

Revisão / Review

Terapia celular no diabetes mellitus

Cell therapy in diabetes mellitus

Julio C. Voltarelli¹Carlos E. B. Couri¹Maria Carolina Rodrigues¹Daniela A. Moraes¹Ana Beatriz P. L. Stracieri¹Fabiano Pieroni¹George Navarro¹Maria Isabel A. Madeira¹Belinda P. Simões¹

Nesta revisão são discutidas várias alternativas de regeneração do conjunto de células produtoras de insulina do pâncreas, usando células-tronco embrionárias do cordão umbilical e adultas, e o trabalho que está sendo realizado em nosso grupo de pesquisas utilizando imunossupressão em altas doses combinada com a infusão de células-tronco hematopoéticas autólogas em diabete do tipo 1 recém-diagnosticado. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009;31(Supl. 1):149-156.

Palavras-chave: Diabete melito; células-tronco; embrionárias; cordão umbilical; medula óssea; transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas.

Introdução

O *diabetes mellitus* (DM) é um grupo de desordens metabólicas caracterizado por hiperglicemia crônica resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. A hiperglicemia crônica está associada a danos e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos.¹

Em estudo nacional realizado na década de 80, foi observada prevalência de 7,6% de diabetes na população adulta brasileira.² Estudo semelhante realizado em Ribeirão Preto (SP), cerca de dez anos após, evidenciou prevalência de 12,1% na população adulta daquela cidade.³ Em 1997 foi anunciado no XVI Congresso Mundial de Diabetes em Helsinque, Finlândia, que o diabetes acometia cerca de 153 milhões de indivíduos no mundo e a previsão da Organização Mundial da Saúde é de que, em 2025, haverá 300 milhões de pessoas diabéticas.⁴

O DM é classificado em tipo 1, tipo 2, diabetes gestacional e outras formas de *diabetes mellitus*.¹ O *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença que resulta da destruição crônica das células β pancreáticas por mecanismos auto-

imunes mediados por células, como linfócitos T e macrófagos. Este tipo de diabetes representa cerca de 5% de todos os casos de diabetes no mundo, sendo mais frequente em países escandinavos. Na sua base etiopatogênica encontra-se a associação entre fatores genéticos e ambientais. Existem mais de vinte genes envolvidos no desenvolvimento deste tipo de diabetes, porém os genes do sistema HLA parecem ter maior relação com a doença.⁵ Estudos realizados na população brasileira mostraram predominância de HLA-DR3 e HLA-DR4 nos pacientes diabéticos tipo 1, em conformidade com estatísticas mundiais.⁶ Marcadores de autoimunidade, como ICA (anticorpos anticélula da ilhota), IAA (anticorpos anti-insulina) e GADA (anticorpos antidescarboxilase do ácido glutâmico) são detectados em cerca de 90% dos pacientes. Quanto aos fatores ambientais envolvidos na gênese do DM1, sabemos que são tão ou mais importantes que os fatores genéticos na gênese da doença, entretanto, são ainda pouco conhecidos.^{1,7}

Nos pacientes com DM1, o processo de autodestruição se inicia meses a anos antes do diagnóstico clínico da doença. Com isso, dependendo da idade ao diagnóstico, cerca de 70%-90% da massa de células β já foi destruída quando dos

¹Médico(a). Unidade de Transplante de Medula Óssea (UTMO) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto-SP.

Unidade de Transplante de Medula Óssea (UTMO) do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto-SP.

Correspondência: Júlio C. Voltarelli
Hemocentro Regional, Campus-USP
14051-140 – Ribeirão Preto-SP – Brasil
Tel.: (55 16) 2101-9369; Fax.: (55 16) 2101-9309
E-mail: jvoltar@fmrp.usp.br
Doi: 10.1590/S1516-84842009005000036

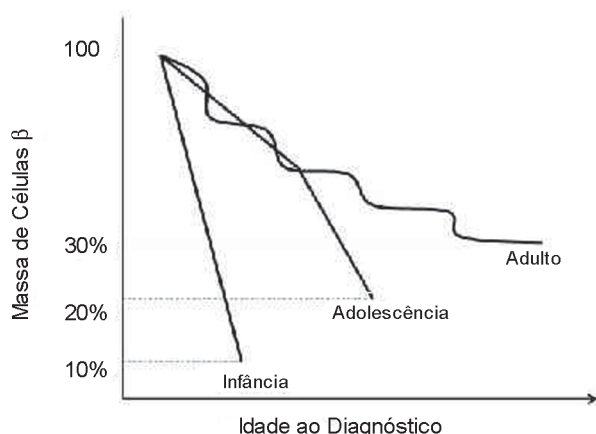


Figura 1. Velocidade de destruição da massa de células β em função da idade do diagnóstico clínico do *diabetes mellitus* tipo 1

