

Originales

Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 con implante pancreático de células madre adultas autólogas

TREATMENT OF TYPE 1 DIABETES MELLITUS WITH AN AUTOLOGOUS BONE MARROW ADULT STEM CELL IMPLANT IN THE PANCREAS

ALEJANDRO DANIEL MESPLES, BASILIO PRETIÑE Y RAÚL BELLOMO

TECNON. Salta. Argentina.

Background and objective: Type 1 diabetes results from the autoimmune destruction of β cells in the pancreas. Several studies have discussed the ability of adult stem cells to differentiate and function effectively. The aim of this study was to attain fasting glycemia of < 100 mg/dl, or any glycemic value of < 200 mg/dl at any time in the course of the day, and a decrease of at least 50% in the dose of exogenous insulin administration up to 180 days after implantation, as well as C-peptide normalization.

Patients and method: Twelve patients with type 1 diabetes mellitus were recruited for autologous bone marrow adult stem cell transplantation through an arterial catheter between October and December 2005. The catheterization was performed through the femoral artery, selectively to the inferior pancreatic artery with a microcatheter, and the implant was delivered to the distal segment. Age ranged between 21 and 60 years. Islet-cell and/or glutamic acid decarboxylase antibodies were negative, C-peptide levels were < 0.05 mg/ml, fasting glycemia was < 180 mg/dl, and glycosylated hemoglobin was $< 9\%$.

Results: The procedure was carried out uneventfully in all patients. Eleven patients (92%) discontinued the use of rapid-acting insulin and four patients managed total suppression of insulin therapy and showed normal C-peptide, glucose, and glycosylated hemoglobin values. Four patients received less than 66% of the initial total daily insulin dose with an increase in basal C-peptide values. Three patients received less than 50% of the initial total daily dose, with no changes in basal C-peptide levels. Of these, two patients resumed initial insulin requirements. Only one patient showed no significant changes after transplantation. After 180 days, no adverse events had occurred.

Conclusions: The procedure is feasible and safe and recovery of gland function was obtained after stem cell implantation.

Key words: Type 1 diabetes mellitus. Peripheral arterial catheterization. Adult stem cells.

Fundamento y objetivo: La diabetes mellitus tipo 1 resulta de la destrucción autoinmunitaria de las células beta del páncreas. Distintos estudios demuestran la capacidad de las células madre adultas de diferenciarse y funcionar. El objetivo fue lograr glucemias en ayunas < 100 mg/dl o < 200 mg/dl en cualquier momento del día, y supresión o disminución del 50% del aporte de insulina exógena hasta los 180 días posteriores al implante, con normalización del péptido C.

Pacientes y método: Doce pacientes con diabetes mellitus tipo 1 recibieron el implante de células madre adultas autólogas de médula ósea por cateterismo arterial desde octubre a diciembre de 2005. Se realizó a través de la arteria femoral; se cateterizó selectivamente la arteria pancreática inferior con un microcatéter y se liberó el implante en el segmento distal. Los pacientes tenían entre 21 y 60 años de edad. Los anticuerpos antiislotte y/o anticuerpos antidescarboxilasa del ácido glutámico fueron negativos; el péptido C, $< 0,05$ ng/ml; la glucemia en ayunas, < 180 mg/dl, y la glucohemoglobina, $< 9\%$.

Resultados: El procedimiento se desarrolló sin problemas en todos los pacientes; 11 (92%) pacientes abandonaron la insulina rápida, 4 pacientes suprimieron el tratamiento con insulina, con normalización del péptido C, de la glucemia y la glucohemoglobina. Cuatro pacientes recibían menos del 66% de la dosis de insulina inicial, con aumento del péptido C; 3 pacientes recibían menos del 50% de la dosis inicial, sin cambios en el péptido C. De éstos, 2 pacientes retornaron a los requerimientos iniciales de insulina. Sólo 1 paciente no tuvo cambios significativos. A 180 días no se observaron eventos adversos.

Conclusiones: La técnica es factible y segura, y se obtuvo la recuperación funcional de la glándula a partir del implante de células madre.

Palabras clave: Diabetes mellitus tipo 1. Cateterismo arterial periférico. Células madre adultas.

