UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL, *IN VITRO* E *IN VIVO*, DE
ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS NUAS E
MICROENCAPSULADAS**

Elizabeth Maria Costa de Oliveira

Dissertação de Doutorado apresentada ao
Instituto de Química da Universidade de São
Paulo, para concorrer ao Título de Doutor,
pelo curso de Pós-Graduação em Ciências –
Área de concentração Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Irene Noronha

Co-orientadora: Profa. Dra. Mari Sogayar

SÃO PAULO

2004

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

O48a Oliveira, Elizabeth Maria Costa de
Avaliação funcional, *in vitro* e *in vivo*, de ilhotas pancreáticas humanas nuas e microencapsuladas / Elizabeth Maria Costa de Oliveira. - São Paulo, 2004.
141p

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Noronha, Irene de Lourdes

Co-orientador : Sogayar, Mari Cleide

1. Biologia celular 2. Diabetes mellitus : Tratamento
3. Microencapsulação : Farmacotécnica I. T. II. Noronha, Irene, orientador. III. Sogayar, Mari Cleide, co-orientador

574.87 CDD

“Avaliação funcional, *in vitro* e *in vivo*, de ilhotas pancreáticas humanas nuas e microencapsuladas”

ELIZABETH MARIA COSTA DE OLIVEIRA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado(a) por:

Profa. Dra. IRENE DE LOURDES NORONHA
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. PEDRO SOARES DE ARAUJO
IQ – USP

Prof. Dr. PIO COLEPICOLO NETO
IQ – USP

Prof. Dr. RUI CURI
ICB – USP

Prof. Dr. ALVARO PACHECO E SILVA FILHO
UNIFESP

SÃO PAULO
06 de AGOSTO 2004

Aos meus pais Manoel (*in memorian*) e Francisca, ao meu marido

José Manuel e a Mari

AGRADECIMENTOS

- **Um agradecimento especial a minha orientadora** Prof^a. Dr^a. Irene L. Noronha pelo incentivo, ensinamentos e exemplos dados.
- A Prof^a. Dr^a. Mari Cleide Sogayar pela orientação e incentivo.
- A Sabrina, Wagner, Ivone, Eliane, Arianni, Tatiana, Fabiana e Luciene sem vocês em não teria conseguido.
- Ao Tercio Genzini, Marcelo Perosa, Fabio Cresentini, Rodrigo Blanco Dumarco, Pedro Paulo de Paris Caravatto, Lucas Yamakami e Clayton Tokunaga, muito obrigado pela ajuda com os meus ratinhos, mas principalmente pela amizade, carinho e paciência que tiveram comigo durante todos estes anos.
- Ao Carlos, Irenice, Fernando, Karin, Letícia e Patricia por toda a ajuda não só durante os isolamentos, mas também no meu processo de amadurecimento pessoal e profissional.
- Aos amigos do Biotério: Tia Eurides, Renata, Flávia, Fátima, Eliane, Matildes, Isael, Wagner, Alexandre e Silvania por todo apoio e amizade.
- A Dr^a. Elizabeth Augusto e ao Dr Sérgio Barbosa do Laboratório de Células Animais do Agrupamento de Biotecnologia da Divisão de Química do IPT pela colaboração na filtração da Biodritina.
- A todos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, especialmente a Zizi, Sandra e Helena por todas as horas de alegre convívio.
- A todos os alunos, funcionários e médicos do LIM-16, em especial a Luciana, Rita, Camila, Camile, Priscila, Becker, Dimitri, Humberto, Rosi, Meire, Janice, Walter, Denise, Neide, Ana Lúcia, Clarice, Denise

Malheiros, Vanda, Joel e Roberto pela acolhida inicial, pelas horas agradáveis de convívio e pelo apoio nas horas difíceis.

- Ao Dino não só pela primorosa análise histológica realizada para este trabalho, mas principalmente pela presença constante e ensinamentos. Durante a realização deste trabalho o “doctor” Dino sempre estava lá para me socorrer. Ah, quase ia esquecendo, Dino com você tive as melhores discussões políticas de minha vida, regadas de muito bom humor.
- A Therezinha e filhos: Leonardo, Jéssica, Lucas e Ligia pelas horas de lazer roubadas em busca de ajuda, muito obrigada meus queridos. Valeu família Leitão!!!!
- A Anna Carla Goldberg e Dr Freddy Eliaschewitz pela ajuda durante este trabalho.
- A todos da secretaria de pós-graduação, em especial a Cibeles e ao Milton.
- A Nívia, Érika, Gustavo e Cláudio Scarpinela nem em mil anos poderia agradecer tudo o que sempre fizeram por mim, muito obrigada meus queridos amigos.
- A minha prima Miriam pela força e pelas gargalhadas.
- A Tia Zefa pelos almoços extraordinários.
- A Janssen-Cilag Farmacêutica pelo apoio financeiro.
- Enfim, muito obrigada a todos que de alguma forma me ajudaram a realizar este trabalho e mil desculpas se esqueci de citar alguém, com tantos amigos que me ajudaram não é difícil que isto tenha acontecido.

APOIO FINANCEIRO

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

CNPq-Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos

PRP-USP - Pró-Reitoria de Pós-Graduação - USP

IQUSP – Instituto de Química da Universidade de São Paulo

IQUSP – Departamento de Bioquímica

LISTA DE ABREVIATURAS

Alo-Tx	Alotransplante
ATP/ADP	Adenosina trifosfato / adenosina difosfato
BB	“BioBreeding”
$\text{Ca}^{+}_{\text{voltagem}}$	Canais de cálcio sensíveis à voltagem
Ca^{+2}	Íons de cálcio
Ca^{+}_i	Concentração intracelular de cálcio
CECUA	Comissão de Ética em Cuidados e uso Animal
Células INS-1E	Células de insulinoma de rato
CEMIB	Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas
CMRL	Meio “Connaught Medical Research Laboratories”
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CRIESP	Central de radioimunoensaio do Estado de SP
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DNA	“Deoxyribonucleic acid” (Ácido desoxirribonucléico)
EV	Endovenosa
FCF-IQ/USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química da Universidade de São Paulo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GLUT 2	Transportador de glicose 2
HE	Hematoxilina-eosina
HEPES	“N-[2-Hydroxyethyl] piperazine – N’-[2-ethanesulfonic acid]”
HIV	“Human Imuno Deficiency Virus” (Vírus da Imunodeficiência Humana)

HTLVIII	“Human T- Lymphotropic Virus Types I & II” (Vírus linfotrópico T humano tipos I e II)
ICBUSP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
IEQ	“Islet Equivalents”
IPTR	“International Pancreas Transplant Registry” (Registro Internacional de Transplante de Pâncreas)
ITR	“International Islet Transplant Registry” (Registro Internacional de Transplante de Ilhotas)
MEM	“Minimum Essential Medium”
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
NIH	“ <i>Nude</i> Outbred Rats - Restricted Flora”
NIHRNU-M	Ratos NIH homozigotos
NIHRNU-T	Ratos NIH heterozigotos
NOD	“ <i>non obese</i> diabetic”
OMS	Organização Mundial de Saúde
PO	Pós-operatório
PP	Polipeptídio Pancreático
RPMI	meio “Roswell Park Memorial Institute”
SD	Desvio padrão
SFB	Soro fetal bovino
SZT	Estreptozotocina
Taconic	“Quality Laboratory Animals and Services for Research”
TBS	Solução salina tris-tamponada
Tx	Transplante

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

I. INTRODUÇÃO 1

I.1. *Diabetes mellitus* - histórico 1

I.2. *Diabetes mellitus* - definição 3

I.3. Ilhotas de Langerhans 5

I.4. Transplante de ilhotas pancreáticas 7

I.5. Microencapsulamento..... 12

I.6. Modelos experimentais de *diabetes mellitus* 15

I.6.1. Modelos espontâneos de *diabetes mellitus*..... 15

I.6.2. Modelos de *diabetes mellitus* induzidos 16

II. OBJETIVOS 19

II.1. Objetivo geral..... 19

II.2. Objetivos específicos..... 19

III. MATERIAL e MÉTODOS	20
III.1. Ilhotas pancreáticas humanas	20
III.1.1. Isolamento e purificação	20
III.1.2. Teste de viabilidade morfológica	24
III.1.3. Teste de atividade funcional <i>in vitro</i>	24
III.2. Modelo animal de <i>diabetes</i> experimental	25
III.2.1. Indução de <i>diabetes</i> experimental	26
III.3. Análise da atividade funcional de ilhotas pancreáticas humanas <i>in vivo</i>	27
III.3.1. Transplante experimental	27
III.3.2. Transplante experimental de ilhotas pancreáticas humanas nuas	27
III.3.3. Transplante experimental de células nuas de insulinoma de rato (linhagem celular INS-1E)	29
III.4. Microencapsulamento	30
III.4.1. Produção de Biodritina	31
III.4.2. Produção de microcápsulas de Biodritina	31
III.4.3. Encapsulamento de ilhotas pancreáticas humanas	33
III.4.4. Teste de atividade funcional <i>in vitro</i> de ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas	34
III.4.5. Implante de microcápsulas vazias	35
III.4.6. Transplante de ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas	36
III.4.7. Transplante de células encapsuladas de insulinoma de rato (linhagem celular INS-1E)	36
III.5. Análise histológica	37
III.6. Imuno-histoquímica	38
III.6.1. Técnica de estreptavidina-biotina fosfatase alcalina	39

III.6.2. Análise dos resultados	40
III.7. Análise estatística	42
IV. RESULTADOS	43
IV.1. Ilhotas pancreáticas humanas	43
IV.1.1. Isolamento e purificação	43
IV.1.2. Teste de viabilidade morfológica	44
IV.1.3. Teste de atividade funcional <i>in vitro</i>	44
IV.2. Modelo animal de <i>diabetes</i> experimental	46
IV.2.1. Indução de <i>diabetes</i> experimental	46
IV.3. Transplante de ilhotas pancreáticas humanas nuas	46
IV.3.1. Análise da atividade funcional <i>in vivo</i> de ilhotas pancreáticas humanas	46
IV.3.2. Análise histológica do Tx ilhotas pancreáticas humanas nuas	52
IV.3.3. Imuno-histoquímica do Tx de ilhotas ilhotas pancreáticas humanas nuas	59
IV.3.3.a. Insulina e glucagon	62
IV.3.3.b. Linfócitos T	63
IV.3.3.c. Macrófagos	64
IV.3.3.d. Miofibroblastos	66
IV.4. Transplante de células nuas de insulinoma de rato (linhagem celular INS-1E)	67
IV.5. Microencapsulamento	71
IV.5.1. Produção de microcápsulas de Biodritina	71
IV.5.2. Encapsulamento de ilhotas pancreáticas humanas	74

IV.5.2.1. Teste de atividade funcional <i>in vitro</i> de ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas.....	74
IV.5.2.2. Avaliação <i>in vivo</i> de microcápsulas.....	77
IV.5.2.2a. Implante de cápsulas vazias	77
IV.5.2.2b. Transplante de ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas.	83
IV.5.2.2c. Transplante de células encapsuladas de insulinoma de rato (linhagem celular INS-1E) ..	85
 V. DISCUSSÃO	 87
 VI. CONCLUSÕES	 102
 VII. ANEXOS	 104
 VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 125

Curriculum vitae

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento do isolamento e atividade funcional <i>in vitro</i> de ilhotas....	45
Tabela 2: Resultados obtidos com o transplante de ilhotas pancreáticas humanas nuas em ratos <i>nude</i>	48
Tabela 3: Dados referentes ao transplante de ilhotas pancreáticas humanas realizado na veia porta.....	50
Tabela 4: Resumo dos resultados obtidos com transplante de ilhotas pancreáticas nuas	52
Tabela 5: Estudo imuno-histoquímico em ratos transplantados e no grupo controle	60
Tabela 6: Transplante de células INS-1E em ratos <i>nude</i> e imunocompetentes .	68
Tabela 7: Resumo dos resultados do transplante de células INS-1E nuas	69
Tabela 8: Atividade funcional <i>in vitro</i> de ilhotas pancreáticas humanas nuas <i>versus</i> ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas	76
Tabela 9: Implante de cápsulas de Biodritina: características dos receptores e das cápsulas implantadas.....	79
Tabela 9a: Resumo da análise histológica do implante de cápsulas vazias de Biodritina	81
Tabela 10: Resultados obtidos com Tx de ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas em ratos <i>nude</i> e em ratos imunocompetentes	84
Tabela 11: Resultados do Tx de células INS-1E encapsuladas	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais etapas de isolamento e purificação de ilhotas	23
Figura 2: Infra-estrutura para produção de microcápsulas de Biodritina	32
Figura 3: Preparação de ilhotas pancreáticas humanas	43
Figura 4: Fotomicrografia de fluorescência de ilhota pancreática humana	44
Figura 5: Tx de ilhotas pancreáticas humanas na veia porta	51
Figura 6: Fígado do rato Wistar transplantado com ilhotas humanas	53
Figura 7: Fígado de rato do grupo com reversão do <i>diabetes</i>	54
Figura 8: Fígado de rato com reversão parcial do <i>diabetes</i>	55
Figura 9: Fígado de rato sem reversão do <i>diabetes</i> com fibrose	56
Figura 10: Fígado de rato sem reversão do <i>diabetes</i> com trombose	56
Figura 11: Fígado de rato com óbito pós-Tx	57
Figura 12: Fígado de rato controle	57
Figura 13: Fígado de rato “sham” diabético	58
Figura 14: Expressão de insulina no tecido hepático de ratos <i>nude</i>	62
Figura 15: Linfócitos T em espaço porta de rato <i>nude</i>	63
Figura 16: Macrófagos em tecido hepático de rato <i>nude</i>	65
Figura 17: Expressão de α -actina no tecido hepático de rato <i>nude</i>	66
Figura 18: Insulinoma em peritônio subparietal de rato <i>nude</i>	70
Figura 19: Modelos de gotejadores	71
Figura 20: Cápsula de Biodritina com diâmetro de 800 μm	72
Figura 21: Cápsulas de Biodritina com diâmetro de 250 μm e 320 μm	73
Figura 22: Cápsulas de Biodritina com diâmetro variando entre 300 μm e 500 μm	73
Figura 23: Ilhotas pancreáticas nuas pré e pós-encapsulamento	74

Figura 24: Fígado de rato nude com implante de cápsulas vazias de Biodritina ultra pura.....	82
Figura 25: Músculo abdominal de rato imunocompetente com implante de cápsulas vazias de Biodritina ultra pura.....	82

RESUMO

Diabetes mellitus tipo 1 resulta da produção insuficiente ou da ausência de insulina, decorrente da destruição de células β , por mecanismo auto-imune. O tratamento deste tipo de *diabetes* consiste na administração subcutânea de insulina exógena.

Recentemente, foi demonstrado que o transplante de ilhotas pancreáticas é capaz de tornar o portador de *diabetes* tipo 1 independente de insulina exógena. Apesar do sucesso alcançado, a necessidade permanente de imunossupressão é uma das principais barreiras para que o transplante de ilhotas possa ser realizado em número maior de pacientes. Assim, o desenvolvimento de novas metodologias que evitem a rejeição do enxerto, como o macro e o microencapsulamento de ilhotas, continua sendo crucial para o estabelecimento definitivo do transplante de ilhotas como opção terapêutica no tratamento de *diabetes* tipo 1.

Neste trabalho, foi padronizado um modelo animal para avaliar, *in vivo*, a funcionalidade das ilhotas pancreáticas humanas isoladas e purificadas na Unidade de Ilhotas Pancreáticas Humanas do IQUSP. Ratos NIH *nude* foram tornados diabéticos através de injeção de estreptozotocina para o implante de ilhotas pancreáticas humanas nuas e microencapsuladas. As ilhotas foram microencapsuladas em Biodritina, um novo heteropolissacarídeo patenteado e cedido ao nosso laboratório, tendo sido possível padronizar a produção de microcápsulas uniformes e homogêneas, com tamanho médio entre 400 μ m e 600 μ m.

A reversão do *diabetes* ocorreu em 24% dos ratos *nude* transplantados com ilhotas pancreáticas humanas nuas. Por outro lado, não observamos reversão do *diabetes* quando ilhotas encapsuladas foram implantadas, apesar do teste de atividade funcional realizado *in vitro* ter demonstrado que elas continuam a secretar insulina e a responder ao estímulo com glicose após o encapsulamento. Para elucidar este efeito, cápsulas vazias foram implantadas em ratos *nude* e em ratos imunocompetentes, os quais desenvolveram processo inflamatório acompanhado de processo fibrótico no local do implante. Estudo imuno-histoquímico está sendo realizado para esclarecer a natureza e a intensidade destes processos.

S U M M A R Y

Type 1 *diabetes mellitus* results from insufficient or absence of insulin production, as a consequence of destruction of pancreatic β cells, by an auto-immune mechanism. Treatment for this type of *diabetes* consists of subcutaneous administration of exogenous insulin.

Recently, it has been demonstrated that pancreatic islet cell transplantation is capable of rendering type I diabetic patients independent of exogenous insulin. However, in spite of the success achieved, permanent immunosuppression is still required, being the main barrier to expand this treatment to a large number of patients. Therefore, development of new technologies, such as islet macro and microencapsulation to avoid rejection of the tissue implanted, is still crucial for definitive establishment of islet transplantation as a therapeutic alternative for type I *diabetes*.

In the present work, an animal model was established for *in vivo* evaluation of the functional ability of human pancreatic islets, which were isolated and purified at the Human Pancreatic Islet Unit of the University of São Paulo Chemistry Institute. *Diabetes* was induced in NIH *nude* rats through streptozotocin injection followed by implantation of naked or microencapsulated human pancreatic islets. Biodritin, a new and patented heteropolysaccharide was used to microencapsulate the islets. The production of uniform and homogeneous microcapsules with diameters in the range of 400 μ m e 600 μ m was successfully established.

Reversion of *diabetes* occurred in 24% of the *nude* rats transplanted with human pancreatic islets. On the other hand, no reversion of *diabetes* was observed when encapsulated islets were implanted, although their functional activity *in vitro* indicated that they secreted insulin and responded to glucose stimulation upon encapsulation. In order to elucidate this effect, empty capsules were implanted in *nude* rat and in immunocompetent rats, both of which developed an inflammatory process accompanied by a fibrotic process in the site of the implant. Immunohistochemical studies are underway to address the nature and the intensity of these inflammatory processes.

I. INTRODUÇÃO

I.1. *Diabetes mellitus* – histórico

As primeiras referências ao *diabetes* foram encontradas nos Papirus de Erbs no ano 1500 a.C., onde os egípcios descreveram remédios para combater a eliminação excessiva de urina. Neste mesmo ano, indianos relataram que a urina de alguns doentes atraía insetos e moscas, pelo seu sabor adocicado. Entretanto, a primeira descrição clínica da doença foi realizada por Celsus no século I d.C. No século seguinte, Araeteus da Capadócia usou o termo *diabetes* para designar a doença. Este termo, que em grego significa sifão, foi utilizado por Araeteus, porque a eliminação excessiva de urina, característica da doença, recordava-lhe a drenagem da água através de um sifão. Já o adjetivo *mellitus* foi acrescentado no século XVIII por Cullen (ITR, 2004).

No período de 1813 a 1900 d.C., Claude Bernard teorizou que o *diabetes mellitus* era causado pela quebra do glicogênio armazenado no fígado, enquanto, L. Traube relatou que a ingestão de carboidratos aumentava a quantidade de açúcar na urina. Em 1869, Paul Langerhans descreveu a existência de células epitelióides distribuídas no tecido interacinar do pâncreas, que posteriormente foram denominadas de ilhotas de Langerhans. Finalmente, em 1889, Mering & Minkowski comprovaram a origem pancreática do *diabetes*, tornando cachorros diabéticos após remoção cirúrgica do pâncreas e propuseram que o pâncreas era crucial para o metabolismo da glicose. Além disso, patologistas observaram ilhotas

pancreáticas danificadas em pessoas que morreram por causa de *diabetes* grave (ITR, 2004).

Em 1913, Schaefer conclui que as de ilhotas de Langerhans eram responsáveis pela produção de uma substância capaz de atuar no metabolismo da glicose e propôs para a mesma a denominação de insulina (do latim *insula*, ilha). Entretanto, a existência desta substância só foi comprovada em 1921 por John Macleod, Frederick Banting e seu aluno Charles Best. Estes pesquisadores da Universidade de Toronto obtiveram extratos pancreáticos de cães saudáveis e injetaram em cães diabéticos, restaurando a normoglicemia. Posteriormente, passaram a utilizar pâncreas de fetos bovinos e, com a colaboração de James Collip, obtiveram uma formulação razoavelmente pura de insulina. Então, em janeiro de 1922, Leonard Thompson, um adolescente portador de *diabetes mellitus* grave, tornou-se a primeira pessoa a receber uma injeção de insulina e melhorou drasticamente. Pela descoberta da insulina, Macleod e Banting receberam o prêmio Nobel de Medicina em 1923 (ITR, 2004).

Em 1955, Frederick Sanger seqüenciou totalmente a insulina e ganhou um prêmio Nobel em 1959. Uma vez conhecida a seqüência de uma proteína, é possível recriá-la sinteticamente. Assim, em 1963, a insulina tornou-se a primeira proteína sintetizada em laboratório. Em 1978, com o advento da tecnologia do DNA recombinante, foi produzida a primeira insulina humana recombinante. Este produto foi disponibilizado comercialmente no início dos anos 80 e revolucionou o tratamento do *diabetes*, substituindo, quase que totalmente, as insulinas suína e bovina.

Em 1996, a *Food and Drug Administration* aprovou o primeiro análogo de insulina humana recombinante de ação ultra-rápida (ITR 2004).

Com a insulinoterapia, o nível de glicose no sangue pode ser controlado e a sobrevida dos pacientes diabéticos aumentou. No entanto, observou-se que a terapêutica com insulina, em muitos casos, não previne o aparecimento de complicações secundárias, tais como retinopatia, nefropatia, neuropatia e vasculopatia. Frente a esta situação, o nível glicêmico alterado destes pacientes foi associado com o aparecimento destas complicações, tornando-se, necessária a busca por novas terapias que permitissem controlar melhor a glicemia em pacientes diabéticos.

1.2. ***Diabetes mellitus* – definição**

Atualmente, sabe-se que o *diabetes mellitus* (DM) compreende um grupo de doenças, clínica e geneticamente heterogêneo, que apresenta como característica comum níveis elevados de glicose no sangue, além de distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas provocados pela produção ou ação deficiente da insulina. Esta síndrome é classificada como: DM do tipo 1, DM do tipo 2, DM gestacional e outros tipos específicos de *diabetes*, que incluem *diabetes* secundário ou associado a outras patologias (para revisão, Aita, 2002).

O DM tipo 1 é uma doença crônica caracterizada por hiperglicemia e glicosúria que, se não controlados, podem levar ao coma e à morte. Acomete preferencialmente crianças, adolescentes e adultos jovens. Fatores genéticos e ambientais, além de fenômenos auto-imunes, são responsáveis

pela etiopatogenia do DM tipo 1. A doença evolui com diversas complicações clínicas, desde descompensações metabólicas agudas até complicações crônicas envolvendo diferentes órgãos, levando a nefropatia, retinopatia e neuropatia diabéticas (Christie, 1992; EASD, 1996; Kaczorowski *et al.*, 2002; Winter & Schatz, 2003).

O DM tipo 2, inicialmente classificada como DM independente de insulina, afeta, principalmente, indivíduos com idade superior a 40 anos que apresentam algum grau de obesidade. É uma doença de etiopatogenia complexa e pouco definida, na qual a resistência à insulina combinada com uma relativa deficiência de insulina produzem hiperglicemia. Na maioria dos casos, a insulinoterapia não é necessária na fase inicial da doença (Titus *et al.*, 2000; Miedema, 2003).

De acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), o *Diabetes Mellitus* pode afetar, atualmente, 150 milhões de pessoas no mundo e a projeção para o ano de 2025 é de 300 milhões de diabéticos. Este crescimento deverá ocorrer principalmente às custas de um aumento expressivo no número de doentes nos países em desenvolvimento (King *et al.*, 1998). No Brasil, a população de diabéticos deverá aumentar dos 6 milhões atuais para cerca de 12 milhões, dos quais 5 a 10% serão portadores de DM tipo 1 e 90% portadores de DM tipo 2, sendo a maioria constituída por mulheres com idade entre 45 a 64 anos (Ministério da Saúde; 1996; King *et al.*, 1998).

I.3. Ilhotas de Langerhans

As ilhotas de Langerhans representam aproximadamente 1 a 2% da massa total do pâncreas humano e apresentam um núcleo central constituído por células β secretoras de insulina, circundadas por células α produtoras de glucagon, δ , produtoras de somatostatina e PP, produtoras de polipeptídios pancreáticos (Ashcroft & Ashcroft, 1992).

As ilhotas pancreáticas desempenham um papel importante no controle hormonal do metabolismo energético, uma vez que a atividade antagônica do glucagon e da insulina é determinante para a regulação homeostática dos níveis de glicose no sangue. O glucagon atua no fígado estimulando a quebra do glicogênio em moléculas de glicose que são imediatamente lançadas na circulação sangüínea. Já a insulina age na membrana plasmática celular, facilitando o transporte das moléculas de glicose do meio extra para o intracelular, diminuindo assim a glicemia (Philippe, 1991).

Além de promover a captação da glicose sangüínea, a insulina também estimula a síntese de ácidos graxos a partir da acetilcolina e participa do metabolismo das proteínas, aumentando a taxa de iniciação da síntese protéica e diminuindo a taxa de formação de uréia (Newsholme *et al.*, 1992). A ausência ou a produção insuficiente de insulina, decorrente da destruição de células β , resulta em DM tipo 1 (Christie, 1992).

O tratamento do DM tipo 1 consiste na administração subcutânea de insulina exógena. A manutenção de níveis estáveis de glicemia através de

monitorização e terapia intensivas tem sido correlacionada com uma menor incidência de complicações agudas e crônicas (EASD, 1996; Titus *et al.*, 2000). Entretanto, a terapêutica insulínica é considerada incômoda pela maioria dos pacientes devido ao rigor necessário para manter níveis plasmáticos de glicose estáveis, induzindo freqüentemente episódios de hipoglicemia. Além disso, o controle dos níveis de glicemia através do uso de insulina tem se mostrado ineficaz na manutenção da normoglicemia (EASD, 1996; Calafiore, 1997; Titus *et al.*, 2000).

Para restaurar o controle fisiológico da glicemia e tornar o portador de DM tipo 1 independente de insulina, as alternativas são: transplante (Tx) de pâncreas órgão total ou Tx de ilhotas de Langerhans (London *et al.*, 1994; Secchi *et al.*, 1997; Kaczorowski *et al.*, 2002; Guignard *et al.*, 2004). A realização de Tx de pâncreas aumentou a partir da década de 80, devido ao aprimoramento dos procedimentos cirúrgicos e da disponibilidade de novas drogas imunossupressoras (Calafiore, 1997; Secchi *et al.*, 1997; Mamode & Sutherland, 2003). Até 2003, foram reportados ao *International Pancreas Transplant Registry* (IPTR) mais de 19.600 transplantes, sendo a maioria (73%) realizada nos Estados Unidos da América. No mesmo período foram registradas taxas de sobrevida de um ano para o enxerto pancreático de 78 a 83% e para o paciente de 95 a 98% (Mamode & Sutherland, 2003; Guignard *et al.*, 2004; IPTR, 2004).

O pâncreas transplantado é capaz de secretar insulina imediatamente após sua revascularização, induzindo completa independência de insulina exógena (Mamode & Sutherland, 2003; Paul,

2004). Todavia, o implante do órgão total, além de ser uma cirurgia com diversas complicações clínicas e cirúrgicas, requer terapia imunossupressora intensiva e contínua, o que implica em sua indicação praticamente exclusiva a pacientes que necessitam de transplantes de outros órgãos (London *et al.*, 1994; Secchi *et al.*, 1997; Serup *et al.*, 2001; Paul, 2004).

O transplante de ilhotas pancreáticas apresenta inúmeras vantagens em relação ao transplante do órgão total, dentre elas: uma menor massa de tecido enxertado, procedimento de implante menos invasivo e mais seguro, além da possibilidade de imunomanipulação *in vitro* do enxerto, visando diminuir sua antigenicidade (London *et al.*, 1994; Calafiore & Basta, 1995; Fraga *et al.*, 1998; de Vos *et al.*, 2002; King *et al.*, 2003). Entretanto, o transplante de ilhotas pancreáticas encontra-se ainda em fase experimental.

1.4. Transplante de ilhotas pancreáticas

A primeira tentativa de transplante clínico em pacientes com *diabetes* data do século XIX. Em 1894, Williams implantou fragmentos de pâncreas de ovelha em uma criança diabética de 15 anos. Esta foi a primeira descrição de xenotransplante em humanos (White & Nicholson, 1999). Até 1972, nenhum tipo de Tx realizado com sucesso, em animais ou em humanos, havia sido descrito, quando Ballinger e Lacy reportaram que ilhotas de ratos normais implantadas em ratos com *diabetes* induzido por estreptozotocina, revertiam o *diabetes*.

