

# Transplante de células dos ilhéus pancreáticos – O estado da arte

Selma B. Souto<sup>1</sup>, Daniel Carvalho Braga<sup>2</sup>, José Luís Medina<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Internista Complementar de Endocrinologia. Hospital de S. João; <sup>2</sup> Assistente Graduado de Endocrinologia. Hospital de S. João; <sup>3</sup> Director do serviço de Endocrinologia. Hospital de S. João. Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Faculdade do Porto

## Correspondência:

Dra. Selma Souto › Serviço de Endocrinologia. Hospital de S. João › Alameda Prof. Hernâni Monteiro › 4200-319 Porto  
E-mail: selmasouto@yahoo.com

## RESUMO

A Diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico que afecta mais de 200 milhões de pessoas. A terapêutica de sobrevivência para a DM tipo 1 consiste na injeção diária de insulina subcutânea. Uma alternativa a esta terapêutica é o transplante de ilhéus pancreáticos, com melhoria da qualidade de vida dos doentes. Estudos recentes revelaram que 7 doentes com DM 1 com história de hipoglicemia severa e instabilidade metabólica, submetidos a transplante de ilhéus mantiveram-se insulino-independentes durante 1 ano após a transplantação. Desde a divulgação destes estudos, o transplante de ilhéus avançou consideravelmente, tendo sido já realizados transplantes de ilhéus após transplante de rim, transplante usando ilhéus de dadores cadavéricos, de dador único e de dador vivo. Não obstante, na sequência dos resultados altamente promissores obtidos em estudos posteriores, parece ser necessário aperfeiçoar as técnicas de isolamento de células insulares e desenvolver drogas imunossupressoras mais seguras para otimizar os resultados da transplantação.

## PALAVRAS-CHAVE

Isolamento de ilhéus; Transplante de ilhéus; Protocolo de Edmonton.

## SUMMARY

*Diabetes mellitus (DM) is a disturbance affecting more than 200 millions of people worldwide. The surveillance for DM type 1 consists of daily insulin subcutaneous administration. A suitable alternative would be the pancreatic islets transplantation, with enhanced life quality of patients. Recent studies revealed that 7 patients with DM type 1 with severe hypoglycaemic history and metabolic unbalance, submitted to islets transplantation remained insulin-independent over 1 year after transplantation. Since publication of such studies, islet transplantation methodology has developed considerably, having already been performed islet transplantation after kidney transplantation, transplants using islet from cadaver donors, from single donor and from alive donor. Nonetheless, according to promising results obtained, it seems necessary to improve islet cells isolation techniques and to develop safer immunosuppressive drugs in order to optimize the results of transplantation.*

## KEY-WORDS

*Islet isolation; Islet Transplantation; Edmonton protocol.*

## INTRODUÇÃO

A Diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico que afecta mais de 200 milhões de pessoas em todo o Mundo<sup>1</sup>, estimando-se cerca

de 366 milhões de diabéticos em 2030<sup>2</sup>. Historicamente, a DM era considerada uma doença aguda fatal, que culminava no coma hiperglicémico. No entanto, com a descoberta da insulina e a sua utilização terapêutica há cerca

de 80 anos, tornou-se numa doença crónica, na qual os doentes podem esperar uma vida longa, enfrentando não obstante as complicações a longo prazo<sup>3</sup>.

A DM tipo 1 representa um desafio terapêutico e permanece uma grande responsabilidade para o doente e para a família. Actualmente, a terapêutica de sobrevivência para estes doentes consiste na injeção diária de insulina subcutânea (s.c.). O DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*) refere que a terapia intensiva com insulina melhora a hemoglobina glicosilada (HbA1c) e protege das complicações<sup>4</sup>, mas verifica-se que este controlo glicémico apertado aumenta o risco de eventos hipoglicémicos sérios, incluindo convulsões e coma. Cerca de 10% dos doentes são extremamente sensíveis à insulina, tendo elevado risco de neuroglicopenia e, à medida que perdem a capacidade de reconhecer a hipoglicemia, os episódios podem ser difíceis de controlar<sup>3</sup>.

As estratégias alternativas à insulino-terapia s.c. incluem a insulina inalada, as bombas infusoras, o transplante total ou segmentar de pâncreas e, mais recentemente, a transplantação de ilhéus pancreáticos<sup>3</sup>. O transplante de pâncreas pode curar a DM tipo 1. No entanto, devido às co-morbilidades, este não pode ser aplicado a todos os doentes. O transplante de ilhéus pancreáticos pode, por isso, ser considerado uma alternativa promissora, uma vez que evita a cirurgia, a anestesia geral e as complicações relacionadas com a função exócrina<sup>5</sup>.

## HISTÓRIA DO TRANSPLANTE DE ILHÉUS

A primeira referência a transplante de ilhéus pancreáticos reporta a Dezembro de 1893, vinte e oito anos antes da descoberta da insulina. Williams e Harsant, em Bristol, Reino Unido, transplantaram porções de pâncreas de carneiro, por via s.c., num jovem de 15 anos em cetoacidose diabética e, apesar de se ter verificado melhoria no seu controlo glicémico, o jovem que não estava imunossuprimido faleceu três dias após o transplante<sup>3,6</sup>.

A grande evolução na terapêutica da DM 1 foi em 1920, com a descoberta da insulina, por Banting e Best, em Toronto<sup>7,8</sup>. O passo seguinte na terapêutica foi a realização do primeiro

transplante de pâncreas, na Universidade do Minnesota, em 1966, por Kelly e Lillehei<sup>9</sup>. Os resultados foram no entanto catastróficos, tendo-se obtido uma taxa de mortalidade de 60%, com menos de 3% de transplantes funcionais ao fim de 1 ano. A falência do processo de transplante estaria relacionada com altas doses de corticoterapia usadas no regime imunossupressor e com o risco elevado de infecções oportunistas<sup>10,11</sup>. No entanto, os avanços na técnica cirúrgica, na imunossupressão, na profilaxia antiviral e na monitorização pós-transplante, tiveram impacto na redução da morbi-mortalidade associadas ao procedimento<sup>12,13</sup>.

Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente na transplantação apenas da porção endócrina do pâncreas<sup>6</sup>. Em 1967, Lacy e colaboradores deram um grande contributo para o início da transplantação de ilhéus, conseguindo distender o ducto pancreático com uma solução salina, seguido de digestão enzimática do pâncreas com colagenase, descobrindo que os ilhéus poderiam ser separados do tecido acinar digerido com base na sua densidade diferencial<sup>14</sup>. O mesmo grupo fez o primeiro transplante de ilhéus em ratos em 1972<sup>15</sup>. No ano seguinte, Reckard e Barker conseguiram pela primeira vez curar a DM induzida quimicamente em ratos, através da transplantação de um grande número de ilhéus na cavidade peritoneal<sup>16</sup>. Kemp e colaboradores foram os primeiros a desenvolver o local intraportal para implantação dos ilhéus, que actualmente permanece como sendo o mais favorável, e o único com sucesso clínico<sup>17</sup>.

