



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

ANTÓNIO DE MIRANDA LEMOS CRUZ DONATO

***O transplante de ilhéus pancreáticos na terapêutica da
diabetes mellitus tipo 1: o estado da arte e perspetivas de
futuro***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE ENDOCRINOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

DRA. MARIA MARGARIDA SANTOS ANTUNES CATARINO BASTOS FERREIRA

JULHO DE 2016

ARTIGO DE REVISÃO

TÍTULO: O transplante de ilhéus pancreáticos na terapêutica da diabetes *mellitus* tipo 1: o estado da arte e perspetivas de futuro

AUTOR: António de Miranda Lemos Cruz Donato* (1)

ORIENTADORA: Maria Margarida Santos Antunes Catarino Bastos Ferreira
(1,2)

AFILIAÇÃO:

(1) Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

(2) Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Centro Hospitalar e
Universitário de Coimbra, Portugal

ENDEREÇO DE CORREIO ELECTRÓNICO:

* antoniocd@live.com.pt

ÍNDICE

Resumo.....	5
Abstract	7
1 - Introdução	9
2 - Materiais e Métodos.....	10
3 - A Evolução Histórica do Transplante de Ilhéus	10
3.1 - Desde dos primórdios até ao Protocolo de <i>Edmonton</i>	10
3.2 - O Protocolo de <i>Edmonton</i>	11
3.3 - Desde o Protocolo de <i>Edmonton</i> até aos dias de hoje	13
4 - A terapêutica atual da DM 1: os seus sucessos e os seus insucessos.....	13
5 - Indicações e circunstâncias para realizar o transplante de ilhéus	16
6 - O Procedimento	18
6.1 - Avaliação Pré-transplante do Doente	18
6.2 - Obtenção dos Ilhéus e Preparação da Infusão de Ilhéus	19
6.3 - Métodos de contagem dos Ilhéus	20
6.4 - Infusão dos Ilhéus.....	20
6.5 - Outras Complicações.....	23
6.6 - Avaliação logo após o Transplante	24
7 - Regimes Imunossupressores	24
8 - Complicações tardias e efeitos secundários do transplante de ilhéus	26
9 - Monitorização do enxerto intra-hepático	27
10 - Os resultados do alotransplante de ilhéus	28
10.1 - Onde é realizado o transplante e, há algum registo internacional dos resultados?	28
10.2 - O número de transplantes nos últimos 15 anos	29
10.3 - Quem tem recebido o transplante?	30
10.4 - O que define o sucesso do transplante de ilhéus?	31
10.5 - Resultados obtidos em insulinoindpendência.....	31
10.6 - Prevenção da hipoglicemia.....	34
10.7 - Efeitos sobre as complicações crónicas	35
11 - Comparação entre o transplante de ilhéus e a terapêutica médica.....	35
12 - Comparação entre o Alotransplante de Ilhéus e o Alotransplante de Órgão	37
13 - Problemas e Soluções	38
13.1 - Estratégias farmacológicas para melhorar a sobrevivência do enxerto.....	39
13.1.1 - Estratégias anti-inflamatórias	39
13.1.2 - Estratégia anti-apoptose.....	41

13.2 - Bioencapsulação.....	42
13.3 - Locais Alternativos de Implantação.....	47
13.4 - A escassez de órgãos e dadores e soluções inovadoras para este problema	52
13.4.1 - Fontes atuais de ilhéus e as suas limitações	52
13.4.2 - Estratégias alternativas: a xenotransplantação	53
13.4.3 - Estratégias alternativas: a medicina regenerativa e a engenharia celular	55
14 - O papel das células estaminais mesenquimatosas	57
15 - Conclusões	58
16 - Lista de Abreviaturas	62
17 - Agradecimentos	63
18 - Referências bibliográficas.....	64

TÍTULO: O transplante de ilhéus pancreáticos na terapêutica da diabetes *mellitus* tipo 1: o estado da arte e perspectivas de futuro.

RESUMO

No mundo existem 49,8 milhões de pessoas que sofrem de diabetes *mellitus* tipo 1. Esta patologia é tratada com recurso à insulino-terapia exógena intensiva, que obriga a uma grande adesão do doente e tem riscos como a hipoglicemia. O alotransplante de ilhéus pancreáticos, por via percutânea trans-hepática, representa uma hipótese de cura funcional da diabetes, ou seja, de uma vida com controlo glicémico sem recurso à insulina exógena. Neste artigo fazemos uma revisão do estado atual e das perspectivas de futuro desta terapêutica, analisando as propostas de resolução dos entraves que ainda se colocam ao transplante e a sua translação para a prática clínica. O alotransplante de ilhéus é uma alternativa experimental nos doentes com episódios frequentes de hipoglicemia grave, especialmente se associada a ausência de sintomas de alarme, mau controlo glicémico, progressão rápida das complicações crónicas, apesar de terapêutica médica adequada, podendo ser realizado oportunisticamente associado ao transplante de rim por permitir cobrir num só regime imunossupressor os dois enxertos. Desde o protocolo de *Edmonton* que os resultados se vêm aproximando dos obtidos com o transplante de órgão. O transplante deve ser avaliado pela duração da insulino-independência, pela prevenção da hipoglicemia e pelo controlo glicémico que proporciona. Num estudo prospetivo recente, a taxa de insulino-independência aos 5 anos foi de 60% e, noutro estudo demonstrou-se maior benefício na retinopatia, comparativamente com a insulino-terapia. O transplante é muito eficaz na redução do risco de hipoglicemia grave, embora com menor custo-eficácia do que a insulino-terapia. Contudo, só é possível com imunossupressão crónica, estando ainda por comprovar a vantagem no balanço entre eficácia e segurança desta troca em ensaio clínico randomizado. A bioencapsulação permite o imunoisolamento dos ilhéus e dispensa assim o uso de imunossupressores, o que tornará o alotransplante numa terapêutica

muito mais atrativa São particularmente promissoras as nanocápsulas e as cápsulas conformacionais. Têm sido pesquisados locais alternativos de implantação, com especial atenção para o espaço subcutâneo e o intramuscular, de acesso fácil e com melhor função das células alfa. A sua limitação é a fraca neovascularização. Outro problema é a falta de disponibilidade de órgãos e dadores. Fontes alternativas de células beta são os xenoenxertos porcinos, para já impraticáveis, as células estaminais embrionárias humanas, as células estaminais pluripotentes induzidas, as células precursoras dos ductos pancreáticos ou a transdiferenciação das células exócrinas. Ultrapassadas estas dificuldades, o transplante de ilhéus poderá constituir a opção terapêutica de 1ª linha em muitos doentes.

Palavras-Chave:

Transplante de ilhéus pancreáticos

Terapêuticas de reposição das células beta

Diabetes mellitus tipo 1

Protocolo de Edmonton

Insulinoindpendência

Hipoglicemia

Imunossupressão

Bioencapsulação

Xenotransplantação

Células estaminais

TITLE: Pancreatic islet transplantation for the treatment of diabetes *mellitus* type 1: a review of the state of the art and perspectives on the future.

ABSTRACT

There are 49.8 million people worldwide who suffer from diabetes mellitus type 1. This disease is treated with exogenous intensive insulinotherapy, which requires a great patient compliance and has significant risks, such as hypoglycaemia. The percutaneous trans-hepatic allotransplantation of pancreatic islets constitutes a potential functional cure for diabetes, in other words, a life with glycaemic control without the need for exogenous insulin. In this article we review the state of the art and future perspectives of this therapy, analysing proposals for surpassing the obstacles that the transplant still faces and their translation from bench to bedside. The allotransplantation of islets is an experimental alternative in patients with frequent episodes of severe hypoglycaemia, especially if the patient is unaware of warning symptoms, poor glycaemic control or rapid progression of chronic complications, despite appropriate medical therapy. It can be opportunistically associated with kidney transplant, since a single immunosuppressant regime protects both grafts. In this post-Edmonton protocol era, results have become very close to those obtained with the whole organ transplant. The islet transplant should be evaluated for the duration of insulin independence, the prevention of hypoglycaemia and the glycaemic control that it provides. In a recent prospective study, the rate of insulin independence at 5 years was 60%. Another study showed improved outcomes in diabetic retinopathy with islet transplant when compared to medical therapy. Although the transplant reduces very effectively the risk of severe hypoglycaemia, it is less cost-effective than insulinotherapy. However, all this is only possible with chronic immunosuppression. It is still missing a randomized controlled trial that proves the clinical benefit of this trade-off. The encapsulation technology allows the islets immunoisolation and turning the immunosuppression unnecessary. This technology will make

the allotransplantation a more attractive therapy. The nanocapsules and the conformal coating capsules are particularly promising. Alternative sites for implantation of the graft have been investigated, particularly the subcutaneous and intramuscular spaces, which are easily accessible and allow better alpha cells function. The main limitation is the poorer neovascularization. Another problem is the lack of donor organs. Alternative sources of beta cells are the porcine xenografts, impractical for the time being, the human embryonic stem cells, the induced pluripotent stem cells, the pancreatic duct precursor cells and the transdifferentiation of the exocrine cells. After these difficulties have been overcome, the pancreatic islet transplantation might be adopted as the first line therapy in many patients with type 1 diabetes.

Keywords:

Islets of Langerhans Transplantation

Beta-cell replacement therapy

Diabetes *mellitus*, Type 1

Edmonton Protocol

Insulin independence

Hypoglycemia

Immunosuppression

Encapsulation

Heterologous Transplantation

Stem Cell Research

1 - INTRODUÇÃO

Segundo a Federação Internacional da Diabetes (1) e a Organização Mundial de Saúde (2), estima-se que existam entre 415 a 422 milhões de adultos, em todo o mundo, a sofrerem de diabetes *mellitus* (DM), dependendo dos limites etários considerados. Entre estes, 7 a 12%, portanto, até 49,8 milhões de pessoas (1), sofrem de diabetes *mellitus* tipo 1 (DM 1). E tem sido notado um aumento da incidência da DM 1 nas crianças (3,4,5). Em relação à realidade portuguesa, de acordo com os dados do Observatório Nacional da Diabetes (6), a prevalência da diabetes (tipo 1 e 2) em 2014 foi de 13,1%, na população entre os 20 e os 79 anos.

No tratamento da DM 1, a insulinoterapia exógena constitui um dos maiores progressos da Medicina dos últimos 100 anos. Contudo, esta não é uma terapêutica curativa. Na DM 1 há uma destruição das células beta dos ilhéus pancreáticos. Uma estratégia natural é tentar repor as células em falta no doente. Assim, temos as terapêuticas de reposição das células beta, que representam uma hipótese de cura funcional, altamente benéfica para o doente. Entre estas, existe o transplante de órgão sólido (TOS), em que o enxerto inclui as componentes exócrina e endócrina do pâncreas, e o transplante apenas dos seus ilhéus (TI), ou seja, o seu tecido endócrino, relevante para a regulação glicémica. Ao passo que o TOS parece ter atingido muito do seu potencial, o TI continua a ter algumas dificuldades em se afirmar (7), embora, apresente resultados progressivamente melhores (8). Para contornar estas dificuldades, tem-se investido na criação de soluções inovadoras, como a bioencapsulação ou o uso de células estaminais, que prometem revolucionar não só o tratamento da DM 1, como também muitas outras áreas da Medicina. Com este trabalho, pretende-se fazer uma revisão da evolução histórica, do estado atual e das perspectivas de futuro do transplante de ilhéus, que permita ao leitor, especialista ou não na área da diabetes, se atualizar sobre os principais tópicos desta temática. O artigo foca-se mais na perspectiva do clínico, no que se poderá translacionar da investigação pré-clínica para a investigação clínica e depois para a prática médica corrente.

No entanto, ao longo do trabalho, são fornecidas referências de artigos que focam mais os aspetos de biotecnologia e outros do domínio da investigação básica.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

Foi feita uma pesquisa na base de dados da *Medline (Pubmed)* com os termos *Medical Subject Headings* “*islets of langerhans transplantation*”, incluindo artigos dos últimos 5 anos, escritos nas línguas inglesa, portuguesa e espanhola, com o *Abstract* disponível. Sempre que relevante, foi feita uma pesquisa das referências citadas nos artigos, assim como de outros artigos que se julgou importantes para a melhor compreensão dos temas. Foram consultados alguns relatórios pertinentes, incluindo o do *Collaborative Islet Transplantation Registry* (9).

3 - A EVOLUÇÃO HISTÓRICA DO TRANSPLANTE DE ILHÉUS

3.1 - Desde dos primórdios até ao Protocolo de *Edmonton*

O transplante parcial do pâncreas não é uma ideia recente e até foi utilizado para comprovar a associação entre o pâncreas e a diabetes. Antes mesmo do isolamento e início da aplicação terapêutica da insulina por *Banting, Best, Macleod e Collip*, na década de 1920 (10), *Oscar Minkowsky* realizou um autotransplante pancreático. Este investigador, após realizar pancreatectomias totais em alguns cães, implantou segmentos destes pâncreas no espaço subcutâneo e, até estes serem retirados ou até degenerarem espontaneamente, não se observou hiperglicemia nos animais (11). Dois anos depois, *Watson-Williams e Harshant*, colocaram segmentos de pâncreas ovino na coxa de um rapaz com cetoacidose diabética. Depois de uma melhoria transitória da glicosúria, o enxerto acabou por falhar, provavelmente pela rejeição imunitária e pela pobre vascularização (12). No entanto, com a descoberta da insulina, a ideia do transplante caiu no esquecimento até à década de 1960. Em 1967, *Lacy e Kostianovsky*,

descreveram um método de isolar os ilhéus do restante tecido pancreático através do uso de colagenases (13). Recorrendo a esta nova técnica, *Lacy e Ballinger*, em 1972, transplantaram aloenxertos de ilhéus para a cavidade intraperitoneal de ratos com diabetes induzida por estreptozocina. O transplante de ilhéus permitiu reverter a diabetes (14). Este resultado gerou grande interesse por parte da comunidade científica. Entretanto, o transplante de ilhéus começou a ser testado também em humanos. Por exemplo, um estudo de 1980 reporta transplantes alogênicos de ilhéus em humanos com euglicemia mantida a 9 meses sem recurso a insulina exógena (15). O aparecimento de novos agentes imunossuppressores contribuiu para este sucesso. Vários grupos de investigadores experimentaram diferentes protocolos, com taxas de sucesso muito variáveis, desde 22 dias até 6 anos de insulinoindpendência após o transplante (16). Todavia, segundo o relatório do *International Islet Transplant Registry* de 1999 (17), dos 267 pacientes alotransplantados entre 1990 e 1996, apenas 12,4% dos indivíduos mantiveram o enxerto funcional por mais do que uma semana, e ainda menos, apenas 8,2%, atingiram um ano com um enxerto funcional. Só um caso de enxerto de ilhéus conseguiu manter a sua funcionalidade até aos cinco anos. A maioria destes pacientes foram tratados com regimes imunossuppressores com glucocorticoides. Contudo, logo ao virar do milénio, surgiu um protocolo de transplantação verdadeiramente revolucionário.

3.2 - O Protocolo de *Edmonton*

Consiste no conjunto de procedimentos enunciados por *Shapiro et al.* (18) da Universidade de *Alberta*, situada na cidade de *Edmonton*, no Canadá, daí a sua denominação. Neste estudo, só foram feitos transplantes em indivíduos com DM 1 há mais de 5 anos e com mau controlo glicémico ou episódios frequentes de hipoglicemia. Uma importante diferença em relação a experiências anteriores foi a utilização de ilhéus de vários doadores, em geral, dois ou três, de modo obter uma quantidade significativa de ilhéus para um só doente transplantado. Em média, foram transplantados 11.547 (\pm 1604) equivalentes de ilhéus / Kg de massa corporal do indivíduo recetor, que foi a quantidade necessária para obter euglicemia sem recurso a

insulinoterapia exógena. O equivalente de ilhéus é a unidade padrão internacional para quantificar o volume de ilhéus isolados, no contexto clínico e no laboratorial. Um equivalente de ilhéus corresponde ao volume ocupado por um ilhéu totalmente esférico com um diâmetro de 150 μm (19). Outra importante inovação deste protocolo foi a redução do tempo de isquemia fria, que, em média, foi de 13,9 horas (\pm 9 horas). Esta redução foi possível porque os ilhéus foram transplantados logo a seguir a serem obtidos e preparados, sem necessidade de os manter em cultura. Foi efetuado o *cross-matching* de acordo com o tipo sanguíneo e com a pesquisa de anticorpos linfotóxicos, mas sem realizar o *matching* do sistema HLA (*Human Leucocyte Antigen*). A terceira inovação importante do protocolo de *Edmonton* foi o uso de regimes imunossuppressores isentos de glucocorticoides. Isto é particularmente importante, dado o efeito nefasto, bem conhecido, dos glucocorticoides sobre a glicemia. Utilizou-se um regime com sirolimus, tacrolimus em baixa dose e daclizumab.

Nos casos que exigiram insulinoterapia, após o primeiro enxerto, um novo transplante de ilhéus foi realizado. Cerca de 12 meses após o transplante, todos os pacientes estavam com bom controlo glicémico sem recurso a insulina exógena. Deve ser sublinhado que, seis dos sete doentes necessitaram de uma segunda infusão de ilhéus, até 70 dias após o primeiro transplante. Em relação aos episódios de hipoglicemia grave, que eram frequentes antes da transplantação, deixaram de ocorrer após este tratamento, atingindo-se um dos principais objetivos. No que concerne ao peptídeo C, este estava indoseável antes do transplante. Três meses depois deste, o peptídeo-C passou a estar doseável, de forma estatisticamente significativa ($P < 0,001$).

Em resumo, as principais inovações trazidas pelo protocolo de *Edmonton* foram a utilização de múltiplos dadores para um só recetor para conseguir garantir uma quantidade significativa de ilhéus, a redução do tempo de isquemia fria e a dispensa do uso de glucocorticoides.

3.3 - Desde o Protocolo de *Edmonton* até aos dias de hoje

Este protocolo mudou o paradigma do TI e renovou o interesse neste campo. Os transplantes, daí em diante, seguiram muitas das premissas de *Edmonton*. Porém, foram sendo introduzidas modificações, como por exemplo, nos agentes imunossuppressores utilizados. Os trabalhos publicados até hoje têm vindo a demonstrar resultados funcionais do transplante de ilhéus cada vez melhores e mais próximos do TOS, sem acarretar o risco de uma cirurgia *major* (7). Como será depois discutido, a pesquisa recente tem incidido sobre a melhoria da imunossupressão, as localizações para transplante alternativas ao fígado, as tecnologias, como as técnicas de bioencapsulação, que permitam proteger o enxerto da resposta imunitária, e também sobre as fontes alternativas de células beta.

4 - A TERAPÊUTICA ATUAL DA DM 1: OS SEUS SUCESSOS E OS SEUS INSUCESSOS

O estudo *Diabetes Control and Complications Trial* (20), considerado um marco histórico, demonstrou que um regime de insulinoterapia intensiva consegue reduzir substancialmente o risco de desenvolvimento de complicações microvasculares e retardar o agravamento das mesmas, quando já instaladas. Depois, o estudo *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* (21), também demonstrou o benefício do regime intensivo na redução do risco cardiovascular na DM 1. Por conseguinte, a terapêutica padrão atual da DM 1 é a insulinoterapia exógena, em regime intensivo, com 3 ou mais injeções por dia, ou em sistema de perfusão subcutânea contínua (22). Todavia, esta não é eficaz na prevenção de complicações numa parte significativa dos pacientes e, o controlo glicémico é conseguido à custa de um risco duas a três vezes maior de hipoglicemia (20). Efetivamente, esta é o principal risco e fator limitante da insulinoterapia (22). De acordo com a definição da *American Diabetes Association* (ADA), a hipoglicemia grave corresponde a um episódio de

hipoglicemia do qual o doente só recupera com o auxílio de uma outra pessoa, traduzindo um estado de neuroglicopenia já bastante considerável (22). Estima-se que a incidência anual de hipoglicemia grave seja de 1,6 episódios / doente, concentrados em cerca de 30% dos pacientes (23,24). A hipoglicemia grave associa-se a maior mortalidade (22).