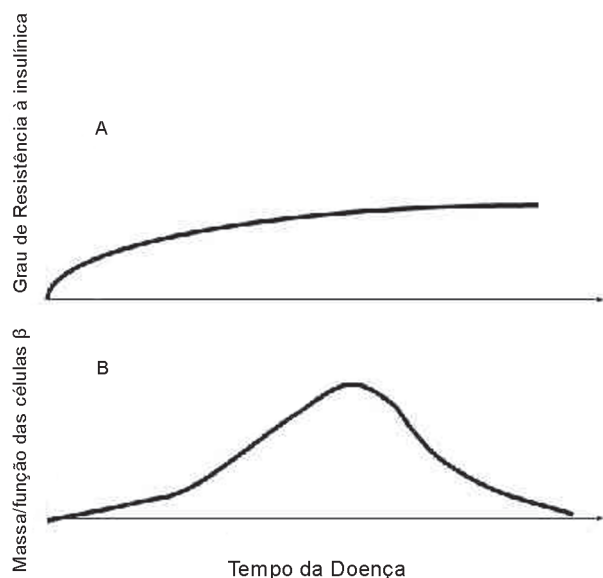


Figura 2. Representação esquemática do fenômeno de resistência insulínica (A) e do fenômeno de deterioração da massa/função das células β (B) em função do tempo de doença em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2

primeiros sintomas de hiperglicemia⁸ (Figura 1). Com o passar dos meses ou anos, este porcentual se reduz substancialmente e a secreção de insulina também se reduz na mesma proporção.

Devido à insulinopenia, os portadores de DM1 dependem de aplicações diárias de insulina para o controle dos níveis glicêmicos. Via de regra, quanto maior o número de aplicações ao dia (tratamento intensivo), melhor o controle glicêmico e menor o risco de complicações crônicas.¹ Além disso, a insulino terapia deve sempre estar acompanhada de modificações do estilo de vida, como atividade física regular e uma alimentação saudável.¹

O *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) representa cerca de 90% de todos os casos de diabetes.⁹ O principal fenômeno

fisiopatológico associado a este tipo de diabetes é a resistência à ação da insulina. Na fase inicial da doença, em resposta a esta resistência, ocorre uma hiperinsulinemia compensatória que dura meses ou anos. Com a progressão da doença, devido ao mecanismo de disfunção e redução da massa de células β , observa-se uma diminuição na secreção de insulina (Figura 2).¹⁰ No DM2, os fatores envolvidos na redução da massa de células β são diferentes do DM1 e incluem: glicolipototoxicidade, estresse oxidativo e acúmulo de depósitos amilóides nas ilhotas.¹¹ A forte herança genética associada a fatores ambientais, como obesidade e sedentarismo, são determinantes na gênese do DM2.

A base do tratamento do DM2 consiste da mudança do estilo de vida. Com a progressão da doença, torna-se necessário o uso de medicamentos antidiabéticos orais para o adequado controle das glicemias e, na fase mais avançada da doença, em que há uma marcada disfunção/redução da massa de células β , torna-se necessária a insulino terapia.¹

Como se pode observar, apesar de ter etiologias diferentes, os processos de destruição e disfunção das células β pancreáticas estão envolvidos na fisiopatologia de ambas as formas de diabetes, porém com maior relevância no DM1. Com isso, a maioria dos estudos referentes à preservação e regeneração da massa de células β foi desenvolvido nesta forma de diabetes, como veremos a seguir.

Regeneração de células β

Células β diferenciadas são detectadas inicialmente em torno do 13º dia embrionário – no início da segunda transição –, uma fase de organogênese em que as células endócrinas do pâncreas se destacam da matriz exócrina, aumentando em número e organizando-se em ilhotas maduras. Após o nascimento, o seu crescimento se deve tanto à hiperplasia quanto à hipertrofia celular.¹²

A manutenção da massa de células β na vida adulta é resultado de um estado dinâmico de equilíbrio entre proliferação e apoptose.¹³ Este processo fisiológico tem como objetivo garantir a homeostase da glicose frente a circunstâncias adversas, como obesidade e estados de resistência à ação de insulina.^{14,15}

A maioria dos estudos analisando a regeneração de células β foi conduzida em modelos animais. Assim, Bonner-Weir *et al.*,¹⁶ analisando o conteúdo pancreático oito semanas após a exérese de 90% do pâncreas de ratos Sprague-Dawley, demonstraram recuperação espontânea de 27% do peso total do pâncreas e 42% do peso do pâncreas endócrino. Através de métodos quantitativos, estes pesquisadores estimaram em 3% a taxa de renovação diária da massa de células β nesses animais.¹⁷

Em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (substância tóxica ao pâncreas que produz inflamação e destruição do seu parênquima) há muito já se conseguiu demonstrar a capacidade regenerativa das células β . Em 1989,

Rosenberg e colaboradores¹⁷ conseguiram induzir a regeneração de células das ilhotas pancreáticas, incluindo as células β , após o contato do tecido pancreático com placas de celofane. Neste mesmo estudo, as células β regeneradas apresentaram capacidade secretória de insulina *in vitro* frente ao estímulo com glicose em diferentes concentrações.

Alguns casos esporádicos em humanos são impressionantes em relação à regeneração do pâncreas endócrino. Em 2002, Kuroda e colaboradores¹⁸ realizaram biópsia do pâncreas nativo de um paciente diabético tipo 1, diagnosticado há 19 anos, que havia sido submetido ao transplante simultâneo pâncreas-rim dois anos antes. Em uso de esquema imunossupressor, sem evidências de rejeição ao enxerto e com bom controle glicêmico sem insulino terapia, o pâncreas nativo do paciente apresentava quatro vezes mais células β em comparação com indivíduos diabéticos tipo 1 de longa duração tratados convencionalmente com insulina. Com isso, após o bloqueio da autoimunidade, uma proliferação expressiva da massa de células β pôde ser detectada no paciente em questão.

