

ANTONIO SÉRGIO BRENNER

**INDUÇÃO DE DIABETE POR ESTREPTOZOTOCINA E
REVERSÃO DA HIPERGLICEMIA APÓS TRANSPLANTE
INTRAPORTAL DE ILHOTAS PANCREÁTICAS
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka.

CURITIBA - PARANÁ
1997

À memória de meu avô,

Dr. Agostinho Moritz Brenner

Médico nos Campos Gerais do Paraná de 1935 a 1946
para onde, apesar das dificuldades de comunicação e
locomoção, soube levar os progressos da cirurgia.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Brenner, pelo ensino da prática cirúrgica e orientações em nossos desafios diários. Pelo exemplo de dedicação à cirurgia, aos doentes e à nossa família.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Malafaia, que com seu dinamismo, visão de ciência e de administração, é responsável pelo desenvolvimento e elevado conceito do Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR, pela oportunidade da realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka, pela orientação, presença constante e apoio absoluto na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Júlio César Wiederkerh, pelo incentivo e idéia de desenvolver o transplante na linha de pesquisa do Mestrado em Cirurgia.

Ao Prof. Dr. Julio César Uili Coelho e Prof. Dr. Antonio Carlos Ligocki Campos com os quais tive o privilégio de ser orientado durante meu treinamento em cirurgia. Pela iniciação na vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino e Dr. Luiz Augusto Auersvald que em nossos contatos esclareceram os detalhes e as dificuldades no transplante de ilhotas pancreáticas.

Ao Prof. Dr. Adyr Soares Mulinari e Prof. Dr. Francisco Diniz Affonso da Costa, pelas sugestões e correções.

Ao Prof. Dr. Acir Mulinari e Dra. Cristine Zanelato pelas análises histopatológicas.

Ao Prof. Anselmo Chaves Neto, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Dr. Pablo Aviles Cabrera e Dr. Hêmerson Paul Vieira Marques, residentes em Cirurgia Geral do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, pela ajuda nos procedimentos cirúrgicos, seguimento e material fotográfico.

Aos Acadêmicos Monitores de Imunologia e Bioquímica da Faculdade Evangélica de Medicina Vinicius Ribas Carvalho Duarte Fonseca, Gustavo Adolfo Antonik e Alessandro Hartmann, pela ajuda nas etapas de isolamento e transplante de ilhotas pancreáticas.

Ao Técnico de Laboratório Mauricio Beker pela eficiência e prontidão na preparação do material necessário.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
RESUMO.....	XI
<i>ABSTRACT</i>.....	XII
1 INTRODUÇÃO.....	2
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 A HISTÓRIA DO DIABETE.....	5
2.2 A DESCOBERTA DA INSULINA.....	7
2.3 O DIABETE MELITO INSULINO DEPENDENTE.....	9
2.4 INCIDÊNCIA.....	9
2.5 RISCO E COMPLICAÇÕES.....	10
2.6 PREVENÇÃO E TRATAMENTO DAS COMPLICAÇÕES.....	11
2.7 MODELOS DE ANIMAIS DIABÉTICOS.....	12
2.8 TRANSPLANTE DO PÂNCREAS E DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	13

2.8.1 HISTÓRICO.....	13
2.8.2 RESULTADOS ATUAIS.....	15
3 MATERIAL E MÉTODO.....	19
3.1 O EXPERIMENTO.....	19
3.2 AVALIAÇÕES E PERÍODOS.....	20
3.3 INDUÇÃO DO DIABETE.....	20
3.4 DOSAGEM DA GLICEMIA.....	21
3.5 PESAGEM DOS ANIMAIS.....	21
3.6 IMUNODEPRESSÃO.....	21
3.7 PREPARO DA SUSPENÇÃO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	22
3.7.1 PANCREATECTOMIA.....	22
3.7.2 MÉTODO DE ISOLAMENTO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	24
3.7.3 MÉTODO DE CONTAGEM DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS.....	26

3.7.4 IMPLANTE INTRAPORTAL DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	27
3.8 HISTOPATOLOGIA.....	28
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
4 RESULTADOS.....	30
4.1 RESULTADO DAS DOSAGENS SÉRICAS DA GLICOSE.....	30
4.2 RESULTADO DAS MEDIÇÕES DO PESO.....	32
4.3 RESULTADO DO ESTUDO HISTOPATOLÓGICO.....	33
5 DISCUSSÃO.....	38
5.1 INDUÇÃO DO DIABETE EM MODELOS ANIMAIS.....	38
5.2 ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	40
5.3 TRANSPLANTE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	42
5.4 IMUNODEPRESSÃO EM TRANSPLANTE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	44
6 CONCLUSÕES.....	48