Uma medida muito importante para tratar a hipoglicemia é ensinar os pacientes a reconhecerem os sintomas de hipoglicemia e a tomarem medidas antes que a neuroglicopenia se torne demasiado grave e o doente fique incapaz de se tratar (25). Todavia, existe um número significativo de doentes que deixam de experimentar os sintomas de alarme típicos da hipoglicemia, ou seja, os doentes podem ter um nível patologicamente baixo de glicose no sangue, mas, não se apercebem dos seus efeitos. Isto pode ocorrer pela neuropatia autonómica clássica (26), ou seja, a degeneração do sistema nervoso autónomo, ou com a chamada hipoglicemia sem sinais de alarme associada à insuficiência autonómica (HSSAIA) ou *hypoglycemia unawareness* (22,25). Em doentes com DM 1 há mais de 5 anos, a resposta adrenérgica, responsável pelos sintomas de alarme, está frequentemente diminuída. Apesar de reversível, esta situação é de difícil controlo dado que o limiar glicémico de ativação da resposta adrenérgica diminui após um episódio de hipoglicemia. Bastam dois episódios de glicemia menor que 70 mg/dL para que a resposta contra-regulatória em episódio ulterior se diminua em 30%. Ou seja, os doentes com glicemias frequentemente baixas, como é comum com a insulino-terapia intensiva, desenvolvem um fenómeno adaptativo e só experimentam sintomas autonómicos com níveis perigosamente baixos de glicemia (25). A terapêutica de reposição das células beta permite restaurar a fisiologia normal do metabolismo da glicose e assim evitar a hipoglicemia, constituindo o transplante de ilhéus uma opção terapêutica para os diabéticos com HSSAIA. Outro efeito bem conhecido da insulino-terapia é o ganho ponderal.

Além destes riscos, é necessário que haja uma boa adesão do doente ao plano terapêutico, tornando o seu sucesso muito dependente do doente. Nem todos os doentes reúnem as condições para seguirem este tipo de controlo tão apertado. Também é essencial garantir a existência de profissionais de saúde preparados para a educação terapêutica dos pacientes (22). Por outro prisma, também é um tratamento oneroso que implica a compra de insulina, aplicadores e tiras-teste de glicemia para o resto da vida (1,6). Na tabela 1 resumem-se os principais problemas da atual terapêutica padrão da DM 1.

O sucesso depende muito da adesão do doente	Eficácia a prevenir as complicações crónicas
<ul style="list-style-type: none"> - Monitorização diária obrigatória, ou obrigação de uso de dispositivo automático - Administração diária de insulina obrigatória ou uso de dispositivos autónomos para esse efeito - Cuidados alimentares: se for seguido um regime intensivo funcional obriga a contagem de equivalentes de hidratos de carbono - Depende da capacidade do doente adaptar a administração de insulina às circunstâncias (por exemplo: exercício, refeição mais ou menos rica em hidratos de carbono) - Sendo o tratamento centrado no doente, a adesão à terapêutica necessária pode estar comprometida em crianças, idosos, doentes com défice cognitivo ou patologia psiquiátrica, e outros grupos especiais 	<ul style="list-style-type: none"> - Não previne o aparecimento de complicações crónicas num número importante de doentes
	Riscos / Efeitos secundários
	<ul style="list-style-type: none"> - Hipoglicemia - Ganho ponderal - Distrofia lipídica no local da injeção - Reações de hipersensibilidade, sobretudo locais
	Outros problemas
<ul style="list-style-type: none"> - Perda de qualidade de vida dos doentes - É uma doença crónica, com elevados custos socioeconómicos 	

Tabela 1: Problemas atuais da terapêutica padrão da DM 1.

5 - INDICAÇÕES E CIRCUNSTÂNCIAS PARA REALIZAR O TRANSPLANTE DE ILHÉUS

Dado que a DM 1 surge pela perda irreversível das células produtoras de insulina, que resulta numa insulinopenia absoluta, faz todo o sentido substituir estas células por outras, tal como se faz para outros tecidos e órgãos. O que se pretende com a reposição das células beta é uma cura funcional, e não a cura do fenómeno autoimune que leva à destruição das células.

A reposição de células beta pode ser feita pelo alotransplante de órgão sólido, ou pelo alotransplante de ilhéus. Estes dois tipos de transplante podem enquadrar-se em três situações diferentes: 1) transplante simultâneo com o transplante de rim; 2) transplante após o transplante de rim e 3) transplante isolado de todo o pâncreas ou só dos ilhéus (7). As duas primeiras são uma associação entre o transplante renal e o transplante de tecido pancreático. Estas são feitas com frequência nos doentes com DM 1 que apresentam doença renal crónica em estágio terminal e que necessitam de transplante renal. Esta associação é benéfica para o doente por duas razões. Por um lado, o doente vai ter de estar obrigatoriamente sob regime imunossupressor para proteger o enxerto renal e, assim, o enxerto pancreático fica protegido pela mesma terapêutica imunossupressora. Por outro lado, o pâncreas transplantado vai secretar insulina de forma fisiológica e assegurar a euglicemia e, deste modo, ter um efeito protetor sobre o enxerto renal (27). Um doente com DM 1 a que se tenha de realizar transplante de outro órgão, sem ser o renal, também poderá beneficiar do transplante de ilhéus, mas, a associação entre o transplante de rim e de ilhéus, pela elevada incidência de nefropatia na DM 1, é de facto a mais observada.

A terceira modalidade é o transplante isolado de tecido pancreático. Segundo as recomendações da ADA para o transplante de órgão inteiro (28), o transplante isolado deve ser equacionado em pacientes cuja insulinoterapia causa problemas emocionais ou problemas clínicos ao doente, ou em pacientes com história de complicações metabólicas agudas

(cetoacidose, hiperglicemia hiperosmolar e hipoglicemia) frequentes e graves, não preveníveis pela insulino-terapia. Estas indicações também são aplicáveis ao transplante de ilhéus (7). Ao fenótipo da DM 1, com níveis de glicemia muito instáveis, acompanhados de episódios frequentes de hipoglicemia e/ou cetoacidose e consequentes internamentos recorrentes, alguns autores dão o nome de diabetes lábil, ou *brittle diabetes* na literatura anglo-saxónica. Afeta 3 em cada 1000 doentes e associa-se a pior prognóstico, com pior qualidade de vida, maior incidência de complicações microvasculares, complicações na gravidez e menor esperança média de vida (29,30). O transplante de ilhéus pode beneficiar estes doentes (7). Este também pode ser uma solução de recurso em casos em que, apesar de terapêutica médica ajustada, há uma progressão rápida das complicações crónicas (31). Na tabela 2 resumem-se as circunstâncias em que, atualmente, se contempla o transplante de ilhéus.

Circunstâncias nas quais se realiza o transplante de ilhéus	Transplante isolado de ilhéus	Insulino-terapia intolerável para o doente
		Diabetes lábil, com mau controlo glicémico
		Complicações agudas frequentes e graves não preveníveis pela insulino-terapia
		Progressão rápida das complicações crónicas, apesar de terapêutica adequada
		Episódios de hipoglicemia grave, especialmente se com ausência de sintomas de alarme
	Transplante de ilhéus associado ao transplante renal	Em simultâneo com o de rim
		Após o transplante de rim

Tabela 2: Circunstâncias nas quais se faz o transplante de ilhéus.

O doente típico que recebe o transplante de aloilhéus tem DM1 usualmente há mais de 5 anos, quase sempre com peptídeo-C indetetável, e muitas vezes, com níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) iguais ou superiores a 8% (8), e que se encaixa nas circunstâncias resumidas na tabela 2.

Em 2006, a *American Diabetes Association* (ADA) recomendou que o transplante de ilhéus fosse apenas realizado no âmbito de estudos em centros especializados (32). Passados 10 anos, não houve alteração desta recomendação, mesmo tendo em conta todos os avanços feitos nos últimos anos, permanecendo o TI ainda um tratamento experimental.

6 - O PROCEDIMENTO

Desde antes do protocolo de *Edmonton* que o transplante intra-hepático de ilhéus tem sido a forma de transplante de ilhéus preferida. De seguida, descreve-se, de forma sucinta, o procedimento mais consensual atualmente. Dado se tratar de um tratamento experimental, ainda não padronizado, existem modificações ao procedimento consoante o centro. Ao longo da descrição, descrevem-se também sugestões de melhoria feitas por alguns autores.

6.1 - Avaliação Pré-transplante do Doente

Todos os pacientes devem ser sujeitos a uma ecografia hepática com avaliação *Doppler* da veia porta, os seus ramos e as veias hepáticas, dado que a infusão de ilhéus geralmente é feita na veia porta. O que se pretende rastrear com este exame são situações que podem constituir contraindicações ao transplante ou pelo menos aumento do risco de realizar o transplante (33), que estão listadas na tabela 3.

<p>Ecografia Hepática com <i>Doppler</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Examinar a patência da veia porta - Rastrear a presença de hipertensão portal, que pode ser agravada pela infusão de ilhéus - Excluir nódulos/massas hepáticas benignos, mas que podem ser puncionados acidentalmente durante o procedimento (exemplo: hemangiomas) - Excluir esteatose hepática, cirrose e doença hepática maligna
---	--

Tabela 2: Patologias hepáticas a excluir pela ecografia antes do transplante intra-hepático de ilhéus.

6.2 - Obtenção dos Ilhéus e Preparação da Infusão de Ilhéus

Os ilhéus são obtidos a partir de pâncreas de dadores em morte cerebral. A qualidade dos ilhéus obtidos vai depender do tempo que leva entre a declaração de morte cerebral, a extração do órgão e a sua chegada ao laboratório, assim como também do meio de conservação utilizado no transporte do órgão (16). Outra variável é o estado do órgão, prévio à sua colheita e as características do dador (9). Hoje em dia, verifica-se uma tendência para recorrer a dadores com mais massa corporal, atendendo a que os seus pâncreas terão mais células beta. Atendendo à epidemia da DM 2, há o risco de estar a usar enxertos de indivíduos com diabetes, e por isso esta deve ser rastreada nos dadores (8).

Depois, os ilhéus têm de ser isolados do restante tecido. O objetivo é retirar o máximo de tecido acinar pancreático. É importante reduzir a massa de tecido a injetar na veia porta, para evitar a hipertensão portal e fenómenos oclusivos como a trombose portal (16). Para este efeito, o pâncreas é submetido a uma digestão, mediante o uso de colagenases, seguida de uma centrifugação a baixas temperaturas, dita a frio. Nesta centrifugação, perdem-se cerca de 50% de ilhéus, e dos restantes ilhéus que sobrevivem, vários ficam parcialmente danificados (16). Existem vários preparados de colagenases comercializados atualmente (9).

É fundamental transplantar a quantidade adequada de ilhéus. Pelos métodos atuais de contagem, transplanta-se uma quantidade aproximada de 6.000 ilhéus saudáveis / Kg de massa corporal, o que para uma pessoa de 70 Kg corresponde a 420.000 ilhéus transplantados. Esta quantidade corresponde a cerca de 40-50% do número total de ilhéus de um pâncreas de uma pessoa saudável, o que é suficiente para manter a euglicemia durante muitos anos, conforme se comprova em hemipancreatetomizados ou recipientes de um hemipâncreas (34). Todavia, esta quantidade bastante razoável de ilhéus, em alotransplantes, só tem uma taxa de sucesso de 50% aos 15 meses. Provavelmente, a taxa de sucesso será baixa porque o número real de ilhéus saudáveis transplantados é inferior ao número de ilhéus saudáveis estimado

pelos métodos de contagem atuais. Os métodos de contagem de ilhéus após o processo de isolamento, podem não discriminar entre os ilhéus parcialmente lesados e os ilhéus verdadeiramente íntegros. Ou seja, quando se pensa estar a transplantar a quantidade suficiente de ilhéus, na verdade, alguns desses ilhéus estarão já danificados antes do próprio transplante. Atendendo a que no autotransplante de ilhéus, feito após pancreatectomia por pancreatite crónica, não é feita esta purificação tão intensa e, não há maior risco de ocorrerem complicações, talvez a centrifugação a frio tenha menor benefício do que o prejuízo que traz ao sucesso do transplante (31).

Existe o risco, embora apenas de 1,65%, de contaminação dos preparados de ilhéus com microrganismos (9).

6.3 - Métodos de contagem dos Ilhéus

Apesar da unidade de equivalente de ilhéus ser a unidade padrão para quantificar os ilhéus isolados, *Huang et al* (19) defendem que esta unidade sobrestima o volume de tecido transplantado pois, baseia-se na falsa premissa de que todos os ilhéus são perfeitamente esféricos. Por isso, propõem uma nova unidade, o número de células, que, segundo os autores, é um método mais fidedigno de quantificar o tecido transplantado.

6.4 - Infusão dos Ilhéus

Inicialmente, a infusão dos ilhéus na veia porta era realizada por laparotomia. Contudo, com a evolução das técnicas percutâneas guiadas por método de imagem, hoje em dia, é um procedimento de radiologia de intervenção. Através de um acesso percutâneo é possível cateterizar a veia porta, utilizando a técnica de *Seldinger* (33). Geralmente, o procedimento é efetuado sob sedação consciente e anestesia local (18). A punção é guiada por ecografia, que permite visualizar o ramo da veia porta a cateterizar e evitar complicações por punção inadvertida das vias biliares ou da artéria hepática. A punção do ramo da veia porta é de seguida confirmada por fluoroscopia. Preferencialmente, é puncionada uma ramificação

periférica do ramo direito da veia porta, pela sua boa visibilidade ecográfica e facilidade de acesso sem atravessar outras estruturas que não apenas o parênquima hepático. Depois de puncionada a ramificação da veia porta é colocado um fio-guia, com progressão do mesmo até ao tronco da veia porta. O fio-guia permite progredir com uma bainha e um cateter *pigtail* que posteriormente servirá para distribuir uma quantidade idêntica de ilhéus pelos dois lobos hepáticos. Antes da administração de ilhéus ser concretizada, obtém-se uma portografia para avaliar a permeabilidade da veia e a sua árvore anatómica.

A pressão venosa portal deve ser medida antes e, durante o procedimento a intervalos regulares. Uma pressão superior a 20 mmHg durante a infusão, acarreta maior risco de trombose e de hemorragia no local da venopunção (33). Por isso, se a pressão venosa portal estiver acima de 20 mmHg a infusão deve ser parada. A infusão de ilhéus dura habitualmente entre 10 a 30 minutos. A preparação a infundir contém geralmente entre 2 a 3 ml de tecido, até um máximo de 10 ml, em suspensão com 250 ml de dextrano. É injetada juntamente com heparina para prevenir a formação de trombos. Terminada a infusão de ilhéus, é realizada uma nova portografia para descartar algum fenómeno trombótico agudo.

Para prevenir a hemorragia após transplante de ilhéus, há vários autores que defendem a utilização de material de embolização no trato de punção no parênquima hepático (49-51). Isto é conseguido da seguinte maneira: a bainha vai sendo retirada lentamente e à medida que é retirada, vão sendo injetadas pequenas quantidades de contraste para conferir a localização anatómica da bainha e, confirmar que a bainha já não está na veia porta e não penetrou noutras estruturas vasculares (35). Por exemplo, se o trajeto da punção passar pela veia hepática, a colocação de materiais embolizantes no trato e, por conseguinte, na veia hepática, pode conduzir a uma embolia pulmonar (35). À medida que a bainha também vai sendo retirada, vão sendo injetados materiais embolizantes para obliterar o trato intra-parenquimatoso hepático de acesso. Os materiais mais utilizados são *coils* / espirais de fibra de platina, ou então rolhões feitos de material hemostático (*gelfoam*[®]) (35). Alguns autores

preferem utilizar os *coils* dado o risco de migração dos rolhões de *gelfoam*[®] (33). Vários estudos comprovam a relevância da embolização do trato de acesso à veia porta. Na série de 132 transplantes efetuados por *Villiger et al.* (35), em que a embolização não foi feita de forma rotineira a taxa de complicação hemorrágica foi de 13,6%, com 18 casos de hemorragia ameaçadora da vida. Quando se passou a realizar a embolização de forma rotineira, para todos os transplantes, não se verificaram casos de hemorragia. Outros estudos em que se embolizou o trajeto da punção, apresentaram uma baixa taxa de hemorragia, sempre inferior a 6,5% (33).

Nos trabalhos realizados sobre o tema (49,50,52) encontraram-se outros fatores de risco para hemorragia, nomeadamente: 1) o número de punções realizadas num só procedimento; 2) o número de transplantes de ilhéus prévios (quanto maior o número de procedimentos maior é o risco de hemorragia); 3) a dose de heparina utilizada ≥ 45 U/Kg; 4) pressão venosa portal aumentada; 5) terapêutica anti-agregante; 6) a trombocitopenia.

A utilização da ecografia, para além da fluoroscopia, é particularmente importante para evitar demasiadas punções, uma vez que a ecografia permite uma visualização direta e em tempo real. A combinação de ecografia com controlo fluoroscópico provou ser melhor do que a fluoroscopia isolada (36). Também é possível realizar a cateterização da veia porta guiada por tomografia computadorizada (TC) com sucesso. Porém, a TC, para além de menor disponibilidade na maioria das instituições, obriga a um maior dispêndio de tempo e a maior exposição a radiação.

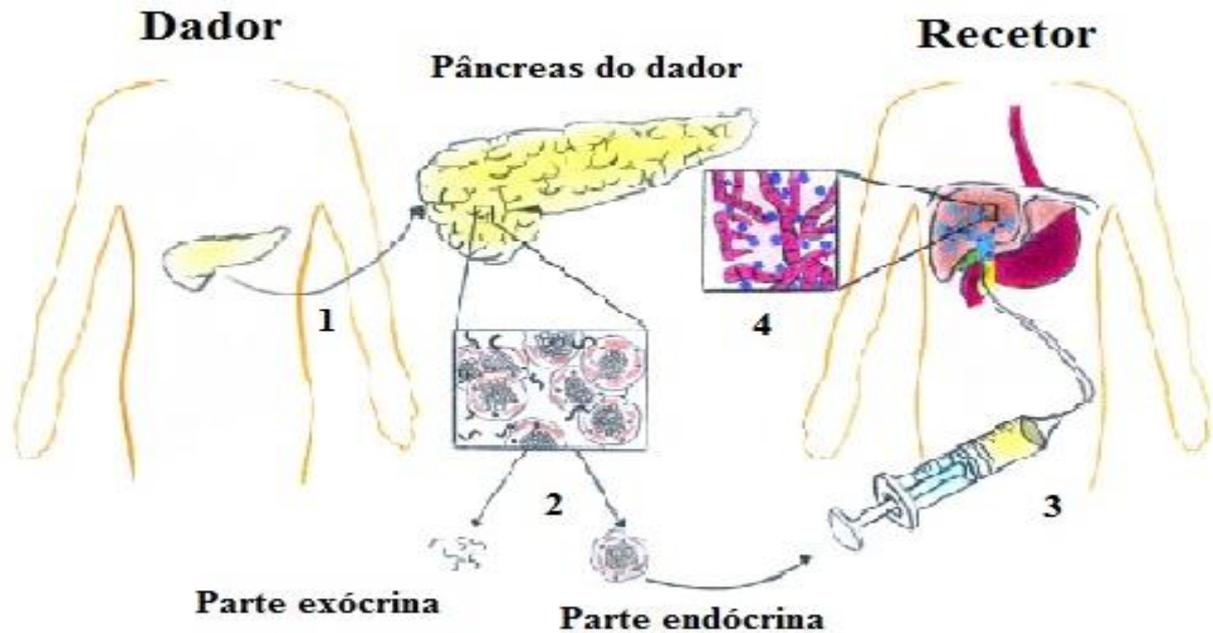


Figura 1: Desenho esquemático do procedimento do transplante de ilhéus. Legenda: 1) o pâncreas é colhido de um doador, geralmente em morte cerebral; 2) o órgão é processado de maneira purificar o enxerto, separando a parte endócrina, os ilhéus, da parte exócrina; 3) os ilhéus são infundidos na veia porta; 4) os ilhéus (a azul) implantam-se nos sinusóides hepáticos, de forma difusa pelos espaços vasculares do fígado.

