURO**

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar / Centro Hospitalar do Porto

*Sofia Patrícia Jardim Neves, 6ºano Mestrado Integrado na Medicina*

*Orientador: Dr. Jorge Soares*

*Junho 2009*

### **1. RESUMO**

A Diabetes Mellitus é um distúrbio metabólico que afecta mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo. A terapêutica convencional de sobrevivência para estes doentes tem como base a reposição de insulina exógena. Com a introdução do Protocolo de Edmonton em 2000, o transplante de ilhéus pancreáticos, tem sido considerado uma alternativa promissora e mais eficaz para o tratamento de casos seleccionados de DM tipo 1, com redução da morbilidade e consequente melhoria da qualidade de vida dos doentes. Desde a divulgação destes estudos, o transplante de ilhéus avançou consideravelmente, tendo sido realizados transplantes de ilhéus após transplante de rim, transplante de ilhéus usando dadores cadavéricos, de dador único e de dador vivo. Contudo, e na sequência da evolução dos resultados destes últimos anos, surgem perspectivas promissoras relativamente ao atingimento da insulino-independência mais sustentada nestes doentes, quer através do recurso a fármacos imunossuppressores mais eficazes e seguros, ao xenotransplante e o acesso a um número ilimitado de enxertos funcionais e competentes, à microencapsulação dos ilhéus ou mesmo à utilização de células pluripotenciais, clonagem ou às células estaminais.

### **2. PALAVRAS-CHAVE**

Isolamento de ilhéus pancreáticos; Transplante de ilhéus; Protocolo de Edmonton; Terapias celulares.

### **3. INTRODUÇÃO**

A Diabetes Mellitus (DM) é um distúrbio metabólico que afecta mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo, estimando-se cerca de 366 milhões de diabéticos em 2030 (*Wild et al., 2004*).

A DM tipo 1 constitui 5% a 10% dos casos de DM. A estrita dependência de insulina e o seu aparecimento precoce na vida dos doentes, acarreta-lhes potencialmente grande limitação da esperança e qualidade de vida. Esta doença representa um grande desafio terapêutico e o seu controlo depende de uma boa articulação entre todos os profissionais de saúde envolvidos e destes com o doente, que tem um papel eminentemente activo na gestão diária da sua doença. A terapêutica convencional de sobrevivência para estes doentes tem como base a reposição de insulina exógena que consiste em injeções múltiplas ou infusão contínua diária subcutânea de

insulina com o objectivo de melhorar os níveis glicémicos. Apesar da evolução na tecnologia da administração de insulina, o *Diabetes Control and Complications Trial (DCCT, 1993)* refere que este tipo de terapêutica não reproduz fielmente o padrão fisiológico de secreção do pâncreas, pelo que estes doentes se encontram expostos a um maior risco de desenvolver complicações agudas, como a hipoglicemia e/ou complicações crónicas, como nefro, retino e neuropatias, bem como o aparecimento precoce da doença macrovascular.

Entre as alternativas terapêuticas disponíveis à insulino-terapia exógena, apenas o transplante total ou segmentar de pâncreas e, mais recentemente, a transplantação de ilhéus pancreáticos possibilitam a reconstituição do padrão fisiológico de secreção de insulina. A partir do ano de 2000, com a introdução do Protocolo de Edmonton por *Shapiro et al.*, o transplante de ilhéus pancreáticos tem sido considerado uma alternativa promissora, mais eficaz para o tratamento de casos seleccionados de DM tipo 1, com redução da morbilidade e consequente melhoria da qualidade de vida dos doentes. A transplantação de ilhéus é um procedimento pouco invasivo e seguro que evita a anestesia geral e as complicações relacionadas com a função exócrina do pâncreas, uma vez que apenas a porção endócrina, que corresponde aproximadamente a 2% do pâncreas, é transplantada.

Desde a divulgação destes estudos, o transplante de ilhéus avançou consideravelmente, tendo sido realizados transplantes de ilhéus após transplante de rim, transplantes usando dadores cadavéricos, de dador único e de dador vivo. Até ao momento, os resultados a médio prazo não são completamente animadores relativamente à insulino-independência. No entanto, tem-se constatado, a longo prazo, uma percentagem importante de doentes que ficam com uma função pancreática residual, com necessidade de menos unidades de insulina relativamente à fase pré-transplante e maior estabilidade metabólica. Estes resultados têm estimulado a manutenção e desenvolvimento deste procedimento terapêutico.

Na sequência da evolução dos resultados destes últimos anos, surgem perspectivas promissoras relativamente ao atingimento da insulino-independência mais sustentada nestes doentes, quer através do recurso a fármacos imunossuppressores mais eficazes e seguros, ao xenotransplante, à microencapsulação dos ilhéus ou mesmo à utilização de células pluripotenciais, clonagem ou às células estaminais.

#### **4. HISTÓRIA DO TRANSPLANTE DE ILHÉUS PANCREÁTICOS**

A primeira referência a transplante segmentar de pâncreas foi em Dezembro de 1893, vinte e oito anos antes da descoberta da insulina. *Williams e Harsant*, em Bristol, no Reino Unido, transplantaram parte de um pâncreas de carneiro, por via subcutânea, num jovem de 15 anos com cetoacidose diabética e, apesar da subsequente melhoria do nível glicémico, o jovem que não estava imunossuprimido, morre três dias depois.

A grande evolução na terapêutica do DM tipo 1 foi em 1921, com a descoberta da insulina, por *Banting e Best*, em Toronto. A realização do primeiro transplante total de pâncreas, por *Kelly e Lillehei*, na Universidade do Minesota, em 1966, era o próximo passo. Contudo, os resultados foram catastróficos, com uma taxa de mortalidade de 60% e com menos de 3% de transplantes funcionais ao fim de um ano. A falência deste processo estaria relacionada com as altas doses de corticoterapia usadas no regime imunossupressor e com o risco elevado de infecções oportunistas. No entanto, os avanços da técnica cirúrgica, profilaxia anti-viral e monitorização pós-transplante, tiveram impacto na redução da morbilidade e mortalidade associadas ao procedimento.

Nas últimas décadas, houve um crescente interesse pelo transplante da parte endócrina do pâncreas. Em 1967, *Lacy et al.* propõem que os ilhéus fossem separados do tecido acinar, conseguindo distender o ducto pancreático com uma solução salina, seguido de digestão enzimática do pâncreas com colagenase. Este mesmo grupo, realiza o primeiro transplante de ilhéus em ratos em 1972. *Kemp et al.*, foram os primeiros a desenvolver o local intra-portal para implantação dos ilhéus, que actualmente permanece como sendo o mais favorável, e o único com sucesso clínico.

Até ao ano 2000, os resultados obtidos com transplante de ilhéus em humanos foram desencorajadores, altura em que é publicado um estudo realizado na Universidade de Alberta, Edmonton, por *Shapiro et al.*, no qual 7 dos doentes com DM tipo 1 com história de hipoglicemia severa e instabilidade metabólica, submetidos a transplante de ilhéus mantiveram-se insulino-independentes durante um ano após a transplantação, com uma diminuição significativa da amplitude média das excursões glicémicas e com correcção dos níveis de hemoglobina glicosilada (HbA1c). A proposta terapêutica resultante deste estudo ficou conhecida como Protocolo de Edmonton.

A pancreatectomia total é considerada o último recurso na terapêutica da pancreatite crónica. Contudo, o estudo de *Webb et al (2008)* demonstra que o transplante autólogo de ilhéus após pancreatectomia pode revogar o aparecimento da diabetes induzida pela cirurgia, preservando a capacidade do doente de secretar insulina. Em Leicester, 46 doentes foram submetidos a pancreatectomia total e transplante autólogo de ilhéus simultaneamente. Os doentes receberam uma média de 2246 IE/Kg de peso corporal. Doze doentes mantiveram-se insulino-independentes, em média, 16,9 meses durante os dez anos de seguimento e, cinco assim se mantiveram durante todo o tempo. Ao longo dos dez anos, registou-se um aumento das necessidades de insulina por Kg/dia e os níveis de HbA1c aumentaram significativamente. No entanto, todos os doentes apresentavam valores positivos de peptídeo C dez anos após o transplante “traduzindo” a funcionalidade do enxerto a longo termo.

