

## MESA 3: PRESENTE Y FUTURO DE LAS TERAPIAS BIOLÓGICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1

**Expertos invitados:** Dr. Luis Grosembacher, Dr. Federico Pereyra Bonnet

**Coordinadoras:** Carolina Muratore, María Laura Pomares

**Secretario:** Pablo Avila

**Integrantes:** Carolina Muratore, Pablo Avila, María Laura Pomares, José Retamosa, Gabriela Cuzziol, Alejandra Maldini, Rubén De Marco, Susana Apoloni, Virginia Rama, Martín Maraschio, Pablo Retamosa, Martín Berta, Natalia Mabel Blanco, Patricia Susana Romero

### Conflictos de intereses

Los autores declaran no presentar conflictos de intereses en relación al tema tratado en este artículo.

### TEMARIO

**INTRODUCCIÓN:** Avances terapéuticos biológicos.  
¿De qué hablamos?

#### 1. TRASPLANTES

##### A) Trasplante de páncreas

- Fundamento. Estadísticas a nivel mundial y en Argentina. Objetivos. Indicaciones y contraindicaciones.

- Modalidades.

- Tx simple (páncreas solo): en pacientes con DM1.
- Tx doble (reno-pancreático): en pacientes con DM1 ó DM2.

##### B) Trasplante de islotes pancreáticos

- Fundamento. Estadísticas a nivel mundial y en Argentina. Objetivos. Indicaciones. Beneficios. Dificultades y limitaciones. Evolución posterior.

- Modalidades: Tx de islotes solos/trasplante de islotes junto con trasplante renal.

- Protocolo de Edmonton.

##### C) Rol del médico diabetólogo dentro del equipo multidisciplinario de trasplantes

#### 2. PROCEDIMIENTOS INMUNOLÓGICOS, GENÉTICOS Y DE TERAPIA CELULAR DIRIGIDOS AL TRATAMIENTO DE LA DIABETES TIPO 1

##### A) Tratamientos para frenar la apoptosis y agresión autoinmune de la célula beta

##### B) Uso de células madre

- Introducción y fundamento. Objetivos. Mecanismos del potencial efecto beneficioso. Efectos adversos. Experiencia a nivel mundial y en Argentina.

- Tipos de células madre: adultas/*Stem Cells* embrionarias.

- Reprogramación genética de fibroblastos hacia células productoras de insulina.

#### 3. PÁNCREAS ARTIFICIAL

- Introducción y fundamento del páncreas artificial: páncreas artificial bihormonal (*closed-loop*). Objetivos del tratamiento. Indicaciones y contraindicaciones. Beneficios. Experiencia a nivel mundial.

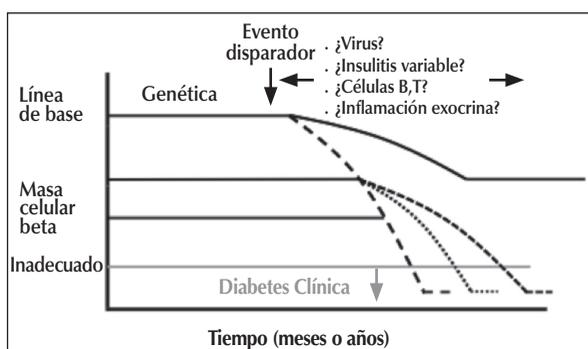
### INTRODUCCIÓN

Si bien las primeras descripciones de la diabetes mellitus (DM) se remontan a más de 3.500 años (Papiro de Ebers, siglo XV a.C.), el rol decisivo del páncreas en la fisiopatología de esta metabolopatía fue establecido recién hace unos 125 años gracias a los experimentos de von Mering y Minkowski (1889). Tomando como base estudios preliminares (Langerhans, Laguesse, Zuelzer y sobre todo Paulescu), el aislamiento y la preparación de la insulina en una formulación farmacéutica (Banting, Best, MacLeod y Collip), que permitieron su introducción terapéutica en 1922, constituyen un punto de inflexión de la historia de la DM<sup>1</sup>. Las décadas siguientes presenciaron el advenimiento de nuevas insulinas, fármacos hipoglucemiantes y otros descubrimientos e invenciones destinados a combatir la patología y sus complicaciones crónicas y ofrecer una mejor calidad de vida a las personas con diabetes. Desde entonces, las nuevas tecnologías y las innovaciones terapéuticas se han ido complementando, comprendiendo la fisiopatología de la DM y la necesidad de un enfoque multifactorial. Más recientemente en la evolución de la terapéutica de la DM (a partir de mediados de 1970) aparecen en las últimas décadas las terapias biológicas (trasplante

de páncreas y de islotes)<sup>2</sup> y los avances de la bioingeniería como el páncreas artificial, cuyo desarrollo continúa activamente en la actualidad<sup>3</sup>.

Como es fehacientemente conocido en la historia natural de la enfermedad, la existencia de un terreno de predisposición genética, sumada a la aparición de factores desencadenantes aún no del todo conocidos resultan en el proceso autoinmune subyacente a la DM1, con manifestaciones de citotoxicidad a nivel de los islotes (insulinitis) y aparición de anticuerpos detectables en sangre periférica. Estos componentes preceden a la aparición de los síntomas clásicos de DM1, momento en el cual se estima que alrededor de un 90% de las células  $\beta$  ha dejado de funcionar (parcial o totalmente)<sup>4</sup>. Se sabe, además, que el espectro de la DM1 de origen autoinmune es heterogéneo y según la edad de comienzo de la enfermedad (entre otros factores) se detectan diferencias significativas referidas a la intensidad del proceso autoinmune, la aparición de marcadores de autoinmunidad, a los mecanismos patogénicos implicados y a la cuantía y velocidad de destrucción de las células  $\beta$ <sup>5</sup>.

También se ha postulado en los últimos años que el declinamiento de la masa o de la función  $\beta$  celular podría ser intermitente y posiblemente episódico luego del evento desencadenante inicial, y que algunas células  $\beta$  pueden sobrevivir por décadas (Figura 1)<sup>6</sup>.



**Figura 1:** Modelo vigente de la patogénesis de la DM1 y su relación con la declinación de la masa de células  $\beta$ .

Las investigaciones actuales referidas a la DM1 contemplan, entre otros, los siguientes factores:

- Características inmunológicas de las células insulares: niños vs adultos.
- Mecanismos de la respuesta inmune: papel desencadenante de distintos virus, rol patogénico de interleuquinas (por ejemplo, TNF- $\alpha$ , interferón).

- Nuevos puntos de vista sobre el rol de la célula  $\beta$  en la DM1, tales como:

- Diferencias interindividuales en la masa de células  $\beta$ .
- Susceptibilidad de las células  $\beta$  a la destrucción citotóxica.
- Métodos de estudio de la masa de células  $\beta$  en humanos.
- Persistencia de las células  $\beta$  en algunos pacientes con DM1.
- Momento de inicio y velocidad de la pérdida de células  $\beta$ .
- Inducción de la proliferación de células  $\beta$  combinada con intervenciones sobre el sistema inmunológico.
- Esfuerzos para preservar la masa de células  $\beta$  y su capacidad metabólica<sup>5</sup>.

Se han realizado diversos intentos de intervención sobre el sistema inmunológico, dirigiendo el enfoque hacia la prevención y/o reversión de la DM1<sup>7,8,9,10</sup> (mediante el uso de ciclosporina A, anticuerpos monoclonales anti-CD3, globulinas antitímocito, insulina por vía oral, vacuna GAD65, Diapep 277<sup>®</sup>, vacuna BCG), esfuerzos que no han brindado hasta la fecha resultados alentadores.

La investigación actual se encuentra abocada a la protección de la masa de células  $\beta$ , actuando sobre la inmunidad a diferentes niveles, con el fin de preservar durante la mayor cantidad de tiempo posible la secreción de insulina y atenuando el daño sobre las células  $\beta$ .

Las terapias biológicas de la DM1 emergen actualmente como posibles tratamientos utilizados a nivel mundial y en nuestro país con resultados alentadores. Estos procedimientos, relacionados con el trasplante pancreático y de islotes, así como aquellos que se encuentran en investigación y desarrollo, serán motivo de la presente revisión.

## 1. TRASPLANTES

### A) TRASPLANTE DE PÁNCREAS

El trasplante de páncreas es el único tratamiento actualmente disponible que permite, a diferencia de la insulino terapia, restablecer la normoglucemia en forma estable, a largo plazo y con un riesgo de hipoglucemias prácticamente nulo en los pacientes con DM1<sup>11,12</sup>. El primer trasplante vascularizado de páncreas en un paciente con DM1 se concretó en la Universidad de Minnesota a mediados de 1960 (Kelly y Lillehei, 1966)<sup>13</sup>; en 1977, en la misma insti-

tución, tuvo lugar el primer trasplante de islotes de Langerhans<sup>14</sup>. Hasta la década de 1980 estos procedimientos estaban restringidos a unos pocos centros en Estados Unidos y Europa. La introducción de los inmunosupresores tacrolimus y micofenolato en 1994 dio lugar a una mejoría significativa en los resultados y por lo tanto se llevaron a cabo trasplantes en escala ascendente en varios países del mundo<sup>15</sup>. Según el Registro Internacional de Trasplante de Páncreas, se realizaron hasta el 31 de diciembre de 2012 más de 42.000 trasplantes de páncreas (27.000 en Estados Unidos y más de 15.000 en el resto del mundo)<sup>16</sup>. Según datos extraídos del boletín de trasplantes internacionales, en el año 2013 se concretaron 76 trasplantes pancreáticos de los cuales 74 fueron renopancreáticos y sólo dos de páncreas<sup>17</sup>.

El objetivo principal del trasplante es mejorar la calidad de vida de los pacientes con DM1 al promover la independencia de la insulina exógena, prevenir la aparición de las complicaciones crónicas (retinopatía, neuropatía, nefropatía y enfermedad macrovascular) y proteger el riñón eventualmente cotrasplantado del desarrollo de nefropatía<sup>18</sup>.

### **Tipos de trasplante e indicaciones**

Las distintas modalidades de trasplante de páncreas son trasplante simultáneo reno-pancreático (*simultaneous pancreas-kidney transplant* o SPK), páncreas después del trasplante de riñón (*pancreas after kidney transplant* o PAK) y el trasplante de páncreas solo o aislado (*pancreas transplant alone* o PTA). Estas modalidades son utilizadas en tres categorías principales de pacientes con DM:

- La primera categoría incluye a pacientes con uremia crónica (insuficiencia renal con FG <20 ml/min en prediálisis o diálisis) en quienes está indicada la modalidad SPK. Existe un consenso general en cuanto a que el trasplante de riñón es el mejor tratamiento de la nefropatía diabética avanzada secundaria a DM1 o DM2 en el tratamiento con insulina y con IMC <30kg/m<sup>2</sup>. De acuerdo a las evidencias existentes, es ésta la opción que ofrece una mayor supervivencia del paciente y del órgano trasplantado, así como una mejor calidad de vida. Esta modalidad constituye el 84% de todos los trasplantes de páncreas realizados en el mundo<sup>19</sup>. El paciente ya se encuentra obligado a inmunosupresión de por vida por el injerto renal de modo que sólo se agrega el riesgo quirúrgico del injerto pancreático. El éxito del SPK se traduce en liberar al paciente de la diálisis crónica y de la insulino-dependencia. Se ha visto un

aumento de la supervivencia del riñón trasplantado cuando se hace junto con el páncreas en el contexto de una nefropatía diabética avanzada.

- La segunda categoría incluye a pacientes post-urémicos que son sometidos a PAK. En el año 2012, el 9% de todos los trasplantes de páncreas correspondía a esta categoría de pacientes. Son personas que fueron inicialmente sometidas a trasplante renal de donante vivo o cadavérico, y que por mal control metabólico y/o por progresión de las complicaciones crónicas presentan indicación de PAK<sup>20</sup>. En pacientes con diabetes que han sido trasplantados con un riñón que está normo-funcionante y que no han tenido episodios de rechazo al mismo, el trasplante adicional y posterior (procedente de otro donante) ha sido recomendado por algunos centros, ya que el paciente está sometido a inmunosupresión de por vida, no suponiendo otro riesgo para el receptor que el del acto quirúrgico. De todas maneras, también debe tenerse en cuenta que la supervivencia del páncreas trasplantado en esta modalidad ha sido menor<sup>21</sup>. La decisión tiende a ser complicada y debe realizarse con una minuciosa consideración individual. La misma puede verse influenciada, por ejemplo, por la evaluación prequirúrgica de la función cardíaca del paciente: aquellos que no están en condiciones de tolerar una intervención quirúrgica prolongada como la que supone el trasplante doble, se beneficiarían con la modalidad secuencial (PAK).

- La tercera categoría incluye a pacientes con DM lábil sin uremia, que son candidatos a un trasplante de páncreas aislado o PTA. En el año 2012, el 7% de los trasplantes correspondió a esta categoría. Son pacientes que todavía no presentan nefropatía pero su control glucémico es extremadamente lábil pese a la correcta adherencia terapéutica. Sólo un 5-10% de los pacientes con DM1 corresponde a esta categoría. La indicación de PTA estaría dada cuando los efectos adversos de la inmunosupresión a largo plazo y los riesgos quirúrgicos no superan los riesgos atribuibles a la diabetes lábil y de las hipoglucemias asintomáticas<sup>22</sup>. De acuerdo con la recomendación de la Asociación Norteamericana de Diabetes (ADA) se indica en los casos de complicaciones metabólicas agudas, graves y reiteradas (hipoglucemia, hiperglucemia y cetoacidosis), problemas emocionales causados por la terapia con insulina exógena que son tan graves hasta el punto de ser incapacitantes y por el fracaso constante para prevenir com-

plicaciones agudas con el tratamiento insulínico<sup>23</sup>. Hay que tener un especial cuidado en la función renal ya que puede afectarse con el tratamiento inmunosupresor incluyendo a los inhibidores de la calcineurina como el tacrolimus<sup>24</sup>.

En la Tabla 1 se resumen las indicaciones de cada una de las modalidades de trasplante de páncreas para pacientes con DM1<sup>25</sup>.

#### **Trasplante simultáneo páncreas-riñón (SPK)**

1. Pacientes con diabetes mellitus tipo 1, péptido C <0,5 ng/ml.
2. Edad menor de 50 años (valor individualmente a pacientes mayores).
3. Criterios para trasplante renal (en Europa, aclaramiento de creatinina <30 ml/min).
4. Ausencia de vasculopatía periférica y coronariopatía severas.
5. Ausencia de neuropatía motora o autonómica incapacitante.
6. Ausencia de trastornos psiquiátricos o psicológicos severos.

#### **Trasplante de páncreas después de riñón (PAK)**

1. Diabetes mellitus tipo 1, péptido C <0,5 ng/ml.
2. Trasplante renal previo de donante vivo o donante cadavérico.
3. Función estable del injerto renal, con aclaramiento de creatinina >40 ml/min.
4. Diabetes inestable o mal control metabólico (HbA1c >8%).
5. Empeoramiento de las lesiones crónicas a pesar del tratamiento óptimo.
6. Fallo del injerto pancreático después de un TRP.

#### **Trasplante de páncreas aislado (PTA)**

1. Pacientes con diabetes tipo 1 con un aclaramiento de creatinina >60 ml/min y proteinuria <2 g/24 hs que presenten los siguientes criterios:
  - Complicaciones metabólicas frecuentes (hipoglucemia, hiperglucemia, cetoacidosis), que requieran asistencia en un centro de salud.
  - Problemas clínicos y emocionales derivados de la administración de la terapia insulínica que resulten incapacitantes.
  - Fallo en el control de la insulino terapia para prevenir complicaciones agudas.

#### **Selección del donante de páncreas**

Algunos centros realizan trasplante de segmentos de páncreas de pancreatectomías distales en donantes vivos, pero es mucho más frecuente la obtención a partir de donantes de páncreas cadavérico<sup>26</sup>. La selección de donantes de páncreas suele ser más estricta que para otros órganos; se deben evaluar cuidadosamente aquellas muertes con alteraciones circulatorias y descartar aquellos donantes potenciales con diabetes y/o que han sufrido un traumatismo pancreático. Es frecuente encontrar que el órgano no es viable por presentar un alto grado de fibrosis o depósitos lipídicos, por lo que en algunos centros se descartan también los donantes con IMC >30 kg/m<sup>2</sup> <sup>27</sup>.