ANEXO 1: Dados referentes aos valores das medições de glicemia nos ratos dos grupos controle, diabete e transplante.....	50
ANEXO 2 Dados referentes aos valores das medições de peso nos ratos dos grupos controle, diabete e transplante.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Distensão pancreática por inoculação da solução de colagenase no ducto pancreático de um rato doador.....	22
FIGURA 2: Pancreatectomia de um rato doador.....	23
FIGURA 3: No sedimento, observa-se tecido pancreático digerido e lavado após centrifugação.....	25
FIGURA 4: Momento da inoculação intraportal das ilhotas pancreáticas.....	27
FIGURA 5: Tecido hepático de um rato do grupo controle com aspecto histológico normal.....	34
FIGURA 6: Tecido pancreático de um rato do grupo controle com ilhotas de Langerhans de aspecto histológico normal.....	34
FIGURA 7: Tecido hepático de um rato do grupo diabete onde observamos aspecto histológico habitual.....	35
FIGURA 8: Tecido pancreático de um rato do grupo diabete onde observamos uma ilhota de Langerhans. Não é possível avaliar alterações de células beta.....	35
FIGURA 9: Tecido hepático de um rato do grupo transplante onde observamos espaço porta com infiltrado linfocitário.....	36
FIGURA 10: Tecido pancreático de um rato do grupo transplante. Não é possível avaliar alterações de células beta.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C. - Antes de Cristo

BB - *Bio-Breeding Laboratory* (Canadá)

d.C. - Depois de Cristo

dl - Decilitro

DMID - Diabete melito insulino dependente

DMNID - Diabete melito não insulino dependente

G - *Gauge*

g - Grama

Hanks - Solução de Hanks

kg - Quilograma

mg - Miligrama

MHC - Complexo de histocompatibilidade maior

ml - Mililitro

NASA - *National Aeronautics and Space Administration*

NOD - *Non obese diabetic*

rpm - Rotações por minuto

RESUMO

O objetivo do presente estudo, foi estabelecer um modelo de indução de diabetes do tipo I em ratos e os efeitos do transplante intraportal de ilhotas pancreáticas nos níveis plasmáticos de glicose. Quinze ratos machos WISTAR foram divididos em 3 grupos com 5 animais cada. GRUPO CONTROLE: inoculação endovenosa de 1 ml de solução salina a 0,9% e posteriormente intraportal de 1 ml de solução de Hanks. GRUPO DIABETE: inoculação endovenosa de estreptozotocina (60 mg/kg) e posteriormente intraportal de 1 ml de solução de Hanks. GRUPO TRANSPLANTE: inoculação endovenosa de estreptozotocina (60 mg/kg) e posteriormente intraportal de 1200 ilhotas pancreáticas. Todos os ratos foram previamente imunodeprimidos com ciclofosfamida intraperitoneal na dose de 200 mg/kg e o tempo de seguimento foi de 14 dias. Para o isolamento das ilhotas pancreáticas nos ratos doadores normais, foi utilizada a digestão pancreática com colagenase tipo V, via intraductal, seguido de separação do tecido exócrino por gradiente de ficol. O grupo controle apresentou níveis glicêmicos normais durante o seguimento. No grupo diabetes, os níveis plasmáticos de glicose permaneceram significativamente elevados em relação ao grupo controle em todas as medições. No grupo transplante, após o implante intraportal de ilhotas pancreáticas, os elevados níveis de glicemia diminuíram significativamente em relação ao grupo diabetes, mantendo-se estatisticamente igual a do grupo controle. Nos grupos controle e transplante, não houve alteração no peso dos animais, entretanto, no grupo diabetes, observamos aumento significativo no peso durante o seguimento. Com esses resultados, concluímos que a estreptozotocina via endovenosa induz o diabetes do tipo I e o transplante de ilhotas pancreáticas reduz os níveis séricos de glicose.

ABSTRACT

The purpose of this study was to establish an experimental model for the induction of diabetes type I and to analyse the efficacy of intraportal islet cells transplant in the plasmatic levels of glucose. Fifteen male Wistar rats were divided into three groups of five animals each. CONTROL GROUP: intravenous administration of 1 ml of 0,9% saline solution and subsequently intraportal injection of 1 ml of Hanks solution. DIABETIC GROUP: intravenous administration of streptozotocin (60 mg/kg) and subsequently intraportal injection of 1 ml of Hanks solution. TRANSPLANT GROUP: intravenous administration of streptozotocin (60 mg/kg) followed by intraportal inoculation of 1200 islet cells. All animals had been previously immunodepressed by intraperitoneal administration of 200 mg/kg of cyclophosphamid. Follow-up period was 14 days for all animals. Islet cells were obtained from rat donors by pancreatic digestion with intraductal injection of collagenase type V, followed by exocrine tissue isolation by ficoll gradient. The control group exhibited normal plasmatic glucose values during the follow-up. The diabetic group exhibited a significant higher plasmatic glucose level in relation to the control animals. In the transplant group, islet cells transplant caused a significant decrease in the glucose levels when compared to the diabetic group, returning to levels similar to the control group. No weight changes were noted in the control and transplant groups, but a significant weight gain was observed in the diabetic group. We conclude that intravenous administration of streptozotocin was effective in inducing diabetes type I in rats and that islet cells transplant reduced plasmatic glucose levels.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O transplante de tecido pancreático para o tratamento do diabetes foi sugerido e realizado muito antes da insulina ser descoberta por Banting e Best, em 1922 (SCHARP, 1984; BLISS, 1991). Desde então, grandes progressos têm sido divulgados, principalmente após a evolução e consolidação dos métodos imunodepressivos. (DIBELIUS et al., 1986; SCHARP et al., 1991; RICORDI et al., 1992; GORES et al., 1993)

O objetivo do transplante é estabelecer um estado de insulino-independência e normoglicemia de forma a evitar as complicações do diabetes e do seu tratamento. O perfeito controle glicêmico não pode ser obtido com insulina exógena, mesmo que meticulosamente administrada. A grande meta é a melhora na qualidade de vida dos pacientes.