6.5 - Outras Complicações

Para além da hemorragia, acima discutida, podem ocorrer também outras complicações associadas ao procedimento, tais como, a hemorragia no espaço pleural, que é uma complicação rara e que se associa a má qualidade da técnica (36); a trombose da veia porta, que pode ocorrer em até 3% dos casos e é potencialmente fatal, e que se relaciona provavelmente com a densidade dos conjuntos de ilhéus infundidos (37). Também há casos descritos de fístulas arteriovenosas e de traumatismo da bexiga ou da árvore biliar (37). Uma queixa relativamente comum dos doentes (17,6% dos casos) é a dor ou desconforto durante o procedimento, que pode obrigar a uma anestesia geral em alguns casos (33). Na tabela 3 apresentam-se algumas séries de procedimentos e as complicações que ocorreram.

Estudo e ano de publicação	Nº de procedimentos	Nº total de complicações <i>major</i>	Tipos de complicações
<i>Owen et al. 2003</i>	68	8	4 hemorragias + 2 hematomas + 2 trombozes venosas portais
<i>Venturini et al. 2005</i>	58	3	2 hemorragias + 1 trombose
<i>Shapiro et al. 2006</i>	77	10	7 hemorragias + 1 episódio de hipoglicemia + 2 trombozes venosas portais
<i>Low et al. 2010</i>	230	20	15 hemorragias + 5 trombozes venosas portais
<i>Dixon et al. 2012</i>	17	1	1 hemorragia

Tabela 3: Algumas séries de procedimentos de transplante intra-hepático de ilhéus e suas complicações. Elaborada a partir de *Dixon et al.* (33).

6.6 - Avaliação logo após o Transplante

Logo no dia seguinte ao procedimento é realizada uma ecografia abdominal. Desta deve constar o despiste de hemorragia e a avaliação do fluxo hepatoportal (33).

Analicamente, na primeira semana, ocorre uma elevação das enzimas hepáticas, com respetiva normalização dentro das primeiras 4 semanas após o transplante (38).

7 - REGIMES IMUNOSSUPRESSORES

Por um lado, um alotransplante como o de ilhéus, tal como o de rim ou de coração, sofre uma reação imunitária que reduz o seu sucesso. Isto é demonstrável pelos melhores resultados do autotransplante de ilhéus após pancreatectomia em doentes com pancreatite crónica, sem DM 1, submetidos a cirurgia para resolução da dor (39,40). Por outro lado, ao transplantar parte do pâncreas entre gémeos monozigóticos, de um saudável para um com DM 1, a diabetes é aparentemente curada durante algumas semanas. Ao longo destas, observa-se a destruição dos

ilhéus, com preservação do tecido exócrino, demonstrando a natureza autoimune da patologia (24). Ou seja, o controlo da resposta imunitária ao enxerto é fundamental para manter os ilhéus funcionantes. Têm-se utilizado agentes imunossuppressores já experimentados noutros tipos de transplantes. Na tabela 5 enumeram-se os vários agentes imunossuppressores utilizados no transplante de ilhéus.

Ação do fármaco	Fármaco	Ação do fármaco	Fármaco	
Inibidores da Calcineurina	Tacrolimus	Inibidor da Replicação das Células	Inibidores do mTor	
	Ciclosporina		Everolimus	
Antagonistas / Inibidores do TNF- α	Infliximab		Análogo do DNA	Azatioprina
	Etanercept		Inibidor enzimático	Micofenolato mofetil
Depleção de Linfócitos T	Alemtuzumab		Antagonista do recetor da IL-2	Daclizumab
	Globulina anti-timócito		Depleção de linfócitos B	Rituximab
	Globulina anti-linfócito	Anti-inflamatório	Glucocorticoides	

Tabela 5: Principais agentes imunossuppressores utilizados no transplante de ilhéus. Elaborado a partir do relatório do CITR (9).

Desta lista de fármacos, os glucocorticoides perderam a sua importância desde *Edmonton*, pelo efeito deletério que exercem no enxerto. No entanto, outros fármacos, como o tacrolimus, que até faz parte do protocolo de *Edmonton* (18), também exercem efeitos negativos sobre a secreção de insulina nas células beta humanas (41). Em modelos animais, observou-se um efeito inibitório significativo de vários agentes imunossuppressores sobre a secreção de insulina, incluindo a metilprednisolona (até 90% de inibição), o micofenolato (até 83%), o sirolimus (até 63%), a ciclosporina (até 24%) e o tacrolimus (até 20%). Não se registou efeito inibitório por parte do daclizumab (42). A combinação da lesão causada pela

resposta imunitária com a toxicidade dos fármacos utilizados para suprimir essa mesma resposta, é bastante relevante na redução da sobrevivência dos aloenxertos.

Em relação aos regimes imunossupressores, há que distinguir os agentes que se usam apenas para indução e os que se usam para manutenção. No protocolo de *Edmonton* usa-se um antagonista do recetor da interleucina 2 (IL-2) como indutor, combinado com dois agentes de manutenção, um inibidor da calcineurina, o tacrolimus e, um inibidor do mTOR, o sirolimus. A combinação de fármacos empregados tem mudado desde a publicação do protocolo, conforme se ilustra na seguinte figura esquemática (Figura 2).

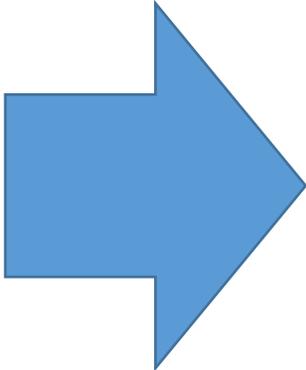
Agente	Período de 1999-2002		Atualidade
Agentes de indução	Antagonistas do recetor da IL-2 apenas		Usa-se cada vez mais combinações de agentes de depleção dos linfócitos T e inibidores do TNF- α com ou sem antagonistas da IL-2
Agentes de manutenção	Inibidor da Calcineurina		Continua a utilizar-se o inibidor da calcineurina
	Inibidor do mTOR		Substituído na maioria dos casos por agentes inibidores da enzima Inosina-5'-monofosfato desidrogenase (ex: micofenolato mofetil)

Figura 2: A evolução nos esquemas imunossupressores desde 1999 até à atualidade. Segundo o relatório do CITR (9).

8 - COMPLICAÇÕES TARDIAS E EFEITOS SECUNDÁRIOS DO TRANSPLANTE DE ILHÉUS

Seis meses depois do transplante, em 20% dos casos, pode-se detetar esteatose hepática na ressonância magnética (RM), comprovada por biópsia. Nesta, verifica-se um padrão predominantemente heterogéneo granular, que parece ser bastante específico desta situação. A

esteatose deve-se provavelmente ao efeito parácrino da insulina libertada pelos ilhéus e é aparentemente benigna, contudo, não se conhece ao certo o seu impacto a longo termo (43).

Após o TI isolado, a RM também demonstra, por vezes, edema perinéfrico associado a alguma disfunção renal, em doentes cuja função renal pré-transplante estava normal (44).

Também são expectáveis efeitos secundários à administração dos agentes imunossuppressores, como o risco aumentado de infeções ou de neoplasias, porém, ainda está por se perceber a verdadeira incidência destes fenómenos secundários. Por exemplo, em relação ao risco de aumento da incidência de neoplasias, atendendo a que a própria diabetes aumenta o risco neoplásico, é difícil prever em que medida o alotransplante poderá aumentar a incidência de neoplasias (9).

Um dos efeitos mais notados tem sido uma elevada prevalência, que pode chegar aos 70,5%, de quistos ováricos em mulheres, ainda em idade fértil, a tomar sirolimus após o transplante de ilhéus. A suspensão do sirolimus associou-se a uma redução das dimensões ou até mesmo desaparecimento completo dos quistos em 80% dos casos. Assim, é recomendável uma vigilância ginecológica regular destas doentes. Também é de notar que nas mulheres sob contraceção hormonal oral não se desenvolveram quistos (45).

9 - MONITORIZAÇÃO DO ENXERTO INTRA-HEPÁTICO

A monitorização da vitalidade do enxerto é feita indiretamente pelos seus efeitos na glicemia e a síntese de peptídeo-C (9). No entanto, faltam formas de estudo imagiológico dos ilhéus intra-hepáticos. A RM com ilhéus marcados com óxido de ferro superparamagnético poderá constituir um método de monitorizar imagiologicamente o enxerto e diagnosticar a rejeição (46). A tomografia de emissão de positrões com 2-desoxi-2-(18F) fluoro-D-glicose também tem sido estudada mas ainda existem dificuldades técnicas a serem ultrapassadas (36).

10 - OS RESULTADOS DO ALOTRANSPLANTE DE ILHÉUS

10.1 - Onde é realizado o transplante e, há algum registo internacional dos resultados?

Embora seja já realizado em vários centros desde há várias décadas, só desde 1999 é que há um registo internacional dos resultados (47). Este é feito pelo *Collaborative Islet Transplant Registry* (<http://www.citrregistry.org/>), ou CITER, que reúne os dados de centros localizados nos Estados Unidos da América (EUA), no Canadá, na Europa e na Austrália. Dado que este registo é, em muitos casos, voluntário e dependente da instituição, infelizmente, os dados deste registo não traduzem de forma completa o trabalho feito nesta área (9,47). No entanto, conforme se verifica na revisão independente feita por *Tezza et al.* (48), ilustrada na figura 2 e explanada na tabela 4, a atividade de TI concentra-se nos países abrangidos pelo CITER.

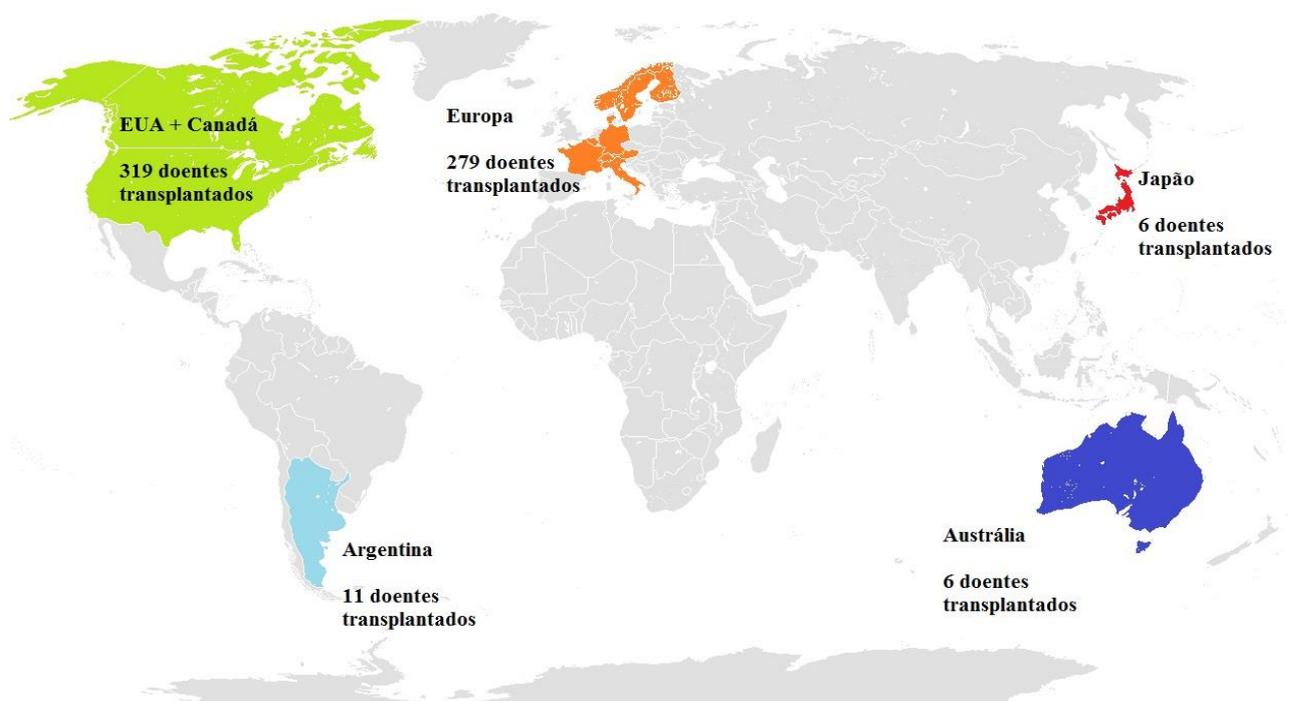


Figura 2: Principais centros mundiais com atividade de transplantação de ilhéus entre os anos 1999-2009. Imagem elaborada pelo autor do trabalho, segundo a revisão feita por *Tezza et al.* (48). Atualmente, grande parte dos transplantes concentram-se na América do Norte e na Europa.

Zona Geográfica	Nº de doentes transplantados (percentagem do total)	Nº de centros ativos	Centro mais ativo
América do Norte (EUA + Canadá)	319 doentes transplantados (51,3%)	12 centros principais	<i>Edmonton</i> (118 doentes)
América do Sul	11 doentes transplantados (1,8%)	só 1 centro principal	<i>Buenos Aires</i> , Argentina)
Europa	279 doentes transplantados (44,9%)	9 centros principais	<i>Geneva</i> + <i>GRAGIL</i> (75 doentes)
Ásia	6 doentes transplantados (1%)	só 1 centro principal	<i>Kyoto</i> , Japão)
Oceânia	6 doentes transplantados (1%)	só 1 centro principal	<i>Sidney</i> , Austrália)

Tabela 4: Revisão da atividade mundial de transplantação de ilhéus entre 1999 até 2009. Tabela elaborada segundo a revisão feita por *Tezza et al.* (48).

10.2 - O número de transplantes nos últimos 15 anos

Desde o advento do protocolo de *Edmonton*, que se tem observado uma tendência de crescimento do número de transplantes, conforme se pode verificar pelos relatórios anuais do CITR, ilustrado pelo gráfico 1 abaixo.

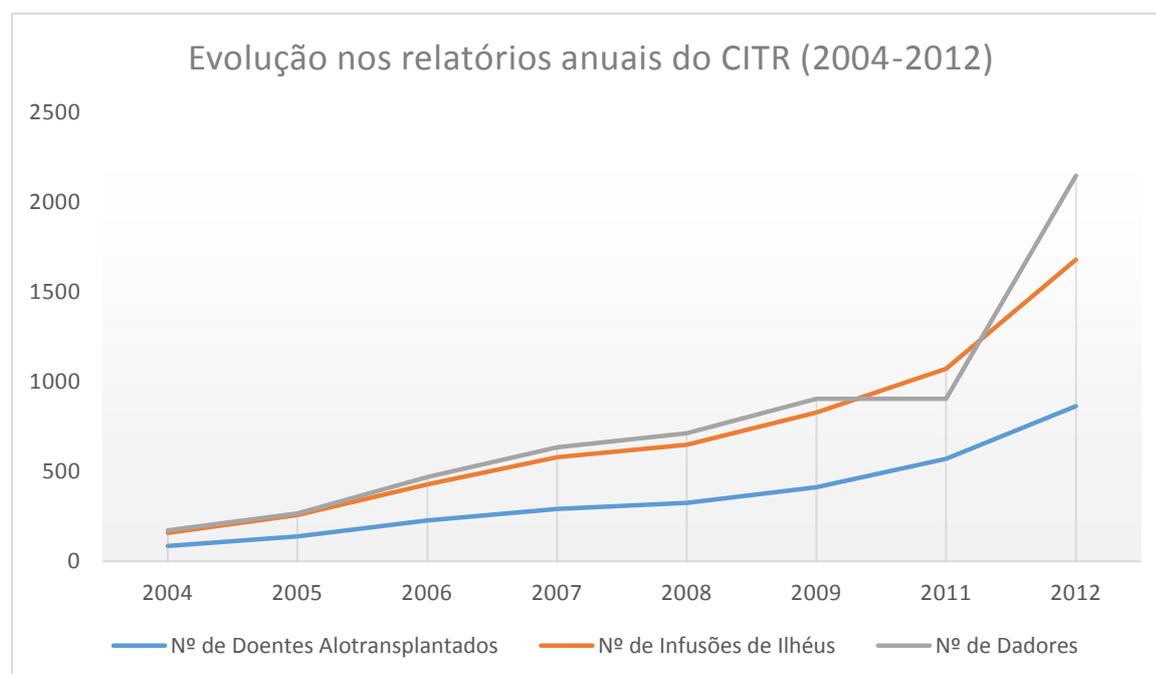


Gráfico 1: A evolução no nº de doentes alotransplantados, no nº de infusões de ilhéus e no nº de dadores ao longo nos registos feitos pelo CITR e publicados nos seus relatórios anuais. Gráfico elaborado com base no 8º relatório anual do CITR (9).

Como se deduz também a partir do gráfico, uma porção significativa dos doentes recebe mais do que uma infusão de ilhéus. Também se verifica maior utilização dos dadores de órgão.

No que concerne à associação com o transplante de rim, como se observa no gráfico 2, há uma clara predominância do transplante de ilhéus isolado, ao contrário do que ocorre no transplante de órgão sólido (7).

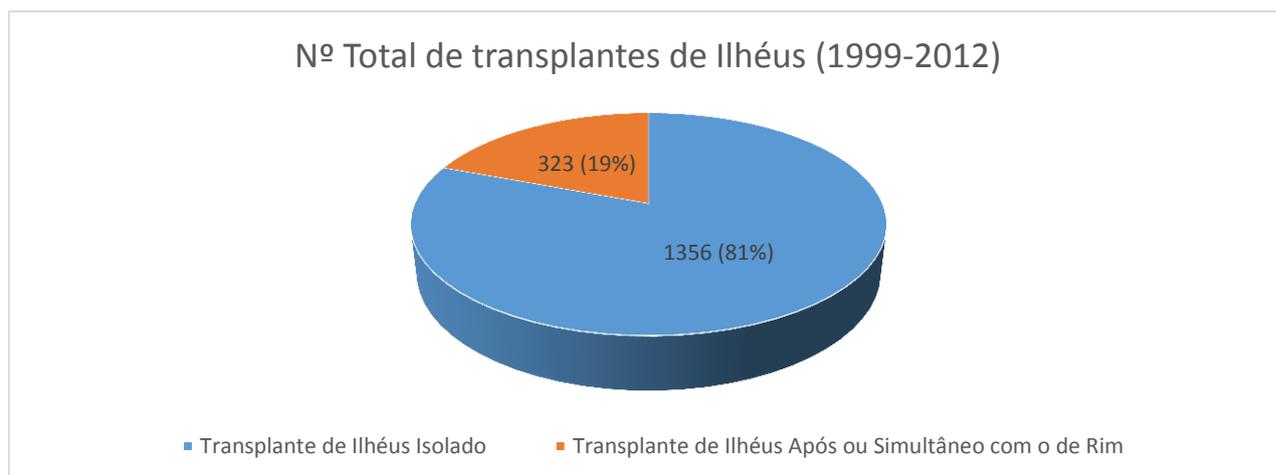


Gráfico 2: Número total de infusões durante o período de 1999 até 2012, registadas pelo CITR (9), com discriminação do tipo de transplante feito.