Em 1980, um grupo de investigadores do Minnesota efectuou auto-transplantação de ilhéus em doentes após pancreatectomia por pancreatite crónica, tendo verificado que, ao infundir mais de 300.000 ilhéus, a taxa de insulino-independência em 2 anos era de 70%<sup>18,19</sup>. Dos 267 transplantes efectuados entre 1990 e 2000, apenas em 12,4% dos casos, os doentes ficaram insulino-independentes por períodos superiores a 1 semana e 8,2% superiores a 1 ano<sup>20</sup>.

Os resultados obtidos com transplantes de ilhéus em humanos apresentaram-se desencorajadores até ao ano 2000, altura em que Shapiro e colaboradores publicaram um estudo realizado na Universidade de Alberta, Edmonton, no qual 7 doentes com DM 1 com história de hipoglicemia severa e instabilidade metabólica, foram

submetidos a transplante de ilhéus tendo-se mantido insulino-independentes durante 1 ano após a transplantação<sup>7,20</sup>. A proposta de tratamento resultante deste estudo ficou conhecida como Protocolo de Edmonton<sup>20</sup>.

Após a divulgação deste protocolo, a transplantação de ilhéus avançou consideravelmente, tendo sido já realizados transplantes usando ilhéus de doadores cadavéricos em Kyoto, em 2004, e de dador único e de dador vivo, no Estado do Minnesota e em Kyoto, respectivamente, em 2005<sup>3</sup>.

## PROTOCOLO DE EDMONTON

Os 7 doentes transplantados pelo grupo de Shapiro receberam duas infusões de ilhéus de dois ou mais pâncreas de doadores em morte cerebral<sup>20</sup>. Um dos doentes, o mais obeso, recebeu uma terceira infusão com ilhéus de dois doadores. A segunda infusão foi realizada numa média de 29 dias após a primeira. A média do número total de ilhéus necessária para transplante foi de  $11547 \pm 1604$  IE (equivalentes de ilhéus)/Kg de peso corporal. O volume médio infundido foi de  $3,5 \pm 1,3$  mL, sem alterações significativas na pressão portal. Os doentes foram seguidos por um período médio de 11,9 meses, com um tempo médio de hospitalização de 2,3 dias.

Os resultados obtidos foram encorajadores, com redução das necessidades de insulina em todos os doentes após o primeiro transplante, tendo ficado insulino-independentes quando um número suficiente de ilhéus foi transplantado<sup>20</sup>. Obteve-se ainda normalização da HbA1c e diminuição significativa da amplitude média das excursões glicémicas (MAGE) ( $198 \pm 32$  mg/dL antes da transplantação para  $119 \pm 37$  mg/dL após a primeira infusão e  $51 \pm 30$  mg/dL após atingir a insulino-independência). No entanto, o doente que recebeu menor número de ilhéus necessitou de 4 a 10 Ui de insulina por dia, em quatro ocasiões por motivo de doença, e um outro necessitou por igual motivo um suplemento de 7 Ui de insulina, igualmente por motivo de doença. Nenhum dos doentes manifestou novos episódios de hipoglicemia, apresentando por isso mudanças significativas na sua qualidade de vida. Em todos os doentes a concentração de peptídeo C era indetectável

antes da transplantação, e três a seis meses após o procedimento, todos apresentavam níveis plasmáticos de peptídeo C doseáveis, não tendo sofrido diminuição da sua concentração durante o seguimento. Não houve alterações significativas nos testes de função hepática e não foram constatados casos de trombose portal. Não houve episódios de rejeição celular aguda e nenhum dos doentes faleceu.

Foram ainda analisados os anticorpos (Ac's) anti-insulina, anti-ilhéus 512 e anti-GAD antes e depois do transplante, verificando-se que a concentração média dos Ac's anti-insulina diminuiu (de  $0,26 \pm 0,06$  UI para  $0,07 \pm 0,03$  UI) e que os Ac's anti-GAD foram indetectáveis antes e depois do transplante<sup>20</sup>. Um dos 4 doentes, em que se obteve o resultado dos Ac's anti-ilhéus 512, apresentava positividade antes e depois do transplante. Os testes de tolerância à glicose oral, realizados após a insulino-independência verificaram que em nenhum dos casos havia critérios de DM (segundo a ADA – *American Diabetes Association*) após transplante.

Nos dois primeiros procedimentos realizados, houve hemorragia moderada no local de punção transhepática, com necessidade de suporte transfusional, tendo sido evitada nos seguintes pela redução da dose de heparina intraportal<sup>20</sup>. Todos os doentes tiveram úlceras superficiais da mucosa oral. Não houve casos de citopenia, nem aumentos significativos da concentração lipídica ou da creatinina durante o seguimento. Não obstante, não houve seguimento suficiente para avaliar as complicações secundárias da diabetes.

Com base neste estudo foi criado o Protocolo de Edmonton para a transplantação de ilhéus pancreáticos, o qual apresenta os seguintes elementos-chave:

- I. Selecção de doentes com DM tipo 1 há mais de 5 anos, com níveis de peptídeo C estimulado negativo, que sofram de hipoglicemias severas recorrentes ou DM lábil ou instável<sup>20</sup>;
- II. Dadores de pâncreas em morte cerebral, com preservação do órgão numa solução fria da Universidade de Wisconsin (UW) com mínimo tempo de conservação<sup>21</sup>;
- III. Isolamento de ilhéus pancreáticos:
  - Infusão de colagenase no ducto pancreático principal com método de controlo da pressão<sup>21</sup>;

- Digestão do pâncreas usando o sistema Ricordi<sup>21</sup>;
- Purificação dos ilhéus mediante a técnica de separação sobre Ficoll, num processador de células COBE 2991<sup>20,21</sup>;
- Remoção de xenoproteínas no processo de isolamento, usando albumina humana<sup>3,21</sup>;

IV. Transplantação imediata dos ilhéus isolados por infusão simples por acção da gravidade<sup>21</sup>; com um mínimo de 10000 IE/kg de peso corporal administrado a cada doente, em 2 ou 3 infusões sequenciais<sup>3,20</sup>.

V. Regime imunossupressor livre de corticosteróides consistindo da indução com dacluzimab (anticorpo monoclonal – CD25 mAb) em associação a sirolimus e baixa dose de tacrolimus<sup>3,7,20</sup>.