No final dos anos 70, foram descritos os primeiros autotransplantes e alotransplantes (alo-Tx) de ilhotas pancreáticas realizados com sucesso em humanos (Sutherland *et al.*, 1980; London *et al.*, 1994). Os primeiros casos de sucesso de alo-Tx de ilhotas pancreáticas em portadores de DM foram relatados em 1977 na Universidade de Minnesota. Nove pacientes receberam uma suspensão de ilhotas no sangue portal, simultaneamente ou após transplante renal. Dois deles permaneceram normoglicêmicos por dois e cinco dias, respectivamente. Um segundo registro, em Zurique em 1978, descreveu que de sete pacientes que receberam ilhotas pancreáticas simultaneamente à realização de transplante renal, um caso permaneceu oito meses sem necessidade de insulina exógena (London *et al.*, 1994).

Em 1988 foi introduzida uma técnica automatizada para o isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas humanas, que tornou possível a obtenção de um grande número de ilhotas viáveis (Ricordi *et al.*, 1988; Ricordi & Rastellini, 1995). Com a introdução desta nova metodologia, em 1989 pode ser demonstrada a independência de insulina exógena, por um período superior a 300 dias, em pacientes com DM tipo 1 e em pacientes com câncer abdominal, nos quais o *diabetes* era resultante de hepatopancreatectomia para retirada do tumor (Tzakis *et al.*, 1990).

O número total de Tx de ilhotas pancreáticas, realizado nos diversos centros mundiais, vem sendo compilado pelo Registro Internacional de Transplante de Ilhotas (ITR), com sede na Universidade Justus-Liebig, Giessen, Alemanha. Relatórios do ITR mostram que desde 1894 até dezembro de 2000 foram registrados 733 procedimentos (240

autotransplantes e 493 alotransplantes), sendo a maioria realizada a partir do ano de 1990. Com relação aos 240 autotransplantes, 55% (132) foram realizados nos anos 90. Entre eles, 57 foram acompanhados com rigor durante um ano após a realização do Tx, sendo que 27 (47%) permaneceram independentes de insulina ao final do período de acompanhamento (ITR, 2001).

Com relação aos 493 alotransplantes realizados em pacientes portadores de DM tipo 1, um ano após a realização do Tx, apenas 40 (8%) permaneceu independente de insulina. A análise de um subgrupo composto por 237 transplantados entre 1990 e 2000 mostrou que um ano após a realização do transplante, 173 pacientes (73%) apresentavam níveis basais de peptídeo C superiores a 0,5 ng/mL, sendo que 25 deles (11%) não necessitavam de insulina exógena (ITR, 2001).

Até o ano de 2000, o sucesso do transplante de ilhotas pancreáticas era limitado uma vez que a porcentagem de transplantes que resultava em produção de insulina de longa duração era pequena, cerca de 8 a 10 % de todos os casos relatados. A análise de trabalhos publicados permitiu constatar que o fracasso do transplante ocorria, na maioria dos casos, imediatamente após ou durante o primeiro mês do pós-operatório. As causas que determinavam a falência do enxerto não eram totalmente reconhecidas, mas podiam incluir um implante numérico e/ou funcional inadequado, autoimunidade ou rejeição precoce. Contudo, os resultados obtidos indicavam que era possível manter normoglicemia por longos períodos, após transplante de ilhotas pancreáticas.

Para que o enxerto de ilhotas pudesse apresentar melhores resultados era preciso transpor algumas dificuldades técnicas inerentes ao isolamento e purificação de ilhotas de Langerhans. Sabe-se, por exemplo, que a fase de digestão do pâncreas pela colagenase é crucial: a utilização de enzimas de boa qualidade pode liberar ilhotas intactas e inteiramente livres de ácidos, fator essencial para uma purificação eficiente em gradiente de densidade. Após a digestão, a purificação de ilhotas é uma etapa particularmente importante para o sucesso do transplante, pois quanto maior o grau de pureza das preparações, mais seguro é o procedimento de implante, uma vez que a injeção de preparações impuras está associada à hipertensão portal e a ocorrência de trombose na veia porta, com conseqüente perda do enxerto (White *et al.*, 2001). Assim, na década de 90, foram introduzidas algumas modificações técnicas no procedimento de isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas humanas. Como por exemplo, o desenvolvimento e a utilização de uma colagenase especial, a Liberase[®], altamente purificada e contendo baixíssimos níveis de endotoxinas bacterianas (Linetsky *et al.*, 1995). A introdução de uma câmara especial para a perfusão da colagenase no pâncreas com pressão e temperaturas controladas (Lakey *et al.*, 1999). Além disso, a purificação do tecido digerido passou a ser realizada através de um gradiente contínuo de Ficoll em baixa temperatura (4°C).

No ano de 2000, na Universidade de Alberta no Canadá, com a utilização de um novo protocolo de isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas, que incorporou as alterações descritas anteriormente e

utilizando um novo e potente esquema imunossupressor, além de excluir corticosteróides, que são drogas diabetogênicas Shapiro e colaboradores transplantaram ilhotas de excelente viabilidade em sete portadores de DM tipo 1 e obtiveram independência de insulina em todos os pacientes transplantados (Shapiro *et al.*, 2000). Após a divulgação dos resultados desse novo protocolo, que passou a ser conhecido como Protocolo de *Edmonton*, muitos centros iniciaram programas de transplante de ilhotas (White *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2002; Ault, 2003; Hering *et al.*, 2004).

Um estudo internacional com o objetivo de reproduzir os resultados do protocolo de *Edmonton* vem sendo realizado em nove centros de Tx de ilhotas coordenados pela *Immune Tolerance Network*, patrocinado pela *US National Institutes of Health and The Juvenile Diabetes Research Foundation*. Até o momento, foram transplantados 36 pacientes com DM tipo 1 e metade tornou-se independente de insulina exógena (Shapiro *et al.*, 2003). Nos 75 procedimentos realizados com o protocolo de *Edmonton* nas Universidades de Alberta, Minnesota e Miami, que possuem centros de excelência em transplante de ilhotas, após um ano da realização do Tx, 85% dos transplantados não necessitavam de insulina exógena para manter glicemia normal e após dois anos, 75% permaneciam insulino-independentes (Shapiro & Ricordi, 2004). Estes resultados demonstram que o sucesso do transplante de ilhotas pancreáticas depende, principalmente, da obtenção de ilhotas viáveis, de um regime imunossupressor apropriado e da perícia médica na seleção e acompanhamento dos pacientes.

Além da transposição das dificuldades técnicas discutidas anteriormente, o desenvolvimento de novas estratégias para prevenir a rejeição ao enxerto ainda é crucial para o estabelecimento definitivo do transplante de ilhotas de Langerhans como opção terapêutica no tratamento do DM. Dentre estas novas estratégias merece destaque o encapsulamento das ilhotas pancreáticas, procedimento criado para envolver grupamentos (*clusters*) celulares ou ilhotas individualizadas, com o objetivo de realizar alo-Tx de ilhotas com esquemas de imunossupressão menos agressivos (Calafiore & Basta, 1995; Secchi *et al.*, 1997; Titus *et al.*, 2000; White *et al.*, 2001; Berney, *et al.*, 2002; de Vos *et al.*, 2002; King *et al.*, 2003).

1.5. Microencapsulamento

A existência de uma barreira física entre o material implantado e o hospedeiro não apenas oferece imunoproteção ao enxerto, como também atenua a ação de fatores potencialmente adversos às estruturas transplantadas que possam estar presentes no local do implante (Calafiore & Basta, 1995; Calafiore, 1997; de Vos *et al.*, 2002).

Macro e microencapsulamento são os procedimentos criados para desenvolver dispositivos que possam envolver enxertos de *cluster* celulares ou de ilhotas individualizadas, protegendo-os do ataque de células do sistema imune. O princípio metodológico consiste em revestir ilhotas com uma membrana artificial homogênea e semi-permeável, que não comprometa sua integridade morfológica e funcional (Calafiore, 1997). Assim, a membrana deve ser permeável às substâncias de baixo peso

molecular, tais como nutrientes, eletrólitos, oxigênio, insulina e glicose, mas impermeável a linfócitos e a outros elementos efetores da resposta imune (Calafiore, 1997)

Para o macroencapsulamento, tem sido descrito a utilização de câmaras de difusão fabricadas com membranas produzidas a partir de polímeros de cloreto de vinila e de acrilonitrila (Lanza *et al.*, 1995) implantadas em regiões intra ou extravasculares (de Vos *et al.*, 2002; King *et al.*, 2003). Este método tem se mostrado eficiente para prevenir rejeição na ausência de imunossupressão, em transplantes alogênicos e xenotransplantes entre roedores (Lanza *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2003). Entretanto, existem restrições ao macroencapsulamento devido a ocorrência de acidentes vasculares que têm sido associados ao procedimento (King *et al.*, 2003).

O primeiro Tx de ilhotas encapsuladas realizado em humanos foi descrito apenas em 1994. Um paciente com DM tipo 1 ficou independente de insulina exógena por um período superior a nove meses, pós-Tx de ilhotas microencapsuladas na cavidade peritoneal realizado com imunossupressão (Soon-Shiong *et al.*, 1994). Desde então, nenhum outro caso foi descrito, até que recentemente, em 2004 Calafiore comunicou a realização do primeiro Tx de ilhotas pancreáticas humanas microencapsuladas sem imunossupressão, em um paciente com DM tipo 1 na Itália. Após dois meses da realização do Tx, o paciente não apresentou efeitos colaterais, continua em insulino-terapia, mas utilizando doses de insulina exógena inferiores às utilizadas pré-Tx. Este trabalho confirma a viabilidade do Tx de ilhotas

microencapsuladas na ausência de imunossupressão. Entretanto ainda é muito recente e deve ser acompanhado com rigor.

O reagente básico utilizado na construção de microcápsulas é o alginato, um polissacarídeo extraído de algas marinhas. Na metodologia empregada, uma suspensão de ilhotas e alginato de sódio é processada em um gerador de microgotas. Estas microgotas são subsequenteiramente transformadas em microesferas gelatinosas. A porosidade destas microesferas impede a entrada de imunoglobulinas e de células mediadoras do sistema imune, mas permite a passagem de micro e macro solutos indispensáveis à vida e à atividade funcional das ilhotas. Para tanto, o número de células e o volume da solução de alginato de sódio devem ser determinados com exatidão. Para garantir uma população de microcápsulas homogênea, é importante que sua produção seja semi-automatizada (Calafiore & Basta, 1995; Calafiore, 1997).

Em 1980 Lim & Sun descreveram o primeiro Tx intraperitoneal de ilhotas de ratos microencapsuladas com reversão do *diabetes* em cinco ratos imunocompetentes. Desde então, vários pesquisadores vem descrevendo o sucesso de alo ou xeno Tx de ilhotas pancreáticas microencapsuladas na reversão de *diabetes* induzido por estreptozotocina em diversos modelos animais (Lum *et al.*, 1991; Lum *et al.*, 1992; Berney & Ricordi, 1999; Duvivier-Kali *et al.*, 2001, King *et al.*, 2003).

I.6. Modelos experimentais de *diabetes mellitus*

Os modelos experimentais de DM utilizados para avaliação funcional de transplantes de ilhotas pancreáticas nuas e/ou encapsuladas são modelos espontâneos ou induzidos por drogas sintéticas. Nos dois casos existe um predomínio do uso de roedores como receptores do enxerto (Fan *et al.*, 1990; Fritschy *et al.*, 1991; Lanza *et al.*, 1991; Lum *et al.*, 1992; Eizirik *et al.*, 1997; Hayek & Beattie, 1997; Yang *et al.*, 1997).

I.6.1. Modelos espontâneos de *diabetes mellitus*

Camundongos NOD (*non obese diabetes*) e ratos BB (*BioBreeding rats*) são exemplos de animais portadores de DM similar ao DM humano de etiologia auto-imune. Modelos experimentais como estes vêm sendo usados para demonstrar que o transplante de ilhotas pancreáticas livres ou encapsuladas pode reverter o *diabetes*, além de proteger células β da destruição auto-imune, no caso de implante encapsulado (Fan *et al.*, 1990).

Macacos *cynomologus* também são exemplos de modelo espontâneo. Sun e colaboradores (1996) descreveram que estes animais desenvolveram *diabetes* em cativeiro com idade entre 3 e 12 anos e tornaram-se normoglicêmicos por até 803 dias após xenotransplantes de ilhotas encapsuladas.

1.6.2. Modelos de *diabetes mellitus* induzidos

A metodologia empregada para indução do *diabetes* pode ser cirúrgica, através da retirada do pâncreas (pancreatectomia) ou por intermédio de administração de drogas sintéticas (Fan *et al.*, 1990; Fritschy *et al.*, 1991; Lum *et al.* 1992; Eizirik, *et al.*, 1997; Hayek & Beattie, 1997; Yang *et al.*, 1997).

Na indução química a droga mais usada é a estreptozotocina (SZT) (Lanza *et al.*, 1991; Fritschy *et al.*, 1991; Lum *et al.*, 1992; Hayek & Beattie, 1997; Yang *et al.*, 1997). A SZT quebra o DNA desencadeando a ativação da ADP-poli-ribose sintetase, o que provoca uma depleção letal de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD) nas células β . Além disso, o metabolismo intracelular da SZT produz óxido nítrico, o que provoca uma precipitação adicional de fitas de DNA lesadas. Quarenta e oito horas após a injeção de SZT, um *diabetes* grave, dependente de insulina e caracterizado histologicamente por necrose de células β e infiltração de macrófagos é observado (Yang & Wright Jr, 2002). Os animais mais utilizados nos ensaios de indução de *diabetes* experimental são os roedores. Dentre eles podemos citar os ratos: Lewis (Lanza *et al.*, 1991; Lanza *et al.*, 1993); Albino Oxford (Fritschy *et al.*, 1991) e NIH *nude*, (Hayek & Beattie, 1997) e também camundongos: Balb/c (Lum *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1997); *nude* Swiss (Eizirik *et al.*, 1997) e *nude* C57BL/6 [nu/nu] (Eizirik *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997).

A indução do DM é realizada na maioria dos experimentos 10 dias antes da realização do transplante, com uma dose única e intravenosa de

SZT. A quantidade de droga injetada varia de acordo com peso do animal. Por exemplo, para ratos Lewis (225 - 300g) doses de 42 mg/Kg (Lanza *et al.*, 1991; Lanza *et al.*, 1993) e para Albinos Oxford (280 - 320g), 75 mg/Kg tem sido empregadas (Fristchy *et al.*, 1991). Nos modelos com camundongos BALB/c (20 - 25g) são necessárias doses mais elevadas, como 200 mg/Kg injetadas por via intravenosa (Yang *et al.*, 1997) e intraperitoneal (Lum *et al.*, 1992). Os animais são considerados diabéticos quando apresentam níveis plasmáticos de glicose superiores a 400 mg/dL persistentes por no mínimo duas semanas (Fristchy *et al.*, 1991; Lanza *et al.*, 1991; Lum *et al.*, 1992; Lanza *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1997), acompanhado de perda de peso e poliúria (Fristchy *et al.*, 1991).

Nos modelos com animais atímicos (Hayek & Beattie, 1997; Eizirik *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997), camundongos e ratos devem ser mantidos em gaiolas isoladas em ambiente semi-estéril. Camundongos *nude* C57BL/6 [nu/nu] com peso entre 20 e 25g têm um quadro diabético induzido através de injeção intravenosa de aloxana (80 mg/Kg) três a cinco dias antes do transplante (Eizirik *et al.*, 1997), ou por intermédio de SZT (175 mg/Kg) (Yang *et al.*, 1997). Enquanto que em ratos NIH *nude* de seis semanas e peso entre 120 - 200g, o *diabetes* é induzido com uma dose de SZT intravenosa de 70 mg/Kg, no mínimo duas semanas antes do transplante (Hayek & Beattie, 1997). Estes animais, camundongos e/ou ratos, só podem ser considerados aptos à cirurgia quando apresentam glicemia superior a 400 mg/dL (Eizirik *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997).

A indução de *diabetes* com SZT em camundongos NIH Swiss *nude* resulta em alta mortalidade (Hayek & Beattie, 1997). Comprovada também na fase inicial deste projeto. Por este motivo, ratos NIH *nude* foram utilizados como modelo animal de *diabetes* desenvolvido no presente trabalho, para que ilhotas pancreáticas humanas isoladas e purificadas por nossa equipe fossem ser testadas *in vivo*.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo geral

- Estabelecer um modelo animal para transplante de ilhotas pancreáticas humanas e avaliação *in vitro* de ilhotas pancreáticas humanas nuas e microencapsuladas.

II.2. Objetivos específicos

- a. Isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas humanas a partir de pâncreas de doadores cadavéricos.
- b. Análise da atividade funcional *in vitro* das ilhotas humanas isoladas e purificadas.
- c. Análise de atividade funcional *in vivo* através de transplante experimental de ilhotas pancreáticas humanas nuas em modelo animal, utilizando ratos imunodeficientes.
- d. Produção e caracterização de microcápsulas de Biodritina.
- e. Microencapsulamento de ilhotas pancreáticas humanas e análise da atividade funcional *in vitro* das ilhotas microencapsuladas.
- f. Análise da atividade funcional *in vivo* de ilhotas pancreáticas humanas microencapsuladas através de transplante experimental em modelo animal.
- g. Análise histológica do implante e avaliação do processo inflamatório no sítio de implante de ilhotas nuas e microencapsuladas.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Ilhotas pancreáticas humanas

III.1.1. Isolamento e purificação

As ilhotas pancreáticas humanas foram obtidas a partir de pâncreas de doador cadáver após consentimento informado e seguindo as normas da Central de Transplantes da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Para a seleção de doadores foram utilizados os seguintes critérios: ausência de história familiar de *diabetes mellitus*, idade superior a 18 anos, glicemia inferior a 200 mg/dL, amilase menor que 85 UI/L, uso de dopamina ausente ou em doses inferiores a 15 mg/Kg/min e tempo de isquemia fria do órgão menor que 8 horas. Para a seleção dos doadores, foram ainda incluídos os critérios de sorologias negativas para HIV, HTLVII/III, hepatites B e C, citomegalovírus, doença de Chagas e sífilis e história negativa para alcoolismo crônico ou intoxicação por álcool.

Os pâncreas foram retirados pelos cirurgiões que fazem parte da Equipe Multidisciplinar de Transplante de Ilhotas Pancreáticas Humanas, através de técnica cirúrgica convencional para retirada de pâncreas para transplante de órgão total. Após a retirada, foram imersos em frasco estéril contendo solução de preservação (Viaspan, Du Pont Pharma, DE, EUA) e encaminhados a Unidade de Ilhotas Pancreáticas Humanas do IQ-USP. O isolamento e a purificação de ilhotas foi realizado segundo a técnica descrita por Ricordi e colaboradores (1988), com as alterações introduzidas pelo

grupo da Universidade de Alberta, de Edmonton, Canadá (Shapiro *et al.*, 2000), como descrito a seguir.

Inicialmente, o pâncreas foi dissecado para remoção de gordura peri-pancreática, sem danificar a cápsula pancreática. Em seguida, foi realizada a introdução de uma cânula flexível (Introcan, calibre 18G. Laboratórios B.Braun S/A, RJ, Brasil) no ducto pancreático principal, com a finalidade de realizar a perfusão da solução enzimática, uma solução de colagenase especial, chamada Liberase HI (1,43 mg/mL) (Roche Diagnostics Corporation, IN, EUA). A perfusão foi realizada em uma câmara desenvolvida na Universidade de Alberta, denominada câmara de perfusão, sob pressão (80 mmHg durante os 5 minutos iniciais e 180 mmHg nos 5 minutos finais) e temperatura (4°C) controladas.

Após a perfusão da enzima, o pâncreas foi cortado em aproximadamente 10 pedaços para realizar a digestão da matriz colágena e, assim, promover a separação entre as ilhotas e o tecido exócrino pancreático. Os fragmentos foram colocados na câmara de digestão ou câmara de Ricordi, sob agitação, com temperatura controlada (37°C) e recirculação da solução enzimática (0,6 mg/mL) através de bomba peristáltica (Masterflex, Cole-Parmer Instrument Co, IL, EUA), durante aproximadamente 20 a 25 minutos. No interior desta câmara, foi colocada uma tela contendo poros de 500 µm de diâmetro, que permitiam que o tecido pancreático, já digerido, pudesse recircular juntamente com a solução enzimática, enquanto os fragmentos de tamanho maior ficavam retidos na câmara. Durante esta etapa, a monitoração da digestão foi realizada colhendo-se amostras de material, as quais foram submetidas à coloração

com solução de difeniltiocarbazona (ditizona) (Sigma Chemical Co, MO, EUA), que cora os átomos de zinco nas células β das ilhotas, onde estes encontram-se complexados à insulina. Ao atingir uma separação adequada entre as ilhotas e o tecido exócrino, a digestão foi interrompida por resfriamento, diluição e adição de albumina humana (LFB Laboratoire - Courtaboeuf, França) ao sistema. O material resultante desta digestão foi lavado com meio de cultura MEM (Invitrogen Corporation, NY, EUA), centrifugado (250 x g por 1 minuto, a 4°C) para remoção da solução enzimática e submetido a um processo de purificação, por centrifugação em gradiente contínuo de Ficoll (densidade: 1100 a 1077)(Biochrom AG - Berlin, Alemanha), utilizando o processador de células COBE 2991 (Gambro BCT Inc, CO, EUA). As frações do gradiente, contendo as ilhotas foram recolhidas, lavadas em meio 199 (Invitrogen Corporation) para remoção do Ficoll e concentradas por centrifugação. A preparação final foi ressuspensa em meio 199 e amostras foram coradas com ditizona para contagem do número de ilhotas obtidas e avaliação do grau de pureza da preparação. A Figura 1 (quadros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) ilustra as principais etapas do processo de isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas humanas.

III.1.2. Teste de viabilidade morfológica

A análise de viabilidade morfológica das ilhotas foi realizada no dia seguinte ao isolamento, através de dupla coloração com iodeto de propídio 150 mM/L e laranja de acridina 290 mM/L (Sigma) que coram, respectivamente, células mortas (em vermelho) e células vivas (em verde), seguida de observação sob microscópio de fluorescência Nikon FluoPhot (Nikon Corporation - Tokyo, Japão) (Bank, 1988). Foram contadas 100 células (verdes + vermelhas) e foi determinado um escore de viabilidade de acordo com o número de células verdes observadas.

III.1.3. Teste de atividade funcional *in vitro*

A atividade funcional das ilhotas pancreáticas foi avaliada no dia seguinte ao isolamento e, em alguns casos, também após este período. Uma quantidade conhecida de ilhotas (500, 1.000 ou 2.000 IEQ - *Islet Equivalents*: termo utilizado para indicar a quantidade de ilhotas numa amostra, com o tamanho das ilhotas normalizado para 150 µm de diâmetro) foi incubada em meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen Corporation) contendo 2,8 mM de glicose (Sigma) e o mesmo número de ilhotas foi colocado em meio contendo alta concentração de glicose (11 mM ou 20 mM) durante 2 horas. Após este período, o sobrenadante das culturas foi recolhido para dosagem de insulina, que foi realizado por eletroquimioluminescência, no Laboratório CRIESP (São Paulo, SP, Brasil). O índice obtido, dividindo-se a produção de insulina em alta concentração de

glicose pelo valor obtido na presença de baixa concentração de glicose, foi utilizado para avaliação da viabilidade das ilhotas (Ricordi *et al.*, 1992).

III.2. Modelo animal de *diabetes* experimental

Para a realização dos experimentos, foram utilizados ratos NIH homozigotos (NIHRNU-M), ratos NIH heterozigotos (NIHRNU-T) e ratos Wistar. Os ratos NIH homozigotos são atímicos, tendo a produção de linfócitos T maduros bastante comprometida e ausência de resposta imune mediada por este tipo celular. Foram observados pela primeira vez em 1953 em uma colônia de ratos heterogênicos ("outbred line") mantida no "Rowett Research Institute", Escócia, Grã-Bretanha. Estes animais são caracterizados, fenotipicamente, pela ausência total ou parcial de pêlos (Rolstad, 2001). Por outro lado, os animais heterozigotos apresentam sistema imunológico e pelagem normais.

Os ratos da linhagem NIH são originários da expansão de matrizes adquiridas da Taconic – "Quality Laboratory Animals and Services for Research" (Germantown, NY, EUA) realizada no Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química da Universidade de São Paulo (FCF-IQ/USP), onde foram mantidos e manipulados a maioria dos animais. Entretanto, na fase inicial do projeto, alguns ratos *nude* foram adquiridos do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Além disto, alguns ratos Wistar foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina e mantidos no Biotério do Laboratório de Fisiopatologia Renal – LIM/16

(FMUSP), enquanto outros foram produzidos e manipulados no Biotério de Produção do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBUSP), o que ocorreu porque as instalações do Biotério da FCF-IQ/USP estavam sendo reformadas.

Toda a metodologia aplicada para o estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA. <http://www.cobea.org.br/index.htm>) e foi aprovada pela Comissão de Ética em Cuidados e uso Animal (CECUA) do IQ-USP. Nos diferentes biotérios, as três linhagens permaneceram em salas distintas e os ratos *nude* foram manipulados em condições “germ free”. Todos os animais foram alimentados com ração comercial padrão (NUVITAL, Curitiba, PR, Brasil) e água *ad libitum*.

III.2.1. Indução de *diabetes* experimental

A indução de *diabetes* foi realizada através de injeção endovenosa (EV) de estreptozotocina (SZT; Sigma) na dose de 65 mg/Kg na veia caudal. No momento da indução, os ratos estavam em jejum de, no mínimo 6 horas e anestesiados com 30 mg/Kg de pentobarbital sódico (Hypnol 3%, Cristália, SP, Brasil) intraperitonal. Após a indução, todos animais receberam solução de glicose 20% via oral durante 12 horas.

O *diabetes* foi caracterizado por hiperglicemia ≥ 300 mg/dL por um período igual ou superior a 3 dias. Para controle da indução de *diabetes*, a concentração de glicose sangüínea foi avaliada diariamente por reflectometria (Glicosímetro *Sensor Precision Plus*, *Medi Sense*, Abbott Laboratories, Illinois, EUA), sempre com os animais em jejum de, no mínimo

6 horas. A partir do diagnóstico estabelecido de *diabetes*, a avaliação passou a ser realizada 3 vezes por semana. Os ratos considerados diabéticos foram tratados com doses diárias de 10 a 15U/Kg de peso de insulina NPH-N (IOLIN, Biobrás, MG, Brasil). As injeções foram subcutâneas e realizadas entre 16 e 18 horas.

III.3. Análise da atividade funcional de ilhotas pancreáticas humanas *in vivo*

III.3.1. Transplante experimental

As modalidades contempladas foram: Tx de ilhotas pancreáticas humanas nuas e Tx de células de insulinoma de rato (células INS-1E) nuas. O Tx de células INS-1E foi realizado com o objetivo de estabelecer e padronizar a técnica cirúrgica utilizada no Tx de ilhotas pancreáticas humanas, servindo como grupo controle. Além disso, em alguns animais foi injetado apenas meio de cultura 199 sem vermelho fenol (Invitrogen Corporation), onde as ilhotas e/ou células foram ressuspensas. Os ratos submetidos a este último procedimento foram denominados ratos “sham”.

III.3.2. Transplante experimental de ilhotas pancreáticas humanas nuas

O Tx de ilhotas pancreáticas humanas foi realizado imediatamente após o isolamento ou em até 48 horas. Em outros casos, o Tx foi realizado mais tardiamente (após 4 a 9 dias) pois as ilhotas isoladas foram mantidas em suspensão ou em monocamada em meio CMRL (GIBCO BRL, MD, EUA) suplementado com HEPES 25 mM (Sigma) e soro fetal bovino 10% (SFB,

Cultilab, SP, Brasil). Para serem implantadas, as ilhotas foram ressuspensas em meio 199 sem vermelho fenol (Invitrogen Corporation). O número de ilhotas implantado variou de 10.000 a 920.000 IEQ/Kg de peso.

O transplante foi realizado em ratos diabéticos e os sítios do Tx foram: veia porta, cápsula renal esquerda e cavidade peritoneal. As cirurgias foram realizadas em mesa aquecida (BIOOFICINA Industria e Comércio de Aparelhos Laboratoriais, SP, Brasil) e todos os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg de peso) intraperitoneal. A técnica cirúrgica utilizada nos protocolos de Tx na veia porta foi: laparotomia mediana, rotação do mesentério para esquerda, visualização e punção da veia porta com cateter nº 25 (Scalp, Asepto B-D 25. Becton Dickinson Industrias Cirúrgicas Ltda., Minas Gerais, Brasil). As ilhotas ressuspensas, previamente, em meio de cultura 199 sem vermelho fenol (Invitrogen Corporation), foram injetadas lentamente, procurando-se exercer a menor pressão possível na veia porta. Ao final da infusão, foi realizada hemostasia com Gelfoam (Pharmacia Brasil Ltda., SP, Brasil) e sutura contínua em dois planos com fio catgut cromado 4-0 (CIRUMÉDICA, SP, Brasil).

Para o implante das células na cápsula renal, os ratos foram colocados em decúbito lateral direito para realização de incisão subcostal longitudinal, seguida de exploração da cavidade, identificação do polo renal inferior, injeção subcapsular das ilhotas com cateter nº 25 (Scalp, Asepto B-D 25) e sutura. Para o implante de ilhotas na cavidade peritoneal, os ratos foram colocados em decúbito dorsal, foi feita uma pequena incisão, de tamanho suficiente para introduzir a ponta de uma pipeta Pasteur. As

suturas foram contínuas e em dois planos com fio catgut cromado 4-0 (CIRUMÉDICA).