INTRODUCCIÓN

La diabetes es la más común de las enfermedades endocrinas que se define como un conjunto de trastornos metabólicos resultantes de la alteración en la secreción pancreática de insulina, en la respuesta periférica a ésta o ambas, lo que conduce a un síndrome

Correspondencia: Dr. A.D. Mesples.
J.J. Urquiza 968. Salta. 4400 Argentina.
Correo electrónico: amesples@uolsinectis.com.ar

Manuscrito recibido el 22-2-2006 y aceptado para su publicación el 23-4-2007.

caracterizado por hiperglucemia y alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono, las proteínas y los lípidos¹. La diabetes tipo 1 afecta típicamente a niños y adultos jóvenes, es producida por una agresión autoinmunitaria contra las células beta de los islotes pancreáticos de Langerhans, y ocasiona un cuadro de hiperglucemia manifiesta cuando un 80-90% de las células beta se han destruido. Estos pacientes requieren de la administración de insulina para vivir^{2,3}.

Durante décadas se ha investigado con la finalidad de encontrar un método que reemplace las células beta de los islotes de Langerhans. Alternativas tales como el trasplante pancreático, el implante de islotes y el páncreas bioartificial no han cumplido las expectativas debido al alto coste, la dificultad en la obtención de un donante, la morbilidad⁴⁻⁶ y la necesidad de terapia inmunosupresora de por vida, que actúa de manera deletérea a largo plazo por su capacidad diabetogénica⁷⁻⁹.

Desde hace unos años se reconoce que las células madre tienen la propiedad de diferenciarse en distintos tipos celulares y funcionar como tales, incluidas tanto las embriogénicas como las adultas¹⁰⁻¹⁵. El implante de células madre en el páncreas de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 tiene por objetivo refuncionalizar la glándula y lograr un buen control glucémico. Según nuestro conocimiento, en la literatura médica no hay antecedentes de series clínicas en seres humanos con resultados que respalden este método de tratamiento sustitutivo.

PACIENTES Y MÉTODO

Desde octubre hasta diciembre de 2005 se trató a 12 pacientes (8 varones y 4 mujeres) con implantes, por cateterismo arterial, de células madre adultas autólogas de médula ósea. La experiencia se realizó en TECNÓN de Salta, Argentina, con aprobación institucional del Comité Científico-Técnico y el Comité de Bioética del Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablaciones e Implantes (INCUCAI), organismo representante del Ministerio de Salud de la República Argentina, y del Comité Independiente de Ética Dr. Luis Zieher. Todos los pacientes recibieron información extensa sobre el procedimiento, y firmaron el consentimiento informado.

Se eligió a los pacientes según los siguientes criterios de inclusión: diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1, edad comprendida entre 21 y 60 años, ausencia de anticuerpos antiislote pancreático (ICA) y/o anti-GAD (descarboxilasa del ácido glutámico), con valores inferiores a los normales de péptido C en sangre, con glucemia en ayunas menor a 180 mg/dl y glucohemoglobina total $\leq 9\%$, y sin deterioro de órganos diana. Consideramos lesiones de órganos diana la insuficiencia renal (aclaramiento de creatinina menor de 50 ml/min), la retinopatía diabética en estadios avanzados, la arteriopatía severa de miembros inferiores, los antecedentes de síndrome coronario agudo, infarto de miocardio o infarto cerebral, y el antecedente de cirugía vascular. La media de edad de los pacientes era 36 (21-60) años, y la del tiempo de evolución de la enfermedad, 13 (6-30) años. Las dosis de insulina previas al implante eran: 47 (26-85) U de

insulina de acción retardada, y 13 (0-36) U de acción rápida. Todos los pacientes tenían un índice de masa corporal menor de 31, y pesaban más de 40 kg antes del procedimiento de implante. Ningún paciente tratado cambió su peso corporal más de un 10% del que tenía previamente al implante.

Los objetivos planteados incluyeron: lograr que el paciente tuviera valores de glucemia en ayunas inferiores a 100 mg/dl o una glucemia inferior a 200 mg/dl en cualquier momento del día, sin aporte de insulina exógena o con un aporte de insulina exógena inferior al 50% con respecto a los requerimientos previos al implante, y la consecución de concentraciones normales de péptido C, con un seguimiento de 180 días tras realizar el procedimiento. No se incluyó a los pacientes en ningún programa de dieta o ejercicio físico distinto del que realizaban habitualmente. Las variables analizadas fueron edad, sexo, requerimiento diario de insulina exógena, evolución de la glucemia en ayunas y posprandial, evolución de la glucohemoglobina y del péptido C.