Roedores, principalmente ratos e camundongos, têm sido amplamente utilizados no estudo do transplante de ilhotas de Langerhans. Os ratos com diabetes simulam a doença dos humanos. (THOMAS et al., 1993; JARA-ALBARRÁN et al., 1995; HOUWING et al., 1995)

Clinicamente, o transplante de pâncreas tem alcançado melhores resultados que o de ilhotas (RICORDI et al., 1992; SUTHERLAND, 1996). Entretanto, a sua indicação limita-se a pacientes urêmicos que necessitam ou já foram submetidos ao transplante renal. Com as atuais drogas imunodepressoras, o transplante de pâncreas total limita-se aos casos em que as complicações do diabetes são mais graves do que os potenciais efeitos colaterais das drogas imunodepressoras.

O transplante de ilhotas pancreáticas, permanece dificultado pela imunogenicidade do tecido pancreático exócrino, favorecendo o processo de rejeição e pelo elevado número de células viáveis necessárias para obter a reversão do diabetes. Por outro lado, o transplante de ilhotas facilita a manipulação imunológica e genética do enxerto, evita grandes procedimentos

cirúrgicos e, comparativamente ao transplante de pâncreas total, não oferece o risco das complicações proporcionadas pelo tecido exócrino.

Utilizando-se modelos animais na pesquisa do diabetes, foram desenvolvidos métodos de isolamento de ilhotas mais eficientes, locais de implante privilegiados e progressos no controle da rejeição. Observa-se, atualmente, grande interesse nessa linha de pesquisa. Com modelos confiáveis, poderemos participar do desafio de minimizar complicações, aumentar a longevidade e garantir adequada qualidade de vida aos portadores de diabetes melito do tipo I.

O objetivo do presente estudo foi estabelecer modelo animal de indução de diabetes melito tipo I e de avaliar os efeitos do transplante intraportal de ilhotas pancreáticas nos níveis séricos de glicose em ratos Wistar, com diabetes induzido por estreptozotocina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Diabete melito é uma alteração do metabolismo dos hidratos de carbono, acompanhada de complicações a longo prazo tais como retinopatia, nefropatia, neuropatia e vasculopatia. (RODGER, 1991; NATHAN, 1993)

Baseada no conhecimento dessa doença, uma classificação do diabete e outras categorias de intolerância a glicose foi desenvolvida por um grupo norte americano de dados em diabete, que classificou o diabete em dois principais subtipos (NATIONAL DIABETES DATA GROUP, 1979):

1. Diabete Melito Insulino Dependente (DMID) ou tipo I, com propensão a cetose, que é associado ao aumento na frequência de certos antígenos de histocompatibilidade no cromossomo 6 e com anticorpos contra células da ilhota. O termo diabete juvenil foi inapropriadamente utilizado visto que pode ocorrer em qualquer faixa etária.

2. Diabete Melito Não Insulino Dependente (DMNID) ou tipo II, sem propensão à cetose, não secundário a outras doenças ou condições. O DMNID foi classificado como associado ou não à obesidade: DMNID obeso e DMNID não obeso. (FAJANS, 1995)

2.1 A HISTÓRIA DO DIABETE

O papiro de Ebers, escrito cerca de 1500 anos a.C., continha descrições de várias doenças incluindo um estado poliúrico semelhante ao diabete. O tratamento recomendado era ingerir, em 4 dias, uma mistura de ossos, trigo, cereais, areia, chumbo e terra.

O termo diabete, que em grego significa "passar através" ou "um sifão", foi usado pela primeira vez por Arataeus da Cappadocia no século II (81-138 d.C.). O termo se referia a semelhança da poliúria com a saída do vinho dos tonéis através dos sifões. Arataeus concluiu que a doença estaria associada à deficiência renal. (MACFARLANE, 1991)

Philippus Theophrastus Bombastus von Hohenheim (1493-1541), chamado de Paracelsus, reportou que a urina de diabéticos continha "uma substância anormal que através da evaporação tratava-se de sal". Concluiu que o diabete seria a deposição de sal nos rins, causando sede renal e poliúria.

Matthew Dobson (1735-1784), médico de Liverpool, em 1776, tratando de nove pacientes diabéticos, observou que com a evaporação da urina, obtinha-se resíduo cristalino com aparência e sabor de açúcar e que apareceria primeiro no sangue, antes de ser formado no rim. Esta foi a primeira evidência de que o diabete seria uma desordem sistêmica. A prevalência de opiniões na época era de que os rins seriam os órgãos afetados pela doença visto que os sintomas eram relacionados com a poliúria e glicosúria.

John Rollo (1809), na Inglaterra, foi o primeiro a utilizar o termo melito (a tradução de "mel" do latim e do grego) diferenciando de outros estados poliúricos. Relacionou o tipo de dieta ingerida com a quantidade de açúcar obtido pela evaporação da urina de seus pacientes. Identificou substâncias como carboidratos que aumentariam o açúcar na urina e considerou que o órgão mórbido no diabete não seria o rim e sim o estômago. (KRALL, et al., 1994)

Entre 1830 e 1880, na França, Inglaterra e Alemanha, descreveram-se casos de diabete com achados pós-mortem de atrofia ou calcificações pancreáticas. Houve especulações sobre a relação do pâncreas com a patogênese da doença.