## **5. PROTOCOLO DE EDMONTON**

Os 7 doentes transplantados pelo grupo de *Shapiro* receberam duas infusões independentes de ilhéus pancreáticos de dois ou mais pâncreas de dadores em morte cerebral. Um dos doentes, o mais obeso, por sua vez recebeu uma terceira infusão com ilhéus de dois dadores. A média do número total de ilhéus necessária para o transplante foi de  $11547 \pm 1604$  IE (equivalentes de ilhéus)/Kg de peso corporal. O volume médio infundido foi de  $3,5 \pm 1,3$  ml, sem alterações significativas na pressão portal. Os ilhéus eram transplantados imediatamente após o isolamento contribuindo para a preservação da qualidade dos mesmos. O seguimento foi durante um período médio de 11,9 meses, com um tempo médio de hospitalização entre dois a três dias.

Os resultados foram encorajadores, com redução das necessidades de insulina e os doentes submetidos ao transplante de ilhéus mantiveram-se insulino-independentes durante um ano após o transplante. Verificou-se a normalização da HbA1c e uma diminuição significativa da amplitude média das excursões glicémicas, com  $198 \pm 32$  mg/dl antes da transplantação para  $119 \pm 37$  mg/dl após a primeira infusão e  $51 \pm 30$  mg/dl após atingir a insulino-independência. No entanto, o doente que recebeu o menor número de ilhéus, precisou de receber entre 4 UI a 10 UI numa intercorrência aguda. Em todos os doentes, a concentração de peptídeo C era indetectável antes do transplante, e três a seis meses após o procedimento, todos apresentavam níveis plasmáticos doseáveis. Analisaram-se os anticorpos anti-insulina, anti-ilhéus e anti-GAD (*glutamic acid decarboxilase*) antes e depois do transplante, verificando-se que a concentração média dos anticorpos anti-insulina diminuiu de  $0,26 \pm 0,06$  UI para  $0,07 \pm 0,03$  UI e que os anticorpos anti-GAD eram indetectáveis, antes e depois do transplante. Um dos 4 doentes, em que se obteve o resultado dos anticorpos anti-ilhéus, apresentava positividade antes e depois do transplante. Não houve registo de episódios *de novo* de hipoglicemia, contribuindo para uma maior qualidade de vida. Este protocolo introduziu um novo esquema de fármacos imunossupressores (que não utiliza corticoesteróides - fármacos diabetogénicos), associado à infusão intra-hepática, geralmente realizada na veia porta por meio de punção percutânea trans-hepática, de um grande número de ilhéus. Estes últimos acabam impactando em pequenos capilares portais, com posterior neovascularização, passando a haver secreção hepática de insulina dependente da glicose.

Durante o seguimento não houve alterações nos testes de função hepática e não foram constatados casos de trombose portal, episódios de rejeição celular aguda e nenhum dos doentes faleceu. De acordo com a *American Diabetes Association*, os testes de tolerância à glicose oral realizados após insulino-independência, demonstraram que em nenhum dos casos havia critérios de DM. Todavia, o tempo de seguimento dos doentes foi insuficiente para avaliar as complicações secundárias da diabetes.

Cerca de nove meses após a divulgação do Protocolo de Edmonton, este grupo ampliou a sua amostra para 12 doentes com DM tipo 1, com um seguimento médio de dez meses, sendo

o mais longo vinte meses. Todos os doentes recuperaram a capacidade de secretar insulina, comprovada pelo aumento dos níveis de peptídeo C e houve redução da HbA1c. Dos 12 doentes, 5 apresentaram melhoria da tolerância à glicose e 3 mantiveram uma DM pós-transplante caracterizada por níveis estáveis de glicose, produção endógena de insulina persistente e ausência de episódios de hipoglicemia, prontamente controlada com anti-diabéticos orais ou baixa dose de insulina. Em 11 doentes a insulino-independência ocorreu após a infusão de 8000 EI/Kg de peso corporal. A maioria dos doentes apresentava, previamente ao transplante, algum envolvimento renal manifestado por proteinúria mas, apenas 2 doentes apresentavam níveis elevados de creatinina. Estes últimos, sofreram um novo aumento dos níveis de creatinina após o transplante e subsequente substituição do tacrolimus pelo micofenolato. Não foram registadas infecções ou doenças linfoproliferativas após o transplante. Nenhum doente faleceu e o sucesso na obtenção da glicemia em jejum normal foi de 80% um ano após o transplante e de 70% dois anos depois.

## **6. SELECÇÃO DE DADORES**

Os pâncreas são seleccionados prioritariamente para transplante segmentar ou total. Posteriormente poderão ser usados para transplante de ilhéus, uma vez que este procedimento ainda é visto como experimental.

Os parâmetros relacionados com a qualidade dos pâncreas doados tal como idade e IMC, são factores importantes para o sucesso do isolamento dos ilhéus. Os pâncreas de dadores obesos contribuem para uma maior produção de ilhéus do que os pâncreas de dadores magros. Em 2004, estudos desenvolvidos no Minnesota, registaram uma produção de ilhéus de 319129 EI em dadores com um IMC  $> 30 \text{ Kg/m}^2$  e, de 215753 EI em dadores com IMC  $< 30 \text{ Kg/m}^2$ . O primeiro grupo apresentou maior sucesso no isolamento de ilhéus, definido por uma produção de ilhéus superior 300000 EI por pâncreas, e uma pureza superior a 50% (*Matsumoto et al., 2007*).

A idade do dador também influencia a produção e a função dos ilhéus transplantados. *Matsumoto et al.*, compararam dois grupos, um de idade superior a 40 anos e outro com idade inferior ou igual a 40 anos, e verificou que a produção de ilhéus foi superior neste último grupo, quer após a digestão quer após a purificação. No entanto, constatou-se que os ilhéus de dadores mais jovens são mais difíceis de separar do tecido acinar mas a estimulação da secreção de insulina com glicose é significativamente maior. As modificações no método de purificação dos ilhéus de dadores jovens parecem poder recuperar os ilhéus aprisionados. Estes resultados sugerem que o uso de dadores jovens pode melhorar o transplante de dador único.

## **7. TRATAMENTO IMUNOSUPRESSOR**

A selecção dos fármacos imunossupressores ideais para o transplante de ilhéus tem sido um grande desafio, dada a necessidade de superar as barreiras auto-imunes e allo-imunes, bem como a toxicidade dos próprios fármacos sobre os ilhéus transplantados. Estratégias iniciais obtiveram resultados satisfatórios em transplante de órgãos sólidos, com 10% dos doentes a atingir insulino-independência sob um protocolo que combinava azatriopina, ciclosporina e corticoesteróides. O desenvolvimento do Protocolo de Edmonton transformou drasticamente os resultados clínicos no transplante de ilhéus com a introdução de um regime imunossupressor mais potente, sem recurso a corticóides, menos diabetogénico e para toda a vida. Este regime inclui o sirolimus, o tacrolimus em baixas doses e o daclizumab. Um maior conhecimento sobre fármacos imunossupressores menos tóxicos e sobre a biologia da diabetes levará ao desenvolvimento de estratégias adequadas que poderão controlar as reacções auto-imunes recorrentes e allo-imunes (Kenyo et al., 1998; Shapiro et al., 2000).

O sirolimus é administrado uma vez por dia, via oral, de modo a conseguir níveis séricos entre 12 ng/ml e 15 ng/ml nos primeiros três meses após o transplante e entre 7 ng/ml e 10 ng/ml após os três meses. O sirolimus é administrado numa dose baixa de 0,2 mg/Kg de peso corporal, seguida de uma dose de 0,1 mg/Kg/dia, com monitorização dos níveis do fármaco. Os seus efeitos laterais mais conhecidos incluem hipertensão, diarreia e dislipidemia. Outros problemas são artralguas, erupções cutâneas, acne, trombocitopenia, leucopenia e úlceras da mucosa oral. Em doses elevadas poderá surgir nefrotoxicidade e tremor.