À luz das recentes descobertas sobre o potencial regenerativo do pâncreas, quais células seriam os prováveis precursores de células β adultas?

Prováveis precursores das células β adultas

O conhecimento do papel das células-tronco na regeneração das células β pancreáticas é um passo importante, tanto para o entendimento dos processos fisiológicos envolvidos neste fenômeno, como também no desenvolvimento de novas técnicas para tratamento do *diabetes mellitus*.

Inúmeros estudos avaliaram a contribuição de diferentes linhagens de células-tronco no fenômeno de regeneração de células β . As células candidatas foram avaliadas quanto ao seu potencial de diferenciação ou expressão de marcadores genéticos específicos de células β ou perfil de secreção de insulina *in vivo* ou *in vitro* frente a diversos estímulos. Apesar de não haver consenso na literatura, destacaremos a seguir os principais estudos relacionados à proliferação de células β .

Células-tronco localizadas no próprio pâncreas

A própria célula β madura vem sendo estudada como tendo um importante papel na sua autoproliferação. Sabidamente, a ciclina D2 é uma proteína envolvida no processo de replicação de células β maduras no período pós-natal.¹⁹ Para testar o papel desta proteína, Georgia e colaboradores²⁰ criaram um modelo experimental de ratos que não expressavam o gene da ciclina D2. O que se pôde observar foi que ratos que não expressavam esse gene apresentaram uma taxa de replicação de células β quatro vezes inferior aos ratos controle e todos se tornaram intolerantes à glicose. Além disso, outros

estudos utilizando modelos animais com células β marcadas apontam para o fato de ser a própria célula β , e não células-tronco, as responsáveis pela expansão da massa de células β na vida pós-natal.^{21,22}

Por outro lado, outros estudos sugerem que a proliferação de células β seja resultado da diferenciação de precursores multipotentes localizados no parênquima pancreático. Em 2004, Seaberg e colaboradores²³ isolaram precursores pancreáticos multipotentes (PPM) em tecido de ilhotas e ductos pancreáticos. Estas células promoveram, *in vitro*, a proliferação clonal não só de células β , mas também de células α , δ e células do pâncreas exócrino. As células β geradas apresentaram capacidade secretora de insulina *in vitro* frente a diferentes concentrações de glicose do meio. Neste mesmo estudo, os PPM não apresentaram marcadores de células-tronco embrionárias, mesodérmicas ou de crista neural, podendo reforçar a existência de um precursor pancreático intrínseco defendido por outros autores.²⁴

Poucos estudos foram conduzidos em humanos. Em 2000, Bonner-Weir e colaboradores²⁵ avaliaram a capacidade das células ductais humanas em se diferenciarem em ilhotas pancreáticas. Utilizando restos pancreáticos humanos de doadores de pâncreas para transplante, células ductais foram separadas do restante do parênquima e cultivadas em Matrigel (um gel formado por proteínas de matriz extracelular). Dias após foram visualizados agrupamentos celulares semelhantes a ilhotas e, 10 a 15 dias após, a secreção de insulina *in vitro* aumentou cerca de sete vezes frente ao estímulo com glicose. As células das ilhotas neoformadas também apresentavam reatividade para citoqueratina-19, comprovando a origem ductal dessas células.

Células-tronco de medula óssea

Apesar de a existência de células-tronco nos diversos órgãos, como o pâncreas, ser um evento reconhecido e geralmente aceito por muitos autores, muito se interroga sobre como as células-tronco chegam até esses órgãos. A primeira hipótese (revisada no item anterior) é de que essas células progenitoras, desde o processo de organogênese, fazem parte do desenvolvimento de cada órgão, promovendo o estado de proliferação celular, inclusive no período pós-natal.

A segunda hipótese é a de que outras fontes, por exemplo, a medula óssea adulta, destacariam células-tronco continuamente durante a vida adulta promovendo a proliferação e reparo celular do órgão em questão. Possivelmente, essas células-tronco migrariam via circulação periférica até os órgãos-alvo (fenômeno denominado *homing*).²⁶

Ianus e colaboradores²⁷ analisaram a contribuição da medula óssea na regeneração de células β . Neste estudo, os pesquisadores marcaram com verde fluorescente as células mononucleares da medula óssea que tinham capacidade de transcrever o gene da insulina (em ratos machos). Em seguida, essas células foram infundidas em fêmeas que sofreram

mieloablação por irradiação prévia. O que se observou foi a presença de células contendo cromossomo Y emitindo luz verde fluorescente nas ilhotas das fêmeas. A análise das células marcadas encontradas nas ilhotas das fêmeas demonstrou que elas expressavam o gene da insulina, do transportador 2 de glicose (GLUT 2) e outros fatores de transcrição encontrados em células β maduras. Além disso, um estudo *in vitro* evidenciou marcada secreção de insulina frente a estímulo com glicose e GLP-1 (incretina estimuladora da secreção de insulina).