Las mediciones del péptido C se realizaron en sangre periférica en forma basal y estimulada según técnica de electroquimioluminiscencia (ECL), técnica sándwich que utiliza dos anticuerpos monoclonales específicos contra el péptido humano. Se consideró valores normales en suero y plasma 1,1-4,4 ng/ml, y sensibilidad analítica en suero, 0,005-40 ng/ml.

La medición de la glucohemoglobina total se realizó antes del implante y luego en forma trimestral. El método utilizado fue el de la inmunoaglutinación de partículas de látex (valor normal, 4,2-6,2%).

La estimulación de la secreción mediante glucosa oral se realizó con un ayuno previo de 8 a 9 h. La dosis de glucosa utilizada fue 50-75 g, según el peso del paciente. Se recogió sangre venosa antes y después de la ingesta de la glucosa, cada hora, durante 3 h.

Los ICA se midieron por inmunofluorescencia indirecta de forma semicuantitativa (valor de referencia, negativo). Los anticuerpos anti-GAD se midieron por análisis de radio-ligando (valores de referencia: < 1 U/ml, negativo, y $> 1,01$ U/ml, positivo).

Las variables continuas se expresan como media y desviación estándar, y las variables categóricas como valor absoluto y porcentaje.

Material y procedimiento del implante

Se realizó a los pacientes estimulación de la médula ósea con factor estimulante de colonias: filgrastim (*granulocyte colony stimulating factor* [G-CSF]), a dosis de 5-10 $\mu\text{g/kg/día}$, vía subcutánea durante los días 1 a 4. El día 5 se realizó citometría de flujo de sangre periférica. Se predeterminó que la celularidad CD34+ tenía que ser superior al 0,03% en relación con las CD45+ en sangre periférica para programar el implante al día siguiente. Si los recuentos eran inferiores, se estimulaba durante 2 días más, y así sucesivamente hasta alcanzar el número de CD34+ previamente establecido.

La citometría de flujo determinó una población homogénea de células CD34+ en relación con el número de células CD45+, mediante el análisis de características morfológicas y la definición de antígenos de superficie con empleo de anticuerpos monoclonales anti-CD45 y anti-CD34. El protocolo empleado para cuantificar las células CD34+ fue el ISHAGE 23¹⁶, con utilización de anticuerpos monoclonales

anti-CD45-FITC, anti-CD34-PE y control isotipo-PE. Se determinó la población de CD34+ como porcentaje en relación con las células CD45+, con mínima interferencia de marcación no específica y de restos celulares.

El día del implante se procedió a la extracción de médula ósea de cresta ilíaca posterior, previa desinfección de la piel con povidona yodada y anestesia local. Se realizó punción con un trocar conectado a una jeringa de 20 ml, se aspiraron unos 40 a 80 ml de médula ósea, y se mezcló con heparina sódica (5.000 U/10 ml) y se filtró con Bone Marrow Collection Kit (Baxter, Estados Unidos). La suspensión de células se introdujo dentro de una jeringa de 50 ml conectada al catéter de infusión.

La médula ósea filtrada se evaluó morfológicamente con determinaciones de viabilidad (75%), ausencia de coágulos, ausencia de porción ósea y de bacterias, y se observó que la celularidad (CD34+) fue siempre mayor que $0,04 \times 3 \times 10^8/\text{kg}$. No se realizaron cultivos ni procedimientos de enriquecimiento in vitro.

Se inyectó en circulación pancreática toda la muestra obtenida de la médula ósea. Se realizó punción de arteria femoral. Se colocaron introductores valvulados; con control radioscópico y angiografía digital, se posicionó el catéter guía con curva tipo LIMA, de 5 Fr de diámetro, en la arteria mesentérica superior o el tronco celiaco. Se identificó la red anastomótica dependiente de la arteria pancreática inferior, y se colocó selectivamente el microcatéter de perfusión. Se inyectaron 5.000 U de heparina sódica por el catéter. Se inyectó el material de recuperación celular en la arteria, y se dio por finalizado el procedimiento. Se consideró como éxito angiográfico el cateterismo selectivo del vaso afectado (colocación selectiva del catéter guía y progresión exitosa del microcatéter en la arteria pancreática inferior), sin complicaciones vasculares (embolias, trombosis, disecciones, espasmos) o complicaciones de la punción arterial (embolias, trombosis, disecciones, hematomas que requieran cirugía o transfusiones de sangre o sus elementos) con o sin *blush* pancreático: visualización durante la inyección de contraste del parénquima pancreático por su microcirculación.