O tacrolimus é administrado por via oral, com uma dose inicial de 1 mg duas vezes por dia, posteriormente ajustada de forma a manter uma concentração entre 3 ng/ml e 6 ng/ml, doze horas após o transplante. Os níveis quer de sirolimus quer de tacrolimus devem ser vigiados regularmente para o ajuste da dose pós-transplante. Os efeitos laterais *major* do tacrolimus incluem nefrotoxicidade, neurotoxicidade, intolerância à glicose e distúrbios gastrointestinais.

O daclizumab, um anticorpo monoclonal dos receptores da interleucina 2 das células T, é administrado via oral, na dose de 1 mg/Kg cada catorze dias, num total de cinco doses. Se o segundo transplante for realizado dez semanas após o primeiro, o curso de daclizumab deverá ser interrompido. Até a data, não foram registados efeitos secundários a este fármaco.

As doenças linfoproliferativas pós-transplante em receptores de órgãos sólidos e de medula óssea imunossuprimidos não foram observados em receptores de ilhéus pancreáticos. O risco é de 1% a 2% mas pode ser mais baixo ao usar ensaios de PCR (*polimerase chain reaction*) para identificar infecção por Espstein-Barr (EBV) e terapia anti-viral com ganciclovir (Shapiro et al., 2000).

## **8. RESULTADOS CLÍNICOS DE 2001 A 2003 – APÓS O PROTOCOLO DE EDMONTON**

Desde o primeiro estudo realizado em Edmonton, globalmente, um grande número de centros de transplante iniciaram e seguiram o seu protocolo imunossupressor com fármacos não diabetogénicos.

*Ryan et al.* publicaram, em 2002, um dos maiores estudos descrevendo os resultados clínicos da experiência de Edmonton. Os autores registaram 54 infusões de ilhéus em 30 doentes com DM tipo1 e revelaram os dados de seguimento de 17 doentes. Todos os doentes atingiram insulino-independência com uma HbA1c média de  $6,1 \pm 0,8\%$  após receberem, no mínimo, uma infusão de 9000 EI/Kg de peso corporal e 80% mantiveram-se insulino-independentes um ano após o transplante. Realizaram-se duas infusões de ilhéus, separadas por intervalo de um mês, de dois pâncreas distintos. Dos 17 doentes seguidos, 14 não voltaram a ter crises de hipoglicemia. As complicações mais frequentes associadas a este procedimento foram hemorragia no local da punção percutânea trans-hepática, com necessidade de transfusões e trombose parcial da veia porta, apesar da terapêutica anticoagulante. Outras complicações incluem elevações transitórias da função hepática, hipercolesterolemia, agravamento dos níveis de creatinina em doentes com patologia renal preexistente, agravamento da proteinúria e aumento da dose de anti-hipertensores. No entanto, não houve registo de infecções graves ou mortes.

Dados relevantes obtidos em transplantes autólogos de ilhéus sugerem que os ilhéus crescem funcionalmente a partir dos três meses após a infusão. Logo, e tal como o Protocolo de Edmonton, concluiu-se que o transplante de ilhéus é relativamente seguro e mais eficaz, eliminando as necessidades de insulina exógena e prevenindo crises de hipoglicemia recorrentes. Em Alberta, a sobrevivência inicial do enxerto foi de 80% usando ilhéus de mais que um dador, e foi comparada favoravelmente com o sucesso do transplante total do pâncreas e transplante autólogo de ilhéus pancreáticos. Se a sobrevivência a longo termo do aloenxerto poderá igualar a do enxerto autólogo é ainda desconhecido. No estudo de *Robertson et al.* (2003), num receptor de enxerto autólogo registaram-se valores normais de glicose em jejum e de HbA1c treze anos após o transplante, permanecendo insulino-independente dezasseis anos depois. Contudo, a segurança e a eficácia a longo prazo do transplante autólogo continua incerta. As principais preocupações são as consequências a longo prazo da elevada pressão portal após a infusão e o aumento da sensibilidade imunológica induzida nos receptores de ilhéus. No que diz respeito ao transplante de ilhéus alogénico, os seus receptores enfrentam o risco de DM recorrente e os efeitos laterais directos sobre as células beta dos fármacos imunossuppressores.

De forma atingir a insulino-independência usam-se ilhéus de mais que um dador. Logo, os receptores do transplante têm um risco elevado de desenvolver sensibilidade imunológica após o transplante. A detecção de anticorpos Human Leucocyte Antigen (HLA) pós-transplante

é preocupante e tem sido associada ao risco de rejeição aguda do enxerto. Estudou-se um total de 98 doentes, dos quais 31% desenvolveram anticorpos *de novo* específicos do dador (DAS) pós-transplante e 23% desenvolveram DSAs mesmo estando sob regime imunossupressor. Em média, 70% dos doentes que interromperam os fármacos imunossupressores devido à rejeição do enxerto, desenvolveram sensibilidade imunológica, tendo desenvolvido muitos anticorpos com um score de *panel reactive antibody* (PRA) superior a 50%. Estes achados são inquietantes e apontam para a possível sensibilização dos doentes aos aloantígenos, tornando-se um factor de risco de rejeição para os doentes que venham a necessitar de um novo transplante de ilhéus, pâncreas ou de rim no futuro (Campbell et al, 2007).

## **9. PROGRESSOS E DESAFIOS**

A tecnologia moderna envolvida no isolamento de ilhéus determina a procura de um pâncreas saudável de um dador em morte cerebral, apesar de já se ter demonstrado sucesso com o uso de dadores cadavéricos (Markmann et al., 2003). Durante a colheita do pâncreas, o ducto pancreático é distendido, seguido de infusão de colagenase que separa os ilhéus do tecido exócrino e ductal. O produto final é avaliado tendo em conta a sua pureza e viabilidade antes de ser transportado para o laboratório.

O isolamento dos ilhéus é um processo complicado. Desenvolvimentos no transporte do pâncreas têm sido bem sucedidos com a utilização do método de conservação de dupla camada, que consiste na adição de perfluorcarbono (PFC) oxigenado à solução Universidade Wiscosin (UW), usada em Edmonton. Com este método o enxerto é oxigenado directamente e a produção de ATP é contínua, contribuindo para a integridade celular. Verificou-se que quando o pâncreas é preservado apenas em PFC, a produção de ilhéus é superior quando comparada com o uso da solução UW. Gores e Sutherland questionaram a necessidade de purificação dos ilhéus, uma vez que aumentava o tempo do processo, causando a perda de 30% a 50% dos ilhéus e traumatizando os restantes. Estes autores defendem que o processo de purificação remove as células estaminais existentes no ducto pancreático, as quais poderiam ser capazes de produzir novos ilhéus após o transplante. No entanto, os pró-purificação defendem que este procedimento implica um volume tecidual inferior, o que torna menos provável o desenvolvimento de hipertensão portal (Gaber, 2001).

Outra questão que se coloca é se o fígado será o local ideal para a infusão dos ilhéus. Potenciais locais tais como o baço, cápsula renal, cérebro, cavidade peritoneal e omentum já foram considerados. O fígado é sem dúvida o local mais utilizado com base nos sucessos anteriores com o transplante autólogo de ilhéus. No transplante autólogo os ilhéus são infundidos no intra-operatório directamente na circulação portal venosa hepática, enquanto que no transplante de aloenxertos os ilhéus são infundidos por punção percutânea pela veia porta. As complicações associadas a este último procedimento incluem hemorragia, trombose venosa

portal e hipertensão portal, apesar do uso de anticoagulantes. Hoje há possibilidade de usar preparações de ilhéus não purificados em locais não hepáticos, eliminando o trauma e a perda de ilhéus durante o processo de purificação.