#### **Selección del receptor del trasplante**

Los criterios para la selección del receptor son los siguientes:

- Pacientes con DM1 en rango de edad de entre 18 y 55 años.
- Ausencia de complicaciones generalizadas secundarias a diabetes.
- Ausencia de falla de órganos.
- Ausencia de enfermedad maligna o sin criterios de curación.
- Contraindicaciones para la inmunosupresión.
- Estabilidad emocional y social (para comprender los riesgos y beneficios de la cirugía y de la necesidad de inmunosupresión y sus efectos secundarios).

Los criterios de exclusión para los receptores son:

- Alteración de la función cardíaca (IAM reciente, angina inestable, ecocardiograma con fracción de eyección <50%).
- Trastorno psiquiátrico, abuso de alcohol o de sustancias ilícitas, falta de motivación.
- Presencia de infecciones, sepsis o tumores malignos.
- Obesidad (IMC > 30 kg/m<sup>2</sup>) (no constituye una contraindicación absoluta).

Otros criterios de exclusión relativos<sup>24</sup> están dados por el hallazgo de una serología positiva para el HIV, de un resultado positivo en pruebas cruzadas utilizando células T o por la presencia de DM2.

El trasplante en pacientes con DM2 constituye una indicación excepcional. Los criterios de indicación serían los mismos que en DM1 sumados a cinco años o más en tratamiento con insulina, necesidades de insulina >1 UI/kg/día, IMC < 30 kg/m<sup>2</sup> <sup>25</sup>.

**Tabla 1:** Modalidades de trasplante pancreático y sus indicaciones. Modificado de Montiel et al.<sup>25</sup>.

## Técnica quirúrgica

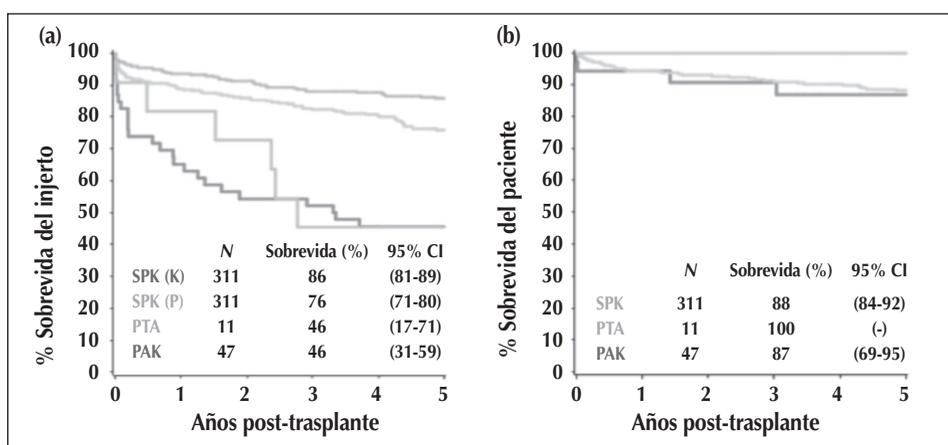
En la mayoría de los centros donde se realiza trasplante de páncreas se extrae el órgano completo con un segmento del duodeno del donante de aproximadamente de entre 5 y 7 cm. Se puede conservar con técnicas especiales hasta 24 hs pero en situación ideal el trasplante debe realizarse en un plazo de 9-12 hs de isquemia fría. El flujo arterial del órgano se obtiene de la arteria ílica común del receptor y el drenaje venoso se realiza a la vena ílica común<sup>28</sup>. Pocos centros utilizan el drenaje venoso directo a la vena porta, que se asociaría a un nivel más fisiológico de insulina circulante, aunque esto no ha reportado un beneficio significativo en la supervivencia del paciente y del órgano trasplantado<sup>29</sup> aportando una mayor incidencia de trombosis de la vena porta como complicación. La posibilidad de que esta hiperinsulinemia asociada al drenaje venoso sistémico, eludiendo el sistema porta, resulte en un incremento del riesgo de aterosclerosis no tiene, por el momento, una constatación fehaciente<sup>30</sup>.

El drenaje exocrino del páncreas se realizaba en 1990 anastomosando el duodeno del donante con la vejiga del receptor, con la ventaja de poder medir la amilasa urinaria como marcador bioquímico de la función pancreática<sup>31</sup>. Pero el drenaje

vesical ha evidenciado algunos inconvenientes metabólicos y urológicos como deshidratación, acidosis metabólica y cistitis. Por estas razones el drenaje vesical ha sido ampliamente reemplazado por el drenaje a yeyuno proximal del receptor. Esto resulta en una técnica más fisiológica, aunque se ha perdido el marcador bioquímico precoz para evidenciar el rechazo al trasplante que representaba la amilasa urinaria<sup>32,33</sup>.

## Resultado clínico del trasplante de páncreas

Datos del Registro Internacional de Trasplante de Páncreas muestran que la supervivencia de los pacientes es equivalente en todas las modalidades de trasplante de páncreas: 96% al año y 80% a los cinco años post-trasplante. La supervivencia del órgano trasplantado parece ser mayor cuando el trasplante es simultáneo con riñón, con un 89% de supervivencia en dicha modalidad al año, comparada con 82% en el trasplante aislado, y con una supervivencia a los cinco años de 71% y 58% respectivamente (Figura 2)<sup>34</sup>. La falla pancreática se define por la necesidad de tratamiento con insulina exógena, si bien esto no siempre representa la destrucción total de las células  $\beta$  del páncreas trasplantado.



**Figura 2:** Supervivencia del órgano trasplantado y de los pacientes según modalidad del trasplante<sup>34</sup>.

La pérdida inmunológica en el primer año post-trasplante sólo fue de 1,8, 3,7 y 6% para las modalidades SPK, PAK y PTA respectivamente. El trasplante de páncreas tiene de un 10 a un 20% de complicaciones quirúrgicas que requieren lapa-

rotomía. A pesar de ello este tipo de tratamiento, además de mejorar la calidad de vida, proporciona una mayor supervivencia en el paciente urémico con DM1, en comparación con el tratamiento dialítico o el trasplante de riñón solo<sup>35</sup>.

## B) TRASPLANTE DE ISLOTES PANCREÁTICOS

### Introducción

En la mayoría de los pacientes con DM1 la insulino terapia y el automonitoreo glucémico son suficientes para alcanzar un adecuado control metabólico. Sin embargo, uno de los principales efectos adversos asociados a la insulino terapia es la hipoglucemia, particularmente prevalente en aquellos pacientes con diabetes lábil o que presentan fallas autonómicas. Ante estos casos, el trasplante de islotes pancreáticos resulta un tratamiento alternativo e incluso prometedor.

El primer trasplante de islotes pancreáticos se realizó en 1894 en Bristol (Inglaterra), cuando Watson-Williams y Harshant trasplantaron fragmentos de páncreas de oveja por vía subcutánea a un joven que estaba muriendo debido a una cetoacidosis diabética. El paciente falleció a los tres días del xenotrasplante. Posteriormente, con el descubrimiento de la insulina, las investigaciones cesaron hasta inicios de 1970 cuando Ballinger y Lacy demostraron, en estudios realizados en animales con diabetes experimental, que el trasplante de islotes pancreáticos permitía alcanzar la normoglucemia. A fines de la década de 1980, Camillo Ricordi desarrolló exitosamente un método automatizado para el aislamiento de islotes pancreáticos humanos<sup>36,37,38</sup>.

Entre los años 1974 y 2000, 447 pacientes con DM1 recibieron trasplantes de islotes: menos del 10% permaneció insulino independiente y menos del 18% tuvo un péptido C detectable al año. El *Collaborative Islet Transplant Registry* (CITR) es el registro más grande de trasplante de islotes pancreáticos que concentra datos de 32 centros (27 americanos, 3 europeos y 2 australianos). Entre 1999 y 2009 se realizaron 481 trasplantes de islotes aislados (897 infusiones). El 65% de los pacientes permaneció insulino independiente por un año. Sólo en 2010 se realizaron 1.072 trasplantes de 1.087 donantes. La *Eurotransplant International Foundation* (organizaciones de Austria, Bélgica, Croacia, Alemania, Luxemburgo, Holanda y Eslovenia) registró, entre 2007 y 2011, 89 trasplantes en 54 receptores, con islotes obtenidos de 207 donantes<sup>37</sup>.

Un gran avance se logró a principios de este siglo con el Protocolo de Edmonton, elaborado por investigadores de la Universidad de Alberta (Canadá). Utilizando este procedimiento, Shapiro et al. lograron estados persistentes de normoglucemia con insulino independencia por más de un año en

siete pacientes con DM1<sup>39,40</sup>. Entre 1999 y 2004 se registraron en Alberta 65 casos con 128 infusiones, lográndose en el 15% insulino independencia al año y el 85% restante que volvió a la insulino terapia requirió una dosis menor de insulina por comparación a aquella administrada antes del trasplante<sup>38</sup>.

Los objetivos del trasplante de islotes pancreáticos son: estabilizar el control metabólico alcanzando la normoglucemia con insulino independencia; evitar o disminuir la presencia de hipoglucemias severas no percibidas; prevenir el desarrollo y/o progresión de complicaciones secundarias a la DM, y mejorar la calidad de vida de los pacientes<sup>37,41</sup>.

El páncreas debe obtenerse a partir de un donante multiorgánico a "corazón batiente," mayor de 20 años, con IMC normal o elevado, normoglucémico (HbA1c <6,0%), sin hipotensión o paro cardíaco y habiendo tenido mínimo requerimiento de soporte vasopresor<sup>36,37</sup>.

El páncreas es extraído junto con el duodeno y el bazo, colocándose inmediatamente en una solución de conservación refrigerada y rodeado de hielo. Un factor importante para preservar los islotes es el tiempo de isquemia fría que debe ser de 2 a 12 hs (ideal: 6-8hs). El páncreas se separa de los otros órganos y se coloca en una solución con colagenasa a fin de digerir el páncreas exocrino y seleccionar el páncreas endocrino. Los islotes digeridos se aíslan por centrifugación. Luego de la purificación, se colocan en cultivo celular 24-72 hs previas a realizar el trasplante. En este momento, además se evalúan características de la preparación del islote en términos de esterilidad, potencia, volumen, pureza, viabilidad, compatibilidad (sistema ABO) y masa mínima de islotes. En general, para alcanzar la normoglucemia la mayoría de los receptores requiere de dos a tres infusiones. Por otro lado, se estima que para lograr la insulino independencia se necesitan entre 5.000-10.000 equivalentes de islotes (IEQ) por kilogramo de peso del receptor y esto no se logra con un solo donante, siendo la provisión de este elevado número de islotes una de las principales limitaciones de este procedimiento<sup>36,37,42</sup>.

Finalmente los islotes se suspenden en una solución con heparina y se infunden por vía percutánea, bajo guía radioscópica, lentamente por gravedad dentro de la vena porta o por laparotomía canulando la vena mesentérica y de allí hasta alcanzar la vena porta. El flujo sanguíneo dentro de la vena lleva a los islotes desde los vasos tribu-

tarios hacia los sinusoides hepáticos donde establecerán conexiones vasculares<sup>37,43</sup>.

Existen dos modalidades: trasplante de islotes pancreáticos aislado o luego de un trasplante renal. El primer caso está indicado en pacientes con DM1 de más de cinco años de diagnóstico, con 18-65 años de edad, que tengan un requerimiento de insulina menor a 1 U/kg/día, con una prueba de estimulación de péptido C negativa, un filtrado glomerular normal para la edad, con un IMC <28 kg/m<sup>2</sup> y sin neoplasias, infecciones activas, macroalbuminuria o contraindicaciones para la inmunosupresión<sup>37</sup>. Resultan especialmente beneficiados pacientes con diabetes lábil o "brittle", es decir, aquellos con frecuentes e impredecibles episodios de hipoglucemia y cetoacidosis, no explicables por errores del paciente ni del tratamiento diabetológico y que se encuentran intensificados y han utilizado los recursos tecnológicos disponibles, presentando un gran deterioro en su calidad de vida ante frecuentes internaciones por estos cuadros<sup>42</sup>. A fin de determinar el riesgo elevado de hipoglucemias, se describen una serie de *scores*, considerando al menos uno de los siguientes: *score de Clarke* ≥4; HYPO-score ≥1000; índice de labilidad (LI) ≥400, ó combinación de HYPO score ≥400 y LI ≥300<sup>36,44</sup>.

El *score de Clarke* consiste en evaluaciones sobre la severidad y frecuencia de las hipoglucemias, síntomas asociados y una relación de síntomas/estimación de hipoglucemia por software específico. Este score fue recientemente revalidado para los episodios no percibidos<sup>45,46</sup>. El HYPO-score en forma similar evalúa los eventos de glucemia baja, diferenciando los severos y dándole puntos extras a éstos. El índice de labilidad se basa en los cambios de glucemia. Es una relación matemática entre las diferencias de glucosa medida (se necesitan cuatro al día por cuatro semanas) al cuadrado y el intervalo de tiempo entre las lecturas<sup>47</sup>.

Luego de recibir un trasplante renal exitoso, puede continuarse con el de islotes pancreáticos en aquellos pacientes con DM1 con adecuada tolerancia al mantenimiento del esquema inmunosupresor, bajas dosis de prednisona ≤5 mg/día, en ausencia de infección por virus BK u otros oportunistas y que no estén sensibilizados (panel reactivo de anticuerpos <20%)<sup>36</sup>.

En cuanto a las contraindicaciones, se excluirán aquellos que no puedan ser inmunosuprimidos, con menos de cinco años de diagnóstico de DM1, requerimiento de insulina mayor a 0,7UI/kg/

día, prueba de estimulación de péptido C positiva, HbA1c mayor a 10%, embarazo, infección activa, enfermedad hepática o cardiovascular severa<sup>37</sup>.

### Modalidades de trasplante de islotes pancreáticos

El trasplante de islotes pancreáticos constituye una opción terapéutica en pacientes con DM1. El procedimiento se puede realizar como trasplante de islotes (ITA) sólo en sujetos no urémicos. Los pacientes con enfermedad renal terminal pueden ser considerados para trasplante simultáneo de islotes y renal (SIK) o, si ya fueron sometidos a trasplante renal, trasplante de islotes después de riñón (IAK) respectivamente. También puede ser considerado en combinación con otros órganos<sup>48</sup>. La fuente de los islotes para el trasplante puede ser el propio páncreas del paciente (autólogas o auto-trasplante, por ejemplo en el caso de un paciente con pancreatitis crónica que requiere una pancreatectomía), de donante cadavérico (heterólogo) o de animales (xenotrasplante)<sup>49</sup>. Éste permite lograr el control metabólico óptimo sin la necesidad de insulina exógena en aproximadamente el 70% de los casos<sup>50,51</sup>. El principal objetivo del trasplante es corregir la alta susceptibilidad a la hipoglucemia severa y el desequilibrio de la glucemia que se asocia a una elevada mortalidad (8% de mortalidad en sujetos no urémicos en lista de espera para trasplante de páncreas). Los pacientes obesos presentan mayor morbilidad operatoria<sup>52,53</sup>.

Las células trasplantadas deben soportar tanto una reacción inflamatoria instantánea mediada por la sangre (IBMIR), como la respuesta inmune humoral y celular dirigida por linfocitos T y B<sup>54</sup>. Se cree que la IBMIR es provocada por la expresión en la superficie celular de mediadores inflamatorios, tales como factor tisular en los islotes trasplantados, lo que resulta en la activación de las plaquetas, inicio de la cascada de la coagulación, activación del sistema de complemento e infiltración leucocitaria<sup>55,56</sup>. Incluso bajo inmunosupresión podría haber una pérdida del 50-70% de las células casi inmediatamente después de la infusión de los islotes debido a la IBMIR<sup>57</sup>. Una de las consecuencias no deseadas de los trasplantes de islotes obtenidos de múltiples donantes es el desarrollo de anticuerpos HLA, lo que puede limitar el éxito de futuros trasplantes de islotes, de páncreas entero o de riñón. Los resultados de los ITA son inferiores a los obtenidos cuando se realiza un trasplante

combinado (SPK). Una razón puede ser la demora en el reconocimiento de rechazo agudo. El rechazo en el SPK es generalmente concordante en ambos órganos y el aumento de la creatinina es un evento relativamente temprano en el rechazo renal<sup>58,59</sup>.