Em todos os experimentos, a insulinoterapia (10 a 15U/Kg de peso de insulina NPH/dia) foi realizada pré-Tx e indicada pós-Tx para animais com níveis glicêmicos ≥ 150 mg/dL até que um nível glicêmico inferior a este fosse atingido e mantido. Após a realização do Tx, os animais foram observados por um período de 15 a 30 dias.

III.3.3. Transplante experimental de células de insulinoma de rato (linhagem celular INS-1E) nuas

A linhagem celular INS-1E é uma linhagem de células beta secretora de insulina, que foi estabelecida a partir de cultura de células de insulinoma de ratos em presença de 2-mercaptoetanol. O tumor original foi induzido por Raios X e mantido por uma série de transplantes realizados em ratos NEDH (*New England Deaconess Hospital rats*). Estas células apresentam características morfológicas e funcionais semelhantes às células β presentes nas ilhotas pancreáticas, daí serem utilizadas como modelo em vários trabalhos que estudam os aspectos biológicos de células β (Asfari *et al.*, 1992).

As células INS-1E foram doadas pelo Dr Pierre Maechler (Division de Biochimie Clinique, Centre Medical Univers Michel-Servet, Switzerland) e mantidas em cultura em meio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com HEPES 25 mM, soro fetal bovino 5%, 2-mercaptoetanol 50 μ M (Sigma), piruvato de sódio 1mM, penicilina 100UI/mL e estreptomicina 100UI/mL. Para realizar o implante, as culturas foram tripsinizadas (tripsina 0,1% -

GIBCO) e as células foram ressuspensas em meio 199. O número de células implantado variou de $1,5 \times 10^3$ a 4×10^6 .

As cirurgias foram realizadas em ratos diabéticos e em ratos normoglicêmicos. Os sítios de Tx de células INS-1E foram veia porta, cápsula renal esquerda, cavidade peritoneal e peritônio sub-parietal. As técnicas cirúrgicas utilizadas foram as mesmas aplicadas no Tx de ilhotas pancreáticas humanas nuas. No implante de células INS-1E nuas no peritônio sub-parietal os animais foram colocados em decúbito dorsal para realização de uma pequena incisão abdominal, punção do sítio, com giro de 180° em torno do local puncionado e injeção simultânea da suspensão celular. A punção foi realizada com escalpe nº 25 (Asepto B-D 25) e a sutura, contínua em dois planos, com fio catgut cromado 4-0 (CIRUMÉDICA).

III.4. Microencapsulamento

Para a produção de microcápsulas utilizou-se Biodritina, um novo heteropolissacarídeo resultante da mistura entre alginato de sódio e sulfato de condroitina, descoberto e patenteado pelos Profs. Drs. Marcos Mares-Guia e Camillo Ricordi (1997). Um acordo de colaboração estabelecido entre a Unidade de Ilhotas Pancreáticas Humanas e o Prof. Dr. Mares-Guia garantiu o fornecimento de alginato e de condroitina para este projeto.

III.4.1. Produção de Biodritina

Na síntese da Biodritina, utilizou-se alginato e condroitina preparados e purificados pelo Prof. Dr. Mares-Guia, além de alginato comercial (Sigma), purificado no Laboratório, segundo uma adaptação da técnica descrita por Mares-Guia & Ricordi (1997). A mistura foi preparada na proporção de 80% de alginato de sódio e 20% de sulfato de condroitina (Biodritina 80:20), dissolvida em meio de cultura RPMI sem glicose (Cultilab) ou em NaCl 0,15 M e filtrada sob pressão de 3 a 4 Kg/cm². O polímero preparado a partir dos materiais doados foi chamado de Biodritina ultrapura, enquanto, o polímero preparado com o alginato comercial foi chamado de Biodritina pura.

A metodologia que envolve a produção e a purificação da Biodritina não será detalhada, pois foi submetida a um pedido de Patente (patente nº 540519-2004.1, "United States Patent and Trademark Office Application for Letters Patent") (Mares-Guia & Ricordi, 1997).

III.4.2. Produção de microcápsulas de Biodritina

A infra-estrutura utilizada para a produção de microcápsulas de Biodritina é composta por: gerador de cápsulas, bomba de seringa SP 500 JMS (JMS do Brasil, SP, Brasil), rotâmetro (Cole-Parmer, IL, EUA), cilindro de ar comprimido e coletor de cápsulas (Figura 2).

Figura 2. Infra-estrutura utilizada para a produção de microcápsulas de Biodritina, mostrando: a) bomba de seringa, b) gerador de cápsulas n^o2, c) coletor, d) rotâmetro.

Os parâmetros que determinam o tamanho e formato totalmente esférico da microcápsula são: o diâmetro interno da agulha do gerador de cápsulas, o fluxo da Biodritina na bomba de seringa, a pressão e vazão do ar no sistema e a distância de queda livre da Biodritina. A distância de queda livre é definida como a distância entre a agulha e a superfície da solução de cloreto de cálcio presente no interior do coletor de cápsulas. O único parâmetro que variou foi a vazão do ar (1,6 L/min a 2,5 L/min). Os demais parâmetros foram fixados em 0,4 mm (diâmetro da agulha), 19,2 mL/h (fluxo da Biodritina), 1 Kgf/cm² (pressão do ar) e 7,5 cm (distância de queda livre).

As microcápsulas foram produzidas de acordo com o seguinte protocolo: a Biodritina foi transferida para uma seringa, sem fazer bolhas. O fluxo da bomba de seringa foi calibrado e o fluxo de ar ajustado. A seguir, a distância da agulha à superfície da solução de cloreto de cálcio foi ajustada e o sistema ligado. A partir do momento em que as cápsulas de Biodritina começaram a sair da microagulha, foi injetado ar no sistema e cinco minutos foram marcados. Após este tempo, o coletor de cápsulas foi retirado e a incubação das cápsulas no cloreto de cálcio prosseguiu por mais cinco minutos. Após esta etapa de incubação no cloreto de cálcio, as cápsulas foram filtradas rapidamente, lavadas com NaCl 0,15 M e estocadas na mesma solução.

III.4.3. Encapsulamento de ilhotas pancreáticas humanas

Para o encapsulamento, um número conhecido de ilhotas mantidas em suspensão e/ou cultura, em meio CMRL suplementado com HEPES 25

mM e SFB 10% foi centrifugado durante 1 minuto a 800g. O sedimento foi lavado em meio RPMI contendo glicose 2,8 mM e ressuspendido em Biodritina em uma seringa que foi imediatamente conectada à bomba de seringa. Os parâmetros foram ajustados e o sistema ligado. A partir do momento em que as cápsulas começaram a sair da microagulha, o ar foi injetado no sistema e o protocolo transcorreu como descrito no item III. 4. 2 (Produção de microcápsulas de Biodritina). Em paralelo, um mesmo número de ilhotas foi ressuspendido em Biodritina, utilizando-se uma pipeta Pasteur e gotejado sobre a solução de cloreto de cálcio, procurando manter a mesma distância de queda livre (7,5 cm).

As cápsulas formadas foram mantidas no cloreto de cálcio durante 10 minutos e, a seguir, lavadas com NaCl. O sistema de encapsulamento com pipeta Pasteur foi denominado de sistema manual, enquanto o sistema de encapsulamento padrão, o qual utiliza bomba de seringa, foi denominado de sistema automático.

III.4.4. Teste de atividade funcional in vitro de ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas

As ilhotas encapsuladas (1.000 ou 2.000 IEQ) foram lavadas três vezes em NaCl e incubadas em RPMI com glicose 2,8 mM durante uma hora a 37°C. Após este período o sobrenadante foi coletado e substituído por RPMI glicose 20 mM de. As ilhotas retornaram à estufa por mais uma hora e após este tempo o sobrenadante foi coletado para dosagem de insulina, por eletroquimioluminescência no Laboratório CRIESp. O índice obtido dividindo-se a produção de insulina em alta concentração de glicose pelo

valor obtido na presença de baixa concentração de glicose, foi utilizado para avaliação da viabilidade das ilhotas (Ricordi *et al.*, 1992).

III.4.5. Implante de microcápsulas vazias

O implante de microcápsulas de Biodritina foi realizado em 31 ratos. No momento do implante, cinco receptores estavam diabéticos. Na data da indução do *diabetes*, todos estavam com idade igual ou superior a oito semanas, exceto um rato, que estava com quatro semanas. Os sítios do Tx foram o parênquima hepático, a cavidade peritoneal e a parede abdominal. Em ratos “sham” foi injetado apenas solução salina (NaCl 0,15 M), meio no qual as microcápsulas foram ressuspensas pré-implante.

A técnica cirúrgica utilizada para o implante de cápsulas no parênquima hepático foi: anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/Kg de peso) seguida de laparotomia mediana, rotação do mesentério para esquerda, visualização e punção do lobo superior esquerdo do fígado com agulha de calibre 25 G, hemostasia com Gelfoam e sutura contínua em dois planos. Para a realização do Tx na cavidade peritoneal e na parede abdominal, após a anestesia, os animais foram colocados em decúbito dorsal, fazendo-se uma pequena incisão abdominal pela qual as ilhotas foram injetadas, na cavidade peritoneal, utilizando-se pipeta Pasteur. Na parede abdominal, após a punção com agulha 25x10, foi realizado um giro de 180° em torno do local da punção para injeção da solução de cápsulas. Em todos os procedimentos, foi injetado 1 mL de solução cápsulas ressuspensas em solução salina (NaCl 0,15 M).

III.4.6. Transplante de ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas

O Tx de ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas foi realizado na cavidade peritoneal. Os animais foram anestesiados (50 mg/Kg de pentobarbital sódico) foi realizada uma pequena incisão no abdome e as ilhotas encapsuladas foram depositadas na cavidade peritoneal com auxílio de uma pipeta Pasteur. Em todos os procedimentos, foi injetado 1 mL de ilhotas encapsuladas ressuspensas em solução salina (NaCl 0,15 M), imediatamente pós-encapsulamento. Em ratos “sham” foi injetado apenas solução salina (NaCl 0,15 M).

III.4.7. Transplante de células de insulinoma de rato (linhagem celular INS-1E) encapsuladas

O Tx de células INS-1E encapsuladas foi realizado com o objetivo de estabelecer e padronizar a técnica cirúrgica utilizada no Tx de ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas, servindo como grupo controle.

As células foram mantidas em cultura em meio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com HEPES 25 mM, soro fetal bovino 5%, 2-mercaptoetanol 50 μ M (Sigma), piruvato de sódio 1 mM, penicilina 100UI/mL e estreptomicina 100UI/mL. Para realizar o implante, as culturas foram tripsinizadas (tripsina 0,1% - GIBCO) e as células foram ressuspensas em Biodritina pura e encapsuladas. O número de células encapsuladas foi de 4×10^6 /rato. O sistema de encapsulamento foi o automático e realizado como

já descrito no item III.4.3. (Encapsulamento de ilhotas pancreáticas humanas).

As células encapsuladas foram ressuspensas em solução salina (NaCl 0,15 M) e implantadas na parede abdominal de ratos *nude* e ratos imunocompetentes, imediatamente após o encapsulamento. Para o implante, os animais foram anestesiados e colocados em decúbito dorsal para realização de uma pequena incisão abdominal e punção do sítio do Tx. A punção foi realizada com agulha 25x10 e o material injetado girando a agulha em torno do local puncionado. O mesmo procedimento foi utilizado nas cirurgias realizadas em ratos “sham”.

III. 5. Análise histológica

A análise histológica foi realizada no fígado, rim e parede abdominal do grupo de animais transplantados e do grupo controle. O grupo controle incluiu animais que não foram submetidos a procedimentos cirúrgicos e ratos que foram inoculados com meio 199 sem vermelho fenol ou solução fisiológica (ratos “sham”). Este grupo foi subdividido em dois sub-grupos, o primeiro incluiu ratos normoglicêmicos e sem cirurgia e o segundo, ratos “sham” diabéticos. Os animais do grupo controle tinham a mesma idade, tendo sido acompanhados durante o mesmo período que os ratos do grupo transplantado.

Ao final de período de observação, alguns ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg/ intraperitoneal) e sacrificados para coleta dos diferentes tecidos. Os tecidos retirados foram fixados em

formaldeído 3,7% em solução tamponada e encaminhados ao Centro Integrado de Patologia do Hospital Beneficência Portuguesa (São Paulo, SP). As peças foram incluídas em parafina e os cortes submetidos às colorações de hematoxilina-eosina (HE) e Masson para avaliação da estrutura morfológica. Em todas as amostras submetidas à análise histológica, foi também realizado estudo imuno-histoquímico.

III.6. Imuno-histoquímica

A avaliação da função endócrina das ilhotas pancreáticas humanas foi investigada através da expressão de insulina e de glucagon. Para caracterizar a presença de processo inflamatório no local do implante de ilhotas pancreáticas e células INS-1E foram utilizados anticorpos monoclonais específicos para identificação de macrófagos e linfócitos T. Além disso, foi utilizado o anticorpo anti- α actina tendo como objetivo detectar miofibroblastos, componente celular envolvido no processo inflamatório crônico e na fibrinogênese.

Para a realização da imuno-histoquímica foram realizados cortes de 3 μ m de blocos de parafina. Antes da realização da técnica de imuno-histoquímica, as lâminas foram colocadas em estufa a 60°C por 30 minutos, para iniciar o processo de desparafinização. Após este período, passaram em três banhos de xilol, cada um com duração de nove minutos. Em seguida, o xilol foi substituído por concentrações decrescentes de etanol, etanol absoluto por cinco minutos (2 vezes) e etanol 96%, por três minutos

(2 vezes). Finalizado este processo, as lâminas foram lavadas em água destilada e imersas em solução salina Tris-tamponada (TBS).

Após a desparafinização, as lâminas foram submetidas à técnica do microondas, utilizada para aumentar a exposição antigênica, uma vez que durante o processo de parafinização pode ocorrer o “mascaramento” de antígenos no tecido, dificultando sua detecção. Para tanto, as lâminas foram imersas em tampão citrato (2,1g de ácido cítrico mono hidratado - Merck, Darmstadt, Alemanha - dissolvidos em água destilada para 1000 mL, pH 6,0) e levadas ao forno microondas (Sanyo, São Paulo, Brasil) com potência de 2.400 watts durante 15 minutos. As lâminas foram então resfriadas em água corrente e lavadas em água destilada para a retirada do tampão citrato, permanecendo posteriormente em TBS.

III.6.1. Técnica de estreptavidina-biotina fosfatase alcalina

As lâminas de tecidos incluídos em parafina foram submetidas a imuno-histoquímica através de método da estreptavidina biotina /fosfatase alcalina (Noronha *et al.*, 1993). Este método consiste, inicialmente, no bloqueio de avidina e biotina endógenas por 15 minutos e, posteriormente, no bloqueio antigênico inespecífico com soro não imune de cavalo (Vector, Burlingame, EUA), por 30 minutos. Após os bloqueios, os cortes foram incubados com anticorpos primários monoclonais: anti-insulina humana (1:20) (Zymed, CA, EUA), anti-monócito/macrófago de rato (1:200) (Serotec, Raleigh, EUA), anti-linfócito T de rato (1:50) (Harlan Sera-lab, Belton, Inglaterra), anti- α -actina de músculo liso de rato (1:800) (Sigma) e anticorpo

primário policlonal anti-glucagon humano (1:50) (Zymed). Todas as incubações foram realizadas durante uma noite a 4°C, em câmara úmida. No dia seguinte, as lâminas incubadas com anticorpos monoclonal ou policlonal foram tratadas com anticorpos secundários biotinilados anti-camundongo (Vector) e anti-coelho (Vector), respectivamente, sendo o tempo de incubação com o anticorpo secundário de 45 minutos. Após este período, os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina (Dako, Copenhagen, Dinamarca) por 30 minutos.

Para revelação da reação, os cortes foram incubados com uma solução composta por naftol AS-MX-fosfato (Sigma) diluído em dimetilformamida (Merck), acrescida de solução tris 0,1 M (Merck), levamisol 1 M (Sigma) e corante *fast red* (Dako). O levamisol foi usado para bloquear a fosfatase alcalina endógena. A revelação foi acompanhada ao microscópio óptico é interrompida com TBS. Após a revelação, as lâminas foram contracoradas com hemalumbre de Mayer (Merck), lavadas em água destilada e montadas com Glicergel (Dako), previamente aquecido.

O controle negativo do método foi realizado em todos os experimentos omitindo-se o anticorpo primário.

III.6.2. Análise dos resultados

O resultado da imuno-histoquímica foi avaliado em termos de identificação das células imuno-reativas e análise quantitativa das células positivas para cada uma das moléculas estudadas.

As contagens do número de células positivas para insulina, glucagon, macrófagos e linfócitos T foram realizadas ao microscópio óptico

(aumento de 400x), através da análise de 80 campos do corte histológico. O total de células positivas, coradas em vermelho, foi expresso em relação à área total da biópsia (número de células positivas/mm²). Para o cálculo do número de células positivas/mm² o número de células positivas/ campo foi multiplicado pelo fator de correção 5,096, previamente estabelecido. Este fator foi definido através do cálculo da área do campo do microscópio, que é equivalente à imagem vista através da objetiva. Para este cálculo foi utilizada uma escala micrométrica de 1 mm. O campo foi medido verticalmente e horizontalmente e a área circular foi calculada através da fórmula geométrica ($A=\pi.r^2$). Para o aumento da objetiva de 40x, a área obtida através do método citado acima foi de aproximadamente 0,19625 mm². Tomando como base o número representativo para o fator de correção ideal (número 1), efetuamos a divisão matemática 1 / 0,19625 chegando ao resultado do fator de correção de 5,096.

O método de contagem de pontos foi utilizado para quantificar os miofibroblastos através da marcação da proteína α -actina, encontrada nas células deste tipo celular. Este método consiste na contagem de pontos utilizando um microscópio acoplado a um monitor de vídeo com uma ocular graticulada de 110 pontos. Foram contados os pontos que correspondiam à área de presença de α -actina, analisando-se 25 campos consecutivos sob um aumento de 400x (Jepsen & Mortensen, 1979). Os resultados são fornecidos em porcentagem de α -actina do parênquima do órgão.

III.7. Análise estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (SD).

Foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism* V.2.0.1 para a realização dos testes e gráficos. Para as variáveis com distribuição normal foi aplicado o teste t de *Student* (com correção de *Welch*, quando necessário) para comparação entre os grupos estudados. O teste de *Kruskal-Wallis* (com correção de *Dunn*) foi aplicado para comparação de grupos quando a variável não apresentou distribuição normal (% de α -actina) e o teste exato de *Fisher* para comparar a sobrevida pós-Tx.

Para as análises foi adotado como estatisticamente significativo um nível descrito inferior a 0,05.

IV. RESULTADOS

IV.1. Ilhotas pancreáticas humanas

IV.1.1. Isolamento e purificação

Durante a realização do presente trabalho foram processados 104 pâncreas para o isolamento de ilhotas pancreáticas humanas. Até o ano de 2000, a técnica utilizada para o isolamento foi àquela desenvolvida por Ricordi e colaboradores (1988). A partir de novembro de 2000, foram introduzidas as modificações como descritas pelo grupo da Universidade de Alberta, em Edmonton, Canadá (Shapiro *et al.*, 2000). Estas modificações resultaram em preparações com maior rendimento (100.000 IEQ em média) e com ilhotas de melhor qualidade, tanto em atividade funcional como em morfologia (Figura 3).

Figura 3 – Preparação de ilhotas pancreáticas humanas coradas com ditizona (ilhotas em vermelho) (40x)

IV.1.2. Teste de viabilidade morfológica

Nas 104 preparações de ilhotas pancreáticas humanas a viabilidade morfológica foi superior a 80%. As preparações foram coradas com laranja de acridina, que cora células vivas em verde e com iodeto de propídeo, que cora células mortas em vermelho (Figura 4).

Figura 4 – Fotomicrografia de fluorescência de uma ilhota pancreática humana (200x)

IV.1.3. Teste de atividade funcional *in vitro*

Para a realização do presente trabalho, foram utilizadas ilhotas pancreáticas humanas provenientes de 15 isolamentos, com rendimento médio de 158.870 ± 51.713 IEQ.

O teste de atividade funcional *in vitro* foi realizado em 19 preparações e demonstrou que em 42% (8/19) destas preparações as ilhotas aumentaram a secreção de insulina em resposta à glicose (índice de estímulo ≥ 3). Sendo que em 75% (6/8) destas preparações, a secreção de

insulina triplicou ou aumentou cinco vezes e em 25% (2/8), o índice de estímulo foi igual a 10 (Tabela 1).

TABELA 1 - Resultados referentes ao rendimento e atividade funcional *in vitro* de ilhotas humanas

n°	Pâncreas	Rendimento (IEQ)	Condição das Ilhotas pancreáticas nuas durante o teste de atividade funcional	Secreção de insulina (µU/mL)		Índice de estímulo B/A
				[Gli] _{baixa} (A)	[Gli] _{alta} (B)	
1	P28/00	105.000	Ilhotas em suspensão por 24 horas	271	465	2
2	P29/00	NC	Ilhotas em suspensão por 24 horas	152	506	3
3	P10/01	102.000	Ilhotas em suspensão por 24 horas	1.062	804	1
4	P12/01	NC	Ilhotas em suspensão 6 dias	458	269	0,6
			Ilhotas em suspensão por 24 horas	196	196	1
5	P13/01	NC	Ilhotas em suspensão 4 dias	190	274	1
6	P02/02	132.400	Ilhotas em suspensão por 24 horas	3.289	3.2480	10
7	P04/02	236.500	Ilhotas em suspensão por 24 horas	320	935	3
8	P06/02	152.400	Ilhotas em suspensão por 24 horas	5.896	58.096	10
9	P07/02	173.800	Ilhotas em suspensão por 24 horas	854	4.412	5
10	P09/02	NC	Ilhotas aderidas (48h pós-isolamento)	620	3.207	5
11	P13/02	233.000	Ilhotas em suspensão por 48 horas	2.116	1.885	1
12	P14/02	175.000	Ilhotas em suspensão por 24 horas	1.919	7.086	4
			Ilhotas em suspensão por 48 horas	3.861	9.613	2
			Ilhotas em suspensão por 72 horas	4.092	4.369	1
13	P15/02	186.600	Ilhotas em suspensão por 24 horas	1.334	474	0,4
14	P01/03	92.000	Ilhotas em suspensão 6 dias	2.995	3.522	1
15	P13/03	NC	Ilhotas em suspensão 9 dias	282	8.41	3
			Ilhotas em suspensão 6 dias	486	3.64	1
média		158.870		1.600	6.831	3,0
SD		51.773		1.676	14.442	3,0

[Gli]: concentração de glicose
NC: Não foi contado

IV.2. Modelo animal de *diabetes* experimental

IV.2.1. Indução de *diabetes* experimental

A indução de *diabetes* experimental foi realizada em 209 ratos, com idade média de 8 ± 3 semanas e com glicemia média pré-indução de 102 ± 14 mg/dL. O *diabetes* foi caracterizado em 176 ratos (84%). Apenas oito animais (4%) não desenvolveram *diabetes*. Vinte e cinco ratos (12%) foram a óbito antes do diagnóstico de *diabetes*. A glicemia média nos ratos diabéticos ao diagnóstico foi 405 ± 77 mg/dL (Anexo 1).

IV.3. Transplante de ilhotas pancreáticas humanas nuas

IV.3.1. Análise da atividade funcional *in vivo* de ilhotas pancreáticas humanas

No protocolo de transplante de ilhotas pancreáticas humanas nuas foram incluídos 88 ratos, sendo que o Tx foi realizado em 67 ratos *nude* diabéticos (Anexo 2). O grupo de animais transplantados foi composto por 30 machos e 37 fêmeas, com idade média de 11 ± 4 semanas, pesando em média 175 ± 47 g e com glicemia pré-Tx de 354 ± 63 mg/dL. O número médio de ilhotas equivalentes implantado foi 23.696 ± 17.956 IEQ/Kg, sendo que o índice médio de estímulo destas ilhotas em presença de glicose foi de $5,0 \pm 4,0$. Os sítios de Tx foram a veia porta (n=46), a cápsula renal (n=9) e a cavidade abdominal (n=12).

O grupo controle foi constituído por 21 ratos *nude* (Anexo 2), 1 macho e 20 fêmeas, com idade média de 8 ± 4 semanas e peso médio igual

138 ± 34 g. O grupo controle foi subdividido em três subgrupos: ratos sham diabéticos (glicemia 445 ± 52 mg/dL), controle diabético (glicemia 237 ± 144 mg/dL) e controle não diabético (glicemia 97 ± 13 mg/dL).

Os animais transplantados foram separados em quatro grupos de acordo com o resultado do Tx: REVERSÃO total do *diabetes*, REVERSÃO parcial, sem reversão e óbito (Tabela 2). No grupo com REVERSÃO total do *diabetes*, a idade média foi 10 ± 2 semanas, sendo que 33.333 ± 28.967 IEQ/Kg. foram injetadas na veia porta (n=5) e na cavidade peritoneal (n=1). Nos ratos com REVERSÃO parcial, a idade foi 12 ± 1 semanas; foram implantadas 18.000 ± 2.168 IEQ/Kg, sendo n=4 na veia porta e n=1 na cápsula renal. No grupo sem reversão, de idade média 10 ± 4 semanas, 25.030 ± 18.000 IEQ/Kg foram injetadas na veia porta (n= 19), na cápsula renal (n=6) e na cavidade peritoneal (n=10). Finalmente, entre os animais que foram a óbito pós-Tx, foram injetadas na veia porta (n=18), na cápsula renal (n=2) e na cavidade peritoneal (n=1) 20.900 ± 16.520 IEQ/Kg.