Cerca de 9 meses após a divulgação do Protocolo de Edmonton, este grupo ampliou a amostra para 12 doentes DM tipo 1, com um seguimento médio de 10 meses<sup>7</sup>. Todos os doentes recuperaram a insulino-secreção e tiveram redução da HbA1c. Dos 12 doentes, 5 apresentaram melhoria da intolerância à glicose e 3 tiveram DM pós transplante, com necessidade de antidiabéticos orais ou uma baixa dose de insulina. Em 11 dos 12 doentes a insulinoindpendência ocorreu após 8000 EI/Kg de peso terem sido transplantados. Nenhum doente morreu e o sucesso na obtenção de glicose em jejum normal foi de 80% 1 ano após a transplantação<sup>7</sup>.

## PROGRESSOS APÓS PROTOCOLO DE EDMONTON

Desde que o Protocolo de Edmonton foi divulgado, a transplantação de ilhéus pancreáticos avançou consideravelmente, com a realização de transplante combinado de ilhéus e de rim, de transplante de ilhéus pancreáticos após transplante renal, e de transplante usando dadores cadavéricos, dadores únicos e dadores vivos.

## TRANSPLANTE DE ILHÉUS APÓS TRANSPLANTE RENAL E TRANSPLANTE COMBINADO DE ILHÉUS E RIM

A DM tipo 1 pode conduzir a insuficiência renal terminal com necessidade de transplante renal, sendo nestes casos de ponderar a realização de transplante combinado de pâncreas e de rim. Quando existe contra-indicação para este transplante, uma alternativa aceitável é o transplante combinado de ilhéus e de rim<sup>22</sup>. Por sua vez, os doentes já submetidos a transplante renal são bons candidatos a transplante de ilhéus, no sentido de obter um melhor controlo glicémico e prolongar a sobrevida do enxerto renal existente.

Bertuzzi e colaboradores transplantaram ilhéus em 15 doentes DM tipo 1 com enxerto renal e sob imunossupressão com corticóides e ciclosporina<sup>23</sup>. Após o transplante, os doentes alteraram o regime imunossupressor para globulina anti-linfocitária, ciclosporina, micofenolato de mofetil e metilprednisolona, tendo verificado aumento do peptídeo C, redução para metade das necessidades de insulina, insulinoindpendência durante 1 ano (em 10 doentes) e HbA1c < 6,2%.

Em 2006 foi publicado um estudo por Toso e colaboradores, o qual avaliou a eficácia e a segurança da utilização do regime imunossupressor do Protocolo de Edmonton em receptores de ilhéus após transplante renal<sup>22</sup>. Foram transplantados 8 doentes diabéticos tipo 1, com peptídeo C negativo e enxerto renal funcionante, todos com complicações da diabetes, dos quais 5 doentes com mau controlo glicémico e hipoglicemias não reconhecidas. As necessidades de insulina antes do transplante eram de 0,52±0,1 U/Kg de peso corporal e a HbA1c 7,7±0,6%. O tempo médio entre o transplante renal e a primeira infusão dos ilhéus foi de 9,8±7,3 anos.

Assim que os doentes eram inscritos na lista de espera para transplante de ilhéus, iniciava-se a redução da corticoterapia e a transplantação só era considerada em doentes a fazer ≤ 5 mg de prednisona<sup>20,22</sup>. Em 2 doentes, iniciou-se a redução da corticoterapia antes do transplante que apenas foi suspensa 3,5 e 4,5 meses após a infusão de ilhéus. Os restantes 9 doentes encontravam-se sem corticoterapia no momento da transplantação. Após o transplante foram submetidos a imunossupressão com sirolimus,

tacrolimus e dacluzimab. Verificou-se insulino-independência em todos os doentes, dos quais 5 se mantiveram insulino-independentes 11 a 34 meses após transplantação, com valores de HbA1c e MAGE normais. Um doente re-iniciou insulino-terapia aos 19,5 meses, embora tenha mantido bom controlo glicémico (HbA1c < 6,5%) e peptídeo C positivo. Dois doentes mantiveram-se insulino-independentes por 3 e 10 meses, e perderam a função dos ilhéus aos 5 e 4 meses após o transplante, demonstrada pela ausência de peptídeo C<sup>22</sup>. Os valores de anticorpos anti-GAD, anti-insulina e anti-ilhéus permaneceram estáveis, quando comparados com os valores pré-transplante, excepto um aumento do anticorpo anti-GAD em 3 doentes, os quais se mantiveram insulino-independentes<sup>22</sup>.

Relativamente à função renal, verificou-se que a *clearance* da creatinina se manteve estável, excepto num doente que já apresentava um valor < 50 mL/min antes do transplante<sup>22</sup>. Um dos doentes manifestou rejeição humoral, tendo de ser tratado com imunoglobulina e.v. em altas doses, com normalização posterior da função renal.

Neste estudo houve vários efeitos secundários severos, nomeadamente hemorragia após acesso portal percutâneo, pneumonia severa atribuída à toxicidade do sirolimus, perda do enxerto renal após descontinuação da imunossupressão, rejeição humoral reversível do rim e febre de origem desconhecida<sup>22</sup>. Houve um caso de rejeição em um doente que tinha efectuado corticoterapia por vários anos antes do transplante de ilhéus, sendo preferível nestes casos, manter uma dose baixa de corticoterapia no tratamento imunossupressor. Outros efeitos secundários foram as complicações infecciosas (e.g. infecções urinárias, respiratórias, micose vaginal e infecção anal por herpes simples), hematológicas (e.g. trombocitopenia, anemia, leucopenia), e outras complicações, como úlceras da mucosa oral, edema periférico, diarreia, rash e poliartrite. Dos 7 doentes medicados com estatinas, 4 manifestaram um aumento do colesterol sérico, com necessidade de intensificação terapêutica, e em 2 doentes houve necessidade de aumentar a dose de anti-hipertensor.

Toso e colaboradores propuseram os seguintes critérios de inclusão para o transplante de ilhéus após transplante de rim<sup>22</sup>:

- I. *clearance* de creatinina >50 mL/min
- II. proteinúria <0,5 g/dia
- III. necessidades de insulina <0,7 U/Kg/dia
- IV. IMC <27 Kg/m<sup>2</sup>
- V. peso <80 Kg e <75 Kg para homens e mulheres, respectivamente.

Neste estudo, 3 doentes não apresentavam estes critérios, 1 tinha *clearance* de creatinina < 50 mL/min, tendo perdido a função do enxerto de ilhéus aos 5 meses, e 2 doentes apresentavam necessidade diária de insulina suplementar, tendo um destes perdido a função do enxerto aos 4 meses<sup>22</sup>. Estes autores concluíram que a imunossupressão usada estava associada a efeitos secundários significativos, e que apenas os doentes com função estável do enxerto renal poderiam ser submetidos a esse tratamento. No entanto, a razão risco/benefício não está ainda estabelecida, sendo necessária a realização de mais estudos, utilizando um número estatisticamente significativo de doentes.