No estudo de Ianus, entretanto, não foi identificado qual era exatamente a origem das células-tronco marcadas. Outros trabalhos tentaram avaliar qual ou quais seriam as células da medula óssea capazes de se diferenciarem em células β . Um dos candidatos seria a célula-tronco hematopoética, que apresenta marcada diferenciação em hepatócitos em experimentos de regeneração hepática^{28,29} e apresenta íntima relação anatômica e embriológica com o pâncreas. Entretanto, em estudo de Kang e colaboradores,³⁰ evidenciou-se que, apesar de o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas (CTH) prevenir diabetes em modelos experimentais de ratos geneticamente diabéticos tipo 1 (ratos NOD - não obesos diabéticos com autoimunidade genética contra células β), essas células-tronco não contribuíam para regeneração pancreática, uma vez que o processo de insulite (inflamação das ilhotas) já se encontrava estabelecido. O mecanismo de ação das células-tronco hematopoéticas proposto neste estudo seria o controle da autoimunidade contra as células β dos ratos receptores.

Outra célula da medula óssea candidata a ser precursora de células β é a célula-tronco mesenquimal ou célula progenitora adulta multipotencial (MAPC). MAPCs apresentam marcada plasticidade com capacidade de se diferenciarem em células medodérmicas, neuroectodérmicas e endodérmicas *in vitro*.³¹ Em 2004, após isolar MAPCs da medula óssea de ratos Wistar (modelo de DM1), Chen e colaboradores³² conseguiram induzir, *in vitro*, a sua diferenciação em células β . Essas células diferenciadas apresentavam capacidade secretora de insulina *in vitro* e, quando infundidas em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, controlaram os níveis glicêmicos destes animais.

O papel do transplante autólogo de células-tronco não selecionadas da medula óssea vem sendo avaliado em ensaios clínicos em humanos. Um estudo conduzido por centros na Argentina, Peru e China vem sendo conduzido para avaliar o efeito destas células após implante direto no pâncreas de indivíduos diabéticos tipo 1 e tipo 2 por cateterismo arterial. Os resultados ainda não foram publicados na íntegra, mas se observou redução dos níveis glicêmicos, aumento da secreção endógena de insulina e redução das doses de medicações antidiabéticas, mais pronunciadamente em pacientes com DM2. Os mecanismos propostos pelos pesquisadores seriam a estimulação da angiogênese e/ou regeneração de células β .³³

Células-tronco de cordão umbilical

O cordão umbilical é uma importante fonte de células-tronco com potencial de promover diferenciação de células β *in vivo*. De fato, em estudos de transplante xenogênico de células-tronco de cordão umbilical, células mononucleares humanas de cordão se mostraram capazes de reduzir a glicemia e a inflamação pancreática e aumentar a sobrevida de modelos animais de diabetes tipo 1 (NOD).³⁴ Estudo semelhante conduzido em modelos animais de DM2 também demonstrou marcada melhora no controle metabólico e na sobrevida dos animais.³⁵ Entretanto, até o momento, não há indicação de qual o mecanismo de ação e quais células-tronco especificamente seriam responsáveis por este fenômeno.

Atualmente, na Universidade da Flórida, vem sendo desenvolvido um protocolo de transplante autólogo de células-tronco de cordão umbilical criopreservadas ao nascimento, em pacientes com DM1. Neste protocolo, estas células são infundidas por veia periférica sem imunossupressão prévia. Vinte pacientes já foram submetidos a este tratamento e aparentemente os resultados são animadores. A principal expectativa é a de que as células infundidas promovam uma modulação da autoimunidade através de células T reguladoras, favorecendo a preservação da massa residual de células β e os mecanismos endógenos de regeneração.³⁶ De dez pacientes que completaram pelo menos um ano de seguimento, houve uma estabilização na secreção endógena de insulina e redução das doses diárias de insulina, porém nenhum paciente permaneceu livre da insulino terapia (Haller M, comunicação pessoal).

Células hepáticas ovas

Fígado e pâncreas sabidamente dispõem de estreita relação anatômica e embriológica. Desta forma, tentativas de se utilizarem células-tronco hepáticas foram realizadas com intuito de regeneração de células β pancreáticas. As células hepáticas ovas são consideradas células-tronco hepáticas por se diferenciarem em hepatócitos e células de ductos biliares.³⁶

Yang e colaboradores,³⁷ utilizando proliferação *in vitro* de células hepáticas ovas, obtiveram agrupamento de células semelhantes às ilhotas pancreáticas que expressavam vários hormônios do pâncreas endócrino, como glucagon, polipeptídeo pancreático e insulina. Além disso, as células diferenciadas apresentavam transcrição de genes inerentes à célula β adulta, como o PDX-1, PAX-4, PAX-6, Nkx2.2, Nkx 6.2 e GLUT 2. No mesmo estudo, resultados preliminares *in vivo* evidenciaram reversão completa da hiperglicemia em camundongos NOD-scid tratados com estreptozotocina.

Esplenócitos como fonte de células β maduras

Vários estudos foram realizados visando impedir a progressão do diabetes em camundongos NOD utilizando terapia celular. Entretanto, uma vez já estabelecida a hiperglicemia, dificilmente se restabelece o estado de normoglicemia nestes animais.