Em 1869, Paul Langerhans noticiou pequenos grupos de células pancreáticas que poderiam ser separadas do tecido exócrino circunjacente e do tecido ductal. Descreveu essas estruturas sem especular sua função. Seu artigo passou pela literatura médica quase desapercibido até 1890.

Em Strasburgo, Oskar Minkowski e Freiherr von Mering em 1889 estudavam a importância do pâncreas como órgão vital. Minkowski realizou a

ressecção total do pâncreas. Após reclamações do bedel responsável pela limpeza do laboratório que os cães "urinavam muito e ainda atraíam moscas", Minkowski observou alta concentração de glicose na urina. Repetiu o experimento sempre observando o aparecimento de severo diabetes. A transfusão do sangue para cães sadios não reproduziu a doença, excluindo algum efeito tóxico. A origem pancreática do diabetes estava estabelecida. (LABHART, 1978)

Em 1893 Edouard Laguesse sugeriu que os agrupamentos de células descritas por Paul Langerhans em 1869, aos quais ele denominou ilhotas de Langerhans, poderiam constituir o tecido endócrino do pâncreas, responsável pelo controle da glicemia.

2.2 A DESCOBERTA DA INSULINA

Em 1892 Capparelli já havia realizado tentativas de extrair uma substância do pâncreas que pudesse reverter ou prevenir o diabetes. Em 1914, Zelzer inoculou extratos pancreáticos purificados em cães diabéticos que convulsionaram. Estas convulsões, prováveis sintomas de hipoglicemia, foram interpretadas como efeito tóxico da substância. Com o início da Primeira Guerra Mundial sua clínica foi convertida em Hospital Militar. Zulzer partiu para a frente de batalha nunca retornando ao laboratório.

Em 1921, Frederic Grant Banting, cirurgião ortopédico londrino, sem nenhuma experiência em diabetes ou em pesquisa experimental relevante e sem o conhecimento dos insucessos prévios de se extrair insulina do pâncreas, foi ao laboratório da Universidade de Toronto e solicitou a MacLeod (1876-1935), chefe do laboratório, espaço para pesquisa. Após ter lido um artigo sobre a relação entre cálculos e danos às estruturas pancreáticas, realizou ligadura de ductos pancreáticos na tentativa de proteger a secreção interna da destruição pelos sucos digestivos durante a extração. Designou um estudante de medicina,

Charles H. Best para ajudá-lo. Decidiram usar solução de extração gelada e ácida. Com essa manobra, evitaram a digestão da insulina pelas enzimas exócrinas e a desnaturação da mesma quando em solução alcalina, dois pontos cruciais que haviam impedido outros pesquisadores de isolá-la. James Collip (1882-1978), bioquímico experimentado, juntou-se ao grupo e foi capaz de estandardizar a dosagem de insulina, agora já obtida em pâncreas bovino para uso clínico. Em 23 de janeiro de 1922, o extrato pancreático produzido por Collip foi injetado em um paciente de 14 anos, Leonard Thompson, que estava morrendo de coma diabético no "Toronto General Hospital".

Em outubro de 1923 a insulina estava disponível nos Estados Unidos e Europa para uso clínico. Foi no tratamento da cetoacidose diabética que o médico deparou-se com uma das melhores oportunidades de realizar o "milagre" de recuperar, em questão de horas, o paciente gravemente enfermo e com risco iminente de vida. Leonard Tompson casou-se e viveu até 1935. Ted Ryder, uma das primeiras crianças a usar insulina no mundo, foi referida como estando em boas condições de saúde em 1990 (MACFARLANE, 1991). George Minot (1885-1950), paciente do Dr. Joslin, salvo do diabetes pela recém descoberta insulina em 1922 recebeu, em 1934, o prêmio Nobel de Medicina pela sua codescoberta no tratamento da anemia perniciosa.

Em um dos mais rápidos reconhecimentos da ciência, Banting e MaCleod foram agraciados com o prêmio Nobel de Medicina em 1923. Banting dividiu o prêmio com Best e MaCleod com Collip. Best e Collip nunca se conformaram com sua exclusão. Como um palestrante sentenciou durante o jantar de homenagem aos laureados do Nobel "na insulina há glória suficiente para todos". Com sua descoberta, Banting e Best abriram as portas da fortuna mas, em troca de 1 dólar simbólico, renunciaram a qualquer possibilidade de lucro com a insulina. Recusaram propostas das mais tentadoras e promissoras de diversas faculdades americanas, permanecendo nos laboratórios da Universidade de Toronto. (DELFINO, 1995)

2.3 O DIABETE MELITO INSULINO DEPENDENTE

Mesmo com os avanços em relação ao tratamento do diabetes melito insulino dependente, estes doentes ainda morrem mais cedo que a população geral. Entre 20 e 40 anos de idade, o risco de morte é dez vezes maior no diabético tipo I que nos não diabéticos. (CHAIB, 1996)

Hoje está bem definido que o diabetes melito insulino dependente (DMID) é doença geneticamente influenciada, imunologicamente mediada, com fase assintomática (pré-diabete), seguida de manifestações da insulinopenia. (MUIR, et al., 1992)

Sintetizando a evolução da doença EISENBARTH (1986), com muito fundamento, dividiu o desenvolvimento do diabetes melito insulino dependente em 6 fases distintas: I - Suscetibilidade genética; II - Evento desencadeante; III - Desenvolvimento da autoimunidade ativa; IV - Anormalidade imunológica e perda progressiva da secreção de insulina; V - Diagnóstico do diabetes e VI - Destruição completa das células beta.