#### **10. TRANSPLANTE DE ILHÉUS PANCREÁTICOS APÓS TRANSPLANTE DE RIM**

A DM tipo 1 pode conduzir a várias complicações, nomeadamente a insuficiência renal crónica terminal com necessidade de transplante renal, e nestes casos deve-se ponderar a realização de um transplante simultâneo de pâncreas e rim. Os doentes previamente submetidos a transplante renal são bons candidatos a transplante de ilhéus, no sentido de se obter um melhor controlo da glicemia e prolongar a sobrevida do enxerto renal existente.

Em 2006, *Toso et al.* publicaram um estudo que avalia a eficácia e a segurança da utilização do Protocolo de Edmonton em receptores de ilhéus pancreáticos após transplante de rim. Foram transplantados 8 doentes com DM tipo 1, com peptídeo C negativo e enxerto renal funcionante, todos com complicações da diabetes. O tempo médio entre o transplante renal e a primeira infusão de ilhéus foi de  $9,8 \pm 7,3$  anos. Uma vez inscritos na lista de espera para transplante de ilhéus, reduz-se a corticoterapia e o transplante apenas é considerado em doentes a fazer  $\leq 5$  mg de prednisona. Após o transplante, os doentes iniciaram um regime imunossupressor com sirolimus, tacrolimus e daclizumab. Obteve-se insulino-independência em todos os doentes, dos quais 5 assim se mantiveram durante 11 a 34 meses após o transplante, com valores de HbA1c normais. Relativamente à função renal, verificou-se que se manteve estável, excepto num doente, o qual já apresentava níveis de *clearance* da creatinina  $<50$  ml/min antes do transplante.

Os efeitos secundários registados foram atribuídos aos efeitos laterais dos fármacos imunossupressores, complicações infecciosas, hematológicas, entre outras, como úlceras da mucosa oral, edema periférico, diarreia, erupções cutâneas e poliartrite. Deste modo, estes autores concluíram que apenas os doentes com função estável do enxerto renal eram candidatos a esse tratamento. No entanto, a razão risco/benefício ainda não é clara, sendo necessário a realização de mais estudos, utilizando um maior número de doentes.

#### **11. TRANSPLANTE DE ILHÉUS DE DADORES CADAVERÍCOS**

O recurso ao uso do pâncreas de dadores cadavéricos, e não apenas de dadores em morte cerebral, é uma das possibilidades para ultrapassar a escassez de pâncreas para o isolamento de ilhéus.

No Japão, os dadores de pâncreas limitam-se a dadores vivos e a dadores cadavéricos, sendo ilegal o uso de pâncreas de dadores em morte cerebral. Assim sendo, foram feitas modificações ao método de isolamento de Ricordi, usado no Protocolo de Edmonton,

melhorando o isolamento de ilhéus de doadores cadavéricos. Este procedimento é actualmente conhecido como método de isolamento de ilhéus de Kyoto.

O método de Kyoto consiste na colheita do pâncreas do cadáver mediante a (técnica) de arrefecimento rápido, reduzindo assim o tempo de isquemia a quente. Imediatamente após a colheita, faz-se infusão da solução ET-Kyoto (*extracellular-type trehalose containing Kyoto solution*) no ducto pancreático e adiciona-se um inibidor da tripsina, o ulinastatin. Em seguida, o pâncreas é colocado numa solução conservante pelo método de dupla camada modificado - solução ET-Kyoto/PFC oxigenado - para o transporte até ao laboratório. Posteriormente, dá-se a digestão pancreática com colagenase, contendo o ulinastatin. Na purificação, usa-se o iodixanol em vez do Ficoll usado em Edmonton, devido ao seu baixo nível de endotoxina e baixa viscosidade.

O primeiro transplante de ilhéus em humanos usando doadores cadavéricos realizou-se no Japão, em 2004. *Nagata et al.* isolaram os ilhéus, seguindo-se o transplante de 4 doentes que cumpriam os critérios do Protocolo de Edmonton em mais de 80%. Em todos os casos, houve redução das necessidades de insulina de  $0,6 \pm 0,1$  U/Kg/dia para  $0,3 \pm 0,1$  U/Kg/dia e normalização dos valores da HbA1c, de  $8,0 \pm 0,4\%$  para  $5,1 \pm 0,2\%$ .

Estudos compararam a produção e a viabilidade entre ilhéus de doadores cadavéricos e de doadores em morte cerebral, demonstrando que a produção de ilhéus de doadores cadavéricos foi 12,6% superior à de doadores em morte cerebral, com viabilidade comparável.

## **12. TRANSPLANTE DE ILHÉUS DE DADOR ÚNICO**

Na Universidade do Minnesota demonstrou-se que se podem usar ilhéus de dador único cadavérico para obter insulino-independência mas com algumas precauções, nomeadamente a exclusão de doadores com idade superior a 50 anos (ilhéus menos funcionais), uso de iodixanol durante a purificação, cultura de ilhéus durante dois dias, iniciar um tratamento imunossupressor e anti-inflamatório antes do transplante e, minimizar a exposição a inibidores da calcineurina (*Hering et al., 2005*). A utilização de dador único pode ser vantajosa se o doente já estiver sob terapêutica imunossupressora e anti-inflamatória durante o período de cultura dos ilhéus, reduzindo os riscos e os custos associados ao procedimento e aumentando a viabilidade do transplante. Os 8 doentes submetidos ao transplante de ilhéus de dador único tornaram-se insulino-independentes, dos quais 5 durante mais de um ano. Houve rejeição aguda do enxerto em 3 doentes, provavelmente devido à exposição subterapêutica dos imunossupressores.

## **13. TRANSPLANTE DE ILHÉUS DE DADOR VIVO**

O transplante de ilhéus de dador vivo permite iniciar um regime imunossupressor antes do transplante, um controlo glicémico mais eficaz e, contrariamente ao que acontece com doadores cadavéricos e em morte cerebral, o pâncreas de doadores vivos não sofre acção das

citocinas. Deste modo, previamente estima-se a qualidade dos ilhéus avaliando a sua capacidade de secretar insulina. O dador é submetido a pancreatectomia distal, com posterior isolamento de ilhéus a partir da cauda do pâncreas, em média 408114 IE, e infusão dos mesmos no receptor (Matsumoto *et al.*, 2006). Registaram-se complicações em 3% a 5% dos dadores vivos, entre estas, fístula pancreática, hemorragia e pancreatite. Um outro factor de risco inerente é o possível desenvolvimento de DM no dador, que pode acontecer quando mais de 50% do pâncreas é removido. Este risco pode ser reduzido se o dador não for obeso, se tiver anticorpos anti-ilhéus negativos e PTGO normal.

O primeiro transplante de ilhéus de dador vivo realizou-se em Kyoto, em 2005, num doente com DM instável, com episódios de hipoglicemias severas não reconhecidas e a fazer insulino-terapia intensiva. O dador, neste caso a mãe, não tinha história familiar de DM, antes do transplante apresentava uma PTGO normal, HbA1c de 5% e a TAC abdominal mostrava um pâncreas com conformação normal. O receptor iniciou sirolimus e tacrolimus uma semana antes do transplante, com o objectivo de atingir as concentrações sanguíneas adequadas de imunossupressão no momento da infusão. O receptor ficou insulino-independente 22 dias após o transplante e manteve-se por um período superior a 3 meses, sem qualquer registo de crises de hipoglicemias e normalização da HbA1c (Matsumoto *et al.*, 2005).