## Xenotrasplantes

Una fuente alternativa que ha generado mucho interés es el uso de islotes porcinos, debido a que, no sólo la insulina de cerdo, que difiere tan sólo en un aminoácido de la humana<sup>60</sup>, sino también los mecanismos insulares que controlan la homeostasis de la glucemia son similares a los del ser humano, lo que indica su compatibilidad funcional<sup>61</sup>.

La encapsulación puede proporcionar protección contra la reacción al tejido de una especie diferente o xenosis. En 2009 se inició un estudio de fase I/IIa con 14 pacientes que reportaron mayor precepción de las hipoglucemias y eliminación de las convulsiones inducidas por esta complicación aguda<sup>50</sup>.

Sin embargo, la mayoría de los ensayos que utilizó xenotrasplantes incluye inmunosupresión sistémica, lo que limitaría la aplicabilidad clínica de este enfoque. Brady et al. han generado islotes porcinos que producen un anticuerpo anti-CD2 y causan depleción local de células T en el sitio de injerto en un modelo de ratón. Potencialmente -mediante la combinación de diferentes manipulaciones genéticas, enmascarando con eficacia los epítopes especie específicos de los islotes de cerdo para que no sean reconocidos por el sistema inmune del receptor, mientras que además estos islotes producen inmunosupresores locales- podría ser factible reducir la utilización de protocolos de inmunosupresión sistémica mientras se mantiene la supervivencia del injerto y su función<sup>62</sup>.

## Selección de donantes y receptores, procuración de páncreas, aislamiento de páncreas y cultivo, y técnicas de trasplante

Se ha estimado que un páncreas sano puede contener aproximadamente un millón de islotes dispersos por toda la glándula, lo que representa sólo el ~1% del total del tejido pancreático<sup>63</sup>. La preservación de la integridad del grupo de células del islote es un requisito previo para su óptimo funcionamiento. Antes del trasplante, los islotes deben cumplir con determinados requisitos que incluyen: esterilidad, potencia, volumen, pureza, viabilidad y compatibilidad, entre otros<sup>64</sup>.

La encapsulación tiene como objetivo crear un

sitio de privilegio inmune artificial para proteger a los injertos del sistema inmune del huésped. Un dispositivo exitoso debe contener membranas con permeabilidad selectiva para excluir las células y las grandes inmunoglobulinas del receptor permitiendo, al mismo tiempo, el pasaje de pequeñas moléculas tales como O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y nutrientes esenciales para llegar a las células, así como de la insulina secretada en respuesta a los niveles de glucosa que penetran al xenoinjerto encapsulado. El sitio del injerto es también una consideración importante en el diseño de un dispositivo de encapsulación porque los islotes/células injertadas deben ser capaces de responder rápidamente a los niveles circulares elevados de glucosa<sup>65</sup>.

Para el trasplante de islotes se prefiere la vía de acceso percutánea. En la Universidad de Alberta, el 98% de los 382 procedimientos se ha realizado por el abordaje percutáneo, con menos de un 2% utilizando un acceso quirúrgico abierto. Los pacientes deben tener un parénquima hepático normal, sin cirrosis ni hipertensión portal, y sin hemangiomas grandes del lado derecho. Se debe administrar heparina de bajo peso molecular durante siete días y los islotes deben tener bajo volumen debiéndose controlar la presión portal durante la infusión, lo que reduce el riesgo de trombosis portal y puede facilitar el injerto de islotes de donante único mediante la reducción de la activación de la reacción inflamatoria mediada por sangre. Se ha propuesto un abordaje laparoscópico mini-invasivo para canular la vena umbilical, afluente del sistema porta<sup>36</sup>.

## Riesgos asociados al trasplante de islotes

El trasplante de islotes es considerado el más seguro de todos los trasplantes de órganos cuando se efectúa en centros con experiencia, ya que no es necesaria la cirugía invasiva y cuando los pacientes no están deteriorados. El cuidado de la inmunosupresión, el seguimiento y la profilaxis son similares a otros trasplantes de órganos sólidos. No obstante, existen riesgos asociados al procedimiento tales como hemorragia intraperitoneal, trombosis portal y lesión de la vesícula biliar; esto último es evitable si se utiliza en forma rutinaria el control ecográfico para guiar la inserción. La complicación más común es el dolor leve o malestar, ya sea en el lugar de inserción del catéter o como dolor referido al hombro derecho; es transitorio, se produce en la mitad de los pacientes, se controla fácilmente con analgésicos y generalmente se resuelve completamente en 24-48 hs.

Se observaron oclusiones de ramas periféricas de la vena porta, clínicamente insignificantes, en el 3,7% de los 382 trasplantes de islotes en DM1 de la Universidad de Alberta. Se ha descrito una alteración transitoria y leve de la función hepática en la mitad de los sujetos que se normaliza completamente en un mes. También se halló aumento de transaminasas (5x) en el 27% que también se resolvió en el plazo de un mes. La esteatosis hepática estuvo presente en el 20% de los casos por ecografía y resonancia magnética. Por microscopía se ha observado que la grasa es macrovesicular, focal y reflejo de la alta liberación de insulina local desde islotes en funcionamiento. Estos cambios son reversibles e intrascendentes. El riesgo de muerte después de un trasplante de islotes es extremadamente bajo. En términos de malignidad, el registro CTR destaca pacientes con tumores basocelulares de piel o carcinoma de células escamosas, con una tasa global de 2,3%, probablemente resultante de la inmunosupresión crónica<sup>66</sup>.

Los niveles de anticuerpos IA-2 y GAD aumentan después del trasplante, y los ICA caen tempranamente después del mismo. La presencia de anticuerpos de GAD o IA-2 pre-trasplante no parecen estar asociados con la supervivencia del injerto a largo plazo, pero un aumento en estos anticuerpos se correlaciona con la pérdida del injerto<sup>66</sup>.

### **Impacto del trasplante de islotes en el control metabólico y las complicaciones secundarias**

La persistencia de péptido C positivo puede estabilizar cambios tanto macro como microangiopáticos, independientemente de la condición de independencia de la insulina. El grupo de Vancouver llevó a cabo un estudio cruzado de cohortes, comparando en forma prospectiva la intervención mediante trasplante de islotes con la terapia médica óptima, y se encontró reducción de la progresión de la retinopatía y una tendencia hacia una mejor velocidad de conducción nerviosa<sup>67</sup>.

Los requerimientos de insulina exógena para lograr un control metabólico óptimo se reducen drásticamente inmediatamente después del trasplante de islotes, con una reducción de la amplitud media de las excursiones glucémicas durante todo el día y normalización de A1c (<6,5%). Se observó también restauración de la respuesta de las células  $\beta$  a secretagogos, con mejoría en la secreción de insulina ("primera fase") en respuesta a glucosa intravenosa, así como aumento de la secreción de

péptido C en respuesta a la glucosa oral y una normalización del umbral glucémico para desencadenar la liberación de hormonas contrarreguladoras, aunque sin llegar a la normalización de la magnitud de la respuesta vegetativa. La secreción de glucagón en respuesta a la hipoglucemia no mejora en alo o auto-trasplante de islotes en el hígado, en los estudios en humanos o animales, como se describe con trasplante de páncreas, y puede relacionarse a su ubicación en el hígado<sup>43</sup>.

### **Protocolo de Edmonton**

Se trata de un protocolo de trabajo efectuado en el año 2000 en la Universidad de Alberta por Shapiro et al. Estos autores realizaron un trasplante de islotes pancreáticos a siete pacientes con DM1 utilizando un esquema inmunosupresor libre de glucocorticoides. Los receptores debían presentar más de cinco años de enfermedad, sin falla renal y con episodios hipoglucémicos severos y recurrentes. La media de seguimiento fue de 11,9 meses, período durante el cual se logró la insulino-independencia; se debe mencionar que para lograr dicho objetivo los pacientes necesitaron más de una infusión de islotes<sup>68</sup>.

#### *Beneficios:*

- Procedimiento mínimamente invasivo por punción percutánea en vena porta lo que da lugar a una internación breve en la mayoría de los casos.
- La inmunosupresión, libre de corticosteroides, utiliza daclizumab, sirolimus y tacrolimus, con escasa morbilidad.
- Con el procedimiento se logra insulino-independencia por más de un año, reducción de las concentraciones séricas de glucosa, menor amplitud de las excursiones glucémicas, normalización de la HbA1c y efecto protector frente a hipoglucemias severas<sup>68</sup>.

#### *Dificultades y limitaciones:*

- Escasez de islotes para trasplante debido a escasos donantes cadavéricos<sup>69</sup>.
- Aislamiento de islotes: la obtención de los islotes se lleva a cabo a partir de páncreas de donantes multiorgánicos mediante el método descrito por Ricordi (digestión mediante colagenasa y purificación posterior mediante centrifugación).
- Destrucción de islotes trasplantados: debido probablemente a la lesión de los islotes mediante el proceso de aislamiento, problemas técnicos de aislamiento, hipoxia de islotes, etc.

- Tratamiento inmunosupresor: puede dar lugar a efectos secundarios como úlceras bucales, anemia, leucopenia o diarrea.

- Se requiere de un equipo médico altamente entrenado<sup>70</sup>.

- La insulinoindendencia obtenida declina con el tiempo; en la mayoría de los casos se requiere más de una infusión de islotes para prolongarla<sup>71</sup>.

## Evolución posterior

La experiencia internacional creció junto con el número de trasplantes en centros altamente especializados<sup>72</sup>, sin embargo el análisis a largo plazo de los resultados iniciales del grupo de Edmonton indicó que la insulinoindendencia no fue duradera y la mayoría de los pacientes vuelve a pequeñas cantidades de insulina alrededor del quinto año, aunque sin eventos de hipoglucemias severas recurrentes<sup>73,74</sup>.

Numerosos fenómenos constituyen factores limitantes para el injerto de islotes y su supervivencia<sup>75</sup>, y en la actualidad todos los esfuerzos están dirigidos a mejorar la calidad de los islotes y su proceso de injerto, así como a optimizar la inmunosupresión para facilitar la tolerancia y la supervivencia de los mismos<sup>76</sup>.

## C) ROL DEL MÉDICO DIABETÓLOGO DENTRO DEL EQUIPO MULTIDISCIPLINARIO DETRASPLANTES

El rol del diabetólogo en el equipo de trasplante consiste, en primer lugar, en confirmar la presencia de los criterios de indicación de trasplante constatando al menos uno de los siguientes criterios clínicos: complicaciones metabólicas frecuentes (hipoglucemia, hiperglucemia, cetoacidosis) que requieran atención médica, hipoglucemias graves no detectadas que amenacen la vida, problemas clínicos y emocionales con la insulinoiterapia que resulten incapacitantes, y fallo persistente de la insulinoiterapia para prevenir las complicaciones agudas. De la misma manera se deberá evaluar al paciente en busca de los criterios de exclusión para recibir este tipo de tratamientos.

Otros de los roles es confirmar la inestabilidad glucémica a través del monitoreo glucémico continuo de 48-72 hs o valores de automonitoreo glucémicos informatizados manifestados a través de promedios en distintas escalas:

- I. Índice MAGE (*Mean Amplitude of the Glycemic Excursions*): dos días consecutivos de siete lecturas cada día. Valor normal: 110-190 mg/dl. Un

valor mayor a 200 mg/dl indica variabilidad glucémica muy importante<sup>36,44</sup>.

- II. Índice de labilidad (*Lability index, LI*): se calcula a partir de un número de cuatro o más mediciones durante un período de siete días, a partir de la sumatoria de todas las excursiones glucémicas elevadas al cuadrado, divididas por el intervalo (en horas) correspondiente a cada excursión. Un LI por encima del percentilo 90 correspondiente a una población control de pacientes con DM1 no seleccionados (en el trabajo original de Ryan et al. este valor es de 433 mmol/l2/h por semana, lo que equivaldría aproximadamente a 7.800 mg/dl2/h por semana) sugiere la existencia de una labilidad glucémica relevante<sup>77,78</sup>.

- III. Score de hipoglucemias o *Hypo Score*: se calcula a partir del registro durante cuatro semanas de las glucemias inferiores a 50 mg/dl otorgando un puntaje por su profundidad y las características de su percepción por parte del paciente, y sumando además puntos por los episodios de hipoglucemia grave en los 12 meses previos. Evalúa frecuencia, severidad y grado de percepción de hipoglucemias. Un resultado >1,047 (nuevamente, este valor corresponde al percentilo 90 de la población estudiada por Ryan et al.) indica la existencia de una problemática grave generada por episodios de hipoglucemia<sup>77,78</sup>.

Es imprescindible haber agotado previamente las posibilidades de mejorar el control metabólico mediante un tratamiento individualizado optimizado en una unidad especializada en diabetes durante un mínimo de seis meses, llevándose a cabo además una evaluación psicológica a fin de descartar otras causas de inestabilidad. Se considerará especialmente si la persona presenta complicaciones microvasculares incipientes (incluida nefropatía) que aún pudieran, al menos teóricamente, ser estabilizadas o revertidas mediante la normalización glucémica. Especialmente se requiere un filtrado glomerular >60 ml/min (estimado por la fórmula MDRD) y una proteinuria <1 g/24 hs para evaluar si es candidato a trasplante de páncreas solo o trasplante simultáneo de riñón y páncreas. En mujeres en edad fértil, deberá garantizarse anticoncepción apropiada.

En la primera entrevista, el paciente con diabetes posiblemente candidato a un trasplante de páncreas/islotes recibirá información personalizada acerca de los riesgos (morbimortalidad) y beneficios de estos procedimientos. En ese momento se ofrecerá el documento de Consentimiento Informado para ser sometido a estudio por parte

del paciente y sus allegados; se confirmará la presencia de criterios de elegibilidad, se confirmarán y completarán, si procediese, las exploraciones complementarias de la evaluación pre-trasplante. El resultado se presentará en las sesiones multidisciplinarias mensuales del equipo de trasplante, se emitirá un informe definitivo y en caso de ser considerado el paciente como elegible se firmará el documento de Consentimiento Informado. Se comunicará a la persona afectada su inclusión o no en la lista de espera de trasplantes de páncreas y en caso negativo se explicitarán las causas<sup>79</sup>.

### **Seguimiento post-trasplante**

Para la adecuada consecución de los objetivos anteriormente expuestos, el seguimiento debe realizarse inicialmente por el equipo de un hospital donde se efectúen estos trasplantes. El traslado del seguimiento a otros centros hospitalarios que no los realicen sólo debe plantearse cuando la distancia a estos centros sea significativamente menor para el paciente y siempre que dispongan de los recursos suficientes para asegurar la calidad asistencial. El traslado para el seguimiento compartido se realizará a partir de los 6-12 meses después del trasplante. La periodicidad recomendada de las visitas ambulatorias es, durante el primer mes, de tres veces a la semana; durante los siguientes 11 meses es mensual y a partir del primer año cada tres meses y, además, en caso de ocurrir algún incidente. Se remitirá un informe clínico completo con toda la evolución seguida hasta ese momento. Se solicitan en los meses 1, 3, 6 y 12 niveles de anticuerpos (anti-GAD, -IA2 y -insulina), controles de glucemia pre y postprandiales (siete durante al menos dos días previos a la visita para determinar MAGE), amilasemia y lipasemia para evaluar función de páncreas exocrino y eventual rechazo de trasplante agudo debido a que la hiperglucemia es un signo más tardío y refleja generalmente un rechazo irreversible. La hiperglucemia puede ocurrir también como consecuencia tardía de un rechazo crónico que conlleva una marcada fibrosis del trasplante y desaparición de los islotes de Langerhans<sup>80</sup>. Otros parámetros a evaluar durante los primeros meses para medir la calidad de la respuesta a la intervención son: péptido C sérico, monitoreo glucémico continuo durante 48-72 hs, determinación del índice HOMA-R (en pacientes con DM2), prueba de arginina o respuesta a una comida mixta evaluando secreción de insulina y eventuales hipo-

glucemias. A los 12 meses se realizará una determinación del estado nutricional: proteínas totales, albúmina, transferrina, ferritina y sideremia, ácido fólico y vitamina B12, péptido C basal, prueba de sobrecarga i.v de glucosa para evaluar el pico de secreción de insulina (incremento respecto de la respuesta basal) y la tasa de desaparición de la glucosa, amilasemia y lipasemia.