2.4 INCIDÊNCIA

O diabetes tipo I é uma doença que se tornou proeminente somente nos últimos dois séculos. Tireotoxicose, anemia perniciosa e hipoadrenalismo idiopático assim como o diabetes tipo I, são doenças auto-imunes e todas descritas somente no século 19. Na tireotoxicose, a exoftalmia e o bócio óbvio não poderiam passar despercebidos durante séculos (BOTAZZO, 1993). Comenta-se que Galeno, mesmo com sua grande experiência clínica, atendeu somente dois casos de diabetes em sua vida médica. Mesmo durante a Renascença e nos séculos

seguintes com a explosão da ciência e da medicina, não há relatos de aumento no número de casos de um tipo mais agressivo de diabetes. (BOTAZZO, 1993)

A incidência varia de 1 a 2 casos/100.000 habitantes/ano no Japão até 43/100.000 habitantes/ano em regiões da Finlândia (ATKINSON e MACLAREN, 1994). No continente europeu, observamos maior incidência do DMID nos países nórdicos. A Finlândia lidera seguida pelo restante da Escandinávia. A proporção diminui dramaticamente em direção ao Mediterrâneo. Observa-se 8 casos/100.000 habitantes/ano na França e na Itália. A menor incidência está em Israel com 6/100.000 habitantes/ano (BOTAZZO, 1993). Nos Estados Unidos observa-se 5,5 casos/100.000 habitantes/ano (citado por CHAIB, 1996). No Brasil dados apontam para 3/100.000 habitantes/ano. (DIB et al., 1992)

As diferenças na incidência são explicadas pela susceptibilidade de genes para DMID em grupos populacionais distintos. A dieta e outros fatores ambientais também parecem influir. Como exemplo, observa-se incidência aumentada em crianças que não foram amamentadas e a doença somente acontece em 33% dos casos de gêmeos idênticos com irmãos afetados. (DIB et al., 1992; BOTAZZO, 1993)

2.5 RISCO E COMPLICAÇÕES

As complicações mais limitantes do diabetes são a retinopatia, a nefropatia, a neuropatia e a vasculopatia. De acordo com o *NATIONAL DIABETES DATA GROUP* (1979), o risco relativo de morbidade, considerando todos os tipos de diabetes é: 20% de cegueira; 25% de doença renal terminal; 40% de amputação de membro inferior e 2 a 5% de infarto do miocárdio. (NATHAN, 1993)

DECKERT et al. (1978), estudando 307 pacientes durante 40 anos observaram: comprometimento visual em 14%; cegueira em 16%; insuficiência renal em 22%; choque em 10%; amputação de membro inferior em 12% e infarto

do miocárdio em 21%. A sobrevida média após o diagnóstico é de 36 anos e a idade média do óbito é de 49 anos.

2.6 PREVENÇÃO E TRATAMENTO DAS COMPLICAÇÕES

A modalidade terapêutica de maior sucesso para prevenção de complicações do diabete é o tratamento intensivo da hiperglicemia (CLARK Jr e LEE, 1995). REICHARD et al. (1993) avaliaram 102 pacientes com DMID, retinopatia não proliferativa, creatinina sérica normal, porém com controle glicêmico insatisfatório. Estudaram 2 grupos ao acaso (tratamento intensivo e convencional) e observaram que o tratamento intensivo com insulina, quando comparado com o convencional, retardou o desenvolvimento de complicações microvasculares. O grupo THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP (1993), avaliou 1441 pacientes com DMID e concluiu que a terapia intensiva prorroga o início e retarda a progressão de retinopatia, de neuropatia e de nefropatia diabética quando comparado ao tratamento convencional.

A bomba de insulina é uma opção terapêutica ainda em fase de experimentação. BROUSSOLLE et al. (1994) com 224 bombas utilizadas em adultos diabéticos tipo I obtiveram um significativo melhor controle glicêmico quando comparado com os valores pré-implantação e com o grupo que utilizava injeção subcutânea. Nos pacientes onde foi implantada a bomba, a hemoglobina glicosada caiu de 7,4 para 6,8 em 6 meses e os episódios de hipoglicemia de 15,2 para 2,5/100 pacientes/ano. WAXMAN et al. (1992) avaliaram a implantação da bomba de insulina em 25 pacientes. Em 50% destes, as bombas funcionaram durante 3 anos e em 18 houve necessidade de pelo menos um procedimento cirúrgico para manter a bomba funcionando ou para sua remoção. Considerações

ainda devem ser tomadas em relação ao custo, risco cirúrgico e eficácia do equipamento a longo prazo.