RESULTADOS

Tras una estimulación medular de por lo menos 3 días, y un máximo de 5 días con filgrastim (G-CSF) a dosis de 5-10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, por vía subcutánea, se observó que todos los pacientes presentaban una celularidad en la muestra de médula ósea mayor que $0,04 \times 3 \times 10^8/\text{kg}$; 5 pacientes presentaron recuentos de CD34+ en sangre periférica del 0,03 al 0,05%; 4 pacientes, entre el 0,06 y el 0,10%, y 3 pacientes, mayores del 0,11%. El éxito angiográfico se logró en todos los pacientes. Tras la inyección del material de recuperación celular medular se observó *blush* pancreático en el 50% de los procedimientos (6 pacientes). No se observaron complicaciones vasculares en la arteria dominante ni eventos adversos. El tiempo promedio del procedimiento fue 20 (rango, 10-30) min; el de ingreso fue 12 (rango, 6-24) h.

En la evolución a 30 días (tabla 1) no se observaron eventos adversos; 8 (66%) pacientes refirieron episodios de hipoglucemia (síntomas compatibles con glucemias menores que 60 mg/dl), repetidas (de aparición en

TABLA 1. Requerimientos de insulina antes y después del implante

| Paciente | Dosis previa | | 30 días | | 60 días | | 90 días | | 120 días | | 180 días | |
|----------|--------------|--------|-----------|--------|---------|-----------|---------|-------|-----------|--------|----------|-------|
| | Retardada | Rápida | Retardada | Rápida | (%) | Retardada | Rápida | (%) | Retardada | Rápida | (%) | (%) |
| 1 | 47/33 | 6/6 | 40/30 | 0/0 | (76) | 30/20 | 0/0 | (54) | 30/20 | 0/0 | (54) | 0/0 |
| 2 | 40/30 | 12/12 | 30/20 | 5/5 | (63) | 30/20 | 0/0 | (53) | 20/12 | 0/0 | (34) | 0/0 |
| 3 | 30/20 | 6/6 | 24/6 | 0/0 | (48) | 24/6 | 0/0 | (48) | 20/0 | 0/0 | (32) | 0/0 |
| 4 | 36/22 | 15/15 | 36/13 | 0/0 | (60) | 30/0 | 0/0 | (37) | 30/0 | 0/0 | (24) | 0/0 |
| 5 | 28/0 | 5/5 | 18/0 | 0/0 | (47) | 18/0 | 0/0 | (47) | 10/0 | 0/0 | (20) | 0/0 |
| 6 | 28/14 | 4/4 | 28/10 | 3/3 | (88) | 20/10 | 0/0 | (60) | 10/0 | 0/0 | (20) | 0/0 |
| 7 | 30/20 | 8/8 | 26/16 | 0/0 | (64) | 26/16 | 0/0 | (64) | 20/10 | 0/0 | (45) | 0/0 |
| 8 | 28/14 | 4/4 | 28/14 | 4/4 | (100) | 20/10 | 0/0 | (60) | 20/0 | 0/0 | (40) | 28/14 |
| 9 | 30/15 | 5/5 | 30/15 | 5/5 | (100) | 30/15 | 5/5 | (100) | 30/15 | 5/5 | (100) | 30/15 |
| 10 | 16/10 | 12/12 | 16/10 | 12/12 | (100) | 16/10 | 0/0 | (52) | 10/0 | 0/0 | (20) | 10/0 |
| 11 | 28/8 | 4/4 | 28/8 | 4/4 | (100) | 28/8 | 0/0 | (81) | 0/0 | 0/0 | (0) | 0/0 |
| 12 | 20/20 | | 20/10 | 0/0 | (75) | 10/10 | 0/0 | (50) | 10/0 | 0/0 | (25) | 10/10 |

Entre paréntesis el porcentaje de la dosis total de insulina recibida con respecto a la dosis preimplante. Se observa en las columnas la división del requerimiento de insulina diaria de acción retardada, matutina y nocturna (separada por barras) e insulina diaria rápida, matutina y nocturna (separada por barras).