#### **14. CÉLULAS ESTAMINAIS COMO FONTE DE CÉLULAS BETA**

O uso de células humanas como terapia da DM tipo 1 depende da capacidade destas células expandirem *in vitro* a limitada quantidade de tecido pancreático disponível. A expansão *in vitro* de células beta primárias, ou seja, provenientes do tecido pancreático normal e sem manipulação genética, assim como de linhagens celulares obtidas a partir da célula beta, representa um dos maiores desafios ao sucesso do transplante celular para DM. Isto deve-se à relação inversa entre a proliferação e a diferenciação da célula beta. As células estaminais, assim como os precursores da célula beta, e as células provenientes de linhagens celulares possuem elevada capacidade de proliferação, ao contrário das células beta adultas que raramente apresentam divisão celular. A utilização de células humanas de origem não pancreática é uma opção mas, apesar de oferecer flexibilidade quanto à escolha do tipo de célula a ser empregue, enfrenta o desafio de ter que reproduzir o complexo aparato celular para a secreção de insulina própria da célula beta. A reposição celular como terapêutica do DM tipo 1 depende, portanto, da existência de uma fonte de células beta diferenciadas e funcionais com a capacidade de se proliferar indefinidamente. Basicamente, dois tipos de células estaminais estão sob investigação: células estaminais provenientes de tecidos embrionários, de carácter pluripotente e indiferenciadas, capazes de gerar células dos três folhetos embrionários e células estaminais adultas, estas últimas células progenitoras pluripotentes.

As **células embrionárias** têm grande potencial na terapia de reposição celular/órgão devido às suas propriedades intrínsecas. Em teoria, as células embrionárias podem ser cultivadas e diferenciadas formando diferentes linhagens celulares, inclusive de células beta pancreáticas. As células embrionárias proliferam indefinidamente *in vitro* quando no seu estado indiferenciado, produzindo um número elevado de células necessárias para o transplante. A primeira linhagem de células estaminais embrionárias humanas foi desenvolvida em 1998 pelo pesquisador americano James Thomson. Estas células mantinham-se indiferenciadas em cultura na presença de factores tróficos (auto-renovação) e formavam teratomas quando injectadas sob a pele de animais imunodeficientes, demonstrando a sua pluripotencialidade. As primeiras tentativas na diferenciação de células estaminais embrionárias em células que expressam insulina foram realizadas em ratos. Estas células são mais fáceis de aceder que as células estaminais embrionárias humanas e, não estão sujeitas a critérios éticos e legais (Lumelsky *et al.*, 2001). Estudos iniciais verificaram que as células estaminais embrionárias humanas diferenciavam-se espontaneamente em células que expressam insulina, embora a uma baixa frequência e com apenas 1% a 3% das células a produzir insulina.

Os estudos desenvolvidos nos últimos anos, apontam para a necessidade de recriar, em meio de cultura, o mesmo ambiente que no embrião. D'Amour *et al.*, em 2005, defendiam que as células estaminais devem, em primeiro lugar, ser induzidas a formar a endoderme definitiva (ou que expressa *sox17*), num meio de cultura rico em activina (membro da família do *transforming growth factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ ) e soro bovino fetal, seguido da sua diferenciação em endoderme pancreática (ou que expressa PDX1) e finalmente capaz de secretar insulina, em resposta aos aumentos de concentração de glicose. Um protocolo detalhado sobre como obter populações puras e funcionais de células secretoras de insulina a partir de células estaminais embrionárias ainda não foi propriamente estabelecido. O progresso nesta área tem sido rápido e, em diferentes graus, todos os protocolos têm contribuído para o avanço na busca de um protocolo definitivo.

Paralelamente ao estudo das células embrionárias, uma nova classe de células estaminais foi emergindo, visando seu uso clínico e terapêutico, as células estaminais adultas. As **células estaminais adultas** são células indiferenciadas presentes num tecido diferenciado e com capacidade de originar células do tecido de origem, garantindo a sua manutenção. Estas células auto-renovam-se durante toda a vida do organismo e já foram identificadas, além da medula óssea, na córnea, no pâncreas, no cérebro e no coração (Reynolds e Weiss, 1992; Watt, 1998; Fuchs e Segre, 2000;). Actualmente, a grande controvérsia sobre o uso de células estaminais adultas em terapias celulares baseia-se na capacidade de transdiferenciação (plasticidade) destas células em células especializadas do órgão que se pretende regenerar. A partir de 1998 diversos trabalhos sugeriram que as células estaminais adultas, principalmente as

derivadas da medula óssea, teriam capacidade de transdiferenciação em qualquer tipo celular de um organismo adulto quando colocadas num (micro) ambiente adequado. A hipótese da transdiferenciação foi amplamente difundida, até que trabalhos pioneiros em regeneração hepática, em 2002, demonstraram que o que parecia ser transdiferenciação de uma célula hematopoiética era na verdade, resultado de um processo de fusão desta célula com um hepatócito. A partir de então assistimos a um extenso número de publicações demonstrando, principalmente através de técnicas moleculares, que não ocorre transdiferenciação *in vivo*. Embora nestas publicações o mecanismo de transdiferenciação fosse contestado, nos poucos trabalhos em que se realizaram simultaneamente testes funcionais, houve uma recuperação parcial da função dos órgãos afectados após terapia com células estaminais adultas.

As **células estaminais da medula óssea** são as células mais estudadas e hoje, são utilizadas clinicamente com o objectivo de eliminar o sistema imunitário defeituoso e substituí-lo por um novo que funcione correctamente. A medula óssea possui duas populações de células estaminais que co-existem de maneira funcionalmente interdependente: as células estaminais hematopoiéticas, também encontradas no cordão umbilical e as células estaminais do mesênquima da medula óssea que vêm sendo utilizadas em diversas terapias celulares. Novos estudos sugerem que no lugar do processo de transdiferenciação, as células da medula óssea possam reverter *in vivo* a diabetes ao prolongar a regeneração e a sobrevivência das células beta endógenas (Hasewaga, et al., 2003; Urban, et al., 2008). Em 2007, Sun et al. isolaram células estaminais hematopoiéticas do cordão umbilical e verificaram *in vitro* a sua diferenciação em células que expressam insulina. Contudo, não existem registos sobre a sua capacidade em secretar insulina. Actualmente, as células do mesênquima são uma das alternativas mais promissoras para a regeneração e reparo de tecidos, devido seu potencial de diferenciação, propriedades imunomodulatórias e capacidade de acomodação ao tecido alvo. Os mecanismos de acção envolvidos no recrutamento destas células pelos tecidos e como atravessam o endotélio ainda não estão completamente esclarecidos. Pensa-se que cimocinas e seus receptores possam participar neste processo, uma vez que controlam a migração celular (Sordi, 2009).

Durante o desenvolvimento embrionário, as **células estaminais neurais** migram em direcção à endoderme derivada do pâncreas e, a interacção entre as células estaminais neurais e as células progenitoras de células beta é crucial para a mútua diferenciação. Na DM, a perda de células beta e/ou função anormal das células beta é acompanhada de degeneração dos nervos periféricos, contribuindo para a progressão da doença. Em 2009, Kozlova e Jansson, verificam que os ilhéus pancreáticos de adultos promovem a diferenciação de células estaminais neurais num fenótipo neural *in vitro* e *in vivo* após transplante, aumentando a sua capacidade de migrar para o pâncreas e possível interacção com as células beta.

O **fígado** compartilha a origem endodérmica com o pâncreas. Hoje sabe-se que as células hepáticas podem ser manipuladas e induzidas a co-expressar insulina e glucagon. Para além disso, é um órgão de acesso fácil para biópsia e com capacidade regenerativa, tornando-se uma opção atraente para transplante autólogo de células derivadas do fígado no tratamento da DM tipo 1 (Li WC, *et al.*, 2005). Uma variante do herpes vírus tem sido utilizada como vector para o gene da insulina humano. Esta variante tem sido usada em tratamentos locais para glioblastoma e injectado no cérebro. Até a data, não houve evidências de doença sistémica entre os seis doentes tratados, após cinco anos de seguimento (Rampling *et al.*, 2000). Calne *et al.*, desenvolveram novas pesquisas e estão empenhados em determinar qual o tipo celular ou qual o tecido mais apropriado para se submeter a uma infecção viral e em descobrir qual seria o melhor método, trabalhar *in vitro* com células autólogas, que seriam posteriormente devolvidas ao receptor ou, deverá o vírus ser injectado directamente no receptor.