## **2. PROCEDIMIENTOS INMUNOLÓGICOS, GENÉTICOS Y DE TERAPIA CELULAR DIRIGIDOS AL TRATAMIENTO DE LA DIABETES TIPO 1**

### **A) TRATAMIENTOS PARA FRENAR LA APOPTOSIS Y AGRESIÓN AUTOINMUNE DE LA CÉLULA BETA**

En la actualidad conocemos que la evolución preclínica de la DM1 muestra una fase progresiva crónica y predecible en la mayoría de los individuos. Avances recientes en la comprensión de la etiología autoinmune y los mecanismos patogénicos involucrados justifican la búsqueda de métodos novedosos de intervención, apoyados en conocimientos de la Inmunología. En los últimos años se presentaron datos de más de 10 ensayos de fase II, algunos con resultados prometedores. Sin embargo, los ensayos de fase III o bien no han demostrado eficacia o resultaron en la aparición de eventos adversos de consideración<sup>81</sup>. La mayoría de estos procedimientos intenta detener la enfermedad poco después del diagnóstico clínico con el objetivo de preservar la función de las células  $\beta$  remanentes; la valoración de dicha función se realiza mediante la determinación de los niveles de péptido C en respuesta a un estímulo que induzca su secreción, entre otros<sup>82</sup>.

Si bien en la década de 1980 los primeros estudios realizados en sujetos con DM1 de reciente diagnóstico utilizando ciclosporina A no mostraron diferencias estadísticamente significativas durante el seguimiento con respecto al grupo control<sup>83</sup>, en un estudio posterior los pacientes tratados se mantuvieron sin insulina durante un año<sup>84</sup>. Sin embargo, la toxicidad representó un efecto adverso que limitó esta forma de terapia. Una limitación adicional fue que el efecto desaparecía con la interrupción del tratamiento sin lograr inducir una tolerancia inmune, lo que implicaba que el tratamiento inmunosupresor debía ser administrado indefinidamente para mantener su efecto terapéutico<sup>81</sup>.

La azatioprina también fue utilizada en pacientes con DM1, sola y en terapia combinada con glucocorticoides, con resultados desalentadores ya que además de los efectos adversos previsibles no se

detectaron beneficios en la prevención de la DM1<sup>85</sup>. Otras terapias utilizando globulinas antitimocitos, que inhiben la acción de los linfocitos T, no lograron diferencias favorables en los niveles de péptido C ni tampoco en los objetivos secundarios planteados (niveles de HbA1c e insulinemia), por lo que también este tratamiento fue considerado ineficaz<sup>86,87</sup>.

La mejor solución para superar las limitaciones de la inmunosupresión parecería ser la inducción de una tolerancia inmune mediante el uso de agentes biológicos. De este modo se sintetizaron anticuerpos humanizados anti-CD3 utilizados en distintos ensayos, como los estudios denominados Protégé<sup>88</sup> y ABATE<sup>89</sup>, ensayos clínicos de fase III realizados con teplizumab. En el primer caso, el punto final elegido no se alcanzó (niveles de HbA1c <6,5 con una dosis insulina <0,5 UI/kg/d) por lo que el estudio se detuvo; en el segundo, con dos años de seguimiento, el grupo tratado tuvo un modesto efecto favorable sobre los niveles de péptido C, pero un gran número de sujetos debió abandonar el estudio por efectos adversos. Otro ensayo clínico de fase III denominado DEFEND, utilizando dosis menores de un anti-CD3 (otelixizumab) con el objetivo de mantener la eficacia y disminuir los efectos adversos, no alcanzó los objetivos primarios por lo cual también fue interrumpido<sup>90</sup>. Otras terapias destinadas a preservar los niveles de péptido C utilizando por ejemplo un anti-CD20 (rituximab) se encuentran en estudio<sup>91</sup>.

Mediante la administración experimental de un péptido de la GAD65 (decarboxilasa del ácido glutámico) se logró inducir tolerancia inmunológica en estadios subclínicos de la diabetes autoinmune en ratones NOD; se utilizó en consecuencia una formulación de GAD65 recombinante asociada a hidróxido de aluminio para intentar preservar la función de las células  $\beta$  en pacientes con DM1 de reciente diagnóstico<sup>8,92</sup>. Los resultados no fueron satisfactorios, quizás porque lo evidenciado en ratones NOD, en los que este tratamiento mostró eficacia, era el resultado de la administración en la fase prehiperglucémica de la enfermedad<sup>81</sup>.

Otro antígeno utilizado es un péptido denominado Diapep 277<sup>®</sup>, derivado de la proteína de shock térmico humana-60 (Hsp60), tratamiento que induce células T antiinflamatorias. Los resultados de un ensayo clínico fase III, cuyo objetivo primario fue evaluar la seguridad y eficacia de éste en la preservación de la función de las células  $\beta$  en pacientes diabéticos tipo 1 de reciente diagnóstico, demostra-

ron una buena tolerancia al tratamiento y un incremento no significativo de los niveles de péptido C en ayunas, sin variaciones en la respuesta a una comida mixta<sup>93</sup>, continuando la evaluación de este fármaco.

En ratones NOD la administración de la vacuna BCG (*Bacilo Calmette-Guèrin*) demostró modular el proceso autoinmune mediante la estimulación del TNF- $\alpha$ , citoquina que destruye selectivamente células responsables del proceso autoinmune, permitiendo la regeneración de las células  $\beta$ , hecho evidenciado por un aumento transitorio en la secreción de péptido C in vivo. En un primer ensayo clínico de fase I realizado en adultos con diabetes tipo 1 de larga duración, que recibieron dos inyecciones de BCG, se observó una activación del sistema inmune y un estímulo de los niveles de TNF- $\alpha$ , con una disminución de la autoinmunidad dirigida hacia las células  $\beta$ . No se detectaron eventos adversos relevantes, continuando la evaluación de este tipo de intervenciones<sup>10</sup>.

Desafortunadamente no existe un ensayo que se haya traducido en un retraso o prevención de la DM1. Algunos estudios han tenido resultados diversos con alguna promesa de mejoría transitoria en la función de las células  $\beta$  remanentes, mientras que otros no han logrado frenar la declinación de la función celular en comparación con el placebo<sup>7</sup>. Es probable que nuevas estrategias de tratamiento actualmente en desarrollo proporcionen evidencias en los próximos años. El uso de nuevas moléculas que permitan efectuar una terapia antigénica específica y el empleo de anticuerpos monoclonales con un aceptable grado de seguridad pueden abrir algunas expectativas futuras, sobre todo en determinado tipo de pacientes y en momentos más tempranos de la evolución de la DM1.

## B) USO DE CÉLULAS MADRE

La DM1 es causada por destrucción autoinmune de las células  $\beta$  insulares. En las últimas décadas el empleo de un tratamiento intensificado combinando avances farmacológicos y tecnológicos logró una importante mejoría en el tratamiento de los pacientes con DM1: insulinas humanas recombinantes, análogos de insulina, microinfusores, medidores de glucosa con mayor precisión y menor requerimiento de la muestra, sensores continuos de glucosa, etc., contribuyeron a mejorar la expectativa de vida y disminuir la aparición de las complicaciones crónicas de la enfermedad<sup>94,95,96,97</sup>.

Sin embargo la realidad muestra que aún con

el mejor tratamiento disponible, mantener la glucemia en forma constante dentro del intervalo fisiológico es una meta difícil de alcanzar, resultando muchas veces en la aparición hipoglucemias y pudiendo ser percibido como un menoscabo de la calidad de vida<sup>96,98</sup>. Además, después de 30 años de diagnosticada la DM1 y aún utilizando tratamientos intensificados, la incidencia acumulada de retinopatía, neuropatía y enfermedad cardiovascular alcanza cifras considerablemente elevadas<sup>99</sup>.

Queda claro que el tratamiento sustitutivo con inyecciones de insulina exógena no puede imitar la secreción fisiológica de las células  $\beta$ <sup>99</sup>. En este sentido, numerosos datos experimentales y clínicos sugieren que sólo una fuente de insulina cuya liberación esté controlada por los niveles glucémicos puede prevenir en forma fehaciente la aparición de complicaciones en el largo plazo<sup>95</sup>.

El trasplante de páncreas entero, o bien de sus islotes, podría responder a esa necesidad, pero la complejidad técnica, la necesidad de donantes cadavéricos y el uso de inmunosupresión de por vida, hace que sean terapias destinadas a un número muy reducido de pacientes en los cuales los beneficios del tratamiento sean superiores a los inconvenientes asociados al mismo<sup>94,95,96,100,101</sup>.

Se plantea la necesidad de buscar fuentes alternativas de células  $\beta$  (o células equivalentes) capaces de ser trasplantadas y reemplazar la función de las células  $\beta$  ausentes, logrando subsanar el inconveniente de requerir varios donantes para efectuar un trasplante de islotes. La terapia celular con *stem cells* (células madre, SC) podría brindar una posibilidad con este fin.

Las SC son células que poseen capacidad de autorrenovarse indefinidamente por división celular asimétrica, con el potencial de diferenciarse en uno o más tipos celulares especializados, y actualmente están siendo estudiadas para el desarrollo de terapias dirigidas específicamente al tratamiento de la DM1<sup>94,95,96,100,101</sup>. Según su origen se pueden dividir en SC embrionarias, obtenidas de adultos e inducidas.

### **Stem Cells Embrionarias (SCE)**

Las SCE son células pluripotenciales derivadas de la masa interna del blastocisto (embrión de cuatro a siete días), que pueden diferenciarse hacia cualquier tipo celular del organismo<sup>94</sup>. Se obtienen a partir de embriones gestados *in vitro* por técnicas de fertilización asistida que fueron des-

cartados y donados.

La técnica empleada para desarrollar células  $\beta$  a partir de SCE se denomina diferenciación (dirigida), persiguiendo un desarrollo secuencial del blastocisto en: endodermo > tubo intestinal primitivo > intestino posterior > endodermo pancreático > progenitores pancreáticos endócrinos > célula  $\beta$ . La mayoría de los factores de transcripción implicados en este proceso ha sido identificado, siendo los más importantes PDX-1, FOXA2 y NHH3. Además se emplean diferentes protocolos en relación a tiempos y secuencias de diferentes factores de crecimiento pancreáticos, medios de cultivo, etc., a fin de optimizar la diferenciación fenotípica de estas SCE hacia células que expresen insulina<sup>94,95,96,101</sup>.

#### *Ventajas de las SCE:*

- Son pluripotentes, es decir pueden diferenciarse en células precursoras pancreáticas, inclusive de manera espontánea<sup>94</sup>.
- Son fáciles de identificar en el blastocisto.
- Tienen alta capacidad auto-regenerativa.

#### *Desventajas de las SCE:*

- Existen fuertes cuestionamientos de orden religioso y ético sobre el origen y manipulación de los embriones.
- Los productos finales son de naturaleza alógena con respecto al huésped, induciendo respuesta inmunológica al ser implantadas, debiendo emplearse terapia inmunosupresora, con consecuencias sistémicas sobre el huésped y el propio implante<sup>94,95</sup>.
- Por su pluripotencialidad (capacidad proliferativa indefinida) es latente la teratogénesis<sup>94</sup>.
- Los mecanismos íntimos subyacentes del proceso de diferenciación están lejos de ser entendidos, controlados y reproducidos sistemáticamente<sup>94</sup>.

Hasta la fecha los resultados no han sido óptimos, generando con células productoras de insulina con una eficiencia baja (síntesis de insulina-capacidad secretoria), células poli-homonaes e inclusive poblaciones celulares heterogéneas y/o inmaduras<sup>94,95,96</sup>.

### **Stem Cells del Adulto (SCA)**

Son células pluripotenciales que se encuentran en escasa cantidad en algunos tejidos del adulto, con baja capacidad proliferativa<sup>94</sup>.

Se clasifican en dos grupos: hematopoyéticas (dan origen a los elementos de la sangre) y me-

senquimales (presentes principalmente en médula ósea, y en menor cantidad en tejido adiposo, hígado, conductos pancreáticos, placenta, sangre de cordón umbilical)<sup>94,95,100</sup>.

En diversas publicaciones se atribuye a las SC hematopoyéticas y mesenquimales un alto grado de plasticidad: células provenientes de un órgano (médula ósea, por ejemplo) con capacidad de generar células con características morfológicas y funcionales diferentes (nerviosas, endócrinas). Por lo tanto son consideradas candidatas para el tratamiento de múltiples patologías, incluida la DM1, a través de procesos de diferenciación<sup>94,95,100</sup>.

Se confirmó que el trasplante de células de la médula ósea permitió la reparación del tejido endocrino pancreático en ratones con diabetes experimental<sup>102</sup>. Además, demostró que SC mesenquimales obtenidas de seres humanos se pueden diferenciar hacia células productoras de insulina mediante la transfección adenoviral del ADN correspondiente a los factores de transcripción específicos tales como PDX-1, HLXB9 y FOXA2<sup>94,95</sup>, logrando incluso alcanzar la secreción de insulina en respuesta a la glucosa<sup>103</sup>. Diversos tejidos (hepático, adiposo, cordón umbilical) y células (intestinales, esplénicas, ductales pancreáticas, salivales) pueden servir como fuente de SC mesenquimales para generar tejido endocrino pancreático funcional<sup>94,95</sup>. Estos estudios plantean la posibilidad futura de autotrasplante de tejidos propios (por ejemplo, médula ósea) para tratar/curar la DM, si bien se debe tener en cuenta que, por el momento, existen interrogantes con respecto a los mecanismos de diferenciación celular involucrados<sup>94,100</sup>.

#### *Ventajas de las SCA:*

- Son pluripotenciales<sup>94,100</sup> y resultan más fáciles de aislar<sup>95</sup>.
- Al ser células autólogas no se necesitaría agregar terapia inmunosupresora<sup>94,100</sup>.
- El paciente puede ser donante a partir de sus propios tejidos<sup>94</sup>.
- Las células de origen mesenquimal tendrían propiedades inmunomoduladoras al expresar moléculas de clase HLA I pero no HLA II<sup>100,104</sup>.
- Las SC mesenquimales dan origen a procesos de angiogénesis<sup>100</sup>.
- No existe riesgo de teratogénesis<sup>94,100</sup>.

#### *Desventajas de las SCA:*

- No se cuenta por el momento con marcadores específicos para identificar selectivamente a las SC mesenquimales<sup>94</sup>.

- Problemas de expansión *in vitro*, pérdida de la pluripotencialidad y contaminación<sup>95</sup>.

La necesidad de inducir procesos de diferenciación para lograr que las SCA se transformen en células productoras de insulina se manifiesta por el hecho de que cuando un paciente con DM1 recibe un trasplante de médula ósea a causa de una enfermedad hematológica no se observa cambio alguno en el metabolismo de la glucosa<sup>95</sup>.

Las SCA tienen características particulares que las hacen mejores candidatas como fuente de masa celular funcional trasplantable al compararlas con las SCE, sobre todo en relación a la ausencia de riesgo de teratogénesis, al hecho de ser autólogas y a la ausencia de problemas éticos relacionados con su obtención.

#### **Stem Cells Inducidas (SCI)**

Hay células somáticas del adulto que se pueden diferenciar hacia células pluripotenciales y luego hacia células productoras de insulina, utilizando casi los mismos protocolos de cultivos que para las SCE. En 2008 se publicó el primer trabajo exitoso en este sentido, en el que se utilizaron fibroblastos obtenidos de la piel en los que se indujo la diferenciación hacia células productoras de insulina que respondían al estímulo con glucosa<sup>95,105</sup>.

Las técnicas empleadas para generar SCI son dos:

- Reprogramación: es un proceso por el cual células somáticas se convierten en SCI mediante el uso de transfección viral de factores de transcripción  $\beta$  celulares<sup>95,101</sup>. El peligro de estos vectores virales es la integración de los mismos en el genoma, con potencial tumorigénesis o alteraciones en la diferenciación<sup>95,96</sup>. Una posible solución es el uso de virus no-integrales, por ejemplo adenovirus o virus Sendai<sup>96,106</sup>. Además para evitar el riesgo de recontaminación por células inmaduras (y posibilidad de oncogénesis) deberían desarrollarse protocolos altamente eficientes de identificación de formas inmaduras<sup>95,96</sup>.