TABELA 2 - Resultados obtidos com Tx de ilhotas pancreáticas humanas nuas em ratos NIH nude

nº	Ratos		Idade (semanas)	Tx			Análise histológica
	Identificação	IEQ/Kg	Destino	Índice de estímulo das ilhotas transplantadas	Sítio	Resultado	
1	R41F3	28x10 ³	P04/02	3	veia porta	REVERSÃO do diabetes	Processo inflamatório
2	R69/02	22x10 ³	P08/02	10	veia porta	REVERSÃO do diabetes	Espaço porta conservado
3	R62/02	20x10 ³	P08/02	10	veia porta	REVERSÃO do diabetes	Processo inflamatório
4	R88/02	21x10 ³	P07/02	5	veia porta	REVERSÃO do diabetes	Espaço porta: com grânulos celulares
5	R72/02	17x10 ³	P07/02	5	veia porta	REVERSÃO do diabetes	Espaço porta: com grânulos celulares
6	R71F4	92x10 ³	P01/03	3	cavidade peritoneal	REVERSÃO do diabetes	NR
média		33.333		6			
SD		28.867		3			
7	R39	16x10 ³	P02/02	10	veia porta	REVERSÃO parcial do diabetes	NR
8	R43F3	20x10 ³	P04/02	3	veia porta	REVERSÃO parcial do diabetes	Processo inflamatório
9	R69/02	21x10 ³	P07/02	5	veia porta	REVERSÃO parcial do diabetes	Processo inflamatório
10	R71/02	17x10 ³	P07/02	5	veia porta	REVERSÃO parcial do diabetes	Processo inflamatório
11	R53/02	20x10 ³	P08/02	10	cápsula renal	REVERSÃO parcial do diabetes	Nefrite intersticial crônica
média		18.000		7			
SD		2.188		3			
12	R21	24x10 ³	P29/00	3	veia porta	Sem reversão do diabetes	Processo inflamatório
13	R46	10x10 ³	P12/01	1	veia porta	Sem reversão do diabetes	NR
14	R47	10x10 ³	P12/01	1	veia porta	Sem reversão do diabetes	NR
15	R48	10x10 ³	P12/01	1	veia porta	Sem reversão do diabetes	Processo inflamatório
16	R50	10x10 ³	P12/01	1	veia porta	Sem reversão do diabetes	Processo inflamatório
17	R26F3	25x10 ³	P02/02	10	veia porta	Sem reversão do diabetes	NR
18	R31F3	12x10 ³	P02/02	10	veia porta	Sem reversão do diabetes	NR
19	R31	16x10 ³	P02/02	10	veia porta	Sem reversão do diabetes	NR
20	R32	15x10 ³	P02/02	10	veia porta	Sem reversão do diabetes	NR
21	R37	16x10 ³	P02/02	10	veia porta	Sem reversão do diabetes	NR
22	R45F3	28x10 ³	P04/02	3	veia porta	Sem reversão do diabetes	Fibrose
23	R62/02	20x10 ³	P08/02	10	veia porta	Sem reversão do diabetes	Processo inflamatório
24	R54/02	20x10 ³	P08/02	10	veia porta	Sem reversão do diabetes	Processo inflamatório
25	R66/02	23x10 ³	P07/02	5	veia porta	Sem reversão do diabetes	Processo inflamatório
26	R67/02	26x10 ³	P07/02	5	veia porta	Sem reversão do diabetes	Fibrose + Trombose
27	R28	20x10 ³	P13/02	1	veia porta	Sem reversão do diabetes	Processo inflamatório
28	R29	20x10 ³	P13/02	1	veia porta	Sem reversão do diabetes	Processo inflamatório
29	R30	20x10 ³	P13/02	1	veia porta	Sem reversão do diabetes	Congestão venosa
30	R31	20x10 ³	P13/02	1	veia porta	Sem reversão do diabetes	Congestão venosa
média		18.210		6			
SD		5.903		4			
31	R25F3	17x10 ³	P02/02	10	Cápsula renal	Sem reversão do diabetes	NR
32	R26F3	18x10 ³	P02/02	10	Cápsula renal	Sem reversão do diabetes	NR
33	R34	18x10 ³	P02/02	10	Cápsula renal	Sem reversão do diabetes	NR
34	R35	18x10 ³	P02/02	10	Cápsula renal	Sem reversão do diabetes	NR
35	R39	15x10 ³	P02/02	10	Cápsula renal	Sem reversão do diabetes	NR
36	R56/02	20x10 ³	P08/02	10	Cápsula renal	Sem reversão do diabetes	Normal
média		17.667		10			
SD		1.633		0			

Continuação da TABELA 2 - Resultados obtidos com Tx de ilhotas pancreáticas humanas nuas em ratos NIH nude

nº	Ratos		Tx					Análise histológica
	Identificação	Idade (semanas)	IED/Kg	Doador	Índice de estímulo das ilhotas transplantadas	Sítio	Resultado	
37	R ₃₈	7	30x10 ³	P14/02	4	cavidade peritoneal	Sem reversão do diabetes	NR
38	R ₃₉	7	30x10 ³	P14/02	4	cavidade peritoneal	Sem reversão do diabetes	NR
39	R ₃₅	7	30x10 ³	P14/02	4	cavidade peritoneal	Sem reversão do diabetes	NR
40	R ₃₆	7	30x10 ³	P14/02	4	cavidade peritoneal	Sem reversão do diabetes	NR
41	R ₃₇	7	30x10 ³	P14/02	4	cavidade peritoneal	Sem reversão do diabetes	NR
42	R ₄₈	6	30x10 ³	P15/02	0,4	cavidade peritoneal	Sem reversão do diabetes	NR
43	R ₄₉	6	30x10 ³	P15/02	0,4	cavidade peritoneal	Sem reversão do diabetes	NR
44	R ₅₀	6	30x10 ³	P15/02	0,4	cavidade peritoneal	Sem reversão do diabetes	NR
45	R _{69F4}	5	92x10 ³	P01/03	3	cavidade peritoneal	Sem reversão do diabetes	NR
46	R _{70F4}	5	92x10 ³	P01/03	3	cavidade peritoneal	Sem reversão do diabetes	NR
média		6	42.400		3			
SD		1	26.140		2			
média		10	25.030		5			
SD		4	18.000		4			
47	R ₂₀	9	15x10 ³	P29/00	3	vela porta	Óbito durante o Tx	NR
48	R ₃₅	22	17x10 ³	P12/01	1	vela porta	Óbito durante o Tx	NR
49	R ₃₈	17	20x10 ³	P12/01	1	vela porta	Óbito no PO-1	NR
50	R ₄₉	17	10x10 ³	P12/01	1	vela porta	Óbito no PO-1	Processo inflamatório + Trombose
51	R ₅₃	11	15x10 ³	P13/01	-	vela porta	Óbito imediatamente pós-Tx	Processo inflamatório + Trombose
52	R ₅₅	11	15x10 ³	P13/01	-	vela porta	Óbito imediatamente pós-Tx	Processo inflamatório + Trombose
53	R ₅₁	17	16x10 ³	P13/01	-	vela porta	Óbito imediatamente pós-Tx	Processo inflamatório + Trombose
54	R ₅₆	11	15x10 ³	P13/01	-	vela porta	Óbito imediatamente pós-Tx	Processo inflamatório + Trombose
55	R ₅₇	11	16x10 ³	P13/01	-	vela porta	Óbito imediatamente pós-Tx	Processo inflamatório + Trombose
56	R ₅₈	11	15x10 ³	P13/01	-	vela porta	Óbito imediatamente pós-Tx	Processo inflamatório + Trombose
57	R ₅₉	11	15x10 ³	P13/01	-	vela porta	Óbito imediatamente pós-Tx	Processo inflamatório + Trombose
58	R _{40F3}	12	20x10 ³	P04/02	3	vela porta	Óbito imediatamente pós-Tx	Processo inflamatório + Trombose
59	R _{41F3}	12	20x10 ³	P04/02	3	vela porta	Óbito imediatamente pós-Tx	Processo inflamatório + Trombose
60	R _{59/02}	11	20x10 ³	P03/02	10	vela porta	Óbito no PO-1	NR
61	R _{60/02}	11	20x10 ³	P03/02	10	vela porta	Óbito no PO-1	NR
62	R _{70/02}	12	20x10 ³	P07/02	5	vela porta	Óbito imediatamente pós-Tx	NR
63	R ₄₆	6	20x10 ³	P15/02	0,4	vela porta	Óbito imediato pós-Tx Sangramento	NR
64	R ₄₇	6	20x10 ³	P15/02	0,4	vela porta	Óbito imediato pós-Tx Sangramento	NR
média		12	17.170		3			
SD		4	2.936		4			
65	R _{42F3}	12	19x10 ³	P04/02	3	cápsula renal	Óbito imediatamente pós-Tx	NR
66	R _{61/02}	11	19x10 ³	P03/02	10	cápsula renal	Óbito no PO-2	Necrose tubular
67	R _{69F4}	5	92x10 ³	P01/03	3	cavidade peritoneal	Óbito no PO-1	NR
média		9	43.333		6			
SD		4	42.147		4			
média		12	20.900		4			
SD		4	16.520		4			

A taxa de reversão do *diabetes* foi de 24% (11/46), sendo que seis animais ficaram independentes de insulina exógena após o Tx, enquanto que em cinco receptores houve reversão parcial do *diabetes*.

O sítio de implante preferencial de ilhotas pancreáticas humanas nuas foi a veia porta (n=46). Os ratos com Tx na veia porta também foram subdivididos em quatro subgrupos de acordo com o resultado do transplante: REVERSÃO total do *diabetes*, REVERSÃO parcial, sem reversão e óbito (Tabela 3). A análise dos 46 ratos *nude* não mostrou diferenças significativas entre estes subgrupos em relação a idade, ao número de ilhotas equivalentes implantado e a resposta à glicose (índice de estímulo) nas diferentes preparações de ilhotas, testadas *in vitro* pré-Tx e injetadas na veia porta (Figura 5).

TABELA 3 – Dados referentes ao Tx de ilhotas pancreáticas humanas realizado na veia porta

Grupos	Idade média (semanas)	IEQ/Kg	Índice de estímulo
REVERSÃO total	11 ± 0,5	21.600 ± 1.805	7 ± 1,3
REVERSÃO parcial	12 ± 0,3	18.500 ± 1.190	6 ± 1,5
Sem reversão	12 ± 0,9	17.800 ± 1.349	5 ± 0,9
Óbito	12 ± 0,9	16.789 ± 755	3 ± 0,7

Figura 5 – Tx de ilhotas pancreáticas humanas na veia porta: avaliação da idade dos animais, IEQ/Kg e índice de estímulo nos diferentes grupos

Conforme apresentado na Tabela 4, a taxa de mortalidade foi de 31% (21/67). O maior número de óbitos ocorreu quando o sítio do Tx foi a veia porta (18/46). Entretanto, a taxa de óbitos nos três sítios de implante não foi significativamente diferente (veia porta x cápsula renal; $p=0,46$, veia porta x cavidade peritoneal; $p=0,08$ e cápsula renal x cavidade peritoneal; $p=0,55$) (Tabela 4).

TABELA 4 - Resultados obtidos com o Tx de ilhotas pancreáticas nuas

Sítio do Tx	n	Sobreviventes n	Reversão do diabetes		Óbitos n (%)
			Total	Parcial	
			n (%)	n (%)	
Veia porta	46	28	5 (18%)	4 (14%)	18 (39%)
Cápsula renal	9	7	0	1 (14%)	2 (22%)
Cavidade peritoneal	12	11	1 (9%)	0	1 (8%)
TOTAL	67	46	6 (13%)	5 (11%)	21 (31%)

IV.3.2. Análise histológica do Tx de ilhotas pancreáticas humanas nuas

A análise histológica foi realizada no sítio do implante de ilhotas pancreáticas humanas nuas de 33 ratos *nude* transplantados e de 11 dos 21 animais *nude* do grupo controle (ratos “sham” diabéticos e ratos normoglicêmicos não transplantados). Os resultados histológicos dos ratos

transplantados foram apresentados, resumidamente, na Tabela 2, e são descritos a seguir. Como controle positivo de rejeição aguda foram incluídos, extraordinariamente, 2 animais Wistar submetidos ao transplante de ilhotas pancreáticas humanas (Figura 6).

Figura 6 - Fígado de rato Wistar transplantado com ilhotas pancreáticas humanas. Espaço porta mostrando processo inflamatório intenso constituído por células mononucleares em torno de restos celulares (ilhotas?), compatível com rejeição aguda (HE, 250x)

No grupo de ratos com REVERSÃO total do *diabetes*, não foram observadas alterações em três ratos. O tecido estava bem conservado, sendo que alguns espaços porta apresentaram agrupamentos celulares que podem corresponder a ilhotas pancreáticas (Figura 7). Nos outros dois animais foi verificado processo inflamatório moderado caracterizado por células mononucleares.

Figura 7 – Fígado de rato do grupo com reversão do *diabetes*. Espaço porta com agrupamentos celulares de contorno esférico (sugestivo de ilhotas pancreáticas) (HE, 250x)

No parênquima hepático de 3 animais do grupo com REVERSÃO parcial do *diabetes* ocorreu processo inflamatório caracterizado por células mononucleares no espaço porta (Figura 8). Já no rato com Tx na cápsula renal, o diagnóstico histológico foi de nefrite crônica focal.

Figura 8 – Fígado de rato do grupo com reversão parcial do *diabetes*. Espaço porta com agrupamentos celulares (ilhotas?) desestruturadas, circundadas por algumas células mononucleadas (HE, 250x)

No terceiro grupo, sem reversão do *diabetes*, foram realizadas análises histológicas em 12 ratos com Tx na veia porta. Nestes casos, a histologia mostrou a presença de processo inflamatório em 8 casos (66%), congestão venosa em 2 animais (17%) e fibrose em 2 (17%) (Figura 9). Em um dos casos de fibrose, também foi observado trombose da veia porta (Figura 10). No rato com Tx em cápsula renal não foram observadas alterações histológicas.

Figura 9 – Fígado de rato do grupo sem reversão do *diabetes*. Espaço porta com intensa fibrose (Masson, 250x)

Figura 10 – Fígado de rato do grupo sem reversão do *diabetes*. Veia porta com trombose e áreas de fibrose ao redor de estruturas celulares desorganizadas (ilhotas?) (HE, 250x)

No grupo de animais transplantados que evoluíram para óbito pós Tx as alterações mais frequentes foram processo inflamatório e trombose (82%) (Figura 11).

Figura 11 – Fígado de rato que evoluiu para óbito logo após o transplante. Trombo celular intraportal (com ilhota?) (HE, 250x)

No grupo controle, a análise histológica do tecido hepático se mostrou normal em 2 de 6 ratos controles “sham” e em 2 de 5 ratos controles normoglicêmicos não transplantados (Figura 12).

Figura 12 - Fígado de rato controle. Espaço porta circundado por tecido hepático normal (HE, 250x)

Entretanto, foi observado processo inflamatório no tecido hepático em 7 dos 11 animais controle (64%), sendo 4/6 controles “sham” e 3/5 controles normoglicêmicos não transplantados. O processo inflamatório foi caracterizado por infiltrado de células mononucleares no espaço porta em todos os 7 animais, inclusive nos ratos não submetidos a nenhum processo cirúrgico. A figura 13 ilustra o processo inflamatório de um animal “sham” diabético.

Figura 13- Fígado de rato “sham” diabético. Espaço porta com processo inflamatório moderado e difuso (HE, 250x)

Em resumo, a análise histológica do tecido hepático dos ratos Wistar transplantados com ilhotas pancreáticas humanas nuas revelou a ocorrência de rejeição celular aguda. Por outro lado, em ratos *nude* não foram observadas alterações compatíveis com o diagnóstico de rejeição. No grupo controle (ratos “sham” diabéticos e ratos normoglicêmicos não

transplantados), a presença de processo inflamatório foi observada em 64% dos ratos *nude*.

IV.3.3. Imuno-histoquímica do Tx de ilhotas pancreáticas humanas nuas

Métodos de imuno-histoquímica foram realizados em cortes do tecido hepático de 29 ratos com Tx na veia porta e de 10 ratos do grupo controle. Os ratos transplantados foram reunidos em três grupos de acordo com o resultado do Tx: a) reversão do *diabetes*, incluindo os casos de reversão total e parcial (n=8); b) sem reversão do *diabetes* (n=12) e c) óbito pós-Tx (n=9). O grupo controle foi formado por ratos *nude* “sham” diabéticos (n=5) e ratos *nude* normoglicêmicos (n=5) nos quais não foi realizado nenhum tipo de procedimento cirúrgico nem indução de *diabetes* experimental (Tabela 5).

TABELA 5 - Estudo imuno-histoquímico: Resultados obtidos em ratos transplantados e no grupo controle

R#	Ratos	Tx		HISTOLOGIA	Insulina (cel./mm ²)	Glucose (mg/dl/mm ²)	Linfócitos T ⁺ (cel./mm ²)	Macrófagos (cel./mm ²)	Mitocondrion (%)
		Sítio	Resultado						
1	R5802 _{REL.3}	veia porta	Reversão do diabetes	Espaço porta: com grânulos celulares	0,1	0	3,4	25,6	0,2
2	R7202 _{REL.3}	veia porta	Reversão do diabetes	Espaço porta: com grânulos celulares	0,1	0	2,5	9,7	0,1
3	R5802 _{REL.3}	veia porta	Reversão do diabetes	Espaço porta conservado	1,1	0,4	3,9	4,8	1,8
4	R4402 _{REL.3}	veia porta	Reversão do diabetes	Processo inflamatório	0,3	0,7	4,6	7,5	2,2
5	R6202 _{REL.3}	veia porta	Reversão do diabetes	Processo inflamatório	0,1	0,1	3,1	4,0	0,7
6	R4302 _{REL.3}	veia porta	Reversão parcial do diabetes	Processo inflamatório	0,3	0,3	1,6	40,9	0
7	R6902 _{REL.3}	veia porta	Reversão parcial do diabetes	Processo inflamatório	1,0	0,4	2,6	8,4	0,1
8	R7102 _{REL.3}	veia porta	Reversão parcial do diabetes	Processo inflamatório	0,2	0,2	7,8	7,0	1,2
					média	0,4	3,7	13,5	0,8
					SD	0,4	1,9	13,0	0,8
9	R29 _{REL.4}	veia porta	Sem reversão do diabetes	Veias centro-lobulares: com grânulos celulares	0	0,3	7,3	31,1	0,4
10	R31 _{REL.4}	veia porta	Sem reversão do diabetes	Veias centro-lobulares: com grânulos celulares	0	0	0	8,8	0,7
11	R4502 _{REL.3}	veia porta	Sem reversão do diabetes	Fibrose	0	0,4	2,1	8,5	0,6
12	R6702 _{REL.3}	veia porta	Sem reversão do diabetes	Fibrose + Trombose	2,2	1,9	2,7	3,6	0,6
13	R5202 _{REL.3}	veia porta	Sem reversão do diabetes	Processo inflamatório	0	0	1,1	10,5	0,2
14	R28 _{REL.4}	veia porta	Sem reversão do diabetes	Processo inflamatório	0	0	7,0	21,7	0,4
15	R5402 _{REL.3}	veia porta	Sem reversão do diabetes	Processo inflamatório	0	0	0,9	6,6	0,2
16	R30 _{REL.4}	veia porta	Sem reversão do diabetes	Processo inflamatório	0	0	4,7	13,1	0,7
17	R6602 _{REL.3}	veia porta	Sem reversão do diabetes	Processo inflamatório	0	0	2,4	3,9	0,2
18	R21 _{REL.2}	veia porta	Sem reversão do diabetes	Processo inflamatório	0,3	0,3	1,4	5,8	0,1
19	R48 _{REL.2}	veia porta	Sem reversão do diabetes	Processo inflamatório	0	0,4	0,4	24,5	0,7
20	R50 _{REL.2}	veia porta	Sem reversão do diabetes	Processo inflamatório	0	0,4	2,6	21,5	0,5
					média	0,2	2,7	13,3	0,4
					SD	0,6	2,4	9,1	0,2
21	R4002	veia porta	Óbito imediato pós-implante	Congestão venosa	0	0,3	0,5	66,9	0,3
22	R53 _{REL.2}	veia porta	Óbito imediato pós-implante	Trombose + Processo inflamatório	0,7	0,2	6,4	13,0	0,8
23	R55 _{REL.2}	veia porta	Óbito imediato pós-implante	Trombose + Processo inflamatório	1,4	0	0,5	5,9	5,8
24	R56 _{REL.2}	veia porta	Óbito imediato pós-implante	Trombose + Processo inflamatório	0	1,7	1,6	15,5	0,2
25	R57 _{REL.2}	veia porta	Óbito imediato pós-implante	Trombose + Processo inflamatório	2,9	0,3	1,6	14,7	0
26	R58 _{REL.2}	veia porta	Óbito imediato pós-implante	Trombose + Processo inflamatório	2,7	0,8	3,6	10,6	0,6
27	R59 _{REL.2}	veia porta	Óbito imediato pós-implante	Trombose + Processo inflamatório	0	0	8,6	26,4	1,1
28	R51 _{REL.2}	veia porta	Óbito imediato pós-implante	Trombose + Processo inflamatório	0	0,9	1,1	40,6	0,5
29	R4102	veia porta	Óbito imediato pós-implante	Trombose + Processo inflamatório	0	0,1	2,3	81,0	0,1
					média	0,9	2,9	30,5	1,0
					SD	1,2	2,8	26,9	1,8

Continuação da TABELA 5 - Estudo imuno-histoquímico: Resultados obtidos em ratos transplantados e no grupo controle

IH	Ratos	Tx		RESULTADOS	HISTOLOGIA	Insulina (cél./mm ²)	Glucagon (cél./mm ²)	Linfócitos T ⁺ (cél./mm ²)	Macrófagos (cél./mm ²)	Mitocondriatos (%)
		Sítio								
30	C8	veia porta	rato sham diabético		Fígado histologicamente conservado	0	0	19,9	139,9	0,4
31	C5	veia porta	rato sham diabético		Parênquima hepático normal	0	0	11,6	150,8	0,6
32	C6	veia porta	rato sham diabético		Parênquima hepático normal	0	0	7,8	89,6	0,3
33	C7	veia porta	rato sham diabético		Processo inflamatório	0	0	15,3	113,3	0,5
34	R32 _{REL4}	veia porta	rato sham diabético		Processo inflamatório	0	0	17,8	107,8	0,5
					média	0	0	14,5	120,3	0,5
					SD	0	0	4,8	24,8	0,1
35	C14	Não Tx	não diabético, não induzido		Fígado histologicamente normal	0	0	7,5	142,6	0,4
36	C15	Não Tx	não diabético, não induzido		Fígado histologicamente normal	0	0	2,8	156,7	0,1
37	C16	Não Tx	não diabético, não induzido		Processo inflamatório	0	0	7,1	132,0	0,3
38	C17	Não Tx	não diabético, não induzido		Processo inflamatório	0	0	11,3	117,3	0,6
39	C18	Não Tx	não diabético, não induzido		Processo inflamatório	0	0	6,0	95,9	0,1
					média	0	0	7,0	128,9	0,3
					SD	0	0	3,1	23,4	0,2
					média do grupo CONTROLE	0	0	10,7	124,6	0,4
					SD do grupo CONTROLE	0	0	5,5	23,2	0,2

IV.3.3.a. *Insulina e glucagon*

A expressão de insulina (Figura 14) e de glucagon foi observada no espaço porta de vários animais submetidos ao Tx de ilhotas pancreáticas humanas. Não foram verificadas diferenças significativas na expressão de insulina e de glucagon entre os grupos de ratos transplantados neste estudo. Entretanto, no grupo que evoluiu com óbito foi observado uma expressão maior de insulina em relação aos demais grupos, embora estatisticamente não significativa (Tabela 5).

Figura 14 – Expressão de insulina no tecido hepático de ratos *nude* com: A) Reversão total do *diabetes*, B) Reversão parcial; C) Óbito pós-Tx (A e B, 400x; C, 100x)

IV.3.3.b. Linfócitos T

Poucos linfócitos T foram observados no tecido hepático de ratos *nude*. O número de linfócitos T observado no tecido hepático dos ratos com reversão de *diabetes* (Figura 15A e 15B) ($3,7 \pm 1,9$ células/mm²), no grupo sem reversão ($2,7 \pm 2,4$ células/mm²) e no grupo que foi a óbito pósTx ($2,9 \pm 2,8$ células/mm²) não diferiu significativamente. Entretanto, o número de linfócitos T no grupo controle foi significativamente maior do que nos ratos com reversão (Figura 15C e 15D) ($10,7 \pm 5,5$ células/mm²; $p < 0,0001$).

Figura 15 - Linfócitos T em espaço porta de rato *nude* com reversão total (A), com reversão parcial (B), normoglicêmico não transplantado (C) e "Sham" diabético (D) (A, B e D, 400x; C, 100x)

IV.3.3.c. Macrófagos

· Macrófagos foram detectados distribuídos pelo parênquima hepático (Figura 16A), veias centro-lobulares e espaço porta de todos os ratos transplantados, sendo que nos casos de óbito foram identificados em maior número no espaço porta (Figura 16B). No grupo transplantado, os animais com reversão do *diabetes* apresentaram $13,5 \pm 13,0$ macrófagos/mm², nos ratos sem reversão do *diabetes* foram observadas $13,3 \pm 9,1$ macrófagos/mm², enquanto naqueles que foram a óbito pós-Tx verificaram-se $30,5 \pm 26,9$ células/mm². Entretanto, entre estes subgrupos as diferenças não foram estatisticamente significativas.

No grupo controle, a distribuição dos macrófagos no tecido hepático foi uniforme. Não foram observadas diferenças significativas entre os ratos “sham diabéticos” ($120,3 \pm 24,8$ macrófagos/mm²) e normoglicêmicos não transplantados ($128,9 \pm 23,4$ macrófagos/mm²). Entretanto, o número de macrófagos observado no tecido hepático dos ratos controles foi significativamente maior do aquele visto nos subgrupos de ratos transplantados ($p < 0,001$) (Figura 16C e 16D).

Figura 16 – Macrófagos em tecido hepático de ratos *nude* com reversão parcial do *diabetes* (A), com óbito pós-Tx (B), “Sham” diabético (C) e normoglicêmico não transplantado (D) (A, B e D, 100x; C, 400x)

IV.3.3.d. Miofibroblastos (α -actina)

A expressão de α -actina foi observada em células da musculatura lisa vascular de veias centro-lobulares e veias porta em todos os ratos, não apresentando diferença significativa quanto a quantificação nos subgrupos analisados (Figura 17). Não foi observada a expressão de α -actina no parênquima hepático, nem em região peri portal.

Figura 17 – Expressão de α -actina no tecido hepático de ratos *nude*: A) Normoglicêmico não transplantado (400x), B) Sem reversão do *diabetes* (100x)

IV.4. Transplante de células nuas de insulinoma de rato (linhagem celular INS-1E)

Foram realizados 34 implantes de células INS-1E em 29 ratos NIH *nude* e cinco ratos imunocompetentes (NIH heterozigotos) (Anexo 3). O grupo de ratos *nude* foi formado por quatro machos e 25 fêmeas, com idade média de 13 ± 3 semanas, pesando em média 166 ± 39 g e com glicemia média pré-Tx de 267 ± 101 mg/dL. Nestes ratos foram implantadas $1,9 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^6$ células/rato em quatro sítios de implante: veia porta (n=15), cápsula renal (n=6), cavidade peritoneal (n=3) e peritônio subparietal (n=5). Entre os cinco ratos imunocompetentes, três eram machos e dois fêmeas, com idade média de 9 ± 1 semanas, pesando em média 193 ± 34 g e com glicemia média pré-Tx de 236 ± 124 mg/dL. No peritônio subparietal destes ratos foram injetadas 4×10^6 células/rato

Os resultados do implante de células INS-1E foram separados de acordo com o resultado do transplante e encontram-se descritos na Tabela 6. Entre os ratos *nude*, o Tx foi bem sucedido em 52% dos casos (15/29). A taxa de sucesso do implante foi de 100% na peritônio subparietal, 50% na cápsula renal, 47% na veia porta, enquanto nenhum enxerto realizado na cavidade peritoneal foi bem sucedido. Entre os ratos imunocompetentes, o Tx foi bem sucedido em 60% dos procedimentos realizados no peritônio subparietal (Tabela 6).

TABELA 6 - Resultados obtidos com o Tx de células INS-1E em ratos *nude* e em ratos imunocompetentes (NIH heterozigotos)

n°	Rato	linhagem	Sexo	idade (semanas)	Classificação	Peso (gramas)	Glicemia média (mg/dl)	n° de células Implantado/rato	sítio do transplante	Resultado do Tx	Data do sacrifício	Análise histológica
1	R ₀₂₃	NH <i>nude</i>	M	12	Diabético	234	316	750x10 ³	veia porta	Reversão do diabetes seguida de hipoglicemia	-	NR
2	R ₀₂₃	NH <i>nude</i>	M	12	Diabético	239	337	750x10 ³	veia porta	Reversão do diabetes seguida de hipoglicemia	-	NR
3	R ₁₀₃	NH <i>nude</i>	F	15	Diabético	173	320	2.000x10 ³	veia porta	Reversão do diabetes seguida de hipoglicemia	-	NR
4	R ₁₀₃	NH <i>nude</i>	F	12	Diabético	183	385	2.000x10 ³	veia porta	Reversão do diabetes seguida de hipoglicemia	-	NR
5	R ₀₂₃	NH <i>nude</i>	F	15	Hiperglicêmico	199	221	2.000x10 ³	veia porta	Reversão da hiperglicemia seguida de hipoglicemia	-	NR
6	R ₂₁₀₀	NH <i>nude</i>	F	9	Diabético	126	420	4.000x10 ³	peritônio subparietal	Reversão do diabetes seguida de hipoglicemia	PO-34	Insulinoma+Fibrose+Processo inflamatório
7	R ₂₁₀₀	NH <i>nude</i>	F	9	Diabético	120	340	4.000x10 ³	peritônio subparietal	Reversão do diabetes seguida de hipoglicemia	PO-34	Insulinoma+Fibrose+Processo inflamatório
8	R ₂₂₀₀	NH <i>nude</i>	F	9	Diabético	117	213	4.000x10 ³	peritônio subparietal	Reversão do diabetes seguida de hipoglicemia	PO-34	Insulinoma
9	R ₁₀₃	NH <i>nude</i>	F	16	Diabético	173	320	2.000x10 ³	cápsula renal	Reversão do diabetes seguida de hipoglicemia	-	NR
10	R ₁₀₃	NH <i>nude</i>	M	12	Diabético	261	250	750x10 ³	veia porta	Glicemia em queda a partir do PO-30 (sucesso)	-	NR
11	R ₀₂₃	NH <i>nude</i>	M	12	Diabético	247	272	750x10 ³	veia porta	Glicemia em queda a partir do PO-30 (sucesso)	-	NR
12	R ₀₂₃	NH <i>nude</i>	F	13	Diabético	159	304	1.000x10 ³	Re-Tx em cápsula renal	Reversão parcial do diabetes	-	NR
13	R ₂₁₀₀	NH <i>nude</i>	F	8	Normoglicêmico	126	124	4.000x10 ³	peritônio subparietal	Hipoglicemia (sucesso)	PO-34	Insulinoma
14	R ₂₂₀₀	NH <i>nude</i>	F	8	Normoglicêmico	124	99	4.000x10 ³	peritônio subparietal	Hipoglicemia (sucesso)	-	NR
15	R ₁₀₃	NH <i>nude</i>	F	16	Hiperglicêmico	164	112	2.000x10 ³	cápsula renal	Reversão da hiperglicemia e normoglicemia pós-nefroctomia	-	NR
16	R ₁₀₃	NH <i>nude</i>	F	10	Diabético	133	296	3x10 ³	veia porta	Sem reversão do diabetes	-	NR
17	R ₀₂₃	NH <i>nude</i>	F	10	Diabético	138	333	3x10 ³	veia porta	Sem reversão do diabetes	-	NR
18	R ₀₂₃	NH <i>nude</i>	F	10	Diabético	140	330	3x10 ³	veia porta	Sem reversão do diabetes	-	NR
19	R ₁₀₃	NH <i>nude</i>	F	16	Diabético	154	468	2.000x10 ³	veia porta	Sem reversão do diabetes	-	NR
20	R ₀₂₃	NH <i>nude</i>	F	13	Diabético	161	296	1.000x10 ³	Re-Tx em cápsula renal	Sem reversão do diabetes	-	NR
21	R ₀₂₃	NH <i>nude</i>	F	13	Diabético	154	272	1.000x10 ³	Re-Tx em cápsula renal	Sem reversão do diabetes	-	NR
22	R ₁₀₃	NH <i>nude</i>	F	19	Normoglicêmico	157	79	3.000x10 ³	cavidade peritoneal	Sem reversão do diabetes	-	NR
23	R ₀₂₃	NH <i>nude</i>	F	19	Normoglicêmico	165	95	3.000x10 ³	cavidade peritoneal	Sem reversão do diabetes	-	NR
24	R ₂₀₄	NH <i>nude</i>	F	19	Normoglicêmico	157	89	3.000x10 ³	cavidade peritoneal	Sem reversão do diabetes	-	NR
25	R ₁₀₃	NH <i>nude</i>	F	10	Diabético	125	333	3x10 ³	veia porta	Óbito pós-Tx	-	NR
26	R ₁₀₃	NH <i>nude</i>	F	12	Diabético	167	351	2.000x10 ³	veia porta	Óbito pós-Tx	-	NR
27	R ₂₀₀	NH <i>nude</i>	F	12	Diabético	180	251	2.000x10 ³	veia porta	Óbito pós-Tx	-	NR
28	R ₁₀₃	NH <i>nude</i>	F	12	Hiperglicêmico	143	222	2.000x10 ³	veia porta	Óbito pós-Tx	-	NR
29	R ₁₀₃	NH <i>nude</i>	F	16	Diabético	201	302	2.000x10 ³	cápsula renal	Óbito pós-Tx	-	NR
média							267					
SD							103					
30	R ₂₂₀₀	NH heterozigoto	M	8	Diabético	228	334	4.000x10 ³	peritônio subparietal	Reversão do diabetes seguida de hipoglicemia	PO-42	Insulinoma+Fibrose+Processo inflamatório
31	R ₂₁₀₀	NH heterozigoto	M	9	Diabético	213	350	4.000x10 ³	peritônio subparietal	Reversão do diabetes seguida de hipoglicemia	PO-42	Insulinoma
32	R ₂₁₀₀	NH heterozigoto	M	9	Diabético	211	293	4.000x10 ³	peritônio subparietal	Reversão do diabetes seguida de hipoglicemia	PO-42	Insulinoma
33	R ₂₂₀₀	NH heterozigoto	F	8	Normoglicêmico	158	95	4.000x10 ³	peritônio subparietal	Glicemia em queda a partir do PO-37 (sucesso)	PO-42	Insulinoma
34	R ₂₂₀₀	NH heterozigoto	F	8	Normoglicêmico	156	110	4.000x10 ³	peritônio subparietal	Manutenção da normoglicemia (SEM SUCESSO)	PO-42	Microabscesso
média							236					
SD							44					

Hiperglicemia: glicemia > 150 mg/dl porém menor que 300 mg/dl; Hipoglicemia: glicemia < 50 mg/dl; NR: não realizada

A taxa de mortalidade dos ratos *nude* submetidos ao Tx de células INS-1E foi de 17%, sendo que em quatro ratos as células foram injetadas na veia porta. Por outro lado, nenhum rato imunocompetente foi a óbito (Tabela 7).