Os **monócitos**, quando em meios de culturas específicos, diferenciam-se em diferentes tipos celulares. A reprogramação de monócitos circulantes no sangue, na presença de citocinas (interleucina-3, IL-3 e *macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) e subsequente exposição a factores de crescimento (*epidermal growth factor*, EGF e *hepatocyte growth factor*, HGF) e nicotinamida permitiram obter células que expressam insulina. Em teoria, se um número suficiente de células produtoras de insulina pudesse ser obtido do sangue do doente por plasmaférese, o retorno destas células autólogas cultivadas, agora produzindo insulina, não deverá ser capaz de provocar uma reacção auto-imune. No entanto, os animais transplantados mantiveram níveis normais de glicose durante oito dias, altura em que os xenoenxertos de monócitos humanos foram rejeitados, uma vez que não estavam sob regime imunossupressor (Ruhnke *et al.*, 2005).

De um modo geral, todos estes procedimentos parecem ser muito promissores, mas o mecanismo envolvido no processo de transdiferenciação ainda é a questão-chave para melhorar os protocolos existentes em acção.

## **15. XENOTRANSPLANTE**

O uso de ilhéus pancreáticos de outras espécies tem sido uma maneira de obter grandes quantidades de tecido funcional necessárias para o transplante. A grande vantagem do uso de suínos está no elevado número de ilhéus funcionantes disponíveis, contrabalançando com os riscos de rejeição aguda e com o risco de infecções (zoonoses) após o transplante. Até a data, os resultados do xenotransplante em suínos tem sido desencorajador. No entanto, recentemente Bernard Hering apresentou excelentes resultados em transplante de ilhéus de porco para macacos durante mais de setenta dias, usando fármacos imunossupressores que são utilizados em humanos (Wijkstrom *et al.* 2003). Novos avanços estão a cargo da engenharia genética tornando mais semelhante os tecidos dos suínos com os dos humanos ou desenvolvendo

características que os tornem mais aceitáveis como enxertos para o receptor. Alguns factores impediram o uso alargado de ilhéus de suínos, nomeadamente a resposta imunológica exagerada contra xenoenxertos por parte do hospedeiro. As inúmeras tentativas em “esconder” os xenoenxertos transplantados do hospedeiro em micro-cápsulas falharam em manter a viabilidade, pelo que se recorreu mais tarde a transplante de ilhéus. Surge ainda o risco do hospedeiro desenvolver uma infecção por retrovírus porcino endógeno (PERV), isto é, as sequências retrovirais endógenas no DNA do porco podem ser activadas por xenotransplante (Laan, et al., 2000).

Até recentemente, estes dados tornavam improvável o xenotransplante como terapêutica do DM tipo1, mas novos estudos trouxeram este tema de volta à investigação. A Diabetes Research and Wellness Foundation investiu no Spring Point Project, cuja missão é analisar e avaliar a grande disponibilidade de ilhéus necessária para a cura da diabetes, apoiando-se no desenvolvimento de fontes primárias para o xenotransplante de ilhéus. Outros estudos revelaram que o risco de zoonoses associados ao xenotransplante no hospedeiro foi sobre-estimado, uma vez que não se detectou qualquer transmissão do vírus em estudos *in vitro* ou *in vivo*, provavelmente devido ao uso de protocolos de imunossupressão usados em transplantes humanos, reduzindo o número de anticorpos xenorreactivos.

O interesse renovado no xenotransplante de ilhéus de suínos tem gerado controvérsia em vários estudos clínicos humanos. O potencial clínico e comercial de ilhéus de suíno como fonte de material de transplante para a cura da DM tipo1 é crescente, e estudos mais rigorosos e cuidadosamente controlados irão determinar se os ilhéus de suíno são um substituto funcional realista para ilhéus humanos.

## **16. MICROENCAPSULAÇÃO DE CÉLULAS BETA**

Uma das alternativas propostas na investigação e na prevenção das consequências da diabetes é a microencapsulação de células beta, com o objectivo final de promover o seu transplante. O transplante deste tipo de células ainda não é aplicado em grande escala devido à necessidade de uso crónico de imunossuppressores para evitar a rejeição. Contudo, este problema pode ser ultrapassado através do imunoisolamento das células secretoras de proteínas ou hormonas numa membrana semi-permeável, que as protege das células citotóxicas do sistema imune do hospedeiro. Este imunoisolamento por encapsulação permite que o transplante ocorra com sucesso na ausência de imunossupressão, como também permite que se recorra a xenotransplantes, sendo uma alternativa ao fornecimento limitado de tecidos dadores humanos.

Uma microencapsulação com sucesso exige um elevado número de células viáveis, controlo da função das células, através da matriz extra-celular por exemplo, e manutenção da sua função a longo termo. A cavidade peritoneal é o local habitualmente seleccionado para alojar as células encapsuladas, embora não disponha do grau de vascularização requerido. Este

método permite a ligação das cápsulas ao sistema circulatório, funcionando praticamente como um novo órgão. Os vasos sanguíneos ligados às cápsulas transportam nutrientes para o interior destas, libertando-as de resíduos e transportando insulina. O aporte insuficiente de nutrientes e oxigénio às células e a barreira física criada pelas micropartículas onde as células estão encapsuladas, pode interferir não apenas com uma óptima nutrição do transplante imunoisolado mas também com a funcionalidade dos transplantes. Alguns dos argumentos mais convincentes para a encapsulação são a ausência de protocolos imunomodulatórios ou fármacos imunossupressores e a libertação, a longo prazo, de agentes terapêuticos, quer localmente quer de modo sistémico.

Para além das limitações tecnológicas e biológicas, questões de índole ética, política e de regulamentação colocam-se. Para o sucesso consistente desta prática clínica precisa-se de uma fonte funcional de células, uma membrana biocompatível mecânica e quimicamente estável, com um valor de *cut-off* que ofereça imunoprotecção do implante, *performance* funcional, biosegurança e viabilidade do transplante a longo prazo. A tecnologia de microencapsulação de células tem um enorme potencial clínico para o tratamento de várias doenças, inclusive a diabetes. A breve análise dos obstáculos, conjuntamente com a crescente colaboração internacional, deverá impulsionar esta tecnologia para um caminho meticuloso e controlado, contribuindo para uma maior proximidade da realidade clínica.

## **17. CLONAGEM TERAPÊUTICA**

A clonagem terapêutica tem como objectivo principal o desenvolvimento de uma linhagem celular humana. A ideia da clonagem terapêutica é criar células ou tecidos geneticamente semelhantes ou iguais aos doentes, evitando a imunossupressão. Em 2005, uma equipa de cientistas da Coreia do Sul criou uma linhagem de células estaminais embrionárias a partir de uma célula, resultante da transferência, por electrofusão, de um núcleo de uma célula somática para um ovócito humano não fecundado e anucleado do mesmo dador. Esta equipa criou, por transferência nuclear, uma célula estaminal embrionária e estimulou a sua divisão mitótica *in vitro* até atingir o estado de blastocisto. A interrupção do desenvolvimento do embrião na fase de blastocisto origina uma linhagem de células embrionárias com o mesmo património genético do dador do núcleo, contornando a rejeição imunológica e o uso de fármacos imunossupressores potentes. Em seguida, as células estaminais pluripotentes existentes no blastócito são retiradas e reproduzem-se, durante várias gerações, conservando as características genéticas. Na prática, é preciso reconhecer que encontramos ainda muito longe da aplicabilidade terapêutica. O grupo coreano recolheu e submeteu 242 ovócitos a transferência nuclear. Recolheram-se 30 embriões em fase de blastocisto mas apenas uma linhagem de células apresentava condições para ser cultivada e, posteriormente diferenciadas

em células específicas do tecido pancreático, do tecido cardíaco ou nervoso (*Hwang Woo-suk et al, 2005*).