- Transferencia nuclear (*Somatic Cell Nuclear Transfer* o SCNT): se pueden obtener SCEs mediante el trasplante de un núcleo celular de una célula somática de una persona a un oocito humano cuyo núcleo fue previamente retirado, generando embriones idénticos al de las células so-

máticas parenterales y así extraer sus SCE<sup>95,96,107</sup>. Se considera que el oocito tiene la capacidad de reprogramar la expresión génica celular (reiniciándola de alguna manera) para que la célula resultante sea pluripotencial. Por su forma de obtención, esta técnica tiene implicancias éticas.

Al ser de origen autólogo, el uso de las SCI evitaría el rechazo del implante, aunque en el caso de la DM1 las células funcionantes resultantes aún deberán enfrentar el ataque auto-inmune<sup>95</sup>. La capacidad de las SCI de diferenciarse en células  $\beta$  completamente maduras y funcionantes es aún objeto de duda: in vivo la capacidad para controlar los niveles circulantes de glucosa es baja, hay posibilidad de maduración incompleta, senescencia prematura y quizás cierta memoria epigenética residual de los tejidos de origen, circunstancias que podrían propiciar mutaciones oncogénicas<sup>95,96</sup>.

### **Mecanismos del potencial efecto beneficioso y efectos adversos**

Las SC que han demostrado ser capaces de dar origen a células productoras de insulina son las SCE, las SC de la sangre del cordón (CBSC) y SC adultas (SCA). Las CMSC son recolectadas durante el nacimiento a partir de la sangre del cordón umbilical y están representadas por diferentes subtipos. Las CMA que se usan con mayor frecuencia en los estudios de DM1 son las mesenquimáticas (SCM) y las hematopoyéticas (SChE)<sup>108</sup>.

Las características comunes de las SCE humanas y murinas son la capacidad ilimitada de proliferar mediante un proceso de autorrenovación y el potencial de diferenciarse de manera terminal en uno o más tipos celulares in vivo e *in vitro*<sup>109</sup>. Las SCE indiferenciadas no son inmunogénicas, propiedad confirmada por diferentes autores<sup>110</sup>. In vitro, las SCE alogénicas murinas fracasan al estimular las células T y son resistentes a la lisis por las células *natural killer*<sup>111</sup>. Las SCE demostraron prevenir la activación inmune en respuesta a las células presentadoras de antígenos *in vitro* y tienen la capacidad de promover la supervivencia del aloinjerto in vivo<sup>112,113</sup>.

Además de los dilemas éticos, el uso clínico de CME se encuentra seriamente discutido por el riesgo de la formación de teratomas in vivo<sup>114</sup>.

La sangre del cordón (CB) contiene diferentes subtipos de SC, entre las que se encuentran las SC mesenquimáticas (SCM) y las SC hematopoyéticas (SChE)<sup>108</sup>.

Las SCM-CB indiferenciadas expresan muy bajos niveles de complejo mayor de histocompatibilidad clase I pero no de clase II, y son incapaces de inducir proliferación celular mononuclear de sangre periférica alogénica<sup>115</sup>. Zhao et al. trataron exitosamente la diabetes autoinmune en ratones diabéticos no obesos (NOD) con células T reguladoras (Tregs) a través de cocultivo con SCM-CB y concluyeron que las Tregs derivadas de las SCM-CB podrían revertir la diabetes promoviendo la regeneración de la célula  $\beta$  y la reconstrucción de la arquitectura del islote<sup>116</sup>.

Entre las ventajas de las SCM-CB se mencionan: recolección segura, plasticidad y enorme potencial regenerativo en comparación con las SCA. Entre sus desventajas, cuentan el bajo número de SC recolectadas y necesidad de requerir más ensayos clínicos así como también seguimientos a largo plazo para confirmar su utilidad y seguridad<sup>117</sup>.

En el caso de las SCM se trata de células multipotenciales localizadas en diferentes tejidos, inclusive en la sangre del cordón, médula ósea y el tejido adiposo<sup>118</sup>. Las SCM obtenidas de la médula ósea demostraron poseer una amplia gama de características inmunomoduladoras *in vitro* debido a su fenotipo hipoinmunogénico, capacidad de liberar citoquinas antiinflamatorias y capacidad inhibitoria de las interacciones célula-célula<sup>119</sup>. *In vitro*, las SCM inhiben la proliferación de células T, afianza la supervivencia de la célula T y el mantenimiento de las mismas en un estado inactivo<sup>120,121,122</sup>. Las SCM inhiben tanto la maduración como la migración de monocitos a células mieloides<sup>123</sup>, la proliferación de *natural killers* mediada por IL-2, la producción de IFN- $\gamma$ <sup>124</sup> y la proliferación de linfocitos B<sup>125</sup>. La evidencia de la función inmunomoduladora de las SCM fue demostrada en ratones NOD con diabetes autoinmune espontánea, en los cuales se restableció la normoglucemia por la infusión de SCM alogénicas y congénicas<sup>108</sup> y por otros ensayos in vitro que involucraban mecanismos autoinmunes relevantes<sup>126,127</sup>. Li et al.<sup>128</sup> obtuvieron células productoras de insulina (CPI) mediante la transfección de SCM humanas con un adenovirus conteniendo el cADN del PDX-1 humano. Luego fueron cultivadas en un medio conteniendo GLP-1. Las células resultantes mostraron expresión de un conjunto de genes pancreáticos que incluía: PDX-1, NGN3, glucagón, GLUT-2 y glucoquinasa, demostrándose la capacidad de sintetizar insulina y sugiriendo una potencial sensibilidad a la glucosa. Cuando fueron

trasplantadas bajo la cápsula renal en ratones con diabetes por estreptozotocina (STZ), estas CPI normalizaron los niveles de glucemia tras siete a 14 días del trasplante<sup>108</sup>.

Las SCM son de fácil crecimiento y manipulación. Por otra parte, algunas desventajas fueron: posible oncogenicidad<sup>129</sup>, formación resultante de tejido ectópico no deseado<sup>130</sup> y liberación no deseada de citoquinas (altas cantidades de factor derivado del estroma SDF-1 o CXCL12)<sup>131</sup>.

Las células madre hematopoyéticas (SCHe) son SC multipotenciales que se encuentran en la médula ósea, sangre del cordón, sangre periférica y tejidos fetales<sup>132</sup>. Las SCHe muestran la capacidad de diferenciarse en linajes mieloides (macrófagos, eritrocitos y granulocitos) y linfoides (células *natural killer*, T y B)<sup>133,134</sup>. Kared et al.<sup>135</sup> demostraron que las SCHe murinas podían estimular la expansión de células FoxP3+ -factor regulador de la transcripción, que participa directamente en la función de las células reguladoras T CD4+ humanas y murinas. Con respecto a las CMHe humanas, Rachmin et al.<sup>136</sup> demostraron que tienen la capacidad de neutralizar los precursores citotóxicos de los linfocitos T<sup>108</sup>.

La regeneración de las células  $\beta$  no ha sido observada en modelos humanos<sup>137</sup> ni animales<sup>138</sup> durante el trasplante de médula ósea, por lo tanto las SCHe no son consideradas como una posible fuente de CPI, sin embargo, es posible que puedan promover o facilitar la regeneración celular.

Entre las ventajas posibles se encuentran su relativa disponibilidad, la ausencia de formación de tejido ectópico o tumores y la rápida respuesta clínica. Algunas desventajas a considerar son la ocurrencia de recaídas en modelos tratados, el requerimiento de un régimen de acondicionamiento sumado a los riesgos asociados con la mieloablación transitoria y la potencial aparición de infertilidad<sup>108</sup>.

### Transdiferenciación de fibroblastos

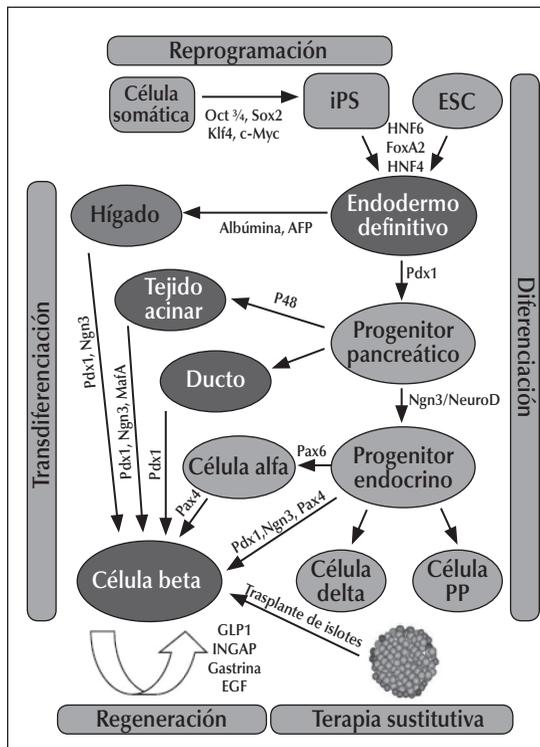
La transdiferenciación se define como la conversión de un tipo celular totalmente desarrollado hacia otro que presenta un fenotipo completamente diferente, sin pasar por el estado de célula pluripotencial. Esta posibilidad ha causado gran entusiasmo en el terreno de la regeneración celular. Han sido utilizadas dos técnicas: una de ellas reprograma células somáticas en células madres pluripotenciales (iPs, en inglés) y la otra convierte células somáticas en otros tipos de células es-

pecializadas. La primera técnica fue desarrollada por Yamanaka en 2006, quien pudo, mediante el agregado de los factores de transcripción correspondientes, convertir esencialmente cualquier tipo celular del cuerpo nuevamente en una célula madre pluripotencial, siendo ésta casi idéntica a las células madre embrionarias<sup>139</sup>.

Trabajos realizados entre 1980 y 1990 demostraron que los fibroblastos podían convertirse directamente en células musculares de manera eficiente utilizando un factor de transcripción MyoD. Muchos escépticos creían que la conversión directa sólo podía lograrse entre "células hermanas", tales como dos tipos de células de la sangre<sup>140</sup>. En el año 2010, ese escepticismo desapareció cuando un grupo de investigadores demostró la conversión directa de fibroblastos en neuronas funcionales, células que pertenecían a diferentes líneas germinales<sup>141</sup>.

Aquellos tejidos que derivan de las regiones adyacentes de una misma capa embrionaria poseen el potencial de transdiferenciarse. Así se ha demostrado que los hepatocitos, que derivan del endodermo, son capaces de dar lugar a células que también se originan a partir de esta capa embrionaria, tales como las células  $\beta$  pancreáticas<sup>142</sup>. En comparación con las células troncales embrionarias (SCE), si se utilizan células cuyo origen embrionario es cercano al páncreas como punto de partida de la diferenciación, el número de pasos requeridos durante el proceso de transdiferenciación para conseguir el tejido definitivo es relativamente menor y, de igual manera, el tiempo necesario para completar este proceso. En este sentido, el uso de vectores virales para sobreexpresar genes importantes en el desarrollo del páncreas endocrino en tejidos como el hígado ha permitido generar células  $\beta$  pancreáticas a partir de hepatocitos. De esta manera, mediante la expresión del factor de transcripción PDX1, decisivo en el desarrollo del páncreas (Figura 3), se han obtenido células capaces de producir insulina en el hígado<sup>143,144</sup>.

Thorel et al. utilizaron un método distinto a la transdiferenciación convencional que involucra el uso de partículas virales. En su lugar, los autores crearon una situación de escasez celular y de este modo maximizaron el aumento de la plasticidad inherente de las células  $\alpha$  insulares. Las células  $\beta$  frecuentemente aparecían como bifuncionales, secretando tanto insulina como glucagón, lo que sugiere una conversión incompleta<sup>145</sup>.



**Figura 3:** Estrategias utilizadas con diferentes tipos de células troncales para el tratamiento de la DM1. Dependiendo del tipo celular de partida, los factores que intervienen y las estrategias utilizadas son diferentes. Entre las más utilizadas se destacan la reprogramación celular, diferenciación, transdiferenciación, regeneración y sustitución del tejido dañado (trasplante de islotes)<sup>82</sup>.

La transdiferenciación de fibroblastos de pacientes en células pancreáticas podría redituar una mayor aplicabilidad sobre las células reprogramadas sin los problemas mayores de las SCE humanas y de las SC humanas inducidas pluripotenciales (hESC y hiPSC). La mayoría de los métodos para realizar la transdiferenciación consideraba estrategias de modificación genética tales como el uso de vectores virales, que conllevan riesgos clínicos severos como la formación de teratomas<sup>144</sup>.

La transdiferenciación de fibroblastos mediante la utilización de agentes químicos ha sido demostrada en linajes celulares *in vivo* e *in vitro*, obteniéndose por ejemplo osteocitos, condrocitos, adipocitos y hepatocitos. Los fibroblastos de un paciente con DM1 que son químicamente transdiferenciados presentan varias ventajas, tales como contener el patrón genotípico de la enfermedad evitando el rechazo inmunológico para futuras terapias, y son una oportunidad única para probar si estas células pueden ser transdiferenciadas en el fenotipo deseado<sup>142</sup>.

Pennarossa et al. demostraron que también es posible convertir fibroblastos de adultos no diabéticos en CPI sin realizar transgénesis. Pero este protocolo utiliza un inhibidor de la DNA metiltransferasa (la 5-azacitidina), con riesgo de potenciales efectos adversos, y no emplea células de pacientes sino de adultos sanos<sup>146</sup>.

En un trabajo realizado en nuestro país se demostró que la plasticidad de los fibroblastos permitió la expresión de factores de transcripción de linaje pancreático y genes, tales como insulina glucagón y somatostatina tras ser manipulados únicamente con compuestos químicos evitando la necesidad de uso de demetilación global. También se observó la reproducibilidad del producto químico en el proceso de transdiferenciación de los fibroblastos tanto en los pacientes diabéticos (HF1 y HF2) y en voluntarios sanos (HF0) pero mostrando diferencias en la expresión génica entre repeticiones<sup>147</sup>.

A diferencia de las células embrionarias humanas, las cuales tienen muchas reservas éticas, los métodos de reprogramación y la transdiferenciación utilizan células somáticas del propio cuerpo del paciente. Esta ventaja brinda una esperanza que permitiría la implementación de una terapia celular autóloga evitando el rechazo inmunomediado que resulta del uso de otras técnicas<sup>148</sup>.

#### Ventajas de la transdiferenciación celular:

- No involucra proliferación celular intensiva. Durante los años recientes se viene demostrando el potencial de las células somáticas que son sometidas a transdiferenciación para convertirse en varios tipos celulares<sup>48</sup>.
- La transdiferenciación celular permite un enfoque alternativo para establecer células de enfermedades específicas con bases genéticas deseadas que facilitarían el estudio de enfermedades importantes.
- Debido a la plasticidad y accesibilidad de los fibroblastos es que han sido considerados como fuente primaria para estudios de transdiferenciación<sup>142</sup>.
- Tienen la ventaja por sobre las células humanas embrionarias que usualmente no forman teratomas y están libres de problemas éticos. Se pueden obtener y expandir en cultivo en laboratorios<sup>149</sup>.

#### Desventajas:

- Las células reprogramadas deben estar libres de vectores insertados en el DNA lo que puede potencialmente producir mutaciones y cáncer.

- Las células deben ser funcionales totalmente y mantener esa eficiencia una vez trasplantadas y sobrevivir largo tiempo, por lo que muchas enfermedades degenerativas quizás no son pasibles de este tipo de estrategias.

- La complejidad de los costos y la duración para obtener las primeras células productoras de insulina.

### La visión del experto

El experto consultado, investigador de la Unidad de Medicina Molecular y Genómica del Hospital Italiano de Buenos Aires, Dr. Federico Alberto Pereyra Bonnet, recalcó que el trabajo que se encuentran desarrollando está en etapa de experimentación en animales y aún queda mucho trabajo por hacer para llegar a los pacientes. Asimismo destacó que aquellos estudios que utilizan células madres también se encuentran en etapa de investigación y ninguno aún se ha transformado en un tratamiento que pueda ofrecerse a los pacientes. Son trabajos prometedores pero hay que manejar con cautela la información de los resultados para no crear falsas expectativas. Al momento de la redacción de este artículo no existen protocolos de aplicación de células madre para el tratamiento de la DM que hayan sido aprobados por las entidades regulatorias.