#### TRANSPLANTE DE ILHÉUS PANCREÁTICOS DE DADORES CADAVERÍCOS

Uma das possibilidades para ultrapassar a escassez de pâncreas para isolamento de ilhéus é o recurso ao uso de pâncreas de doadores cadavéricos, e não apenas de doadores em morte cerebral<sup>5,24-26</sup>. Não obstante, encontram-se publicados poucos estudos sobre a utilização de pâncreas de cadáveres.

No Japão, os doadores de pâncreas limitam-se a doadores cadavéricos ou doadores vivos, sendo ilegal o uso de pâncreas de doadores em morte cerebral<sup>24,25,27</sup>. Por este motivo, foram feitas modificações ao método de isolamento de Ricordi, de modo a melhorar o isolamento de ilhéus de doadores cadavéricos, sendo este procedimento actualmente denominado de método de isolamento de ilhéus de Kyoto<sup>25,26</sup>.

No método de isolamento de ilhéus de Kyoto, é efectuada a colheita do pâncreas do cadáver mediante uma técnica de arrefecimento rápido, reduzindo o tempo de isquemia a quente<sup>5,21,24-26</sup>. Imediatamente após a colheita, faz-se a infusão de solução ET-Kyoto no ducto pancreático<sup>5,21,25</sup>. A esta solução é adicionado um inibidor da tripsina, i.e. o ulinastatin<sup>5,21,26</sup>. Em seguida, o pâncreas é colocado numa solução conservante usando o método de dupla



camada modificado (solução ET-Kyoto/PFC oxigenado) para o transporte até ao laboratório de isolamento<sup>5,21,25</sup>. Posteriormente, efectua-se a digestão pancreática com colagenase, contendo inibidor da tripsina num sistema automático de isolamento de ilhéus. Na purificação usa-se o iodixanol em vez de Ficoll, devido ao baixo nível de endotoxina e baixa viscosidade, sendo menos agressivo para os ilhéus<sup>5,21</sup>.

Na Universidade de Alberta, Edmonton, foi demonstrado que o isolamento de ilhéus era superior quando se usava um inibidor da tripsina (ulínastatin), principalmente se o pâncreas fosse preservado por um período longo<sup>5</sup>. No entanto, o ulínastatin não se manifestou eficaz no isolamento de ilhéus de dadores cadavéricos com o método de isolamento de Ricordi.

O primeiro transplante de ilhéus de dadores cadavéricos em humanos no Japão foi realizado em 2004<sup>5</sup>. Nagata e colaboradores isolaram os ilhéus pancreáticos, seguindo-se o transplante em 4 doentes que cumpriam os critérios do Protocolo de Edmonton. Em todos os casos verificou-se a redução das necessidades de insulina ( $0,6 \pm 0,1$  U/Kg para  $0,3 \pm 0,1$  U/Kg) e da HbA1c ( $8,0 \pm 0,4\%$  para  $5,1 \pm 0,2\%$ )<sup>24</sup>.

Estudos que compararam a produção e a viabilidade entre ilhéus de dadores cadavéricos e de dadores em morte cerebral, demonstraram que a quantidade e a qualidade de ilhéus de dadores cadavéricos era aceitável<sup>28</sup>. A produção foi 12,6% superior à de dadores em morte cerebral, com viabilidade comparável.

### TRANSPLANTE DE ILHÉUS PANCREÁTICOS DE DADOR ÚNICO

A insulino-independência pode obter-se realizando-se transplante de ilhéus de dador único cadavérico<sup>27</sup>.

Na Universidade do Minnesota foi demonstrado que se poderiam usar ilhéus de dador único, sendo necessários alguns cuidados, nomeadamente, a exclusão de dadores com idade  $\geq 50$  anos, evitar a utilização de agentes tóxicos para os ilhéus durante o processamento, fazer a cultura dos ilhéus por um período de dois dias, iniciar um tratamento imunossupressor e anti-inflamatório pré-transplante, realizar insulino-terapia agressiva peri-transplante, e minimizar a exposição a inibidores da calcineurina<sup>29</sup>.

Se durante o período de cultura dos ilhéus,

o doente estiver a fazer imunossupressão e anti-inflamatórios minimiza-se o problema da redução da produção dos ilhéus que está habitualmente associado à cultura<sup>30</sup>. A utilização de dador único apresenta ainda a vantagem de aumentar a segurança e reduzir os custos associados ao procedimento.

Relativamente à idade do dador, sabe-se que os ilhéus de dadores mais velhos são menos funcionais; em contrapartida, o isolamento em dadores novos é, no entanto, mais difícil. Porém, se um número suficiente de ilhéus for isolado de dadores mais novos podem obter-se ilhéus de elevada qualidade. Para evitar toxicidade dos ilhéus, utiliza-se iodixanol na purificação, tal como acontece no método de Kyoto.

### TRANSPLANTE DE ILHÉUS PANCREÁTICOS DE DADOR VIVO

A transplantação de ilhéus a partir de um dador vivo apresenta a vantagem do pâncreas não ter ainda sofrido acção de citocinas, o que acontece quando ocorre morte cerebral<sup>5,27</sup>. Por outro lado, pode estimar-se previamente a qualidade dos ilhéus avaliando a capacidade dos mesmos secretarem insulina. Uma outra vantagem reside na possibilidade de se iniciar a imunossupressão antes do transplante.

Para obter o órgão, o dador é submetido a pancreatectomia distal, com posterior isolamento de ilhéus a partir da cauda do pâncreas, e infusão dos mesmos no receptor<sup>5</sup>.

Na Universidade do Minnesota verificaram-se complicações em 3 a 5% dos dadores vivos, designadamente, fístula pancreática, hemorragia e pancreatite<sup>5</sup>. Um outro factor de risco inerente diz respeito ao possível desenvolvimento de DM no dador, o que pode acontecer quando mais de 50% do pâncreas é removido. Este risco pode ser reduzido consideravelmente se o dador não for obeso, se tiver Ac's anti-ilhéus negativos e PTGO normal. No entanto, estas precauções não eliminam por completo este risco.

O primeiro transplante de ilhéus de dador vivo, ocorreu em 2005, em Kyoto, tendo sido realizado num doente com DM instável e com episódios de hipoglicemias severas não reconhecidas, a fazer insulino-terapia intensiva<sup>26,31</sup>. O dador foi a mãe que, previamente ao transplante, apresentava concentrações de glicose e de insulina na PTGO normais, com HbA1c de

5%, sem outros familiares com DM, e uma TAC abdominal que revelou pâncreas com anatomia normal<sup>5,31</sup>. O receptor iniciou sirolimus e tacrolimus uma semana antes do transplante, no sentido de se obterem concentrações sanguíneas adequadas de imunossupressores no momento da infusão. Para colheita do pâncreas, o dador foi submetido a laparotomia com pancreatectomia distal e esplenectomia, e foram isolados mais de 408114 IE, os quais foram transplantados imediatamente. O dador não teve intercorrências no pós-operatório.

