UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Modelo de transplante de ilhotas pancreáticas para a câmara anterior do olho em
camundongos diabéticos

Leonardo dos Santos Castellar

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientador:

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Modelo de transplante de ilhotas pancreáticas para a câmara anterior do olho em
camundongos diabéticos

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Leonardo dos Santos Castellar

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientador:

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

São Paulo
2015

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

Castellar, Leonardo dos Santos
C348m Modelo de transplante de ilhotas pancreáticas para a câmara anterior do olho em camundongos diabéticos / Leonardo dos Santos Castellar. -- São Paulo, 2015.
91p

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Martins, Joilson de Oliveira

1. Diabetes mellitus 2. Transplantes I. T. II. Martins, Joilson de Oliveira, orientador.

616.462 CDD

Leonardo dos Santos Castellar

Modelo de transplante de ilhotas pancreáticas para a câmara anterior do olho em
camundongos diabéticos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Orientador/presidente

Prof. Dr. Elias David Neto

Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

São Paulo, 12 de março de 2015.

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares e amigos pelo estímulo
e apoio ao longo de todo o caminho.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por ser o alicerce de tudo. Pela estabilidade e por aguentar aquela criança teimosa e curiosa. Esse trabalho não aconteceria sem vocês.

Ao Prof. Joilson, por me dar a oportunidade quando muitos docentes não o teriam feito e por respeitar a minha forma de trabalhar, assim como os diversos conselhos e ensinamentos ao longo dos anos.

Aos colegas do laboratório pelo conhecimento, ajuda nos procedimentos e conselhos sobre o projeto. Todos temos uma parcela desse trabalho.

Aos ICs e amigos Tamara, Felipe e Daniel, que tornaram esse trabalho possível e na maioria das vezes mais divertido e por sempre auxiliarem nas diversas improvisações que fizemos.

Aos amigos da AAAPB, que sabem ser a principal causa deste trabalho ter acontecido.

Aos amigos da 101, que por diversas vezes me ajudaram e tornaram a realização desse projeto menos complicada.

Aos amigos, pela valiosa ajuda, pelos inúmeros conselhos, pelas correções e pelos momentos de procrastinação.

À Regina, por sempre confiar e acreditar na minha capacidade de realizar este projeto, fornecendo apoio em todos os momentos.

Às entidades da FCF-USP, por demonstrarem a importância que nossa *alma mater* tem na vida de todos nós.

A todos os professores, bons e ruins, que me estimularam o questionamento e me ensinaram a buscar incansavelmente pelas respostas.

Às agências de fomento, CNPq, FAPESP e PROEX/CAPES, por fornecerem o apoio financeiro necessário à realização desse projeto.

"É por isso que se mandam as crianças à escola: não tanto para que aprendam alguma coisa, mas para que se habituem a estar calmas e sentadas e a cumprir escrupulosamente o que se lhes ordena, de modo que depois não pensem mesmo que têm de pôr em prática as suas ideias"

Immanuel Kant

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Programa Jovem Pesquisador 2010/02272-0 e Auxílio à Pesquisa – Regular 2014/05214-1.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - O <i>Diabetes Mellitus</i>	1
1.2 - Epidemiologia do <i>diabetes mellitus</i>	2
1.3 - Epidemiologia e Fisiopatologia do <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 1	5
1.4 - Modelo de <i>diabetes mellitus</i> utilizado	11
1.5 - O Transplante de ilhotas de Langerhans	12
1.6 - A Câmara anterior do olho como sítio receptor	17
1.7 - A resposta imune na câmara anterior do olho	19
2. OBJETIVOS	22
2.1 - Objetivos específicos	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 - Animais.....	23
3.1.1 - Animais utilizados na padronização do isolamento de ilhotas	23
3.1.2 - Animais submetidos ao transplante de ilhotas	24
3.2 - Indução do <i>Diabetes mellitus</i>	24
3.3 - Isolamento de ilhotas.....	25
3.4 - Padronização do isolamento de ilhotas	25
3.5 - Transplante para a câmara anterior do olho	26
3.6 - Dosagem de glicose sanguínea	26
3.7 - Teste de tolerância à glicose	26
3.8 - Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1 - O método de isolamento de ilhotas	27
4.2 - Padronização do isolamento de ilhotas	31
4.3 - O método do transplante de ilhotas para a câmara anterior do olho.....	34
4.4 - O transplante de ilhotas para a câmara anterior do olho	37
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXO I	75
ANEXO II	76

RESUMO

CASTELLAR, L. S. **Modelo de transplante de ilhotas pancreáticas para a câmara anterior do olho em camundongos diabéticos**. 2015. 91p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Estima-se que, em 2013, cerca de 382 milhões de pessoas eram portadoras de diabetes mundialmente. Já o *diabetes mellitus* do tipo 1 (DMT1) representa de 5-10% desse total de casos, cujo tratamento atual se pauta na administração de insulina exógena. Contudo, desde a publicação do protocolo de Edmonton, o transplante de ilhotas pancreáticas se apresenta como nova técnica no tratamento para o DMT1, inclusive obtendo a independência de insulina em alguns casos. Apesar disso, a escolha do sítio receptor ainda é essencial para diminuir efeitos adversos e permitir o acompanhamento do enxerto. Nesse sentido, destaca-se o transplante de ilhotas para a câmara anterior do olho, pois permite, além do restabelecimento do controle glicêmico, o estudo da fisiologia dos enxertos *in vivo*. Dessa forma, o objetivo foi estabelecer metodologia de isolamento e transplante de ilhotas de alta reprodutibilidade e baixo custo, utilizando a câmara anterior do olho como sítio receptor. O isolamento foi realizado via injeção de solução de collagenase (1 mg/mL via ducto colédoco) em camundongos machos C57BL/6 hígidos de 8 semanas de idade e posterior transplante dessas ilhotas para camundongos machos da mesma espécie com diabetes induzido por injeção de aloxana (60 mg/kg, i.v.). Esses camundongos foram submetidos a infusão de aproximadamente 250 equivalentes de ilhotas (IEQs) para a câmara anterior do olho e tiveram sua glicemia e alteração de massa corpórea acompanhadas por 14 dias após o transplante. Também foi realizado teste de tolerância a glicose via injeção de solução de glicose (2g/kg i.p.) e realização da curva glicêmica. Obteve-se, na etapa de padronização, que a adição de 0,5% (%p/v) de albumina de soro bovino à solução de collagenase foi capaz de aumentar o número de IEQs isolados por animal. Quanto ao transplante, obteve-se que 50% dos animais submetidos à técnica tiveram diminuição significativa na sua glicemia ($172,5 \pm 6,4$ mg/dL), quando comparados com o grupo controle diabético ($582,8 \pm 27,5$ mg/dL) ($p < 0,05$). Entretanto, todos os animais tiveram aumento significativo da massa corpórea no período de acompanhamento e glicemia de jejum significativamente menor que os animais diabéticos ($p < 0,05$). Ademais, a curva glicêmica dos animais que tiveram transplante considerado bem sucedido, no teste de tolerância a glicose, se aproxima da curva do grupo controle sadio. Conclui-se que o modelo de transplante de ilhotas pancreáticas para a câmara anterior do olho foi bem estabelecido neste projeto, confirmado pelos resultados que evidenciam o transplante de ilhotas funcionais capazes de reduzir sensivelmente a glicemia e promover o ganho de peso em camundongos diabéticos.

Palavras-chave: diabetes; aloxana; transplante de ilhotas; câmara anterior do olho.

ABSTRACT

CASTELLAR, L. S. **Model of Pancreatic islet transplantation to the anterior chamber of the eye in diabetic mice.** 2015. 91p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

It is estimated that, in 2013, around 382 million people had diabetes worldwide. Of that number, 5-10% represented cases of T1DM, which treatment is based in the administration of exogenous insulin. However, since the Edmonton protocol was published, islet transplantation presented itself as novel technique for T1DM treatment, achieving insulin independence in some cases. Although, recipient site choice is still essential to diminish side effects and enable graft follow up. In that sense, transplantation to the anterior chamber of the eye stands out, since it allows, beyond the reestablishment of glycemic control, study of islet physiology *in vivo*. That way, the objective was to establish a low cost and high reproducible model of islet isolation and transplantation, using the anterior chamber of the eye as receptor site. Islet isolation was made by injection of collagenase solution (1 mg/mL via common bile duct) in 8 week old healthy male C57BL/6 mice and followed by transplantation of these islets to male mice of the same age and species with diabetes induced by alloxan injection (60 mg/kg i.v.). These mice were subject of 250 islet equivalents (IEQs) infusion to the anterior chamber of the eye and had their blood glucose and change in body mass monitored for 14 days after transplantation. A glucose tolerance test (GTT) was also made, by injection of glucose solution (2g/kg i.p.) and a glycemic curve was plotted. In the standardization period, was observed that the addition of 0,5% (%w/v) bovine serum albumin is capable of increasing the number of IEQs isolated from each animal. About the transplants, was obtained that 50% of animals subject to transplantation had their blood glucose decreased significantly ($172,5 \pm 6,4$ mg/dL), when compared to the diabetic control group ($582,8 \pm 27,5$ mg/dL) ($p < 0,05$). However, all animals subject to the procedure had significant body mass increase, when compared to the same control group and fasting blood glucose significantly lower than diabetic animals ($p < 0,05$). Moreover, the glycemic curve of animals, who had their transplantation considered successful, was similar to that found in healthy control animals, in the GTT. We conclude that the model of transplant to the anterior chamber of the eye is well established in this project, which is confirmed by results that shows transplantation of functional islets, capable of promoting a significant decrease in blood glucose and an increase in total body mass in diabetic animals.

Keywords: diabetes; alloxan, islet transplantation; anterior chamber of the eye.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Número de pessoas com diabetes no mundo por região.....	3
Figura 2- 10 países com maior número de pessoas com diabetes	4
Figura 3 - Fenda de ligação do MHC classe II ao TCR	7
Figura 4 - Micrografia de ilhotas pancreáticas (coloração HE). A - Ilhota normal. B - Ilhota com intensa infiltração leucocitária (insulite)	9
Figura 5 - Perda progressiva de células beta no DMT1 e eventos relacionados	10
Figura 6 - Método automatizado de isolamento de ilhotas humanas	14
Figura 7 - Revascularização em enxertos de ilhotas pancreáticas.....	15
Figura 8 - Anatomia do olho e suas câmaras	18
Figura 9 - Instrumentos para isolamento de ilhotas.....	27
Figura 10 - A - Identificação do ducto pancreático. B - Pinçamento da papila duodenal.	28
Figura 11 - A - Punção do ducto colédoco. B, C e D - Dilatação do pâncreas com solução de collagenase 1 mg/mL	29
Figura 12 - A - Tecido para coleta manual de ilhotas (Setas: IEQs). B - IEQs em meio de cultura RPMI 1640	30
Figura 13 - Número médio de IEQ obtidos por concentração de BSA (%p/v) adicionada à solução 1 mg/mL de collagenase	33
Figura 14 - Dispersão do número médio de IEQ isolados por concentração de BSA (%p/v)	33
Figura 15 – A - Materiais para a realização do transplante. B – Cânula adaptada com capilar.....	34
Figura 16 - A - Concentração de ilhotas no centro da placa de petri.....	36
Figura 17 - A - Punção da córnea com agulha 26G. B - Inserção da cânula na câmara anterior do olho	36
Figura 18 - Transplantes realizados para a câmara anterior do olho	37
Figura 19 - Glicemia média dos animais	38
Figura 20 - Variação média da massa corpórea (g) nos animais	38
Figura 21 - Equivalentes de ilhotas (IEQ) isolados por animal para transplante.....	39
Figura 22 - Evolução da glicemia (mg/dL) dos animais transplantados (n=4)	40
Figura 23 - Evolução da massa corpórea (g) dos animais transplantados (n=4)	40
Figura 24 - Glicemia média (mg/dL) após 14 dias.	41
Figura 25 - Variação média da massa corpórea (g) nos animais após 14 dias do transplante.....	42
Figura 26 - Teste de tolerância à glicose do grupo controle (Cx)	43
Figura 27 - Teste de tolerância à glicose do grupo controle diabético (Dx)	43
Figura 28 - Teste de tolerância à glicose do grupo Transplantado (Tx)	44
Figura 29 - Área sob a curva dos testes de tolerância à glicose	45
Figura 30 - Glicemia média em jejum	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Risco familiar de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 1	6
Tabela 2 - Grupos utilizados na padronização do processo de isolamento de ilhotas	23
Tabela 3 - Grupos de animais no experimento de transplante de ilhotas	24
Tabela 4 - Quantidade de IEQ obtidos por injeção de solução de colagenase 1 mg/mL	32
Tabela 5 - Quantidade de IEQ obtidos por injeção de solução de colagenase 1 mg/mL contendo inibidor de tripsina de semente de soja 1 mg/mL	33
Tabela 6 - Quantidade de IEQ obtidos por injeção de solução de colagenase 1 mg/mL por concentração de BSA (%p/v) adicionado	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAID	<i>Anterior Chamber Associated Immune Deviation</i> (Desvio imune associado à câmara anterior)
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ADP	Adenosina difosfato
AUC	<i>Area Under Curve</i> (Área sob a curva)
BCS	<i>Bovine Calf Serum</i> (Soro fetal bovino)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina de soro bovino)
CD	Cluster of Differentiation (Grupo de Diferenciação)
Cx	Grupo Controle Salina
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMT1	<i>Diabetes Mellitus</i> do tipo 1
DMT2	<i>Diabetes Mellitus</i> do tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dx	Grupo Controle Diabético
EPM	Erro Padrão Da Média
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
GAD ₆₅	Descarboxilase do ácido glutâmico de 65 kDa
GLUT	<i>Glucose Transporter</i> (Transportador de glicose)
GSH	Glutathione – Forma reduzida
GTT	<i>Glucose Tolerance Test</i> (Teste de tolerância a glicose)
HbA _{1c}	Hemoglobina glicada
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IA2	Anticorpo anti-insulinoma 2
IAA	Autoanticorpo anti-ilhota
ICA	Islet Cell Autoantibody (Anticorpo anti célula de ilhota)
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IEQ	<i>Islet Equivalent</i> (Equivalente de ilhota)
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina

ITS	Inibidor de tripsina de semente de soja
LADA	<i>Latent Autoimmune Diabetes of Adults</i>
α -MSH	Hormônio Estimulador De Melanócito Alfa
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NKT	Linfócito T <i>Natural Killer</i>
NOD	Non-Obese Diabetic
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Tampão fosfato salina)
PMN	Polimorfonucleares
Po ₂	Pressão parcial de oxigênio
POD	<i>Post-Operative Day</i> (Dia pós-operatório)
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SHIELD	<i>Study to Help Improve Early evaluation and management of risk factors Leading to Diabetes</i>
STZ	Estreptozotocina
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Transforming Growth Factor β
Th1	Linfócito T auxiliador 1
Tx	Grupo Receptor de Transplante
Tx +	Grupo Transplante Bem Sucedido
Tx -	Grupo Transplante Mal Sucedido
VPP	Valor Preditivo Positivo
ZnT8	Transportador de zinco 8

1. INTRODUÇÃO

1.1 - O *Diabetes Mellitus*

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), “o *diabetes mellitus* (DM) compreende grupo de patologias relacionada à hiperglicemia, que pode ser decorrente de deficiência na secreção de insulina, de problemas relativos a resposta à insulina, ou por ambos os mecanismos” (SBD, 2014).

Atualmente o DM pode ser classificado em quatro diferentes tipos, baseados em critérios etiológicos de desenvolvimento da doença (SBD, 2014; ADA, 2014), sendo eles:

- DM tipo 1 (DMT1), correspondente à destruição das células β pancreáticas produtoras de insulina;
- DM tipo 2 (DMT2), relacionado a problemas progressivos na secreção de insulina associada a resistência à insulina;
- DM gestacional, diz respeito ao diabetes diagnosticado durante a gestação que não se encaixa claramente nos tipos acima;
- Outros tipos de DM, corresponde a defeitos diversos no mecanismo de -- produção e secreção de insulina que não se assemelham aos tipos 1 e 2.

Convém lembrar que, apesar desses critérios de classificação etiológica do DM compreenderem a grande maioria dos casos, a apresentação da doença ocorre de forma heterogênea na população, sendo, muitas vezes, difícil encaixar o paciente em qualquer dos grupos descritos (ADA, 2014).

Contudo, apesar desses quatro grupos etiológicos distintos, todos partilham de sintomas comuns, cuja presença pode ocorrer isoladamente ou em conjunto, sendo eles: aumento na frequência urinária (poliúria), sede excessiva (polidipsia), fome excessiva (polifagia), perda de peso, fadiga e visão turva, podendo estar presentes de forma conjunta ou isoladamente (American Diabetes Association - www.diabetes.org; CLARK, 2007).

Entretanto, o grupo SHIELD (*Study to Help Improve Early evaluation and management of risk factors Leading to Diabetes*) realizou estudo com 15.794 pessoas, nos Estados Unidos em 2007, e verificou a ocorrência dos sintomas do diabetes na população diagnosticada com DM tipo 1 e DM tipo 2, comparando-a com a população

sadia com alto risco e baixo risco de desenvolver diabetes (CLARK, 2007). Obteve-se então que mesmo nos pacientes diabéticos, somente 56% dos pacientes experimentou algum desses sintomas, sendo o mais comum a poliúria, que apenas cerca de 30% dos pacientes relata ter ocorrido no último ano. Tal achado foi explicado por tais sintomas serem decorrentes diretamente da hiperglicemia elevada e não unicamente da presença do diabetes (CLARK, 2007). Isto ilustra a necessidade do controle da glicemia nos sintomas da doença.

Isto posto, é necessário dizer que o critério diagnóstico do DM não ocorre baseado apenas em achados clínicos, como os sintomas acima descritos, mas também via achados laboratoriais. Dessa forma, o diagnóstico pode ser feito de quatro formas (ADA, 2014):

- Pela presença dos sintomas de diabetes associado a glicose plasmática ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L);
- Glicose plasmática em jejum de ao menos 8 horas ≥ 126 mg/dL (7 mmol/L);
- Glicose plasmática ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) 2 horas após ingestão oral de 75g de glicose em solução aquosa;
- HbA_{1c} (Hemoglobina glicada) $\geq 6,5\%$.