TABLA 2. Recuento de células CD34+ en sangre periférica y valores de la glucohemoglobina y el péptido C

| Paciente | Recuento CD34+ (%) | Glucohemoglobina (%) | | Péptido C (ng/ml) | | |
|----------|--------------------|----------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|-------------------------|
| | Preimplante | Preimplante | 180 días postimplante | Preimplante | Basal postimplante | Estimulado postimplante |
| 1 | 0,15 | 8,2 | 7 | < 0,05 | 1,4 | 4,32 |
| 2 | 0,22 | 8,5 | 6 | < 0,05 | 5,0 | 9 |
| 3 | 0,07 | 8 | 8,7 | < 0,05 | 0,12 | 6,55 |
| 4 | 0,05 | 8,2 | 9,2 | < 0,05 | 0,22 | 3,75 |
| 5 | 0,08 | 7,4 | 6 | < 0,05 | 0,9 | 4,57 |
| 6 | 0,06 | 6,9 | 7 | < 0,05 | 0,3 | 0,8 |
| 7 | 0,13 | 8,5 | 7,6 | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 |
| 8 | 0,07 | 7,5 | 8,4 | < 0,05 | 0,36 | 0,36 |
| 9 | 0,05 | 7,8 | 7,5 | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 |
| 10 | 0,04 | 7,5 | 8 | < 0,05 | 0,7 | 2,5 |
| 11 | 0,05 | 9 | 6 | < 0,05 | 1,20 | 6 |
| 12 | 0,04 | 9 | 8 | < 0,05 | 0,2 | 1,3 |

por lo menos 3 días consecutivos), y no justificables por causas habituales, que requirieron que a 8 pacientes se les disminuyera la dosis diaria de insulina lenta (mediana, 7; rango, 4-20 U), y a 6 pacientes, la de insulina rápida (mediana, 8; rango, 2-30 U), o a 6 pacientes, la de ambas. Si consideramos la dosis total diaria de insulina, la disminución de unidades por paciente fue de 15 (rango, 6-34) U. En 4 pacientes no se observaron cambios. Los controles de laboratorio (hemograma y función renal) fueron normales en todos los pacientes.

A los 60 días (tabla 1), 9 (75%) pacientes refirieron episodios de hipoglucemia, esto requirió que a 5 pacientes se les disminuyera la dosis diaria de insulina lenta (mediana, 5 U por paciente; rango, 1-20); a 3 pacientes, la de insulina rápida (mediana, 0,83; rango, 0-10 U), y a 3 pacientes, la de ambas. Si consideramos la dosis total diaria de insulina, la disminución de unidades por paciente fue de 7 (rango, 1-20) U. A los 60 días de evolución, 8 (66%) pacientes habían abandonado el uso de insulina rápida o sólo realizaban correcciones esporádicas, y 6 (50%) pacientes recibían menos del 60% de la dosis de insulina total diaria con respecto a la previa al implante. En 3 pacientes no se observaron cambios significativos.

A los 90 días (tabla 1), 11 (92%) pacientes refirieron episodios de hipoglucemia que requirieron la disminución de la dosis diaria de insulina lenta en 6 pacientes (mediana, 5; rango, 1-18 U). Si consideramos la dosis total diaria de insulina, la disminución de unidades por paciente fue de 6 (rango, 5-18) U. A los 90 días de evolución, 11 (92%) pacientes habían abandonado el uso de insulina rápida o realizaban correcciones esporádicas, 6 (50%) pacientes recibían menos del 50% de la dosis total diaria de insulina lenta y 4 pacientes recibían menos del 60% de la dosis total de insulina con respecto a la utilizada antes del implante. Sólo 1 paciente no presentó cambios significativos postimplante.

En la evolución a los 120 días (tabla 1), 11 (92%) pacientes refirieron episodios de hipoglucemia que requirieron la disminución de la dosis diaria de insulina lenta en 6 pacientes (mediana, 12; rango, 4-32 U). Si consideramos la dosis total diaria de insulina, la disminución de unidades por paciente fue de 12 (rango,

4-32) U. A los 120 días de evolución, 11 (92%) pacientes habían abandonado el uso de insulina rápida, 3 pacientes lograron una supresión de insulina, 5 pacientes recibían menos del 66% y 3 pacientes, menos del 50% de la dosis total diaria de insulina lenta. Un paciente no presentó cambios significativos postimplante. Los controles de laboratorio (hemograma y función renal) fueron normales.