TABELA 7 - Resultados obtidos com o Tx de células INS-1E nuas

Sítio do Tx	rato	n	Sobreviventes	Óbitos pós-Tx n (%)	Sucesso do Tx n (%)
Veia porta	<i>nude</i>	15	11	4 (27%)	7 (47%)
Cápsula renal	<i>nude</i>	6	6	1 (17%)	3 (50%)
Cavidade peritoneal	<i>nude</i>	3	3	0	0
Peritônio subparietal	<i>nude</i>	5	5	0	5 (100%)
Total		29	25	5 (17%)	15 (52%)
Peritônio subparietal	imunocompetente	5	5	0	3 (60%)

A análise histológica foi realizada em nove ratos com implante de células INS-1E no peritônio subparietal, sendo quatro ratos *nude* e cinco ratos imunocompetentes (Tabela 6). O insulinoma foi caracterizado em todos os ratos *nude* e em 80% dos ratos imunocompetentes (Figura 18). Além disso, foi observado, em dois ratos *nude* e em um rato imunocompetente, a presença de fibrose e processo inflamatório tipo corpo estranho, caracterizado por células gigantes multinucleadas.

No peritônio subparietal do rato imunocompetente, onde o insulinoma não foi caracterizado, foi verificado um processo inflamatório com exsudato de neutrófilos e grande quantidade de histiócitos, formando um microabcesso. A natureza dos processos inflamatórios e da fibrose nos casos de ratos *nude* e de ratos imunocompetentes não pode ser esclarecida uma vez que ainda não foi realizado o estudo imuno-histoquímico.

Figura 18 – Insulinoma em peritônio subparietal observado em rato nude (HE, 400x)

IV.5. Microencapsulamento

IV.5.1. Produção de microcápsulas de Biodritina

Para produzir cápsulas de Biodritina utilizamos três modelos de gotejadores (Figura 19). No modelo inicial, cortesia do Prof. Dr. Marcos Mares-Guia, o transporte de Biodritina da seringa até o gerador de cápsulas foi realizado através de um tubo de silicone. Denominamos este modelo de gerador nº 1. Nos modelos posteriores, desenvolvidos pelo Prof. Dr. José M.V. Martins (Instituto de Eletrotécnica e Energia da Universidade de São Paulo), o gerador de gotículas foi conectado diretamente à seringa. A diferença entre estes dois últimos protótipos reside na direção do fluxo do ar. No modelo nº 3 o ar foi direcionado para a ponta da agulha, o que não acontece no modelo nº 2.

Figura 19 – Gotejadores:
A) modelo nº 1
B) modelo nº 2
C) modelo nº 3

Nos experimentos realizados com o gerador nº 1, uma quantidade expressiva de Biodritina ficava retida na tubulação. No momento em que substituímos este gerador de cápsulas pelo gerador nº 2, esta perda foi eliminada. Entretanto, continuamos perdendo Biodritina nas paredes do tubo coletor. Este problema foi totalmente solucionado a partir da utilização do gerador nº 3.

A produção de microcápsulas foi realizada, majoritariamente, com os geradores nº 2 e nº 3, com agulha de 0,4 mm de diâmetro interno, fixando-se a pressão do ar em $1\text{Kg}/\text{cm}^2$; o fluxo da Biodritina em $19,2\text{ mL}/\text{h}$ e a distância de queda livre em 7,5 cm. O único parâmetro que variou foi a vazão do ar: $1,6\text{ L}/\text{min}$; $2,2\text{ L}/\text{min}$ e $2,5\text{ L}/\text{min}$. Fixando o fluxo do ar em $1,6\text{ L}/\text{min}$, o diâmetro das microcápsulas variou de $200\text{ }\mu\text{m}$ a $900\text{ }\mu\text{m}$, tendo a maioria $800\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro (Figura 20).

Figura 20 – Cápsula de Biodritina com diâmetro de $800\text{ }\mu\text{m}$.
Vazão de ar no sistema $1,6\text{ L}/\text{min}$ (40x)

Aumentando o fluxo do ar para 2,2 L/min e posteriormente para 2,5 L/min, o tamanho das cápsulas diminuiu. Foram produzidas microcápsulas esféricas com diâmetro, em sua maioria, entre 250 μm e 600 μm com 2,2 L/min (Figura 21) e com diâmetro entre 300 μm e 500 μm com vazão do ar em 2,5 L/min (Figura 22).

Figura 21 – Cápsulas de Biodritina com diâmetro de 250 μm e 320 μm . Vazão de ar no sistema de 2,2 L/min (40x).

Figura 22 – Cápsulas de Biodritina com diâmetro variando entre 300 μm e 500 μm . Vazão de ar no sistema de 2,5 L/min (40x)

IV.5.2. Encapsulamento de ilhotas pancreáticas humanas

Microcápsulas com diâmetro entre 400 µm e 600 µm, contendo de uma a duas ilhotas, foram produzidas fixando-se a vazão do ar em 2,2 L/min (Figura 23).

Figura 23 – Ilhotas pancreáticas nuas pré-encapsulamento (A e B, 40x) e pós-encapsulamento (C e D, 100x)

IV.5.2.1. Teste de atividade funcional *in vitro* de ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas

O teste de atividade funcional *in vitro* de ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas mostrou que as ilhotas continuavam secretando insulina após o encapsulamento (Tabela 8). A diferença entre o índice de estímulo das ilhotas encapsuladas ($1,6 \pm 0,3$) não foi estatisticamente

significante quando comparado com o índice de estímulo das ilhotas nuas ($2,2 \pm 1,8$).

No caso P09/02, quando expostas à glicose 20 mM, as ilhotas encapsuladas aumentaram a secreção em 5,7 vezes. Em três casos (P09/02, P14/02 e P13/03), o índice de secreção foi o mesmo observado para ilhotas nuas. Entretanto, na preparação de um pâncreas (P01/03), a secreção de insulina diminuiu após o encapsulamento. A secreção de insulina das ilhotas encapsuladas manualmente foi semelhante à das ilhotas encapsuladas automaticamente.

TABELA 8 - Teste de atividade funcional *in vitro* de ilhotas pancreáticas humanas nuas versus ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas

Pâncreas	Condição das ilhotas durante o ensaio funcional	Ilhotas nuas			Ilhotas encapsuladas		
		Secreção de insulina (μU/mL)		Índice de estímulo (B/A)	Secreção de insulina (μU/mL)		Índice de estímulo (B/A)
		[GII] _{baixa} (A)	[GII] _{alta} (B)		[GII] _{baixa} (A)	[GII] _{alta} (B)	
P09/02	ilhotas aderidas, encapsuladas* pós-tripsin.	620	3.207	5,2	71	404	5,7
P14/02	Ilhotas 72 horas em cultura em suspensão	4.092	4.369	1,1	4.809	6.044	1,3
P15/02	Ilhotas 24 horas em cultura suspensão *	1.334	479	0,4	426	341	0,8
P01/03	Ilhotas 9 dias em cultura em suspensão *	282	841	3,0	436	265	0,6
	Ilhotas 9 dias em cultura em suspensão **	282	841	3,0	300	208	0,7
P13/03	Ilhotas 7 dias em cultura em suspensão **	486	364	0,7	286	206	0,7
Média				2,2	1,6		
SD				1,8	0,3		

[GII]: concentração de glicose

*sistema de encapsulamento manual = pipeta Pasteur s/ injeção de ar no sistema

** sistema de encapsulamento automático = bomba de seringa c/ injeção de ar no sistema (vazão do ar = 1,6 L/min)

Tempo de encapsulamento = 10 minutos. Exceto em P01/03, que foi de 30 minutos

IV.5.2.2. Avaliação *in vivo* de microcápsulas

IV.5.2.2a. Implante de cápsulas vazias

O implante de cápsulas de Biodritina foi realizado em 14 ratos *nude* (12 ± 4 semanas) e em 17 ratos imunocompetentes (14 ± 8 semanas). Foram implantadas cápsulas produzidas com Biodritina ultrapura ($n=22$) e com Biodritina pura ($n=9$). Os sítios de implante foram o parênquima hepático ($n=8$), a cavidade peritoneal ($n=7$) e peritônio subparietal ($n=16$). Após o implante, os animais foram observados durante um período médio de 35 ± 22 dias. As características dos receptores e das cápsulas implantadas estão descritas no Anexo 4. Os resultados do implante estão resumidos na Tabela 9 e são descritos a seguir.

O implante de cápsulas vazias foi realizado em 31 ratos. Ao final do período de observação, os animais foram sacrificados e foram coletados fígado e peritônio subparietal, além de cápsulas aderidas ao fígado, ao estômago e ao baço de um rato com implante na cavidade peritoneal.

A análise histológica foi realizada em 22 ratos (Tabela 9a), nos quais as cápsulas implantadas eram de Biodritina ultrapura ($n=16$) e Biodritina pura ($n=6$). Nos implantes de cápsulas vazias de Biodritina ultrapura realizados em ratos *nude* foram observados processo inflamatório e fibrose em todos os casos, em todos os sítios de implante: parênquima hepático (Figura 24), em órgãos coletados na cavidade peritoneal e no peritônio subparietal. Nos implantes de cápsulas de Biodritina ultrapura realizados em ratos imunocompetentes também foi observado processo inflamatório e fibrose nos casos realizados no peritônio subparietal (Figura 25), enquanto

que no tecido hepático não foram observados sinais de cápsulas. O implante de cápsula de Biodritina pura apresentou resultados semelhantes, ou seja, processo inflamatório e fibrose tanto nos animais *nude* como nos imunocompetentes.

TABELA 9 - Implante de cápsulas de Biodritina: características dos receptores e das cápsulas implantadas

Tx	nº	Identificação	Rato Inhagem	Sexo	Idade (semanas)	Tipo da Biodritina utilizada na produção das cápsulas	Sítio do Tx	Data do sacrifício	Histologia
Tx-1	1	R _{4F4}	NIH nude	M	18	Biodritina ultrapura em RPMI	parênq. hepático	PO-20	Processo inflamatório + fibrose
	2	R _{5F4}	NIH nude	M	18	Biodritina ultrapura em RPMI	parênq. hepático	PO-20	Processo inflamatório + fibrose
Tx-2	3	R _{23F2}	Wistar	M	20	Biodritina ultrapura em RPMI	parênq. hepático	Óbito pós-Tx	Tecido hepático normal sem sinais de cápsulas
	4	R _{26F2}	Wistar	M	24	Biodritina ultrapura em RPMI	parênq. hepático	PO-20	Tecido hepático normal sem sinais de cápsulas
Tx-3	5	R _{27F2}	Wistar	M	24	Biodritina ultrapura em RPMI	parênq. hepático	PO-20	Tecido hepático normal sem sinais de cápsulas
	6	R _{28F2}	Wistar	M	24	Biodritina ultrapura em RPMI	parênq. hepático	PO-20	Tecido hepático normal sem sinais de cápsulas
Tx-4	7	R _{30F2}	Wistar	M	25	Biodritina ultrapura em RPMI	parênq. hepático	PO-25	Tecido hepático normal sem sinais de cápsulas
	8	R _{31F2}	Wistar	M	25	Biodritina ultrapura em RPMI	parênq. hepático	PO-25	Tecido hepático normal sem sinais de cápsulas
Tx-5	9	R _{76F4}	NIH nude	M	5	Biodritina ultrapura em NaCl	cav. peritoneal	PO-124	Processo inflamatório + fibrose
	10	R _{77F4}	NIH nude	M	9	Biodritina ultrapura em NaCl	cav. peritoneal	PO-30	NR
Tx-6	11	R _{81F4}	NIH heterozigoto	F	7	Biodritina ultrapura em NaCl	cav. peritoneal	PO-39	NR
	12	R _{82F4}	NIH heterozigoto	F	7	Biodritina ultrapura em NaCl	cav. peritoneal	PO-46	NR
	13	R _{83F4}	NIH heterozigoto	F	7	Biodritina ultrapura em NaCl	cav. peritoneal	PO-46	NR
	14	R _{84F4}	NIH heterozigoto	F	7	Biodritina ultrapura em NaCl	cav. peritoneal	PO-46	NR
Tx-7	15	R _{13F2}	Wistar	M	14	Biodritina ultrapura em NaCl	cav. peritoneal	Óbito PO-15	NR

Continuação da TABELA 9 - Implante de cápsulas de Biodritina: características dos receptores e das cápsulas implantadas

Tx	nº	Identificação	Rato Linagem	Sexo	Idade (semanas)	Tipo da Biodritina utilizada na produção das cápsulas	Sítio do Tx	Data do sacrifício	Histologia
Tx-8	16	R ₄₁₀₃	NIH <i>nude</i>	F	14	Biodritina ultrapura em NaCl	peritônio subpancreat	PO-49	Processo inflamatório + fibrose
	17	R ₄₂₀₃	NIH <i>nude</i>	F	14	Biodritina ultrapura em NaCl	peritônio subpancreat	PO-49	Processo inflamatório + fibrose
	18	R ₄₃₀₃	NIH <i>nude</i>	F	14	Biodritina ultrapura em NaCl	peritônio subpancreat	PO-49	Processo inflamatório + fibrose
	19	R ₄₄₀₃	NIH <i>nude</i>	F	14	Biodritina ultrapura em NaCl	peritônio subpancreat	PO-49	Processo inflamatório + fibrose
	20	R ₄₅₀₃	NIH <i>nude</i>	F	14	Biodritina ultrapura em NaCl	peritônio subpancreat	PO-49	Processo inflamatório + fibrose
Tx-9	21	R ₄₇₀₃	NIH heterozigoto	F	10	Biodritina ultrapura em NaCl	peritônio subpancreat	PO-42	Processo inflamatório + fibrose
	22	R ₄₈₀₃	NIH heterozigoto	F	10	Biodritina ultrapura em NaCl	peritônio subpancreat	PO-42	Processo inflamatório + fibrose
Tx-10	23	R ₂₃₀₀₃	NIH <i>nude</i>	F	9	Biodritina pura em NaCl	peritônio subpancreat	Óbito PO-17	NR
	24	R ₂₃₃₀₃	NIH <i>nude</i>	F	8	Biodritina pura em NaCl	peritônio subpancreat	PO-27	Processo inflamatório + fibrose
	25	R ₂₅₄₀₃	NIH <i>nude</i>	F	8	Biodritina pura em NaCl	peritônio subpancreat	PO-27	Processo inflamatório (microabscesso) + fibrose
	26	R ₂₅₅₀₃	NIH <i>nude</i>	F	8	Biodritina pura em NaCl	peritônio subpancreat	Óbito PO-3	NR
	27	R ₂₅₆₀₃	NIH <i>nude</i>	F	8	Biodritina pura em NaCl	peritônio subpancreat	PO-27	Processo inflamatório + fibrose
Tx-11	28	R ₂₄₇₀₃	NIH heterozigoto	F	9	Biodritina pura em NaCl	peritônio subpancreat	Óbito PO-24	NR
	29	R ₂₆₃₀₃	NIH heterozigoto	F	6	Biodritina pura em NaCl	peritônio subpancreat	PO-42	Processo inflamatório + fibrose
	30	R ₂₆₄₀₃	NIH heterozigoto	F	6	Biodritina pura em NaCl	peritônio subpancreat	PO-42	Processo inflamatório + fibrose
	31	R ₂₆₅₀₃	NIH heterozigoto	F	6	Biodritina pura em NaCl	peritônio subpancreat	PO-42	Processo inflamatório + fibrose

NR: não realizada

TABELA 9a - Resumo do resultado da análise histológica – Implante de cápsulas vazias de Biodritina

Tipo de Biodritina	Sítio de implante					
	Parênquima hepático		Cavidade peritoneal		Peritônio subparietal	
	Nude	Imunocompetente	Nude	Imunocompetente	Nude	Imunocompetente
Ultrapura (n=16)	PI + fibrose = 2/2	Sem cápsulas = 6/6	PI + fibrose = 1/1	-	PI + fibrose = 5/5	PI + fibrose = 2/2
Pura (n=6)	-	-	-	-	PI + fibrose = 3/3	PI + fibrose = 3/3

PI: processo inflamatório

Figura 24 – Fígado de rato *nude* com implante de cápsulas vazias de Biodritina ultra pura. Processo inflamatório e fibrose ao redor de espaços vazios preenchidos por material basófilo (restos de cápsulas?) (HE, 250x)

Figura 25 – Músculo abdominal de rato imunocompetente com implante de cápsulas vazias de Biodritina ultra pura. Processo inflamatório em torno de cavidades ocupadas por substâncias homogêneas e basófilas (HE, 250x)

IV.5.5.2b. Transplante de ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas

Ilhotas pancreáticas humanas foram encapsuladas e transplantadas na cavidade peritoneal de sete ratos *nude* e de dois ratos imunocompetentes. Não ocorreu reversão do *diabetes* em nenhum caso (Tabela 10).

A observação microscópica do lavado peritoneal coletado em três ratos revelou a presença de estruturas celulares (ilhotas?) no interior de cápsulas deformadas e parcialmente destruídas e, ocasionalmente, também no interior de microcápsulas íntegras. Entretanto, a análise histológica não confirmou a presença de cápsulas e/ou de ilhotas encapsuladas.

TABELA 10 - Resumo dos resultados obtidos com Tx de ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas em ratos *nude* e em ratos imunocompetentes

nº	Ratos	Idade (semanas)	IEQ/Kg	Índice de estímulo das ilhotas encapsuladas	Sítio do Tx	Data do sacrifício	Resultado
1	<i>nude</i>	6	30x10 ³	1	cavidade peritoneal	PO-38	Sem reversão do diabetes.
2	<i>nude</i>	6	30x10 ³	1	cavidade peritoneal	PO-38	Sem reversão do diabetes
3	<i>nude</i>	6	30x10 ³	1	cavidade peritoneal	PO-38	Sem reversão do diabetes
4	<i>nude</i>	5	92x10 ³	1	cavidade peritoneal	PO-26	Sem reversão do diabetes
5	<i>nude</i>	5	92x10 ³	1	cavidade peritoneal	PO-13	Sem reversão do diabetes
6	<i>nude</i>	5	92x10 ³	1	cavidade peritoneal	PO-19	Sem reversão do diabetes
7	<i>nude</i>	5	92x10 ³	1	cavidade peritoneal	PO-26	Sem reversão do diabetes
8	Wistar	15	10x10 ³	NR	cavidade peritoneal	PO-16	Sem reversão do diabetes
9	Wistar	15	10x10 ³	NR	cavidade peritoneal	PO-16	Sem reversão do diabetes

NR: não realizado

IV.5.5.2c. Transplante de células encapsuladas de insulinoma de rato (linhagem celular INS-1E)

O Tx de células INS-1E encapsuladas foi realizado em ratos *nude* (n=5) e em ratos imunocompetentes (n=5), sendo bem sucedido em dois ratos *nude* (Tabela 11).

A análise histológica realizada em seis ratos mostrou alterações em todos os casos. Insulinoma foi diagnosticado nos ratos com Tx bem sucedido. Fibrose foi observada em cinco ratos, sendo acompanhada de processo inflamatório tipo corpo estranho em quatro ratos (2 *nude* e 2 imunocompetentes). Não foi ainda realizado estudo imunohistoquímico, assim, a natureza da fibrose e do processo inflamatório não pode ser determinada.

TABELA 11 - Resultados do Tx de células INS-1E encapsuladas

Tx	n°	Rato	Isotopia	Idade (semanas)	Classificação	no de células implantadas	Sítio de Tx	Glicemia pré-Tx (mg/dl)	Glicemia média pré-Tx (mg/dl)	Glicemia na data do sacrifício (mg/dl)	Data de sacrifício	Remetida	Histologia
Tx-1	1	R20103	NIH nude	9	Não diabético	4x10 ⁶	peritônio subparietal	100	58±25	28	PQ-41	Hipoglicemia	Insulinoma
	2	R23503	NIH nude	9	Não diabético	4x10 ⁶	peritônio subparietal	97	79±18	50	PQ-41	Hipoglicemia	Insulinoma + processo inflamatório + fibrose
	3	R23103	NIH nude	9	Não diabético	4x10 ⁶	peritônio subparietal	88	86±18	67	PQ-41	Manutenção da normoglicemia	Processo inflamatório + fibrose
Tx-2	4	R23803	NIH heterozigoto	7	Não diabético	4x10 ⁶	peritônio subparietal	78	87±7	92	PQ-41	Manutenção da normoglicemia	Processo inflamatório + fibrose
	5	R25103	NIH heterozigoto	7	Não diabético	4x10 ⁶	peritônio subparietal	75	82±4	81	PQ-41	Manutenção da normoglicemia	Fibrose
	6	R23203	NIH heterozigoto	7	Não diabético	4x10 ⁶	peritônio subparietal	72	93±9	105	PQ-41	Manutenção da normoglicemia	Processo inflamatório + fibrose
		média		8		4		86		72			
		SD		1		0		13		29			
Tx-1	7	R27103	NIH nude	9	Diabético	4x10 ⁶	peritônio subparietal	393	351±109	319	Óbito PQ-17	Sem reversão do diabetes	NR
	8	R23803	NIH nude	9	Diabético	4x10 ⁶	peritônio subparietal	396	352±107	281	Óbito PQ-17	Sem reversão do diabetes	NR
	9	R24503	NIH heterozigoto	9	Diabético	4x10 ⁶	peritônio subparietal	301	319±56	307	Óbito PQ-38	Sem reversão do diabetes	NR
Tx-2	10	R23003	NIH heterozigoto	7	Não diabético	4x10 ⁶	peritônio subparietal	76	-	-	Óbito PQ-2	Manutenção da normoglicemia	NR
		média		9		4		269		302			
		SD		1		0		143		19			

NR: não realizada

V. DISCUSSÃO

O isolamento e a purificação de ilhotas pancreáticas humanas vêm sendo realizados na Unidade de Ilhotas Pancreáticas Humanas segundo a técnica desenvolvida por Ricordi e colaboradores (1988) e modificada por Shapiro e colaboradores (2000). Com esta metodologia, realizamos 104 isolamentos. Os resultados satisfatórios observados *in vitro*, quanto à viabilidade morfológica e quanto ao rendimento das preparações, permitiram à Equipe Multidisciplinar de Transplante de Ilhotas Pancreáticas realizar o primeiro **transplante** clínico de ilhotas pancreáticas humanas no Brasil, com reversão quase total do *diabetes* (5-6U de insulina/dia pós-Tx contra 36-38U/dia pré-Tx) (Eliaschewitz *et al.*, 2004).

No presente trabalho, foi realizada a avaliação funcional *in vitro* e *in vivo* de ilhotas pancreáticas humanas nuas obtidas a partir de 15 isolamentos e purificação de ilhotas pancreáticas humanas. Os resultados da viabilidade morfológica e da atividade funcional "*in vitro*" de ilhotas nuas foram excelentes. O estímulo das ilhotas com solução com alta concentração de glicose aumentou a secreção de insulina de 3 a 5 vezes, em 43% das amostras, índices próximos àqueles alcançados pelo grupo de Edmonton (3 a 7 vezes) (Shapiro *et al.*, 2000). Em dois isolamentos, a secreção de insulina na presença de alta concentração de glicose foi 10 vezes maior do que aquela observada na presença de concentração baixa.

Para avaliar a atividade funcional *in vivo* das ilhotas pancreáticas humanas nuas foi padronizado um modelo animal utilizando ratos NIH *nude*.

Neste modelo, a indução de *diabetes* através de injeção caudal de estreptozotocina foi seguida pelo enxerto de ilhotas pancreáticas humanas nuas, em diferentes sítios de transplante.

A indução do *diabetes* foi bem sucedida em 84% dos casos, sendo que em apenas oito animais nosso critério para o diagnóstico de *diabetes* não foi preenchido, mas, apesar disto, estes animais atingiram níveis glicêmicos considerados como característicos da doença (Kano *et al.*, 1998). Este resultado comprova a eficácia do método utilizado na indução de *diabetes* experimental. O modelo inicial de indução de *diabetes* foi realizado em camundongos, mas além de mortalidade alta houve um alto índice de reversão espontânea do *diabetes*. Por este motivo o presente estudo utilizou ratos ao invés de camundongos.

Após o Tx de ilhotas pancreáticas humanas a taxa de reversão do *diabetes* foi de 24%, sendo total em 13% e parcial em 11% dos ratos que sobreviveram ao Tx. O número de ilhotas injetadas/Kg de peso não diferiu significativamente entre os grupos de animais que responderam ou não ao Tx e sempre foi superior ao número recomendado para transplantes experimentais, que é de 10.000 IEQ/Kg de peso (Ueki *et al.*, 1995; Brandhorst *et al.*, 2001). Além das ilhotas terem sido implantadas em número suficiente, estavam produzindo insulina em quantidade adequada na avaliação pré-transplante, em 77% dos enxertos. O grupo de animais com reversão do *diabetes* foi transplantado com ilhotas provenientes de preparações que respondiam ao estímulo de glicose *in vitro*. Por outro lado, estas preparações também foram utilizadas em 23 dos procedimentos onde

o transplante fracassou. A partir destes dados, algumas hipóteses foram levantadas na tentativa de explicar a falência do transplante: dano de ilhotas durante o processo de injeção, vulnerabilidade das ilhotas pancreáticas humanas após o transplante, isquemia secundária à trombose de vasos sangüíneos do fígado e resposta inflamatória às ilhotas pancreáticas humanas.

Muitos dos transplantes (40%) foram realizados poucas horas após o término do isolamento e da purificação das ilhotas. É possível que este período de tempo não tenha sido suficiente para a recuperação das ilhotas após o estresse provocado pelo processo de isolamento. Entretanto, o mesmo período de tempo foi observado em dez dos onze casos onde o implante teve sucesso. Além disso, durante o transplante, o material injetado pode ter sido danificado, em consequência da pressão exercida sobre o embolo da seringa. Assim, a quantidade de ilhotas viáveis enxertadas pode ter sido reduzida de forma significativa, o que pode ter determinado o fracasso do enxerto em alguns casos.