Os avanços na biotecnologia e na investigação de células estaminais tiveram um impacto enorme na medicina regenerativa e no tratamento de defeitos genéticos, apesar de todas as limitações científicas, legais e éticas. Em termos legais, a Convenção de Oviedo formulada em 1997 pelo Conselho Europeu, declara no Artigo 13 que “uma intervenção que tenha como objectivo modificar o genoma humano não pode ser levada em efeito, a não ser por razões preventivas, de diagnóstico ou terapêuticas e, somente se não tiver por finalidade introduzir uma modificação no genoma da descendência” e, estipula no Artigo 18 que “a criação de embriões humanos com fins de investigação, é proibida”. Um dos grandes obstáculos à viabilidade da clonagem terapêutica é a disponibilidade limitada de ovócitos para uso em investigação. A Human Fertility and Embyo Authority, em Inglaterra, permite a doação de dois ovócitos por cada pesquisa científica, num total de doze ovócitos colhidos, sendo os demais usados na inseminação *in vitro* (*Hall et al, 2006*). A rejeição imunológica das células estaminais embrionárias derivadas da transferência nuclear é causada, essencialmente, pela heteroplasma do DNA mitocondrial. A heteroplasma mitocondrial é também uma das causas de inviabilidade das células embrionárias derivadas da transferência nuclear devido à disrupção da interacção mitocondria-núcleo resultante da incompatibilidade inter-espécies e consequente apoptose celular (*Lanza, 2002*). A reprogramação epigenética do genoma ocorre com as células germinais primordiais, durante a fertilização e durante a transferência nuclear. Detectou-se uma maior expressão genética aberrante em embriões submetidos a transferência nuclear, comparado com embriões produzidos por inseminação *in vitro* e *in vivo* (*Jouneau, 2003; Hall, 2005*).

Concluindo, a produção de células estaminais específicas do doente é, cada vez mais, uma realidade. No entanto, mais investigação sobre a diferenciação das células estaminais embrionárias humanas e os efeitos que a expressão genética aberrante acarreta, bem como avanços nas metodologias do transplante celular e cultura de células embrionárias são necessários.

## **18. CONCLUSÃO**

O sonho do transplante de ilhéus pancreáticos, que data de 1972, em doentes com DM tipo 1, a normoglicemia e diminuição da necessidade de injecções exógenas de insulina está ainda em fase de desenvolvimento. Muitos problemas devem ser resolvidos antes do transplante de ilhéus ser considerado uma opção da terapêutica convencional. Pontos práticos, tal como a grande perda de ilhéus durante o isolamento e purificação, as complicações clínicas associadas à localização hepática do implante, os efeitos laterais aos fármacos imunossupressores e o fornecimento insuficiente de ilhéus, requerem resolução. Ironicamente, os fármacos usados mais frequentemente têm sido associados a efeitos laterais directos sobre as células beta. Vários

estudos, inclusive o Protocolo de Edmonton, relatam um melhor valor de glicemia quando comparado com a insulino-terapia intensiva e, até mesmo quando os doentes não chegam a ficar insulino-independentes. A funcionalidade persistente dos ilhéus corrige a labilidade da glicemia, prevenindo crises de hipoglicemia e melhoria dos níveis de HbA1c. Contudo, este valor é ainda inferior ao valor de glicemia alcançado com o transplante total de pâncreas.

O acesso a um número ilimitado de enxertos funcionais e competentes permitiria ao transplante de ilhéus evoluir de um tratamento restrito e limitado para um tratamento com maior aplicabilidade mundialmente, tal como aconteceu com o transplante de outros órgãos no passado. Os problemas associados à imunogenicidade do enxerto e à destruição auto-imune do enxerto é comum a todas as fontes de células beta. Individualmente, todas as fontes de células beta têm vantagens e desvantagens, sendo o balanço entre elas o que irá determinar a sua utilidade clínica. A grande vantagem do xenotransplante com ilhéus de suínos está no elevado número de ilhéus primários funcionantes disponíveis, contrabalançando com os riscos de rejeição imune aguda e com o receio de infecção por retrovírus porcino endógeno (PERV) do receptor após o transplante. O potencial clínico e comercial de ilhéus de suínos como fonte de material de transplante para a cura da DM tipo1 é crescente, e estudos mais rigorosos e cuidadosamente controlados irão determinar se o xenotransplante poderá ser um substituto funcional realista para ilhéus humanos. O conceito de transplante autólogo de células secretoras de insulina derivadas das células estaminais do doente, particularmente células estaminais da medula óssea ou fígado é bastante atraente. No entanto, a restrita capacidade proliferativa, os baixos níveis de expressão de insulina e a pobre, ou não existente, secreção de insulina são problemas ainda a ter em conta. As células estaminais embrionárias têm a capacidade proliferativa necessária e, estudos recentes demonstraram a capacidade de diferenciação das células estaminais humanas em células que secretam insulina, sem recorrer a modificações genéticas inaceitáveis. Neste momento, resta ainda apurar se os protocolos experimentais devem sofrer modificações que permitam a criação de um número suficiente de células a usar no transplante e, se novos métodos de purificação devem ser concebidos para um maior sucesso do transplante, excluindo o potencial teratogénico das células embrionárias humanas. A ideia da clonagem terapêutica é cada vez mais presente e tem como objectivo criar células ou tecidos geneticamente semelhantes ou iguais aos doentes, evitando a imunossupressão. Na prática, é preciso reconhecer que encontramos-nos ainda muito longe da aplicabilidade terapêutica e, por isso, é necessário mais investigação sobre a diferenciação das células estaminais embrionárias, os efeitos que a expressão genética aberrante acarreta, uma maior disponibilidade de ovócitos para pesquisa, bem como avanços nas metodologias do transplante celular e cultura de células embrionárias.

Desde há quase cem anos que o tratamento da DM tipo 1 se baseia na reposição de insulina exógena que consiste em injeções múltiplas ou infusão contínua diária subcutânea de insulina com o objectivo de melhorar os níveis glicémicos. Com o desenvolvimento de terapias celulares e através da clonagem terapêutica é possível, na próxima década, que estes diferentes métodos sejam aplicados globalmente em grande escala como cura da DM tipo 1.

## **19. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Amiel SA, Rela M (2005) Live organ-donation for islets transplantation. *Lancet* 365: 1603-1604. 50: 2464-71.
2. Bosi E, Braghi S, Maffi P et al. (2001) Autoantibodyresponse to islet transplantation in type 1 diabetes. *Diabetes*
3. Bromberg JS, Kaplan B, Halloran PF, Robertson RP (2007) The islet transplant experiment: time for a reassessment. *Am J Transplant* 7: 2217-2218.
4. Calne R, et al. (2005) Cell transplantation for diabetes. *Phil Trans R Soc B* 360: 1769-1774.
5. Campbell PM, Senior PA, Salaman A, LaBranche K, Bigam DL, Kneteman NM, Imes S, Halpin A, Ryan ES, Shapiro AMJ (2007) High risk of sensitization after failed islet transplant *Am J Transplant* 7: 2311-2317.
6. Colman A (2004) Making new beta cells from stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 15: 337-345.
7. D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazar S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE (2005) Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 23: 1534-1541.
8. DCCT. Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 977-986.
9. Denner J, et al. (2008) No transmission of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in along-term pig to rat xenotransplantation model and no infection of immunosuppressed rats. *Ann Transplant* 13: 20-31.
10. Edmond A, Ryan, Jonathan R.T. Lakey, Ray V. Rajotte, Gregory S. Korbutt, Tatsuya Kin, Sharleen Imes, Alex Rabinovitch, John F. Elliott, David Bigam, Norman M. Kneteman, Garth L. Warnock, Ingrid Larsen, Shapiro A.M (2001) Clinical Outcomes and Insulin Secretion After Islet Transplantation With the Edmonton Protocol. *Diabetes* 50: 710-719.
11. Elliot RB, et al. (2007) Live encapsuled porcine islets from a type 1 diabetic patient 9,5 years after xenotransplantation. *Xenotransplantation* 14: 157-161.
12. Fuchs E, Segre J.A (2000) Stem cells: a new lease on life. *Cell* 100: 143-155.
13. Gaglia JL, Shapiro AM, Weir GC (2005) Islet transplantation: progress and challenge. *Arch Med Res* 36:273-80.
14. Gores PF, Sutherland DE (1993) Pancreatic islet transplantation: is purification necessary? *Am J Surg* 166: 538-42.
15. Goto T, Tanioka Y, Sakai T, Terai S, Kamoda Y, Li S, Tanaka T, Tsujimura T, Matsumoto I, Fujino Y, et al. (2007) Application of two-layer method on pancreas digestion results in improved islet yield and maintained viability of isolated islets. *Transplantation* 83: 754-758.
16. Hall VJ, Stojkovic P, Stojkovic M. (2006) Using therapeutic cloning to fight human disease: a conundrum or reality?; *Stem Cells* 24:1628-37.
17. Hasewaga Y et al (2007) Bone marrow transplantation promotes beta cell regeneration after acute injury through bone marrow cell mobilization. *Endocrinology* 2007; 148: 2006-2015.
18. Hwang WS, Roh SI, Lee BC, et al. (2005) Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts; *Science* 308: 1777-83.