Outras formas de tratamento, como a imunoterapia, mostram-se eficazes somente quando diagnosticadas em fase precoce da doença. (BACH, 1994)

CLARK Jr e LEE (1995) sugerem que na retinopatia e na neuropatia, o controle glicêmico proporcionado pelo transplante de pâncreas não melhora a lesão, mas retarda seu progresso. Nesse aspecto, o transplante de tecido pancreático seria a forma mais eficaz de prevenção de complicações.

2.7 MODELOS DE ANIMAIS DIABÉTICOS

O diabetes em animais pode ser produzido por cirurgia, infecção viral, administração de dietas e agentes químicos (Ratos Sand, Mongolian Gerbil e Tuco-Tuco) ou desenvolver a doença de forma espontânea (como ratos BB, NOD e Nude atímicos). (MENDEZ e RAMOS, 1994)

O desenvolvimento dos modelos de ratos diabéticos, principalmente os ratos NOD e BB, foram um marco crucial para o entendimento da fisiopatologia e novas descobertas em relação a doença. (ROSSINI et al., 1995) Animais diabéticos podem ser encarados como modelos do diabetes humano. Ratos NOD e BB chegam a tal ponto de evolução na simulação experimental do diabetes clínico que os modelos apresentam diabetes melito insulino dependente acompanhado de estigmas imunológicos incluindo anticorpos e insulite, atenuação do quadro clínico com imunodepressores e transferência da doença para ratos não diabéticos via linfócitos T. (CARNAUD, 1995)

O primeiro relato de injeção da estreptozotocina foi acidental na produção do diabetes. A ação diabetogênica da estreptozotocina, foi descrita por RAIKIETEN et al. (1963) que descreveram também uma avaliação morfológica da alteração ultraestrutural da célula beta. Hoje, a estreptozotocina tem sido

amplamente utilizada para indução de diabetes experimental e para o estudo de transplante de ilhotas pancreáticas. (ROSSINI et al., 1977; PERLOFF et al., 1995; WEST et al., 1996)

A pancreatectomia é um modelo de indução de diabetes pouco reprodutível. Há complicações e influências proporcionadas pela retirada da porção exócrina do pâncreas. LEAHY et al. (1984), em estudo experimental utilizando ratos, comparou dois modelos de redução de células beta. Um utilizando a estreptozotocina na dose de 90 mg/Kg via intraperitonal e outro através da pancreatectomia a 95%. No grupo de ratos submetidos a pancreatectomia, observaram preservação parcial da resposta da célula beta ao estímulo com arginina e resposta também parcial na secreção de insulina estimulada por glicose. No grupo estreptozotocina, houve secreção mínima de insulina estimulada por glicose, confirmando um diabetes mais intenso.

Em abril de 1943 DUNN e McLETCHIE (1943), demonstraram que a aloxana (ácido mesoxálico ureico), causava necrose de células beta do pâncreas. No mesmo ano, quase simultaneamente, a descoberta foi confirmada por Glasgow, por Bailey e Bailey e por Goldner e Gomori. Foi o início do diabetes experimental induzido quimicamente. Entretanto, a aloxana é menos específica contra célula beta, a dose diabetogênica é muito próxima da letal e há grande variabilidade entre a dose inoculada e o efeito provocado. (GOLDNER e GOMORI, 1944; JUNOD et al., 1969; MARTÍN et al., 1986)

2.8 TRANSPLANTE DO PÂNCREAS E DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

2.8.1 HISTÓRICO

Minkowski em 1892, utilizou um enxerto vascularizado do processo uncinado no subcutâneo, prevenindo o diabetes fatal após remoção do pâncreas

remanescente (DOWNING, 1984). Foi o primeiro relato de transplante de tecido pancreático para o tratamento do diabetes.

No dia 20 de dezembro de 1893, vinte e nove anos antes do isolamento da insulina, Watson Williams e Hartsant, trataram um garoto de 15 anos no *Bristol Royal Infirmary* pela implantação subcutânea de 3 pedaços de pâncreas de carneiro. O garoto morreu em coma 3 dias após o implante e a histopatologia somente revelou fibrose de estroma. (SCHARP, 1984)

Alessandri em 1896, foi o primeiro a realizar implantação intrahepática de pâncreas total mas os enxertos necrosaram. Outras localizações para implantação de tecido pancreático também foram adotadas como baço, cavidade peritoneal e subcutâneo. (DOWNING, 1984)

Em 1902, Ssobolew recomendou o transplante de tecido pancreático como forma de tratamento do diabetes. Na época foi sugerido que "implantando pâncreas nós poderíamos conseguir uma quantidade maior dessa substância destruidora de açúcar". (DOWNING, 1984)

O isolamento e o transplante de ilhotas pancreáticas teve início muitos anos depois. MOSKALEWSKI (1965) foi o primeiro a utilizar colagenase para a digestão pancreática. LACY E KOSTIANOVSKY (1967) descreveram a técnica de digestão enzimática do tecido pancreático que ainda hoje é base dos métodos de isolamento de ilhotas. BALLINGER e LACY (1972) publicaram em 1972, o primeiro estudo onde o transplante de ilhotas pancreáticas reverteu a hiperglicemia. A inoculação intramuscular de 400 a 600 ilhotas produziu normoglicemia por longo tempo em ratos.