O período inicial do transplante é caracterizado pela ocorrência de mudanças estruturais e funcionais nas ilhotas pancreáticas. Estas alterações são acompanhadas por disfunção e morte de uma massa substancial de células β e ocorrem até a remodelação e estabilização do enxerto (Davalli *et al.*, 1995; Davalli *et al.*, 1996). Esta situação adversa pode ser potencializada pela hiperglicemia observada nos animais receptores no pós-transplante imediato. O controle metabólico adequado da glicemia durante esta fase é crucial para a sobrevivência e atividade funcional satisfatória do enxerto. A

manutenção de glicemia pós-prandial inferior a 150 mg/dl é recomendável durante este período (Davalii *et al.*, 1996; Hayek & Beattie, 1997). Em nosso estudo, foi adotada a insulinoterapia no acompanhamento dos animais durante o pós-transplante, visando manter níveis menos tóxicos de hiperglicemia para as ilhotas. No entanto, deve ser ressaltada a dificuldade de controle dos níveis glicêmicos nestes animais, uma vez que alguns evoluem com hipoglicemia, o que também pode levar à perda de animais. Não foi possível manter a glicemia de alguns animais dentro deste limite recomendável, o que pode ter desencadeado uma perda significativa de ilhotas pancreáticas por glicocitotoxicidade, contribuindo, assim, para o insucesso do procedimento (Hayek & Beattie, 1997).

Outra possibilidade que pode explicar o alto índice de insucesso dos transplantes na veia porta realizados em nosso estudo é a obstrução da circulação sangüínea no local da injeção das ilhotas. A suspensão de ilhotas injetada não é totalmente pura. Assim, a massa de tecido exócrino contaminante, bem como restos celulares e até mesmo ilhotas pancreáticas de diâmetro maior podem obstruir a circulação local e desencadear um processo de coagulação intravascular com formação de trombos. Em nosso estudo, congestão vascular e trombose foram observadas em animais que não reverteram o *diabetes* ou que foram a óbito após o transplante. Com o objetivo de evitar acidentes vasculares, discutiu-se sobre o uso de anticoagulante (heparina) durante o procedimento. Entretanto, esta idéia foi abandonada porque a punção da veia porta é acompanhada por sangramento intenso o qual, quando não controlado, pode levar o animal ao

óbito. A diminuição do fluxo sangüíneo no local do enxerto prejudica o suprimento de oxigênio e nutrientes necessários à sobrevivência das ilhotas, portanto, uma substancial massa de células β pode ser perdida, restringindo ainda mais as possibilidades de sucesso do transplante. Além disso, estes restos celulares podem ativar os macrófagos residentes no tecido hepático e desencadear uma resposta inflamatória.

Outra hipótese levantada na tentativa de explicar a falência do transplante em ratos NIH *nude* é a resposta inflamatória às ilhotas pancreáticas humanas. Macrófagos, uma vez ativados, liberam citocinas, principalmente IL-1 e TNF- α , que por sua vez induzem a produção de óxido nítrico. Resposta inflamatória mediada pela ação do óxido nítrico foi descrita como responsável pela falência de enxerto intraportal de ilhotas suínas em ratos *nude* (Brandhorst *et al.*, 2001, Brandhorst *et al.*, 2002). Em nosso estudo, a análise histológica evidenciou processo inflamatório principalmente em espaço porta, não só no grupo de animais transplantados, mas também no grupo controle, particularmente em ratos “sham”. Este resultado sugere que a simples manipulação da veia porta para injeção de ilhotas ou até mesmo para injeção de meio de cultura nos animais “sham” pode desencadear um processo inflamatório.

O estudo imuno-histoquímico mostrou um número de linfócitos T e de macrófagos muito reduzido em todos os grupos de animais submetidos a Tx. A quantidade destas células presentes no tecido hepático de animais com reversão total ou parcial do *diabetes* não foi significativamente diferente do grupo sem reversão. Estes resultados enfraquecem a hipótese do processo

inflamatório ter sido a causa da falência do enxerto. Nos animais que foram a óbito imediatamente pós-Tx foi observado um número maior de células inflamatórias no parênquima hepático que pode ser uma resposta ao processo de trombose observado nestes casos.

A análise histológica também mostrou fibrose no espaço porta de alguns animais cujo o transplante não teve sucesso, apesar de não ter sido identificado por estudo imuno-histoquímico a presença de miofibroblastos no espaço porta e sim apenas em células da musculatura lisa vascular. Mesmo assim, fibrose decorrente da associação de isquemia secundária à trombose e processo inflamatório podem também ter sido responsável pela falência do transplante.

Dentre os transplantes de ilhotas pancreáticas humanas nuas realizados na cavidade peritoneal, deve ser ressaltado que a reversão do *diabetes* foi observada no caso que recebeu maior número de ilhotas (92×10^3 versus 30×10^3 IEQ/Kg nos outros casos). É importante lembrar que a cavidade peritoneal é um sítio de implante que requer um número maior de ilhotas para a reversão do *diabetes* do que aquele exigido em Tx realizados na veia porta ou na cápsula renal. Chaib e colaboradores (2000) relatam cura de *diabetes* com o implante de 300 a 600 ilhotas de ratos na veia porta, enquanto que na cavidade peritoneal são necessários pelo menos três vezes o número de ilhotas (800 a 2.400) para reverter o *diabetes*. Em procedimentos realizados com ilhotas humanas, foi descrito reversão do diabetes pós-Tx de 2×10^3 a 10×10^3 IEQ/Kg (Davalli *et al.*, 1995; Gaber *et al.*, 2001) na cápsula renal, enquanto que na cavidade peritoneal são

necessários de 40×10^3 a 80×10^3 IEQ/Kg (Lanza *et al.*, 1993). Portanto, um número insuficiente de ilhotas implantadas pode ter sido responsável pela falência do Tx nos casos realizados na cavidade peritoneal do presente estudo, uma vez que eles receberam 30×10^3 IEQ/Kg de peso de ilhotas pancreáticas com boa capacidade de produção de insulina (índice de estímulo à glicose *in vitro* = 4). Por outro lado, dois animais que foram transplantados com 92×10^3 IEQ/Kg na cavidade peritoneal não apresentaram reversão de diabetes apesar das ilhotas estarem produzindo insulina em quantidade satisfatória (índice de estímulo à glicose = 3). Uma hipótese para explicar este fato foi a dificuldade de manter a glicemia destes animais dentro do limite recomendável (glicemia pós-prandial < 150 mg/dl), o que pode ter desencadeado um perda significativa de ilhotas pancreáticas por glicotoxicidade e contribuído para o insucesso do procedimento. E, finalmente, implante de ilhotas não funcionais (índice de estímulo à glicose = 0,4) e em número inadequado podem ter determinado o insucesso do Tx de ilhotas pancreáticas humanas nuas na cavidade peritoneal de três ratos.

A taxa de mortalidade no transplante experimental de ilhotas pancreáticas humanas nuas foi de 31%, sendo que em 86% dos óbitos o sítio do transplante foi a veia porta. Nas cirurgias iniciais, a principal causa do óbito foi sangramento excessivo pós-punção da veia porta. A partir do momento em que passamos a realizar a hemostasia com "Gelfoam" (esponja de gelatina absorvível) este problema foi resolvido. Entretanto, tivemos alguns óbitos decorrentes da hipertensão portal e da trombose, devido à

dificuldade de controle da pressão exercida sobre a veia porta durante a injeção da suspensão celular.

Para aferir a eficácia da técnica cirúrgica utilizada nos transplantes de ilhotas pancreáticas humanas foram realizados transplantes de células de insulínoma de rato (linhagem INS-1E). Nestes procedimentos, ocorreu normalização da glicemia ou mesmo hipoglicemia em 52% dos animais submetidos ao Tx de células INS-1E nuas. Para o sucesso da reversão do *diabetes* com este tipo de transplante, o número de células injetadas foi decisivo, pois só se obteve resposta ao tratamento quando passou-se a implantar pelo menos 75×10^4 células/animal. A relação entre o número de células injetado e o sucesso do enxerto também foi descrita em protocolos de transplantes de ilhotas pancreáticas murinas adultas e/ou fetais (Hayek & Beattie *et al.*, 1997; Ueki *et al.*, 1995) e, também, em estudos realizados com ilhotas pancreáticas humanas (Shapiro *et al.*, 2000).

Com relação ao papel do local do transplante no sucesso do procedimento de Tx de células INS-1E, o peritônio subparietal foi o sítio de implante com maior índice de sucesso (90%). Além de ser um local de fácil acesso, é bastante vascularizado e o procedimento cirúrgico menos invasivo do que aquele realizado na veia porta e na cápsula renal. Dentre os transplantes realizados na veia porta, houve sucesso em 47% dos casos, enquanto 50% dos transplantes realizados na cápsula renal foram bem sucedidos. No entanto, deve ser ressaltado que o número total de enxertos realizados na cápsula renal foi menor do que o realizado na veia porta e no peritônio subparietal.

Com relação ao microencapsulamento, nos experimentos iniciais de produção de microcápsulas, um problema enfrentado foi a perda de material. Inicialmente, o problema localizava-se na tubulação que ligava o gerador de gotículas à seringa com Biodritina e, posteriormente, nas paredes do tubo coletor das cápsulas. A solução encontrada foi a ligação direta do gerador de cápsulas à seringa. Para tanto, foi desenvolvido um novo modelo de microgotejador (gerador nº 2). Esta alteração eliminou a perda de material na tubulação, entretanto, a perda do material nas paredes do tubo coletor de cápsulas continuou ocorrendo. Para tentar eliminar este problema, foram realizados experimentos onde todos os parâmetros foram fixados, exceto a velocidade do ar. Esta decisão foi tomada com o objetivo de diminuir o ângulo de dispersão das cápsulas na saída do gerador. No gerador nº 2, como o fluxo do ar não está direcionado para a ponta da agulha, o ângulo de dispersão das cápsulas acompanha o ângulo de dispersão do ar.

Nos experimentos iniciais, a vazão do ar foi 2,2 L/min e as cápsulas produzidas apresentaram diâmetro inferior a 600 μm . Em experimentos posteriores, foi alterada a velocidade do ar injetado no sistema para 2,5 L/min e 1,6 L/min. O aumento da vazão do ar não alterou significativamente o tamanho das microcápsulas e a perda de material continuou acentuada. Em contrapartida, quando a velocidade do ar foi 1,6 L/min, a perda de material foi totalmente eliminada. Isto aconteceu porque, diminuindo a velocidade do ar, reduziu-se seu ângulo de dispersão e, conseqüentemente, o ângulo de dispersão das cápsulas foi reduzido. Em relação ao tamanho das cápsulas, a velocidade do ar está diretamente relacionada com a

pressão exercida sobre a gota que está se formando na ponta da agulha. Diminuindo a velocidade do ar, foi possível diminuir esta pressão e, conseqüentemente, formar gotas com diâmetro maior. O inverso acontece quando se aumenta a velocidade do ar.

Com o objetivo de produzir cápsulas com diâmetro pequeno, sem perda de ilhotas durante o processo de encapsulamento, foi desenvolvido o terceiro gerador de microcápsulas, onde o fluxo do ar está direcionado para a ponta da agulha. Assim, a redução da dispersão das cápsulas foi possível sem aumentar o seu tamanho.

A estratégia inicial adotada para contornar a perda de ilhotas durante o encapsulamento foi o encapsulamento manual, utilizando pipeta Pasteur, na ausência de injeção de ar no sistema. Com isto, foi possível realizar testes de atividade funcional *in vitro*, com a certeza de que os resultados não seriam alterados pela diminuição da massa de ilhotas pancreáticas humanas.

A avaliação funcional *in vitro* de ilhotas microencapsuladas foi realizada em apenas cinco preparações de ilhotas microencapsuladas. Apesar do número reduzido de experimentos, observou-se que o processo de encapsulamento não afeta a secreção de insulina. A quantidade de insulina produzida pelas ilhotas encapsuladas foi similar àquela secretada pelas ilhotas nuas. Além disso, as ilhotas encapsuladas e as ilhotas nuas apresentaram o mesmo padrão de resposta à glicose, entretanto em duas ocasiões, o índice de estímulo diminuiu após o encapsulamento.

No experimento onde índice de estímulo em resposta a glicose foi menor do que o observado pré-encapsulamento, as ilhotas foram encapsuladas de duas formas, ou seja: a forma automática (bomba de seringa c/ injeção de ar no sistema) e a forma manual (pipeta Pasteur s/ injeção de ar no sistema). O índice de estímulo das ilhotas encapsuladas destas duas maneiras foi similar (0,7 contra 0,6). No sistema automático, todas as ilhotas necessárias para realização dos testes *in vitro* e *in vivo* foram encapsuladas de uma só vez. Por este motivo, o tempo de duração do processo foi de 30 minutos. Este tempo foi reproduzido no sistema manual. As ilhotas foram submetidas ao teste de atividade funcional imediatamente pós-encapsulamento. Nos demais testes de atividade funcional *in vitro*, o tempo de encapsulamento das ilhotas não ultrapassou 10 minutos. Portanto, concluiu-se que o tempo de duração do encapsulamento pode ter determinado o fracasso da resposta dada por estas ilhotas ao aumento da concentração de glicose.

Durante o processo de microencapsulamento, as ilhotas têm que ser incubadas em solução de cálcio por alguns minutos para polimerização do alginato. No entanto o íon cálcio também está envolvido na exocitose de grânulos de insulina. Sabe-se que o mecanismo de secreção de insulina tem início com a entrada da glicose na célula β , através do transportador de glicose 2 (GLUT 2). A consequência direta do metabolismo da glicose é o aumento da razão ATP/ADP, que provoca o fechamento dos canais de potássio sensíveis ao ATP, com despolarização da membrana celular e consequente abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem. Com isto, a

concentração intracelular de cálcio aumenta e a exocitose dos grânulos de insulina é ativada (Hellman *et al.*, 1992). Em estudos realizados com células secretoras de insulina em suspensão, foi demonstrado que concentrações de íons Ca^{+2} no meio de cultura superiores a $0,1 \mu\text{M}$ disparam o mecanismo de secreção de insulina dependente de glicose e atingem um ponto ótimo em torno de $10\mu\text{M}$ Ca^{+2} . Por outro lado, experimentos com ilhotas de ratos eletropermeabilizadas demonstraram que concentrações de íons Ca^{+2} superiores a $10\mu\text{M}$ inibem a liberação de insulina (Hellman *et al.*, 1992). Deste modo, tem sido sugerido que a liberação de insulina dependente de glicose requer cálcio extracelular e que existe uma concentração ótima deste íon, acima da qual o mecanismo de liberação de insulina é bloqueado (Jones & Persaud, 1998). Este mecanismo de bloqueio da liberação de insulina dependente de glicose pode ter ocorrido naqueles processos de encapsulamento, nos quais as ilhotas foram expostas à solução cloreto de cálcio $0,10 \text{ M}$ por um tempo superior a 10 minutos, onde o índice de estímulo das ilhotas à glicose pré-encapsulamento passou de 3 para 0,7 pós-encapsulamento.

Para avaliar a resistência e a biocompatibilidade das cápsulas de Biodritina, foram injetadas microcápsulas vazias no parênquima hepático e na peritônio subparietal de ratos *nude* e de ratos imunocompetentes. A análise histológica revelou que microcápsulas de Biodritina ultrapura ou pura induziram processo inflamatório e fibrose em todos os sítios de implante, tanto em ratos *nude* como em ratos imunocompetentes. Estes dados apontam que as cápsulas produzidas não são totalmente biocompatíveis.

Finalmente, em alguns ratos imunocompetentes com implante de cápsulas no parênquima hepático não foram observadas alterações nem sinais de cápsulas no tecido hepático. Este resultado foi inicialmente interpretado como sendo consequência da fragilidade das cápsulas, que não teriam resistido às técnicas de fixação com formaldeído e/ou à temperatura elevada durante a inclusão do tecido. Entretanto, a Biodritina não é termorreversível e sua conversão da forma líquida para a forma de gel é uma propriedade do alginato de sódio que depende da presença de íons de cálcio. A volta à forma líquida depende da presença de quelantes de cálcio, tais como polifosfatos (Ribeiro, 1999).

Assim outra possibilidade para o desaparecimento das cápsulas poderia ser o tempo de permanência das cápsulas em RPMI, pois a concentração de fosfato que existe no RPMI-1640 é suficiente para dissolver cápsulas de alginato de até 1 mm de diâmetro (Lee & Palsson, 1990; Lee, Chuck & Palsson, 1993). No entanto como este fenômeno de desaparecimento das cápsulas não ocorreu nos ratos *nude* e só foi observado em todos os casos de ratos imunocompetentes, a possibilidade de destruição das cápsulas por uma resposta fagocitária ou imune não pode ser descartada.

O número de transplantes de ilhotas pancreáticas humanas microencapsuladas foi limitado, demonstrando nesta análise preliminar que o procedimento foi incapaz de reverter o *diabetes*, tanto em animais imunocompetentes como em ratos *nude*. Estes resultados sugerem que o

fracasso do Tx pode ser creditado a incapacidade das ilhotas em secretar insulina em resposta à glicose.

O transplante de células INS-1E microencapsuladas realizado no peritônio subparietal de cinco ratos *nude* foi bem sucedido em dois animais e em outro animal observou-se uma queda acentuada da glicemia. Este resultado comprova que o encapsulamento não interferiu na capacidade da células de produzirem e secretarem insulina para o meio, além de credenciar a peritônio subparietal como sítio para futuros implantes. Por outro lado, o implante em ratos imunocompetentes não foi bem sucedido, resultado confirmado com a análise histológica que não revelou a presença de insulinoma nos cortes analisados.

Infelizmente, até o momento ainda não pudemos esclarecer a natureza e a intensidade da inflamação e da fibrose observadas no Tx de ilhotas pancreáticas humanas e de células INS-1E encapsuladas. No entanto, a análise por imuno-histoquímica, que está em andamento, deverá fornecer informações adicionais.

Em resumo, o presente estudo apresentou o resultado da análise funcional *in vitro* e *in vivo* de ilhotas pancreáticas humanas. Foi padronizado um modelo animal de Tx de ilhotas pancreáticas humanas em ratos imunodeficientes. Além disso, foi estabelecida uma metodologia para a produção de microcápsulas uniformes e homogêneas. Apesar do pequeno número de experimentos realizados e da biocompatibilidade da Biodritina não ter sido confirmada, foi demonstrado que ilhotas encapsuladas continuaram a secretar insulina e a responder ao estímulo com glicose após

o encapsulamento. Para que o transplante de ilhotas humanas microencapsuladas possa ser estabelecido, o processo de purificação da Biodritina deve ser aprimorado e/ou novos materiais biocompatíveis devem ser desenvolvidos.

VI. CONCLUSÕES

1. Ilhotas pancreáticas humanas isoladas e purificadas seguindo-se os protocolos utilizados na Unidade de Ilhotas Pancreáticas Humanas apresentaram boa atividade funcional *in vitro*, demonstrado pela habilidade de secreção de insulina em resposta à glicose.
2. A padronização do modelo experimental de transplante de ilhotas pancreáticas em animais imunodeficientes mostrou que existem vários sítios possíveis para implantar ilhotas humanas em ratos *nude*.
3. O transplante experimental de ilhotas pancreáticas humanas em ratos *nude* foi capaz de reverter o *diabetes* em 24% dos casos.
4. As causas da falência não foram totalmente esclarecidas, mas envolvem aspectos técnicos do procedimento e funcionais das ilhotas pancreáticas humanas isoladas. Apesar de constatado um certo grau de processo inflamatório no local do implante, a falência do enxerto não pode ser creditada à resposta imune, possivelmente pela natureza dos animais receptores.
5. Foram produzidas microcápsulas de tamanho e formato ideais para o encapsulamento de ilhotas pancreáticas humanas. No entanto, a biocompatibilidade da Biodritina não foi confirmada.

6. Foi realizado, com sucesso, o microencapsulamento de ilhotas pancreáticas humanas. Ilhotas microencapsuladas mantiveram a habilidade de responder ao estímulo da glicose, produzindo e secretando insulina *in vitro*.
7. Apesar do sucesso observado em alguns casos de transplante de células INS-1E microencapsuladas, caracterizando a viabilidade do procedimento, o transplante de ilhotas pancreáticas humanas microencapsuladas foi incapaz de reverter o *diabetes* nos limitados experimentos realizados.

ANEXOS

Anexo 1: Resultados da indução de diabetes em ratos nude e ratos imunocompetentes

n°	Ratos	Idade (semanas) na indução	Resultado da indução	Glicemia (mg/dl)		
				Ao diagnóstico	Durante o período de acompanhamento	
				Dia zero	de diabetes	
1	R20 _{F2}	8	Positivo	114	367	368
2	R21 _{F2}	8	Positivo	96	310	331
3	R33 _{F2}	21	Positivo	104	308	362
4	R35 _{F2}	19	Positivo	108	407	318
5	R36 _{F2}	14	Positivo	109	332	313
6	R37 _{F2}	14	Positivo	107	334	354
7	R38 _{F2}	14	Positivo	121	444	355
8	R39 _{F2}	11	Positivo	89	321	327
9	R40 _{F2}	11	Positivo	103	415	404
10	R42 _{F2}	10	Sem avaliação	109	sem avaliação	óbito PI-1
11	R43 _{F2}	10	Sem avaliação	115	sem avaliação	óbito PI-1
12	R44 _{F2}	10	Sem avaliação	93	sem avaliação	óbito PI-1
13	R45 _{F2}	10	Sem avaliação	123	sem avaliação	óbito PI-1
14	R46 _{F2}	14	Positivo	94	370	390
15	R47 _{F2}	14	Positivo	67	312	328
16	R48 _{F2}	14	Positivo	73	344	361
17	R49 _{F2}	14	Positivo	88	316	311
18	R50 _{F2}	14	Positivo	93	310	304
19	R51 _{F2}	15	Positivo	93	324	323
20	R53 _{F2}	11	Positivo	65	302	322
21	R55 _{F2}	11	Positivo	83	421	360
22	R56 _{F2}	11	Positivo	83	381	347
23	R57 _{F2}	11	Positivo	94	411	394
24	R58 _{F2}	11	Positivo	77	361	337
25	R59 _{F2}	11	Positivo	69	372	335
26	R60 _{F2}	11	Positivo	103	397	365
27	R61 _{F2}	11	Positivo	100	334	369
28	R62 _{F2}	11	Positivo	106	444	371
29	R63 _{F2}	11	Positivo	109	376	325

Anexo 1: Continuação

n°	Ratos	Idade (semanas) na indução	Resultado da indução	Glicemia (mg/dl)		
				Dia zero	Ao diagnóstico de diabetes	Durante o período de acompanhamento
30	R64 _{F2}	11	Positivo	114	424	344
31	R65 _{F2}	11	Positivo	106	347	301
32	R _{1F3}	9	Positivo	103	326	296
33	R _{2F3}	9	Positivo	104	379	333
34	R _{3F3}	9	Positivo	106	399	330
35	R _{4F3}	9	Positivo	109	320	333
36	R _{5F3}	9	Positivo	111	346	316
37	R _{6F3}	9	Positivo	97	385	377
38	R _{7F3}	9	Positivo	97	353	250
39	R _{8F3}	9	Positivo	90	347	272
40	R _{9F3}	8	Negativo	100	sl/ diabetes	221
41	R _{10F3}	8	Positivo	97	330	320
42	R _{11F3}	10	Positivo	100	569	468
43	R _{13F3}	10	Positivo	82	368	320
44	R _{14F3}	10	Positivo	105	336	302
45	R _{15F3}	9	Positivo	93	468	385
46	R _{16F3}	9	Negativo	98	302	222
47	R _{17F3}	9	Positivo	80	455	385
48	R _{18F3}	9	Óbito	98	Óbito	óbito pré diagnóstico de diabetes
49	R _{19F3}	9	Positivo	95	460	351
50	R _{20F3}	9	Positivo	98	394	251
51	R _{21F3}	9	Positivo	85	334	óbito PI-4
52	R _{22F3}	9	Positivo	83	345	305
53	R _{23F3}	9	Positivo	100	430	óbito PI-4
54	R _{24F3}	9	Positivo	88	480	óbito PI-4

Anexo 1: Continuação

nº	Ratos	Idade (semanas) na indução	Resultado da indução	Glicemia (mg/dl)		
				Dia zero	Ao diagnóstico de diabetes	Durante o período de acompanhamento
55	R _{25F3}	9	Positivo	100	535	383
56	R _{26F3}	9	Positivo	93	440	372
57	R _{27F3}	9	Positivo	117	405	401
58	R _{28F3}	9	Positivo	86	411	261
59	R _{29F3}	9	Positivo	91	380	305
60	R _{30F3}	9	Positivo	86	390	330
61	R _{31F3F3}	10	Positivo	126	429	329
62	R _{32F3}	10	Positivo	106	401	319
63	R _{34F3}	9	Positivo	120	347	348
64	R _{35F3}	9	Positivo	86	504	333
65	R _{37F3}	9	Positivo	103	469	351
66	R _{38F3}	9	Positivo	81	383	383
67	R _{39F3}	9	Positivo	94	349	342
68	R _{40F3=R40/02}	10	Positivo	109	348	289
69	R _{41F3=R41/02}	10	Positivo	116	481	315
70	R _{42F3}	10	Positivo	114	349	292
71	R _{43F3}	10	Positivo	114	499	388
72	R _{44F3}	10	Positivo	103	342	260
73	R _{45F3}	10	Positivo	99	344	329
74	R _{46F3}	10	Positivo	101	366	óbito PI-6
75	R _{47F3}	10	Positivo	94	352	óbito PI-4
76	R _{48F3}	10	Positivo	106	351	óbito PI-4
77	R _{49F3}	10	Negativo	112	s/diabetes	231
78	R _{50F3}	10	Óbito	110	óbito	óbito PI-2
79	R _{51F3}	12	Positivo	101	370	316
80	R _{52F3}	11	Positivo	88	444	432
81	R _{53F3}	11	Positivo	95	406	364
82	R _{54F3}	10	Positivo	113	520	368
83	R _{55F3}	10	Positivo	112	431	354

Anexo 1: Continuação

nº	Ratos	Idade (semanas) na indução	Resultado da indução	Glicemia (mg/dl)		
				Dia zero	Ao diagnóstico de diabetes	Durante o período de acompanhamento
84	R _{56F3}	10	Positivo	101	309	202
85	R _{57F3}	10	Positivo	98	311	356
86	R _{58F3}	10	Positivo	94	477	333
87	R _{59F3}	10	Positivo	106	494	288
88	R _{60F3}	10	Positivo	106	539	393
89	R _{61F3}	10	Positivo	99	507	456
90	R _{62F3}	9	Positivo	110	430	343
91	R _{63F3}	9	Positivo	88	485	368
92	R _{64F3}	9	Positivo	91	376	269
93	R _{65F3}	8	Positivo	115	458	380
94	R _{66F3}	8	Positivo	105	352	373
95	R _{67F3}	8	Positivo	111	317	366
96	R _{68F3}	8	Positivo	88	445	323
97	R _{69F3}	9	Positivo	119	385	427
98	R _{70F3}	9	Positivo	114	340	384
99	R _{71F3}	9	Positivo	113	461	445
100	R _{72F3}	8	Positivo	111	404	324
101	R _{73F3}	8	Positivo	146	540 (PI-3)	380
102	R _{74F3}	8	Óbito	132	Óbito	óbito pré diagnóstico de diabetes
103	R _{75F3}	8	Óbito	101	Óbito	óbito pré diagnóstico de diabetes
104	R _{76F3}	8	Positivo	122	308 (PI-4)	358
105	R77F3R _{14F4}	9	Positivo	114	403 (PI-4)	416
106	R78F3R _{15F4}	9	Positivo	106	331 (PI-5)	284
107	R _{80F3}	8	Positivo	95	442 (PI-3)	394
108	R _{81F3}	8	Positivo	91	484 (PI-3)	428
109	R _{83F3}	8	Positivo	89	420 (PI-3)	365
110	R _{85F3}	10	Positivo	112	331	465
111	R _{86F3}	10	Positivo	105	378	428
112	R _{87F3}	10	Positivo	124	330	372

Anexo 1: Continuação

n°	Ratos	Idade (semanas) na indução	Resultado da indução	Glicemia (mg/dl)		
				Dia zero	Ao diagnóstico de diabetes	Durante o período de acompanhamento
113	R _{88F3}	10	Positivo	95	353	422
114	R _{89F3}	10	Positivo	111	369	460
115	R _{90F3}	10	Positivo	132	358	381
116	R _{91F3}	10	Positivo	117	394	368
117	R _{92F3}	10	Positivo	107	355	388
118	R _{17F4}	12	Positivo	119	495	426
119	R _{18F4}	12	Positivo	104	409	348
120	R _{19F4}	12	Positivo	75	364	406
121	R _{20F4}	12	Positivo	70	610	426
122	R _{21F4}	12	Positivo	76	361	453
123	R _{22F4}	12	Positivo	81	346	453
124	R _{23F4}	5	Positivo	104	324	Óbito no PI-3
125	R _{24F4}	5	Positivo	119	301	Óbito no PI-3
126	R _{25F4}	5	Positivo	94	610	Óbito no PI-3
127	R _{26F4}	5	Positivo	88	610	Óbito no PI-3
128	R _{27F4}	5	Óbito	97	Óbito	óbito pré diagnóstico de diabetes
129	R _{28F4}	5	Positivo	115	496	373
130	R _{29F4}	5	Positivo	106	449	454
131	R _{30F4}	5	Positivo	96	541	423
132	R _{31F4}	5	Positivo	100	610	434
133	R _{32F4}	5	Positivo	90	389	393
134	R _{33F4}	5	Óbito	103	Óbito	óbito pré diagnóstico de diabetes
135	R _{35F4}	5	Positivo	82	510	356