1.2- Epidemiologia do *diabetes mellitus*

Estudo estima que, no ano 2013, cerca de 382 milhões de pessoas entre 20 e 79 anos eram portadoras de diabetes mundialmente (Figura 1), com expectativa que esse número alcance a marca de 592 milhões de pessoas até o ano de 2035, dado o aumento na população mundial acima de 65 anos e a maior prevalência esperada da obesidade e do sedentarismo (GUARIGATA, 2013).

No Brasil, estimava-se que, em 2006, 5,3% da população acima de 18 anos era portadora de DM, com aumento para 5,6% no ano de 2011. Além disso, neste mesmo ano, 21,6% das pessoas acima de 65 anos referiram ser portadoras da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Ademais, demonstra-se que, no ano de 2013, o Brasil ocupava o quarto posto no mundo em número absoluto de portadores de diabetes entre 20-79 anos, com 11,9 milhões de pessoas afetadas (Figura 2) (IDF, 2013).

Número de pessoas com *diabetes mellitus* na população de 20-79 anos, por região, 2013:

Figura 1- Número de pessoas com diabetes no mundo por região (Adaptado de IDF Diabetes Atlas, 6ª edição, 2013).

Essa estimativa toma contornos mais preocupantes quando se realiza a projeção desse número para o ano de 2035. Segundo *Guarigata* e colaboradores, estima-se que o aumento proporcional da população afetada pelo DM no Brasil cresça 61,1%, atingindo o patamar de 19,2 milhões de pessoas entre 20-79 anos afetadas pela doença (GUARIGATA, 2013).

Porém a relevância do estudo do DM não se deve somente ao número absoluto de pessoas afetadas e ao provável aumento de sua incidência, mas também ao impacto que esta população portadora de DM tem no sistema de saúde e no uso de recursos pelo Estado.

Para se ter em conta o impacto econômico do diabetes nos cofres públicos, nos Estados Unidos, somente no ano de 2007, estima-se que o gasto com o diabetes tenha ultrapassado a casa dos 170 bilhões de dólares, seja no gasto direto para o tratamento de pacientes ou na perda econômica de força de trabalho em decorrência da doença (ADA, 2008).

Atualmente, os estudos de gastos mundiais com os portadores de diabetes permitem avaliar que o Estado Brasileiro gasta, anualmente, cerca de 13 bilhões de dólares em decorrência do diabetes, gasto que pode ser projetado para 21 bilhões de dólares para o ano de 2035, caso os padrões de gastos não sofram alterações (IDF, 2013).

10 países com maior número de pessoas com diabetes na população de 20-79 anos, 2013:

Figura 2- 10 países com maior número de pessoas com diabetes (Adaptado de IDF Diabetes Atlas, 6ª edição, 2013).

1.3- Epidemiologia e Fisiopatologia do *Diabetes Mellitus* tipo 1

Das variedades do DM descritas, ter-se-á em conta nesse texto, especialmente, o DMT1, por se relacionar ao modelo atualmente utilizado em nosso grupo de pesquisa.

O DMT1, antes tido como doença que afetava somente crianças e adolescentes, mas que, hoje em dia, sabe-se que pode afetar indivíduos de idades mais avançadas (**LADA – Latent Autoimmune Diabetes of Adults**) (LESLIE, 2010), é tipo de diabetes que tem como particularidade a destruição autoimune das células β pancreáticas produtoras de insulina e que corresponde a 5-10% do total de casos de diabetes no mundo (ATKINSON, 2014; ADA, 2014).

Epidemiologicamente a distribuição do DMT1 ocorre de forma diversa do total de casos de diabetes. Enquanto países como China e Índia ocupam o topo de pessoas afetadas pelo DM (IDF, 2013), quando se avalia especificamente o DMT1, tem-se que esses países apresentam incidência muito baixa dessa doença (cerca de 0,1 casos/100.000 habitantes), enquanto países como Finlândia (36,5 casos/100.000 habitantes) e Noruega (32,7 casos/100.000 habitantes) e regiões específicas como a Sardenha (36,8 casos/100.000 habitantes) apresentam incidência muito maior que a esperada (ATKINSON, 2014; MAAHS, 2010; SKRIVARHAUGH, 2014).

Ademais, ao contrário do que se esperava, regiões muito próximas, com *backgrounds* genéticos semelhantes, como a região leste da Finlândia e a província russa de Karelia, com que aquela divide fronteira, apresentaram grande diferença na incidência de DMT1, com o lado finlandês apresentado valor de incidência 6 vezes maior que o lado russo (KONDRASHOVA, 2005). Tal achado levou pesquisadores a elaborarem hipóteses que pudessem explicar essa discrepância nos dados epidemiológicos.

Em consequência, postulou-se que, além de fatores genéticos, a carga de antígenos a que a criança é exposta na infância pode ser importante modulador no desenvolvimento do diabetes, conhecida como a hipótese da higiene (BACH, 2012). Tal hipótese é corroborada pela correlação inversa entre a incidência de DMT1 e doenças infecciosas como tuberculose, sendo inclusive descritos certos agentes infecciosos que

podem estar envolvidos diretamente nessa relação, como enterovírus e vírus da família Coxsackie, assim como bactérias do gênero *Clostridium*. Outros fatores, como vitamina D e insulina bovina, associados à dieta, também foram considerados influentes no desenvolvimento do DMT1 (BACH, 2012; KNIP, 2012).

Dessa forma, temos que a exposição a patógenos do ambiente, especialmente no início da vida, pode alterar a incidência populacional do DMT1, contudo fatores genéticos também têm grande influência no risco de desenvolvimento desta doença.

Apesar de a maioria dos casos da doença ocorrerem sem parente em primeiro grau afetado, pode-se dizer que há forte componente genético no risco de desenvolvimento de DMT1. Estudos da incidência familiar de diabetes indicam que a população geral apresenta risco de 1:300 de desenvolver a doença, enquanto pessoas com parente em primeiro grau afetado, têm esse risco aumentado mais de dez vezes (1:20). Tal risco aumenta quanto maior for a proximidade genética do familiar afetado (Tabela 1), atingindo concordância de 50% em gêmeos monozigóticos (GAN, 2012).

Grupo	Risco de desenvolver DMT1
População Geral	1:300-400 (0,3%)
Parente em 1º grau afetado	1:20 (5%)
Mãe afetada	1:50 (2%)
Pai afetado	1:14 (7%)
Concordância em monozigóticos	1:2-3 (33-50%)
Concordância em dizigóticos	1:10-16 (6-10%)
DR3/DR4 (+) na população geral	1:40 (2,5%)
Irmão afetado	1:20 (5%)
Irmão afetado com mesmo padrão HLA	1:7 (14%)
DR3/DR4 igual ao de irmão afetado	1:4 (25%)

Tabela 1 - Risco familiar de desenvolvimento de *diabetes mellitus* tipo 1 (Adaptado de GAN, 2012).

Nesse sentido, estudos nos Estados Unidos da América indicam maior incidência de DMT1 na população branca não hispânica e negra de 10-19 anos (3,22/1.000 jovens e 3,18/1.000 jovens, respectivamente), enquanto a população de etnia asiática e das ilhas do Pacífico apresentou menor incidência (1,34/1.000 jovens), o que indica influência na carga genética populacional adquirida ao longo do tempo (SEARCH, 2006). Entretanto, o DMT1, ao contrário de outras doenças autoimunes, apresenta distribuição simétrica entre os sexos, afetando igualmente homens e mulheres (GAN, 2012).

Em maior detalhe, esses fatores genéticos se traduzem, a nível molecular, em fatores regulatórios do sistema imune, especialmente o sistema HLA (**H**uman **L**eukocyte **A**ntigen). Sabe-se que os genes desse complexo são responsáveis pela codificação das proteínas do complexo MHC (**M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex), dessa forma, estão diretamente ligados à apresentação de antígenos, como os alelos DQ e DR, cujas proteínas afetam a estabilidade da fenda de ligação do MHC ao receptor de linfócito T (TCR) (Figura 3), levando a menor quantidade de epítomos disponíveis para apresentação para linfócitos T (TSAI, 2013). Por isso, alterações nesses alelos estão intimamente ligadas a diversas doenças autoimunes, entre elas, o DMT1, com aproximadamente 50% de correlação positiva (NOBLE, 2011).

Figura 3 - Fenda de ligação do MHC classe II ao TCR (Retirado de ABBAS, A.K.; Lichtman, A.H. *Imunologia Celular e Molecular*, 5ª ed.).

Em relação ao DMT1, convém destacar que a predisposição genética é o primeiro de muitos fatores que no futuro irão desencadear a doença. Quanto a isso, tem-se que os alelos ligados, atualmente, ao desenvolvimento do DMT1 são aqueles dos *loci* DR e DQ. Enquanto os alelos DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 (DR3) e DRB1*04:01/02/04/05/08-DQA1*03:01-DQB1*03:02/04 (DR4) estão associados a aumento de risco de diabetes, a heterozigose desses dois haplótipos apresentou correlação ainda maior no desenvolvimento de DMT1, com *odds ratio* de 16,59 deste caso, contra 6,32 e 5,68 dos homozigotos DR3/DR3 e DR4/DR4, respectivamente (NOBLE, 2011).

Em contrapartida, certos alelos podem conferir proteção contra o desenvolvimento de DMT1, principalmente via indução de linfócitos T regulatórios, que são capazes de suprimir a resposta autoimune via secreção de IL-10 (TSAI, 2013). Dentre esses, destaca-se o alelo DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02 (DR2), que apresenta *odds ratio* de 0,03 no desenvolvimento de DMT1 (NOBLE, 2011; VALDES, 2005). Posteriormente, fatores ambientais ainda não revelados serão o gatilho que transforma a predisposição genética em anormalidades imunológicas nos primeiros estágios da infância.

Após a etapa de apresentação de antígenos, ocorre, principalmente, resposta Th1 (Linfócito **T Helper 1**) contra as ilhotas pancreáticas, com extensa infiltração de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ autorreativos, o que desencadeia a insulite (Figura 4) (VAN BELLE, 2011). Nesse processo há sinalização e ativação dos linfócitos T citotóxicos via MHC I, com morte das células beta pancreáticas via indução de apoptose por Fas-FasL ou por degranulação de enzimas citolíticas (KNIGHT, 2013).

Contudo, a prevalência da resposta Th1 não impede a liberação de imunoglobulinas contra antígenos específicos das ilhotas pancreáticas, que apesar de não estarem diretamente relacionados com o desenvolvimento da doença, podem ser úteis na confirmação da doença ou do diagnóstico (WINTER, 2011). Os antígenos alvo desses autoanticorpos partilham características comuns, como proteínas envolvidas no processo secretório da insulina e/ou proteínas de membrana das células beta

pancreáticas, presentes exclusivamente no tecido pancreático e produzidos por *splicing* alternativo (WENZLAU, 2013).

Dentre esses autoanticorpos, destacam-se cinco principais que podem ser relevantes na prática clínica: *islet cell autoantibody* (ICA) anti-*Glutamic Acid Decarboxylase 65* (anti-GAD₆₅), anti-*Insulinoma Antigen 2* (anti-IA-2) e autoanticorpo anti-insulina (IAA) e anti-transportador de Zinco 8 (anti-ZnT8) (WENZLAU, 2013; TSIROGIANNI, 2009).

Convém destacar que a positividade na presença desses autoanticorpos não apresenta valor preditivo positivo aceitável para o diagnóstico da doença, mas a persistência de alguns anticorpos (pIAA + pICA – VPP 91%) e/ou a presença de positividade simultânea destes (ICA + GAD₆₅ + IA-2 + IAA – VPP 56%), aumenta consideravelmente a chance do paciente desenvolver a doença no futuro (SILJANDER, 2009).

Figura 4 – Micrografia de ilhotas pancreáticas (coloração HE). A - Ilhota normal. B - Ilhota com intensa infiltração leucocitária (insulite). Retirado de JUN, 1999.

Tendo em vista todos esses eventos imunológicos que acontecem após o início da autoimunidade, é imperativo observar a história natural de evolução da doença, visto que tais eventos não ocorrem concomitantemente com o aparecimento dos sintomas.

Atualmente, é consenso que os sintomas característicos do DM ocorrem somente quando cerca de dois terços das ilhotas são destruídas (Figura 5), uma vez que, nos portadores de DMT1, uma fração significativa das ilhotas não contem insulina (ATKINSON, 2014).

Portanto a maior parte das alterações patológicas aqui descritas ocorrem em período prodrômico da doença, muito antes do próprio diagnóstico do DM. Dessa forma, se torna essencial o desenvolvimento de mecanismos que permitam acompanhar de forma mais detalhada os eventos envolvidos tanto na autoimunidade, quanto na perda da massa de células beta pancreáticas.

Figura 5 - Perda progressiva de células beta no DMT1 e eventos relacionados (Adaptado de ATKINSON, 2014).

1.4- Modelo de *diabetes mellitus* utilizado

No estudo da fisiopatologia do DMT1 se utilizam, principalmente, dois tipos de modelos murinos, o modelo de diabetes autoimune, sendo o mais recorrente o modelo **NOD** (**Non-Obese Diabetic**), ou modelos de diabetes induzido quimicamente, por meio de injeção de substâncias com tropismo pelas células beta pancreáticas produtoras de insulina.

Enquanto o primeiro se trata de linhagem de camundongo isogênico, que apresenta padrão de desenvolvimento de diabetes semelhante ao humano, isso traz certa complexidade, dado o grande número de variáveis que podem afetar o desenvolvimento da doença, como padrão sanitário, gênero do camundongo, entre outros (TANIGUCHI, 2007).

Já os modelos de diabetes induzido permitem que os animais diabéticos apresentem padrão de desenvolvimento de diabetes mais uniforme, pois ocorrem brevemente após a injeção dos compostos indutores. Esses compostos promovem alterações fisiológicas nessas células e acarretam processos de apoptose ou necrose, que, posteriormente, culminarão em deficiência na produção de insulina e em hiperglicemia.

A aloxana (2,4,5,6-tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracila) foi primeiramente descrita por Brugnatelli em 1818 e, desde a descoberta de sua atividade diabetogênica em 1943, por Dubb, Sheehan e McLethie, tem sido utilizada na indução do DM em modelos experimentais. O mecanismo de ação da aloxana é bem descrito na literatura e apresenta inúmeras influências no metabolismo das células β pancreáticas. Após a injeção endovenosa do composto, a aloxana é internalizada pelas células produtoras de insulina e é reduzida a ácido dialúrico por grupos redutores, como GSH (Glutathione), ascorbato e proteínas com radicais $-SH$, dentre elas a hexoquinase, sendo posteriormente reoxidada a aloxana, estabelecendo um ciclo redox com geração de radicais superóxidos livres (SZKUDELSKI, 2001).

Posteriormente, essas espécies reativas de oxigênio (ROS) podem causar poliribosilação de ADP (adenosina difosfato) e dano direto ao DNA (ácido desoxirribonucleico), que são responsáveis por iniciar o processo de apoptose das

células β . Ademais, a aloxana é capaz de despolarizar a membrana dessas células e estimular a abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, o que resulta em influxo desse íon para o compartimento intracelular e subsequente dificuldade no controle da homeostase do cálcio nessas células, desencadeando o processo de apoptose (SZKUDELSKI, 2001).

Isto posto, poder-se-ia argumentar que os modelos de diabetes induzido quimicamente não mimetizam satisfatoriamente certas características encontradas clinicamente em pacientes com DMT1. Contudo, há de se lembrar de casos especiais de diabetes, como aqueles induzidos por outras doenças, que podem necessitar de pancreatectomia, como neoplasias e doenças inflamatórias do tecido pancreático.

1.5- O Transplante de ilhotas de Langerhans

Apesar de descrito por Hipócrates no século V a.C., somente após a descoberta das ilhotas pancreáticas por Langerhans, em 1869, e os experimentos realizados por *Josef von Mering* e *Oscar Minkowski* em 1889 que o pâncreas passou a estar ligado diretamente ao DM, após induzirem o diabetes em cães, via pancreatectomia completa (LEVINE, 1989). Logo após isso, iniciaram-se as primeiras tentativas de cura da doença, utilizando essa nova informação que havia sido desvendada.

Já no ano de 1893, *White* prescreveu a suplementação da alimentação de pacientes diabéticos com pâncreas de ovelha cru, sem que obtivesse resultados positivos (WHITE, 1893). Mais interessante, no mesmo ano, *Watson-Williams* realizaram o primeiro transplante experimental de pâncreas, com a inserção de frações moídas do órgão obtido de ovelhas num paciente com cetoacidose, também sem resultados significativos (WILLIAMS, 1894; MCCALL, 2012).

Contudo, a descoberta da insulina por *Banting, Macleod e Best* em 1921, tornou a pesquisa do transplante de pâncreas para a cura do diabetes como algo supérfluo, cuja ideia permaneceria marginalizada por mais de cinquenta anos (MACLEOD, 1922). Apesar disso, a fundação para a futura técnica de transplantes já havia sido estabelecida, com as contribuições de *Alexis Carrel* para o campo da cirurgia vascular e do transplante de vasos (CARREL, 1907).

Todos esses eventos iriam acarretar no ocorrido no final da década de 1960, quando *Kelly* e colaboradores realizaram o primeiro transplante pancreático bem sucedido em humanos (KELLY, 1967), o que permitiria diminuir a taxa de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) e a glicemia sistêmica de pacientes diabéticos. Contudo, antes mesmo dessa data, o transplante de pâncreas já era utilizado no estudo da fisiologia desse tecido, tanto via transplantes homólogos como heterólogos (BROWNING, 1951).

Porém, somente após o desenvolvimento da técnica de isolamento de ilhotas por solução de collagenase, desenvolvido por *Lacy* e colaboradores, em 1972, que a técnica de transplante de ilhotas voltou a estar sob a luz dos holofotes no tratamento do DM (BALLINGER, 1972). Tal técnica viria a ser melhorada pelo desenvolvimento de novas misturas enzimáticas capazes de digerir extensivamente tecido exócrino pancreático, com o menor dano possível às ilhotas residentes em meio ao tecido acinar, tendo a mistura *Liberase*TM (Roche) como principal enzima utilizada atualmente (LINETSKY, 1997).