KEMP et al. (1973), descreveram o método intraportal de implante que melhorou a eficácia do transplante de ilhotas pancreáticas. Realizaram transplante intraportal de 400 a 600 ilhotas em ratos que normalizou os níveis de glicose no sangue e na urina por 2 a 3 dias. Hoje estabelecido como sítio privilegiado, o transplante intraportal é de grande sucesso por oferecer disponibilidade imediata de sangue às células e por ser via fisiológica para secreção insulínica. (REICKARD et al., 1974; SUTHERLAND et al., 1978)

SCHARP (1984) desenvolveu equipamento para isolar ilhotas pancreáticas denominado de auto-isolador. Consistia em reservatórios de enzimas e soluções automaticamente misturadas, até se obter um concentrado de células que fosse capaz de reverter a glicemia em autotransplantes de cães.

Numa tentativa de melhorar o processo de purificação, SCHARP (1984) ainda realizou estudos com um protótipo de eletroforese desenvolvido pela *McDonnell Douglas Corporation*. A eletroforese pode ser um novo e potente processo pois é capaz de isolar mais de um bilhão de células em uma hora e meia. Em associação com a NASA, o equipamento foi testado no espaço, com gravidade zero. Ilhotas pancreáticas caninas foram isoladas a bordo da nave espacial *Challenger* de agosto a setembro de 1983. Células viáveis e secretoras de insulina retornaram a terra após eletroforese no espaço.

2.8.2 RESULTADOS ATUAIS

As complicações do diabetes, quando estabelecidas, não são mais reversíveis após a normalização glicêmica, mesmo quando por transplante de tecido secretor de insulina - pâncreas total ou ilhotas pancreática (CLARK Jr e LEE, 1995). Lesões renais iniciais poderiam ser revertidas com o transplante de ilhotas quando realizado numa fase precoce da doença (FEDERLIN e BRETZEL, 1984). SUTHERLAND et al. (1978) acreditam ser promissor que a correção metabólica previna o desenvolvimento e progressão das lesões microangiopáticas que afetam o olho, o coração, os rins e outros órgãos.

Clinicamente, o transplante de pâncreas tem apresentado resultados satisfatórios nos primeiros meses após o implante. Entretanto são pouco animadores a longo prazo. Grande parte das complicações são proporcionadas pela porção exócrina da glândula. O número de transplantes realizados em humanos vem crescendo progressivamente. De acordo com o Registro

Internacional de Transplante de Pâncreas perto de 7000 transplantes foram realizados no período de 1966 até 1995 sendo 4000 nos últimos 5 anos. Somente no ano de 1994 nos Estados Unidos da América, foram realizados 846 transplantes. A partir de 1986 a taxa de sucesso (independência à insulina maior do que 1 ano) foi calculada em acima de 75% para transplantes simultâneos de pâncreas e rim e acima de 50% quando realizado como procedimento solitário (SUTHERLAND, 1991; SUTHERLAND, 1996). Com novas drogas imunodepressoras como o FK506 a taxa de sucesso parece aumentar até 80%. (TZE et al., 1994)

Desempenho mais modesto tem sido referido no transplante de ilhotas pancreáticas em humanos. A sobrevida das ilhotas sob regime imunodepressor é menor que a do transplante do fígado, rim ou coração, provavelmente pela grande imunogenicidade, pois se mostram muito sensíveis a rejeição. Não há referências à sobrevida do enxerto a longo prazo. No final de 1994, transplantes de ilhotas pancreáticas em 240 casos humanos, foram reportadas ao Registro Internacional de Transplante de Ilhotas Pancreáticas. Desses, somente 20 permaneceram independentes de insulina após uma semana. Deve ser observado entretanto, que as taxas de sucesso são maiores em pacientes pancreatectomizados sem diabetes melito do tipo I. A Universidade de Minnessota tem a maior experiência em autotransplante intraportal de ilhotas, em pacientes pancreatectomizados por doença benigna, com perto de 50 casos entre 1977 e 1995. Um terço dos pacientes obtiveram independência à insulina, sendo que 10 dos 14 pacientes que receberam mais de 300000 ilhotas mantiveram independência à insulina por 2 a 10 anos. (SUTHERLAND, 1996)

O grande número de células beta necessárias a reversão do diabetes é fator limitante. Pelas técnicas de isolamento atuais, necessita-se mais de um órgão para reversão do diabetes. Calcula-se em torno de 500000 o número necessário para obtenção de controle glicêmico comparável ao do tratamento com insulina exógena ou 5000 ilhotas para cada kg de peso corpóreo (SUTHERLAND, 1996). O xenotransplante ou o transplante de tecido neonatal (onde observamos, proporcionalmente, maior concentração de ilhotas pancreáticas em relação ao

tecido exócrino), podem ser áreas promissoras. (SUTHERLAND et al., 1978; SMITH et al., 1991; FERNANDEZ-CRUZ et al., 1992.)

Baseado nas dificuldades, muito se tem pesquisado no transplante de células beta. A identificação de sítios de implantação privilegiados como timo, cérebro, testículo, rim, entre outros, confere relativa proteção imunológica (BARKER et al., 1991). O encapsulamento de ilhotas e a utilização de drogas ou mecanismos indutores de tolerância também são processos em desenvolvimento. (TZE e TAI, 1983; WEBER et al., 1995; YDERSTRAEDE et al., 1995)

Uma vez obtida a normoglicemia e eliminado o problema da rejeição, o transplante de ilhotas pancreáticas seria o tratamento ideal do diabetes tipo I. Em animais, o transplante de ilhotas cura o defeito metabólico e estabiliza as lesões secundárias do diabetes experimental. Clinicamente, é o único transplante de tecido endócrino que tem mostrado progresso nos últimos tempos (NAJARIAN et al., 1977). Caso os resultados sejam transportáveis ao homem, o transplante de ilhotas pode ser um marco no tratamento do paciente diabético.