10.3 - Quem tem recebido o transplante?

Na tabela 7 resumem-se as principais características dos recipientes atuais de transplante de ilhéus comparadas com as características de outros dois períodos temporais.

Períodos temporais	Idade média em anos (\pm DP) na altura do transplante	Duração média (\pm DP) da diabetes em anos	Peptídeo-C basal médio (\pm DP) em ng/ml	HBA1c média (\pm DP) em %	Há quantos anos estava sob insulinoterapia intensiva antes do transplante, em média (\pm DP)
2003-2006	44,6 \pm 0,6	29,6 \pm 0,6	0,1 \pm 0,0	7,8 \pm 0,1	23,6 \pm 1,2
2007-2010	47,9 \pm 0,6	31,4 \pm 0,9	0,1 \pm 0,0	7,9 \pm 0,1	19,9 \pm 2,0
2011-2014	47,7 \pm 0,9	29,0 \pm 1,4	0,2 \pm 0,1	8,4 \pm 0,1	16,4 \pm 2,6

Tabela 7: Comparação entre as características dos recipientes de transplante de ilhéus em 3 períodos diferentes, desde 2003 até 2014. Com base no relatório do CITR (9).

Conclui-se que o transplante de ilhéus é feito em doentes com cerca de 30 anos de duração da doença, com valores de HbA1c elevados, apesar dos doentes estarem sob insulino-terapia intensiva desde há um período temporal substancial. Segundo o CITR (9), cerca de metade dos doentes transplantados no período de 2011-2014, estavam com bomba de perfusão de insulina.

10.4 - O que define o sucesso do transplante de ilhéus?

O objetivo do transplante é conseguir procedimentos seguros, sem complicações, e garantir aos doentes insulino-independência durável, livre de imunossupressão crónica. Ainda não é possível garantir alotransplantes sem imunossupressão, por conseguinte, a manutenção da euglicemia e a segurança são as principais variáveis a avaliar. Dado ser uma das indicações mais frequentes, a frequência de episódios de hipoglicemia grave também deve ser aferida. O CITR define 5 objetivos primários a atingir: 1) insulino-independência, que tem de durar mais de 14 dias consecutivos; 2) peptídeo-C > 0,3 ng/ml; 3) HbA1c < 6,5% ou uma redução $\geq 2\%$; 4) glicemia em jejum entre 60 e 140 mg/dl e 5) a presença ou não de episódios de hipoglicemia grave. Quando o valor do peptídeo-C após estimulação é < 0,3 ng/ml e, o valor do peptídeo-C em jejum é indetetável, considera-se que há uma perda completa do enxerto. Em relação à hipoglicemia, é avaliada a sua existência e a presença ou não de sintomas de alarme.

10.5 - Resultados obtidos em insulino-independência

Como se pode ver na tabela 8, em vários estudos publicados desde 2000, a insulino-independência a 1 ano é atingida em muitas séries em mais de 60% dos casos, chegando mesmo no estudo que originou o protocolo de *Edmonton* (18) ao valor de 100%.

Estudo / ano de publicação	Nº de doentes transplantados	Nº de doentes insulinoindependentes 1 ano após transplante
<i>Shapiro et al. 2000</i>	7	100%
<i>Owen et al. 2003</i>	34	81%
<i>Venturini et al. 2005</i>	34	35%
<i>O'Connell 2006</i>	5	60%
<i>Neeman et al. 2006</i>	6	50%
<i>Shapiro et al. 2006</i>	36	44%
<i>Low et al. 2010</i>	110	82%
<i>Collaborative Islet Transplant Registry 2011</i>	412	70%
<i>Dixon et al. 2012</i>	10	67%

Tabela 8: A insulinoindpendência 1 ano após o transplante de ilhéus. Elaborada a partir de *Dixon et al.* (33).

Porém, a ambição é que a insulinoindpendência dure mais tempo, de forma a substituir inteiramente a insulina exógena, e permitindo às pessoas uma vida livre das exigências da atual terapêutica padrão. Por isso, é importante analisar os resultados do transplante depois do primeiro ano. Dado ser uma terapêutica experimental, que ganhou entusiasmo sobretudo a partir de 2000, e ser feita ainda em relativamente poucos centros, não existem muitos estudos de *follow-up* a cinco anos dos doentes transplantados, deixando ainda dúvidas sobre a durabilidade da insulinoindpendência.

No *follow-up* dos doentes transplantados em *Edmonton* (37), só 10% dos indivíduos se mantiveram insulinoindependentes aos 5 anos, com HbA1c de 6,4% (AIQ: 6,1-6,7). Todavia, dentro dos insulinoindependentes, os que mantiveram um enxerto funcionante, demonstrado pelo peptídeo-C detetável, tinham níveis de HbA1c de 6,7 (AIQ: 5,9-7,5) *versus* os que deixaram de ter enxerto funcionante, sem peptídeo-C detetável, que tinham HbA1c de 9,0% (AIQ: 6,7-9,3), portanto, um controlo significativamente melhor com o transplante do que

sem o transplante ($P < 0,05$). Entretanto, a durabilidade da insulinoindpendência melhorou bastante, conforme o registo do CITER, que se ilustra no gráfico seguinte:

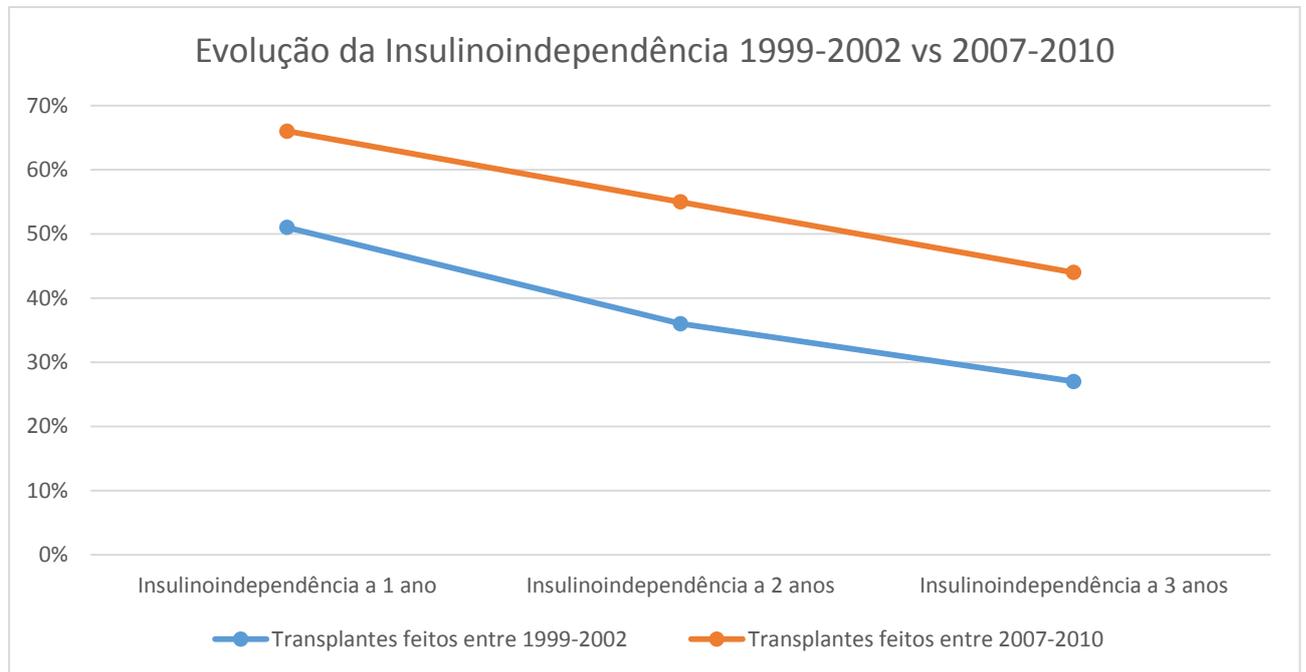


Gráfico 3: Comparação entre o número de doentes insulinoindpendentes obtidos a 1,2 e 3 anos nos períodos de 1999-2002 versus 2007-2010. Há melhoria da duração da insulinoindpendência com significado estatístico ($P < 0,05$). Elaborado com base nos dados do CITER, analisados por *Barton et al.* (8).

Recentemente, foi feito um estudo prospetivo, com 10 doentes, na Universidade de *Illinois* (49), com 60% dos alotransplantados insulinoindpendentes a 5 anos, na maioria dos casos com HbA1c normalizada ao fim de 6 meses e mantida abaixo de 6% aos 5 anos. Segundo a análise estatística feita no 8º relatório do CITER (9), quando reunidos os 5 fatores listados na tabela 9, a probabilidade estimada dos alotransplantados reterem a insulinoindpendência durante 7 ou mais anos de *follow-up* é de 90%.

Fatores com impacto na durabilidade da insulinoindependência	Significado estatístico
O dador receber transfusões antes da cirurgia	p = 0,003
Uso do Serva/NB1 [®] (uma mistura de colagenases para digerir o pâncreas)	p = 0,005
Uso de termolisina (metaloproteinase usada na digestão do pâncreas)	p = 0,039
Imunossupressão – regime de indução com agentes de depleção de linfócitos T	p = 0,001
Alta contagem de ilhéus	p = 0,024

Tabela 9: Fatores que favorecem a manutenção da insulinoindependência 7 ou mais anos após o primeiro atingimento da mesma. De acordo com o 8º relatório do CITR (9).

10.6 - Prevenção da hipoglicemia

A grande frequência de episódios graves de hipoglicemia em alguns doentes com DM 1 é uma das principais razões para fazer o transplante de ilhéus. Por isso, o evitamento de episódios de hipoglicemia grave é claramente um ganho por parte da alotransplantação. A verdade é que mesmo em doentes em que a função do enxerto decai e já não consegue manter a insulinoindependência, enquanto se mantiver uma função mínima, demonstrada pela deteção de peptídeo-C (9,50). Para objetivar a gravidade da hipoglicemia utilizam-se *scores* como o HYPO (50). Em vários grupos, que se apresentam na tabela 10, verificou-se uma melhoria considerável da hipoglicemia. Quanto mais baixo o *score* HYPO, menor é a gravidade da hipoglicemia. Um *score* HYPO \geq 1047 indica um problema grave com a hipoglicemia (50).

Também se pode avaliar a labilidade da glicemia através do índice LI (50). Num ensaio clínico, antes do transplante, mais de 50% doentes tinha um índice LI $>$ 400. Cinco anos após o transplante, todos os doentes tinham LI $<$ 400 (49).

Estudo	Hipoglicemia	
	Pré-transplante	Pós-transplante
Follow up dos transplantados de Edmonton (37)	Score HYPO ia até 3000, com > 50% acima de 1000.	Todos os doentes com score HYPO < 1000
<i>Meirigeng Qi et al.</i> (49)	Score HYPO: Mediana de 824,4 (AIQ: 71-2668)	5 anos após: Score HYPO de 0 em todos os doentes
<i>Barton et al</i> , dados do CITR de 1999-2010 (8)	90% dos doentes apresentava hipoglicemia grave	90% dos doentes permaneceu aos 5 anos livre de episódios de hipoglicemia grave

Tabela 10: Resolução do problema da hipoglicemia após o transplante de ilhéus.

10.7 - Efeitos sobre as complicações crónicas

A transplantação de ilhéus sozinha consegue garantir um bom controlo glicémico ou, pelo menos, complementar a insulino-terapia. Para além dos efeitos preventivos sobre as complicações agudas, o TI também tem efeitos benéficos sobre as complicações crónicas da DM 1, incluindo as complicações cardiovasculares, renais, neurológicas e oculares (51). Também se comprovou a melhoria da qualidade de vida com o TI (52).

11 - COMPARAÇÃO ENTRE O TRANSPLANTE DE ILHÉUS E A TERAPÊUTICA MÉDICA

No que concerne a esta questão, existe uma notória falta de ensaios clínicos randomizados controlados que comparem um grupo de doentes transplantados *versus* um grupo de controlo com doentes sob insulino-terapia. Dado que o TI só é aplicado em doentes com características muito específicas, provavelmente, há um viés de seleção dos pacientes submetidos a transplante (31). Num ensaio clínico não randomizado (53), o alotransplante de ilhéus foi associado a um menor risco de progressão da retinopatia, face à terapêutica médica, 0%

versus 12%, respetivamente ($P < 0,01$). Contudo, a não randomização pode ter enviesado o estudo.

Apesar dos resultados promissores do TI e da eficácia já comprovada do transplante de órgão, estes continuam a ser largamente ignorados (47). Nas recomendações conjuntas da *American Diabetes Association* e da *Endocrine Society*, organização que reúne especialistas de todo o mundo, os dois tipos de alotransplante nem sequer são referidos como possíveis estratégias para combater a hipoglicemia (54). Tendo já provado a sua eficácia em grupos selecionados de diabéticos, a principal razão para que o alotransplante não seja mais utilizado é a necessidade de imunossupressão crónica e o receio dos seus efeitos secundários. Contudo, ainda está por demonstrar uma maior morbimortalidade pela imunossupressão do que pela DM 1 mal controlada, a longo prazo (47). É expectável que, se se conseguir manter o enxerto funcional sem recurso à imunossupressão, o TI seja uma opção terapêutica para a DM 1 cada vez mais aceite. Seguindo esta lógica, várias formas de ultrapassar a imunossupressão têm sido alvo de intensa investigação.

Outro aspeto importante a ter em conta é a relação custo-eficácia do TI em relação à terapêutica médica. Um estudo recente, conclui que, embora o TI consiga várias melhorias em relação à terapêutica padrão, tem custos superiores. Estes podem ser reduzidos com a maior utilização deste procedimento e, com outras medidas, como o uso de fármacos imunossupressores genéricos (55). Mais uma vez, a imunossupressão claramente limita a aplicação clínica do TI. Por outro lado, os doentes submetidos a TI são doentes com mau controlo glicémico, muitas vezes com hipoglicemia, potencialmente fatal, nas quais a insulinoaterapia não se revelou eficaz (9,55). O TI nestes casos não pode ser avaliado nem tanto à luz dos custos mas, sobretudo à luz da sua eficácia em controlar a diabetes (55).

Outra comparação importante a fazer será entre o alotransplante e o uso dos dispositivos conhecidos como pâncreas endócrinos artificiais, com sistemas de monitorização glicémica

contínua artificiais e algoritmos que se tentam aproximar do padrão de secreção fisiológica da insulina. Estes não requerem imunossupressão (56).

12 - COMPARAÇÃO ENTRE O ALOTRANSPLANTE DE ILHÉUS E O ALOTRANSPLANTE DE ÓRGÃO

O transplante de órgão sólido, apesar de conseguir atenuar ou até mesmo reverter as complicações da diabetes, não o consegue fazer de uma forma inteiramente satisfatória. Provavelmente, isto ocorre porque o transplante de órgão ocorre 20 anos após o diagnóstico de diabetes, em média (32). Até agora, não existem estudos para testarem a hipótese de que o transplante de órgão logo após o diagnóstico poderá prevenir as complicações crónicas da DM 1, de forma mais eficaz que a insulino-terapia. Apesar dos avanços, o transplante de ilhéus ainda não reúne as condições para ser sempre preferencial ao transplante de pâncreas. Na atualidade, as duas técnicas complementam-se, na medida em que o transplante de ilhéus deve ser usado em alternativa ao transplante de pâncreas nos casos em que o risco cirúrgico é significativo (8,47). Na tabela 11 resumem-se algumas diferenças essenciais entre os dois tratamentos.

	Transplante de Órgão Sólido (TOS)	Transplante de Ilhéus (TI)
Nº de doentes transplantados até à atualidade	Cerca de 50.000	Cerca de 3.500
Relação com transplante de rim mais frequente	Transplante simultâneo de pâncreas e rim	Transplante isolado
Insulinoindpendência após 1 ano	85%	80%
Insulinoindpendência após 5 anos	50-70%	25-60%
Produção de Peptídeo C após 5 anos	70%	70%
Procedimento e Segurança	Cirurgia <i>major</i> Complicações frequentes e graves	Procedimento minimamente invasivo (da radiologia de intervenção) Complicações raras e menos graves
Mortalidade	2-4%	Virtualmente nula
Nº de dadores necessários	1	1-4
Potencial	Praticamente todo atingido	Muito ainda por atingir

Tabela 11: Comparação entre o transplante de órgão e o transplante de ilhéus. Adaptado de *Niclauss et al.* (7) e *Meirigeng et al.* (49).

Apesar dos sucessos do transplante de órgão, não pode ser esquecido o facto de que este continua a ser um procedimento cirúrgico *major* com risco de complicações e risco de mortalidade para o recetor. Algumas complicações comuns são a infeção peripancreática, a deiscência da anastomose entérica, a hemorragia, a pancreatite e a trombose (27).

13 - PROBLEMAS E SOLUÇÕES

Um dos problemas mais prementes do alotransplante de ilhéus é a necessidade de proteger os ilhéus do sistema imunitário do recetor. Para isto, tem-se investido em novas estratégias de controlar o sistema imunitário e na bioencapsulação, uma forma bastante promissora de isolar o enxerto do sistema imunitário. Vários locais para implantar o enxerto alternativos ao fígado têm sido estudados. Para além de poderem ser locais imunitariamente mais favoráveis do que o fígado, podem ter outras características que os tornem mais atrativos do que o fígado. Finalmente, a falta de dadores é um problema que claramente mina o transplante de ilhéus. Na última secção discutem-se soluções para este problema. Na figura 2 resumem-se os principais problemas que afetam o TI.

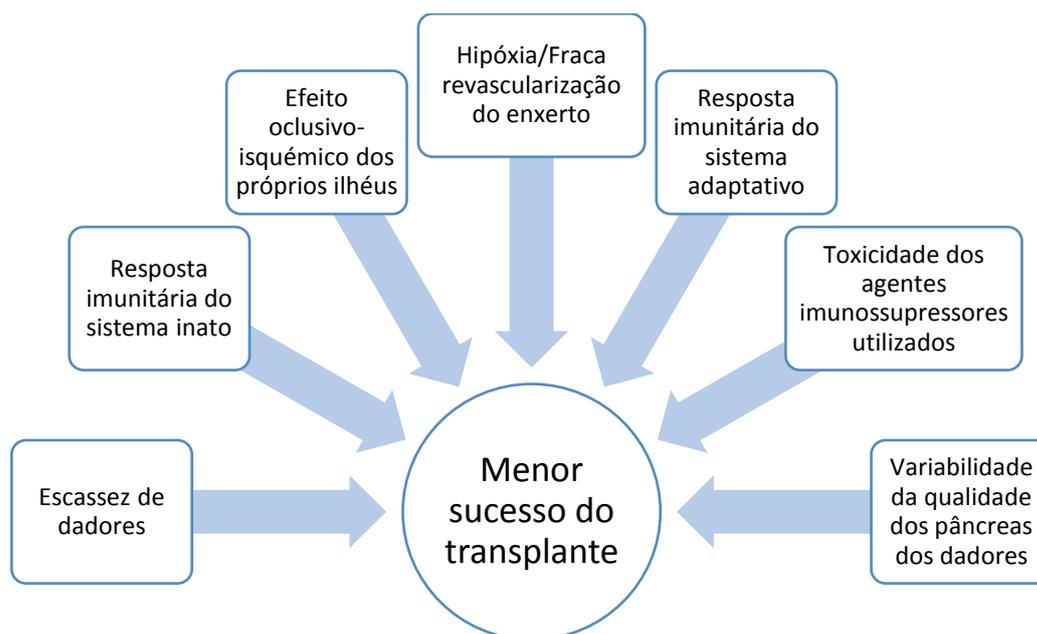


Figura 3: Principais problemas que minam o sucesso do transplante de ilhéus (57).