Em 2003, Kodama e colaboradores,³⁸ utilizando camundongos NOD com diabetes já estabelecido, realizaram um tratamento que consistia de aplicação de adjuvante completo de Freund (óleo mineral contendo bactérias inativadas, como *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium butyricum*) com o intuito de promover uma imunomodulação nestes animais, associada a transplante temporário de ilhotas seguido de transplante de esplenócitos marcados em topografia de cápsula renal. O intuito do transplante de ilhotas foi manter o estado de normoglicemia até a diferenciação de esplenócitos em células β maduras. Segundo Kodama, os esplenócitos marcados realizaram o *homing* até o pâncreas, promovendo a regeneração das células β e perpetuação do estado de normoglicemia.

O impacto deste estudo foi relevante devido ao fato de utilizar células maduras como progenitoras de células β (evitando problemas éticos com uso de células embrionárias) e pelo fato de promover reversão de diabetes já estabelecido em camundongos NOD.

Com isso, em 2006, outros estudos foram realizados por centros distintos utilizando a mesma metodologia empregada por Kodama.³⁹⁻⁴¹ Em todos eles foi demonstrado que o tratamento foi eficaz em promover a reversão do diabetes em camundongos NOD. Entretanto, em nenhum deles se conseguiu confirmar a capacidade regenerativa dos esplenócitos. A hipótese proposta por estes autores é a de que, uma vez que a autoimunidade havia sido bloqueada pelo adjuvante completo de Freund, as próprias células β remanescentes dos animais receptores seriam as responsáveis pela sua autorreplicação e manutenção do estado de normoglicemia permanente desses animais. Desta forma, novos estudos serão necessários para analisar o papel dos esplenócitos na regeneração da massa de células β .

Células-tronco embrionárias

Atualmente, o transplante de pâncreas e o transplante de ilhotas são consideradas as únicas terapias vigentes em que se recupera a capacidade secretora das células β em pacientes diabéticos tipo 1 em estágios avançados de doença. Entretanto, o baixo número de doadores torna-se um importante obstáculo para a realização destes procedimentos. Apesar da discussão ética envolvida neste processo, é neste contexto que se insere a terapia com células-tronco embrionárias (CTE) que, pelo reconhecido potencial de diferenciação, podem ser uma fonte alternativa para substituição da massa de células β em países em que seu uso é permitido.

Em 2001, Assady e colaboradores⁴² demonstraram a diferenciação espontânea de culturas de CTE em células β maduras. Neste estudo, após a formação espontânea de corpos embrionários, 3% das CTE coraram-se fortemente para insulina e ainda foram capazes de transcrever genes como GLUT 2, glucoquinase, PDX-1/IPF-1 (inerentes à célula β madura). Neste mesmo estudo, observou-se que, quanto mais

avançado o estado de maturação das CTE, maior a capacidade de secreção de insulina *in vitro*.

Em 2003, outros cinco experimentos demonstraram a diferenciação em células secretoras de insulina *in vitro* a partir da seleção de CTE que se marcavam especificamente para nestina (proteína filamentosa expressa por células-tronco de origem neuroepitelial).⁴³⁻⁴⁷

Outros estudos avaliaram o papel das CTE *in vivo*. Em 2000, Soria e colaboradores,⁴⁸ promoveram a diferenciação de CTE em células produtoras de insulina *in vitro* e, em seguida, estas células foram implantadas no baço de camundongos com diabetes induzida por estreptozotocina. Os animais transplantados apresentaram correção da hiperglicemia uma semana após o transplante e recuperaram o peso após quatro semanas. Além disso, apresentaram resposta glicêmica semelhante aos camundongos não-diabéticos frente ao estímulo alimentar padrão.

Apesar dos resultados animadores acima citados, em 2004, um grupo de pesquisadores de diferentes universidades norte-americanas e européias questionaram alguns pontos dessas pesquisas.⁴⁹ A primeira questão é a de que as células resultantes da diferenciação das CTE marcavam-se positivamente para insulina, mas não tinham a capacidade de sintetizá-la ativamente. Para eles, nenhum estudo demonstrou a concomitante secreção de peptídeo-C pelas células diferenciadas (o peptídeo-C é um produto da clivagem da pró-insulina liberado na circulação em concentrações equimolares às da insulina, sendo um marcador específico da síntese de insulina pelas células β). A segunda questão é a de que o aumento da secreção de insulina frente a crescentes concentrações de glicose do meio não é uma característica isolada da célula β madura. A terceira questão é a de que a expressão de genes como PDX-1, Nkx6.1, GLUT2 e polipeptídeo pancreático não é específica de células β , sendo também encontrados em células do sistema nervoso central.

Desta forma, a real contribuição das CTE na diferenciação e regeneração da massa de células β ainda está por ser estabelecida.

Bloqueio da autoimunidade: o caminho para a preservação da massa de células ?