Após mais de um século, o transplante de ilhotas, por ser menos invasivo e, por consequência, demandar menor imunossupressão para o paciente transplantado, tem sido ponderado como possível herdeiro dos ideais de *Kelly* e *Browning* no tratamento do DM via transplantes alogênicos (WAMOCK, 1992; KELLY, 1967; BROWNING, 1951). Evidência do progresso dessa técnica foi a publicação do protocolo de Edmonton em 2000, por *Shapiro* e colaboradores, após o tratamento de sete pacientes com o transplante de ilhotas pancreáticas, sem a necessidade de uso de glicocorticoides para imunossupressão (SHAPIRO, 2000; SHAPIRO, 2006).

Nos protocolos atuais, para transplantes de ilhotas em humanos, segue-se o indicado no protocolo de Edmonton, em que se utiliza método automatizado de isolamento das ilhotas, valendo-se de adaptações da câmara de Ricordi (Figura 6), que foi concebida por *Ricordi* e colaboradores em 1988 (RICORDI, 1989; ICHII, 2009).

Já em modelos murinos, utiliza-se o gradiente descontínuo de densidade, que outrora era composto pela solução de Ficoll (polímero derivado da sucrose), mas este vem sendo substituído por compostos que apresentam menor toxicidade às ilhotas e, por conseguinte, diminuem a inflamação no tecido isolado, o que está diretamente relacionado à sobrevida e viabilidade das ilhotas (MIN, 2010; MITA, 2009; MITA, 2010).

Figura 6 - Método automatizado de isolamento de ilhotas humanas (Adaptado de RICORDI, 1989).

Esses avanços no processo de isolamento de ilhotas permitiram que diversas variáveis pudessem ser testadas, para posterior utilização em humanos. Fatores como reatividade imune ao enxerto e ao procedimento e vascularização se mostraram essenciais na escolha do sítio receptor, dado o estresse metabólico a que as ilhotas são submetidas durante o transplante (BRUNI, 2014). Nesse sentido, pacientes submetidos a transplante de ilhotas apresentam independência insulínica por menor tempo que pacientes submetidos a transplante de órgão sólido, cinco anos após os transplantes, com aumento de apenas 10% dos pacientes submetidos a transplante de ilhotas no início do século, para 44% nos últimos anos, contra 61% dos pacientes que sofreram transplante de pâncreas sólido (WANG, 2011; WHITE, 2009; RYAN 2005; BARTON, 2012).

Isso ocorre, pois, ao se realizar o transplante, as ilhotas se encontram fora do estado de homeostase, com perturbações nos níveis de nutrientes antes disponíveis via perfusão sanguínea e/ou diretamente dos meios de cultura e, consequentemente,

suscetíveis à hipóxia (BRUNI, 2014; WANG, 2011). Portanto, o processo de angiogênese e vascularização (Figura 7), que visa restaurar a pressão parcial de oxigênio tecidual a que as ilhotas são submetidas pré-transplante, se torna essencial para a funcionalidade e sobrevivência dos enxertos, visto que os eventos de hipóxia e de estresse metabólico estão relacionados a perda de grande parte da massa de ilhotas transplantadas (CARLSSON, 2000; CARLSSON, 2001; GIBLY, 2011).

Figura 7 - Revascularização em enxertos de ilhotas pancreáticas (Adaptado de GIBLY, 2011). MEC - Matriz Extracelular.

Estudos indicam que, brevemente após o procedimento do transplante, há perda substancial dos enxertos, com valores que podem chegar a até 50% do total de ilhotas transplantadas (EICH, 2007). Outrossim, a presença de diabetes diminui ainda mais a disponibilidade de oxigênio no sítio receptor e nos enxertos, assim como a quantidade de insulina contidas nas ilhotas transplantadas (JANSSON, 2002; CARLSSON, 2000, CARLSSON, 2001).

Todavia, o processo de revascularização dos enxertos não ocorre de forma imediata, porquanto não há como realizar anastomose de vasos diretamente para as ilhotas transplantadas, com variações na angiogênese podendo depender, entre outros fatores, do sítio receptor do transplante. Estudos indicam que os vasos começam a se formar no enxerto brevemente após o transplante, com formação de grandes vasos entre

7 e 14 dias após o procedimento e vascularização extensa após 28 dias do transplante (NYQVIST, 2011; CHAN, 2009).

Além disso, outros fatores podem influenciar no sucesso de implantação das ilhotas transplantadas, a depender do sítio receptor do transplante, notavelmente as reações imunológicas e inflamatórias. Dentre esses, destacam-se, na prática clínica, a IBMIR (*Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction*) e a ativação das moléculas de complemento, que estão intimamente ligadas ao transplante via infusão de ilhotas na circulação portal hepática, que é o mais recorrente, atualmente. (CITRO, 2013; GIBLY, 2011).

A primeira ocorre devido à exposição do fator tecidual pelas ilhotas infundidas em sítio intravascular, o que estimula a agregação plaquetária e causa inflamação local com recrutamento leucocitário e possível formação de trombos (CITRO, 2013; GIBLY, 2011). Em consequência à infiltração leucocitária, ocorre a liberação de diversas citocinas e também há ativação das vias do complemento, o que pode acarretar intensa reação inflamatória local. Acredita-se que esse processo seja o responsável pela perda brusca de grande parte do enxerto que ocorre nas primeiras horas após o transplante (CITRO, 2013; WILEY, 2008).

Logo, formas de neutralizar esses eventos adversos que diminuem a sobrevida das ilhotas transplantadas e, conseqüentemente, da independência da insulina são necessárias. Uma dessas formas é a utilização de sítios receptores de transplante, diferentes da infusão via veia porta hepática, que atendam essas exigências.

Após a exposição das vantagens e desvantagens do transplante de ilhotas citadas anteriormente, uma delas foi, convenientemente, suprimida: a diferença morfológica das ilhotas em relação ao órgão sólido. Nesse sentido, convém destacar que o transplante de pâncreas íntegro se trata de cirurgia de grande porte, com todos os riscos que procedimentos desse nível apresentam.

As técnicas mais comuns na realização desse procedimento são a implantação de segmento pancreático ou a implantação simultânea de pâncreas e segmento de duodeno intra ou retroperitonealmente, podendo ou não estar associado a transplante renal. Nesses procedimentos é necessária a realização de anastomose de vasos de grande ou médio calibre, como a artéria mesentérica superior e a artéria esplênica, assim

como as veias tributárias da veia porta (BOGGI, 2010). Complicações frequentemente associadas ao transplante de pâncreas incluem trombose venosa profunda, vazamentos nas anastomoses e necessidade de repetição do transplante (SANSALONE, 2005).

Em contrapartida, como apresentam tamanho diminuto em relação ao órgão sólido, o transplante de ilhotas pode ser realizado nos mais diversos sítios receptores. Como citado anteriormente, nos dias de hoje, a técnica mais prevalente no transplante de ilhotas pancreáticas, na prática clínica, é a infusão pela veia porta hepática, contudo diversos locais vêm sendo testados para ser alternativa à técnica corrente. Dentre estes, destacam-se o espaço subcapsular renal, peritônio, medula óssea, entre outros (RAJAB, 2010; SZOT, 2007; ZMUDA, 2010).

Já citados anteriormente estão os fatores que influenciam negativamente a implantação das ilhotas no tecido transplantado, especialmente na infusão intraportal. Fatores como a pressão parcial de oxigênio (PO_2), capacidade de neovascularização das ilhotas e evasão do sistema imune são todas essenciais para o sucesso dos procedimentos do ponto de vista do paciente (RAJAB, 2010), porém, há variável que se mostra tão importante quanto todas estas, do ponto de vista do pesquisador: a acessibilidade ao tecido transplantado.

Por conseguinte, tornou-se imperativo encontrar sítio receptor do transplante de ilhotas que permita, simultaneamente, a avaliação dos parâmetros fisiopatológicos do diabetes e sua correlação com a fisiologia das ilhotas pancreáticas. Nesse contexto, de todos os tecidos capazes de receber adequadamente o enxerto de ilhotas, o que atende satisfatoriamente a todas essas necessidades é o transplante para a câmara anterior do olho.

1.6- A Câmara anterior do olho como sítio receptor

A câmara anterior do olho (Figura 8) é conhecida como possível sítio receptor de outros tecidos desde a descrição dos primeiros procedimentos por *Van Dooremaal* em 1873. Desde esse período, enxertos de diversos órgãos foram implantados na câmara anterior, explorando a capacidade de visualizar facilmente variações morfológicas nos

enxertos, iniciado pela transferência de tecido prostático e da vesícula seminal para este sítio (MOORE, 1937).

Figura 8 - Anatomia do olho e suas câmaras (Adaptado de MALANSON, 2009).

Apesar do grande interesse sobre esse local, foi somente em 1957 que o primeiro transplante de tecido pancreático foi realizado para este sítio, em que *Rex Coupland* transplantou pequenas secções de pâncreas de fetos de camundongos para a câmara anterior do olho de suas mães e conseguiu visualizar ilhotas pancreáticas por microscopia simples, mesmo após um mês da inserção do tecido (COUPLAND, 1957). Atualmente, esse modelo apresenta maior grau de desenvolvimento, ao envolver grau de tecnologia elevado, como a microscopia confocal, que permite avaliar em tempo real a fisiologia dos enxertos na câmara anterior (ABDULREDA, 2011; SPEIER, 2008).

Tais estudos com microscopia confocal permitiram avaliar como ocorre a implantação das ilhotas no tecido ocular, inferindo que células provenientes do doador são responsáveis pelo início da angiogênese das ilhotas com os vasos da íris (NYQVIST, 2011). Como visto anteriormente, esse processo é essencial para prevenção da hipóxia do tecido e para o sucesso do transplante para a câmara anterior do olho.

Ademais, a implantação e a vascularização das ilhotas permitem que o fluxo sanguíneo circule os hormônios produzidos pelas células transplantadas e que se renove a inervação que possibilita a resposta das ilhotas pancreáticas aos estímulos simpáticos e parassimpáticos (PEREZ, 2011; RODRIGUEZ-DIAZ, 2012).

1.7 - A resposta imune na câmara anterior do olho

Além dos benefícios acima descritos na utilização da câmara anterior do olho como receptora de transplantes, a resposta imune nesse local é outra importante característica a se ter em conta, especialmente no caso do DM. Diversos estudos indicam que ambientes com excesso de citocinas pró-inflamatórias são capazes de diminuir a capacidade secretória das ilhotas e, inclusive, estimular a apoptose das células nelas presentes, especialmente Interleucina-1 β (IL-1 β) e interferon- γ (IFN- γ) (WESTWELL-ROPER, 2011; POTTER, 2014; CARDOZO, 2003).

Portanto, seria ideal sítio receptor que, além da boa perfusão e acessibilidade, entre outros fatores, o local de implantação apresente ambiente de imunossupressão local. Curiosamente, a câmara anterior do olho apresenta como característica resposta imune diversa da maior parte do resto do organismo, devido a complexo mecanismo de desvio do sistema imune nessa região, a que se atribuiu o nome de *Anterior Chamber Associated Immune Deviation* (ACAID) (STREILEIN, 2003).

O primeiro fator a influenciar a resposta imune na câmara anterior do olho diz respeito às diferenças na apresentação de antígenos. Por muito tempo se especulou que a ausência de órgãos linfáticos específicos na drenagem das câmaras oculares possibilitasse a ocultação de antígenos aí presentes do sistema imune, num processo de ignorância imunológica (STREILEIN, 2002).

Contudo extensos experimentos demonstraram que há, de fato, apresentação de antígenos intraoculares para o sistema imune, com indução de tolerância. Segundo *Streilein* e colaboradores (2002) macrófagos F4/80⁺, presentes no olho, sequestram os antígenos e migram para o baço, onde criam microambiente imunossupressor, com recrutamento de Linfócito T *Natural Killer* (NKT) e secreção local de IL-10 e *transforming growth factor-β* (TGF-β) (STREILEIN, 2002; LIN, 2005).

Em consequência, como é induzida menor expressão de CD40 e menos secreção de IL-12, a resposta imune de linfócitos T contra tal antígeno é diminuída, com diferenciação destes em células T regulatórias (STREILEIN, 2002). Entretanto, esses linfócitos T regulatórios não são induzidos somente no baço, como também na própria câmara anterior do olho (MOCHIZUKI, 2013).

Essas células, tidas como supressoras, são linfócitos T diferenciados, com expressão de *Forkhead box P3* (FOXP3⁺) e são responsáveis por modular a resposta imunológica via produção de citocinas inibitórias, ou por indução de apoptose. Convém destacar que as células T regulatórias induzidas pela ACAID podem ser tanto aferentes (CD4⁺) quanto eferentes (CD8⁺), que apresentam funções diferenciadas, sendo aquelas supressoras da diferenciação de linfócitos T *naïve* em linfócitos efetores Th1, enquanto estas são inibidoras da resposta Th1 em si (MOCHIZUKI, 2013).

No entanto as células T regulatórias não são as únicas responsáveis por suprimir a resposta imunológica na câmara anterior do olho. *Ashour* e *Niederkorn* (2006) demonstraram que linfócitos T do tipo γδ são essenciais para a ocorrência de ACAID, via secreção de IL-10, de modo análogo ao mecanismo descrito no baço (STREILEIN, 2002; SKELSEY, 2001; ASHOUR, 2006).

Há de se destacar, também, a influência de fatores presentes no humor aquoso na resposta imunológica, assim como moléculas expressas nas células que delimitam a câmara anterior.

Sabe-se que o humor aquoso é líquido com matriz extremamente complexa e, dentre essas inúmeras moléculas presentes, algumas também influenciam a resposta imune local. Destaca-se, por exemplo, a presença de fatores inibitórios solúveis, como *Alfa-Melanocyte Stimulating Hormone* (α-MSH), que inibe a ativação de polimorfonucleares (PMNs) e suprime a produção de IFN-γ, assim como TGF-β2, que

inibe a ativação de linfócitos T, células NK e macrófagos, dentre outros fatores inibitórios (STREILEIN, 2003).

Ademais, há alto nível da expressão de FaSL (CD95L) no humor aquoso, cuja molécula é capaz de induzir apoptose em células ativadas infiltradas na câmara anterior do olho, como linfócitos T ou PMNs (STREILEIN, 2003; NIEDERKORN, 2006).

Por conseguinte, todos esses fatores reunidos tornam extremamente valioso o domínio e o estudo do modelo de transplante de ilhotas pancreáticas para a câmara anterior do olho, o que justifica a existência do trabalho desenvolvido em nosso grupo de pesquisa nos últimos anos.

2. OBJETIVOS

O presente estudo visou estabelecer metodologia de isolamento e transplante de ilhotas de alta reprodutibilidade e baixo custo, utilizando a câmara anterior do olho como sítio receptor.

2.1 - Objetivos específicos

- Aprimorar e adaptar a técnica de isolamento de ilhotas;
- Definir os adjuvantes e suas concentrações que permitem máxima eficiência no número de IEQs isolados;
- Adaptar a técnica de transplante de ilhotas;
- Avaliar se os enxertos são fisiologicamente funcionais por meio de alterações na glicemia de indivíduos receptores diabéticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/376 – Anexo I e CEUA/FCF/441 – Anexo II). Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, com peso médio inicial de 25 gramas e idade de, aproximadamente, 12 semanas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, onde foram acondicionados em gaiolas coletivas, contendo, no máximo, cinco animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, à temperatura ambiente constante de 22°C. Os suprimentos de água e alimento ficaram disponíveis *ad libitum*.

3.1.1 – Animais utilizados na padronização do isolamento de ilhotas

Para realizar a padronização do processo de isolamento de ilhotas foram utilizados 24 animais divididos em 3 grupos, conforme a Tabela 2. Nesse processo realizou-se a avaliação do número de ilhotas isoladas utilizando os adjuvantes inibidor de tripsina de semente de soja (ITS) e albumina de soro bovino (BSA), adicionados à solução de collagenase 1 mg/mL.

Grupos	Nº de animais
Solução de collagenase 1 mg/mL	7
Solução de collagenase 1 mg/mL + ITS 1 mg/mL	7
Solução de collagenase 1 mg/mL + BSA	10

Tabela 2 - Grupos utilizados na padronização do processo de isolamento de ilhotas. ITS – Inibidor de tripsina de semente de soja; BSA – Albumina de soro bovino.

3.1.2 – Animais submetidos ao transplante de ilhotas

Para realizar o procedimento de transplante de ilhotas foram utilizados 22 animais divididos em 4 grupos, conforme a Tabela 3. Desses animais, dez se encontram no grupo de doadores de ilhotas, com os outros doze distribuídos igualmente em três grupos, respectivamente grupo controle salina (injeção de solução salina isotônica) (Cx), controle diabético (injeção de aloxana 60 mg/kg i.v.) (Dx) e diabético transplantado (injeção de aloxana 60 mg/kg i.v. + transplante de ilhotas) (Tx).

Grupo	Nº de animais
Doadores de ilhotas	10
Controle salina (Cx)	4
Controle diabético (Dx)	4
Diabético transplantado (Tx)	4

Tabela 3 - Grupos de animais no experimento de transplante de ilhotas.

3.2 - Indução do *Diabetes mellitus*

Para indução do DMT1, os animais foram deixados em jejum de 12 horas antes de receberem uma injeção endovenosa de aloxana (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA), na concentração de 60 mg/kg, dissolvida em solução salina fisiológica. A glicemia foi determinada através de monitor de glicose (Advantage, Lilly), utilizando-se amostras de sangue obtidas da extremidade da cauda dos animais. Somente foram utilizados animais com glicemia superior a 300 mg/dL (adaptado de SPILLER, 2012).