A los 180 días (tabla 1) no se observaron eventos adversos; 11 (92%) pacientes refirieron episodios de hipoglucemia que requirieron la disminución de la dosis diaria de insulina lenta en 1 paciente (mediana, 10 U); 9 (75%) pacientes habían abandonado el uso de insulina rápida, 4 pacientes lograron una supresión total de la dosis de insulina diaria, normalizaron los valores de péptido C basal y estimulado, la glucemia en ayuno y posprandial y la glucohemoglobina. Cuatro pacientes recibían menos del 66% de la dosis de insulina diaria inicial y 1 paciente recibía menos del 50% de la dosis de insulina. Otros 2 pacientes, que a los 120 días integraban este grupo, paulatinamente retornaron a las dosis de insulina previas al implante. Una paciente nunca presentó cambios significativos postimplante.

Los pacientes se realizaron autoanálisis diarios de glucemia en ayunas y posprandial. Se observó que el 92% de los pacientes presentaron episodios de hipoglucemia sintomática, no relacionada con otras causas (promedio, 42; rango, 20-58 mg/dl), en distintos momentos del día y por lo menos durante 3 días consecutivos antes de disminuir las dosis de insulina. Los episodios de hipoglucemia se constataron a partir del primer mes y hasta el sexto de seguimiento. Los más frecuentes sucedieron al cuarto mes de evolución. Se observó que los cuadros de hipoglucemia fueron siempre sintomáticos, y nunca graves. También se observó que a partir del mes de evolución los episodios de hiperglucemia (glucemias mayores que 200 mg/dl en cualquier momento del día) eran infrecuentes, lo que llevó a que los pacientes abandonaran el uso de insulinas de acción rápida.

A los 180 días de evolución se solicitó una medición de péptido C (tabla 2) a todos los pacientes, y se

observó que los que alcanzaron supresión total del aporte de insulina normalizaron los valores de péptido C basal y estimulado. En los pacientes que disminuyeron la dosis de insulina diaria en más de un 66% se constató un aumento de por lo menos tres veces el valor obtenido antes del implante, aunque no lograron valores normales. En los pacientes que disminuyeron la dosis un 50% no se observaron cambios significativos en el péptido C, al igual que en la paciente que no presentó una evolución clínica.

A los 180 días de evolución, en los pacientes a quienes se logró suprimir la insulina exógena y normalizar el péptido C basal y estimulado, los valores de glucohemoglobina (tabla 2) disminuyeron hasta normalizarse. En los pacientes a quienes no se logró suprimir la dosis de insulina ni normalizar el péptido C, los valores de glucohemoglobina total eran similares a los obtenidos previamente al implante con una variación de hasta un 1% en algunos casos.

DISCUSIÓN

La diabetes mellitus tipo 1 implica un importante riesgo de morbilidad y mortalidad. Además, en niños o adolescentes implica una disminución de la calidad de vida, con trastornos psicosociales y familiares de diversa importancia¹⁷.

Desde hace algunos años se estudia alternativas de regeneración celular para aplicar a pacientes con esta enfermedad con una intención curativa. No hay en la literatura científica mundial antecedentes de implantes de células madre en el páncreas, por cateterismo arterial, en pacientes con diabetes mellitus tipo 1. Esta experiencia se apoya en los resultados de experimentación animal logrados y validados por diversos grupos de investigadores.

Nuestro protocolo de trabajo incluyó a pacientes diabéticos seleccionados por su dependencia a la insulina, traducida en el laboratorio por una medición de péptido C basal por debajo de los valores de detección del método. Además, los pacientes debían tener determinaciones negativas de anticuerpos ICA y/o GAD, hecho característico de la fase crónica de la enfermedad. Los pacientes debían tener un control glucémico caracterizado por glucemia en ayunas menor que 180 mg/dl y glucohemoglobina menor del 9%. Dichos valores de referencia se utilizaron para documentar el control metabólico del paciente en la evolución postimplante. La elección de estos criterios de inclusión nos permitió analizar una población homogénea.

La técnica utilizada para el implante celular se describió inicialmente en implantes de células madre en pacientes cardiopatas¹⁸. Su adaptación al cateterismo de la arteria pancreática inferior estuvo a cargo del personal médico del servicio, que seleccionó material específico para el caso que concluyó con el diseño de una curva tipo LIMA modificada en el catéter

guía, que nos permitió trabajar con rapidez y selectividad. La supraseductividad lograda con la migración de un microcatéter nos permite asegurar la direccionalidad del material de implante hacia la glándula pancreática.