O tratamento clássico do DM1 consiste de aplicações diárias de insulina para o adequado controle das glicemias. O tratamento intensivo com insulina é responsável por reduções de 35% a 90% nas complicações microvasculares relacionadas ao DM1.¹

Em 1998, o estudo DCCT (*Diabetes Control and Complication Trial*) demonstrou outro importante aspecto relacionado ao tratamento do diabetes tipo 1: além do controle glicêmico, quanto maior a preservação da massa de células β menor a incidência de complicações crônicas.⁵⁰

Apesar deste achado ter sido revolucionário, estudos de preservação de células β vêm sendo desenvolvidos

desde 1981, quando Eliot e colaboradores utilizaram prednisona via oral na tentativa de promover bloqueio da autoimunidade em crianças diabéticas tipo 1 recém-diagnosticadas.⁵¹ O racional do uso de terapias imunomoduladoras, preferencialmente em pacientes recém-diagnosticados, reside no fato de que quanto mais rápido ele for instituído maior massa de células β a ser preservada.

Em seguida, foram realizados estudos utilizando azatioprina,^{52,53} azatioprina + prednisona⁵⁴ e ciclosporina⁵⁵ em pacientes recém-diagnosticados. Em todos esses estudos, demonstrou-se uma menor velocidade de redução ou mesmo algum incremento nos níveis de peptídeo-C circulantes (diretamente relacionado à massa de células β). Além disso, com a preservação da massa de células β , as necessidades de insulina reduziram-se substancialmente no grupo de pacientes tratados em comparação com os pacientes-controle. Entretanto, poucos indivíduos conseguiram permanecer livres da insulino-terapia nestes tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito de diferentes terapias imunomoduladoras no tempo livre de insulina em pacientes com diabetes tipo 1 recém-diagnosticados

Terapia imunomoduladora	Duração do tratamento	Número de pacientes livres de insulina*	Período livre de insulina (média)
Prednisona ⁵¹	12 meses	4/17	3 meses
Prednisona + Azatioprina ⁵⁴	+ 12 meses	10/20	1 semana
Azatioprina ⁵²	12 meses	7/13	12 meses §
Azatioprina ⁵³	12 meses	0/24	0
Ciclosporina ⁵⁵	6-24 meses	53/122	10 meses

* Número de pacientes livres de insulina/número de pacientes tratados

§1 paciente permaneceu livre de insulina por mais de 35 meses

O uso crônico de medicamentos imunossupressores, seus riscos e a piora do controle metabólico após o término das terapias limitaram o uso rotineiro dessas abordagens.

Recentemente, dois estudos foram conduzidos utilizando terapia imunomoduladora aguda com anticorpos monoclonais anti-CD3 administrados via endovenosa em várias doses em intervalos de tempo variados. No primeiro estudo,⁵⁶ os 12 pacientes tratados com o anticorpo apresentaram maiores níveis de peptídeo-C circulantes e necessitaram de menores doses de insulina em comparação com os 12 pacientes do grupo placebo. Este efeito foi observado durante todo o período de observação, que foi de 12 meses. No segundo estudo,⁵⁷ avaliando um grupo maior de pacientes (quarenta em cada grupo) com tempo de seguimento de 18 meses, foi possível demonstrar resultados semelhantes. Entretanto, em nenhum destes trabalhos conseguiu-se a suspensão da insulino-terapia.

Em 2003, iniciou-se na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, um estudo inédito mundialmente utilizando imunossupressão severa seguida por transplante autólogo

de células-tronco hematopoéticas em pacientes com DM1 recém-diagnosticados. O esquema imunossupressor consiste de ciclofosfamida e globulina antitímocitária endovenosa por cinco dias. Os resultados parciais superaram largamente as expectativas.^{58,59,60} Em contraste com outros estudos de preservação da massa de células β , houve um marcado incremento na secreção de peptídeo-C durante o seguimento médio de 29,9 meses e não apenas uma redução na velocidade de queda dos seus níveis. Além disso, este estudo foi o que obteve melhor resultado em termos de número de indivíduos que conseguiram ter a insulino-terapia suspensa.

Até dezembro de 2008, 23 indivíduos com idade entre 12 e 35 anos haviam realizado o tratamento. Desses, vinte pacientes sem cetoacidose prévia e sem uso de corticoesteróides durante o transplante permaneceram livres de insulina exógena em algum período. Dos vinte pacientes livres de insulina algum momento, oito permaneceram transitóriamente sem insulina por período que variou de 6 a 47 meses. Desses oito pacientes, ineditamente dois se tornaram insulino-independentes novamente, com o uso contínuo da sitagliptina, um inibidor da enzima que degrada o GLP-1. Em dezembro de 2008, 12 pacientes estavam continuamente sem necessidade de insulino-terapia, sendo um paciente há mais de quatro anos, quatro pacientes há mais de três anos, três há mais de dois anos e quatro há mais de um ano sem necessidade de insulina.

Com base no fato de a massa de células β ser comprovadamente regenerável em condições fisiológicas, argumenta-se ainda que com as terapias imunomoduladoras seja possível se favorecer os fenômenos naturais endógenos de regeneração de células β .⁶¹ Assim, a imunomodulação poderia prevenir futuros ataques autoimunes contra as células β recém-regeneradas.

Atualmente, nosso grupo também está testando a potencialidade de células-tronco mesenquimais (CTM) cultivadas da medula óssea de reverter o diabetes melito do tipo 1 recém-diagnosticado em seres humanos. Este protocolo integra um esforço internacional de usar CTM no tratamento de doenças autoimunes, incluindo o DM-1, e se baseia em estudos experimentais com resultados favoráveis.⁶² Planejamos também testar o efeito de CTM em modelos animais de DM-2.