3.3 - Isolamento de ilhotas

Após anestesiados com 2 μ L/g da solução (7,5 mL de Ketamina – 75mg/mL e 2,5 mL de Xilazina – 10mg/mL) e realização da eutanásia do camundongo, em jejum de 6 horas, via deslocamento cervical, realiza-se injeção da solução de collagenase 1mg/mL (Tipo V - C9263 - Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA) e albumina de soro bovino BSA a 0,5% (%p/v) em tampão Hank através do ducto pancreático. Então, é realizada a pancreatectomia, imergindo o pâncreas em solução de collagenase encubada a 37°C por 8 minutos, seguida de agitação vigorosa e mais 8 minutos de incubação a 37°C (ZMUDA, 2011; SZOT, 2007).

Subsequentemente, retira-se o sobrenadante e se realiza lavagem com solução de Hank e separação das ilhotas do tecido exócrino por densidade, com descarte do tecido exócrino sobrenadante. Com a fração mais densa procede-se subsequente separação manual das ilhotas, lavagem e inserção em meio de cultura (ANDRADES, 2007). As ilhotas foram cultivadas em meio RPMI1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino (BCS) e 11 mM de glicose, todos em frascos plásticos mantidos em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂.

3.4 - Padronização do isolamento de ilhotas

Com o objetivo de avaliar se a solução de collagenase, ou o extravasamento das enzimas exócrinas no momento da digestão, podem ser responsáveis por causar a inviabilidade de algumas ilhotas no momento da coleta, utilizou-se compostos inibidores de protease como adjuvantes na injeção de collagenase, sendo escolhidos o inibidor de tripsina de semente de soja (ITS) (*Soybean trypsin inhibitor* – *Sigma T9128*) e a albumina de soro bovino (BSA) (SHEWADE, 1999; BERTERA, 2012).

Para avaliar a influência da concentração de BSA no resultado do isolamento de ilhotas, realizou-se perfusão do pâncreas de animais, previamente em jejum, com soluções 1 mg/mL de collagenase contendo 0,5%, 1,5%, 2,5% e 3,5% de BSA %p/v, a fim de avaliar qual concentração permite isolar maior número de ilhotas, em média.

3.5 - Transplante para a câmara anterior do olho

Para transplantar as ilhotas pancreáticas para a câmara anterior do olho dos camundongos, inicia-se com a sedação do animal com 2 µL/g da solução (7,5 mL de Ketamina – 50mg/mL e 2,5 mL de Xilazina – 20mg/mL). Posteriormente, realiza-se a punção da córnea com agulha 27G e se insere a cânula ligada a uma seringa, pela que se injeta solução contendo aproximadamente 250 equivalentes de ilhotas isoladas em solução PBS estéril (SPEIER, 2008). A analgesia pós-operatória é assegurada com administração de cloridrato de tramadol (Tramal®, Tramadon®) 2 mg/kg.

3.6 - Dosagem de glicose sanguínea

A dosagem glicêmica foi medida entre 16:00 e 18:00 horas, em condições de jejum de 6 a 8 horas, por meio do uso de medidor de glicose sanguínea (Eli Lilly, São Paulo, Brazil) do sangue obtido via punção da veia caudal lateral dos camundongos.

3.7 - Teste de tolerância à glicose

Para a realização do teste de tolerância à glicose foi injetada solução 20% de glicose intraperitoneal, na quantidade de 2 g/kg de peso corpóreo, em animais submetidos a jejum de 12 horas, com posterior medida da glicemia, como descrita anteriormente, em intervalos de tempo de 5 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 60 minutos e 120 minutos após a injeção.

3.8 - Análise estatística

Os resultados foram avaliados por teste t de Student e análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey-Kramer ou do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando-se significativo $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 – O método de isolamento de ilhotas

Para realizar o procedimento de isolamento de ilhotas, foi necessária a adaptação da técnica descrita na literatura e utilizada em outros centros de pesquisa para os padrões técnicos encontrados em nosso laboratório. A seguir está a descrição passo a passo do processo de isolamento de ilhotas realizados pelo nosso grupo.

- Passo 1: O primeiro passo é a separação do material a ser utilizado, assim como recipiente contendo 2 mL de collagenase 1mg/mL para a digestão do órgão e a preparação da seringa contendo de 3-5 mL de collagenase a serem injetados no ducto biliar comum do animal. Para esse procedimento utilizamos os seguintes instrumentos (Figura 9): Lupa estereoscópica ACCU-SCOPE 3055 (aumento 20x), 1 tesoura metzenbaum ponta curva, 1 tesoura íris ponta curva, 1 pinça kelly curva, 1 pinça kelly reta para manipulação da agulha de injeção, cateter adaptado para injeção com agulha 30G e 2 pinças Adson serrilhadas para manipulação da pele e separação do pâncreas.

Figura 9 - Instrumentos para isolamento de ilhotas.

- Passo 2: Após jejum de 6 horas, realiza-se a anestesia e a eutanásia do animal e pulverização de etanol 70% para manter a pelagem aderida à pele, seguida de

incisão em V na região abdominal com metzenbaum, em posição decúbito dorsal, expondo o conteúdo da cavidade peritoneal. É importante romper cuidadosamente o diafragma e o ligamento falciforme, para liberar mais facilmente a manipulação do fígado e das vias biliares, assim como a retirada dos arcos costais anteriores, de forma a aumentar o espaço disponível para a manipulação da agulha de injeção.

- Passo 3: Exposição das vias biliares, por meio da manipulação dos lobos hepáticos em direção à cavidade torácica e retração das alças intestinais e do cólon para a direita, de forma a expor a parte externa da papila duodenal. Após a identificação do ducto colédoco e da parte externa da papila duodenal (Figura 12A), realiza-se o pinçamento da papila, envolvendo o transversalmente o duodeno (Figura 12B), de forma a diminuir a tração sobre o ducto e lesar o tecido pancreático em seu entorno.

Figura 10 – A - Identificação do ducto pancreático. B - Pinçamento da papila duodenal.

- Passo 4: A seguir procede-se a punção do ducto colédoco (Figura 13A), preferencialmente próximo à junção do ducto cístico ao ducto hepático comum. Posteriormente, avança-se levemente a agulha de injeção para evitar a

regurgitação do conteúdo a ser infundido e procede-se a injeção da collagenase, atentando-se para a dilatação homogênea tanto do corpo e da porção caudal do pâncreas, quanto da cabeça do órgão (Figuras 13B, 13C e 13D).

Figura 11 - A - Punção do ducto colédoco. B, C e D - Dilatação do pâncreas com solução de collagenase. (a - corpo e cauda do pâncreas; b - cabeça do pâncreas).

- Passo 5: Procede-se a secção dos ligamentos que aderem o pâncreas aos órgãos abdominais, como o mesocólon transverso e o mesentério e os ligamentos gastrosplênico, esplenorrenal e hepatoduodenal, sem que ocorra perfuração do

órgão e escape da solução de collagenase. Realiza-se então a digestão do órgão extraído em dois ciclos de 6-8 minutos a 37°C, intercalado com um ciclo de agitação vigorosa, para liberar as ilhotas da matriz extracelular e do tecido exócrino digerido.

- Passo 6: Por fim, é feita a lavagem, por três vezes, do produto de digestão com solução de Hank, para separar o tecido acinar, que foi digerido, do tecido endócrino, em tubo Falcon de 15 mL, após 4 minutos em decantação. Segue-se para a coleta dos IEQs isolados manualmente (Figura 14A), em placas de Petri 60x40x20, utilizando pipetas pasteur ou pipeta de 200 µL. Os equivalentes de ilhotas (IEQ) isolados são mantidos em meio de cultura RPMI 1640 (Figura 14B), de forma que não excedam 150 IEQ por placa, com troca do meio de cultura a cada 48 horas.

Figura 12 - A - Tecido para coleta manual de ilhotas (Setas: IEQs). B - IEQs em meio de cultura RPMI 1640.

4.2 - Padronização do isolamento de ilhotas

Durante o processo de padronização do procedimento de isolamento de ilhotas, via injeção de solução de collagenase pelo ducto colédoco, obteve-se que a média de ilhotas isoladas por injeção de solução de collagenase 1 mg/mL (Tabela 4) foi de $72,7 \pm 25,9$ IEQ por animal, enquanto a injeção de solução de collagenase 1 mg/mL contendo ITS 1 mg/mL (Tabela 5) foi de $26,3 \pm 12,7$ IEQ por animal.

Já no processo de isolamento com solução de collagenase 1 mg/mL contendo BSA (Tabela 6 e Figura 15), obteve-se médias de: $141,3 \pm 55,1$ IEQ para a solução contendo 0,5% de BSA; $41,0 \pm 9,9$ IEQ para a solução contendo 1,5% de BSA; $80,3 \pm 7,2$ IEQ para a solução contendo 2,5% de BSA, $7,0 \pm 4,2$ IEQ para a solução contendo 3,5% de BSA ($p < 0.05$). Ao calcular a dispersão do número médio de IEQ (Figura 16) coletados por concentração de BSA, foi encontrado coeficiente de linearidade (r^2) de 0,6641.

Nº do animal	IEQ obtidos
Animal 1	55
Animal 2	56
Animal 3	70
Animal 4	110
Animal 5	109
Animal 6	60
Animal 7	49
Média	72,7

Tabela 4 - Quantidade de IEQ obtidos por injeção de solução de collagenase 1 mg/mL. (N=7).

Nº do animal	IEQ obtidos
Animal 1	20
Animal 2	34
Animal 3	33
Animal 4	15
Animal 5	6
Animal 6	40
Animal 7	36
Média	26,3

Tabela 5 - Quantidade de IEQ obtidos por injeção de solução de collagenase 1 mg/mL contendo inibidor de tripsina de semente de soja 1 mg/mL. (N=7).

Nº do animal	%BSA (%p/v)	IEQ obtidos
Animal 1	0,5%	194
Animal 2	0,5%	146
Animal 3	0,5%	84
Animal 4	1,5%	34
Animal 5	1,5%	48
Animal 6	2,5%	85
Animal 7	2,5%	72
Animal 8	2,5%	84
Animal 9	3,5%	4
Animal 10	3,5%	10

Tabela 6 - Quantidade de IEQ obtidos por injeção de solução de collagenase 1 mg/mL por concentração de BSA (%p/v) adicionado. (N=2 a 3 por grupo).

Número de IEQs isolados por concentração de BSA (%p/v)

Figura 13 - Número médio de IEQ obtidos por concentração de BSA (%p/v) adicionada à solução 1 mg/mL de colagenase. Os valores representam a média ± EPM. *p < 0,05; **p = 0,0607; ***p < 0,05. (N=2 a 3 por grupo).

Dispersão do número médio de Ilhotas coletadas por concentração de BSA (%p/v)

Figura 14 - Dispersão do número médio de IEQ isolados por concentração de BSA (%p/v). Os valores representam a média. *p<0,05. (N=2 a 3 por grupo).

4.3– O método do transplante de ilhotas para a câmara anterior do olho

Para realizar o procedimento de transplante de ilhotas para a câmara anterior do olho, foi necessária a adaptação da técnica descrita na literatura e utilizada em outros centros de pesquisa para os padrões técnicos encontrados em nosso laboratório. A seguir está a descrição passo a passo do processo de transplante de ilhotas para a câmara anterior do olho realizados pelo nosso grupo.

- Passo 1: O primeiro passo é a separação do material a ser utilizado (Figura 17A), no caso: Lupa estereoscópica ACCU-SCOPE 3055 (aumento 20x), retrator ocular adaptado, 1 seringa de 1 mL com êmbolo de rosca (Hamilton ®), cateter adaptado com capilar para utilização como cânula de injeção das ilhotas (Figura 17B) e 1 seringa de 1 mL com agulha 26G contendo PBS para umidificação do globo ocular e punção da córnea. Além disso é necessário local plano para manter o animal durante o procedimento.

Figura 15 – A - Materiais para a realização do transplante. B – Cânula adaptada com capilar.

- Passo 2: Posteriormente ao estabelecimento do local do transplante, realiza-se a transferência das ilhotas do meio de cultura RPMI 1640 em que foram cultivadas para placa de petri de dimensões de 60mm x 15mm x 20 mm, contendo solução de PBS estéril. A seguir, realiza-se movimentos circulares, de forma a concentrar as ilhotas no centro da placa, assim como a manipulação das ilhotas para manutenção destas na menor área possível do centro da placa (Figura 18A), seguida de aspiração pela cânula das ilhotas, de forma a ocupar o menor volume possível da cânula (Figura 18B). Muitas vezes é necessário esperar a decantação do conteúdo dentro da cânula, mantendo-a na posição vertical, com a aspiração de pequeno volume de ar para vedar o extravasamento das ilhotas.
- Passo 3: Realiza-se a punção da córnea próximo à esclera (Figura 19A), com o bisel direcionado para baixo, para evitar lesões ao músculo ciliar da íris. É recomendável que a punção seja realizada na parte superior do globo ocular, de forma que, ao realizar a infusão das ilhotas, a gravidade dificulte o extravasamento destas pelo orifício da punção.
- Passo 4: Inserção da cânula adaptada no local da punção (Figura 19B), o suficiente para impedir o refluxo de ilhotas pelo orifício, mas com cuidado para evitar lesões às estruturas oculares. Após a inserção, realiza-se a infusão do conteúdo da cânula na câmara anterior do olho (Figura 20), preferencialmente realizada por outro operador, de forma que a pessoa a realizar o procedimento possa manter a cânula estável dentro do globo ocular. Recomenda-se manipular a córnea levemente após o transplante, para dispersão das ilhotas sobre a superfície do músculo ciliar e manutenção do animal receptor por pelo menos 10 minutos em posição fixa, para estabilização das ilhotas dentro do globo ocular. Pode ser necessário a utilização de fármacos para diminuição da pressão do globo ocular (solução oftálmica de pilocarpina a 2%), para prevenir efeitos adversos devido ao aumento do volume de líquido na câmara anterior do olho.

Figura 16 - A - Concentração de ilhotas no centro da placa de petri.

B - Aglomerado de ilhotas na extremidade da cânula de infusão.

Figura 17 - A - Punção da córnea com agulha 26G. B - Inserção da cânula na câmara anterior do olho.

Figura 18 - Transplantes realizados para a câmara anterior do olho.

4.4– O transplante de ilhotas para a câmara anterior do olho

Após jejum de 12 horas, o diabetes foi induzido em camundongos C57BL/6 machos, com idade de 8 semanas, através da administração de dose única de aloxana (60 mg/dL) por via endovenosa. Posteriormente à injeção, o jejum perdurou por mais 5 horas. Inicialmente, os animais apresentavam nível de glicose sanguínea média de $149,6 \pm 11,4$ mg/dL no dia 0, já após 10 dias da indução do diabetes, o valor médio encontrado foi de $582,8 \pm 27,5$, enquanto os controles apresentavam $181,8 \pm 15,3$ ($p < 0,05$) (Figura 20), o que indica aumento na glicemia após a injeção de aloxana.

A massa corporal também foi avaliada nesse período, com diagnóstico de DM os animais com quadro glicemia acima de 300 mg/dL por mais de duas medições pela manhã sem jejum e perda de peso, quando comparado com os controles (Cx). Após 10 dias da indução do DM, obteve-se variação de massa corpórea (Figura 21) de $1,04 \pm 0,04$ g no grupo controle, enquanto o grupo que sofreu a injeção de aloxana 60 mg/kg apresentou variação de $-2,98 \pm 0,42$ g ($p < 0,05$). Dessa forma, os animais diabéticos foram divididos aleatoriamente em dois grupos, um grupo controle diabético (Dx) e outro grupo a ser transplantado (Tx).

Procedeu-se então ao isolamento de ilhotas dos animais doadores (Figura 23), após jejum de 6 horas, por injeção de solução de colagenase 1 mg/mL + BSA 0,5% (%p/v) via ducto colédoco. Desses animais, obteve-se média de $170,2 \pm 12,2$ IEQs por animal, com proporção de, no mínimo dois animais doadores para cada animal transplantado.

Figura 19 - Glicemia média dos animais. O DM foi induzido via injeção de aloxana 60 mg/kg i. v. Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,0001$. (Dx – Diabéticos) (n controle = 4; n diabéticos = 8).

Figura 20 - Variação média da massa corpórea (g) nos animais. O DM foi induzido via injeção de aloxana 60 mg/kg i. v. Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,0001$. (N controle = 4; n diabéticos = 8).

Figura 21 – Equivalentes de ilhotas (IEQ) isolados por animal para transplante. Os IEQs foram isolados via injeção de colagenase 1 mg/mL em HBSS, adicionado de BSA 0,5% (%p/v), via ducto colédoco. Média = $170,2 \pm 12,2$ IEQs (Cada coluna corresponde a um animal).

Os animais designados ao grupo (Tx) foram então anestesiados e submetidos ao transplante, sendo infundido solução de PBS contendo aproximadamente 250 IEQs. Realizou-se então o acompanhamento da massa corpórea e glicemia dos receptores por 16 dias, a se contar do dia pré operatório (POD -1) até o 14º dia pós operatório (POD 14). As curvas de variação glicêmica e massa corpórea estão expostas nas Figuras 24 e 25, respectivamente.

Obteve-se que os indivíduos Tx 2 e Tx 3 obtiveram redução sensível da glicemia abaixo do nível de 200 mg/dL, em média, $11,0 \pm 2,0$ dias após o transplante, com estabilização após 12 dias do procedimento. Todos os animais submetidos aos transplantes apresentaram ganho de massa corpórea no período de seguimento de 14 dias. Ao analisar a variável da glicemia final 14 dias após o transplante, obteve-se que após os transplantes, a média de glicemia dos animais Tx 2 e Tx 3 foi de $172,5 \pm 6,4$ mg/dL, sendo considerados bem sucedidos, enquanto nos animais Tx 1 e Tx 4 foi obtido o valor médio de $568,5 \pm 13,4$ mg/dL, sendo considerados mal sucedidos (Figura 26)

Evolução glicemia dos animais transplantados

Figura 22 - Evolução da glicemia (mg/dL) dos animais transplantados (n=4). POD – Dia pós-operatório.

Evolução da massa corpórea dos animais transplantados

Figura 23 - Evolução da massa corpórea (g) dos animais transplantados (n=4). POD – Dia pós-operatório.

($p < 0,05$) quando comparado com o valor de $582,8 \pm 27,5$ mg/dL do grupo controle diabético (Dx), dividindo-os em dois grupos distintos ($n = 2$): Tx + (bem sucedido) e Tx – (mal sucedido).