13.1 - Estratégias farmacológicas para melhorar a sobrevivência do enxerto

13.1.1 - Estratégias anti-inflamatórias

Logo após a sua infusão intravascular, um fator tecidual próprio dos ilhéus desencadeia uma reação no sangue, em que se ativam o sistema de coagulação e o do complemento e, dentro de uma hora, os leucócitos já destruíram a maior parte dos ilhéus infundidos. Esta é a reação inflamatória hemo-mediada imediata e faz parte do sistema imunitário inato (58). A ativação do sistema de coagulação leva a trombose e isquemia hepática e, por conseguinte, do enxerto também. Calcula-se que entre 60 a 80% dos ilhéus transplantados perdem-se dentro de horas a dias após o transplante. Motivados por isto, os investigadores têm investido na procura de estratégias anti-inflamatórias para o período peri-transplante, que permitam frenar esta resposta imunitária. Estas podem-se dividir em estratégias *ex vivo*, em que se interfere junto do próprio tecido do dador de modo a modificá-lo, previamente ao transplante, de maneira a reduzir a reação imunitária que este invoca. Exemplos destes pré-tratamentos *ex vivo* são algumas estratégias para lidar com a reação inflamatória hemo-mediada imediata. Para frenar a sobreativação do sistema hemostático, os ilhéus têm sido administrados em meio com heparina, o que acarreta algum risco hemorrágico (38). Foi proposto também que em vez de se heparinizar o meio, heparinizar apenas a superfície das células, que parece ser mais eficaz (59). Uma solução inovadora é cultivar as células dos ilhéus com células endoteliais, de maneira a que os ilhéus fiquem cobertos de células endoteliais. Estas reduzem a ativação hemostática e do complemento (60). As células dendríticas residentes nos tecidos dos dadores também têm recebido atenção. Estas desempenham um papel muito importante numa rejeição. Após a implantação, estas células migram para o tecido linfóide do recetor e, apresentam os alo-antígenos do dador aos linfócitos T do recipiente, sensibilizando-os para os antígenos do dador (61). Assim, eliminar estas células contribuirá para reduzir a reação

imunitária contra o enxerto. Apesar de segura, esta estratégia ainda tem de ser amplamente estudada antes de passar à prática clínica (48).

Outras estratégias passam por controlar *in vivo* diversos alvos terapêuticos que têm relevância na reação imunitária não específica, nomeadamente: o sistema de coagulação, o sistema do complemento, alguns mediadores pró-inflamatórios e o recrutamento de polimorfonucleares. Dentro destas, têm-se destacado fármacos que têm como alvos importantes mediadores pró-inflamatórios, em concreto, o *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α) e a interleucina 1-beta (IL-1 β). Em relação aos dois inibidores do TNF- α testados, só o etanercept demonstrou benefício, ao contrário do infliximab, que não se mostrou eficaz, provavelmente por diferenças farmacodinâmicas entre os dois, entre outros motivos (38,48). No que concerne à inibição da IL-1 β , um antagonista do seu recetor, o anakinra, demonstrou ser eficaz em animais e tem sido usado em humanos. A associação etanercept com o anakinra parece ser mais eficaz do que um só isolado. Contudo, convém referir que estes fármacos carecem de maior volume de estudos nesta área e têm sido utilizados de forma quase empírica (38). Estas terapêuticas anti-inflamatórias não substituem a imunossupressão mais tradicional, como o sirolimus ou o daclizumab, que se dirigem sobretudo ao sistema imunitário adaptativo. Servem, pois, para complementar a imunossupressão já empregada. Estas terapêuticas anti-inflamatórias devem ser administradas apenas no período peri-transplante, durante escassos dias, para evitar efeitos secundários, dada a distribuição ubiqüitária dos alvos visados (38). Na tabela 12 apresentam-se outros potenciais alvos terapêuticos na estratégia anti-inflamatória.

Fármaco	Mecanismo	Eficácia Terapêutica
Anticorpos anti-CD52 (Alemtuzumab)	Ligam-se ao CD52, presente na superfície dos linfócitos T	Eficácia em transplantes de órgãos sólidos. Eficácia no transplante de ilhéus por comprovar. Até agora ainda não demonstrou benefício em humanos.
Anticorpos anti-CD3 (Teplizumab)	Ligam-se ao CD3, presente na superfície dos linfócitos T	Eficácia e segurança no transplante de ilhéus por comprovar. Tem vários efeitos secundários.
Globulina anti-timócito	Estimula a expansão de linfócitos T reguladores	A associação de anti-timoglobulina com Imunoglobulina CTLA4 é possivelmente o regime imunossupressor atual mais potente.
Reparixina	bloqueio do eixo IL-8/CXCR1-CXCR2	Demonstrou benefício terapêutico num ensaio clínico vs placebo.
Rapamicina e IL-10	Expansão das células T reguladoras	Ainda por apurar o benefício terapêutico.

Tabela 12: Alvos terapêuticos da estratégia anti-inflamatória e fármacos que atuam sobre estes alvos. Elaborado com base em *Citro et al.* (38).

Para além destes, também se equacionam outros alvos como o bloqueio da coestimulação das células T naïve, que carece ainda de muitos estudos.

13.1.2 - Estratégia anti-apoptose

Também têm sido estudados alvos que visam inibir a apoptose das células dos ilhéus. Destes, têm adquirido particular destaque os análogos das incretinas. Estes são cada vez mais usados como adjuvantes do transplante de ilhéus (62), dado que exercem vários efeitos protetores sobre as células beta. Em animais, observou-se que o *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) estimula a biossíntese de insulina, o crescimento e a proliferação das células beta e ainda a via do fator induzido pela hipóxia, o que ajuda a combater o dano isquémico que os ilhéus sofrem. O exenatide, um análogo do GLP-1, reverte parcialmente os efeitos inibitórios dos agentes imunossupressores sobre a secreção de insulina (41). Todavia, em humanos, estes efeitos não são tão evidentes. Talvez porque o efeito proliferativo é mediado por vias associadas ao mTOR, que é fortemente inibido pelo sirolimus, peça-chave da

imunossupressão que consta do protocolo de *Edmonton*. Apesar do uso dos análogos do GLP-1 se ter vindo a popularizar, continuam a faltar ensaios clínicos que testem a segurança e a eficácia dos análogos a longo-termo e o seu uso tem sido sobretudo empírico (62).

Outras potenciais estratégias anti-apoptóticas, estudadas em contexto pré-clínico, são o ácido gama-aminobutírico, ou GABA (63), o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2, ou IGF-2 (64) e os inibidores das caspases efetoras (38).

13.2 - Bioencapsulação

A bioencapsulação consiste em envolver células num invólucro formado por uma matriz ou membrana polimérica (65). Tem o objetivo de proteger o enxerto do sistema imunitário do recetor, dispensando do recurso a imunossupressores, tornando assim o transplante de ilhéus um tratamento mais atrativo. O enxerto fica separado do resto do organismo por uma cápsula impermeável aos componentes maiores do sistema imunitário, nomeadamente, as células e os anticorpos, que têm entre 150-900 KDa. Por outro lado, moléculas de menor peso molecular, nomeadamente, os nutrientes, como a glicose, o oxigénio e as hormonas, como a insulina, que tem à volta de 6 KDa, conseguem atravessar a cápsula (66). Pelos seus menores pesos moleculares, algumas quimiocinas e citocinas também podem atravessar a cápsula. Apesar do barramento da passagem de linfócitos T ser o mais importante fator no imunoisolamento, as menores moléculas a poderem passar pela cápsula deverão ter cerca de 150 KDa, que corresponde ao peso molecular da imunoglobulina G. Este limiar associa-se a melhor proteção imunitária *in vivo* (67).

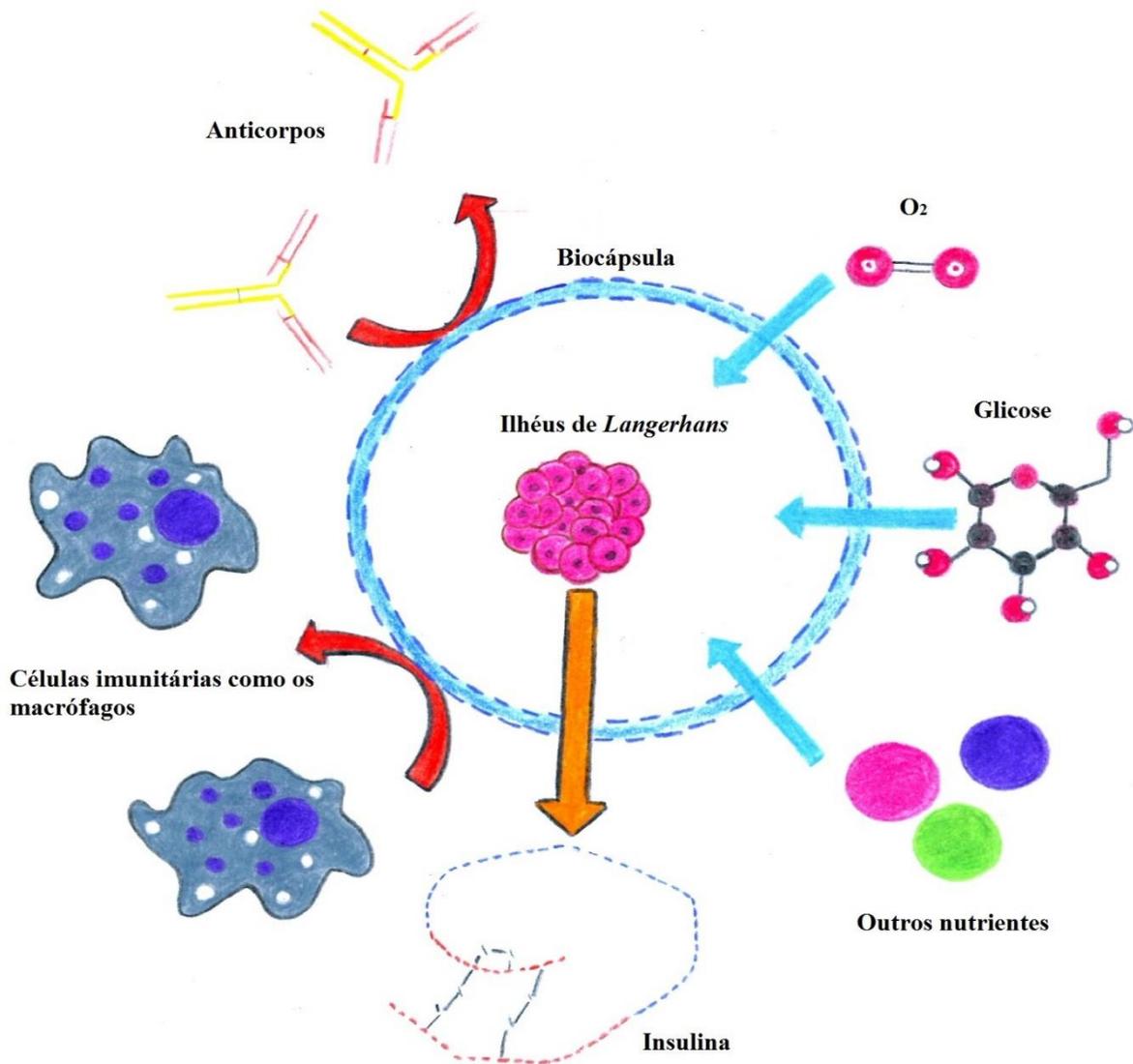


Figura 4: Desenho esquemático a ilustrar o princípio da bioencapsulação. As moléculas com maiores dimensões, como os anticorpos, e as células imunitárias, como os macrófagos e os linfócitos T não conseguem penetrar no espaço intra-capsular, onde se encontram os ilhéus. Estes continuam a receber oxigénio, glicose e outros nutrientes, com baixo peso molecular e, a insulina produzida pelos ilhéus consegue atravessar a biocápsula e ser distribuída pelo corpo pela circulação. Imagem desenhada pelo autor do artigo, com base em *Krishnan et al.* (67).

Existem 4 formas principais de encapsulação: a macroencapsulação, a microencapsulação, a encapsulação conformacional e a nanoencapsulação (69,70).

As macrocápsulas caracterizam-se por conterem grande número de ilhéus e podem ser intra ou extravasculares, dependendo de como se relacionam com a rede vascular circundante. Uma macrocápsula intravascular está ligada diretamente aos vasos do organismo recetor. Assim, o

sangue circula pelo interior oco das fibras que constituem a cápsula. Estando os ilhéus posicionados junto às fibras, só estão separados do interior das fibras por uma membrana, através da qual passam os componentes com baixo peso molecular (69,70). Contudo, as macrocápsulas intravasculares têm tido problemas técnicos, incluindo morte inesperada de um animal num ensaio experimental, e ainda carecem de maior desenvolvimento (69). Para além disso, também há o risco de formação de coágulos e eventual embolização (68), exigindo anti-coagulação sistémica (67). As macrocápsulas extravasculares não permitem uma comunicação tão significativa entre o sangue e os ilhéus, dificultando o acesso do O₂ e dos nutrientes e outras moléculas (68). Todavia, associam-se a menos complicações do que as intravasculares e por isso têm merecido maior estudo (67). As macrocápsulas podem ser implantadas, removidas e até mesmo recarregadas facilmente, o que é bastante útil para poder ir repondo a quantidade de ilhéus no enxerto.

As microcápsulas têm o formato de microesferas e contêm apenas desde um até poucos ilhéus (68). Em relação às macrocápsulas, as microcápsulas de alginato têm melhor resistência à resposta imunológica, são mais estáveis e asseguram melhor difusão de O₂ e outras moléculas entre o sangue e os ilhéus (67). Isto porque as pequenas esferas permitem melhor rácio entre a superfície disponível para trocas com o exterior e o volume de ilhéus contidos no interior do que as macrocápsulas (70). A principal desvantagem é que, ao contrário das macrocápsulas, as microcápsulas não são facilmente removidas (68). As microcápsulas são fáceis de construir e permitem mudar facilmente as suas características. Com todas as suas vantagens, as microcápsulas são a forma de encapsulação mais utilizada (73,74). Já se demonstrou, em animais diabéticos, que a microencapsulação com alginato consegue assegurar a sobrevivência de um enxerto sem recurso à imunossupressão (73). Também em humanos, já se registou diminuição das necessidades de insulina diária, produção de peptídeo C e menor incidência de hipoglicemia com microencápsulas, quer com aloenxertos (74), quer com xenoenxertos (75). São geralmente feitas de alginato ou gel de agarose (69,70), que são

hidrogéis naturais (76). Também podem ser usados materiais sintéticos, que também têm as suas vantagens mas, estimulam mais a resposta inflamatória local, que leva à fibrose no local da implantação e perda dos ilhéus (67). Apesar de serem menos espessas que as macrocápsulas, mesmo assim, as microcápsulas são grandes o suficiente para que não possam ser infundidas na veia porta (77), local preferido atualmente para o transplante de ilhéus. Não sendo possível implantar as microcápsulas no fígado, estas, tal como as macrocápsulas, têm de ser implantadas em locais como a cavidade peritoneal (70). Por isso um dos objetivos da investigação tem sido desenvolver cápsulas com um volume mínimo que permita a infusão intraportal (72,79). Duas tecnologias têm sobressaído: a encapsulação conformacional e a nanoencapsulação.

A encapsulação conformacional consiste em cápsulas individuais, para cada ilhéu, que se adaptam, ou conformam, ao formato do ilhéu. Esta técnica possibilita a criação de muito pequenas cápsulas que podem ser infundidas na veia porta (68). Basicamente, o volume das cápsulas conformacionais praticamente só corresponde ao volume do ilhéu e da pequena espessura da cápsula. Também possibilita a criação de cápsulas com espessuras bastante reduzidas que permitem uma boa difusão de O₂ para os ilhéus e uma melhor resposta insulínica a uma prova de tolerância à glicose (78), que é um dos problemas das outras formas de encapsulação mais tradicionais (79). Esta cápsula é elaborada com um polímero de polietileno glicol. Experiências anteriores em humanos não tiveram sucesso (68). Porém, recentemente, conseguiu-se controlar a glicemia em modelos murinos diabéticos com alotransplantes em cápsulas conformacionais (78). A figura 4 ilustra os 3 tipos de biocápsulas até agora mencionados.

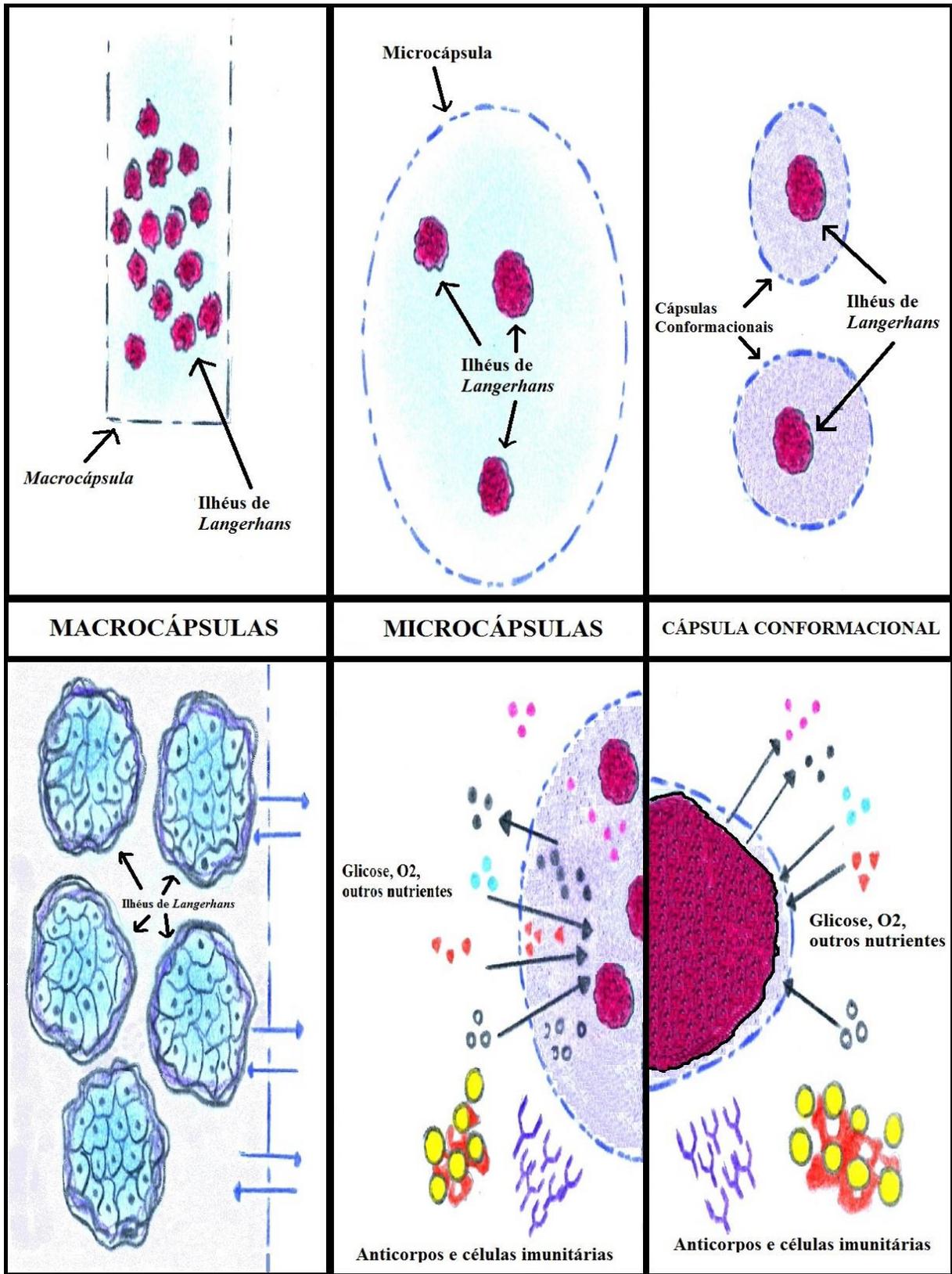


Figura 5: Desenho esquemático de 3 tipos diferentes de biocápsulas. Em baixo, com uma vista mais ampliada em relação à de cima. À esquerda vê-se uma macrocápsula. As macrocápsulas contém numerosos ilhéus. No centro observa-se uma microcápsula. Este tipo de biocápsulas tem desde um até poucos ilhéus. À direita, estão duas cápsulas conformacionais, com uma delas ampliada em baixo. Estas cápsulas adaptam-se à superfície do ilhéu, deixando muito pouco espaço, funcionalmente inútil, entre as células e a interface com o meio exterior, melhorando a difusão de moléculas entre o meio exterior e o ilhéu e, permitindo a sua infusão na veia porta. Imagem desenhada pelo autor.