O receptor ficou insulino-independente 22 dias após o transplante por um período superior a 3 meses, o peptídeo C foi positivo, não ocorreram mais episódios de hipoglicemia<sup>5,31</sup>, e a HbA1c desceu (9,9% para 6,2%)<sup>5</sup>.

O primeiro transplante de ilhéus de dador vivo revelou informações importantes, em particular, que o pâncreas de um dador vivo fornece ilhéus suficientes para curar a diabetes. No presente caso, cerca de 400000 IE foram transplantados e a produção dos ilhéus foi semelhante à obtida a partir de ilhéus de dadores cadavéricos ou em morte cerebral<sup>5</sup>.

Apesar das vantagens inerentes à utilização de ilhéus de dadores vivos, nas sociedades nas quais a transplantação de órgãos cadavéricos for possível, o uso de dadores vivos é difícil de justificar<sup>27</sup>.

Yamada e colaboradores criaram o índice SUITO (*Secretory Units of Islets Transplant Object*) para estimar o número de ilhéus enxertados<sup>30</sup>. Este parâmetro é calculado pela seguinte fórmula:

$$SUITO\ index = \left[ \frac{\text{peptídeo C jejum [ng/dL]}}{\text{glicose jejum [mg/dL]}} - 63 \right] \times 1500$$

Num indivíduo saudável, o índice de SUITO de 100 reflecte a função das células beta pancreáticas de 100%. Se o peptídeo C for 0,8 ng/mL e a glicose 103 mg/dL, o índice de SUITO é 30, significando que o receptor apresenta 30% de ilhéus funcionais, em comparação com um indivíduo saudável. Para receptores de ilhéus de dador vivo, este parâmetro foi 40 e de dador cadavérico foi 30.

O índice de SUITO apresentou-se significativamente mais baixo em receptores de ilhéus de dadores cadavéricos submetidos a cultura, do que em receptores de ilhéus frescos. Para a

insulino-independência é necessário um valor de índice de SUITO superior a 25<sup>30</sup>.

## INDICAÇÕES ACTUAIS

Actualmente, a transplantação de ilhéus pancreáticos está indicada em doentes com DM tipo 1 instável, e em diabéticos tipo 1 após transplantação renal quando contra-indicado o transplante segmentar ou total de pâncreas. Nesta secção, são apresentadas as indicações e as contra-indicações, retiradas do *Consortium 2006 do Clinical Islet Transplantation (CIT Trial Consortium, NIH 2006)*<sup>32</sup>, para o transplante de ilhéus nas duas situações clínicas acima referidas.

### TRANSPLANTE NA DM TIPO 1 INSTÁVEL OU LÁBIL

#### Indicações:

- Sexo feminino ou masculino, entre 18-65 anos
- DM tipo 1
  - Diagnosticada < 40 anos
  - Insulino-dependência ≥ 5 anos
- Estimulação de peptídeo C negativa (<0,3 ng/ml)
- Tratamento diabético intensivo
  - Avaliação da glicemia capilar ≥ 3 vezes/dia
  - ≥ 3 injeções de insulina/dia ou uso de bomba infusora
  - Seguido por endocrinologista com ≥ 3 avaliações nos últimos 12 meses
- Um ou mais eventos hipoglicémicos severos nos últimos 3 anos, requerendo assistência de terceiros e com glicemia < 54 mg/dl ou necessidade de administração de hidratos de carbono orais, glucagon ou glicose e.v.
- Redução dos sintomas de hipoglicemia
  - Score de Clarke ≥ 4 e score HYPO ≥ percentil 90 (≥ 1047) nos últimos 6 meses (ou)
- Labilidade glicémica marcada
  - Índice de labilidade glicémica (LI) ≥ percentil 90 (≥ 433) nos últimos 6 meses

#### Contra-indicações:

- TFG <70 (mulher) e < 80 (homem) ml/minuto/1,73 m<sup>2</sup>
- Presença ou história de macroalbuminúria (> 300 mg/g)

- Actividade da renina plasmática > 20%
- Mulheres que desejem engravidar, grávidas ou em amamentação
- Homens que desejem procriar
- Infecção activa, incluindo HBV, HCV, HIV, TB
- EBV negativo
- Infecção invasiva por *Aspergillus* no último ano
- Qualquer história de malignidade, excepto carcinoma escamoso ou de células basais da pele completamente excisado
- Alcoolismo ou abuso de drogas

## TRANSPLANTE DE ILHÉUS APÓS TRANSPLANTE RENAL

### Indicações:

- Sexo feminino ou masculino, entre 18 – 65 anos
- ≥ 3 meses e < 27 meses após transplante renal
- DM tipo 1
  - Diagnosticada < 40 anos
  - Insulino-dependência ≥ 5 anos
- Estimulação do peptideo C negativa
- Função renal estável (sem rejeição nos 3 meses antes do transplante de ilhéus)
- Tratamento médico *standard* pelo menos 4 meses sob o cuidado de um endocrinologista
  - Ao final de 4 meses HbA1c ≥ 7,0 ou HbA1c < 7,0 e redução da capacidade de prever hipoglicemia (*score* Clarke ≥ 4) e ter pelo menos 1 episódio de hipoglicemia severa a receber tratamento médico *standard*.

### Contra-indicações:

- Hemoglobina abaixo do valor normal, linfopenia (<1.000/μL), neutropenia (<1.500/μL) ou trombocitopenia (<100.000/μL)
- Coagulopatia
  - Deficiência do factor V de Leiden
  - Necessidade de tratamento anticoagulante
  - INR > 1,5
- Doença cardíaca severa (Enfarte do miocárdio nos últimos 6 meses)
- Testes de função hepática persistentemente elevados (AST, ALT, fosfatase alcalina ou bilirrubinas > 1,5 vezes o normal)

- Coledocolitíase sintomática, Pancreatite, Úlcera péptica
- Distúrbios gastrintestinais interferindo na absorção da medicação oral
- Retinopatia proliferativa não tratada

No “score HYPO” (*composite hypoglycaemic score*), que se baseia nos eventos que o doente é capaz de identificar, a pontuação mais elevada é atribuída com base nos sintomas neuroglicopépicos comparativamente com os sintomas autonómicos<sup>3,4, 31</sup>. A “labilidade glicémica” é uma outra terminologia com definições múltiplas. São encontrados na literatura vários outros sistemas de *score*, incluindo o *M-value*, o MAGE (*mean amplitude of glycaemic excursions*), e o LI (*lability index*). O LI está mais relacionado do que o MAGE com a determinação de labilidade e serve melhor como escala quantitativa para a determinação do controlo glicémico em doentes transplantados de ilhéus.