Figura 24 - Glicemia média (mg/dL) após 14 dias. Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,0001$. Cx = controle salina; Dx = controle diabético; Tx - = Transplante mal sucedido; Tx + = transplante bem sucedido. (N Cx e Dx = 4; n Tx - e Tx + = 2).

Contudo, ao comparar a variação média de massa corpórea (g) desses grupos, tem-se que todos os animais submetidos ao transplante tiveram aumento de massa corpórea significativamente maior que ambos os grupos controle (Figura 27), com valores de $2,85 \pm 1,45$ g para o grupo Tx – e de $3,10 \pm 0,30$ g para o grupo Tx +, o que indica correlação positiva entre o desfecho ganho de peso e o procedimento de transplante ($p < 0.0001$), quando comparados com o valor de $0,03 \pm 0,10$ g encontrado no grupo controle diabético. Todavia, não houve diferença estatística na variável ganho de peso entre o grupo cujo transplante foi considerado bem sucedido (Tx +) e o grupo cujo transplante foi considerado mal sucedido (Tx -) ($p > 0.05$).

A seguir, foram realizados os testes de tolerância a glicose, com injeção de solução aquosa de glicose a 20% (%p/v) via intraperitoneal, equivalente a 2 g/kg de massa corpórea, após 12 horas de jejum. Após isso foi aferida a glicemia nos tempos 0, 5, 15, 20, 30, 60, 90, 120 minutos dos animais dos grupos controle (Cx), controle diabético (Dx) e diabéticos transplantados (Tx), cujos resultados estão evidenciados, respectivamente, nas Figuras 28, 29 e 30.

Variação média de massa corpórea após 14 dias

Figura 25 - Variação média da massa corpórea (g) nos animais após 14 dias do transplante. Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p = 0,0117$; ** $p < 0,001$. Cx = controle salina; Dx = controle diabético; Tx - = Transplante mal sucedido; Tx + = transplante bem sucedido. (N Cx e Dx = 4; n Tx - e Tx + = 2).

Os testes de tolerância à glicose indicam que os animais com transplante considerado efetivo apresentaram curva do teste glicêmico próxima dos valores obtidos pelos animais do grupo controle (Cx) (Figuras 28 e 30), enquanto os animais Tx 1 e Tx 4 apresentaram curvas mais próximas dos valores obtidos nos animais do grupo controle diabético (Dx) (Figuras 29 e 30).

Figura 26 - Teste de tolerância à glicose do grupo controle (Cx). Animais injetados, após 12 horas de jejum, com solução aquosa de glicose a 20% (%p/v) via i. p., equivalente a 2 g/kg de massa corpórea (n=4).

Figura 27 - Teste de tolerância à glicose do grupo controle diabético (Dx). Animais injetados, após 12 horas de jejum, com solução aquosa de glicose a 20% (%p/v) via i. p., equivalente a 2 g/kg de massa corpórea (n=4).

Figura 28 - Teste de tolerância à glicose do grupo Transplantado (Tx). Animais injetados, após 12 horas de jejum, com solução aquosa de glicose a 20% (%p/v) via i. p., equivalente a 2 g/kg de massa corpórea (n=4).

Essa afirmação se confirma ao comparar a área sob a curva (AUC) dos testes de tolerância a glicose (GTT) realizados (Figura 31). Nessa análise, tem-se que o valor de AUC do GTT dos animais com transplante considerado bem sucedido (Tx+) é significativamente diferente do valor obtido no grupo controle diabético (Dx), o que não ocorre com o grupo dos animais cujo transplante foi considerado mal sucedido (Tx-) ($p < 0,05$). Entretanto, os valores de glicemia em jejum (Figura 32) obtidos no grupo Tx - ($237,5 \pm 54,5$ mg/dL), são mais próximos dos valores obtidos tanto no grupo Cx ($145,0 \pm 10,7$ mg/dL) quanto no grupo Tx + ($125,0 \pm 4,0$ mg/dL) e muito diferentes do encontrado no grupo Dx ($534,2 \pm 9,0$ mg/dL), o que indica a presença de certo grau de controle glicêmico em situações de baixo oferecimento de glicose.

Figura 29 - Área sob a curva dos testes de tolerância à glicose. Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,0001$. Cx = controle salina; Dx = controle diabético; Tx - = Transplante mal sucedido; Tx + = transplante bem sucedido. (N Cx e Dx = 4; n Tx - e Tx + = 2).

Figura 30 - Glicemia média em jejum. Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,0001$; ** $p < 0,0001$. Cx = controle salina; Dx = controle diabético; Tx - = Transplante mal sucedido; Tx + = transplante bem sucedido. (N Cx e Dx = 4; n Tx - e Tx + = 2).

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos dão indícios consistentes de haver implantação de ilhotas em todos os animais transplantados e se pode afirmar que os obstáculos se encontram, pelo menos parcialmente, neutralizados, o que permite afirmar que ilhotas foram transplantadas para a câmara anterior do olho com sucesso em nosso projeto.

A princípio, seriam utilizados camundongos NOD, que apresentam autoimunidade contra as células beta pancreáticas e desenvolvem o diabetes espontaneamente (TANIGUCHI, 2007). Contudo, esses animais não apresentam padrão uniforme de desenvolvimento da doença, seja quanto a idade do aparecimento dos sintomas ou pela glicemia após esta se instalar, com níveis glicêmicos descritos variando na faixa entre 200 mg/dL e 500 mg/dL (ZHANG, 2007; DAVOODI-SEMIROMI, 2012). Dessa forma, se justifica a escolha do modelo de DM induzido quimicamente, pois há maior segurança quanto a depleção da secreção de insulina, visto que os níveis glicêmicos obtidos se encontram constantemente acima dos 500 mg/dL, o que o torna o método mais sensível para avaliar a função após os transplantes.

Quanto ao modelo de diabetes induzido quimicamente, a indução por aloxana foi escolhida em detrimento da indução por estreptozotocina (STZ), porquanto estudos indicam que a STZ apresenta tropismo por células do sistema linfóide e hematopoiético, o que a torna capaz de comprometer resposta imunocompetente do animal induzido, de forma que afetaria diretamente as pesquisas desenvolvidas por nosso grupo e futura utilidade do modelo desenvolvido neste trabalho (MULLER, 2011; SAKOWICZ-BURKIEWICZ, 2006; GAULTON, 1985).

O mecanismo de ação da aloxana envolve a entrada nas células beta pancreáticas, via ligação a transportadores GLUT-2 e posterior geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que acarreta a morte dessas células (SZKUDELSKI, 2001; RERUP, 1970; ELSNER, 2002, LENZEN, 2008). Dessa forma, o animal entra em estado insulinopênico, com quadro típico do diabetes, cujos principais parâmetros observáveis são a hiperglicemia e a sensível perda de peso após a administração da droga (LI, 2012; SPILLER 2012). Esse quadro pode ser claramente observado nos animais após a injeção

de aloxana (60 mg/kg i.v.) quando comparado com o grupo controle salina (Cx). Dez dias após a injeção, obteve-se nível glicêmico de significativamente diferente do encontrado em controles injetados com solução salina, como descrito na literatura (BAEYENS, 2014; YIMAM, 2014). Da mesma forma, houve significativa perda de peso nos animais que sofreram a injeção de aloxana (60 mg/kg v.), com aumento nos animais injetados com solução salina (Cx) e variação negativa no grupo diabético (Dx), como era esperado (YIMAM, 2014; LI, 2012).

Em sequência a escolha do modelo, fez-se necessária a padronização do procedimento de isolamento de ilhotas, visto que essa tecnologia não estava implantada em nosso grupo à ocasião do início do projeto. Em modelos murinos, diversos protocolos e métodos de injeção de collagenase no ducto biliar são descritos, com o protocolo utilizado no trabalho tendo sido adaptado da literatura (SZOT, 2007; ZMUDA, 2011) e a partir da observação dos métodos utilizados no grupo do Prof. Per-Olof Berggren, no Karolinska Institutet (Suécia), em treinamento realizado no mês de fevereiro de 2013.

Dessa forma, ao longo do ano de 2013 foi realizada padronização da solução de collagenase a ser injetada via ducto colédoco, com as adaptações técnicas adequadas à realidade do nosso grupo de pesquisa. A literatura sugere que a adjuvantes como BSA (albumina de soro bovino) ou ITS (inibidor de tripsina de semente de soja) seriam capazes de aumentar a média de IEQs isolados por animal; com valores próximos de 1350 no caso do ITS (SHEWADE, 1999) ou de 220 no caso do BSA (BERTERA, 2012). Porém, o valor médio esperado dos animais C57BL/6 estaria no intervalo de 180-250 IEQs por animal (STULL, 2012).

Após a padronização, obteve-se que para nosso protocolo de isolamento, que não utiliza centrifugação ou gradiente de densidade para separação das ilhotas (MCCALL, 2011), o adjuvante ITS não aumentou o total de ilhotas isoladas. Percebe-se que na presença desse adjuvante adicionado à solução de collagenase, o tecido exócrino do pâncreas não é digerido satisfatoriamente, de forma que não há liberação das ilhotas da matriz extracelular e a presença de grandes porções de tecido dificulta o processo de coleta manual das ilhotas.

Por outro lado, a adição de BSA, conforme previsto na literatura aumentou o número de IEQs obtidos por animal, porém em que proporção esta devia ser adicionada não estava prevista no protocolo observado durante o treinamento no grupo do Prof. Berggren e as informações na literatura eram conflitantes, pois iam desde a adição de 0,2% de BSA (%p/v) a 35% (%p/v) (BERTERA, 2012; FIELD, 1996; DE HAAN, 2004). Após a avaliação de quatro concentrações diferentes de BSA (%p/v), obteve-se que a adição de 0,5% do adjuvante rendeu maior número de IEQs por animal, com média de 141,3, sendo o padrão reproduzido no processo de isolamento de ilhotas para o transplante.

A seguir obteve-se a reta média de ilhotas isoladas relativa à concentração de BSA adicionada à solução de collagenase 1 mg/mL injetada, indicando que o aumento na quantidade de BSA presente é inversamente proporcional à quantidade de IEQs obtidos. O coeficiente de linearidade se encontra abaixo do valor esperado, mas isso é justificável, pois o passo de injeção da solução pelo ducto, que é essencial para obtenção de número elevado de ilhotas (ANDRADES, 2007; GOTOH, 1990), varia de animal para animal e o processo apresenta curva de aprendizado que demanda longo período de treinamento (ANDRADES, 2008).

Apesar disso, adaptações como a substituição da injeção via “mão livre” para via cateter adaptado à agulha 30G aumentou sensivelmente o número de IEQs isolados, como pode ser percebido pela comparação entre a média obtidas no processo de padronização (72,7 IEQs), quando comparado com a média no processo de isolamento para transplante (170,2 IEQs). Ademais, as ilustrações do processo de isolamento demonstram que há dilatação satisfatória do parênquima pancreático, restando somente fatores inerentes ao método como influências no número de IEQs isolados, entre eles estão a massa do animal doador, massa do pâncreas, o lote da enzima utilizada, entre outros (ANDRADES, 2008; DE HAAN, 2004). Convém destacar também a diminuição do tempo de digestão do pâncreas na etapa de isolamento para transplante dos 20 minutos inicialmente previstos no projeto para os dois períodos de 8 minutos intercalados por agitação vigorosa da amostra, o que difere sutilmente dos métodos usualmente descritos (SZOT, 2007; ZMUDA, 2011).

Contudo diversos obstáculos se interpõem ao estabelecimento em novos centros da técnica de transplante de ilhotas pancreáticas, visto que os primeiros transplantes bem sucedidos e a publicação do protocolo de Edmonton ocorreram há pouco mais de uma década, apenas (ELIASCHEWITZ, 2009; SHAPIRO, 2000; SHAPIRO, 2006). Em modelos animais isso não é diferente, uma vez que, apesar de o nível de demanda material e de instalações ser muito menor, o nível de treinamento técnico e cirúrgico pode ser considerado elevado, dada a menor dimensão dos órgãos animais, especialmente nos modelos murinos, em relação aos órgãos humanos.

Nesse sentido, uma das principais barreiras para o estabelecimento pleno da técnica de transplante de ilhotas pancreáticas é a escolha do sítio receptor. Atualmente, em humanos, o sítio de primeira escolha segue sendo o enxerto via veia porta hepática (ELIASCHEWITZ, 2009). Todavia, esse local apresenta limitações, como a baixa pressão de oxigênio local e a possibilidade de eventos adversos após a infusão de ilhotas (CARLSSON, 2000; CARLSSON, 2001; PEPPER, 2013; KAWAHARA, 2011). Portanto, a busca de novos sítios receptores de ilhotas em modelos animais se tornou algo em voga nos últimos anos e, dentre os sítios utilizados em experimentos em animais, destaca-se a câmara anterior do olho, pela praticidade, acessibilidade dos transplantes e possibilidade de controle farmacológico da liberação de insulina pelas ilhotas (SPEIER, 2008; RODRIGUEZ-DIAZ, 2012; MERANI, 2008).

Outro obstáculo a se transpor na realização do transplante de ilhotas pancreáticas é a quantidade de ilhotas necessárias para atingir a euglicemia do receptor. Atualmente, segundo a maioria de protocolos de transplantes, que se baseiam no protocolo de Edmonton, realiza-se transplante de, no mínimo 10.000 equivalentes de ilhotas por quilograma de massa do receptor (SHAPIRO, 2000; SHAPIRO, 2006; ORAN, 2014; RICKELS, 2013).

Em consequência, seria necessário, no mínimo, 700.000 equivalentes de ilhotas para transplantar a um receptor de massa média de 70 kg. Porém, a literatura estabelece que o procedimento de isolamento pode ser considerado bem sucedido caso a quantidade de ilhotas obtidas por pâncreas supere a quantidade de 250.000, apesar de valores da ordem de 400.000 até 800.000 por pâncreas serem descritos em diversos

estudos (HANLEY, 2008; TAKITA, 2014; KADDIS, 2010). Isso estabelece que seriam necessários entre dois a três doadores para cada receptor de transplante de ilhotas.

No nosso caso, o obstáculo é o mesmo, mas em diferente escala. Atualmente, para reverter o DM induzido quimicamente, realiza-se o transplante de valores entre 200 e 300 equivalentes de ilhotas para um camundongo de 25 gramas, cujo valor se enquadra dentro dos 10.000 equivalentes de ilhota por quilograma de massa corpórea do receptor (RODRIGUEZ-DIAZ, 2012; SPEIER, 2008). Nesse sentido, o número de animais necessários para reverter o DM de um receptor é, em média, de 2 animais doadores.

Apesar disso tudo, ainda se questiona a capacidade da técnica de transplante de ilhotas se apresentar como alternativa curativa no tratamento do DMT1 e seus potenciais benefícios ao paciente receptor. Tal questionamento é extremamente importante para o nosso projeto, pois, ainda que o transplante para a câmara anterior do olho seja extremamente relevante do ponto de vista do acompanhamento da fisiologia das ilhotas pancreáticas *in vivo*, há de se sentir seduzido pelas possibilidades que esse modelo evoca ao se imaginar a transferência deste para pacientes com quadro mais grave de DMT1.

Nesse sentido, o quadro clínico do DMT1 diz respeito à hiperglicemia, sendo os sintomas mais comuns a polidipsia, poliúria, polifagia e perda de peso de, no mínimo 5% da massa corpórea nos últimos 6 meses ou 10% da massa corpórea nos últimos 12 meses (CLARK, 2007; ATKINSON, 2014; LEVY-MARCHAL, 2001). Todavia, tais parâmetros não ilustram o quadro típico, ao diagnóstico de DMT1, em que grande parte dos pacientes se apresenta em cetoacidose diabética, definida como concentração de bicarbonato sanguíneo < 15 mmol/L e/ou pH sanguíneo $< 7,25$, ainda que a quantidade de pacientes que se apresentam dessa forma varie em relação ao local geográfico em que é feito o diagnóstico (CHOLEAU, 2014; ONYIRIUKA, 2013; WOLFSDORF, 2006; USHER-SMITH, 2012).

Entre outros problemas relacionados ao DM também estão as doenças arteriais oclusivas periféricas e a perda da visão. Diversos estudos indicam que pessoas portadoras de DM apresentam risco maior de sofrer amputações de membro inferior,

devido a insuficiência arterial, com variação do risco relativo em relação ao local de residência do paciente (CANAVAN, 2008; MOXEY, 2011; VAN HOUTUM, 2004). Ademais, pacientes com DMT1 também apresentam risco mais elevado de desenvolver retinopatia diabética, risco que cresce com maior número de anos após o diagnóstico (DEDOV, 2009; NORDWALL, 2014; THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL, 2000). Todas essas complicações estão mais frequentemente associadas a pacientes com difícil controle glicêmico, especialmente nos casos de diabetes lábil (*“brittle diabetes”*), a quem o transplante de ilhotas se apresenta como boa alternativa de tratamento para estabilizar a glicemia a longo prazo (BERTUZZI, 2007; VANTYGHEM, 2009, SCHADE, 1995, KOH, 2013; FRIER, 2014).

Portanto, para simular o quadro de DMT1 já instalado, utilizamos animais receptores de transplante com o diabetes induzido quimicamente como previamente descrito, porquanto permite avaliar o resultado positivo da metodologia de transplante a partir da variação dos dois principais sinais do quadro de DM, a hiperglicemia e a perda de peso (DEEDS, 2011; MAKHLOUF, 2003). Dessa forma os animais receptores foram submetidos ao transplante (Tx) de aproximadamente 270 IEQs de ilhotas por animal, com o objetivo de normalizar a glicemia dos receptores do enxerto.

Entretanto, para realizar esse transplante na ausência dos meios apresentados na literatura, foram necessárias diversas adaptações, como a produção de retrator ocular que se adapte ao globo ocular do camundongo, o uso de anestesia com quetamina e xilazina, assim como o uso de capilares de vidro com ponta de diâmetro médio. Esse último detalhe se faz o mais importante, uma vez que, enquanto capilares de extremidades com circunferência menor facilitam a inserção da cânula dentro da câmara anterior, foi observado que, ao aspirar as ilhotas para o interior da cânula, o canal mais estreito rompe o tecido conjuntivo responsável pela manutenção da integridade das ilhotas, que acarreta destruição de sua arquitetura histológica e o comprometimento de sua funcionalidade.