Conclusões

Muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito não só de entender o processo fisiológico de regeneração de células β , mas também de testar seus possíveis usos terapêuticos.

Várias células progenitoras apresentaram potencial

papel no processo de regeneração da massa de células β , incluindo a própria célula β , o precursor pancreático multipotente, células-tronco hematopoéticas, células-tronco mesenquimais, células de cordão umbilical, células hepáticas ovais e esplenócitos. De qualquer forma, independentemente da célula progenitora envolvida no processo de regeneração de células β , acredita-se que o simples transplante desta célula não seja capaz de reverter o quadro de hiperglicemia em pacientes diabéticos tipo 1. Uma vez que se trata de uma doença autoimune, torna-se necessário também o uso de esquemas imunossupressores com o intuito de prevenir os efeitos da autoagressão também nas células transplantadas. Com relação ao diabetes tipo 2, poucos estudos foram realizados em modelos animais e nenhum realizado em humanos foi objeto de publicação completa.³³ Assim, exato papel das células-tronco no tratamento desta doença ainda está por ser definido.

Abstract

In this review, we discuss several alternatives for the regeneration of the pool of insulin-producing cells by the pancreas using embryonic, cord blood or adult stem cells and the work being carried out by our research group using high dose immunosuppression with autologous hematopoietic stem cells in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009;31(Supl. 1):149-156.

Key words: *Diabetes mellitus; stem cells; embryonic; cord blood; bone marrow; autologous stem cell transplantation.*

Referências Bibliográficas

1. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 1997;20 (7):1183-97.
2. Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. *Diabetes Care.* 1992; 15(11):1509-16.
3. Torquato MT, Montenegro Júnior RM, Viana LA, de Souza RA, Lanna CM, Lucas JC, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. *São Paulo Med J.* 2003; 121(6):224-30.
4. World Health Organization. Report of a WHO consultation on obesity. Preventing and managing the global epidemic. Geneva: WHO; 1997.
5. Redondo MJ, Eisenbarth GS. Genetic control of autoimmunity in Type I diabetes and associated disorders. *Diabetologia.* 2002; 45(5): 605-22.
6. Nahas R, Deghaide NHS, Donadi EA, Foss MC. Frequency of HLA class II DR and DQ in Brazilian patients with type I diabetes. *Medicina, Ribeirão Preto* 2000;33:34-41.
7. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet.* 2001;358(9277):221-9.
8. Zimmet P, Turner R, McCarty D, Rowley M, Mackay I. Crucial points at diagnosis. Type 2 diabetes or slow type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 1999;22 Suppl 2:B59-64.

9. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2005;28 Suppl 1:S37-42.
10. MMatthaei S, Stumvoll M, Kellner M, Häring HU. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocr Rev.* 2000;21(6):585-618.
11. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 2006;116(7):1802-12.
12. Lee VM, Stoffel M. Bone marrow: an extra-pancreatic hideout for the elusive pancreatic stem cell? *J Clin Invest.* 2003;111(6):799-801.
13. Bonner-Weir S, Sharma A. Pancreatic stem cells. *J Pathol.* 2002; 197(4):519-26.
14. Swenne I. Pancreatic beta-cell growth and diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1992;35(3):193-201.
15. Fernandes A, King LC, Guz Y, Stein R, Wright CV, Teitelman G. Differentiation of new insulin-producing cells is induced by injury in adult pancreatic islets. *Endocrinology.* 1997;138 (4):1750-62.
16. Bonner-Weir S, Trent DF, Weir GC. Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release. *J Clin Invest.* 1983;71(6):1544-53.
17. Finegood DT, Scaglia L, Bonner-Weir S. Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes.* 1995;44(3):249-56.
18. Rosenberg L, Duguid WP, Vinik AI. The effect of cellophane wrapping of the pancreas in the Syrian golden hamster: autoradiographic observations. *Pancreas.* 1989;4(1):31-7.
19. Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 1994;14(3):2066-76.
20. Georgia S, Bhushan A. Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass. *J Clin Invest.* 2004; 114 (7):963-8.
21. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature.* 2004;429(6987):41-6.
22. Levine F, Mercola M. No pancreatic endocrine stem cells? *N Engl J Med.* 2004;351(10):1024-6.
23. Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB, et al. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol.* 2004;22(9):1115-24.
24. Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes.* 2004;53(8):2143-52.
25. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatkiewicz K, Song KH, Sharma A, et al. *In vitro* cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(14):7999-8004.
26. Lechner A, Habener JF. Stem/progenitor cells derived from adult tissues: potential for the treatment of diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284(2):E259-66.
27. Ianus 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(6):843-50.
28. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med.* 2000;6(11):1229-34.
29. Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology.* 2000;31(1): 235-40.
30. Kang EM, Zickler PP, Burns S, Langemeijer SM, Brenner S, Phang OA, et al. Hematopoietic stem cell transplantation prevents dia-