A nanoencapsulação, ou encapsulação camada a camada, é feita pela colocação alternada de polímeros de cargas opostas, ora negativas, ora positivas, sobre a superfície dos agregados celulares, conseguindo cápsulas com espessuras na ordem dos nanômetros (77). Deste modo, estas cápsulas podem ser implantadas em locais com melhor aporte sanguíneo, como o fígado, onde as microcápsulas e as macrocápsulas não podem ser colocadas (80). Para além desta vantagem, a espessura muito reduzida da cápsula melhora a difusão através desta. Tudo isto contribui para melhorar a secreção de insulina em resposta à glicose, a nutrição dos ilhéus e a remoção de metabolitos (68). As nanocápsulas podem conter fármacos, enzimas, ou outros que atuem sobre o meio que rodeia o enxerto, modulando a resposta inflamatória local e melhorando a sobrevivência do enxerto (77). As nanocápsulas também podem ser peguiladas de forma a imunisolarem melhor (81). Em modelos murinos diabéticos, já se conseguiu a euglicemia com alotransplantes de ilhéus nanoencapsulados, sem recurso a imunossupressão (81).

13.3 - Locais Alternativos de Implantação

Desde os trabalhos iniciais de *Lacy et al.* (13), que os sinusóides hepáticos têm sido preferidos, quer em animais quer em humanos, como o local de implantação dos ilhéus. Por um lado, o fígado é um alvo essencial da insulina enquanto hormona e, por isso, os ilhéus ficam assim localizados num sítio estratégico para desempenhar a sua ação endócrina. Por outro lado, a veia porta e os seus ramos providenciam um acesso venoso relativamente fácil e seguro (36). No entanto, as limitações atuais da sobrevivência dos ilhéus devem fazer refletir sobre o ambiente que o fígado confere aos ilhéus. Logo após a infusão dos ilhéus no sangue portal, as suas células são alvo da reação inflamatória hemo-mediada imediata. Depois, também são atacadas pelas células de *Kupffer* e pelas células *natural killer* hepáticas (58). As células também se perdem pela hipóxia (82). Durante o isolamento dos ilhéus, as collagenases digerem a rede vascular que sustenta as células. Por isso, quando as células são transplantadas, vão sofrer por hipoxia nos primeiros 10-14 dias, até que se revascularizem

(58). Os próprios ilhéus podem contribuir para a hipóxia, ao ficarem aprisionados em veias intra-hepáticas de pequeno calibre, podendo ocluir os vasos, e causar alguma isquemia hepática e, até isquemia dos próprios ilhéus (83).

O fígado é um dos primeiros órgãos a entrar em contacto com as toxinas e fármacos absorvidos pelo trato digestivo, acumulando-se na veia porta uma grande quantidade de substâncias tóxicas para as células beta. Sendo o fígado o principal destoxicante do organismo humano, as toxinas quando passam pelos ilhéus implantados no fígado, não estão ainda metabolizadas e podem lesar as células dos ilhéus. Administrando oralmente sirolimus e tacrolimus, que constam do protocolo de *Edmonton*, demonstrou-se, em modelos animais (84) e em humanos (85), que a concentração do sirolimus e do tacrolimus na veia porta pode chegar a ser até cerca do triplo da concentração na circulação sistémica. Estas concentrações, *in vitro*, são tóxicas para as células beta (66,67). Também há que ter em conta que, pela maior concentração intra-hepática de fármacos imunossuppressores, o transplante de ilhéus associado a outros transplantes fica limitado. Por exemplo, a associação entre transplante renal e transplante intra-hepático de ilhéus leva a um dilema: utilizamos doses calibradas para atingir uma concentração sérica que proteja eficazmente o enxerto renal e sujeitamos os ilhéus intra-hepáticos a uma concentração potencialmente tóxica de imunossuppressores para as células beta ou, utilizamos doses inferiores de imunossuppressores, poupando os ilhéus transplantados a alguma toxicidade mas, reduzimos a proteção do rim transplantado (16)? Além disto, como já foi referido anteriormente, a infusão na veia porta associa-se a alguns riscos e complicações como a hemorragia e a trombose.

Outra razão para procurar outros locais é o facto de que a localização intra-hepática dos ilhéus limita a função das células alfa, produtoras de glucagina, hormona fundamental na resposta à hipoglicemia. Demonstrou-se que quer em autoenxertos e aloenxertos em humanos (68,69) quer em modelos animais (89), que os ilhéus implantados intra-hepaticamente não conseguem

expressar uma resposta fisiológica da secreção de glucagina à hipoglicemia. No entanto, com outros estímulos, como a arginina, a secreção de glucagina segue um padrão fisiológico. Uma explicação possível para esta limitação é a teoria do fluxo de glicose intra-hepática. Numa situação de hipoglicemia, independentemente das células alfa, o sistema nervoso simpático, mediante a ação direta sobre o fígado e a libertação de catecolaminas, promove a glicogenólise hepática, aumentando assim a concentração intra-hepática de glucose antes desta ser distribuída pelo corpo através do sistema circulatório (90). Segundo a teoria do fluxo de glicose intra-hepática (91), a grande quantidade de glicose que se acumula no fígado entra em contacto com as células alfa, que estão na periferia dos ilhéus, transmitindo a estas um sinal de glicose mais elevada do que na verdade está na circulação sistémica, frenando assim a libertação de glucagina. Esta teoria foi testada num modelo animal por *Zhou et al.* (91). Alguns animais receberam aloenxertos no fígado e, outros receberam aloenxertos em localizações extra-hepáticas. Em todos os animais com enxertos extra-hepáticos verificou-se uma secreção fisiológica de glucagina em resposta a hipoglicemia induzida pela insulina, ao contrário do que se passou nos animais com enxertos intra-hepáticos. Estes animais, com ilhéus intra-hepáticos, foram depois sujeitos a um jejum prolongado, de forma a esgotar as reservas hepáticas de glicogénio e assim limitar a capacidade do fígado de realizar a glicogenólise. Nestas circunstâncias, observou-se uma secreção de glucagina, ao contrário do que se passara em condições pré-jejum. Voltando a nutrir os animais e a repor as reservas de glicogénio, verificou-se o desaparecimento da secreção de glucagina em resposta à hipoglicemia. Estes resultados apoiam a teoria do fluxo de glicose intra-hepático.

A preservação da função das células alfa é bastante importante e caso seja conseguida, será mais uma razão a justificar a decisão de realizar um transplante de ilhéus. Ao fim de 5 anos de DM 1, a grande maioria dos doentes não consegue desenvolver uma secreção de glucagina apropriada em resposta a uma situação de hipoglicemia (92), colocando-os em risco de sofrerem episódios graves, eventualmente fatais, de hipoglicemia. Por esta razão, um

transplante de ilhéus extra-hepático, mesmo que não consiga assegurar a secreção de insulina suficiente para manter os pacientes insulino-independentes, se conseguir garantir uma secreção apropriada de glucagina face a situações de hipoglicemia, já poderá ser, eventualmente, considerado um transplante com sucesso parcial. É preciso ter em conta que um dos motivos para realizar transplante de ilhéus é a alta frequência de hipoglicemia grave em doentes com DM 1 e, nesse caso, o transplante extra-hepático de ilhéus poderá cumprir melhor esse desiderato do que o transplante intra-hepático de ilhéus, apesar deste já demonstrar eficácia na prevenção da hipoglicemia grave (9), dado que a secreção de insulina é fisiológica e é regulada pelos níveis de glicemia, ao contrário do que se passa com a insulina exógena.

Finalmente, para avaliar o estado e uma eventual rejeição pode ser necessário fazer uma biópsia. Os ilhéus intra-hepáticos são de difícil avaliação por biópsia, exigindo uma punção hepática, com os seus potenciais riscos. Ainda pior, os ilhéus distribuem-se difusamente pelos vários segmentos hepáticos, sendo impossível com uma só biópsia avaliar bem o que se passa com a maioria dos ilhéus. Pelo contrário, um implante subcutâneo é muito mais acessível para biópsias.

Consequentemente, nos anos recentes, têm sido estudados locais alternativos para implantar o enxerto de ilhéus, tais como a subcápsula renal, o trato genito-urinário, os testículos, o timo, a submucosa gástrica, a câmara ocular anterior, os músculos esqueléticos, a medula óssea, o peritoneu, a bursa omental e o espaço subcutâneo (93). Estes cinco últimos já foram testados em humanos (94). Por enquanto, o fígado permanece o local mais utilizado (51). No entanto, num estudo de *Bellin et al* (95), que comprovou os resultados obtidos por *Zhou et al* (91) em animais, comprovou-se a capacidade dos enxertos extra-hepáticos em assegurar uma resposta da glucagina à hipoglicemia. Os autores do estudo dizem mesmo que se deve considerar a hipótese de sempre que se realize um transplante intra-hepático de ilhéus, este se acompanhe

de um transplante de cerca de 100.000 a 150.000 ilhéus para um local não hepático, para garantir uma resposta das células alfa à hipoglicemia (95). O local ideal deve reunir as seguintes condições: 1) acesso anatómico fácil para implantação e, se necessário, biópsia; 2) ter drenagem portal; 3) seja possível alterar o microambiente que rodeia o enxerto e 4) seja acessível para avaliação imagiológica (94). Em relação a estas, a bursa omental tem a vantagem clara de ter uma drenagem portal mas, tem um acesso mais difícil do que o espaço subcutâneo ou que o espaço intramuscular. Ambos pela sua excelente acessibilidade têm recebido bastante interesse. A drenagem portal é importante para que haja a metabolização de alguma insulina no fígado antes de chegar à circulação sistémica. Sem passar pelo fígado primeiro, pode haver o risco de hiperinsulinismo e, secundariamente, surgimento de resistência a ação da insulina (96). Na tabela 12 resumam-se as principais características, favoráveis e desfavoráveis, do músculo estriado esquelético e do espaço subcutâneo como locais de implantação dos ilhéus.

	Músculo Estriado Esquelético e Espaço Subcutâneo
Características favoráveis	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Local fácil para colocar o enxerto, com cirurgia minimamente invasiva e anestesia local (83). ➤ Complicações raras, previsíveis e de fácil tratamento: hemorragia local, hematoma, abscesso (83). ➤ Fácil de biopsar (97). ➤ Como não é intravascular, os ilhéus não sofrem reação inflamatória hemo-mediada imediata (58). ➤ Possibilidade de implantar enxertos macro ou microencapsulados (83).
Características desfavoráveis	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Local de risco significativo de hipóxia do enxerto. Ainda é necessário investigar métodos de resolver este problema (58). ➤ Eficácia baixa ainda, inferior ao transplante intra-hepático, provavelmente por problemas na neovascularização. Ainda carece de maior investigação para tornar o enxerto mais viável (83). ➤ A drenagem sistémica (não portal) tem o risco de hiperinsulinismo e desenvolvimento de resistência à insulina. É necessário investigar se isto será um risco significativo (96).

Tabela 12: Resumo das características a favor e contra a implantação de ilhéus de *Langerhans* no músculo estriado esquelético e no espaço subcutâneo. À frente de cada frase está a referência bibliográfica respetiva.

Os enxertos intra-musculares têm melhores resultados quando são implantados em músculos mais pequenos e quando ficam difusamente distribuídos pelo músculo, e não concentrados num só sítio (98). Mesmo assim, o transplante subcutâneo e o intra-muscular, pela sua baixa eficácia, ainda estão longe da aplicabilidade clínica (58). Também já se realizou um autotransplante de ilhéus bem sucedido para a medula óssea, sem efeitos adversos registados (99). Dado que se demonstrou que a cotransplantação de ilhéus com células da medula óssea pode melhorar a eficácia do transplante para outras localizações (57), é legítimo pensar que a medula óssea poderá ser um bom sítio para acolher os ilhéus.

13.4 - A escassez de órgãos e dadores e soluções inovadoras para este problema

13.4.1 - Fontes atuais de ilhéus e as suas limitações

Atualmente, tanto o transplante de pâncreas como o de ilhéus pancreáticos são efetuados com recurso a aloenxertos, obtidos a partir de dadores em morte cerebral, que servem de fonte de vários órgãos para transplante (40,79). Isto é problemático, atendendo a que o número de dadores é claramente ultrapassado pelo número de doentes com DM 1 (7). Portanto, imaginando um contexto em que o transplante de ilhéus é claramente superior à terapêutica médica, mesmo assim, o transplante, com as fontes atuais de ilhéus, não conseguiria substituir a insulino-terapia, dada a falta de dadores. Para ilustrar este problema, há cerca de 1,5 milhões de pessoas com DM 1 nos EUA. No ano de 2013, apenas se registaram cerca de 6871 de potenciais dadores não vivos de pâncreas. E mesmo assim, deste volume de dadores só foi possível utilizar o pâncreas de 1169 dadores (101). Tendo em mente que, por enquanto, o transplante de órgão permanece a ter melhores resultados do que o transplante de ilhéus, os pâncreas obtidos de dadores são preferencialmente alocados para o transplante de órgão sólido e não para o transplante de ilhéus (100). Porém, como já foi mencionado, em termos de resultados, o transplante de ilhéus está-se a aproximar do transplante de órgão. Se o

transplante de ilhéus se superiorizar ao de órgão, a prioridade na utilização de órgãos doados poderá começar a ser atribuída ao de ilhéus. Outra alteração possível que pode ser feita para otimizar os recursos atuais é a utilização de pâncreas de doadores sem batimento cardíaco. Antes da introdução do conceito de morte cerebral, os doadores não vivos de órgãos tinham de ser todos por morte circulatória, ou seja, doadores sem batimento cardíaco. O problema destes órgãos é que são sujeitos a isquemia por insuficiência circulatória, ao contrário dos doadores em morte cerebral. Com a possibilidade de uso de doadores em morte cerebral, a maioria dos transplantes de órgão passaram a ser realizados com enxertos obtidos desses doadores. Isto também se verifica no transplante de pâncreas, pelo risco de que a isquemia das células exócrinas cause uma pancreatite e assim se danifique o potencial aloenxerto. Todavia, se isto se aplica no transplante de órgão, não se parece verificar no transplante de ilhéus. Num estudo publicado em 2003 (102), comparou-se a qualidade *in vitro e in vivo*, em modelo murino, dos ilhéus obtidos de doadores em morte cerebral e a de doadores sem batimento cardíaco e concluiu-se que esta é semelhante. Chegou-se mesmo a transplantar um doente com DM 1 com ilhéus de dador sem batimento cardíaco e este atingiu o estado de euglicemia insulino independente. Portanto, aqui temos duas medidas que, com os recursos atuais, permitem aumentar o número de doadores.

13.4.2 - Estratégias alternativas: a xenotransplantação

A xenotransplantação, ou transplantação heteróloga, consiste no transplante de enxertos de uma espécie diferente. No caso dos ilhéus, o animal mais estudado tem sido o porco. Os porcos têm um pâncreas anatómica e fisiologicamente semelhante ao pâncreas humano e, a insulina porcina é biologicamente ativa no ser humano (103). Para além disso, os porcos reproduzem-se facilmente e crescem de forma rápida, sendo fácil juntar uma grande quantidade de animais. A xenotransplantação ainda está em fase experimental em modelos animais. O modelo mais usado é o xenotransplante de porco para um primata não humano (104). Já se comprovou que os xenoenxertos nos primatas não humanos conseguem manter-se

funcionais e assegurar um controlo glicémico razoável (105). Vários autores (82,85,86) sugerem que se comece a estudar a xenotransplantação em humanos, atendendo aos bons resultados obtidos em animais. Todavia, ainda se colocam vários problemas. O mais importante é a imunogenicidade dos xenoenxertos. Nos modelos animais, a maior sobrevivência dos enxertos associou-se a regimes de imunossupressão mais intensos do que aqueles que são utilizados nos alotransplantes (101). Assim, estes regimes poderão ter uma toxicidade relevante nos humanos. Para além disso, a maioria destes regimes utilizam anticorpos monoclonais que não estão aprovados para uso em humanos (101). Um exemplo é o anticorpo anti-CD154, que não pode ser usado pelo seu efeito tromboembólico (104). Uma questão pertinente é se a carga imunossupressora necessária para viabilizar um xenoenxerto não acarretará uma toxicidade tal que suplantaria qualquer benefício da xenotransplantação?

Uma estratégia alternativa é a modificação genética dos ilhéus porcinos, de forma a melhorar a sua implantação e a sua sobrevivência. Embora seja tecnicamente mais complexa, parece ser muito mais prometedora do que a imunossupressão farmacológica. A manipulação genética das células porcinas permite eliminar epitopos, os determinantes antigénicos, que são alvos do sistema imunitário do hospedeiro, fazendo o *knockout* dos genes dos epitopos (108). Também é possível acrescentar genes humanos ao genoma porcino, que codificam proteínas com um efeito regulador sobre o sistema imunitário (109). Como existem incompatibilidades entre o sistema de coagulação humano e o porcino, que podem comprometer a sobrevivência dos xenoenxertos, também devem ser integrados genes reguladores da coagulação (110). Estas manipulações genéticas ainda têm de ser extensamente estudadas em animais, para testar a sua segurança e valor terapêutico (101). A verdade é que ainda conhecemos pouco dos efeitos que esta manipulação genética pode ter sobre as células. Há o receio legítimo de que algumas alterações possam induzir a malignização das células. Para além destes receios, existem também outras pontas soltas nesta área. Uma delas é até que ponto os xenoenxertos se adaptam bem à fisiologia humana (111). Por exemplo, *in vitro*, em relação às células beta

humanas, as células porcinas são menos sensíveis aos níveis de glicose e segregam menor quantidade de insulina para uma mesma quantidade de glicose (112). Por isto, provavelmente, a dose de xenoilhéus a administrar em humanos terá de ser maior do que no caso de aloenxertos. Outra questão a ter em conta é o risco dos xenoenxertos serem veículos de zoonoses. Muitas das doenças comuns que afetam o ser humano são transmitidas pelos animais (113), de formas, como a via aérea, que não são acessíveis para todos os agentes patogénicos. Porém, ao colocarmos um enxerto de um animal podemos estar a possibilitar a transmissão de agentes potencialmente patogénicos para os humanos (114). Um dos grupos de agentes mais temidos são os retrovírus porcinos endógenos. Apesar de já estarem a ser desenvolvidas estratégias para combater estes vírus, ainda é necessário produzir maior volume de investigação neste campo antes da xenotransplantação prosseguir, até porque os recetores vão estar sob imunossupressão (101).