Após o procedimento do transplante, realizou-se o acompanhamento dos indivíduos por 14 dias, visto que esse é o período descrito na literatura para plena vascularização dos enxertos das ilhotas na câmara anterior do olho (SPEIER, 2008). Ao

analisar os dados obtidos relativos à glicemia, observou-se queda sensível nos níveis glicêmicos de somente dois animais após 11 dias da realização do transplante. Tal número de dias se encontra próximo do descrito na literatura a respeito do início da neovascularização do enxerto das ilhotas, o que possibilita o início da resposta secretória de insulina pelos enxertos (NYQVIST, 2011; CHAN, 2009).

Nyqvist e colaboradores (2011) descreveram queda significativa na glicemia de camundongos receptores de transplante de ilhotas pancreáticas para a câmara anterior do olho, em média, 12,5 dias após o procedimento, valor próximo do obtido no presente experimento (NYQVIST, 2011; SPEIER, 2008). Contudo, esse valor se encontra acima do encontrado em transplantes para outros sítios, como o subcapsular renal e transplantes via intraportal (MORIYAMA, 2003; QUARANTA, 2014; CUI, 2009).

Dessa forma, obteve-se que a taxa de sucesso dos transplantes foi de 50%, com dois animais normoglicêmicos 14 dias após os transplantes. Ao comparar a glicemia final média dos grupos, tem-se que os animais cujo transplante foi considerado bem sucedido (Tx +) apresentavam glicemia média final, após 14 dias, significativamente inferior aos valores do grupo controle diabético (Dx) e semelhante ao grupo controle salina (Cx), enquanto os animais que tiveram o transplante considerado mal sucedido (Tx -) apresentavam glicemia média final significativamente diferente de Cx e semelhante a Dx.

Em experimento com transplante de ilhotas interespecíficas para o espaço subcapsular, *Loganathan* e colaboradores (2013) atingiram cerca de 75% de sucesso nos transplantes em camundongos timectomizados (LOGANATHAN, 2013). Entretanto, a taxa de sucesso após duas semanas varia entre diversos estudos, relativo ao sítio receptor, total de equivalentes de ilhotas transplantados, imunossupressão e espécie de camundongo utilizada (RACKHAM, 2013; NYQVIST, 2011; SAITO, 2012).

Em humanos, considera-se transplante bem sucedido quando há independência do uso de insulina após o procedimento e a taxa de sucesso obtida, após 1 ano, está ao redor de 60% (HUURMAN, 2008; HARLAN, 2009; RYAN, 2005; NICLAUSS, 2012). Porém, em diversos casos, se faz necessária a realização de novas infusões de ilhotas após o primeiro procedimento, com média de 1,92 transplantes por paciente na América do Norte, de 1999-2008 (JAHANSOUZ, 2011). Ao transferir essa realidade para os

resultados apresentados, é provável que a realização de transplante de ilhotas adjuvante seria suficiente para normalizar a glicemia dos animais cujo transplante foi considerado mal sucedido, pois apenas parcela de ilhotas teriam se implantado no tecido ocular.

Tal afirmação corrobora com os achados obtidos após o acompanhamento da variação de peso dos animais transplantados, em que todos os animais submetidos ao procedimento apresentaram sensível ganho de peso após 14 dias, como indicado na literatura (SAITO, 2012; DENROCHE, 2013). Ademais, ao comparar esses valores com os obtidos pelo grupo controle diabético (Dx) e, até mesmo ao grupo controle salina (Cx), pode-se afirmar que o ganho de peso, tanto dos animais cujo transplante foi considerado bem sucedido (Tx +), quanto dos animais que o transplante foi considerado mal sucedido (Tx -), tenha sido estatisticamente significativo.

Outrossim, após a realização dos testes de tolerância a glicose, observa-se que o pico dos animais Tx + ocorre em tempo maior que o dos animais do grupo Cx, o que é compreensível, porquanto os valores de glicemia dos picos do grupo Cx são, em média, inferiores aos do grupo Tx +. Isso indica menor controle glicêmico dos animais transplantados quando expostos a sobrecarga de glicose, visto que a massa de células secretoras de insulina nesses animais é menor que no grupo controle, com resultados semelhantes observados na literatura (RODRIGUEZ-DIAZ, 2012; SAITO, 2012; SAKATA, 2010; DENROCHE, 2013).

Em consequência, ao avaliar a área sob a curva dos gráficos dos testes de tolerância a glicose, observa-se que há diferença significativa entre os valores obtidos no grupo Tx +, quando comparado com o grupo Dx, o que não ocorre nos valores obtidos do grupo Tx -. Entretanto, a menor massa de célula beta dos animais transplantados faz com que os valores de AUC obtidos nos animais do grupo Cx sejam significativamente menores que nos animais do grupo Tx +, o que já era esperado devido aos picos mais elevados encontrados nos testes de tolerância a glicose (RODRIGUEZ-DIAZ, 2012; SAITO, 2012; SAKATA, 2010; DENROCHE, 2013).

Todavia, ao observar os animais Tx -, percebe-se padrão de curva semelhante ao dos animais Dx, com diferença sensível nos valores de glicemias no tempo $t = 0$ minutos. Portanto, é importante ressaltar que, após avaliar as glicemias em jejum, obteve-se que

os animais Tx - apresentaram valor significativamente menor que os encontrados nos animais diabéticos, o que confirma, associado aos resultados de ganho de peso, que ambos animais do grupo Tx - apresentam ilhotas implantadas na câmara anterior do olho. Contudo a quantidade de ilhotas implantadas nesse sítio só seria suficiente para manter níveis glicêmicos baixos em situações de baixo oferecimento de glicose, enquanto situações de sobrecarga de glicose, como a ausência de jejum, acarretam insuficiência de liberação de insulina.

Dessa forma, o motivo desses transplantes não atingirem o desfecho desejado, ou seja, a causa do déficit na liberação de insulina após o transplante, está ligada a alguns fatores notáveis e já descritos na literatura. A princípio, é essencial enfatizar que, durante o processo de isolamento, é realizada a coleta de equivalentes de ilhotas (IEQ) identificados morfológicamente, de forma que a quantidade de células beta produtoras de insulina nestes IEQ, assim como a viabilidade destes pode variar imensamente entre procedimentos, estando incluso nos IEQs tecido que não pertence ao pâncreas endócrino. *Pisania* e colaboradores (2010), ao estudar IEQs isolados de pâncreas de doadores humanos, obteve que apenas 48,3% do total de células presentes nos IEQs eram células endócrinas, com apenas 35,6% do total de células eram células beta, com indícios de que a quantidade de células beta dentro de uma população de ilhotas também pode variar significativamente (PISANIA, 2010; BRISSOVA, 2005).

Por outro lado, como ficam privadas do oxigênio sanguíneo, as ilhotas pancreáticas estão sujeitas a lesões de isquemia-reperfusão, tanto durante o procedimento de isolamento de ilhotas e cultura, quanto durante o procedimento de transplante. Estudos indicam que as células das ilhotas pancreáticas apresentam concentração reduzida de enzimas redutoras, o que as torna mais sensíveis ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) presentes após eventos de isquemia-reperfusão, com ilhotas cultivadas na presença de antioxidantes apresentando melhor controle glicêmico após transplantes, devido a melhor capacidade de secreção de insulina (SKLAVOS, 2010; DU, 2013; DAVALLI, 1996; MOLNÁR, 2013).

Por fim, a etapa de implantação das ilhotas se torna essencial para o sucesso do transplante, pois envolve a revascularização e fornecimento de suprimento sanguíneo

adequado, tanto para o fornecimento de oxigênio para as células, quanto para a resposta adequada de secreção hormonal relacionada a glicemia do organismo. Estudos indicam que a vascularização das ilhotas é determinante no desenvolvimento homeostático de suas funções, o que torna o passo de angiogênese nos enxertos o passo essencial no sucesso de implantação do transplante (KANG, 2012; PENKO, 2013). Nos enxertos transplantados para a câmara anterior do olho isso não é diferente, sendo o evento de neovascularização das ilhotas transplantadas o passo que acarreta a diminuição da glicemia dos animais receptores dos transplantes (NYQVIST, 2011; ALMAÇA, 2014).

É conveniente destacar também, que esses fatores são problemas inerentes ao processo de transplante de ilhotas, independente do sítio receptor, e, por que não, inerentes ao procedimento de transplante de órgãos em geral, no caso das lesões por isquemia-reperfusão. Todavia, com a evolução e popularização da técnica, espera-se que esses problemas se tornem cada vez menos deletérios, visto que essa técnica ainda é relativamente recente, especialmente no que diz respeito ao transplante para a câmara anterior do olho.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o modelo de transplante de ilhotas pancreáticas para a câmara anterior do olho foi bem estabelecido neste projeto, confirmado pelos resultados que evidenciam o transplante de ilhotas funcionais capazes de reduzir sensivelmente a glicemia e promover o ganho de peso em camundongos diabéticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; Lichtman, A.H. *Imunologia Celular e Molecular*, 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABDULREDA, M.H.; FALEO, G.; MOLANO, R.D.; LOPEZ-CABEZAS, M.; MOLINA, J.; TAN, Y.; ECHEVERRIA, O.A.; ZAHR-AKRAWI, E.; RODRIGUEZ-DIAZ, R.; EDLUND, P.K.; LEIBIGER, I.; BAYER, A.L.; PEREZ, V.; RICORDI, C.; CAICEDO, A.; PILEGGI, A; BERGGREN, P.O. High-resolution, noninvasive longitudinal live imaging of immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 31, p. 12863-12868. 2011.

ALMAÇA, J.; MOLINA, J.; ARROJO, E.; DRIGO, R.; ABDULREDA, M.H.; JEON, W.B.; BERGGREN, P.O.; CAICEDO, A.; NAM, H.G. Young capillary vessels rejuvenate aged pancreatic islets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 49, p. 17612-17617. 2014.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes – 2014. **Diabetes Care**, v. 37, sup. 1, p. S14-S80, 2014.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Disponível em <http://www.diabetes.org>. Acessado em 09/11/2014.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, sup. 1, p. S81-S90, 2014.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Economic costs of diabetes in the US in 2012. **Diabetes Care**, v. 36, n. 4, p. 1033-1046. 2013.

ANDRADES, P.; ASIEDU, C.; RAY, P.; RODRIGUEZ, C.; GOODWIN, J.; MCCARN, J.; THOMAS J.M. Islet yield after different methods of pancreatic liberase delivery. **Transplantation Proceedings**, v. 39, p. 183–184. 2007.

ANDRADES, P.; ASIEDU, C.K.; GANSUVD, B.; INUSAH, S.; GOODWIN, K.J.; DECKARD, L.A.; JARGAL, U.; THOMAS, J.M. Pancreatic islet isolation variables in non-human primates (rhesus macaques). **Diabetologia**, v. 51, n. 7, p. 1236-1244. 2008.

ASHOUR, H.M.; NIEDERKORN, J.Y. $\gamma\delta$ T cells promote anterior chamber-associated immune deviation and immune privilege through their production of IL-10. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 12, p. 8331-8337. 2006.

ATKINSON, M.A.; EISENBARTH, G.S.; MICHELS, A.W. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 383, iss. 9911, p. 69-82, 2014.

BACH, J.; CHATENAUD, L. The Hygiene Hypothesis: An Explanation for the Increased Frequency of Insulin-Dependent Diabetes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 2, p. 1-10, 2012.

BAEYENS, L.; LEMPER, M.; LEUCKX, G.; DE GROEF, S.; BONFANTI, P.; STANGÉ, G.; SHEMER, R.; NORD, C.; SCHEEL, D.W.; PAN, F.C.; AHLGREN, U.; GU, G.; STOFFERS, D.A.; DOR, Y.; FERRER, J.; GRADWOHL, G.; WRIGHT, C.V.; VAN DE CASTEELE, M.; GERMAN, M.S.; BOUWENS, L.; HEIMBERG, H. Transient cytokine treatment induces acinar cell reprogramming and regenerates functional beta cell mass in diabetic mice. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 76-83. 2014.

BALLINGER W.F.; LACY, P.E. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. **Surgery**, v. 72, p. 175–186, 1972.

BARTON, F.B.; RICKELS, M.R.; ALEJANDRO, R.; HERING, B.J.; WEASE, S.; NAZIRUDDIN, B.; OBERHOLZER, J.; ODORICO, J.S.; GARFINKEL, M.R.; LEVY, M.; PATTOU, F.; BERNEY, T.; SECCHI, A.; MESSINGER, S.; SENIOR, P.A.; MAFFI, P.; POSSELT, A.; STOCK, P.G.; KAUFMAN, D.B.; LUO, X.; KANDEEL, F.; CAGLIERO, E.; TURGEON, N.A.; WITKOWSKI, P.; NAJI, A.; O'CONNELL, P.J.; GREENBAUM, C.; KUDVA, Y.C.; BRAYMAN, K.L.; AULL, M.J.; LARSEN, C.; KAY, T.W.; FERNANDEZ, L.A.; VANTYGHM, M.C.; BELLIN, M.; SHAPIRO, A.M. Improvements in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. **Diabetes Care**, v. 35, n.7, p. 1436-1445, 2012.

BERTERA, S.; BALAMURUGAN, A.N.; BOTTINO, R.; HE, J.; TRUCCO, M. Increased yield and improved transplantation outcome of mouse islets with bovine serum albumin. **Transplantation Proceedings**, v. 2012, 2012.

BERTUZZI, F.; VERZARO, R.; PROVENZANO, V.; RICORDI, C. Brittle type 1 diabetes mellitus. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 1739-1744. 2007.

BOGGI, U.; AMORESE, G.; MARCHETTI, P. Surgical techniques for pancreas transplantation. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 15, n.1, p. 102-111. 2010.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Cadernos de atenção básica – Diabetes Mellitus**. Brasília, DF, n. 36. 2013.

BRISSOVA, M.; FOWLER, M.J.; NICHOLSON, W.E.; CHU, A.; HIRSHBERG, B.; HARLAN, D.M.; POWERS, A.C. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. **The Journal of Histochemistry Cytochemistry: oficial jornal of the Histochemistry Society**, v. 9, p.1087-1097. 2005.

BROWNING, H.; RESNIK, P. Homologous and heterologous transplantation of pancreatic tissue in normal and diabetic mice. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 24, n. 2, p. 141-152. 1951.

BRUNI, A.; GALA-LOPEZ, B.; PEPPER, A.R.; ABUALHASSAN, N.S.; SHAPIRO, A.J. Islet cell transplantation for the treatment of type 1 diabetes: recent advances and future challenges. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 23, n. 7, p. 211-223. 2014.

CANAVAN, R.J.; UNWIN, N.C.; KELLY, W.F.; CONNOLLY, V.M. Diabetes and nondiabetes related lower extremity amputation incidence before and after the introduction of better organized diabetes foot care: continuous longitudinal monitoring using a standard method. **Diabetes Care**, v. 31, n. 3, p. 459-463. 2008.

CARDOZO, A.K.; PROOST, P.; GYSEMANS, C.; CHEN, M.C.; MATHIEU, C.; EIZIRIK, D.L. IL-1 β and IFN- γ induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice. **Diabetologia**, v. 46, n. 2, p. 255-266. 2003.

CARLSSON, P.O.; PALM, F.; ANDERSSON, A.; LISS, P. Chronically decreased oxygen tension in rat pancreatic islets transplanted under the kidney capsule. **Transplantation**, v. 69, n. 5, p. 761–766. 2000.

CARLSSON, P.O.; PALM, F.; ANDERSSON, A.; LISS, P. Markedly decreased oxygen tension in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site. **Diabetes**, v. 50, n. 3, p. 489–495. 2001.

CARREL, A. Heterotransplantation of blood vessels preserved in cold storage. **Journal of Experimental Medicine**, v. 9, n. 2, p. 226-228. 1907.

CHAN, N.; OBENAU, A.; TAN, A.; SAKATA, N.; MACE, J.; PEVERINI, R.; CHINNOCK, R.; SOWERS, L.C.; HATHOUT, E. Monitoring neovascularization of intraportal islet grafts by dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging. **Islets**, v. 1, n. 3, p. 249-255. 2009.

CHOLEAU, C.; MAITRE, J.; FILIPOVIC-PIERUCCI, A.; ELIE, C.; BARAT, P.; BERTRAND, A.M.; DE Kerdanet, M.; LETALLEC, C.; LEVY-MARCHAL, C.; NICOLINO, M.; TUBIANA-RUFI, N.; CAHANÉ, M.; ROBERT, J.J.; AJD STUDY GROUP. Ketoacidosis at diagnosis of type 1 diabetes in French children and adolescents. **Diabetes and Metabolism**, v. 40, n. 2, p. 137-142. 2014.

CITRO, A.; CANTARELLI, E.; PIEMONTE, L. Anti-inflammatory strategies to enhance islet engraftment and survival. **Current Diabetes Report**, v. 13, n. 5, p. 733-744. 2013.

CLARK, N. G.; FOX, K. M.; GRANDY, S. Symptoms of diabetes and their association with the risk and presence of diabetes: findings from the Study to Help Improve Early evaluation and management of risk factors Leading to Diabetes (SHIELD). **Diabetes Care**, v. 30, n.11, p. 2868-2873. 2007.

COUPLAND, R.E. Growth of Pancreatic Islet Tissue in the Anterior Chamber of the Eye. **Nature**, v. 179, p. 51 – 52. 1957.

CUI, W.; WILSON, J.T.; WEN, J.; ANGSAANA, J.; QU, Z.; HALLER, C.A.; CHAIKOF, E.L. Thrombomodulin improves early outcomes after intraportal islet transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 9, n. 6, p. 1308–1316. 2009.

DAVALLI, A.M.; SCAGLIA, L.; ZANGEN, D.H.; HOLLISTER, J.; BONNER-WEIR, S.; WEIR, G.C. Vulnerability of islets in the immediate post transplantation period. Dynamic changes in structure and function. **Diabetes**, v. 45, n. 9, p. 1161-1167. 1996.