### 3. PÁNCREAS ARTIFICIAL

Los intentos biológicos de mejorar el perfil glucémico de los pacientes con DM1 de una forma más fisiológica, como los trasplantes de órgano entero o islotes, entre otros, tienen muchas limitaciones como el uso de inmunosupresores, complicaciones del procedimiento y disponibilidad de órganos. Los intentos "mecánicos" de alcanzar la normoglucemia a través de la infusión de insulina controlada por las concentraciones de glucosa en sangre, iniciados en la década de 1970, han vuelto a tener auge en los últimos tiempos<sup>150</sup>.

Para comprender la utilidad y la importancia del páncreas artificial debemos repasar la fisiología de la secreción insular. La secreción de insulina por parte de las células  $\beta$  del páncreas es estimulada por los niveles de glucosa sanguínea y modulada por el SNA y la acción de enterohormonas. La insulina actúa principalmente sobre el hígado, músculo y grasa promoviendo el almacenamiento de energía. Además las células  $\beta$  del páncreas liberan otras sustancias como el ácido gamma aminobutírico (GABA) y la amilina que cumplirían una importante función de comunicación paracrina y autocrina<sup>151</sup>.

La liberación de insulina se produce en dos fases. Una primera fase rápida, debida a la liberación de insulina almacenada en gránulos vecinos a la membrana celular, y una segunda fase más lenta, por la secreción de gránulos que se encuentran alejados de la misma y al estímulo del proceso de síntesis de la hormona. Ambas fases requieren de la oxidación aeróbica de la glucosa y de una adecuada concentración de calcio extracelular<sup>152</sup>.

El glucagón es una hormona secretada por las células  $\alpha$  del páncreas que aumenta los niveles de glucosa circulante rápidamente estimulando fundamentalmente la glucogenólisis hepática. Ha sido aprobado su uso parenteral para el tratamiento de la hipoglucemia severa, pero en su uso *off label* se describe su eficacia en el tratamiento y prevención de la hipoglucemia leve en dosis bajas. Entre las reacciones adversas se presentan síntomas gastrointestinales como náuseas y vómitos<sup>153</sup>.

La amilina es un polipéptido co-secretado en cantidades equimolares con la insulina por las células  $\beta$  del páncreas. La secreción de amilina está disminuida en pacientes con DM1, el grado de deficiencia se correlaciona con la disminución de la insulina. La amilina disminuye la glucemia al suprimir la producción de glucagón endógeno, especialmente en el estado postprandial, con la consecuente disminución de la producción hepática de glucosa. Además reduce el vaciamiento gástrico e induce la saciedad a nivel central. La amilina es inestable en solución por lo que en el tratamiento de la DM1 se utiliza un análogo llamado pramlintide con efectos similares a la amilina nativa. La supresión postprandial de glucagón no impide la respuesta de éste ante una hipoglucemia<sup>154</sup>.

La infusión subcutánea continua de insulina, más conocida como bomba de insulina, ha ganado popularidad entre pacientes con DM1 y entre los médicos que tratan esta enfermedad debido a que permite un perfil más fisiológico de la administración de insulina. Entre los beneficios de esta técnica se resalta el impacto en los niveles de HbA1c, con una diferencia significativa en la calidad del control y en la tasa de hipoglucemias graves frente a los resultados obtenidos mediante inyecciones múltiples de insulina. Esta última diferencia, al igual que la disminución de la variabilidad glucémica, sólo se observa en pacientes adultos con DM1 pero no en niños. Entre otros beneficios se destaca el hecho que puede suspenderse ante la necesidad de una actividad física. Los efectos psicosociales son dis-

pares: algunos estudios han demostrado una mejora en los niveles de ansiedad y de calidad de vida. Existe un riesgo potencial de cetoacidosis diabética (CAD) y resultan más frecuentes las reacciones a nivel local del sitio de infusión como lipohipertrofia, irritación de la piel e infecciones<sup>155</sup>.

La disponibilidad del monitoreo continuo de glucosa ha hecho posible el desarrollo de un páncreas endocrino "biónico". Diferentes estudios han evaluado los resultados de páncreas artificiales tanto en instituciones cerradas como en situaciones simuladas de vida real<sup>156</sup>.

Hay una vasta terminología para el páncreas artificial; se usan como sinónimos páncreas biónico, circuito cerrado de infusión de insulina, dispositivo de liberación de insulina automático y sistema de tratamiento por rango. Es necesario avanzar y modernizar el tratamiento insulínico buscando alternativas dado que sólo el 20% de los niños y jóvenes y el 40% de los adultos con DM1 alcanzan los objetivos planteados por la Asociación Norteamericana de Diabetes (ADA), la hipoglucemia continúa siendo un factor limitante y la variabilidad glucémica aún es un reto y un obstáculo de buen control metabólico. Los pacientes con hipoglucemia no percibida refieren mayor temor a las hipoglucemias con un aumento en los niveles de estrés y ansiedad que restan calidad de vida pudiendo contribuir a la aparición de depresión<sup>157,158</sup>.

El desarrollo del páncreas artificial se remonta a 1964 cuando Kadish utilizó una bomba para la infusión de insulina controlada manualmente de acuerdo a glucemias realizadas regularmente. Los sistemas automatizados de páncreas artificial tipo "bedside" fueron introducidos a mediados de 1970, y a fines de esa década se lanzaron las primeras bombas subcutáneas comerciales que desde entonces sufrieron numerosas modificaciones en tamaño, forma, disponibilidad y funcionalidad. Además en 1970 se demostró que el automonitoreo glucémico (AMG) mejora el control metabólico; también sufrió varias modificaciones en tamaño, practicidad, tamaño de la muestra, entre otras. En 1990 se desarrolló el monitoreo glucémico continuo (CGM) y ha demostrado ser útil en pacientes tratados con bomba de insulina. Desde la disponibilidad del CGM se han diseñado y estudiado diversos dispositivos de circuito cerrado de dispensación de insulina. El primer circuito cerrado semiautomático ha sido aprobado en 2009 en Europa (Minimed Paradigm) y recientemente aprobado en los Estados Unidos. El mismo suspende

la entrega de insulina durante 2 hs si el usuario no reconoció la hipoglucemia<sup>159</sup>.

Un circuito cerrado de infusión podría beneficiar a los pacientes con DM especialmente en niños que no tengan la capacidad de manejar su propia terapia. Estudios clínicos han enfocado su uso en la prevención de la hipoglucemia nocturna<sup>160</sup>.

El sistema de infusión de circuito cerrado consiste en tres componentes: la bomba de infusión de insulina, el CGM y una computadora que, utilizando un algoritmo, calcula automáticamente las dosis de insulina u otras hormonas que serán administradas al sujeto<sup>161</sup>. Entre los algoritmos de control están el modelo de control predictivo (MPC), el control derivativo integral proporcional (PSD) y el control *fuzzy logic*. El MPC usa modelos matemáticos para la regulación glucémica entregando insulina según las excursiones glucémicas, y minimiza la diferencia entre la glucemia ideal y la pronosticada según el modelo. Es proactivo dado que calcula en forma anticipada las glucemias por venir. El PID ajusta continuamente la infusión de insulina considerando la desviación de la glucemia del paciente de los niveles ideales, el área bajo la curva entre la glucemia ambiental y el objetivo, y finalmente la tasa de cambio de la glucemia del paciente. El modelo *fuzzy logic*, en adición del MPC, incluye las características físicas del paciente y los factores basales y bolos de insulina.

La FDA norteamericana propuso algunos pasos que deben cumplirse en forma ineludible durante el desarrollo de los sistemas cerrados:

- Sistema de suspensión por límite bajo pre-determinado.
- Sistema de control por rango.
- Sistema de control por objetivo.

El controlador es implementado usando computadoras, *tablets*, *smartphones* u otros dispositivos más pequeños. La comunicación entre los dispositivos debe ser inalámbrica. Entre los algoritmos existen algunos que requieren información del perfil de insulinización del paciente y otros que sólo calculan la dosis por su peso para su inicialización<sup>159,160,162</sup>.

La transición del páncreas artificial hacia la portabilidad comenzó en 2011 con la introducción del *Diabetes Assistant* (DiAs) desarrollado para *smartphones*. DiAs recibe la información del glucómetro continuo vía *bluetooth* y por la misma vía éste se comunica con la bomba de infusión de insulina. Esta portabilidad permite el uso del circuito cerrado durante todo el día en condiciones norma-

les de la vida real<sup>163</sup>. Estos “circuitos cerrados” son en realidad híbridos ya que aceptan y requieren modificaciones manuales. La aprobación es inminente dado que la tecnología para su desarrollo está actualmente disponible<sup>164</sup>.

Los circuitos cerrados pueden infundir sólo insulina o bien acompañada de otras hormonas como glucagón, análogos del GLP-1, análogos de la amilina, con resultados variables<sup>165</sup>. Los requerimientos de insulina varían entre sujetos lo que dificulta el “seteo” del páncreas biónico reforzando la necesidad de los algoritmos adaptados. El uso de bolos precomidas e incluso de conteo de carbohidratos se torna indispensable para evitar las excursiones postprandiales exageradas<sup>166</sup>.

La variación en la composición de las comidas aún es un reto de los sistemas cerrados. Una solución plausible sería establecer perfiles de dispensación de insulina según la cantidad de grasas de los alimentos clasificándolas en baja o alta<sup>167</sup>. El tipo de comida constituye también otro de los obstáculos; se sabe que en Estados Unidos el desayuno es la comida principal, un desafío para el páncreas biónico ya que resulta el momento de mayor excursión glucémica postprandial<sup>168</sup>. El ejercicio es otro de los obstáculos a vencer en los candidatos a utilizar circuitos cerrados. La mayoría de los estudios se realizó en pacientes internados o bien con ejercicio prefijado<sup>162</sup>.

La relación costo-efectividad de estos sistemas es un punto muy cuestionado, difícil de determinar hasta su salida al mercado. Un análisis de las bombas con suspensión por hipoglucemia, predecesoras del páncreas artificial, demostró su costo-efectividad. Si bien incrementa levemente los costos comparado con pacientes tratados con bombas tradicionales y CGM, disminuye los eventos de hipoglucemia, en especial las hipoglucemias graves. Por lo tanto reduce los costos de internación y otros gastos que se asocian a estas circunstancias<sup>168</sup>. Algunos estudios y opiniones de expertos aseguran que la introducción de los circuitos cerrados debería hacerse en forma gradual, empezando con aplicaciones sencillas como limitando los valores bajos o usándolos sólo de noche<sup>169</sup>.

Alcanzar y mantener niveles de glucosa plasmática cercanos a la normalidad es esencial para el cuidado de los pacientes con DM1. El *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) demostró la importancia de mantener los niveles de HbA1c cercanos a la normalidad para evitar la aparición

de complicaciones microvasculares o retrasar su progresión. La meta internacional de HbA1c <7% disminuye el desarrollo y progresión de las complicaciones micro y cardiovasculares en aproximadamente un 76%<sup>170</sup>. Para alcanzar esta meta se requieren controles frecuentes de los niveles de glucosa plasmática, múltiples aplicaciones diarias de insulina o el uso de una bomba de insulina. Aún con un sistema fisiológico de liberación continua de insulina que combine dosis basal-bolo con las comidas se observan episodios de hipo e hiperglucemia frecuentes en la mayoría de los pacientes con DM1<sup>161</sup>.

Sobre la base de estos principios fisiológicos de regulación de glucemia plasmática se ha desarrollado un sistema computarizado que libera dosis de insulina y glucagón subcutánea, en respuesta a la medición de los niveles de glucosa plasmática medidos cada cinco minutos<sup>171</sup>.

Los principales elementos de este sistema de páncreas artificial bihormonal consisten en una bomba de infusión de insulina (análogos rápidos) y glucagón, monitor de glucosa continuo y un sistema de control<sup>172</sup>. La inclusión de glucagón en el sistema es con el objetivo de imitar la fisiología normal y prevenir la hipoglucemia postprandial que había sido observada en aquellos sistemas de páncreas artificial que utilizaban solamente infusión de insulina subcutánea<sup>173</sup>.

La tercera generación de páncreas artificial bihormonal controla la liberación de insulina ultrarrápida (una de las más usadas en los estudios es la insulina análoga lispro) desde el tejido celular subcutáneo a través de un modelo matemático predictivo que incorpora datos farmacocinéticos tales como el  $T_{max}$  (tiempo en el cual la droga alcanza su máxima concentración en plasma) y el  $T_{95}$  (tiempo en el cual se elimina el 95% de la droga del plasma). La dosis de glucagón es controlada por un algoritmo matemático proporcional derivativo. El único dato que recibe el sistema de control es el nivel de glucosa de acuerdo al monitoreo continuo de glucosa; esto le permite dosificar la dosis de insulina/glucagón cada cinco minutos. El primer bolo de insulina administrado con la comida se establece según el peso del paciente (0,05 U/kg). En las primeras 24 hs la adaptación se basa en el monitoreo de glucosa continuo y la dosis es en respuesta a una comida precedente. El objetivo es mantener la glucemia plasmática por encima de 100 mg/dl<sup>166</sup>.

Debemos tener presente que, por comparación

a la vía fisiológica (intraportal), los análogos de insulina de acción rápida, desde el punto de vista farmacocinético, muestran una absorción lenta desde el subcutáneo, y por otro lado el glucagón actualmente disponible es una molécula con poca estabilidad por lo cual debe ser recambiado diariamente<sup>156</sup>.

Los objetivos que busca alcanzar este novedoso sistema son:

- Reducir el riesgo de hipoglucemia.
- Disminuir las complicaciones a largo plazo asociadas a las excursiones de la glucemia.
- Mejorar la calidad de vida en pacientes con DM1. El páncreas artificial bi-hormonal debe ser seguro y efectivo en el control de la glucemia en pacientes de todas las edades (niños, adolescentes y adultos) y en distintas situaciones de la vida diaria.
- Cubrir los requerimientos de insulina en caso de actividad física, estrés emocional y enfermedad.

Los dos últimos puntos mencionados anteriormente constituyen un gran desafío dadas las diferencias entre los distintos individuos con respecto a los requerimientos de insulina, en particular entre niños, adultos y adolescentes, quienes típicamente demandan mayores requerimientos<sup>156</sup>.

En relación a lo mencionado en el párrafo anterior, se comentan los siguientes estudios randomizados denominados "*Beacon Hill Study*" y "*Summer Camp Study*". El primero incluyó 20 adultos mayores de 21 años con DM1, con al menos un año de diagnóstico de enfermedad, quienes estaban bajo tratamiento con bomba de insulina. Los pacientes fueron controlados durante un período de cinco días usando bomba de insulina y cinco días bajo el sistema de páncreas artificial<sup>156</sup>.

Durante el período de uso de páncreas artificial los pacientes podían moverse libremente en un radio de 8 km<sup>2</sup>, en Beacon Hill (Boston) acompañados por un enfermero. Tuvieron permitido comer lo que deseaban en restaurantes, la ingesta de alcohol diaria fue limitada y podían realizar actividad física en gimnasios. Durante el período nocturno (desde las 11 pm a las 7 am) dormían en un hotel, con un sensor venoso de los niveles de glucosa plasmática, el cual realizaba mediciones cada 30 minutos, y cada 15 minutos en caso que los niveles de glucosa descendieran por debajo de 70 mg/dl. Durante el período desde las 7 am a las 11 pm los niveles de glucosa plasmática fueron monitorizados por los pacientes a través de la medición de glucemia capilar cada 2 hs, antes de las comidas, y cada 30 minutos durante el momento que realizaban ejercicio

o tenían síntomas de hipoglucemia. Si ocurría esta última situación podían consumir carbohidratos<sup>156</sup>.

Los resultados primarios a obtener fueron los niveles de glucosa plasmática medidos cada 2 hs, el porcentaje de tiempo durante el cual los niveles de glucosa eran menores a 70 mg/dl, y secundariamente el número de hipoglucemias que requirió el uso de carbohidratos, durante el período bajo páncreas artificial. Los resultados evidenciaron que el nivel de glucosa durante los cinco días de uso del "*bionic pancreas*" fue de 138 mg/dl. Al segundo día los niveles de glucemia, basados en el monitoreo continuo, fueron significativamente menores a los observados durante el período control, y el porcentaje de tiempo durante el cual la glucosa permaneció por debajo de 70 mg/dl también fue menor (4,1% vs 7,3%, P=0,01), aumentando ligeramente el requerimiento de insulina. La dosis promedio de glucagón durante los días dos a cinco de páncreas artificial fue de 0,82 mg/d<sup>156</sup>.