Em conclusão, a xenotransplantação ainda está longe de constituir uma alternativa viável aos aloenxertos. Porém, tem a vantagem de ser uma fonte ilimitada e barata de ilhéus. Uma associação de grande interesse será a bioencapsulação de xenoenxertos. Se esta resultar, poderemos oferecer a todos os pacientes uma cura funcional da DM 1, livre de insulina exógena e de imunossupressão.

13.4.3 - Estratégias alternativas: a medicina regenerativa e a engenharia celular

As células estaminais embrionárias (CEE) humanas têm o potencial para produção em grande escala de células beta. Através da manipulação com fatores de crescimento e de transcrição é possível conseguir que uma CEE origine uma célula produtora de insulina (CPI), biologicamente similar às células beta (115). Uma equipa de investigadores já reportou a formação de CPI funcionais em animais com diabetes induzida (116). Atualmente, existem estudos a decorrer em humanos (94). Um dos problemas é o risco de crescimento descontrolado das células, podendo-se formar tumores, incluindo teratomas (115). Como estas

células são obtidas de embriões humanos, o seu uso é limitado, sobretudo por questões éticas e logísticas, como a necessidade de criação de bancos de células estaminais. Para contornar estas questões, também se investiga a possibilidade de desdiferenciar as células somáticas, regredindo as células no seu estado maturativo até chegarem a células estaminais pluripotentes (115). São as células estaminais pluripotentes por indução (CEPI). Com a sobre-expressão de 4 fatores de transcrição é possível reprogramar geneticamente uma célula somática diferenciada e produzir uma célula pluripotente, semelhante às células estaminais embrionárias (113,114). Se já se conseguiu criar um rato adulto fértil a partir de uma CEPI (118), originalmente um fibroblasto, provavelmente será possível conseguir células semelhantes às células beta pancreáticas, apesar dos vários problemas técnicos ainda a resolver (117). Com estas células estaminais poderemos ter uma fonte infinita de células produtoras de insulina.

Uma maneira de otimizar o alotransplante de ilhéus com a engenharia celular é a estimulação da proliferação de células nos pâncreas obtidos de dadores. Descobriu-se que os ductos pancreáticos possuem células precursoras que se podem diferenciar em CPI. Com a correta estimulação, pode-se aproveitar não só os ilhéus dos dadores, como também os restantes tecidos pancreáticos, como os ductos, onde existam estas células precursoras, de modo a obter um número total maior de ilhéus (94). Por outro lado, estas células também podem ser usadas para produzir CPI *in vitro*. As células exócrinas pancreáticas e até os hepatócitos também podem ser usados para produzir CPI, através da transdiferenciação, ou seja, a conversão direta de uma célula madura somática para um outro tipo de célula madura somática, sem passar pelo passo intermédio de uma célula pluripotente, mediante um processo de reprogramação genética (100).

14 - O PAPEL DAS CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMATOSAS

Outra forma de incrementar o sucesso do transplante de ilhéus é co-transplantar células estaminais mesenquimatosas da medula óssea. Estas células exercem efeitos imunomoduladores sobre o microambiente que as rodeia, inibindo a função de várias células imunitárias prejudiciais para o enxerto e promovendo a expansão da população de linfócitos T reguladores. Para além disto, estas células também libertam mediadores pró-angiogénicos que estimulam a revascularização e aumentam assim o aporte de O₂ para os ilhéus (57). Também as células hematopoiéticas estaminais têm sido estudadas, mas, num ensaio clínico não demonstraram benefício e há o receio realista do risco de degeneração maligna. Mais investigação tem de ser efetuada nesta área (57).

Na tabela 13, resumem-se os principais problemas do transplante de ilhéus aventados e as soluções discutidas, anteriormente.

Problema	Soluções propostas	
Resposta imunitária do sistema inato (por exemplo, a reação inflamatória hemo-mediada imediata)	<i>Ex vivo</i> (alteração dos ilhéus do dador)	<i>In vivo</i> (controlo da resposta do recetor)
	Heparinização do meio ou da superfície das células	Etanercept
		Anakinra
		Alemtuzumab
	Co-cultura de células endoteliais e células dos ilhéus	Teplizumab
		Globulina anti-timócito
Eliminação das células dendríticas dos ilhéus dos dadores	Reparixina	
	Rapamicina e IL-10	
Apoptose das células beta	Análogos do GLP-1 (exemplo: exenatide)	
	GABA	
	IGF-2	
	Inibidores das caspases efetoras	
Necessidade de imunossupressão crónica	Bioencapsulação	
Hipóxia e necessidade de revascularização	Co-transplantação de células estaminais mesenquimatosas estaminais da medula óssea	
Problema do fígado como local de implantação dos ilhéus, que coloca as seguintes dificuldades: ➤ Reação imunitária local	Transplante para localizações extra-hepáticas Locais estudados em humanos:	

<ul style="list-style-type: none"> ➤ Acumulação de fármacos e toxinas, que lesionam os ilhéus ➤ Riscos e complicações da punção portal ➤ Limitação da função das células alfa ➤ Não é acessível para biópsias 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ medula óssea ➤ peritoneu ➤ bursa omental ➤ espaço subcutâneo ➤ músculo estriado esquelético
Escassez de doadores	<p style="text-align: center;">Otimização dos recursos atuais:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Dar prioridade ao TI ➤ Utilização de doadores sem batimento cardíaco (em morte circulatória) <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <p style="text-align: center;">Xenotransplantação</p> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <p style="text-align: center;">Células estaminais embrionárias humanas</p> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <p style="text-align: center;">Células estaminais pluripotentes por indução</p> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <p style="text-align: center;">Estimulação da proliferação de células nos pâncreas obtidos de doadores</p>

Tabela 13: Quadro-resumo dos principais problemas a resolver do transplante de ilhéus e as soluções propostas para cada um.

15 - CONCLUSÕES

A ideia de transplantar tecido pancreático para curar a DM 1 precede a utilização da insulina exógena. Contudo, esta só começou a ter relevo com o avanço científico, sobretudo na área do controlo da reação imunitária. O alotransplante de ilhéus pancreáticos é um procedimento minimamente invasivo que, tem por objetivo conciliar o excelente controlo glicémico conseguido com a reposição de células beta feita pelo alotransplante de órgão inteiro, mas evitando os riscos colocados por este. O TI almeja conseguir uma cura funcional para a DM 1 e, relativamente à insulino-terapia exógena, o transplante de ilhéus tem o potencial de conseguir o controlo glicémico sem o risco de gerar episódios de hipoglicemia e não exigir a monitorização e administração diária de insulina, aumentando a qualidade de vida. Desde o surgimento do protocolo de *Edmonton*, que esta área tem conhecido consideráveis desenvolvimentos.

Neste momento, o TI é feito, geralmente de forma experimental, em doentes com hipoglicemia grave iatrogénica, causada pela insulino-terapia, ainda mais se associada à

insuficiência autonómica, ou seja, sem sinais de alarme. Também pode estar indicado em pacientes que não conseguem cumprir a insulino-terapia, ou com grande labilidade glicémica ou com progressão rápida das complicações crónicas, apesar de terapêutica médica adequada, podendo ser realizado oportunisticamente associado ao transplante de rim, em caso de doença renal crónica terminal, cobrindo um só regime imunossupressor os dois enxertos. Até hoje foram realizados cerca de 3500 ilhéus. O maior registo internacional do TI é efetuado pelo *Collaborative Islet Transplant Registry*. Este define 5 parâmetros de avaliação do sucesso da eficácia do TI: a insulino-independência, a produção de peptídeo-C, o nível de HbA1c, a glicemia em jejum e a presença ou ausência de episódios de hipoglicemia. A insulino-independência, inicialmente de duração geralmente inferior a 1 ano, tem vindo a crescer em durabilidade, tendo num estudo recente apresentado taxa de insulino-independência de 60%, cinco anos após o alotransplante. Reunidas as melhores circunstâncias, o CITR estima que 90% dos alotransplantados mantém a insulino-independência durante, pelo menos, 7 anos. Mesmo nos doentes em que volta a ser necessária a insulina exógena, um enxerto ainda funcional melhora o controlo glicémico, reduz a labilidade glicémica e diminui muito consideravelmente o risco de hipoglicemia grave, constituindo uma solução eficaz, embora com maior custo económico do que a terapêutica médica. Contudo, estes resultados só são obtidos com o uso de agentes imunossupressores. Muitos profissionais de saúde e doentes não querem trocar um esquema de insulino-terapia, mesmo que mais complexo de executar, mas relativamente seguro, com poucos efeitos secundários e já com muita experiência acumulada, por um esquema de imunossupressão crónica, sem que antes se assegure de forma cabal e categórica, em ensaios clínicos randomizados, com amostras significativas, a superior e durável eficácia do TI face à insulino-terapia e, se demonstre que esse benefício clínico suplante a toxicidade provocada pela supressão do sistema imunitário. Por isso, num artigo publicado em 2010, *Robertson* (31) compara o sucesso parcial do TI com um copo meio cheio, que outros poderão perspetivar como um copo meio vazio, ou seja, um insucesso

parcial, e diz que é preciso encontrar estratégias para encher o que resta do copo. Alguns autores (119) opinam que antes de se procurar soluções para encher o que resta do copo, é preciso demonstrar em vários ensaios clínicos randomizados, com grupos de controlo de pacientes sob terapêutica médica, o maior benefício do TI. De fato, ainda há carência destes ensaios clínicos. Contudo, muitos estudos com doentes selecionados, já demonstraram bons indicadores em termos de insulinoindpendência a longo prazo, baixa labilidade glicémica, redução do risco de complicações agudas, sobretudo no evitamento da hipoglicemia, e até efeitos positivos nas complicações crónica da DM 1, com um estudo a revelar maior benefício do TI na retinopatia do que a insulino-terapia. Para além disso, ao passo que a insulino-terapia exógena já atingiu muito do seu potencial, o TI ainda tem um longo caminho a percorrer. Por isso, apesar da comparação ser essencial, deve ser sempre tido em conta o diferente estágio de desenvolvimento das duas terapias. Assim, conclui-se que um dos principais entraves à maior utilização do TI é a necessidade de controlo da resposta imunitária ao aloenxerto, que atualmente só pode ser feita com recurso a agentes imunossupressores com uma toxicidade não desprezável. Nesse sentido, a bioencapsulação é uma área muito interessante. Estas biocápsulas permitem o isolamento dos ilhéus das células e imunoglobulinas do sistema imunitário, mas, não impedindo a passagem de O₂, nutrientes e a saída de insulina. Dentro dos 4 tipos de cápsulas que existem, as mais experimentadas atualmente são as microcápsulas. Contudo, as cápsulas conformacionais e as nanocápsulas parecem ser mais promissoras dado que têm a vantagem de ter uma difusão muito melhor das moléculas, com espaço muito reduzido entre os ilhéus e o meio exterior e podem ser infundidas no espaço porta. Apesar dos sinusóides hepáticos serem o local preferido, também têm sido pesquisados locais alternativos de implantação dos ilhéus, com grande interesse devotado para o espaço subcutâneo e o intramuscular, que são de acesso mais fácil e seguro do que a veia porta, quer para transplantar quer para biopsar para diagnóstico de rejeição. Para além disso, aqui os ilhéus não sofrem a reação inflamatória hemo-mediada imediata que sofrem nos vasos porta e, aqui

as células alfa dos ilhéus apresentam uma boa resposta secretória aos estímulos, ao contrário da localização intra-hepática. O principal problema destes locais é a falta de vascularização e morte por hipoxia dos aloenxertos.

Antes mesmo de se desenvolver a resposta imunitária do sistema adaptativo, já muitos ilhéus se perderam com a reação do sistema imunitário inato. Ou seja, é necessário controlar a reação do sistema inato e a do sistema adaptativo. Para a primeira utilizam-se inibidores do TNF-alfa e da interleucina-1beta. Outra forma de perda de ilhéus é a apoptose destes ao se implantarem. Neste campo, os análogos do GLP-1, como o exenatide, têm demonstrado efeitos positivos, apesar destes serem parcialmente inibidos pelo sirolimus.

Outra grande limitação do TI é a falta de órgãos. Cada indivíduo alotransplantado geralmente precisa de mais do que uma infusão de ilhéus e o número atual de dadores não serve para as necessidades, caso o TI viesse a tornar-se uma terapêutica corrente, mesmo otimizando a seleção e o uso de órgãos doados. Assim, há que procurar fontes alternativas de células beta, tais como os xenoenxertos porcinos que, para já, são impraticáveis atendendo a sua imunogenicidade. Também há o risco das zoonoses, como os retrovírus porcinos endógenos.

Outra forma, mais fácil, de obter quantidades virtualmente ilimitadas de células produtoras de insulina é através das células estaminais, que poderão advir das células estaminais embrionárias humanas, uma fonte mais restringida, de células estaminais pluripotentes por indução, que são células maduras desdiferenciadas, das células precursoras dos ductos pancreáticos ou da transformação induzida das células exócrinas em células endócrinas.

Se estas dificuldades forem ultrapassadas, e se consiga ter um procedimento seguro, minimamente invasivo, isento de agentes imunossupressores e com uma fonte abundante de ilhéus, o TI poderá constituir a opção terapêutica de 1ª linha em muitos doentes com DM 1.

16 - LISTA DE ABREVIATURAS

CITR – *Collaborative Islet Transplantation Registry*

DM – diabetes *mellitus*

DM 1 – diabetes *mellitus* tipo 1

EUA – Estados Unidos da América

GLP-1 – *glucagon-like peptide 1*

HbA1c – hemoglobina glicada

HLA – *human leucocyte antigen*

HSSAIA – hipoglicemia sem sinais de alarme associada à insuficiência autonómica

IL-2 – interleucina 2

MeSH – *medical subject headings*

RM – ressonância magnética

TC – tomografia computadorizada

TI – transplante de ilhéus

TOS – transplante de órgão sólido

17 - AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo seu apoio.

Agradeço à Helena Donato e ao Paulo Donato pelo seu apoio e conselhos.

Agradeço à Márcia Rodrigues pela sua ajuda no desenho das figuras.

Agradeço à Dra. Margarida Bastos pela sua orientação.

Agradeço ao Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, pela oportunidade de realizar este trabalho.

18 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 7th edition [Internet]. Brussels, Belgium; 2015. Available from: <http://www.diabetesatlas.org>
2. World Health Organization. Global report on diabetes [Internet]. 2016. Available from: <http://www.who.int/diabetes/global-report/en/>
3. Patterson CC, Gyürüs E., Rosenbauer J, Cinek O, Neu A, Schober E, et al. Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989-2008: Evidence of non-uniformity over time in rates of increase. *Diabetologia*. 2012. p. 2142–7.
4. Bruno G, Runzo C, Cavallo-Perin P, Merletti F, Rivetti M, Pinach S, Novelli G, Trovati M, Cerutti F PG. Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults aged 30-49 years: the population-based registry in the province of Turin, Italy. *Diabetes Care*. 2005;28(11).
5. Liese AD, D'Agostino Jr RB, Hamman RF, Kilgo PD, Lawrence JM, Liu LL, et al. The Burden of Diabetes Mellitus Among US Youth: Prevalence Estimates From the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Pediatrics*. 2006;118(4):1510–8.
6. Observatório Nacional da Diabetes SP de D. Diabetes: Factos e Números – O Ano de 2014–Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes 11/2015 [Internet]. 2015. Available from: <http://www.spd.pt/index.php/observatorio-mainmenu-330>
7. Niclauss N, Meier R, Bédât B, Berishvili E, Berney T. Beta-Cell Replacement: Pancreas and Islet Cell Transplantation. 2016;31:146–62.
8. Barton FB, Rickels MR, Alejandro R, Hering BJ, Wease S, Naziruddin B, et al. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. *Diabetes Care*. 2012;35(7):1436–45.
9. Collaborative Islet Transplant Registry. Collaborative Islet Transplant Registry Eighth Annual Report [Internet]. 2014. Available from: <http://www.citregistry.org/>
10. Rosenfeld L. Insulin: discovery and controversy. *Clin Chem*. 2002;48(12):2270–88.
11. Karamanou M. Milestones in the history of diabetes mellitus: The main contributors. *World J Diabetes*. 2016;7(1):1.
12. Srinivasan P, Huang GC, Amiel S a, Heaton ND. Islet cell transplantation. *Postgrad Med J*. 2007;83:224–9.
13. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*. 1967;16(1):35–9.
14. Ballinger WF, Lacy PE. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* [Internet].
15. Largiadèr F, Kolb E BU. A long-term functioning human pancreatic islet allotransplant. *Transplantation*. 1980;29(1):76–7.
16. Robertson RP. Islet Transplantation for Type 1 Diabetes, 2015: What Have We Learned From Alloislet and Autoislet Successes? *Diabetes Care*. 2015;38(6):1030–5.
17. Brendel M, Hering B, Schulz A BR. International Islet Transplant Registry report. Giessen, Germany: University of Giessen, 1999:1-20. 1999.

18. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, 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):230–8.
19. Huang HH, Ramachandran K, Stehno-Bittel L. A replacement for islet equivalents with improved reliability and validity. *Acta Diabetol*. 2013;50(5):687–96.
20. Control TD, Trial C. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med*. 1993;329(14):977–86.
21. Nathan DM, Cleary PA, Backlund J-YC, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2005;353(25):2643–53.
22. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2016. *Diabetes Care* [Internet]. 2016;39 Suppl 1(January):S1–112. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26696680>
23. Honkasalo MT, Elonheimo OM, Sane T. Severe hypoglycaemia in drug-treated diabetic patients needs attention: a population-based study. *Scand J Prim Health Care*. 2011;29(3):165–70.
24. Sutherland DE, Gruessner RW, Dunn DL, Matas AJ, Humar A, Kandaswamy R, et al. Lessons learned from more than 1,000 pancreas transplants at a single institution. *Ann Surg*. 2001;233(4):463–501.
25. Nery M. Hipoglicemia como Fator Complicador no Tratamento do Diabetes Melito Tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metabólica*. 2008;52(2):288–98.
26. Robertson RP. Islet transplantation as a treatment for diabetes - work in progress. *N Engl J Med*. 2004;350:694–705.
27. Sollinger HW, Odorico JS, Becker YT, D'Alessandro AM, Pirsch JD. One thousand simultaneous pancreas-kidney transplants at a single center with 22-year follow-up. *Ann Surg*. 2009;250(4):618–30.
28. Pancreas and islet transplantation in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29(4):935.
29. Vantyghem MC, Press M. Management strategies for brittle diabetes. *Annales d'endocrinologie*. 2006. p. 287–96.
30. Cartwright A, Wallymahmed M, MacFarlane IA, Wallymahmed A, Williams G, Gill G V. The outcome of brittle type 1 diabetes-a 20 year study. *Qjm*. 2011;104(7):575–9.
31. Robertson RP. Islet transplantation a decade later and strategies for filling a half-full glass. *Diabetes*. 2010. p. 1285–91.
32. Robertson RP. Pancreas and Islet Transplantation in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29(4 (April)).
33. Dixon S, Tapping CR, Walker JN, Bratby M, Anthony S, Boardman P, et al. The role of interventional radiology and imaging in pancreatic islet cell transplantation. *Clinical Radiology*. 2012. p. 923–31.
34. Robertson RP, Lanz KJ, Sutherland DER, Seaquist ER, Paul R. Relationship between diabetes and obesity 9 to 18 years after hemipancreatectomy and transplantation in

- donors and recipients. *Transplantation*. 2002;73(5):736–41.
35. Villiger P, Ryan EA, Owen R, O’Kelly K, Oberholzer J, Saif F Al, et al. Prevention of bleeding after islet transplantation: Lessons learned from a multivariate analysis of 132 cases at a single institution. *Am J Transplant*. 2005;5(12):2992–8.
 36. Low G, Hussein N, Owen RJT, Toso C, Patel VH, Bhargava R, et al. Role of imaging in clinical islet transplantation. *Radiographics*. 2010;30(2):353–66.
 37. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*. 2005;54(7):2060–9.
 38. Citro A, Cantarelli E, Piemonti L. Anti-inflammatory strategies to enhance islet engraftment and survival. *Curr Diab Rep*. 2013;13(5):733–44.
 39. Wu Q, Zhang M, Qin Y, Jiang R, Chen H, Xu X, et al. Systematic review and meta-analysis of islet autotransplantation after total pancreatectomy in chronic pancreatitis patients. *Endocr J*. 2015;62(3):227–34.
 40. Robertson RP, Davis C, Larsen J, Stratta R, Sutherland DER. P a n c reas and Islet Transplantation for Patients With Diabetes. *Diabetes Care*. 2000;23(1 (January)).
 41. Johnson JD, Ao Z, Ao P, Li H, Dai LJ, He Z, et al. Different effects of FK506, rapamycin, and mycophenolate mofetil on glucose-stimulated insulin release and apoptosis in human islets. *Cell Transplant*. 2009;18(8):833–45.
 42. Paty BW, Harmon JS, Marsh CL, Robertson RP. Inhibitory effects of immunosuppressive drugs on insulin secretion from HIT-T15 cells and Wistar rat islets. *Transplantation*. 2002;73(3):353–7.
 43. Bhargava R, Senior PA, Ackerman TE, Ryan EA, Paty BW, Lakey JRT, et al. Prevalence of Hepatic Steatosis after Islet Transplantation and Its Relation to Graft Function. *Diabetes*. 2004;53(5):1311–7.
 44. Senior PA, Shapiro AM, Ackerman TE, Ryan EA, Paty BW, Bhargava R. Magnetic resonance-defined perinephric edema after clinical islet transplantation: a benign finding associated with mild renal impairment. *Transplantation*. 2004;78(6):945–8.
 45. Alfadhli E, Koh A, Albaker W, Bhargava R, Ackerman T, McDonald C, et al. High prevalence of ovarian cysts in premenopausal women receiving sirolimus and tacrolimus after clinical islet transplantation. *Transpl Int*. 2009;22(6):622–5.
 46. Toso C, Vallee JP, Morel P, Ris F, Demuylder-Mischler S, Lepetit-Coiffe M, et al. Clinical magnetic resonance imaging of pancreatic islet grafts after iron nanoparticle labeling. *Am J Transplant*. 2008;8(3):701–6.
 47. Gruessner RWG, Gruessner AC. What defines success in pancreas and islet transplantation - Insulin independence or prevention of hypoglycemia? A review. In: *Transplantation Proceedings*. 2014. p. 1898–9.
 48. Tezza S, Ben Nasr M, Vergani A, Valderrama Vasquez A, Maestroni A, Abdi R, et al. Novel immunological strategies for islet transplantation. *Pharmacol Res*. Elsevier Ltd; 2014;98:69–75.
 49. Qi M, Kinzer K, Danielson KK, Martellotto J, Barbaro B, Wang Y, et al. Five-year follow-up of patients with type 1 diabetes transplanted with allogeneic islets: the UIC experience. *Acta Diabetol*. 2014;51(5):833–43.

50. Ryan E a, Shandro T, Green K, Paty BW, Senior P a, Bigam D, et al. Assessment of the severity of hypoglycemia and glycemic lability in type 1 diabetic subjects undergoing islet transplantation. *Diabetes*. 2004;53(4):955–62.
51. Bassi R, Fiorina P. Impact of islet transplantation on diabetes complications and quality of life. *Curr Diab Rep*. 2011;11(5):355–63.
52. Tharavanij T, Betancourt A, Messinger S, Cure P, Leitao CB, Baidal DA, et al. Improved long-term health-related quality of life after islet transplantation. *Transplantation*. 2008;86(9):1161–7.
53. Thompson DM, Begg IS, Harris C, Ao Z, Fung M a, Meloche RM, et al. Reduced progression of diabetic retinopathy after islet cell transplantation compared with intensive medical therapy. *Transplantation*. 2008;85(10):1400–5.
54. Seaquist ER, Anderson J, Childs B, Cryer P, Dagogo-Jack S, Fish L, et al. Hypoglycemia and diabetes: A report of a workgroup of the American diabetes association and the endocrine society. *Diabetes Care*. 2013;36(5):1384–95.
55. Wallner K, Shapiro AMJ, Senior PA, McCabe C. Cost effectiveness and value of information analyses of islet cell transplantation in the management of “unstable” type 1 diabetes mellitus. *BMC Endocr Disord*. *BMC Endocrine Disorders*; 2016;1–16.
56. Pareta RA, Farney AC, Opara EC. Design of a bioartificial pancreas. *Pathobiology*. 2013;80(4):194–202.
57. Sakata N, Goto M, Yoshimatsu G, Egawa S, Unno M. Utility of co-transplanting mesenchymal stem cells in islet transplantation. *World J Gastroenterol*. 2011;17(47):5150–5.
58. Sakata N, Aoki T, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Hata T, Katayose Y, et al. Strategy for clinical setting in intramuscular and subcutaneous islet transplantation. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2014. p. 1–10.
59. Cabric S, Sanchez J, Lundgren T, Foss A, Felldin M, Källén R, et al. Islet surface heparinization prevents the instant blood-mediated inflammatory reaction in islet transplantation. *Diabetes*. 2007;56(8):2008–15.
60. Kim JH, Oh BJ, Lee HN, Park HS, Park SG, Park KS. Endothelial colony-forming cell coating of pig islets prevents xenogeneic instant blood-mediated inflammatory reaction. *Cell Transplant*. 2011;20(11-12):1805–15.
61. Ueno T, Tanaka K, Jurewicz M, Murayama T, Guleria I, Fiorina P, et al. Divergent role of donor dendritic cells in rejection versus tolerance of allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(3):535–44.
62. Wang Y, Qi M, McGarrigle JJ, Rady B, Davis ME, Vaca P, et al. Use of glucagon-like peptide-1 agonists to improve islet graft performance. *Curr Diab Rep*. 2013;13(5):723–32.
63. Purwana I, Zheng J, Li X, Deurloo M, Son DO, Zhang Z, et al. GABA promotes human beta-cell proliferation and modulates glucose homeostasis. *Diabetes*. 2014;63(12):4197–205.
64. Hughes A, Rojas-Canales D, Drogemuller C, Voelcker NH, Grey ST, Coates PTH. IGF2: An endocrine hormone to improve islet transplant survival. *Journal of Endocrinology*. 2014.

65. Steele JAM, Hall JP, Poncelet D, Neufeld RJ. Therapeutic cell encapsulation techniques and applications in diabetes. *Adv Drug Deliv Rev.* Elsevier B.V.; 2014;67-68:74–83.
66. Dufrane D, Gianello P. Macro-or microencapsulation of pig islets to cure type 1 diabetes. *World J Gastroenterol.* 2012;18(47):6885–93.
67. Krishnan R, Alexander M, Robles L, Foster CE, Lakey JRT. Islet and stem cell encapsulation for clinical transplantation. *Rev Diabet Stud.* 2014;11(1):84–101.
68. Yang HK, Yoon KH. Current status of encapsulated islet transplantation. *J Diabetes Complications.* Elsevier Inc.; 2015;29(5):737–43.
69. Scharp DW, Marchetti P. Encapsulated islets for diabetes therapy: History, current progress, and critical issues requiring solution. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2014. p. 35–73.
70. van Schilfgaarde R, de Vos P. Factors influencing the properties and performance of microcapsules for immunoprotection of pancreatic islets. *J Mol Med (Berl).* 1999;77(1):199–205.
71. Krishnamurthy N V, Gimi B. Encapsulated cell grafts to treat cellular deficiencies and dysfunction. *Crit Rev Biomed Eng.* 2011;39(6):473–91.
72. Khanna O, Larson JC, Moya ML, Opara EC, Brey EM. Generation of Alginate Microspheres for Biomedical Applications. *J Vis Exp.* 2012;(66):1–5.
73. Lee S-H, Hao E, Savinov AY, Geron I, Strongin AY, Itkin-Ansari P. Human beta-cell precursors mature into functional insulin-producing cells in an immunoisolation device: implications for diabetes cell therapies. *Transplantation.* 2009;87(7):983–91.
74. Calafiore R, Basta G, Luca G, Lemmi A, Montanucci MP, Calabrese G, et al. Microencapsulated Pancreatic Islet Allografts Into Nonimmunosuppressed Patients With Type 1 Diabetes: First two cases. *Diabetes Care.* 2006;29(1):137–8.
75. Elliott RB, Escobar L, Calafiore R, Basta G, Garkavenko O, Vasconcellos A BC. Transplantation of micro- and macroencapsulated piglet islets into mice and monkeys. *Transpl Proc.* 2005;37(1):466–9.
76. Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews.* 2001. p. 1869–79.
77. Wilson JT, Cui W, Chaikof EL. Layer-by-layer assembly of a conformal nanothin PEG coating for intraportal islet transplantation. *Nano Lett.* 2008;8(7):1940–8.
78. Tomei A a, Manzoli V, Fraker C a, Giraldo J, Velluto D, Najjar M, et al. Device design and materials optimization of conformal coating for islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(29):10514–9.
79. de Vos P, Vegter D, Strubbe JH, de Haan BJ van SR. Impaired glucose tolerance in recipients of an intraperitoneally implanted microencapsulated islet allograft is caused by the slow diffusion of insulin through the peritoneal membrane. *Transpl Proc.* 1997;29(1-2):756–7.
80. Wilson JT, Chaikof EL. Challenges and emerging technologies in the immunoisolation of cells and tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2008. p. 124–45.
81. Dong H, Fahmy TM, Metcalfe SM, Morton SL, Dong X, Inverardi L, et al. Immuno-

- Isolation of Pancreatic Islet Allografts Using Pegylated Nanotherapy Leads to Long-Term Normoglycemia in Full MHC Mismatch Recipient Mice. *PLoS One*. 2012;7(12).
82. Lablanche S, Cottet-Rousselle C, Argaud L, Laporte C, Lamarche F, Richard MJ, et al. Respective effects of oxygen and energy substrate deprivation on beta cell viability. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2015;1847(6-7):629–39.
 83. Sakata N, Obenaus A, Chan N, Mace J, Chinnock R, Hathout E. Factors affecting islet graft embolization in the liver of diabetic mice. *Islets*. 2009;1(1):26–33.
 84. Shapiro a MJ, Gallant HL, Hao EG, Lakey JRT, McCready T, Rajotte R V, et al. The portal immunosuppressive storm: relevance to islet transplantation? *Ther Drug Monit*. 2005;27(1):35–7.
 85. Desai NM, Goss J a, Deng S, Wolf B a, Markmann E, Palanjian M, et al. Elevated portal vein drug levels of sirolimus and tacrolimus in islet transplant recipients: local immunosuppression or islet toxicity? *Transplantation*. 2003;76(11):1623–5.
 86. Nir T, Melton D a, Dor Y. Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. *J Clin Invest*. 2007;117(9):2553–61.
 87. Paty BW, Ryan EA, Shapiro AMJ, Lakey JRT, Robertson RP. Intrahepatic islet transplantation in type 1 diabetic patients does not restore hypoglycemic hormonal counterregulation or symptom recognition after insulin independence. *Diabetes*. 2002;51(12):3428–34.
 88. Rickels MR, Schutta MH, Mueller R, Markmann JF, Barker CF, Naji A, et al. Islet cell hormonal responses to hypoglycemia after human islet transplantation for type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(11):3205–11.
 89. Gupta V, Wahoff DC, Rooney DP, Poutout V, Sutherland DER, Kendall DM, et al. The defective glucagon response from transplanted intrahepatic pancreatic islets during hypoglycemia is transplantation site-determined. *Diabetes*. 1997;46(1):28–33.
 90. Hoffman RP. Sympathetic mechanisms of hypoglycemic counterregulation. *Curr Diabetes Rev*. 2007;3(3):185–93.
 91. Zhou H, Zhang T, Bogdani M, Oseid E, Parazzoli S, Vantyghem MC, et al. Intrahepatic glucose flux as a mechanism for defective intrahepatic islet alpha-cell response to hypoglycemia. *Diabetes*. 2008;57(6):1567–74.
 92. McCrimmon R. The mechanisms that underlie glucose sensing during hypoglycaemia in diabetes. *Diabetic Medicine*. 2008. p. 513–22.
 93. Cantarelli E, Piemonti L. Alternative transplantation sites for pancreatic islet grafts. *Current Diabetes Reports*. 2011. p. 364–74.
 94. Fotino N, Fotino C, Pileggi A. Re-engineering islet cell transplantation. *Pharmacol Res*. Elsevier Ltd; 2015;98(2015):76–85.
 95. Bellin MD, Parazzoli S, Oseid E, Bogachus LD, Schuetz C, Patti ME, et al. Defective glucagon secretion during hypoglycemia after intrahepatic but not nonhepatic islet autotransplantation. *Am J Transplant*. 2014;14(8):1880–6.
 96. Guan J, Zucker PF, Behme MT, Zhong R, Atkison P, Dupré J. Insulin resistance prevented by portal delivery of insulin in rats with renal subcapsular islet grafts. *Diabetes*. 1997;46(3):372–8.

97. Espes D, Eriksson O, Lau J, Carlsson P-O. Striated Muscle as Implantation Site for Transplanted Pancreatic Islets. *J Transplant*. 2011;2011:1–6.
98. Christoffersson G, Carlsson PO, Phillipson M. Intramuscular islet transplantation promotes restored islet vascularity. *Islets*. 2011;3(2):69–71.
99. Maffi P, Balzano G, Ponzoni M, Nano R, Sordi V, Melzi R, et al. Autologous pancreatic islet transplantation in human bone marrow. *Diabetes*. 2013;62(10):3523–31.
100. Khosravi-Maharlooei M, Hajizadeh-Saffar E, Tahamtani Y, Basiri M, Montazeri L, Khalooghi K, et al. Therapy of endocrine disease: Islet transplantation for type 1 diabetes: So close and yet so far away. *Eur J Endocrinol*. 2015;173(5):R165–83.
101. Samy KP, Martin BM, Turgeon NA, Kirk AD. Islet cell xenotransplantation: A serious look toward the clinic. *Xenotransplantation*. 2014. p. 221–9.
102. Markmann JF, Deng S, Desai NM, Huang X, Velidedeoglu E, Frank A, et al. The use of non-heart-beating donors for isolated pancreatic islet transplantation. *Transplantation*. 2003;75(9):1423–9.
103. Van Der Windt DJ, Bottino R, Kumar G, Wijkstrom M, Hara H, Ezzelarab M, et al. Clinical islet xenotransplantation: How close are we? *Diabetes*. 2012. p. 3046–55.
104. Marigliano M, Bertera S, Grupillo M, Trucco M, Bottino R. Pig-to-nonhuman primates pancreatic islet xenotransplantation: An overview. *Current Diabetes Reports*. 2011. p. 402–12.
105. Bühler L, Deng S, O’Neil J, Kitamura H, Koulmanda M, Baldi A, et al. Adult porcine islet transplantation in baboons treated with conventional immunosuppression or a non-myeloablative regimen and CD154 blockade. *Xenotransplantation*. 2002;9(1):3–13.
106. Groth CG. Heading towards an application of pig-to-man islet transplantation. *Xenotransplantation*. 2009;16(4):193.
107. Cooper DK, Bottino R, Satyananda V, Wijkstrom M TM. Toward clinical islet xenotransplantation – are revisions to the IXA guidelines warranted? *Xenotransplantation*. 2013;20(2):68–74.
108. Lutz AJ, Li P, Estrada JL, Sidner RA, Chihara RK, Downey SM, Burlak C, Wang ZY, Reyes LM, Ivary B, Yin F, Blankenship RL, Paris LL TA. Double knockout pigs deficient in N-glycolylneuraminic acid and Galactose α -1,3-Galactose reduce the humoral barrier to xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2013;20(1):27–35.
109. Ko N, Lee J-W, Hwang SS, Kim B, Ock SA, Lee S-S, et al. Nucleofection-mediated alpha1,3-galactosyltransferase gene inactivation and membrane cofactor protein expression for pig-to-primate xenotransplantation. *Anim Biotechnol*. 2013;24(4):253–67.
110. Miwa Y, Yamamoto K, Onishi A, Iwamoto M, Yazaki S, Haneda M, Iwasaki K, Liu D, Ogawa H, Nagasaka T, Uchida K, Nakao A, Kadomatsu K KT. Potential value of human thrombomodulin and DAF expression for coagulation control in pig-to-human xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2010;17(1):26–37.
111. Dufrane D GP. Pig islet for xenotransplantation in human: structural and physiological compatibility for human clinical application. *Transpl Rev*. 2012;26(3):183–8.
112. Mueller KR, Balamurugan AN, Cline GW, Pongratz RL, Hooper RL, Weegman BP, et

- al. Differences in glucose-stimulated insulin secretion in vitro of islets from human, nonhuman primate, and porcine origin. *Xenotransplantation*. 2013;20(2):75–81.
113. Centers for Disease Control and Prevention. Zoonotic Diseases [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention website. 2013 [cited 2016 Jun 10]. Available from: <http://www.cdc.gov/onehealth/zoonotic-diseases.html>
 114. Mueller NJ, Takeuchi Y, Mattiuzzo G, Scobie L. Microbial safety in xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011;16(2):201–6.
 115. Newby BN, Terada N, Mathews CE. In search of a surrogate: engineering human beta cell lines for therapy. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(8):378–80.
 116. Schulz TC, Young HY, Agulnick AD, Babin MJ, Baetge EE, Bang AG, et al. A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS One*. 2012;7(5).
 117. Bilic J, Izpisua Belmonte JC. Concise review: Induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells: Close enough or yet too far apart? *Stem Cells*. 2012;30(1):33–41.
 118. Boland MJ, Hazen JL, Nazor KL, Rodriguez AR, Gifford W, Martin G, et al. Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2009;461(7260):91–4.
 119. Cravedi P, Remuzzi A, Remuzzi G. Comment on: Robertson (2010) Islet Transplantation a Decade Later and Strategies for Filling a Half-Full Glass. *Diabetes*;59:1285-1291. *Diabetes*. 2010;59(9):e13–e13 1p.