El material elegido para el implante es el de médula ósea adulta estimulada durante 3 a 5 días con filgrastim. El número de células CD34+ estipulado como de umbral terapéutico en sangre periférica fue mayor del 0,03%, y en médula ósea, $0,04 \times 3 \times 10^8/\text{kg}$, similar al utilizado en los implantes cardíacos de células madre^{19,20}. La poca experiencia en implantes pancreáticos hizo que, comparando volumen, masa y peso del órgano, extrapoláramos los recuentos celulares. De todas formas, y ante las teorías de fusión celular y de transdiferenciación²¹⁻²⁵, los recuentos de un tipo celular específico no serían significativos ante la posibilidad de que células madre parcialmente diferenciadas a células mesenquimáticas o hematopoyéticas atravesasen las barreras funcionales biológicas y se diferenciaren a células beta. Desde este punto de vista, consideramos que el número de CD34+ presente en la muestra resultaría solamente indicativo de la celularidad óptima. A pesar de que 3 de los 4 pacientes que suspendieron la administración de la insulina tenían recuentos de CD34+ mayores del 0,08% antes del implante, la poca cantidad de pacientes analizados no nos permite valorar la relación entre el recuento de CD34+ preimplante y su evolución clínica.

Consideramos que clínicamente logramos una evidencia indirecta de que las células madre potencialmente implantadas en el páncreas tienen diferenciación y, posteriormente, función. Utilizando los mismos parámetros de seguimiento que los del Protocolo de Edmont²⁶, observamos que los 4 pacientes que abandonaron el uso de insulina normalizaron los valores de péptido C basal y estimulado, de glucemia en ayunas y posprandial y de glucohemoglobina a los 180 días de evolución. La disminución de la dosis total diaria de insulina en más del 66% observada en los pacientes se corresponde con un aumento significativo de las concentraciones de péptido C logrado a los 6 meses de evolución, aunque sin llegar a ser normales. En estos pacientes la glucemia en ayunas y posprandial disminuyó significativamente, aunque no hasta la normalidad, y la glucohemoglobina no presentó cambios significativos.

Los pacientes con sólo una disminución del 50% de las dosis de insulina, o que no mejoraron clínicamente, no elevaron el péptido C, pero mejoraron su control glucémico hasta los 90 días postimplante, momento en el que paulatinamente retornaron a sus valores de control glucémico y la dosis de insulina preimplante. Nuestra hipótesis para explicar este tipo de evolución es que un pequeño número de células madre logró diferenciarse y funcionar en el período precoz postimplante, aunque no la cantidad suficiente como para lograr a medio plazo un aumento del péptido C, perdiéndose progresivamente hasta desaparecer sin lograr función. Por protocolo se midió el péptido C a

partir del cuarto mes de evolución, y seguramente no se controló correctamente este período ventana.

Se observó que probablemente, y por deducción, de manera indirecta, las células madre adultas se diferencian y funcionan in vivo provocando cambios clínicos en el paciente, como ya se demostrara en investigación animal^{27,28}.

El 92% de los pacientes, a los 90 días de evolución, suspendieron la administración de insulina rápida, al no requerir correcciones por picos de hiperglucemia, y asumimos este hecho como una primera etapa de aumento de la secreción de insulina endógena basal y de estabilización metabólica. También, a partir de los 30 días de evolución, se observó una disminución promedio de la dosis de insulina total diaria del orden del 20%, que progresivamente a los 90 días era del 50% y a partir del cuarto mes, del 70%. De los 4 pacientes que lograron abandonar el uso de insulina, 3 lo hicieron en el cuarto mes y uno en el quinto mes de evolución, y se mantenían en la misma situación 3 meses después. Este hecho constituye una diferencia importante si comparamos la evolución de los pacientes con trasplante de islotes pancreáticos del Protocolo de Edmonton que 30 días después de dejar la insulina retornaban a su requerimiento histórico en el 90% de los casos.

Sin embargo, recientes trabajos realizados en ratones, y publicados con posterioridad al inicio de nuestro protocolo, informan sobre resultados negativos al no lograr diferenciación celular²⁹. Consideramos que, a la luz de los resultados del presente estudio, los trabajos futuros deberán planearse en seres humanos sin intentar extrapolar resultados de experimentación animal.