El "*Summer Camp Study*" incluyó 32 adolescentes con DM1 (de entre 12 y 21 años de edad). Todos los pacientes participaron en las mismas actividades e ingirieron las mismas comidas. Podían consumir 15 g de glucosa si los niveles de glucosa plasmática eran menores a 60 mg/dl o si el valor era menor de 80 mg/dl acompañado de síntomas. En este estudio el resultado primario a medir fue el promedio de niveles de glucosa plasmática y el porcentaje de tiempo en el cual esos niveles se encontraban por debajo de 70 mg/dl durante el período control y durante el período de uso de páncreas artificial. El resultado secundario a buscar fue -al igual que en el estudio de adultos- el número de hipoglucemias que requirió el uso de carbohidratos<sup>156</sup>.

La dosis total diaria de insulina durante el período de uso de páncreas artificial fue de 0,82 unidades/kg y la de glucagón de 0,72 mg/d. El nivel de glucosa durante el período de uso de páncreas artificial fue significativamente menor, pero el porcentaje de tiempo durante el cual la glucemia permaneció por debajo de 70 mg/dl fue similar en ambos períodos (6,1% vs 7,6%, P=0,23). Las intervenciones por hipoglucemia fueron menos frecuentes durante el uso de páncreas artificial que durante el período control (1 en 1,6 días vs 1 en 0,8 días, P<0,001)<sup>156</sup>.

Con respecto a los eventos adversos, entre los adultos no hubo hipoglucemias graves. Durante el período de uso de páncreas artificial se presentaron como eventos náuseas tras 2 hs de administrada la

última dosis de glucagón y vómitos tras la extracción del catéter intravenoso. El set de insulina debió extraerse en tres oportunidades y el de glucagón en una por dolor o inflamación. Entre los adolescentes no hubo episodios de hipoglucemia grave durante el período de páncreas artificial. Durante el período control hubo un episodio asociado con confusión (glucosa plasmática 19 mg/dl) que fue tratado exitosamente con carbohidratos orales. Tres pacientes tuvieron hipercetonemia transitoria durante cada período que se resolvió luego de que se cambiara el set de infusión, y en un caso luego de que fuera resuelto un problema técnico con el páncreas artificial. Un paciente reportó náuseas y vómitos. En cada uno de estos eventos adversos la última dosis de glucagón había sido dada 2 a 5 hs antes<sup>156</sup>.

Como conclusión puede mencionarse que en ambos estudios el páncreas artificial bihormonal redujo los niveles de glucosa plasmática comparado con el uso de bomba de insulina, teniendo en cuenta que el 75% de los pacientes tenía mejor control glucémico de base que el promedio poblacional<sup>172,174</sup>. Entre los adultos el páncreas artificial redujo un 67% el tiempo durante el cual los niveles de glucosa plasmática permanecieron por debajo de 60 mg/dl, y un 94% durante el período nocturno. Entre los adolescentes hubo una reducción de más del 50% en la cantidad de carbohidratos requeridos para tratar las hipoglucemias<sup>156</sup>.

## REFERENCIAS

1. Martí ML. Historia de la Diabetes. Bol. An. de Medicina 1999; 77: 109-118.
2. Robertson RP. Islet transplantation for type 1 diabetes, 2015: what have we learned from alloislet and autoislet successes? Diabetes Care 2015; 38: 1030-1035.
3. Kowalski A. Pathway to artificial pancreas systems revisited: moving downstream. Diabetes Care 2015; 38:1036-1043.
4. Atkinson MA, George S, Eisenbarth 1947-2012, In Memorial. Diabetología 2013; 56: 435-438.
5. Pozilli P, Di Mario U. Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes of the adult). Diabetes Care 2001; 24 N° 8, 1460-1467.
6. Atkinson MA, Von Herrat M, Powers AC, et al. Current concepts on the pathogenesis of type 1 diabetes: considerations for attempts to prevent and reverse the disease. Diabetes Care 2015; 38: 979-988.
7. Skyler JS. Prevention and reversal of type 1 diabetes: past challenges and future opportunities. Diabetes Care 2015; 38: 997-1007.
8. Ludvigsson J, Faresjo M, Hjorth M, et al. GAD Treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes. NEJM 2008; 359: 1909-1920.
9. Raz I, Elias D, Avron A, et al.  $\beta$ -cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. Lancet 2001; 358: 1749-1753.
10. Faustman DL, Wang L, Okubo Y, et al. Proof-of-concept, randomized, controlled clinical trial of bacillus-calmette-guerin for treatment of long-term type 1 diabetes. Plos. One 2012; Vol. 7, Issue 8, e41756.
11. 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. Review.
12. Mittal S, Gough SC. Pancreas transplantation: a treatment option for people with diabetes. Diabet Med. 2014; 31(5):512-21. Review.
13. Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, Idezuki Y, Goetz FC. Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. Surgery. 1967; 61(6):827-37
14. Sutherland DE, Matas AJ, Najarian JS. Pancreatic islet cell transplantation. Surg. Clin. North Am. 1978; 58(2):365-82.
15. Gruessner AC, Sutherland DE. Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. Clin. Transplant. 2005; 19(4):433-55. Review.
16. Gruessner AC, Gruessner RWG. Pancreas transplant outcomes for United States and non United States cases as reported to the United Network for Organ Sharing and the International Pancreas Transplant Registry as of December 2011. Clin. Transpl. 23-40 (2012).
17. Newsletter Transplant. International Figures on Donation and Transplantation 2013. Vol. 19. N° 1. Septiembre 2014.
18. Mauer M, Fioretto P. Pancreas transplantation and reversal of diabetic nephropathy lesions. Med. Clin. North Am. 2013; 97(1):109-14.
19. Gruessner RW, Gruessner AC. Pancreas transplant alone. Diabetes Care 2013, Vol. 36(8), 2440-7.
20. Gruessner A C. Pancreas after kidney transplants in posturemic patients with type 1 diabetes mellitus. J. Am. Soc. Nephrol 2001, 12, 2490-2499.
21. Gruessner AC, Gruessner RW. The current state of pancreas transplantation. Nat. Rev. Endocrinol. 2013, Vol. 9, 555-562.
22. Gruessner RWG, Sutherland DER, Kandaswamy R, Gruessner AC. Over 500 solitary pancreas transplants in nonuremic patients with brittle diabetes mellitus. Transplantation 85, 42-47 (2008).
23. Robertson P, Davis C, Larsen J, Stratta R, Sutherland DE. American Diabetes Association. Pancreas transplantation in type 1 diabetes. Diabetes Care. 2004; 27 Suppl 1:S105
24. Kandaswamy R, Stock PG, Skeans MA, et al. Special Issue: Organ Procurement and Transplantation Network and Scientific Registry of Transplant Recipients 2011 Data Report. Am. J. Transplant 2013, Vol. 13, pag 47-72.
25. Montiel MC, Pardo F, et al. Trasplante pancreático. An. Sist. Sanit. Navar. 2006; 29 (Supl 2): 113-124.
26. Smail N, Paraskevas S, Tan X, et al. Renal function in recipients of pancreas transplant alone. Curr. Opin. Organ. Transplant 2012, Vol. 17, pag 73-79.
27. Meirelles RF Júnior, Salvalaggio P, Pacheco-Silva A. Pancreas transplantation. Einstein. 2015; 13(2):305-9. Review.

28. Proneth A, Schnitzbauer A, Zeman F, et al. Extended pancreas donor program. The EXPAND study rationale and study protocol. *Transplant Res.* 2013, Vol. 2: 12.
29. Jong Han D, Shuterland D. Pancreas transplantation. *Gut. Liver.* 2010, Vol. 4, pag. 450-465.
30. Bazerbachi F, Selzner M, Marquez MA, et al. Portal venous vs systemic venous drainage of pancreas grafts: impact on long-term results. *Am. J. Transplant* 2012, Vol. 12, 226-232.
31. Stadler M, Anderwald C, Pacini G, Zbyn S, Promintzer-Schifferl M, Mandl M, et al. Chronic peripherals hyperinsulinemia in type 1 diabetic patients after successful combined pancreas-kidney transplantation does not affect ectopic lipid accumulation in skeletal muscle and liver. *Diabetes* 2010; 59:2015-2018.
32. Sollinger H, Odorico J, Becker Y, et al. One thousand simultaneous pancreas-kidney transplants at a single center with 22-year follow-up. *Ann. Surg.* 2009, Vol. 250: 618-630.
33. Van der Werf WJ, Odorico JS, DAlessandro AM, et al. Enteric conversion of bladder-drained pancreas allografts: experience in 95 patients. *Transplant Proc.* 1998, Vol. 30, 441-442.
34. Gruessner RW, Gruessner AC. The current state of pancreas transplantation. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2013; 9: 555-562.
35. Gruessner AC. Update on pancreas transplantation: comprehensive trend analysis of 25,000 cases followed up over the course of twenty-four years at the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). *Rev. Diabet. Stud.* 2011; 8(1):6-16. Review.
36. Shapiro AM. Islet transplantation in type 1 diabetes: ongoing challenges, refined procedures, and long-term outcome. *Rev. Diabet. Stud.* 2012. 9(4):385-406.
37. Poradzka A, Wronski J, Jaski M, et al. Insulin replacement therapy in patients with type 1 diabetes by isolated pancreatic islet transplantation. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research.* 2013. 70(6):943-950.
38. Robertson RP. Islet transplantation a decade later and strategies for filling a half-full glass. *Diabetes.* 2010. 59:1285-1291.
39. Shapiro AMJ, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *NEJM.* 2000. 343:230-238.
40. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355(13):1318-1330.
41. Jamiolkowski RM, Guo LY, Li YR, et al. Islet transplantation in type 1 diabetes mellitus. 2012. *Yale Journal of Biology and Medicine.* 85:37-43.
42. Shapiro AMJ, McCall M. Update of islet transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2012. 1-17
43. Robertson RP. Islet transplantation for type 1 diabetes, 2015: what have we learned from alloislet and autoislet successes? *Diabetes Care* 2015; 38:1030-1035.
44. Ryan EA, Shandro T, Green K, et al. Assessment of the severity of hypoglycemia and glycemic lability in type 1 diabetic subjects undergoing islet transplantation. 2004. *Diabetes.* 53:955-962.
45. Clarke WL, Cox DJ, Gonder-Frederick LA, et al. Reduced awareness of hypoglycemia in adults with IDDM. A prospective study of hypoglycemic frequency and associated symptoms. *Diabetes Care.* 1995 Apr. ;18(4):517-22.
46. Geddes J, Eright R, Zammit N, et al. An evaluation of methods of assessing impaired awareness of hypoglycaemia in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2007; 30:1868-70.
47. Ruiz de Adana MS, Domínguez-López M, Tapia MJ, et al. ¿Cómo cuantificar la variabilidad glucémica? *Av. Diabetol.* 2008; 24(1): 77-81.
48. Ricordi C, Tzakis AG, Carroll PB, et al. Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. *Lancet* 1990; 336:402-405.
49. Najarian JS, Sutherland DE, Matas AJ, Goetz FC. Human islet autotransplantation following pancreatectomy. *Transplant Proc.* 1979; 11:336-340.
50. Teuscher AU, Kendall DM, Smets FC, et al. Successful islet autotransplantation in humans. *Diabetes* 1998; 47:324-330.
51. Robertson RP. Consequences on beta-cell function and reserve after long-term pancreas transplantation. *Diabetes* 2004; 53:633-644.
52. Wilson GA, Bumgardner GL, Henry ML, et al. Decreased graft survival rate in obese pancreas/kidney recipients. *Transplant Proc.* 1995; 27(6):3106-7.
53. Scalea JR, Cooper M. Surgical strategies for type II diabetes. *Transplant Rev.* 2012; 26(3):177-82.
54. Korsgren O, Nilsson B, Berne C, et al. Current status of clinical islet transplantation. *Transplantation.* 2005; 79(10):1289-1293.
55. Scharp DW, Marchetti P. Encapsulated islets for diabetes therapy: history, current progress, and critical issues requiring solution. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2014 Apr; 67:68:35-73.
56. Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, et al. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes.* 2001; 50(4):710-719.
57. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, et al. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet.* 2007; 370 (9581):59-67-23.
58. Naziruddin B, Wease S, Stablein D, et al. HLA class I sensitization in islet transplant recipients: report from the Collaborative Islet Transplant Registry. *Cell Transplant* 2012; 21(5):901-8.
59. Gruessner AC, Sutherland DE. Pancreas transplant outcomes for United States (US) cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). *Clin. Transplant* 2008:45-56.
60. Burman KD, Cunningham EJ, Klachko DM, et al. Successful treatment of insulin resistance with dealaninated pork insulin (DPI). *Mo. Med.* 1973; 70(6):363-366.
61. Graham ML, Schuurman HJ. The usefulness and limitations of the diabetic macaque model in evaluating long-term porcine islet xenograft survival. *Xenotransplantation.* 2013; 20(1):5-17.
62. Brady JL, Sutherland RM, Hancock M, et al. Anti-CD2 producing pig xenografts effect localized depletion of human T cells in a huSCID model. *Xenotransplantation.* 2013; 20(2):100-109.
63. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, et al. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103:2334-2339.
64. Dolgin E. Encapsulate this. *Nat Med.* 2014; 20(1):9-11.
65. Cogger K, Nostro MC. Recent advances in cell replacement therapies for the treatment of type 1 diabetes. *Endocrinology* 2015, Jan; 156(1):8-15.
66. Watson CJ. The current challenges for pancreas transplantation for diabetes mellitus. *Pharmacological Research* 98 (2015) 45-51.
67. Fiorina P, Folli F, Bertuzzi F, et al. Long-term beneficial effect of islet transplantation on diabetic macro-/microangiopathy in type 1 diabetic kidney-transplanted patients. *Diabetes Care* 26 (2003):1129-1136.
68. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343:230-238.