Anexo 1: Continuação

n°	Ratos	Idade (semanas) na indução	Resultado da indução	Glicemia (mg/dl)		
				Dia zero	Ao diagnóstico de diabetes	Durante o período de acompanhamento
136	R _{36F4}	5	Positivo	93	510	246
137	R _{37F4}	5	Positivo	79	314	265
138	R _{38F4}	5	Positivo	104	523	219
139	R _{39F4}	5	Positivo	105	386	444
140	R _{40F4}	5	Positivo	83	492	311
141	R _{44F4}	6	Positivo	91	465	357
142	R _{46F4}	6	Positivo	100	341	445
143	R _{47F4}	6	Positivo	99	428	485
144	R _{48F4}	6	Positivo	103	389	329
145	R _{49F4}	6	Positivo	95	469	463
146	R _{50F4}	6	Positivo	104	316	438
147	R _{52F4}	6	Positivo	94	381	410
148	R _{53F4}	6	Negativo	105	s/ diabetes	-
149	R _{54F4}	6	Positivo	86	450	330
150	R _{55F4}	6	Positivo	100	525	495
151	R _{56F4}	6	Positivo	99	610	552
152	R _{58F4}	4	Óbito	119	Óbito	óbito pré diagnóstico de diabetes
153	R _{59F4}	4	Óbito	121	Óbito	óbito pré diagnóstico de diabetes
154	R _{60F4}	4	Óbito	132	Óbito	óbito pré diagnóstico de diabetes
155	R _{61F4}	4	Óbito	121	Óbito	óbito pré diagnóstico de diabetes
156	R _{62F4}	4	Óbito	115	Óbito	óbito pré diagnóstico de diabetes
157	R _{63F4}	4	Óbito	129	Óbito	óbito pré diagnóstico de diabetes
158	R _{64F4}	4	Óbito	142	Óbito	óbito pré diagnóstico de diabetes
159	R _{65F4}	4	Óbito	132	Óbito	óbito pré diagnóstico de diabetes
160	R _{66F4}	4	Óbito	115	Óbito	óbito pré diagnóstico de diabetes
161	R _{67F4}	4	Óbito	122	Óbito	óbito pré diagnóstico de diabetes
162	R _{68F4}	4	Positivo	115	610	344
163	R _{69F4}	4	Positivo	91	469	490
164	R _{70F4}	4	Positivo	110	511	421

Anexo 1: Continuação

n°	Ratos	Idade (semanas) na indução	Resultado da indução	Glicemia (mg/dl)		
				Dia zero	Ao diagnóstico de diabetes	Durante o período de acompanhamento
165	R _{71F4}	4	Positivo	86	383	305
166	R _{72F4}	4	Positivo	80	483	416
167	R _{73F4}	4	Positivo	100	610	398
168	R _{74F4}	4	Positivo	85	473	549
169	R _{75F4}	4	Positivo	90	610	561
170	R _{76F4}	4	Positivo	85	481	423
171	R _{77F4}	4	Positivo	101	458	407
172	R _{78F4}	9	Óbito	103	Óbito	óbito pré diagnóstico de diabetes
173	R _{79F4}	9	Óbito	100	Óbito	óbito pré diagnóstico de diabetes
174	R _{80F4}	9	Óbito	133	Óbito	óbito pré diagnóstico de diabetes
175	R _{217/03}	6	Positivo	89	420	290
176	R _{219/03}	6	Positivo	108	340	299
177	R _{223/03}	6	Positivo	93	313	254
178	R _{227/03}	6	Positivo	101	393	357
179	R _{228/03}	6	Positivo	97	386	353
180	R _{230/03}	6	Positivo	98	401	346
181	C _{1/04}	8	Positivo	130	315	305
182	C _{4/04}	8	Positivo	118	406	382
183	C _{5/04}	8	Positivo	92	414	378
184	C _{6/04}	8	Positivo	106	432	402
185	C _{7/04}	8	Positivo	109	434	392
186	C _{8/04}	8	Positivo	89	357	332
187	C _{9/04}	8	Positivo	97	452	372
188	C _{10/04}	8	Negativo	99	s/diabetes	-
189	C _{11/04}	8	Negativo	103	s/diabetes	-
190	C _{12/04}	8	Negativo	104	s/diabetes	-
191	C _{13/04}	8	Negativo	98	s/diabetes	-
192	R _{239/03}	6	Positivo	101	350	344
193	R _{240/03}	6	Positivo	97	396	394

Anexo 1: Continuação

n°	Ratos	Idade (semanas) na indução	Resultado da indução	Glicemia (mg/dl)		
				Dia zero	Ao diagnóstico de diabetes	Durante o período de acompanhamento
194	R _{244/03}	6	Positivo	96	308	310
195	R _{245/03}	6	Positivo	106	343	343
196	R _{247/03}	6	Positivo	95	333	308
197	R _{2F₂}	10	Positivo	115	378	318
198	R _{3F₂}	10	Sem avaliação	97	sem avaliação	óbito no PI-1
199	R _{4F₂}	10	Positivo	116	384	337
200	R _{5F₂}	10	Positivo	101	387	307
201	R _{7F₂}	11	Positivo	100	362	311
202	R _{8F₂}	11	Positivo	87	396	310
203	R _{9F₂}	11	Positivo	88	408	474
204	R _{10F₂}	11	Sem avaliação	104	sem avaliação	óbito no PI-1
205	R _{11F₂}	11	Positivo	75	398	387
206	R _{14F₂}	5	Positivo	145	346	336
207	R _{15F₂}	5	Positivo	82	333	317
208	R _{16F₂}	5	Positivo	111	363	357
209	R _{17F₂}	5	Positivo	111	335	335
média		8		102	405	359
SD		3		14	76	63

Anexo 2: Tx de ilhotas pancreáticas humanas nuas: Características dos receptores, do Tx, dos doadores e dos controles

Tx	RECEPTOR							DOADOR					Resultado do Tx			
	nº	Raio	Linagem	Sexo	Idade (semanas)	Classificação	Peso (gramas)	Glicemia (mg/dl)	nº de ilhotas	nº de implantes/fixo	Sítio do Tx	Pâncreas estimulo		Data do isolamento	Data do Tx	Observações
Tx-1	1	R21	NH nude	M	9	Transplantado	257	331	24x10 ³	6200	veia porta	P29/00	3,3	7/12/2000	16/12/2000	Sem reversão do diabetes
	2	R20	NH nude	M	9	Transplantado	214	368	15x10 ³	3100	veia porta	P28/00	3,3	7/12/2000	16/12/2000	Óbito durante o Tx
Tx-2	3	R35	NH nude	M	22	Transplantado	234	318	17x10 ³	4000	veia porta	P10/01	0,8	1/7/2001	3/7/2001	Óbito durante o Tx
	4	R38	NH nude	F	17	Transplantado	152	355	20x10 ³	3000	veia porta	P10/01	0,8	1/7/2001	3/7/2001	Óbito no PO-1
Tx-3	5	R46	NH nude	F	17	Transplantado	162	390	10x10 ³	1600	veia porta	P12/01	1,4	9/8/2001	13/8/2001	Sem reversão do diabetes
	6	R47	NH nude	F	17	Transplantado	172	328	10x10 ³	1720	veia porta	P12/01	1,4	9/8/2001	13/8/2001	Sem reversão do diabetes
	7	R48	NH nude	F	17	Transplantado	183	381	10x10 ³	1630	veia porta	P12/01	1,4	9/8/2001	13/8/2001	Sem reversão do diabetes
	8	R50	NH nude	F	17	Transplantado	189	304	10x10 ³	1690	veia porta	P12/01	1,4	9/8/2001	13/8/2001	Sem reversão do diabetes
	9	R49	NH nude	F	17	Transplantado	144	311	10x10 ³	1440	veia porta	P12/01	1,4	9/8/2001	13/8/2001	Óbito no PO-1
	10	R51	NH nude	F	17	Transplantado	143	323	16x10 ³	2345	veia porta	P13/01		4/8/2001	5/8/2001	Óbito imediatamente pós-Tx
Tx-4	11	R53	NH nude	M	11	Transplantado	210	322	15x10 ³	3150	veia porta	P13/01		4/8/2001	5/8/2001	Óbito imediatamente pós-Tx
	12	R55	NH nude	M	11	Transplantado	217	360	15x10 ³	3255	veia porta	P13/01		4/8/2001	5/8/2001	Óbito imediatamente pós-Tx
	13	R56	NH nude	F	11	Transplantado	154	347	15x10 ³	2310	veia porta	P13/01		4/8/2001	5/8/2001	Óbito imediatamente pós-Tx
	14	R57	NH nude	F	11	Transplantado	142	384	18x10 ³	2310	veia porta	P13/01		4/8/2001	5/8/2001	Óbito imediatamente pós-Tx
	15	R58	NH nude	F	11	Transplantado	150	337	15x10 ³	2250	veia porta	P13/01		4/8/2001	5/8/2001	Óbito imediatamente pós-Tx
	16	R59	NH nude	F	11	Transplantado	159	335	15x10 ³	2385	veia porta	P13/01		4/8/2001	5/8/2001	Óbito imediatamente pós-Tx
Tx-5	17	R283	NH nude	M	13	Transplantado	243	305	25x10 ³	6000	veia porta	P02/02	10	31/3/2002	31/3/2002	Sem reversão do diabetes
	18	R383	NH nude	M	13	Transplantado	237	330	12x10 ³	3000	veia porta	P02/02	10	31/3/2002	31/3/2002	Sem reversão do diabetes
	19	R283	NH nude	F	13	Transplantado	181	383	17x10 ³	3000	capcua renal	P02/02	10	31/3/2002	31/3/2002	Sem reversão do diabetes
	20	R283	NH nude	F	13	Transplantado	188	372	18x10 ³	3000	capcua renal	P02/02	10	31/3/2002	31/3/2002	Sem reversão do diabetes

Tx	RECEPTOR						DOADOR						Resultado do Tx				
	nº	Raça	Linagem	Sexo	Idade (semanas)	Classificação	Peso (gramas)	Osteon (mg/dl)	nº de illos/Kg	nº de illos/implantado/Kg	tipo de Tx	Princípio		Índice de estímulo	Data do Implante	Data do Tx	Observações
Tx-6	21	R ₃₀	NH nude	M	13	Transplantado	247.5	393	18x10 ³	4000	veia porta	P02/02	10	31/3/2002	1/4/2002	Ilhotas 1 dia em cultura em suspensão	Reversão parcial do diabetes
	22	R ₃₁	NH nude	M	13	Transplantado	243	329	16x10 ³	4000	veia porta	P02/02	10	31/3/2002	1/4/2002	Ilhotas 1 dia em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes
	23	R ₃₂	NH nude	M	13	Transplantado	251.5	319	15x10 ³	4000	veia porta	P02/02	10	31/3/2002	1/4/2002	Ilhotas 1 dia em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes
	24	R ₃₇	NH nude	M	13	Transplantado	254.5	351	16x10 ³	4000	veia porta	P02/02	10	31/3/2002	1/4/2002	Ilhotas 1 dia em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes
	25	R ₃₈	NH nude	M	13	Transplantado	207	342	15x10 ³	3000	capítulo renal	P02/02	10	31/3/2002	1/4/2002	Ilhotas 1 dia em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes
	26	R ₃₄	NH nude	F	13	Transplantado	189	348	18x10 ³	3000	capítulo renal	P02/02	10	31/3/2002	1/4/2002	Ilhotas 1 dia em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes
	27	R ₃₅	NH nude	F	13	Transplantado	168.5	333	18x10 ³	3000	capítulo renal	P02/02	10	31/3/2002	1/4/2002	Ilhotas 1 dia em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes
Tx-7	28	R _{40/3}	NH nude	F	12	Transplantado	175.5	280	20x10 ³	5000	veia porta	P4/02	3	17/4/2002	18/4/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Reversão total do diabetes
	29	R _{40/3}	NH nude	F	12	Transplantado	175	398	20x10 ³	3500	veia porta	P4/02	3	17/4/2002	18/4/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Reversão parcial do diabetes
	30	R _{40/3}	NH nude	F	12	Transplantado	173	329	29x10 ³	5000	veia porta	P4/02	3	17/4/2002	18/4/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes
	31	R _{40/3}	NH nude	F	12	Transplantado	177	289	20x10 ³	3500	veia porta	P04/02	3	17/4/2002	18/4/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Óbito imediatamente pós-Tx
	32	R _{41/3}	NH nude	F	12	Transplantado	169.5	315	20x10 ³	3500	veia porta	P04/02	3	17/4/2002	18/4/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Óbito imediatamente pós-Tx
	33	R _{42/3}	NH nude	F	12	Transplantado	182	292	16x10 ³	3500	veia porta	P4/02	3	17/4/2002	18/4/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Óbito imediatamente pós-Tx

RECEPTOR													DOADOR					Resultado
Tx	nº	Rato	Linagem	Sexo	Idade (semanas)	Classificação	Peso (gramas)	Glicemia (mg/dl)	nº de IEC/Kg	nº de Implantes/Rato	Sítio do Tx	Placenta estímulo	Índice de	Data do Isolamento	Data do Tx	Observações	do Tx	
Tx-8	34	R ₅₆₀₂	NH nude	F	11	Transplantado	170	333	22x10 ³	3800	veia porta	P06/02	10	3/5/2002	4/5/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Reversão total do diabetes	
	35	R ₅₆₀₂	NH nude	F	10	Transplantado	164	343	20x10 ³	3300	veia porta	P06/02	10	3/5/2002	4/5/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Reversão total do diabetes	
	36	R ₅₆₀₂	NH nude	M	13	Transplantado	231	384	20x10 ³	4800	cápsula renal	P06/02	10	3/5/2002	4/5/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Reversão parcial do diabetes	
	37	R ₅₆₀₂	NH nude	M	13	Transplantado	238	432	20x10 ³	4800	veia porta	P06/02	10	3/5/2002	4/5/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes	
	38	R ₅₆₀₂	NH nude	F	11	Transplantado	180	388	20x10 ³	3600	veia porta	P06/02	10	3/5/2002	4/5/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes	
	39	R ₅₆₀₂	NH nude	F	11	Transplantado	170	354	20x10 ³	3400	cápsula renal	P06/02	10	3/5/2002	4/5/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes	
	40	R ₅₆₀₂	NH nude	F	11	Transplantado	152	288	20x10 ³	3000	veia porta	P06/02	10	3/5/2002	4/5/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Óbito no PO-1	
41	R ₅₆₀₂	NH nude	F	11	Transplantado	162	393	20x10 ³	3200	Veia porta	P06/02	10	3/5/2002	4/5/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Óbito no PO-1		
42	R ₅₆₀₂	NH nude	F	11	Transplantado	161	456	19x10 ³	3200	cápsula renal	P06/02	10	3/5/2002	4/5/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Óbito no PO-2		
Tx-9	43	R ₅₆₀₂	NH nude	M	11	Transplantado	243	323	21x10 ³	5250	veia porta	P07/02	5	10/5/2002	11/5/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Reversão total do diabetes	
	44	R ₅₆₀₂	NH nude	F	10	Transplantado	200	284	17x10 ³	3500	veia porta	P07/02	5	10/5/2002	11/5/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Reversão total do diabetes	
	45	R ₅₆₀₂	NH nude	M	12	Transplantado	246	427	21x10 ³	5250	veia porta	P07/02	5	10/5/2002	11/5/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Reversão parcial do diabetes	
	46	R ₅₆₀₂	NH nude	M	12	Transplantado	222	481	23x10 ³	5250	veia porta	P07/02	5	10/5/2002	11/5/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Reversão parcial do diabetes	
	47	R ₅₆₀₂	NH nude	M	11	Transplantado	224	373	23x10 ³	5250	veia porta	P07/02	5	10/5/2002	11/5/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes	
	48	R ₅₆₀₂	NH nude	M	11	Transplantado	198	366	28x10 ³	5250	veia porta	P07/02	5	10/5/2002	11/5/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes	
	49	R ₅₆₀₂	NH nude	M	12	Transplantado	261	384	20x10 ³	5250	veia porta	P07/02	5	10/5/2002	11/5/2002	Ilhotas em cultura em suspensão	Óbito imediatamente pós-Tx	

Tx	RECEPTOR										DOADOR					Resultado do Tx	
	nº	Rato	Linagem	Sexo	Idade (semanas)	Classificação	Peso (gramas)	Glândula (mg/di)	nº de IEC/Kg	nº de IEC	Sítio do Tx	Plancas	Índice de estímulo	Data do isolamento	Data do Tx		Observações
Tx-10	50	R ₂₈	NH nude	M	8	Transplantado	135	492	20x10 ³	2700	veta porta	P13:02	0,9	11/9/2002	13/9/2002	Ilhotas: 2 dias em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes
	51	R ₂₈	NH nude	M	6	Transplantado	137	449	20x10 ³	2740	veta porta	P13:02	0,9	11/9/2002	13/9/2002	Ilhotas: 2 dias em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes
	52	R ₃₀	NH nude	M	6	Transplantado	90	496	20x10 ³	1800	veta porta	P13:02	0,9	11/9/2002	13/9/2002	Ilhotas: 2 dias em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes
	53	R ₃₁	NH nude	M	6	Transplantado	88	534	20x10 ³	1700	veta porta	P13:02	0,9	11/9/2002	13/9/2002	Ilhotas: 2 dias em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes
Tx-11	54	R _{36Z}	NH nude	F	7	Transplantado	131,5	294	30x10 ³	3960	cavidade peritoneal	P14:02	3,7	25/9/2002	28/9/2002	Ilhotas: 1 dia em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes
	55	R _{36Z}	NH nude	F	7	Transplantado	124	195	30x10 ³	3720	cavidade peritoneal	P14:02	3,7	25/9/2002	28/9/2002	Ilhotas: 1 dia em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes
	56	R _{36Z}	NH nude	F	7	Transplantado	117	348	30x10 ³	3510	cavidade peritoneal	P14:02	3,7	25/9/2002	28/9/2002	Ilhotas: 1 dia em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes
	57	R _{36Z}	NH nude	F	7	Transplantado	127	219	30x10 ³	3910	cavidade peritoneal	P14:02	3,7	25/9/2002	28/9/2002	Ilhotas: 1 dia em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes
	58	R _{36Z}	NH nude	F	7	Transplantado	137	436	30x10 ³	4110	cavidade peritoneal	P14:02	3,7	25/9/2002	28/9/2002	Ilhotas: 1 dia em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes

RECEPTOR										DOADOR						Resultado		
Tx	nº	Rato	Linagem	Sexo	Idade (semanas)	Classificação	Peso (gramas)	Glicemia (mg/dl)	nº de IEC/Kg	nº de Implantes/otário	Sítio do Tx	Pâncreas	Índice de estímulo	Data do isolamento	Data do Tx	Observações	do Tx	
Tx-12	59	R _{AGEZ}	NIH nude	M	6	Transplantado	160	341	20x10 ³	3200	veia porta	P15:02	0,4	4/10/2002	5/10/2002	Ilhotas:1 dia em cultura em suspensão	Óbito imediatamente pós-Tx. Sangramento	
	60	R _{AGEZ}	NIH nude	M	6	Transplantado	157,5	428	20x10 ³	3150	veia porta	P15:02	0,4	4/10/2002	5/10/2002	Ilhotas:1 dia em cultura em suspensão	Óbito imediatamente pós-Tx. Sangramento	
	61	R _{AGEZ}	NIH nude	M	6	Transplantado	151,5	329	30x10 ³	4545	cavidade peritoneal	P15:02	0,4	4/10/2002	5/10/2002	Ilhotas:1 dia em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes	
	62	R _{AGEZ}	NIH nude	M	6	Transplantado	178	463	30x10 ³	5340	cavidade peritoneal	P15:02	0,4	4/10/2002	5/10/2002	Ilhotas:1 dia em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes	
Tx-13	63	R _{AGEZ}	NIH nude	M	6	Transplantado	163	316	30x10 ³	4660	cavidade peritoneal	P15:02	0,4	4/10/2002	5/10/2002	Ilhotas:1 dia em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes	
	64	R _{Y-FEL}	NIH nude	M	5	Transplantado	89	333	92x10 ³	8659	cavidade peritoneal	P01:03	3	10/1/2003	19/1/2003	Ilhotas:9 dias em cultura em suspensão	Reversão total do diabetes	
	65	R _{AGEZ}	NIH nude	F	5	Transplantado	90	283	92x10 ³	8749	cavidade peritoneal	P01:03	3	10/1/2003	19/1/2003	Ilhotas:9 dias em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes	
	66	R _{Y-FEL}	NIH nude	F	5	Transplantado	83	270	92x10 ³	7972	cavidade peritoneal	P01:03	3	10/1/2003	19/1/2003	Ilhotas:9 dias em cultura em suspensão	Sem reversão do diabetes	
67	R _{AGEZ}	NIH nude	F	5	Transplantado	78	320	92x10 ³	7583	cavidade peritoneal	P01:03	3	10/1/2003	19/1/2003	Ilhotas:9 dias em cultura em suspensão	Óbito no PO-1		
média							175	354	23.698	3.860	5,1							
SD							47	63	17.958	1.569	3,7							

RECEPTOR										DOADOR					Resultado			
Tx	n°	Raço	Linagem	Sexo	Idade (semanas)	Classificação	Peso (gramas)	Glicemia (mg/dl)	n° de MCG/Kg	n° de IMQ	Sítio do Tx	Parâmetro estimado	Índice de	Data do	Data do	Observações	Tx	
	68	R32	NIH nude	F	23	Controle não diabético	135	79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	69	R12F5	NIH nude	M	12	Controle não diabético	165	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	70	R34	NIH nude	F	8	Controle não diabético	71	103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	71	R12F4	NIH nude	F	6	Controle não diabético	100.5	94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72	R12F1	NIH nude	F	6	Controle não diabético	78	105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	73	C14	NIH nude	F	8	Controle não diabético	162	101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	74	C15	NIH nude	F	6	Controle não diabético	162	88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	75	C16	NIH nude	F	8	Controle não diabético	185.5	104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	76	C17	NIH nude	F	6	Controle não diabético	162.5	71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	77	C18	NIH nude	F	8	Controle não diabético	173	113	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
média										8	143	97						
SD										5	45	13						

RECEPTOR										DOADOR						Resultado
Tx				Sexo	Idade (semanas)	Classificação	Peso (gramas)	Glicemia (mg/dl)	nº de implantes/Reio	Sítio do Tx	Pâncreas estimulo	Data de Isolamento	Data do Tx	Observações	da Tx	
	nº	Rato	Linagem													
	78	R ₅₇₀₂	NH nude	F	11	Controle diabético	164	356	-	-	-	-	-	-	Diabético ao final do período de observação	
	79	R ₃₀₀₂	NH nude	F	11	Controle diabético	160	368	-	-	-	-	-	-	Diabético ao final do período de observação	
	78	R ₄₆₀₂	NH nude	F	11	Controle diabético	162	380	-	-	-	-	-	-	Diabético ao final do período de observação	
	79	R ₄₆₇₄	NH nude	F	7	Controle diabético	130	294	-	-	-	-	-	-	Diabético ao final do período de observação	
	78	R ₅₄₇₄	NH nude	F	8	Controle diabético	105.5	485	-	-	-	-	-	-	Diabético ao final do protocolo	
	79	R ₅₇₇₄	NH nude	F	8	Controle diabético	37.5	381	-	-	-	-	-	-	Diabético ao final do protocolo	
média 7 131 237																
SD 4 44 144																
	80	R ₁₃₈	NH nude	F	6	sham diabético	104	421	-	veia porta	-	-	-	-	Diabético ao final do período de observação	
	81	C5	NH nude	F	6	sham diabético	131	413	-	veia porta	-	-	-	-	Diabético ao final do período de observação	
	82	C8	NH nude	F	8	sham diabético	138	501	-	veia porta	-	-	-	-	Diabético ao final do período de observação	
	83	C7	NH nude	F	6	sham diabético	139	499	-	veia porta	-	-	-	-	Diabético ao final do período de observação	
	84	C8	NH nude	F	8	sham diabético	137	389	-	veia porta	-	-	-	-	Diabético ao final do período de observação	
média 8 130 445																
SD 0 15 52																
	média 8 138 258															
	SD 4 34 181															

Anexo 3: Tx de células INS-1 nuas: características dos receptores e do Tx

Tx	n°	Rato	linhagem	Sexo	Idade (semanas)	Classificação	Peso (gramas)	Glicemia média (mg/dl)	n° de células implantado/reto	sitio do transplante	Resultado do Tx
Tx-1	1	R _{1F3}	NIH nude	F	10	Diabético	133	296	3x10 ³	veia porta	Sem reversão do diabetes
	2	R _{2F3}	NIH nude	F	10	Diabético	138	333	3x10 ³	veia porta	Sem reversão do diabetes
	3	R _{3F3}	NIH nude	F	10	Diabético	140	330	3x10 ³	veia porta	Sem reversão do diabetes
	4	R _{4F3}	NIH nude	F	10	Diabético	125	333	3x10 ³	veia porta	Óbito pós-Tx
Tx-2	5	R _{5F3}	NIH nude	M	12	Diabético	234	316	750x10 ³	veia porta	REVERSÃO do diabetes seguida de hipoglicemia
	6	R _{6F3}	NIH nude	M	12	Diabético	239	337	750x10 ³	veia porta	REVERSÃO do diabetes seguida de hipoglicemia
	7	R _{7F3}	NIH nude	M	12	Diabético	261	250	750x10 ³	veia porta	Glicemia em queda a partir do PO-30
	8	R _{8F3}	NIH nude	M	12	Diabético	247	272	750x10 ³	veia porta	Glicemia em queda a partir do PO-30
Tx-3	9	R _{10F3}	NIH nude	F	15	Diabético	173	320	2x10 ⁶	veia porta	REVERSÃO do diabetes seguida de hipoglicemia
	10	R _{11F3}	NIH nude	F	16	Diabético	153,5	468	2x10 ⁶	veia porta	Sem reversão do diabetes

Anexo 3: Continuação

Tx	n°	Rato	linhagem	Sexo	Idade (semanas)	Classificação	Peso (gramas)	Glicemia média (mg/dl)	n° de células implantado/rato	óbito do transplante	Resultado do Tx
Tx-4	11	R _{15F3}	NH1 nude	F	12	Diabético	183	385	2x10 ⁶	veia porta	HIPOGLICEMIA
	12	R _{19F3}	NH1 nude	F	12	Diabético	167	351	2x10 ⁶	veia porta	Óbito pós-Tx
	13	R _{20F3}	NH1 nude	F	12	Diabético	180	251	2x10 ⁶	veia porta	Óbito pós-Tx
Tx-5	14	R _{3F3}	NIHnude	F	13	Diabético	158,5	304	1x10 ⁶	Re-Tx em cápsula renal	Reversão parcial do diabetes
	15	R _{3F3}	NIHnude	F	13	Diabético	180,5	296	1x10 ⁶	Re-Tx em cápsula renal	Sem reversão do diabetes
	16	R _{4F3}	NIHnude	F	13	Diabético	154	272	1x10 ⁶	Re-Tx em cápsula renal	Sem reversão do diabetes

Anexo 3: Continuação

Tx	n°	Rato	Inhagem	Sexo	Idade (semanas)	Classificação	Peso (gramas)	Glicemia média (mg/dl)	n° de células implantado/rato	sítio do transplante	Resultado do Tx
Tx-6	17	R _{13F3}	NIH nude	F	16	Diabético	173	320	2x10 ⁶	cápsula renal	REVERSÃO do diabetes seguida de hipoglicemia
	18	R _{14F3}	NIH nude	F	16	Diabético	201	302	2x10 ⁶	cápsula renal	Óbito pós-Tx
Tx-8	19	R _{317/03}	NIH nude	F	9	Diabético	125,5	420	4x10 ⁶	peritônio subparietal	REVERSÃO do diabetes seguida de hipoglicemia
	20	R _{218/03}	NIH nude	F	9	Diabético	120	340	4x10 ⁶	peritônio subparietal	REVERSÃO do diabetes seguida de hipoglicemia
	21	R _{223/03}	NIH nude	F	9	Diabético	116,5	213	4x10 ⁶	peritônio subparietal	REVERSÃO do diabetes seguida de hipoglicemia
Tx-3	22	R _{9F3}	NIH nude	F	15	Hiperglicêmico	199	221	2x10 ⁶	veia porta	REVERSÃO da hiperglicemia imediatamente pós-Tx
Tx-4	23	R _{16F3}	NIH nude	F	12	Hiperglicêmico	143	222	2x10 ⁶	veia porta	Óbito pós-Tx
Tx-6	24	R _{12F3}	NIH nude	F	16	Hiperglicêmico	164	112	2x10 ⁶	cápsula renal	HIPOGLICEMIA pós-Tx e normoglicemia pós-nefrectomia parcial
Tx-7	25	R _{41F4}	NIH nude	F	19	Normoglicêmico	157	79	3x10 ⁶	cavidade peritoneal	Sem reversão do diabetes
	26	R _{42F4}	NIH nude	F	19	Normoglicêmico	165	95	3x10 ⁶	cavidade peritoneal	Sem reversão do diabetes
	27	R _{43F4}	NIH nude	F	19	Normoglicêmico	157	89	3x10 ⁶	cavidade peritoneal	Sem reversão do diabetes
Tx-8	28	R _{251/03}	NIH nude	F	8	Normoglicêmico	126	124	4x10 ⁶	peritônio subparietal	HIPOGLICEMIA
	29	R _{252/03}	NIH nude	F	8	Normoglicêmico	123,5	99	4x10 ⁶	peritônio subparietal	HIPOGLICEMIA
<div> <div> <div>média</div> <div>13</div> </div> <div> <div>166</div> <div>267</div> <div>1,9x10⁶</div> </div> </div>											
<div> <div> <div>SD</div> <div>3</div> </div> <div> <div>39</div> <div>101</div> <div>1,3x10⁶</div> </div> </div>											