19. Hering BJ, Kandaswamy R, Ansite JD, Eckman PM, Nakano M, Sawada T, Matsumoto I, Ihm SH, Xhang HJ, Parkey J, et al. (2005) Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *JAMA* 293: 830-835.
20. Hering BJ, et al. (2006) Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed non-human primates. *Nat Med* 12: 301-303.
21. Jaeger C, Brendel MD, Hering BJ, Eckhard M, Bretzel RG (1997) Progressive islet graft failure occurs allografts. *Diabetes* 46: 1907-10.  
significantly earlier in autoantibody-positive than in autoantibody-negative IDDM recipients of intrahepatic islet
22. Jones PM, Courtney ML, Burns CJ, Persaud SJ (2008) Cell-based treatments for diabetes. *Drug Discovery Today* 13: 19-20.
23. Jouneau A, Renard JP (2003) Reprogramming in nuclear transfer; *Curr Opin Genet Dev* 13:486-491.
24. Karnieli O, et al. (2007) Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells* 25: 2837-2844.
25. Kelly WD, Lilehei RC, Merckel FK, Idezuki Y, Goetz FC (1967) Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery* 61: 827-837.
26. Kojima H et al. (2003) Neuro D-betacellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med* 9: 596-603.
27. Kuroda Y, Kkawura T, Suzuki Y, Fujiwara H, Yamamoto K, Saitoh Y (1988) A new simple method for cold storage of the pancreas using perfluorchemical. *Transplantation* 46: 457-60.
28. Lacy PE, Kostianovsky M (1967) Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16: 35-39.
29. Lann LJ, et al. (2000) Infection by endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 407: 90-94.
30. Lanza RP, Chung HY, Yoo JJ et al. (2002) Generation of histocompatible tissues using nuclear transplantation. *Nat Biotechnol* 20:689-696.
31. Li WC, et al. (2005) In vitro transdifferentiation of hepatoma cells into functional pancreatic islets. *Mech Dev* 122: 835-847.
32. Lumelsky N, et al. (2001) Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292: 1389-1394.
33. Matsumoto S, Qualley SA, Goel S, Hagman DK, Sweet IR, Poitout V, Robertson RP, Reems JA (2002) Effect of the two-layer (University of Wisconsin solution-perfluorchemical plus O<sub>2</sub>) method of pancreas preservation on human islet isolation, as assessed by the Edmonton Isolation Protocol. *Transplantation* 74: 1414-1219.
34. Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, Yonekawa Y, Yamada Y, Fukuda K, Tsukiyama K, Suzuki H, Kawasaki Y, Shimodaira M, Matsuoka K, Shibata T, Kasai Y, Maekawa T, Shapiro J, Tanaka K (2005) Insulin independence after living-donor distal pancreatectomy and islet allotransplantation. *Lancet* 365:1642-4.
35. Matsumoto S, Yamada Y, Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, Yonekawa Y, Nakai Y, Ishii A, et al.(2005) Simple evaluation of engraftment by secretory unit of islets transplant objects for living-donor fresh or cultured islet transplantation. *Transplant Proc* 37: 3435-3437.
36. Matsumoto S, Noguchi H, Yonekawa Y, Okitsu T, Iwanaga Y, Liu X, NAGATA H, Kobayashi N, Ricordi C (2006) Pancreatic islet transplantation for treating diabetes. *Expert Opin Biol Ther* 6: 23-37.
37. Nagata H, Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, Yonekawa Y, Kinukawa T, Shimizu T, et al. (2006) Procurement of the human pancreas for pancreatic islet transplantation from marginal cadaver donors. *Transplantation* 82: 327-331.
38. Nanji SA, Shapiro AM. (2004) Islet transplantation in patients with diabetes mellitus: choice of immunosuppression. *BioDrugs* 18:315-28.

39. Okitsu T, Matsumoto S, Iwanaga Y, Noguchi H, Yonekawa Y, Tanaka K (2005) Kyoto islets isolation method: the optimized one for non-heart-beating (NHBDs); *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 12: 227-230.
40. Reynolds B, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707-1710.
41. Robertson RP, Kendall D (2003) Islet transplantation: questions about the future. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 10: 128-132.
42. Robertson RP, Lanz KJ, Sutherland DE (2001) 13 years by autoislet transplantation for chronic pancreatitis. *Diabetes* 50: 47-50.
43. Ruhnke M et al. (2005) Reprogramming of human peripheral blood monocytes into functional hepatocytes and pancreatic islets-like cells (neo-islets) in streptozotocin diabetic mice. *Gastroenterology*
44. Ruhnke M et al. (2005) Normalization of blood glucose by human monocyte-derived pancreatic islets-like cells (neo-islets) in streptozotocin diabetic mice. *Transplantation*
45. Ryan EA, Lakey JR, Paty BW, et al. (2002) Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes* 51: 2148-2157.
46. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM (2005) Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54: 2060-9.
47. Sun B, et al. (2005) Induction of human umbilical cord blood-derived stem cells with embryonic stem cells phenotypes into insulin producing-islets structure. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 919-923.
48. Shapiro AM, Nanji SA, Lakey JR (2003) Clinical islet transplant: current and future directions towards tolerance. *Immunol Rev* 196: 219-236.
49. Shapiro AM, Lakey JR, Paty BW, Senior PA, Bigam DL, Ryan EA (2005) Strategic opportunities in clinical islet transplantation. *Transplantation* 79:1304-7.
50. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, Secchi A, Brendel MD, Berney T, Brennan DC, Cagliero E, Alejandro R, Ryan EA, DiMercurio B, Morel P, Polonsky KS, Reems JA, Bretzel RG, Bertuzzi F, Froud T, Kandaswamy R, Sutherland DE, Eisenbarth G, Segal M, Preiksaitis J, Korbitt GS, Barton FB, Viviano L, Seyfert-Margolis V, Bluestone J, Lakey JR (2006) International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 28:1318-30.
51. Sordi V et al. (2009) Mesenchymal stem cell homing capacity. *Transplantation* 87:42-5.
52. Stranier D et al. (2006) No stem cell is an islet (yet). *New Engl J Med* 354: 521-523.
53. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. (1998) Embryonic stem cells lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-1147.
54. Toso C, Baertschiger R, Morel P, Bosco D, Armanet M, Wojtuszczyk A, Badet L, Philippe J, Becker CD, Hadaya K, et al. (2006) Sequential kidney/islet transplantation: efficacy and safety assessment of a steroid-free immunosuppression protocol. *Am J Transplant* 6: 1049-1058.
55. Truco et al (2007) The pig as the donor of pancreatic islets for men. *Vet Res Commun* 31: 27-30.
56. Urban BS, et al. (2008) Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells* 26: 244-253.
57. Watt FM (1998) Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 353: 831-837.
58. Weissman, I.L.(2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units of evolution. *Cell* 100: 157-168.
59. Yatoh S, et al. (2007) NeuroD and reaggregation induce beta-cell specific gene expression in cultured hepatocytes. *Diabetes Metab Res Rev* 48: 1763-1772.