DAVOODI-SEMIROMI, A.; HASSANZADEH, A.; WASSERFALL, C.H.; DRONEY, A.; ATKINSON, M. Tyrphostin AG490 agent modestly but significantly prevents onset of type 1 in NOD mouse; implication of immunologic and metabolic effects of a Jak-Stat pathway inhibitor. **Journal of Clinical Immunology**, v. 32, n. 5, p. 1038-1047. 2012.

DEDOV, I.; MASLOVA, O.; SUNTSOV, Y.; BOLOTSKAIA, L.; MILENKAIA, T.; BESMERTNAIA, L. Prevalence of diabetic retinopathy and cataract in adult patients with type 1 and type 2 diabetes in Russia. **The Review of Diabetic Studies**, v. 6, n. 2, p. 124–129. 2009.

DEEDS, M.; ANDERSON, J.; ARMSTRONG, A.; GASTINEAU, D.; HIDDINGA, H.; JAHANGIR, A.; EBERHARDT, N.L.; KUDVA, Y. Single dose streptozotocin induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. **Laboratory Animals**, v. 45, n. 3, p. 131–140. 2011.

DE HAAN, B.J.; FAAS, M.M.; SPIJKER, H.; VAN WILLIGEN, J.W.; DE HAAN, A.; DE VOS, P. Factors influencing isolation of functional pancreatic rat islets. **Pancreas**, v. 29, n. 1, p. 15-22. 2004.

DENROCHE, H.C.; QUONG, W.L.; BRUIN, J.E.; TUDURÍ, E.; ASADI, A.; GLAVAS, M.M.; FOX, J.K.; KIEFFER, T.J. Leptin administration enhances islet transplant performance in diabetic mice. **Diabetes**, v. 62, n. 8, p. 2738-2746. 2013.

DU, X.; HE, S.; JIANG, Y.; WEI, L.; HU, W. Adiponectin prevents islet ischemia-reperfusion injury through the COX2-TNF α -NF- κ B-dependent signal transduction pathway in mice. **Journal of Endocrinology**, v. 218, n. 1, p. 75-84. 2013.

EICH, T.; ERIKSSON, O.; LUNDGREN, T.; NORDIC NETWORK FOR CLINICAL ISLET TRANSPLANTATION. Visualization of early engraftment in clinical islet transplantation by positron-emission tomography. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 26, p. 2754–2755. 2007.

ELIASCHEWITZ, F.G.; FRANCO, D.R.; MARES-GUIA, T.R.; NORONHA, I.L.; LABRIOLA, L.; SOGAYAR, M.C. Transplante de ilhotas na prática clínica: estado atual e perspectivas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 1, p. 15-23. 2009.

ELSNER, M.; TIEDGE, M.; GULDBAKKE, B.; MUNDAY, R.; LENZEN, S. Importance of the GLUT2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan. **Diabetologia**, v. 45, n. 11, p. 1542-1549. 2002.

FIELD, J.; FARNEY, A.; SUTHERLAND, D.E. Improved islet isolation from rat pancreas using 35% bovine serum albumin in combination with Dextran gradient separation. **Transplantation**, v. 61, n. 10, p.1554-1556. 1996.

FRIER, B.M. Hypoglycemia in diabetes mellitus: epidemiology and clinical implications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, p. 711–722. 2014.

GAN, M.J.; ALBANESE-O'NEILL, A.; HALLER, M.J. Type 1 Diabetes: Current Concepts in Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Care, and Research. **Current Problems in Pediatrics and Adolescent Health Care**, v. 42, n. 10, p. 269-291. 2012.

GAULTON, G.N.; SCHWARTZ, J.L.; EARDLEY, D.D. Assessment of the diabetogenic drugs alloxan and streptozotocin as model for the study of immune defects in diabetic mice. **Diabetologia**, v. 28, p. 769-775. 1985.

GIBLY, R.F.; GRAHAM, J.G.; LUO, X.; LOWE, W.L.; HERING, B.J.; SHEA, L.D. Advancing islet transplantation: from engraftment to the immune response. **Diabetologia**, v. 54, n. 10, p. 2494–2505. 2011.

GOTOH, M., OHZATO, H., PORTER, J., MAKI, T., MONACO, A.P. Crucial role of pancreatic ductal collagenase injection for isolation of pancreatic islets. **Hormone and Metabolic Research**, sup. 25, p. 10-16. 1990.

GUARIGUATA, L.; WHITING, D.R.; HAMBLETON, I.; BEAGLEY, J.; LINNENKAMP, U.; SHAW, J.E. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 103, n. 2, p. 137-49. 2014.

HANLEY, S.C.; PARASKEVAS, S.; ROSENBERG, L. Donor and isolation variables predicting human islet isolation success. **Transplantation**, v. 85, p. 950–955. 2008.

HARLAN, D.M.; KENYON, N.S.; KORSGREN, O.; ROEP, B.O. Current advances and travails in islet transplantation. **Diabetes**, v. 58, n.10, p. 2175-2184. 2009.

HUURMAN, V.A.; HILBRANDS, R.; PINKSE, G.G.; GILLARD, P.; DUINKERKEN, G.; VAN DE LINDE, P.; VAN DER MEER-PRINS, P.M.; VERSTEEG-VAN DER VOORT MAARSCHALK, M.F.; VERBEECK, K.; ALIZADEH, B.Z.; MATHIEU, C.; GORUS, F.K.; ROELEN, D.L.; CLAAS, F.H.; KEYMEULEN, B.; PIPELEERS, D.G.; ROEP, B.O. Cellular islet autoimmunity associates with clinical outcome of islet cell transplantation. **Public Library of Science One**, v. 3, n. 6, e2435. 2008.

ICHII, H.; RICORDI, C. Current status of islet cell transplantation. **Journal of Hepatobiliary Pancreatic Surgery**, v. 16, n. 2, p. 101-112. 2009.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas, 6ª edição.** 2013. Disponível em <http://www.idf.org/>. Acessado em 09/11/2014.

JAHANSOUZ, C.; JAHANSOUZ, C.; KUMER, S.C.; BRAYMAN, K.L. Evolution of β -cell replacement therapy in diabetes mellitus: islet cell transplantation. **Journal of Transplantation**, v. 2011, art. 247959, p. 1-21. 2011.

JUN, H.; YOON, C.S.; ZBYTNUK, L.; VAN ROOIJEN, N.; YOON, J.W. the role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 2, p. 347-358. 1999.

KADDIS, J.S.; DANOBEITIA, J.S.; NILAND, J.C.; STILLER, T.; FERNANDEZ, L.A. Multicenter analysis of novel and established variables associated with successful human islet isolation outcomes. **American Journal of Transplantation**, v.10, p. 646-656. 2010.

KANG, S.; PARK, H.S.; JO, A.; HONG, S.H.; LEE, H.N.; LEE, Y.Y.; PARK, J.S.; JUNG, H.S.; CHUNG, S.S.; PARK, K.S. Endothelial progenitor cell cotransplantation enhances islet engraftment by rapid revascularization. **Diabetes**, v. 61, n. 4, p. 866-876. 2012.

KAWAHARA, T.; KIN, T.; KASHKOUSH, S.; GALA-LOPEZ, B.; BIGAM, D. L.; KNETEMAN, N.M.; KOH, A.; SENIOR, P.A.; SHAPIRO, A.M. Portal vein thrombosis is a potentially preventable complication in clinical islet transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 11, n. 12, p. 2700-2707. 2011.

KELLY, W.D.; LILLEHEI, R.C.; MERKEL, F.K. Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. **Surgery**, v. 61, p. 827–837. 1967.

KNIGHT, R.R.; KRONENBERG, D.; ZHAO, M.; HUANG, G.C.; EICHMANN, M.; BULEK, A.; WOOLDRIDGE, L.; COLE, D.K.; SEWELL, A.K.; PEAKMAN, M.; SKOWERA, A. Human β -cell killing by autoreactive preproinsulin-specific CD8 T cells is predominantly granule-mediated with the potency dependent upon T-cell receptor avidity. **Diabetes**, v. 62, n. 1, p. 205-213. 2013.

KNIP, M.; SIMELL, O. Environmental triggers of type 1 diabetes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 7, p. 1-15, 2012.

KOH, A.; IMES, S.; SHAPIRO, A.M.; SENIOR, P.A. Successful treatment of brittle diabetes following total pancreatectomy by islet allotransplantation: a case report. **Journal of the Pancreas**, v. 14, n. 4, p. 428-431. 2013.

KONDRASHOVA, A.; REUNANEN, A.; ROMANOV, A.; KARVONEN, A.; VISKARI, H.; VESIKARI, T.; ILONEN, J.; KNIP, M.; HYOTY, H. A sixfold gradient in the incidence of type 1 diabetes at the eastern border of Finland. **Annals of Medicine**, v. 37, n. 1, p. 67–72. 2005.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226. 2008.

LESLIE, R.D. Predicting adult-onset autoimmune diabetes: clarity from complexity. **Diabetes**, v. 59, p. 330–331. 2010.

LEVINE, R. Historical development of the theory of pancreatic diabetes by Oscar Minkowski, 1929: introduction and translation by Rachmiel Levine. **Diabetes**, v. 38, p. 1-6. 1989.

LÉVY-MARCHAL, C.; PATTERSON, C.C.; GREEN, A.; EURODIAB ACE STUDY GROUP. Europe and Diabetes. Geographical variation of presentation at diagnosis of type I diabetes in children: the EURODIAB study. European and Diabetes. **Diabetologia**, v. 44, Sup. 3, p. B75-B80. 2001.

LI, Y.; HAMASAKI, T.; TERUYA, K.; NAKAMICHI, N.; GADEK, Z.; KASHIWAGI, T.; YAN, H.; KINJO, T.; KOMATSU, T.; ISHII, Y.; SHIRAHATA, S. Suppressive effects of natural reduced waters on alloxan-induced apoptosis and type 1 diabetes mellitus. **Cytotechnology**, v. 64, n.3, p. 281-297. 2012

LIN, H.H.; FAUNCE, D.E.; STACEY, M.; TERAJEWICZ, A.; NAKAMURA, T.; ZHANG-HOOVER, J.; KERLEY, M.; MUCENSKI, M.L.; GORDON, S.; STEIN-STREILEIN, J. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 10, p. 1615–1625. 2005.

LINETSKY, E.; BOTTINO, R.; LEHMANN, R.; ALEJANDRO, R.; INVERARDI, L.; RICORDI, C. Improved human islet isolation using a new enzyme blend, liberase. **Diabetes**, v. 46, n. 7, p. 1120-1123. 1997.

LOGANATHAN, G.; GRAHAM, M.L.; RADOSEVICH, D.M.; SOLTANI, S.M.; TIWARI, M.; ANAZAWA, T.; PAPAS, K.K.; SUTHERLAND, D.E.; HERING, B.J.; BALAMURUGAN, A.N. Factors affecting transplant outcomes in diabetic nude mice receiving human, porcine, and nonhuman primate islets: analysis of 335 transplantations. **Transplantation**, v. 95, n. 12, p. 1439-1447. 2013.

MAAHS, D.M.; WEST, N.A.; LAWRENCE, J.M.; MAYER-DAVIS, E.J. Epidemiology of type 1 diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 39, p. 481–497. 2010.

MACLEOD, J.J.R. Insulin and diabetes: a general statement of the physiological and therapeutic effects of insulin. **The British Medical Journal**, v. 2, p. 833-835, 1922.

MAKHLOUF, L.; DUVIVIER-KALI, V.F.; BONNER-WEIR, S.; DIEPERINK, H.; WEIR, G.C.; SAYEGH, M.H. Importance of hyperglycemia on the primary function of allogeneic islet transplants. **Transplantation**, v. 76, n. 4, p. 657-664. 2003.

MALANSON, K.M.; LEM, J. Rhodopsin-mediated retinitis pigmentosa. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 88, p. 1-31. 2009.

MCCALL, M.D.; MACIVER, A.H.; PAWLICK, R.; EDGAR, R.; SHAPIRO, A.M. Histopaque provides optimal mouse islet purification kinetics: comparison study with Ficoll, iodixanol and dextran. **Islets**, v. 3, n. 4, p. 144-149. 2011.

MCCALL, M.; SHAPIRO, A.M.J. Update on islet transplantation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v.2, art. 007823. 2012.

MERANI, S.; TOSO, C.; EMAMAULEE, J.; SHAPIRO, A.M. Optimal implantation site for pancreatic islet transplantation. **The British Journal of Surgery**, v. 95, n. 12, p. 1449-1461. 2008.

MIN, T.; YI, L.; CHAO, Z.; HAITAO, Z.; WEI, W.; LIANG, Y.; BO, W. Superiority of visipaque (iodixanol)-controlled density gradient over ficoll-400 in adult porcine islet purification. **Transplantation Proceedings**, v. 42, p. 1825-1829. 2010.

MITA, A.; RICORDI, C.; MIKI, A.; BARKER, S.; KHAN, A.; ALVAREZ, A.; HASHIKURA, Y.; MIYAGAWA, S.; ICHII, H. Purification method using iodixanol (Optiprep)-based density gradient significantly reduces cytokine chemokine production from human islet preparations, leading to prolonged cell survival during pretransplantation culture. **Transplantation Proceedings**, v. 41, p. 314-315. 2009.

MITA, A.; RICORDI, C.; MESSINGER, S.; MIKI, A.; MISAWA, R.; BARKER, S.; MOLANO, R. D.; HAERTTER, R.; KHAN, A.; MIYAGAWA, S.; PILEGGI, A.; INVERARDI, L.; ALEJANDRO, R.; HERING, B. J.; ICHII, H. Antiprolinflammatory effects of iodixanol (OptiPrep)-based density gradient purification on human islet preparations. **Cell Transplantation**, v. 19, n. 12, p. 1547-1546. 2010.

MOCHIZUKI, M.; SUGITA, S.; KAMOI, K. Immunological homeostasis of the eye. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 33, p. 10-27. 2013.

MOLNÁR, C.; ESSAND, M.; WENNERBERG, L.; BERNE, C.; LARSSON, E.; TUFVESON, G.; KORSGREN, O. Islet engraftment and revascularization in clinical and experimental transplantation. **Cell Transplantation**, v. 22, n. 2, p. 243-251. 2013.

MOORE, R.A.; ROSENBLUM, H.B.; TOLINS, S.H.; MELCHIONNA, R.H. Variation in the size of transplants of the prostate and seminal vesicle in the anterior chamber of the eye. **Journal of Experimental Medicine**, v. 66, n. 3, p. 273–280. 1937.

MORIYAMA, H.; ABIRU, N.; PARONEN, J.; SIKORA, K.; LIU, E.; MIAO, D.; DEVENDRA, D.; BEILKE, J.; GIANANI, R.; GILL, R.G.; EISENBARTH, G.S. Evidence for a primary islet autoantigen (preproinsulin 1) for insulinitis and diabetes in the nonobese diabetic mouse. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 100, n. 18, p. 10376–10381. 2003.

MOXEY, P.W.; GOGALNICEANU, P.; HINCHLIFFE, R.J.; LOFTUS, I.M.; JONES, K.J.; THOMPSON, M.M.; HOLT, P.J. Lower extremity amputations - a review of global variability in incidence. **Diabetic Medicine**, v. 28, n. 10, p. 1144-1153. 2011.

MULLER, Y.D.; GOLSHAYAN, D.; EHIRCHIOU, D.; WYSS, J.C.; GIOVANNONI, L.; MEIER, R.; SERRE-BEINIER, V.; PUGA YUNG, G.; MOREL, P.; BÜHLER, L.H.; SEEBACH, J.D. Immunosuppressive effects of streptozotocin-induced diabetes result in absolute lymphopenia and a relative increase of T regulatory cells. **Diabetes**, v. 60, n. 9, p. 2331-2340. 2011.

NICLAUSS, N.; WOJTUSCISZYN, A.; MOREL, P.; DEMUYLDER-MISCHLER, S.; BRAULT, C.; PARNAUD, G.; RIS, F.; BOSCO, D.; BADET, L.; BENHAMOU, P.Y.; BERNEY, T. Comparative impact on islet isolation and transplant outcome of the preservation solutions Institut Georges Lopez-1, University of Wisconsin, and Celsior. **Transplantation**, v. 93, n.7, p. 703-708. 2012.

NIEDERKORN, J.Y. See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. **Nature Immunology**, v. 7, n.4, p. 354-359. 2006.

NOBLE, J.A.; VALDES, A.M. Genetics of the HLA Region in the Prediction of Type 1 Diabetes. **Current Diabetes Report**, v. 11, n.6, p. 533–542. 2011.

NORDWALL, M.; ABRAHAMSSON, M.; DHIR, M.; FREDRIKSON, M.; LUDVIGSSON, J.; ARNQVIST, H.J. Impact of HbA1c, Followed From Onset of Type 1 Diabetes, on the Development of Severe Retinopathy and Nephropathy: The VISS Study (Vascular Diabetic Complications in Southeast Sweden). **Diabetes Care**. 2014.

NYQVIST, D.; SPEIER, S.; RODRIGUEZ-DIAZ, R.; MOLANO, R.D.; LIPOVSEK, S.; RUPNIK, M.; DICKER, A.; ILEGEMS, E.; ZAHR-AKRAWI, E.; MOLINA, J.; LOPEZ-CABEZA, M.; VILLATE, S.; ABDULREDA, M.H.; RICORDI, C.; CAICEDO, A.; PILEGGI, A.; BERGGREN, P.O. Donor islet endothelial cells in pancreatic islet revascularization. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2571-2577. 2011.

ONYIRIUKA, A.N.; IFEBI, E. Ketoacidosis at diagnosis of type 1 diabetes in children and adolescents: frequency and clinical characteristics. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders**, v. 12, n. 1, p. 47. 2013.

ORAM, R.A.; BROOKS, A.M.; FORBES, S.; ECKOLDT, S.; SMITH, R.M.; CHOUDHARY, P.; ROSENTHAL, M.J.; JOHNSON, P.; RUTTER, M.K.; BURLING, K.A.; MCDONALD, T.J.; SHAW, J.A.; HATTERSLEY, A.T. Home urine C-peptide creatinine ratio can be used to monitor islet transplant function. **Diabetes Care**, v. 37, n. 6, p. 1737-1740. 2014.