Consideramos que nuestros resultados no sólo muestran que la técnica es factible y segura de realizar, sino también que probablemente existe regeneración del órgano, ya que la recuperación funcional de la glándula es efectiva en el control metabólico del paciente a partir del implante.

Todavía hay muchos interrogantes que contestaremos, en parte, con el seguimiento de la evolución a largo plazo de estos pacientes, y que resultan de gran importancia, como la evolución de los anticuerpos ICA y anti-GAD que por protocolo se medirán al año de evolución, y los eventos del seguimiento a largo plazo que también intentará refutar la hipótesis de la transformación tumoral de las células madre adultas. Los resultados obtenidos justifican el diseño de trabajos con mayor número de pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. The 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;329:977-86.
2. Undlien DE, Thorsby E. HLA associations in type 1 diabetes: merging genetics and immunology. *Trends Immunol*. 2001;22:467-9.

3. Mathis D, Vence L, Benoist C. Beta-cell death during progression to diabetes. *Nature*. 2001;414:792-8.
4. Gruessner AC, Sutherland DE. Analysis of United States (US) and non-US pancreas transplants reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of October 2001. En: Cecka JM, Terasaki PI, editores. *Clinical transplants 2001*. Los Angeles: UCLA Immunogenetics Center; 2002. p. 41-72.
5. Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, McCullough CS, Weide LG, Falqui L, et al. Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patient. *Diabetes*. 1990;39:515-8.
6. Shapiro J. Eighty years after insulin: parallels with modern islet transplantation. *CMAJ*. 2002;167:1398-400.
7. Nielsen JH, Mandrup-Poulsen T, Nerup J. Direct effects of cyclosporin A on human pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 1986;35:1049-52.
8. Fabian MC, Lakey JR, Rajotte RV, Kneteman NM. The efficacy and toxicity of rapamycin in murine islet transplantation: in vitro and in vivo studies. *Transplantation*. 1993;56:1137-42.
9. Redmon JB, Olson LK, Armstrong MB, Greene MJ, Robertson RP. Effects of tacrolimus (FK506) on human insulin gene expression, insulin mRNA levels, and insulin secretion in HIT-T15 cells. *J Clin Invest*. 1996;98:2786-93.
10. De la Tour D, Halvorsen T, Demeterco C, Tyrberg B, Itkin-Ansari P, Loy M, et al. Beta-cell differentiation from a human pancreatic cell line in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol*. 2001;15:476-83.
11. 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;292:1389-94. [Erratum, *Science*. 2001;293:428.]
12. Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Elder J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes*. 2001;50:1691-7.
13. Berna G, Leon-Quinto T, Ensenat-Waser R, Montanya E, Martin F, Soria B. Stem cells and diabetes. *Biomed Pharmacother*. 2001;55:206-12.
14. Edlund H. Factors controlling pancreatic cell differentiation and function. *Diabetologia*. 2001;44:1071-9.
15. Soria B. In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation*. 2001;68:205-19.
16. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin Yee I. The ISHAGE Guidelines for CD34+ cells determination by flow cytometry. *J Hematother*. 1996;5:213-26.
17. ADA. Expert Committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. Report of the Experts. *Diabetes Care*. 1997;20:1183-97.
18. Fuchs S, Satler LF, Kornowski R, Okubagzi P, Weisz G, Baffour R, et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2003;41:1721-4.
19. Assmus B, Schächinger V, Teupe C. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106:3009-17.
20. Vicario JH, Campos C, Piva JR, Faccio F. Médula ósea autóloga vía seno coronario y angiogenesis en pacientes con angina crónica estable. Fase I. *Rev Fed Arg Cardiol*. 2004;33:357-63.
21. Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*. 2002;416:545-8.
22. Hess D, Li L, Martin M, Sakano S, Hill D, Strutt B, et al. Bone marrow -derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nature Biotechnology*. 2003;21:763-70.
23. 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;111:843-50.
24. Alison MR. Hepatocyte from non-hepatic adult stem cells. *Nature*. 2000;406:257-60.

25. Petersen BE. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 1999;284:1168-70.
26. Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 2000;343:230-8.
27. Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycaemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes*. 2000;49:157-62.
28. Soria B, Skoudy A, Martín F. From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2001;44:407-15.
29. Taneera J, Rosengren A, Renstrom E, Nygren JM, Serup P, Rorsman P, et al. Failure of transplanted bone marrow cells to adopt a pancreatic β -cell fate. *Diabetes*. 2006;55:290-6.