## SELECÇÃO DE DADORES

Para a selecção de dadores, os pâncreas são seleccionados inicialmente para transplante segmentar ou total, e só posteriormente poderão ser usados para transplante de ilhéus. Este procedimento deve-se ao facto de que, actualmente, o transplante de pâncreas é considerado uma opção terapêutica, enquanto que a transplantação de ilhéus ainda é vista como um procedimento experimental<sup>21</sup>. Os parâmetros relacionados com a qualidade dos pâncreas doados (e.g. IMC, idade) são factores importantes no sucesso do isolamento de ilhéus.

Os pâncreas de dadores obesos fornecem uma maior produção de ilhéus do que os de dadores magros. Estudos desenvolvidos no Estado do Minnesota e publicados em 2004, demonstraram que a produção de ilhéus de dadores com IMC >30 foi de 319129 EI, enquanto que os dadores com IMC <30 foi de 215753 EI. O primeiro apresentou, por isso, um maior sucesso no isolamento de ilhéus, definido como uma produção de ilhéus > 300.000 EI por pâncreas, e uma pureza > 50%<sup>21</sup>.

A idade do dador parece influenciar igualmente a produção e a função dos ilhéus transplantados<sup>21,33</sup>. Foram efectuados estudos comparando dois grupos, um de idade ≤ 40



anos e outro > 40 anos. No primeiro grupo, a produção de ilhéus foi superior tanto após a digestão como após purificação (embora após purificação a diferença não tenha sido estatisticamente significativa). No entanto, usando o método de conservação com solução UW a percentagem de ilhéus aprisionados no tecido acinar apresentou-se superior no grupo mais novo, verificando-se que os ilhéus dos mais jovens são mais difíceis de separar do tecido acinar<sup>21,33</sup>. Verificou-se ainda que a estimulação da secreção de insulina com glicose era significativamente maior no grupo mais novo. Estas descobertas sugerem que o uso de dadores jovens pode melhorar o transplante de dador único e, no caso de dadores mais velhos é necessária uma massa maior de ilhéus para estabelecer a insulino-independência<sup>33</sup>.

Modificações no método de purificação dos ilhéus de dadores mais novos parecem poder recuperar os ilhéus aprisionados<sup>21</sup>. Para esse efeito, será necessário individualizar a densidade da solução de purificação de alta densidade para cada preparação de ilhéus. Se for possível conseguir recuperar os ilhéus do tecido acinar, a preparação de ilhéus de dadores jovens pode ser de elevada qualidade, tanto sob o ponto de vista funcional como em número de ilhéus<sup>21</sup>.

No que se refere à utilização de dadores cadavéricos, existem alguns critérios de exclusão, designadamente, a hipotensão prolongada com anormalidades bioquímicas, como a elevação da creatinina sérica superior a 50% do valor inicial, ou a elevação das transaminases em níveis duas vezes superior ao normal, e a necessidade de recorrer a vasopressores.

Quanto ao uso de pâncreas com pancreatite crónica, verifica-se resistência à acção da colagenase, com tempo de digestão prolongado, e grande quantidade de tecido não digerido, conduzindo a um isolamento pobre de ilhéus<sup>21</sup>.

## ISOLAMENTO DOS ILHÉUS

Tradicionalmente, o pâncreas era preservado na solução UW. No entanto, parece que o melhor método para a sua conservação é o método de dupla camada, que consiste na adição de perfluorocarbono (PFC) oxigenado à solução UW<sup>21,34,35</sup>. Como o PCF é lipofílico e de alta densidade, as duas soluções ficam

claramente separadas<sup>35</sup>. Com este método, o enxerto é directamente oxigenado, produzindo continuamente ATP, permitindo desta forma manter a integridade celular<sup>21,34,35</sup>. Consequentemente, a lesão de isquemia a quente e a frio é reduzida<sup>34</sup>. Quando o pâncreas é preservado apenas com PFC a produção de ilhéus é maior quando comparada com o uso da solução UW<sup>8</sup>. Estudos experimentais de Brandhorst e colaboradores demonstraram que o PFC isoladamente pode ter sucesso na preservação de ilhéus em porcos<sup>36</sup>. Os autores verificaram produção de  $2080 \pm 290$  IE com o método de dupla camada e  $3110 \pm 520$  IE com o PFC, sendo esta diferença estatisticamente significativa.

É fundamental a preservação do ducto pancreático durante a conservação, dado que a colagenase usada na distensão do pâncreas é infundida directamente neste ducto. A injeção ductal também pode ser feita com a solução de Kyoto modificada, dado que esta permite reduzir a apoptose das células do tecido exócrino e dos ilhéus pancreáticos. Deve ser evitada a solução UW, uma vez que esta inibe a colagenase, a qual é essencial para a digestão pancreática e isolamento dos ilhéus<sup>21</sup>.

A selecção da colagenase é um aspecto importante no isolamento, sendo a Liberase a mais utilizada<sup>21</sup>. No entanto, devem ser considerados vários factores quando seleccionamos as enzimas para a digestão da porção exócrina. Recentemente, a utilização de uma preparação enzimática com dois componentes produziu resultados favoráveis<sup>37</sup>. Bucher e colaboradores compararam a mistura de *Collagenase NB1* e *Neutral Protease NB* (SERVA), com a enzima Liberase HI no isolamento de ilhéus, tendo verificado uma maior produção de IE, maior IEs/kg de tecido pancreático, melhoria da função dos ilhéus e redução da apoptose quando se usava a combinação enzimática<sup>37</sup>.

Com o objectivo de distender o pâncreas, a colagenase deve ser infundida directamente no ducto pancreático com monitorização da pressão, com o menor extravasamento possível<sup>21</sup>. A canulação pode ser feita no ducto pancreático principal sendo, para isso, necessário que o pâncreas esteja intacto, resultando num menor extravasamento da colagenase e numa distensão excelente. Em alternativa, pode seccionar-se o pâncreas e canular 2 ou 3 ductos pancreáticos, o que inevitavelmente causa extravasamento da colagenase.

Em seguida, o pâncreas distendido é digerido através do método de Ricordi. Neste método usa-se uma câmara de Ricordi (desenvolvida por Camilo Ricordi), a qual permite um controlo meticuloso da temperatura, seguindo-se a colheita do tecido pancreático digerido. A diluição, o controlo da temperatura e a neutralização das enzimas digestivas, são aspectos fundamentais criteriosamente controlados mediante a utilização deste método<sup>21</sup>.

A fase seguinte consiste na purificação dos ilhéus do tecido exócrino, sendo efectuada por centrifugação pelo gradiente de densidade sobre Ficoll, usado um processador celular COBE 2991<sup>21</sup>. Uma solução contendo iodixanol em substituição do Ficoll parece contribuir para aumentar a produção de ilhéus, uma vez que o iodixanol apresenta baixa viscosidade, necessitando de menor força na centrifugação.