- betes in NOD mice but does not contribute to significant islet cell regeneration once disease is established. *Exp Hematol.* 2005;33(6):699-705.
31. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49.
 32. Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol.* 2004;10(20):3016-20.
 33. Chen L, Dong J, Hou W, *et al.* Sustained Effect of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation in Patients with Diabetes: 12 month follow-up. *Diabetes* 2008; 57 (Suppl 1): Abstract # 1962P
 34. Ende N, Chen R, Reddi AS. Effect of human umbilical cord blood cells on glycemia and insulinitis in type 1 diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325(3):665-9.
 35. Ende N, Chen R, Reddi AS. Transplantation of human umbilical cord blood cells improves glycemia and glomerular hypertrophy in type 2 diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 321(1):168-71.
 36. Haller MJ, Viener HL, Wasserfall C, Brusko T, Atkinson MA, Schatz DA. Autologous umbilical cord blood infusion for type 1 diabetes. *Exp Hematol.* 2008;36(6):710-5.
 37. Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, *et al.* *In vitro* trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(12):8078-83.
 38. Kodama S, Kühtreiber W, Fujimura S, Dale EA, Faustman DL. Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. *Science.* 2003;302(5648):1223-7.
 39. Suri A, Calderon B, Esparza TJ, Frederick K, Bittner P, Unanue ER. Immunological reversal of autoimmune diabetes without hematopoietic replacement of beta cells. *Science.* 2006;311(5768):1778-80.
 40. Nishio J, Gaglia JL, Turvey SE, Campbell C, Benoist C, Mathis D. Islet recovery and reversal of murine type 1 diabetes in the absence of any infused spleen cell contribution. *Science.* 2006; 311(5768): 1775-8.
 41. Chong AS, Shen J, Tao J, Yin D, Kuznetsov A, Hara M, *et al.* Reversal of diabetes in non-obese diabetic mice without spleen cell-derived beta cell regeneration. *Science.* 2006;311(5768):1774-5.
 42. Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes.* 2001;50(8):1691-7.
 43. Blyszczuk P, Czyn J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, *et al.* Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(3):998-1003.
 44. Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy JD, Kim SK. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(25): 16105-10.
 45. Kim D, Gu Y, Ishii M, Fujimiya M, Qi M, Nakamura N, *et al.* *In vivo* functioning and transplantable mature pancreatic islet-like cell clusters differentiated from embryonic stem cell. *Pancreas.* 2003;27(2):e34-41.
 46. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science.* 2001;292(5520):1389-94.
 47. Moritoh Y, Yamato E, Yasui Y, Miyazaki S, Miyazaki J. Analysis of insulin-producing cells during *in vitro* differentiation from feeder-free embryonic stem cells. *Diabetes.* 2003;52(5):1163-8.
 48. Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes.* 2000;49(2):157-62.
 49. Hansson M, Tonning A, Frandsen U, Petri A, Rajagopal J, Englund MC, *et al.* Artifactual insulin release from differentiated embryonic stem cells. *Diabetes.* 2004;53(10):2603-9.
 50. Effect of intensive therapy on residual beta-cell function in patients with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial. A randomized, controlled trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Ann Intern Med.* 1998;128(7):517-23.
 51. Elliott RB, Crossley JR, Berryman CC, James AG. Partial preservation of pancreatic beta-cell function in children with diabetes. *Lancet.* 1981;2(8247):631-2.
 52. Harrison LC, Colman PG, Dean B, Baxter R, Martin FI. Increase in remission rate in newly diagnosed type I diabetic subjects treated with azathioprine. *Diabetes.* 1985;34(12):1306-8.
 53. Cook JJ, Hudson I, Harrison LC, Dean B, Colman PG, Werther GA, *et al.* Double-blind controlled trial of azathioprine in children with newly diagnosed type I diabetes. *Diabetes.* 1989;38(6):779-83.
 54. Silverstein J, Maclaren N, Riley W, Spillar R, Radjenovic D, Johnson S. Immunosuppression with azathioprine and prednisone in recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1988; 319(10):599-604.
 55. Assan R, Feutren G, Sirmaj J, Laborie C, Boitard C, Vexiau P, *et al.* Plasma C-peptide levels and clinical remissions in recent-onset type I diabetic patients treated with cyclosporin A and insulin. *Diabetes.* 1990;39(7):768-74.
 56. Herold KC, Hagopian W, Auger JA, Poumian-Ruiz E, Taylor L, Donaldson D, *et al.* Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2002;346(22):1692-8.
 57. Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, Mathieu C, Kaufman L, *et al.* Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2005;352(25):2598-608.
 58. Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F, *et al.* Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA.* 2007;297(14):1568-76.
 59. Couri CE, Voltarelli JC. Potential role of stem cell therapy in type 1 diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(2):407-15.
 60. Couri CE, Oliveira MC, Stracieri AB, Moraes DA, Pieroni F, Barros GM, *et al.* C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA.* 2009;301(15):1573-9.
 61. Couri CE, Foss MC, Voltarelli JC. Secondary prevention of type 1 diabetes mellitus: stopping immune destruction and promoting beta-cell regeneration. *Braz J Med Biol Res.* 2006; 39(10):1271-80.
 62. Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes.* 2008;57(7):1759-67.
- Avaliação: O tema apresentado consta da pauta elaborada pelo editor, Professor Milton Artur Ruiz, e coeditores deste suplemento, Professores Sergio Paulo Bydlowski e Adriana Seber.
- Conflito de interesse: não declarado
- Recebido: 24/10/2008
Aceito: 04/11/2008