69. Acha-Torrez R. Pancreatic transplantation and Langerhans islets approaches in the treatment of diabetes. *Rev. Cient. Cienc. Med.* 2011; 14(1): 31-35.
70. Montanya EM, Nacher MG, Tellez NB. Trasplante de islotes de páncreas y terapia celular en diabetes. En: Montanya EM. *El islote pancreático en el desarrollo y tratamiento de la diabetes*. Ed. Madrid: Sociedad Española de Diabetes; 2007. 109-122.
71. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, et al. International Trial of the Edmonton Protocol for Islet Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355:1318-1330.
72. Pepper AR, Gala-Lopez B, Ziff O, et al. Current status of clinical islet transplantation. *World J. Transplant.* 2013. Dec 24.3(4):48-53.
73. Jahansouz C, Kumer SC, et al. Evolution of B-cell replacement therapy in diabetes mellitus: islet cell transplantation. *J. Transplant.* 2011; 2011: 247.959 (PMC) PubMed.
74. Casanova D. Pancreatic islets transplantation in the treatment of diabetes mellitus: present and future. *Cir. Esp.* 2009, 85(2):76-83.
75. Correa-Gianella ML, Amaral AS. Pancreatic islet transplantation. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2009, 1(9).
76. Balibrea del Castillo JM, Ameigeiras EV, et al. Current status of islet transplantation. *Cir. Esp.* 2007, 81 (4): 177-191.
77. Ryan EA, Shandro T, Green K, 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.
78. Ruiz MS, Domínguez-López M, Tapia MJ, et al. Cómo cuantificar la variabilidad glucémica. *Av. Diabetol.* 2008; 24(1): 77-81.
79. Ludwig B, Reichel A, Kruppa A, et al. Islet transplantation at the dresden diabetes center: five years' experience. *Horm. Metab. Res.* 2015; 47: 4-8.
80. Papadimitriou JC. Evaluación histológica del trasplante de páncreas. 21° Congreso de la SEAP, Madrid, 2003.
81. Staeva TP, Chatenoud L, Insel R, et al. Recent lessons learned from prevention and recent-onset type 1 diabetes immunotherapy trials. *Diabetes* 2013; 62:9-17.
82. Barajas M. Estrategias de terapia celular para el tratamiento de la diabetes tipo 1: dónde estamos y qué podemos esperar. *Av. Diabetol.* 2011; 27(4):115-127.
83. Feutren G, Papoz L, Assan R, et al. Cyclosporin increased the rate and length of remission in insulin-dependent diabetics of recent onset: result of a multicentre double-blind trial. *Lancet* 1986; 2:119-23.
84. Bougneres PF, Carel JC, Castaño L, et al. Factors associated with early remission of type 1 diabetes in children with cyclosporine. *N. Engl. J. Med.* 1988; 318:663-70.
85. Licea-Puig MA, Gonzalez-Calero TM. Estrategias para la prevención de la diabetes mellitus tipo 1. *Revista Cubana de Salud Pública.* 2013;39 (4):733- 751.
86. Gitelman SE, Gottlieb PA, Rigby MR, et al. Antithymocyte globulin treatment for patients with recent-onset type 1 diabetes: 12-month results of a randomised, placebo controlled, phase 2 trial. *Lancet* 2013; 1 (4): 306-316.
87. Skyler JS. Immune intervention for type 1 diabetes, 2012-2013. *Diabetes Technology & Therapeutics.* 2014; 16: S85-S91.
88. Hagopian W, Ferry RJ, Sherry N, et al. Teplizumab preserves C-peptide in recent-onset type 1 diabetes: 2-year results from the randomized, placebo-controlled. *Protégé Trial.* *Diabetes* 2013; 62(11): 3901-3908.
89. Herold KC, Gitelman SE, Ehlers MR, et al. Teplizumab (anti-CD3 mAb) treatment preserves C-peptide responses in patients with new-onset type 1 diabetes in a randomized controlled trial: metabolic and immunologic features at baseline identify a subgroup of responders. *Diabetes* 2013; 62(11):3766-74.
90. Aronson R, Gottlieb PA, Christiansen JS, Donner TW, Bosi E, Bode BW, Pozzilli P; DEFEND Investigator Group. Low-dose oteplizumab anti-CD3 monoclonal antibody DEFEND-1 study: results of the randomized phase III study in recent-onset human type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2014 Oct; 37(10):2746-54.
91. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361:2143-52.
92. Ludvigsson J, Krisky D, Casas R, et al. GAD65 Antigen therapy in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366:433-42.
93. Raz I, Ziegler AG, Linn T, et al. Treatment of recent-onset type 1 diabetic patients with DiaPep277: results of a double-blind, placebo-controlled, randomized phase 3 trial. *Diabetes Care* 2014; 37:1392-1400.
94. Kadam S. Stem cell therapy for diabetes. *Are we close enough?* *JKIMSU* 2014, 3 (1):6-17.
95. Giannoukakis N, Trucco M. Cellular therapies based on stem cells and their insulin-producing surrogates: a 2015 reality check. *Pediatric Diabetes* 2015;16:151-163.
96. Johannesson B, Sui L, O Freytes D, Creusot R, Egli D. Review: toward  $\beta$  cell replacement for diabetes. *The EMBO Journal* 2015; Vol. 34, 841-855.
97. DCCT Research Group: the effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1993, 329: 977-986.
98. Beta cell function and the development of diabetes-related complications in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* 2003, 26:832-836.
99. Nathan DM, Bayless M, Clear TP, Genuth S, Gubitosi-Klug R, Lachin JM, Lorenza G, Ziman B. Group D.E.R. DCCT/EDIC at 30 years: advances and contributions. *Diabetes* 2013;62:3976-3986.
100. Meng L, Zhong Chao H. Mesenchymal stem cells: biology and clinical potential in type 1 diabetes therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 2008,12 N°4:1155-1168.
101. Gerace D, Martiniello-Wilks R, O'Brien BA, Simpson AM. The use of beta-cell transcription factors in engineering artificial beta cells from non-pancreatic tissue. *Gene Therapy* 2015;22:1-8.
102. Gao X, Song L, Slen K. Transplantation of bone marrow derived-cells promotes pancreatic islet repair in mice. *Biochem Biophys Res. Commun* 2008,371 (1): 132-137.
103. Karnielli O, Izhar-Prato Y, Bulri KS, Efrat S. Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells* 2007, 25 (22): 2837-2844.
104. Weiss ML, Mendicetty S, Bledsoe AR. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization in a rodent model of Parkinson disease. *Stem Cells* 2006, 24: 781-792.
105. Maher L, Cken S, Snitow M, et al. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106:15768-15773.
106. Stadfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells without viral integration. *Science* 2008, 322:945-949.
107. Lanza RP, Cibelli JB, West MD. Prospects for the use of nuclear transfer in human transplantation. *Nat. Biotechnol.* 1999,17:1171-1174.
108. Fiorina P, Voltarelli J, Zavazava N. Immunological applications of stem cells in type 1 diabetes. *Endocrine Reviews* 2011, 32(6):725-754.

109. Ginis I, Luo Y, Miura T, Thies S, Brandenberger R, Gerech-Nir S, Amit M, Hoke A, Carpenter MK, Itskovitz-Eldor J, Rao MS. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 2004, 269:360-380.
110. Bonde S, Zavazava N. Immunogenicity and engraftment of mouse embryonic stem cells in allogeneic recipients. *Stem Cells* 2006, 24:2192-2201.
111. Bonde S, Chan KM, Zavazava N. ES-Cell derived hematopoietic cells induce transplantation tolerance. *PLoS. One* 2008, 3:e3212.
112. Drukker M, Katchman H, Katz G, Even-Tov Friedman S, Shezen E, Hornstein E, Mandelboim O, Reisner Y, Benvenisty N. Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. *Stem Cells* 2006, 24:221-229.
113. Fändrich F, Lin X, Chai GX, Schulze M, Ganten D, Bader M, Holle J, Huang DS, Parwaresch R, Zavazava N, Binas B. Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat. Med.* 2002, 8:171-178.
114. Lysy P, Weir G, Bonner-Weir S. Concise review: pancreas regeneration: recent advances and perspectives. *Stem Cells Translational Medicine* 2012, 1:150-159.
115. Wang M, Yang Y, Yang D, Luo F, Liang W, Guo S, Xu J. The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Immunology* 2009, 126:220-232
116. Zhao Y, Lin B, Darflinger R, Zhang Y, Holterman MJ, Skidgel RA. Human cord blood stem cell-modulated regulatory T lymphocytes reverse the autoimmune-caused type 1 diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *PLoS ONE* 2009, 4:e4226.
117. Oh W, Kim DS, Yang YS, Lee JK. Immunological properties of umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Cellular Immunology* 2008, 251 (2):116-123.
118. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006, 24:1294-1301.
119. Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells. *Diabetes* 2008, 57:1759-1767.
120. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur. J. Immunol.* 2005, 35:1482-1490.
121. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004, 103:4619-4621.
122. Benvenuto F, Ferrari S, Gerdoni E, Gualandi F, Frassoni F, Pistoia V, Mancardi G, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells* 2007, 25:1753-1760.
123. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 2006, 177:2080-2087.
124. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008, 111:1327-1333.
125. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006, 107:367-372.
126. Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, Selig M, Godwin J, Law K, Placidi C, Smith RN, Capella C, Rodig S, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH, Abdi R. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J. Immunol.* 2009, 183:993-1004.
127. Zanone MM, Favaro E, Miceli I, Grassi G, Camussi E, Caorsi C, Amoroso A, Giovarelli M, Perin PC, Camussi G. Human mesenchymal stem cells modulate cellular immune response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in type 1 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010, 95:3788-3797.
128. Li Y, Zhang R, Qiao H, Zhang H, Wang Y, Yuan H, Liu Q, Liu D, Chen L, Pei X. Generation of insulin-producing cells from PDX-1 gene-modified human mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology* 2007, 211(1):36-44.
129. Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant* 2005, 11:321-334.
130. Gafni Y, Turgeman G, Liebergal M, Pelled G, Gazit Z, Gazit D. Stem cells as vehicles for orthopedic gene therapy. *Gene Ther.* 2004, 11:417-426.
131. Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, Mercalli A, Melzi R, Giordano T, Belmonte N, Ferrari G, Leone BE, Bertuzzi F, Zerbini G, Allavena P, Bonifacio E, Piemonti L. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 2005, 106:419-427.
132. Huang S, Law P, Young D, Ho AD. Candidate hematopoietic stem cells from fetal tissues, umbilical cord blood vs adult bone marrow and mobilized peripheral blood. *Exp. Hematol.* 1998, 26:1162-1171.
133. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003, 102:3483-3493.
134. Sigvardsson M. New light on the biology and developmental potential of haematopoietic stem cells and progenitor cells. *J. Intern. Med.* 2009, 266:311-324.
135. Kared H, Leforban B, Montandon R, Renand A, Layseca Espinosa E, Chatenoud L, Rosenstein Y, Schneider E, Dy M, Zavala F. Role of GM-CSF in tolerance induction by mobilized hematopoietic progenitors. *Blood* 2008, 112:2575-2578.
136. Rachamim N, Gan J, Segall H, Krauthgamer R, Marcus H, Berrebi A, Martelli M, Reisner Y. Tolerance induction by "megadose" hematopoietic transplants: donor-type human CD34 stem cells induce potent specific reduction of host anti-donor cytotoxic T lymphocyte precursors in mixed lymphocyte culture. *Transplantation* 1998, 65:1386-1393.
137. Lanus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J. Clin. Invest.* 2003 111:843-850.
138. Kang EM, Zickler PP, Burns S, Langemeijer SM, Brenner S, Phang OA, Patterson N, Harlan D, Tisdale JF. Hematopoietic stem cell transplantation prevents diabetes in NOD mice but does not contribute to significant islet cell regeneration once disease is established. *Exp. Hematol.* 2005, 33:699-705.
139. Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell.* 2009 Apr 3;137(1):13-7.
140. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transcribed cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell.* 1987 Dec 24;51(6):987-1000.
141. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.* 2010 Feb 25; 463(7284):1035-4.

142. Yi F, Liu GH, Izipisua Belmonte JC. Rejuvenating liver and pancreas through cell transdifferentiation. *Cell Research* (2012) 22:616-619.
143. Ber I, Shternhall K, Perl S, Ohanuna Z, Goldberg I, Barshack I, et al. Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation. *J. Biol. Chem.* 2003;278:31950-7.
144. Zhou Q, Melton DA. Extreme makeover: converting one cell into another. *Cell Stem Cell* 2008, 3(4):382-8.
145. Thorel F, Nepote V, Avril I, et al. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature.* 2010; 464:1149-1154.
146. Pennarossa G, Maffei S, Campagnol M, Tarantini L, Gandolfi F, et al. Brief demethylation step allows the conversion of adult human skin fibroblasts into insulin-secreting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013 May 28; 110(22):8948-53.
147. Pereyra-Bonnet F, Gimeno ML, Argumedo NR, Ielpi M, Cardozo JA, Giménez CA, Hyon SH, Balzaretto M, Loresi M, Fainstein-Day P, Litwak LE, Argibay PF. Skin fibroblasts from patients with type 1 diabetes (T1D) can be chemically transdifferentiated into insulin-expressing clusters: a transgene-free approach. *PLoS One.* 2014 Jun 25;9(6):e10036.
148. Jopling C, Boue S, Izipisua Belmonte JC. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2011; 12:79-89.
149. Dave S. Mesenchymal stem cells derived in vitro transdifferentiated insulin-producing cells: a new approach to treat type 1 diabetes. *Adv. Biomed. Res.* 2014 Dec 31; 3:266.
150. Nathan D, Russell S. The future of care for type 1 diabetes. *CMAJ* 2013. 185 (4): 285-286.
151. MacDonald P, Rorsman P. The ins and outs of secretion from pancreatic  $\beta$ -cells: control of single-vesicle exo- and endocytosis. *Physiology.* 2007, 22 (2) 113-121.
152. Misler S. The isolated pancreatic islet as a micro-organ and its transplantation to cure diabetes: celebrating the legacy of Paul Lacy. *Islets.* 2010. 2(4):210-24.
153. Castle J, Engle JM, ElYoussef J, et al. Novel use of glucagon in a closed-loop system for prevention of hypoglycemia in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2010. 33:1282-1287.
154. Hoogwerf B, Doshi KB, Diab D. Pramlintide, the synthetic analogue of amylin: physiology, pathophysiology, and effects on glycemic control, body weight, and selected biomarkers of vascular risk. *Vasc. Health Risk Manag.* 2008.; 4(2): 355-362.
155. Phillip M, Battelino T, Rodriguez H, et al. Use of insulin pump therapy in the pediatric age-group consensus statement from the European Society for Paediatric Endocrinology, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes, endorsed by the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care.* 2007. 30(6):1653-62
156. Russell SJ, El-Khatib FH, Sinha M, et al. Outpatient glycemic control with a bionic pancreas in type 1 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2014. 371:313-25.
157. Kowalski A. Pathway to artificial pancreas systems revisited: moving downstream. *Diabetes Care.* 2015. 38:1036-1043.
158. Ly T, Brnabic AJ, Eggleston A, et al. A cost-effectiveness analysis of sensor-augmented insulin pump therapy and automated insulin suspension vs standard pump therapy for hypoglycemic unaware patients with type 1 diabetes. *Value Health.* 2014. 17(5):561-9.
159. Shah, V. Shoskes A, Tawfik B, et al. Closed-loop system in the management of diabetes: past, present, and future. *Diabetes Technol. Ther.* 2014. 16(8):477-90.
160. Doyle F, Huyett LM, Lee JB, et al. Closed-loop artificial pancreas systems: engineering the algorithms. *Diabetes Care.* 2014. 37:1191-1197.
161. El-Khatib F, Russell SJ, Nathan DM, et al. A bi-hormonal closed-loop artificial pancreas for type 1 diabetes. *Sci. Transl. Med.* 2010. 2, 27ra27.
162. Russell S, El-Khatib FH, Nathan DM, et al. Blood glucose control in type 1 diabetes with a bi-hormonal bionic endocrine pancreas. *Diabetes Care.* 2012. 35:2148-2155.
163. Kovatchev, B, Renard E, Cobelli C, et al. Safety of outpatient closed-loop control: first randomized crossover trials of a wearable artificial pancreas. *Diabetes Care.* 2014. 37:1789-1796.
164. Weinzimer SA, Steil GM, Swan KL, et al. Fully automated closed-loop insulin delivery vs semiautomated hybrid control in pediatric patients with type 1 diabetes using an artificial pancreas. *Diabetes Care.* 2008. 31(5):934-9.
165. Renukuntla VS, Ramchandani N, Trast J, et al. Role of glucagon-like peptide-1 analogue vs amylin as an adjuvant therapy in type 1 diabetes in a closed loop setting with ePID algorithm. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2014. 8(5):1011-7.
166. El-Khatib, FH, Russell SJ, Magyar KL, et al. Autonomous and continuous adaptation of a bi-hormonal bionic pancreas in adults and adolescents with type 1 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014. 99(5):1701-11.
167. Srinivasan A, Lee JB, Dassau E, et al. Novel insulin delivery profiles for mixed meals for sensor-augmented pump and closed-loop artificial pancreas therapy for type 1 diabetes mellitus. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2014. 8(5):957-68.
168. Steil GM, Rebrin K, Darwin C, et al. Feasibility of automating insulin delivery for the treatment of type 1 diabetes. *Diabetes.* 2006. 55(12):3344-50.
169. Hovorka R, Allen JM, Elleri D, et al. Manual closed-loop insulin delivery in children and adolescents with type 1 diabetes: a phase 2 randomised crossover trial. *Lancet.* 2010 27; 375(9716):743-51.
170. The Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 2002. 287, 2563-2569.
171. El-Khatib FH, Jiang J, Damiano ER. A feasibility study of bi-hormonal closed loop blood glucose control using dual subcutaneous infusion of insulin and glucagon in ambulatory swine. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2009. 1;3(4):789-803.
172. Beck RW, Tamborlane WV, Bergenstal RM, et al. The T1D Exchange clinic registry. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012. 97(12):4383-9.
173. Steil GM, Rebrin K, Darwin C, et al. Feasibility of automating insulin delivery for the treatment of type 1 diabetes. *Diabetes* 2006. 55(12):3344-50.
174. Wood JR, Miller KM, Maahs DM, et al. Most youth with type 1 diabetes in the T1D Exchange Clinic Registry do not meet American Diabetes Association or International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes clinical guidelines. *Diabetes Care.* 2013. 36(7):2035-7.