PENKO, D.; ROJAS CANALES, D.; MOHANASUNDARAM, D.; PEIRIS, H.S.; SUN, W.Y.; DROGEMULLER, C.J.; KEATING, D.J.; COATES, P.T.; BONDER, C.S.; JESSUP, C.F. Endothelial progenitor cells enhance islet engraftment, influence beta cell function and modulate islet connexin 36 expression. **Cell Transplantation**. 2013.

PEPPER, A.R.; GALA-LOPEZ, B.; ZIFF, O.; SHAPIRO, A.J. Current status of clinical islet transplantation. **World Journal of Transplantation**, v. 3, n. 4, p. 48-53. 2013.

PEREZ, V.L.; CAICEDO, A.; BERMAN, D.M.; ARRIETA, E.; ABDULREDA, M.H.; RODRIGUEZ-DIAZ, R.; PILEGGI, A.; HERNANDEZ, E.; DUBOVY, S.R.; PAREL, J.M.; RICORDI, C.; KENYON, N.M.; KENYON, N.S.; BERGGREN, P.O. The anterior chamber of the eye as a clinical transplantation site for the treatment of diabetes: a study in a baboon model of diabetes. **Diabetologia**, v. 54, n. 5, p. 1121-1126. 2011.

PISANIA, A.; WEIR, G.C.; O'NEIL, J.J.; OMER, A.; TCHIPASHVILI, V.; LEI, J.; COLTON, C.K.; BONNER-WEIR, S. Quantitative analysis of cell composition and purity of human pancreatic islet preparations. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 90, n. 11, p. 1661–1675. 2010.

POTTER, K.J.; WESTWELL-ROPER, C.Y.; KLIMEK-ABERCROMBIE, A.M.; WARNOCK, G.L.; VERCHERE, C.B. Death and dysfunction of transplanted β -cells: lessons learned from type 2 diabetes? **Diabetes**, v. 63, n 1, p. 12-19. 2014.

QUARANTA, P.; ANTONINI, S.; SPIGA, S.; MAZZANTI, B.; CURCIO, M.; MULAS, G.; DIANA, M.; MARZOLA, P.; MOSCA, F.; LONGONI, B. Co-transplantation of endothelial progenitor cells and pancreatic islets to induce long-lasting normoglycemia in streptozotocin-treated diabetic rats. **Public Library of Science One**, v. 9, n. 4, e94783. 2014.

RACKHAM, C.L.; JONES, P.M.; KING, A.J.F. Maintenance of islet morphology is beneficial for transplantation outcome in diabetic mice. **Public Library of Science One**, v. 8, n.2, e57844. 2013.

RAJAB, A. Islet transplantation: alternative sites. **Current Diabetes Reports**, v. 10, iss. 5, p. 332-337. 2010.

RERUP, C.C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. **Pharmacological Reviews**, v. 22, p. 485-518. 1970.

RICKELS, M.R.; KONG, S.M.; FULLER, C.; DALTON-BAKES, C.; FERGUSON, J.F.; REILLY, M.P.; TEFF, K.L.; NAJI, A. Improvement in insulin sensitivity after human islet transplantation for type 1 diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 11, p. E1780-1785. 2013.

RICORDI, C; LACY, P.E.; SCHARP, D.W. Automated islet isolation from human pancreas. **Diabetes**, v. 38, sup. 1, p. 140-142. 1989.

RODRIGUEZ-DIAZ, R.; SPEIER, S.; MOLANO, R.D.; FORMOSO, A.; GANS, I.; ABDULREDA, M.H.; CABRERA, O.; MOLINA, J.; FACHADO, A.; RICORDI, C.; LEIBIGER, I.; PILEGGI, A.; BERGGREN, P.O.; CAICEDO, A. Noninvasive in vivo model demonstrating the effects of autonomic innervation on pancreatic islet function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 52, p. 21456-21461. 2012.

RYAN, E.A.; PATY, B.W.; SENIOR, P.A.; BIGAM, D.; ALFADHLI, E.; KNETEMAN, N.M.; LAKEY, J.R.; SHAPIRO, A.M. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. **Diabetes**, v. 54, n. 7, p. 2060-2069. 2005.

SAITO, Y.; CHAN, N.K.; HATHOUT, E. Partial hepatectomy improves the outcome of intraportal islet transplantation by promoting revascularization. **Islets**, v. 4, n.2, p. 138–144. 2012.

SAKATA, N.; CHAN, N.K.; OSTROWSKI, R.P.; CHRISLER, J.; HAYES, P.; KIM, S.; OBENAUS, A.; ZHANG, J.H.; HATHOUT, E. Hyperbaric oxygen therapy improves early post-transplant islet function. **Pediatric Diabetes**, v. 11, n. 7, p. 471–478. 2010.

SAKOWICZ-BURKIEWICZ, M.; KOBCUCH, K.; GRDEN, M.; SZUTOWICZ, A.; PAWELCZYK, T. Diabetes-induced decrease of adenosine kinase expression impairs the proliferation potential of diabetic rat T lymphocytes. **Immunology**, v. 118, n. 3, p. 402-412. 2006.

SANSALONE, C.V.; MAIONE, G.; ASENI, P.; MANGONI, I.; DE ROBERTO, A.; SOLDANO, S.; MINETTI, E.; BROGGI, M.L.; CIVATI, G. Surgical complications are the main cause of pancreatic allograft loss in pancreas-kidney transplant recipients. **Transplantation Proceedings**, v. 37, n. 6, p. 2651-2653. 2005.

SCHADE, D.S.; BURGE, M.R. Brittle diabetes: etiology and treatment. **Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism**, v. 6, p. 289-319. 1995.

SEARCH FOR DIABETES IN YOUTH STUDY GROUP; LIESE, A.D.; D'AGOSTINO, R.B.; HAMMAN, R.F.; KILGO, P.D.; LAWRENCE, J.M.; LIU, L.L.; LOOTS, B.; LINDER, B.; MARCOVINA, S.; RODRIGUEZ, B.; STANDIFORD, D.; WILLIAMS, D.E. The burden of diabetes mellitus among US youth: prevalence estimates from the SEARCH for diabetes in youth study. **Pediatrics**, v. 118, n. 4, p. 1510-1518. 2006.

SHAPIRO, A.M.J.; 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. **New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 230–238. 2000.

SHAPIRO, A.M.J.; RICORDI, C.; HERING, B.J.; AUCHINCLOSS, H.; LINDBLAD, R.; ROBERTSON, R.P.; SECCHI, A.; BRENDEN, M.D.; BERNEY, T.; BRENNAN, D.C.; CAGLIERO, E.; ALEJANDRO, R.; RYAN, E.A.; DIMERCURIO, B.; MOREL, P.; POLONSKY, K.S.; REEMS, J.A.; BRETZEL, R.G.; BERTUZZI, F.; FROUD, T.; KANDASWAMY, R.; SUTHERLAND, D.E.; EISENBARTH, G.; SEGAL, M.; PREIKSAITIS, J.; KORBUTT, G.S.; BARTON, F.B.; VIVIANO, L.; SEYFERT-MARGOLIS, V.; BLUESTONE, J.; LAKEY, J.R.. International Trial of the Edmonton Protocol for Islet Transplantation. **New England Journal of Medicine**, n. 355, p. 1318-1330. 2006.

SHEWADE, Y.M.; UMRANI, R.; BHONDE, R.R. Large-scale isolation of islets by tissue culture of adult mouse pancreas. **Transplantation Proceedings**, v. 31, p. 1721-1723. 1999.

SILJANDER, H.; HÄRKÖNEN, T.; HERMANN, R.; SIMELL, S.; HEKKALA, A.; SALONSAARI, R.T.; SIMELL, T.; SIMELL, O.; ILONEN, J.; VEIJOLA, R.; KNIP, M. Predictive characteristics of diabetes-associated autoantibodies among children with HLA-conferred disease susceptibility in the general population. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 25, n. 7, p. 615-22. 2009.

SKELSEY, M.E.; MELLON, J.; NIEDERKORN, J.Y. $\gamma\delta$ T cells are needed for ocular immune privilege and corneal graft survival. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 4327-4333. 2001.

SKLAVOS, M.M.; BERTERA, S.; TSE, H.M.; BOTTINO, R.; HE, J.; BEILKE, J.N.; COULOMBE, M.G.; GILL, R.G.; CRAPO, J.D.; TRUCCO, M.; PIGANELLI, J.D. Redox Modulation Protects Islets From Transplant-Related Injury. **Diabetes**, v. 59, n.7, p. 1731–1738. 2010.

SKRIVARHAUG, T.; STENE, L.C.; DRIVVOLL, A.K.; STRØM, H.; JONER, G.; NORWEGIAN CHILDHOOD DIABETES STUDY GROUP. Incidence of type 1 diabetes in Norway among children aged 0-14 years between 1989 and 2012: has the incidence stopped rising? Results from the Norwegian Childhood Diabetes Registry. **Diabetologia**, v. 57, n. 1, p. 57-62. 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2013-2014**. São Paulo, SP, 2013-2014.

SPEIER, S.; NYQVIST, D.; CABRERA, O.; YU, J.; MOLANO, R.D.; PILEGGI, A.; MOEDE, T.; KÖHLER, M.; WILBERTZ, J.; LEIBIGER, B.; RICORDI, C.; LEIBIGER, I.B.; CAICEDO, A.; BERGGREN, P.O. Noninvasive *in vivo* imaging of pancreatic islet cell biology. **Nature Medicine**, v. 14, n. 5, p. 574-578. 2008.

SPEIER, S.; NYQVIST, D.; KÖHLER, M.; CAICEDO, A.; LEIBIGER, I. B.; BERGGREN, P.O. Noninvasive high-resolution *in vivo* imaging of cell biology in the anterior chamber of the mouse eye. **Nature Protocols**, v. 3, n. 8, p. 1278-1286. 2008.

SPILLER, F.; CARLOS, D.; SOUTO, F.O.; DE FREITAS, A.; SOARES, F.S.; VIEIRA, S.M.; PAULA, F.J.; ALVES-FILHO, J.C.; CUNHA, F.Q. α 1-Acid glycoprotein decreases neutrophil migration and increases susceptibility to sepsis in diabetic mice. **Diabetes**, v. 61, p. 1584-1591. 2012.

STREILEIN, J.W. Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 879-889. 2003.

STREILEIN, J.W.; MASLI, S.; TAKEUCHI, M.; KEZUKA T. The eye's view of antigen presentation. **Human Immunology**, v. 63, p. 435-443. 2002.

STULL, N.D.; BREITE, A.; MCCARTHY, R.; TERSEY, S.A.; MIRMIRA, R.G. Mouse islet of Langerhans isolation using a combination of purified collagenase and neutral protease. **Journal of Visualized Experiments**, v. 67, e4137, p. 1-5. 2012.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v. 50, n. 6, p. 537-546. 2001.

SZOT, G.L.; KOUDRIA, P.; BLUESTONE, J.A. Murine Pancreatic Islet Isolation. **Journal of Visualized Experiments**, iss. 7, art. e255. 2007.

SZOT, G.L., KOUDRIA, P., BLUESTONE, J.A. Transplantation of pancreatic islets into the kidney capsule of diabetic mice. **Journal of Visualized Experiments**, iss. 9, art. e404. 2007.

TAKITA, M.; ITOH, T.; SHIMODA, M.; KANAK, M.A.; SHAHBAZOV, R.; KUNNATHODI, F.; LAWRENCE, M.C.; NAZIRUDDIN, B.; LEVY, M.F. Pancreatic ductal perfusion at organ procurement enhances islet yield in human islet isolation. **Pancreas**, v. 43, n. 8, p. 1249-1255. 2014.

TANIGUCHI, H.; MAKINO, S.; IKEGAMI, H. The NOD mouse and its related strains. **Animal Models of Diabetes**, 2^a ed., cap. 2, p. 41-60. 2007.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL/EPIDEMIOLOGY OF DIABETES INTERVENTIONS AND COMPLICATIONS RESEARCH GROUP. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 6, p. 381-389. 2000.

TSAI, S.; SANTAMARIA, P. MHC class II polymorphisms, autoreactive T-cells, and autoimmunity. **Frontiers in Immunology**, v. 4, art 321, p. 1-7. 2013.

TSIROGIANNI, A.; PIPI, E.; SOUFLEROS, K. Specificity of islet cell autoantibodies and coexistence with other organ specific autoantibodies in type 1 diabetes mellitus. **Autoimmunity Reviews**, v.8, n. 8, p. 687–691, 2009.

USHER-SMITH, J.A.; THOMPSON, M.; ERCOLE, A.; WALTER, F.M. Variation between countries in the frequency of diabetic ketoacidosis at first presentation of type 1 diabetes in children: a systematic review. **Diabetologia**, v. 55, n. 11, p. 2878-94. 2012.

VALDES A.M. THOMSON, G.; GRAHAM, J.; ZARGHAMI, M.; MCNENEY, B.; KOCKUM, I.; SMITH, A.; LATHROP, M.; STEENKISTE, A.R.; DORMAN, J.S.; NOBLE, J.A.; HANSEN J.A.; PUGLIESE, A.; LERNMARK, A.; SWEDISH CHILDHOOD STUDY GROUP; DIABETES INCIDENCE IN SWEDEN STUDY GROUP; TYPE 1 DIABETES COMPONENT OF THE 13TH INTERNATIONAL HISTOCOMPATIBILITY WORKING GROUP. D6S265*15 marks a DRB1*15, DQB1*0602 haplotype associated with attenuated protection from type 1 diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 48, n. 12, p. 2540–2543. 2005.

VAN BELLE, T.L.; COPPIETERS, K.T.; VON HERRATH, M.G. Type 1 diabetes: etiology, immunology and therapeutic strategies. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 1, p. 79–118. 2011.

VAN HOUTUM, W.H.; RAUWERDA, J.A.; RUWAARD, D.; SCHAPER, N.C.; BAKKER, K. Reduction in diabetes-related lower-extremity amputations in The Netherlands: 1991-2000. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1042-1046. 2004.

VANTYGHM, M.C.; BALAVOINE, A.S.; KERR-CONTE, J.; PATTOU, F.; NOEL, C. Who should benefit from diabetes cell therapy? **Annals of Endocrinology (Paris)**, v. 70, n. 6, p. 443-448. 2009.

WAMOCK, G.L.; RAJOTTE, R.V. Human pancreatic islet transplantation. **Transplantation reviews**, v. 6, n. 4, p. 195-208. 1992.

WANG, X.; MELOCHE, M.; VERCHERE, C.B.; OU, D.; MUI, A.; WARNOCK, G.L. Improving islet engraftment by gene therapy. *Journal of Transplantation*, v. 2011, art. 594851, p. 1-7. 2011.

WENZLAU, J.W.; HUTTON, J.C. Novel diabetes autoantibodies and prediction of type 1 diabetes. **Current Diabetes Report**, v. 13, n. 5, p. 608-615. 2013.

WESTWELL-ROPER, C.; DAI, D.L.; SOUKHATCHEVA, G.; POTTER, K.J.; VAN ROOIJEN, N.; EHSES, J.A.; VERCHERE, C.B. IL-1 blockade attenuates islet amyloid polypeptide-induced proinflammatory cytokine release and pancreatic islet graft dysfunction. **Journal of Immunology**, v. 187, n. 5, p. 2755-2765. 2011.

WHITE, S.A.; SHAW, J.A.; SUTHERLAND, D.E. Pancreas transplantation. **The Lancet**, v. 373, n. 9677, p. 1808–1817. 2009.

WHITE, W.H. On the Treatment of Diabetes Mellitus by Feeding on Raw Pancreas and by the Subcutaneous Injection of Liquor Pancreaticus. **The British Medical Journal**, v. 1, p. 452-453. 1893.

WILLIAMS, P.W. Notes on diabetes treated with extract and by grafts of sheep's pancreas. **The British Medical Journal**, v. 2, p. 1303–1304. 1894.

WINTER, W.E.; SCHATZ, D.A. Autoimmune markers in diabetes. **Clinical Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 168-75. 2011.

WOLFSDORF, J.; GLASER, N.; SPERLING, M.A.; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diabetic ketoacidosis in infants, children, and adolescents: A consensus statement from the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 29, n. 5, p. 1150-1159. 2006.

YIMAM, M.; ZHAO, J.; CORNELIUSEN, B.; PANTIER, M.; BROWNELL, L.; JIA, Q. Blood glucose lowering activity of aloe based composition, UP780, in alloxan induced insulin dependent mouse diabetes model. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 6, art. 61, p. 1-8. 2014.

ZHANG, C.; TODOROV, I.; LIN, C.L.; ATKINSON, M.; KANDEEL, F.; FORMAN, S.; ZENG, D. Elimination of insulinitis and augmentation of islet beta cell regeneration via induction of chimerism in overtly diabetic NOD mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n.7, p. 2337-2342. 2007.

ZMUDA, E.J.; POWELL, C.A.; HAI, T. A method for murine islet isolation and subcapsular kidney transplantation. **Journal of Visualized Experiments**, iss. 50, art. 2096. 2011.

ANEXO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF:86/2012

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **“Busca de novos biomarcadores e alternativas ao tratamento do Diabetes Mellitus Tipo 1 utilizando transplante de ilhotas pancreáticas para a câmara anterior do olho.”** (Protocolo CEUA/FCF/376), do pesquisador **Leonardo dos Santos Castellar**, sob a orientação do Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi **APROVADO** em reunião de 03 de setembro de 2012.

São Paulo, 04 de setembro de 2012.

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

ANEXO II

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 125.2013-P441

C E R T I F I C A D O

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, CERTIFICA que o Projeto de Pesquisa **"Transplante de ilhotas pancreáticas para a câmara anterior do olho em modelo murino de diabetes mellitus induzido por aloxana"** (Protocolo CEUA/FCF/441), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Leonardo dos Santos Castellar**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 09 de dezembro de 2013.

São Paulo 11 de dezembro de 2013.

Prof. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Vice-Coordenadora da CEUA/FCF/USP