Anexo 3: Continuação

Tx	n°	Rato	linhagem	Sexo	Idade (semanas)	Classificação	Peso (gramas)	Glicemia média (mg/dl)	n° de células implantado/rato	efeito do	Resultado do Tx
Tx-9	30	R _{238/03}	NIH heterozigoto	M	9	Diabético	228	334	4x10 ⁶	transplante	
										peritônio subparietal	REVERSÃO do diabetes seguida de hipoglicemia
	31	R _{240/03}	NIH heterozigoto	M	9	Diabético	212,5	350	4x10 ⁶	peritônio subparietal	REVERSÃO do diabetes seguida de hipoglicemia
	32	R _{244/03}	NIH heterozigoto	M	9	Diabético	210,5	293	4x10 ⁶	peritônio subparietal	REVERSÃO do diabetes seguida de hipoglicemia
Tx-10	33	R _{237/03}	NIH heterozigoto	F	8	Normoglicêmico	155,5	110	4x10 ⁶	peritônio subparietal	Manutenção da normoglicemia
	34	R _{258/03}	NIH heterozigoto	F	8	Normoglicêmico	157,5	95	4x10 ⁶	peritônio subparietal	Glicemia em queda a partir do PO-37
média					9		193	236	4x10 ⁶		
SD					1		34	124	0		

Anexo 4: Tx de cápsulas : Características dos receptores e das cápsulas implantadas

Tx	RECEPTOR					Sítio do Tx	Composição das cápsulas	Classificação da Biodifusão quanto a pureza	Procedência do material utilizado na confecção das cápsulas		Função dos componentes da semente	Esterilização	Forma de encapsulamento
	nº	sexo	Linhagem	Idade (semanas)	Classificação				Alimento de estudo	Surgido de Condição			
Tx-1	1	R _{1g4}	NH <i>nude</i>	18	Diabético	parenq, hepático	Biodifusão 80:20 em RPMI	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc	Processo químico	automático
	2	R _{1g4}	NH <i>nude</i>	18	Não diabético	parenq, hepático	Biodifusão 80:20 em RPMI	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc.	Processo químico	automático
Tx-2	3	R ₂₃₋₂	Wistar	20	Não diabético	parenq, hepático	Biodifusão 80:20 em RPMI	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc	Processo químico	automático
	4	R ₂₆₋₂	Wistar	24	Não diabético	parenq, hepático	Biodifusão 80:20 em RPMI	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc	Processo químico	automático
Tx-3	5	R ₂₇₋₂	Wistar	24	Não diabético	parenq, hepático	Biodifusão 80:20 em RPMI	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc	Processo químico	automático
	6	R ₂₈₋₂	Wistar	24	Não diabético	parenq, hepático	Biodifusão 80:20 em RPMI	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc	Processo químico	automático
Tx-4	7	R ₃₀₋₂	Wistar	25	Não diabético	parenq, hepático	Biodifusão 80:20 em RPMI	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc	Processo químico	automático
	8	R ₃₁₋₂	Wistar	25	Não diabético	parenq, hepático	Biodifusão 80:20 em RPMI	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc	Processo químico	automático
Tx-5	9	R _{7g4}	NH <i>nude</i>	5	Diabético	cav, peritoneal	Biodifusão 80:20 em NaCl	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc.	Filtração sob pressão	automático
	10	R _{7T4}	NH <i>nude</i>	10	Diabético	cav, peritoneal	Biodifusão 80:20 em NaCl	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc.	Filtração sob pressão	automático
Tx-6	11	R _{8T4}	NH heterozigoto	7	Não diabético	cav, peritoneal	Biodifusão 80:20 em NaCl	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc.	Filtração sob pressão	automático
	12	R _{9g4}	NH heterozigoto	7	Não diabético	cav, peritoneal	Biodifusão 80:20 em NaCl	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc.	Filtração sob pressão	automático
	13	R _{9g4}	NH heterozigoto	7	Não diabético	cav, peritoneal	Biodifusão 80:20 em NaCl	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc.	Filtração sob pressão	automático
	14	R _{9g4}	NH heterozigoto	7	Não diabético	cav, peritoneal	Biodifusão 80:20 em NaCl	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc.	Filtração sob pressão	automático
Tx-7	15	R ₁₃₋₂	Wistar	14	Não diabético	cav, peritoneal	Biodifusão 80:20 em NaCl	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc	Processo químico	automático
	16	R ₄₁₀₃	NH <i>nude</i>	14	Não diabético	peritônio subperitonal	Biodifusão 80:20 em NaCl	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc.	Filtração sob pressão	automático
Tx-8	17	R ₄₂₀₃	NH <i>nude</i>	14	Não diabético	peritônio subperitonal	Biodifusão 80:20 em NaCl	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc.	Filtração sob pressão	automático
	18	R ₄₃₀₃	NH <i>nude</i>	14	Não diabético	peritônio subperitonal	Biodifusão 80:20 em NaCl	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc.	Filtração sob pressão	automático
Tx-9	19	R ₄₄₀₃	NH <i>nude</i>	14	Não diabético	peritônio subperitonal	Biodifusão 80:20 em NaCl	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc.	Filtração sob pressão	automático
	20	R ₄₅₀₃	NH <i>nude</i>	14	Não diabético	peritônio subperitonal	Biodifusão 80:20 em NaCl	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc.	Filtração sob pressão	automático
	21	R ₄₇₀₃	NH heterozigoto	10	Não diabético	peritônio subperitonal	Biodifusão 80:20 em NaCl	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc.	Filtração sob pressão	automático
	22	R ₄₈₀₃	NH heterozigoto	10	Não diabético	peritônio subperitonal	Biodifusão 80:20 em NaCl	Biodifusão ultra pura	Doação Dr Mares-Guia	Doação Dr Mares-Guia	BloMM, Inc.	Filtração sob pressão	automático

Anexo 4: Continuação

Tx	Nº	Razão	RECEPTOR				Sítio do Tx	Composição das cápsulas	Classificação da Biodifina quanto a pureza	Procedência do material utilizado na confecção das cápsulas		Furtificação dos componentes da cápsula	Misturificação	Forma de encapsulamento
			Linagem	Sexo	Idade (semanas)	Classificação				Alimento de sódio	Sumo de Cerdulina			
Tx-10	23	R ₂₃₃₀₃	NH nude	F	9	Diabético	peritônio subperitonal	Biodifina 80:20 em NaCl	Biodifina pura	Sigma	Doação Dr Mares-Guia	IQUSP	Filtração sob pressão	automático
	24	R ₂₃₃₀₃	NH nude	F	8	Não diabético	peritônio subperitonal	Biodifina 80:20 em NaCl	Biodifina pura	Sigma	Doação Dr Mares-Guia	IQUSP	Filtração sob pressão	automático
	25	R ₂₃₄₀₃	NH nude	F	3	Não diabético	peritônio subperitonal	Biodifina 80:20 em NaCl	Biodifina pura	Sigma	Doação Dr Mares-Guia	IQUSP	Filtração sob pressão	automático
	26	R ₂₃₅₀₃	NH nude	F	3	Não diabético	peritônio subperitonal	Biodifina 80:20 em NaCl	Biodifina pura	Sigma	Doação Dr Mares-Guia	IQUSP	Filtração sob pressão	automático
	27	R ₂₃₅₀₃	NH nude	F	3	Não diabético	peritônio subperitonal	Biodifina 80:20 em NaCl	Biodifina pura	Sigma	Doação Dr Mares-Guia	IQUSP	Filtração sob pressão	automático
Tx-11	28	R ₂₄₇₀₃	NH heterozigoto	F	9	Diabético	peritônio subperitonal	Biodifina 80:20 em NaCl	Biodifina pura	Sigma	Doação Dr Mares-Guia	IQUSP	Filtração sob pressão	automático
	29	R ₂₄₈₀₃	NH heterozigoto	F	3	Não diabético	peritônio subperitonal	Biodifina 80:20 em NaCl	Biodifina pura	Sigma	Doação Dr Mares-Guia	IQUSP	Filtração sob pressão	automático
	30	R ₂₄₉₀₃	NH heterozigoto	F	3	Não diabético	peritônio subperitonal	Biodifina 80:20 em NaCl	Biodifina pura	Sigma	Doação Dr Mares-Guia	IQUSP	Filtração sob pressão	automático
	31	R ₂₅₀₀₃	NH heterozigoto	F	3	Não diabético	peritônio subperitonal	Biodifina 80:20 em NaCl	Biodifina pura	Sigma	Doação Dr Mares-Guia	IQUSP	Filtração sob pressão	automático
12,7														
1,5														

VII. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITA, C.A.M. Clonagem e regulação de genes regulados por glicose em ilhotas pancreáticas humanas. **Tese de Doutorado**, Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 114p, 2002.

ASHCROFT, F.M. & ASHCROFT, S.J.H. The pancreatic β -cell: Editor's introduction. ASHCROFT, F. M. & ASHCROFT, S. J. H. ed. **Insulin: Molecular Biology to Pathology**, Oxford: Oxford University Press, p. 3-4, 1992.

ASFARI, M.; JANJIC, D.; MEDA, P.; LI, G.; HALBAN, P. A. & WOLLHEIM, C. B. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. **Endocrinology**, 130:167-178, 1992.

AULT, A. Edmonton's islet success tough to duplicate elsewhere. **Lancet**, 361:2054, 2003.

BALLINGER, W.F. & LACY, P.E. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. **Surgery**, 72:175-186, 1972.

BANK, H. L. Rapid assessment of islets viability acridine orange and propidium iodide. **In vitro Cell Dev. Biol.**, 24:266-273, 1988.

BERNEY, T.; BÜHLER, L.; CAULFIELD, A.; OBERHOLZER, J.; TOSO, C.H.; ALEJANDRO, R.; COOPER, D.K.C.; RICORDI, C. & MOREL, P.H. Transplantation of islets of Langerhans: new developments. **Swiss Med Wkly.**, 132:671-680, 2002.

BERNEY, T. & RICORDI, C. Immunoisolation of cells and tissues for transplantation. **Cell Transplant**, 8:577-579, 1999.

BRANDHORST, D.; BRANDHORST, H.; ZWOLINSKI, A.; NAHIDI, F.& BRETZEL, R.G. Prevention of early islet graft failure by selective inducible nitric oxide synthase inhibitors after pig to nude rat intraportal islet transplantation. **Transplantation**, 71: 179-184, 2001.

BRANDHORST, D.; BRANDHORST, H.; ZWOLINSKI, A.; NAHIDI, F.& BRETZEL, R.G. High-dosed nicotinamide decreases early graft failure pig to nude rat intraportal islet transplantation. **Transplantation**, 73: 74-79, 2002.

CALAFIORE, R. Encapsulated Islet Transplant without Immunosuppression. Disponível *on line* em <http://www.DiabetesPortal.com>. Acesso em 03 de junho 2004.

CALAFIORE, R. Perspectives in pancreatic and islet cell transplantation for the therapy of IDDM. **Diabetes Care**, 20:889 -896, 1997.

- CALAFIORE, R. & BASTA, G. Microencapsulation of pancreatic islets: theoretical principles, technologies and practice. In: Ricordi, C. ed. **Methods in cell transplantation**, Austin: R. G. Landes Company, p.587-609, 1995.
- CHAIB, E.; PAPALLOIS, A.; BRONS, I.G.M. & CALNE, R.Y. Transplante isogênico de Ilhotas de Langerhans no fígado de ratos (Metodologia para separação e purificação das Ilhotas de Langerhans). **Arq. Gastroenterol**, 37(1):44–51, 2000.
- CHRISTIE, M.R. Aetiology of type I diabetes: immunological aspects. In: ASHCROFT, F.M. & ASHCROFT, S.J.H. ed. **Insulin: Molecular Biology to Pathology**, Oxford: Oxford University Press, p. 306-346, 1992.
- DAVALLI, A.M.; OGAWA, Y.; RICORDI, C.; SCHARP, D.W.; BONNER-WEIR, S. & WEIER, G.C. A selective decrease in the beta cell mass of human islets transplanted into diabetic nude mice. **Transplantation**, 59(6): 817-820, 1995.
- DAVALLI, A.M.; SCAGLIA, L.; ZANGEN, D.H.; HOLLISTER, J.; BONNER-WEIR, S. & WEIER, G.C. Vulnerability of islets in the immediate post transplantation period: Dynamic changes in structure and function. **Diabetes**, 45(9):1161-1167, 1996.
- DE VOS, P.; HAMEL, A.F. & TATARKIEWICZ, K. Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets. **Diabetologia**, 45:159-173, 2002.

- DUVIVIER-KALI, V.F.; OMER, A.; PARENT, R.J.; O'NEIL, J.J.; WEIR, G.C. Complete protection of islets against allorejection and autoimmunity by a simple barium-alginate membrane. **Diabetes**, 50:1698-1705, 2001.
- EASD - EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES
EUROPEAN DIMENSION OF DIABETES RESEARCH. **Diabetologia**, 39:Suppl 5-11, 1996.
- EIZIRIK, D.L.; JANSSON, L.; FLODSTROM, M.; HELLERSTROM, C.; ANDERSSON, A. Mechanisms of defective glucose-induced insulin release in human pancreatic islets transplanted to diabetic nude mice. **J. Clin. Endocrinol Metabol.**, 82:2660-2663, 1997.
- ELIASCHEWITZ, F. G.; AITA, C. A. M.; GENZINI, T.; NORONHA, I. L.; LOJUDICE, F. H.; LABRIOLA, L.; KROGH, K.; OLIVEIRA, E. M. C.; SILVA, I. C.; MENDONÇA, Z.; FRANCO, D.; MIRANDA, M. P.; NODA, E.; DE CASTRO, L. A.; ANDREOLLI, M.; GOLDBERG, A. C. & SOGAYAR, M. C. First Brazilian pancreatic islet transplantation in a patient with type 1 diabetes mellitus. **Transplantation Proceedings**, 36: 1117-1118, 2004.
- FAN, M.Y.; LUM, Z-P.; FU, X-W.; LEVESQUE, L.; TAI, I.T.; SUN, A.M. Reversal of diabetes in BB rats by transplantation of encapsulated pancreatic islets. **Diabetes**, 39:519-522, 1990.

FRAGA, D.W.; SABEK, O.; HATHAWAY, D.K.; & GABER, A.O. A comparison of media supplement methods for the extended culture of human islet tissue. **Transplantation**, 65:1060-1066, 1998.

FRITSCHY, W.M.; STRUBBE, J.H.; WOLTERS, G.H.J.; VAN SCHILFGAARDE, R. Glucose tolerance and plasma insulin response to intravenous glucose infusion and test meal in rats with microencapsulated islet allografts. **Diabetologia**, 34:542- 547, 1991.

GABER, A.O.; FRAGA, D.W.; CALLICUTT, C.S.; GERLING, I.C.; SABEK, O.M. & KOTB, M. Improved in vivo pancreatic islet function after prolonged in vitro islet culture. **Transplantation**, 72 (11):1730-1736, 2001.

GUIGNARD, A.P.; OBERHOLZER, J.; BENHAMOU, P-Y.; TOUZET, S.; BUCHER, P.; PENFORNIS, A.; BAYLE, F.; KESSLER, L.; THIVOLET, C.; BADET, L.; MOREL, P.; COLIN, C. Cost analysis of human islet transplantation for the treatment of type 1 diabetes in the Swiss-French consortium GRAGIL. **Diabetes Care**, 27:895-900, 2004.

HAYEK, A. & BEATTIE, G.M. Experimental transplantation of human fetal and adult pancreatic islets. **J. Clin. Endocrinol. Metabol.**, 82:2471-2475, 1997.

HELLMAN, B.; GYLFE, E.; GRAPENGIESSER, E.; LUND, P. & MARCSTRÖM, A. Cytoplasmatic calcium and insulin secretion. In: FLATT, P.R. ed: **Nutrient regulation of insulin secretion**, Portland Press, Londo, p. 213-246, 1992.

HERING, B.J.; KANDASWAMY, R.; HARMON, J.V.; ANSITE, J.D.; CLEMMINGS, S.M.; SAKAI, T.; PARASKEVAS, S.; ECKMAN, P.M.; SAGESHIMA, J.; NAKANO, M.; SAWADA, T.; MATSUMOTO, I.; ZHANG, H.J.; SUTHERLAND, D.E.R. & BLUESTONE, J.A. Transplantation of cultured islets from two-layer preserved pancreases in type 1 Diabetes with anti-CD3 Antibody. **Am J Transplant.**, 4:390-401, 2004.

IPTR – INTERNATIONAL PANCREAS TRANSPLANT REGISTRY. Midyear Update 2003. Total number of pancreas transplant. Disponível *on line* em <http://iptr.umn.edu/annualreports.htm>. Acesso em 20 de maio de 2004.

ITR – INTERNATIONAL ISLET TRANSPLANT REGISTRY. **Newsletter**, 8:1-20, 2001.

ITR – INTERNATIONAL ISLET TRANSPLANT REGISTRY. The history of *Diabetes*. Disponível *on line* em <http://www.med.uni-giessen.de/itr>. Acesso em 20 de maio de 2004.

JONES, P.M. & PERSAUD, S.J. Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulations of insulin secretion from pancreatic β -cells. **Endocrine reviews**, 19(4):421-461, 1998.

KACZOROWSKI, D.J.; PATTERSON, E.S.; JASTROMB, W.E. & SHAMBLOTT, M.J. Glucose-responsive insulin-producing cells from stem cells. **Diabetes Metab. Res. Ver.**, 18:442-450, 2002.

- KANO, Y.; ITO, T.; GATO, Y.; HIRAI, H.; KIDA, K. Lack of recurrence of insulin-dependent diabetes mellitus in syngeneic and allogeneic islet-transplanted diabetic biobreeding. **Transplantation**, 65: 1543-1548, 1998.
- KING, A.; ANDERSSON, A.; STRAND, B.L.; LAU, J.; SKJAK-BRAEK, G. & SANDLER, S. The role of capsule composition and biologic responses in the function of transplanted islets of Langerhans. **Transplantation**, 76:275-279, 2003.
- KING, H.; AUBERT, R.E. & HERMAN, W.H. Global Burden of Diabetes, 1995 - 2025. **Diabetes Care**, 21:1414-1431, 1998.
- LAKEY, J.R.; WARNOCK, G.L.; SHAPIRO, A.M.; KORBUTT, G.S.; AO, L.; KNETEMAN, N.M.; RAJOTTE, R.V. Intraductal collagenase delivery into the human pancreas using syringe loading or controlled perfusion. **Cell Transplant**, 8:285-292, 1999.
- LANZA, R.P.; BEYER, A.M.; STARUK, J.E.; CHICK, W.L. Biohybrid artificial pancreas. **Transplantation**, 56:1067-1072, 1993.
- LANZA, R.P.; BUTLER, D.H.; BORLAND, K.M.; STARUK, J.E.; FAUSTMAN, D.L.; SOLOMON, B.A.; MULLER, T.E.; RUPP, R.G.; MAKI, T.; MONACO, A.P.; CHICK, W.L. Xenotransplantation of canine, bovine, and porcine islets in diabetic rats without immunosuppression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88:11100-11104, 1991.

- LANZA, R.P.; SOLOMON, B.A.; CHICK, W.L. Hollow fibers and Macroencapsulamento In: RICORDI, C. (ed.), Methods in cell transplantation. Austin: R. G. **Landes Company**, pp. 611-615, 1995.
- LEE, G.M. & PALSSON, B.O. Simplified method of making alginate-polylysine microcapsules for hybridoma cell cultures using RPMI 1640 medium. **Biotechnol. Techniq.**, 4:341-344, 1990.
- LEE, G.M.; CHUCK, A.S. & PALSSON, B.O. Cell culture conditions Determine the enhancement of specific monoclonal antibody productivity of calcium alginate-entrapped S3H5/ γ 2bA2 Hybridoma cells. **Biotechnology and Bioengineering**, 41:330-340, 1993.
- LIM, F. & SUN, A. M. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. **Science**, 210: 908-910, 1980.
- LINETSKY, E.; SELVAGGI, G.; BOTTINO, R.; KONG, S.S.; QUIAN, T.; ALEJANDRO, R.; RICORDI, C. Comparasion of collagenase type P and Liberase during human islet isolation using the automated method. **Transplant Proc.**, 27:3264, 1995.
- LONDON, N.J.M.; ROBERTSON, G.S.M.; CHADWICK, D.R.; JOHNSON, P.R.V.; JAMES, R.F.L.; BELL, P.R.F. Human pancreatic islet isolation and transplantação. **Clin. Transplantation**, 8:421-459, 1994.

- LONDON, N.J.M.; ROBERTSON, G.S.M.; CHADWICK, R.F.L.; BELE, P.R.F. Adult islets purification. In: Ricordi, C. ed. **Methods in cell transplantation**. Austin: R.G. Landes Company, p.439-454, 1995.
- LUM, Z-P; KRESTOW, M.; TAI, I.T.; VACEK, I.; SUN, A.M. Xenografts of rat islets into diabetic mice. **Transplantation**, 53:1180-183, 1992.
- LUM, Z. P. ; TAI, I. T.; KRESTOW, M.; NORTON, J.; VACEK, I.& SUN, A. M. Prolonged reversal of diabetic state in NOD mice by xenografts of microencapsulated rat islets. **Diabetes**, 40: 1511-1516, 1991.
- MAMODE, N. & SUTHERLAND, D.R.E. Transplantation for diabetes mellitus. **Br. J. Surgery**, 90:1031-1032, 2003.
- MARES-GUIA, M. & RICORDI, C. Novel hetero-polysaccharide conjugates, novel s-INP polysaccharide gels and methods and using the same. *In* **The United States Patent and Trademark Office Application for Letters Patent**. June 17, 1997. Patent 540519-2004.1.
- MIEDEMA, K. Laboratory tests in diagnosis and management of Diabetes Mellitus practical considerations. **Clin Chem Lab Med.**, 41:1259-1265, 2003.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diabetes Mellitus: Guia básico para diagnóstico e Tratamento. Brasília, 1996.

- NEWSHOLME, E.A.; BEVAN, S.J.; DIMITRIADIS, G.D.; KELLY, R.P. Physiological aspects of insulin action. In: ASHCROFT, F. M. & ASHCROFT, S. J. H. ed. **Insulin: Molecular Biology to Pathology**, Oxford: Oxford University Press, p.155-156, 1992.
- NORONHA, I. L. HARTTLEY, B., CAMERON, J. S., WALDHERR, R. Detection of IL-1 β and TNF- α message and protein in renal allograft biopsies. **Transplantation**, 56: 1026-1029, 1993.
- PAUL, R.R. Medical progress: Islet transplantation as a treatment for diabetes – A work in progress. **J. N. Engl. Med.**, 350:694-705, 2004.
- PHILIPPE, J. Structure and pancreatic expression of the insulin and glucagon genes. **Endocrine Reviews**, 12:1-20, 1991.
- RIBEIRO, M.M. Estudo sobre a permeabilidade de microcápsulas de biodritin a proteínas. A importância da carga nítida da proteína. **Tese de Mestrado**, apresentada ao Depto de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília: 4-10, 1999.
- RICORDI, C.; LACY, P.E.; FINKE, E.H.; OLACK, B.J. & SHARP, D.W. The automated method for pancreatic islets separation. **Diabetes**, 37:413-420, 1988.

- RICORDI, C.; TZAKIS, A. G.; CARROLL, P. B.; ZENG, Y.J.; RILO, H. L.; ALEJANDRO, R.; SHAPIRO, A.; FUNG, J. J ; DEMETRIS, A. J.; MINTZ, D.H.; *et al.* Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. **Transplantation**, 53: 407-414, 1992.
- RICORDI, C. & RASTELLINI, C. Automated method for pancreatic islets separation. In: RICORDI, C. ed. **Methods in cell transplantation**. Austin: R.G. LandesCompany, p. 433-438, 1995.
- RICORDI, C.; TZAKIS, A. G.; CARROLL, P. B.; ZENG, Y.J.; RILO, H. L.; ALEJANDRO, R.; SHAPIRO, A.; FUNG, J. J ; DEMETRIS, A. J.; MINTZ, D.H.; *et al.* Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. **Transplantation**, 53: 407-414, 1992.
- ROLSTAD, B. The athymic nude rat; an animal experimental model to reveal novel aspects of innate immune responses? **Immunol. Rev.**, 184:136-144, 2001.
- RYAN, E.A.; LAKEY, J.R.T.; PATY, B.W.; IMES, S.; KORBUTT, G.S.; KNETEMAN, N.M.; BIGAM, D.; RAJOTTE, R.V.; SHAPIRO, A.M.J. Successful islet transplantation: Continuous insulin reverse provides long-term glycemic control. **Diabetes**, 51:2148-2157, 2002.
- SECCHI, A.; DI CARLO, V. & POZZA, G. Pancreas and islet transplantation: current progress, problems and perspectives. **Horm. Metab. Res.**, 29:1-8, 1997.

SERUP, P.; MADSEN, O. & MANDRUP-POULSEN, T.. Science, medicine and the future. Islet and stem cell transplantation for treating diabetes. **B.M.J.**, 322:29-32, 2001.

SHAPIRO, A.M.; LAKEY, J.R.; RYAN, E.A.; KORBUTT, G.S.; TOTH, E.; WARNOCK, G.L.; KNETEMAN, N.M.; RAJOTTE, R.V. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. **N. J. Engl. Med.**, 343:230-238, 2000.

SHAPIRO, A.M.; RICORDI, C & HERING, B. Edmonton's islets success has indeed been replicated elsewhere. **Lancet**, 362:1242, 2003.

SHAPIRO, A.M. & RICORDI, C. Unraveling the secrets of single donor success in islet transplantation. **Am. J. Transplant.**, 4:295-298, 2004.

SOON-SHIONG, P.; HEINTZ, R. E.; MERIDETH, N.; YAO, Q. X. ; YAO, Z.; ZHENG, T.; MURPHY, M.; MOLONEY, M. K.; SCHMEHL, M. & HARRIS, M.; MENDEZ, R.; MENDEZ, R. & SANDFORD, P. A. Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. **Lancet**, 343: 950-951, 1994.

SUN, Y.; MA, X.; ZHOU, D.; VACEK, I.; SUN, A.M. Normalization of diabetes in spontaneously diabetic Cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. **J. Clin. Invest.**, 98:1417-1422, 1996.

- SUTHERLAND, D.E.; MATAS, A.J.; GOETZ, F.C. & NAJARIAN, J.S. Transplantation of dispersed pancreatic islet tissue in humans: autografts and allografts. **Diabetes**, 29:Suppl 1:31-44, 1980.
- TITUS, T.; BADET, L. & GRAY, D.W.R. Islet cell transplantation for insulin-dependant diabetes mellitus: perspectives from the present and prospects for the future. **Expert. Ver. Mol. Med.**, 2000:1-28, 2000.
- TZAKIS, A.G.; RICORDI, C.; ALEJANDRO, R.; ZENG, Y.; FUNG, J.J., TODO, S.; DEMETRIS, A.J.; MINTZ, D.H.; STARZL, T.E. Pancreatic islet transplantation after upper abdominal exenteration and liver replacement. **Lancet**, 336:402-405, 1990.
- UEKI, M.; YASUNAMI, Y.; MONTOYAMA, K.; FUNAKOSHI, A.; IKEDA, S.; TANAKA, M. The amelioration of hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats after the intraportal transplantation of an insufficient number of islets by nicotinamide treatment. **Transplantation**, 60: 313-317, 1995.
- WANG, W.; GU, Y.; HORI, H.; SAKURAI, T.; HIURA, A.; SUMI, S.; TABATA, Y.; INOUE, K. Subcutaneous transplantation of macroencapsulated porcine pancreatic endocrine cells normalizes hyperglycemia in diabetic mice. **Transplantation**, 76: 290-296, 2003.
- WINTER, W. E. & SCHATZ, D. Prevention strategies for type 1 diabetes mellitus. Current status and future directions. **Biodrugs**, 17:39-64, 2003.

WHITE, S. A.; JAMES, R. F. L.; SWIFT, R. M.; KIMBER, R. M. & NICHOLSON, M. L. Human islet cell transplantation – future prospects. **Diabetic Medicine**, 18:78-103, 2001.

WHITE, S.A. & NICHOLSON, M.L. Xenotransplantation. **Br. J. Surg.**, 86:1499-1514, 1999.

YANG, H.; O'HALLI, W.; KEARNS, H.; WRIGHT JR, J.R. Long-term function of fish islet xenografts in mice by alginate encapsulation. **Transplantation**, 64:28-32, 1997.

YANG, R. & WRIGHT JR, R. Human β cells are exceedingly resistant to streptozotocin *in vivo*. **Endocrinology**, 143:2491-2495, 2002.