## PROCEDIMENTO DE TRANSPLANTAÇÃO DE ILHÉUS

O local para infusão dos ilhéus pancreáticos isolados é a veia porta. O pâncreas é um órgão inacessível e a infusão de ilhéus na vasculatura esplénica resulta em morbidade significativa, incluindo enfarte, ruptura e perfuração gástrica<sup>3</sup>. A embolização de ilhéus no fígado oferece uma vantagem fisiológica, uma vez que este é o maior local de função da insulina e é fisiologicamente consistente com a secreção pancreática de insulina directamente na vasculatura portal.

Existem duas vias para aceder à vascularização portal<sup>3</sup>: 1) a laparotomia cirúrgica com canulação da veia mesentérica tributária do sistema portal, e 2) o acesso percutâneo da veia porta guiado por ecografia. Uma vez obtido o acesso, os ilhéus são introduzidos usando uma infusão em saco que contém os ilhéus suspensos em cerca de 200 mL de líquido. Na infusão é incluída heparina não fraccionada para reduzir o risco de trombose portal, a qual é uma complicação rara, mais frequentemente associada ao grau de impureza dos ilhéus. A pressão portal é avaliada durante o procedimento para monitorizar a infusão e alteração na pressão é indicação para a suspender. Os riscos relacionados com este procedimento incluem hemorragia, trombose, punção biliar, desconforto, aumento

transitório das transaminases e fístula arterio-venosa.

A abordagem cirúrgica apresenta a vantagem de prevenir a hemorragia, enquanto que a abordagem radiológica evita a infecção e herniação (a qual pode apresentar um risco acrescido pelo uso de sirolimus)<sup>3</sup>. Os doentes preferem o método radiológico pela sua simplicidade, redução da dor e ausência de anestesia. No entanto, com o procedimento imagiológico, existe risco de hemorragia quando o cateter é retirado do fígado.

Imediatamente após a transplantação, o controlo glicémico com insulina exógena é usado para manter um ambiente estável para os novos ilhéus<sup>3</sup>. Dados experimentais em modelos animais revelaram que o enxerto de ilhéus é melhor completado num ambiente normoglicémico do que hiperglicémico<sup>38</sup>. Assim que os ilhéus começam a segregar insulina, a terapia com insulina exógena deve ser diminuída para evitar hipoglicemia. Em alguns casos, a libertação de insulina pelos ilhéus transplantados apoptóticos pode criar um ambiente de hipoglicemia, com necessidade de administração de dextrose intravenosa.

## TRATAMENTO IMUNOSSUPRESSOR

O Protocolo de Edmonton (e as suas variantes mais recentes) usa uma terapia imunossupressora livre de glucocorticóides que inclui dacluzimab, sirolimus e tacrolimus<sup>3,20</sup>.

O sirolimus é administrado oralmente numa dose baixa de 0,2 mg/Kg de peso corporal, seguida de uma dose de 0,1 mg/Kg/dia, com monitorização dos níveis da droga para manter-se entre 12-15 ng/mL nos primeiros três meses e entre 7-10 ng/mL após 3 meses<sup>3,20</sup>. O tacrolimus é administrado oralmente, iniciando-se com 1 mg duas vezes por dia, sendo posteriormente ajustada a dose para manter uma concentração de 3-6 ng/mL às 12 h<sup>20</sup>. Os níveis de sirolimus e tacrolimus devem ser monitorizados regularmente para o ajuste da dose pós-transplantação<sup>3</sup>. O dacluzimab é administrado por via EV numa dose de 1 mg/Kg cada 14 dias, num total de cinco doses<sup>20</sup>. Se a segunda transplantação for feita 10 semanas após a primeira, o curso de dacluzimab deverá ser repetido<sup>20</sup>. Nenhum

corticóide deve administrado em qualquer altura do tratamento imunossupressor<sup>20</sup>.

Os efeitos secundários do sirolimus e tacrolimus incluem náuseas, úlceras orais, diarreia, obstipação, fadiga, anemia, neutropenia, edema, tumor, acne, hipertensão e dislipidemia. Quando são usadas doses elevadas de sirolimus pode surgir nefrotoxicidade e tremor. A imunossupressão a longo prazo pode aumentar o risco de infecção e de certas neoplasias<sup>3</sup>.

As doenças linfoproliferativas pós-transplantação observadas em receptores de órgãos sólidos e de medula óssea imunossuprimidos não foram observadas em receptores de ilhéus pancreáticos. O risco é de cerca de 1-2%, mas pode ser mais baixo se forem usados ensaios de PCR (*polimerase chain reaction*) para a identificação de Epstein-Barr e a possibilidade de terapias antiviral com ganciclovir<sup>3</sup>.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Em doentes com DM tipo 1 é possível obter-se um bom controlo glicémico com insulino-terapia intensiva ou com transplante segmentar ou total de pâncreas. No entanto, a insulino-terapia intensiva não normaliza a HbA1c e pode levar a hipoglicemia severa, e o transplante de pâncreas é um procedimento invasivo com os riscos inerentes a uma cirurgia. A transplantação de ilhéus pancreáticos apesar de associada a alguns riscos, permite obter insulino-independência e normalização dos níveis de HbA1c.

Até à data, a transplantação de ilhéus parece constituir o método mais promissor para a cura da diabetes. No entanto, ainda é necessário o aperfeiçoamento das técnicas de isolamento dos ilhéus para a obtenção de uma maior quantidade de ilhéus de modo a ultrapassar a dificuldade da escassez de dadores de pâncreas.

A comunidade científica internacional enfrenta actualmente dois grandes desafios, i.e. desenvolver drogas imunossupressoras seguras, e garantir a sobrevivência dos ilhéus transplantados a longo prazo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Boyle JP, Honeycutt AA, Narayan KM, Hoerger TJ, Geiss LS, Chen H, Thompson TJ. Projection of diabetes burden through 2050: impact of changing demography and disease prevalence in the U.S. *Diabetes Care* 2001; 24: 1936-1940.
2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27:1047-1053.
3. Merani S, Shapiro AM. Current status of pancreatic islet transplantation. *Clin Sci (Lond)* 2006; 110: 611-625.
4. DCCT. Diabetes Control and Complications Trial 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.
5. Matsumoto S, Noguchi H, Yonekawa Y, Okitsu T, Iwanaga Y, Liu X, Nagata H, Kobayashi N, Ricordi C. Pancreatic islet transplantation for treating diabetes. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6: 23-37.
6. Shapiro AM, Nanji SA, Lakey JR. Clinical islet transplant: current and future directions towards tolerance. *Immunol Rev* 2003; 196: 219-236.
7. Robertson RP. Islet Transplantation: Travels up the Learning Curve. *Current Diabetes Reports* 2002; 2: 365-370.
8. Stevens RB, Matsumoto S, Marsh CL. Is islet transplantation a realistic therapy for the treatment of type 1 diabetes in the near future? *Clinical Diabetes* 2001; 19: 51-60.
9. Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, Idezuki Y, Goetz FC. Allograft transplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery* 1967; 61: 827-837.
10. Lillehei RC, Idezuki Y, Kelly WD, Najarian JS, Merkel FK, Goetz FC. Transplantation of the intestine and pancreas. *Transplant Proc* 1969; 1: 230-238.
11. Lillehei RC, Idezuki Y, Uchida H, Kelly WD, Najarian JS, Merkel F, Goetz FC. Pancreatic allotransplantation in the dog and in man. *Br J Surg* 1969; 56: 699.
12. Sutherland DE, Gruessner RW, Dunn DL, Matas AJ, Humar A, Kandaswamy R, Mauer SM, Kennedy WR, Goetz FC, Robertson RP, et al. Lessons learned from more than 1,000 pancreas transplants at a single institution. *Ann Surg* 2001; 233: 463-501.
13. Sutherland DE, Gruessner RW, Gruessner AC. Pancreas transplantation for treatment of diabetes mellitus. *World J Surg* 2001; 25: 487-496.

14. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16: 35-39.
15. Kostianovsky M, Lacy PE, Greider MH, Still MF. Long term (15 days) incubation of islets of Langerhans isolated from adult rats and mice. *Lab Invest* 1972; 27: 53-61.
16. Reckard CR, Ziegler MM, Barker CF. Physiological and immunological consequences of transplanting isolated pancreatic islets. *Surgery* 1973; 74: 91-99.
17. Kemp CB, Knight MJ, Scharp DW, Ballinger WF, Lacy PE. Effect of transplantation site on the results of pancreatic islet isografts in diabetic rats. *Diabetologia* 1973; 9: 486-491.
18. Pyzdrowski KL, Kendall DM, Halter JB, Nakhleh RE, Sutherland DE, Robertson RP. Preserved insulin secretion and insulin independence in recipients of islet autografts. *N Engl J Med* 1992; 327: 220-226.
19. Wahoff DC, Papalois BE, Najarian JS, Kendall DM, Farney AC, Leone JP, Jessurun J, Dunn DL, Robertson RP, Sutherland DE. Autologous islet transplantation to prevent diabetes after pancreatic resection. *Ann Surg* 1995; 222: 562-575; discussion 575-569.
20. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-238.
21. Matsumoto S, Noguchi H, Naziruddin B, Onaca N, Jackson A, Nobuyo H, Teru O, Naoya K, Klintmalm G, Levy M. Improvement of pancreatic islet cell isolation for transplantation. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2007; 20: 357-362.
22. Toso C, Baertschiger R, Morel P, Bosco D, Armanet M, Wojtuszczyz A, Badet L, Philippe J, Becker CD, Hadaya K, et al. Sequential kidney/islet transplantation: efficacy and safety assessment of a steroid-free immunosuppression protocol. *Am J Transplant* 2006; 6: 1049-1058.
23. Bertuzzi F, Grohovaz F, Maffi P, Caumo A, Aldrighetti L, Nano R, Hengster P, Calori G, Di Carlo V, Bonifacio E, Secchi A. Successful [correction of Succesful] transplantation of human islets in recipients bearing a kidney graft. *Diabetologia* 2002; 45: 77-84.
24. Nagata H, Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, Yonekawa Y, Kinukawa T, Shimizu T, Miyakawa S, Shiraki R, et al. Procurement of the human pancreas for pancreatic islet transplantation from marginal cadaver donors. *Transplantation* 2006; 82: 327-331.
25. Okitsu T, Matsumoto S, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, Yonekawa Y, Maekawa T, Tanaka K. Kyoto islet isolation method: the optimized one for non-heart-beating donors with highly efficient islet retrieval. *Transplant Proc* 2005; 37: 3391-3392.
26. Matsumoto S, Tanaka K. Pancreatic islet cell transplantation using non-heart-beating donors (NHBDs). *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12: 227-230.
27. Amiel SA, Rela M. Live organ-donation for islet transplantation. *Lancet* 2005; 365: 1603-1604.
28. Zhao M, Muiesan P, Amiel SA, Srinivasan P, Asare-Anane H, Fairbanks L, Persaud S, Jones P, Jones J, Ashraf S, et al. Human islets derived from donors after cardiac death are fully biofunctional. *Am J Transplant* 2007; 7: 2318-2325.
29. Hering BJ, Kandaswamy R, Ansite JD, Eckman PM, Nakano M, Sawada T, Matsumoto I, Ihm SH, Zhang HJ, Parkey J, et al. Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *Jama* 2005; 293: 830-835.
30. Matsumoto S, Yamada Y, Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, Yonekawa Y, Nakai Y, Ueda M, Ishii A, et al. Simple evaluation of engraftment by secretory unit of islet transplant objects for living donor and cadaveric donor fresh or cultured islet transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 3435-3437.
31. Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, Yonekawa Y, Yamada Y, Nakai Y, Ueda M, Ishii A, et al. Insulin independence of unstable diabetic patient after single living donor islet transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 3427-3429.
32. CIT Trial Consortium, NIH 2006.
33. Ihm SH, Matsumoto I, Sawada T, Nakano M, Zhang HJ, Ansite JD, Sutherland DE, Hering BJ. Effect of donor age on function of isolated human islets. *Diabetes* 2006; 55: 1361-1368.
34. Goto T, Tanioka Y, Sakai T, Terai S, Kamoda Y, Li S, Tanaka T, Tsujimura T, Matsumoto I, Fujino Y, et al. Application of the two-layer method on pancreas digestion results in improved islet yield and maintained viability of isolated islets. *Transplantation* 2007; 83: 754-758.
35. Matsumoto S, Qualley SA, Goel S, Hagman DK, Sweet IR, Poitout V, Strong DM, Robertson RP, Reems JA. Effect of the two-layer (University of Wisconsin solution-perfluorochemical plus O2)

- method of pancreas preservation on human islet isolation, as assessed by the Edmonton Isolation Protocol. *Transplantation* 2002; 74: 1414-1419.
36. Brandhorst D, Iken M, Brendel MD, Bretzel RG, Brandhorst H: Successful pancreas preservation by a perfluorocarbon-based one-layer method for subsequent pig islet isolation. *Transplantation* 2005; 79: 433-437.
37. Bucher P, Mathe Z, Morel P, Bosco D, Andres A, Kurfuest M, Friedrich O, Raemsch-Guenther N, Buhler LH, Berney T. Assessment of a novel two-component enzyme preparation for human islet isolation and transplantation. *Transplantation* 2005; 79: 91-97.
38. Biarnes M, Montolio M, Nacher V, Raurell M, Soler J, Montanya E: Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes* 2002; 51: 66-72.