3 MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 O EXPERIMENTO

Foram utilizados 15 ratos machos albinos WISTAR TECPAR, pesando entre 150 e 374 g, obtidos no laboratório de linhagem do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) e mantidos no laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná conforme as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA - 1991). Estes animais foram divididos em 3 grupos com 5 ratos cada, conforme tabela 1:

TABELA 1
Delineamento do Experimento

Grupo	Número de Animais	Procedimentos
Controle	5	<ul style="list-style-type: none"> • T-7 = Imunodepressão pela ciclofosfamida via intraperitoneal na dose de 250 mg/Kg de peso. • T-3 = Inoculação de 1 ml de solução salina isotônica via endovenosa. • T0 = Inoculação de 1 ml de Hanks via intraportal
Diabete	5	<ul style="list-style-type: none"> • T-7 = Imunodepressão pela ciclofosfamida via intraperitoneal na dose de 250 mg/Kg de peso. • T-3 = Indução de diabete pela estreptozotocina via endovenosa na dose de 60 mg/Kg de peso. • T0 = Inoculação de 1 ml de Hanks via intraportal.
Transplante	5	<ul style="list-style-type: none"> • T-7 = Imunodepressão pela ciclofosfamida via intraperitoneal na dose de 250 mg/Kg de peso. • T-3 = Indução de diabete pela estreptozotocina via endovenosa na dose de 60 mg/Kg de peso. • T0 = Inoculação de suspensão de ilhotas pancreáticas via intraportal

T-7 = 7 dias antes da inoculação intraportal; T-3 = 3 dias antes da inoculação intraportal; T0 = na oportunidade da inoculação intraportal

3.2 AVALIAÇÕES E PERÍODOS

Em todos os animais foram realizadas dosagens plasmáticas da glicose nos seguintes momentos:

T0 = na oportunidade da inoculação intraportal
T1 = 24 horas após inoculação intraportal
T3 = 3º dia após inoculação intraportal
T5 = 5º dia após inoculação intraportal
T7 = 7º dia após inoculação intraportal
T10 = 10º dia após inoculação intraportal
T14 = 14º dia após inoculação intraportal

Todos os animais foram pesados nos momentos T0, T7 e T14.

No 14º dia (T14), todos os animais foram sacrificados por inalação letal de éter sulfúrico, com ressecção total do fígado e pâncreas para histopatologia.

3.3 INDUÇÃO DO DIABETE

O diabetes foi induzido por inoculação endovenosa, na veia peniana, de solução de estreptozotocina (Zanozar® - UPJON) na concentração de 60 mg por quilograma de peso. A estreptozotocina foi inicialmente diluída em solução fisiológica e posteriormente em tampão citrato de pH 4,0 até a concentração desejada.

3.4 DOSAGEM DA GLICEMIA

A dosagem da glicose sérica foi realizada em sangue total obtido por secção da porção final da cauda. Utilizou-se o glicosímetro automatizado e calibrado (Advantage® - BOEHRINGER MANNHEIN). O aparelho foi aferido com soluções padronizadas de glicose a cada série de exames. Após leve anestesia inalatória por éter sulfúrico, a ponta da cauda era seccionada e obtida a gota de sangue necessária à leitura do aparelho. As novas coletas de sangue, também realizadas sob leve anestesia inalatória, necessitavam apenas da retirada do coágulo aderido ao ferimento anterior.

3.5 PESAGEM DOS ANIMAIS

A pesagem foi realizada sob leve anestesia inalatória por éter sulfúrico em balança HELMAC.

3.6 IMUNODEPRESSÃO

A imunodepressão foi conferida por única inoculação intraperitoneal de ciclofosfamida (Genuxal® - ASTA), diluída em solução fisiológica, na dosagem de 200 mg/kg de peso.

3.7 PREPARO DA SUSPENÇÃO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

3.7.1 PANCREATECTOMIA

Todos os procedimentos operatórios foram realizados em condições limpas. Para cada rato transplantado, foram utilizados 5 doadores.

Os ratos doadores foram submetidos à pré-anestesia com éter sulfúrico, de forma superficial, seguido de injeção intraperitoneal de 3,2 ml por quilograma de peso de hidrato de cloral a 10 %. Após tricotomia abdominal e degermação com polivinil pirrolidona, realizou-se incisão abdominal transversal ampla. O ducto bileo-pancreático foi clampeado, com pinça hemostática de Halsted, junto a confluência com o duodeno. Com o clampeamento, evitou-se que a solução a ser inoculada drenasse para o intestino. O ducto bileo-pancreático foi então canulado, no seu segmento distal, com cateter de polietileno 27G e injetado 15 ml da solução de colagenase tipo V (SIGMA) a 2%, diluída em solução de Hanks, para distensão pancreática e separação mecânica entre o tecido exócrino e endócrino. FIGURA 1

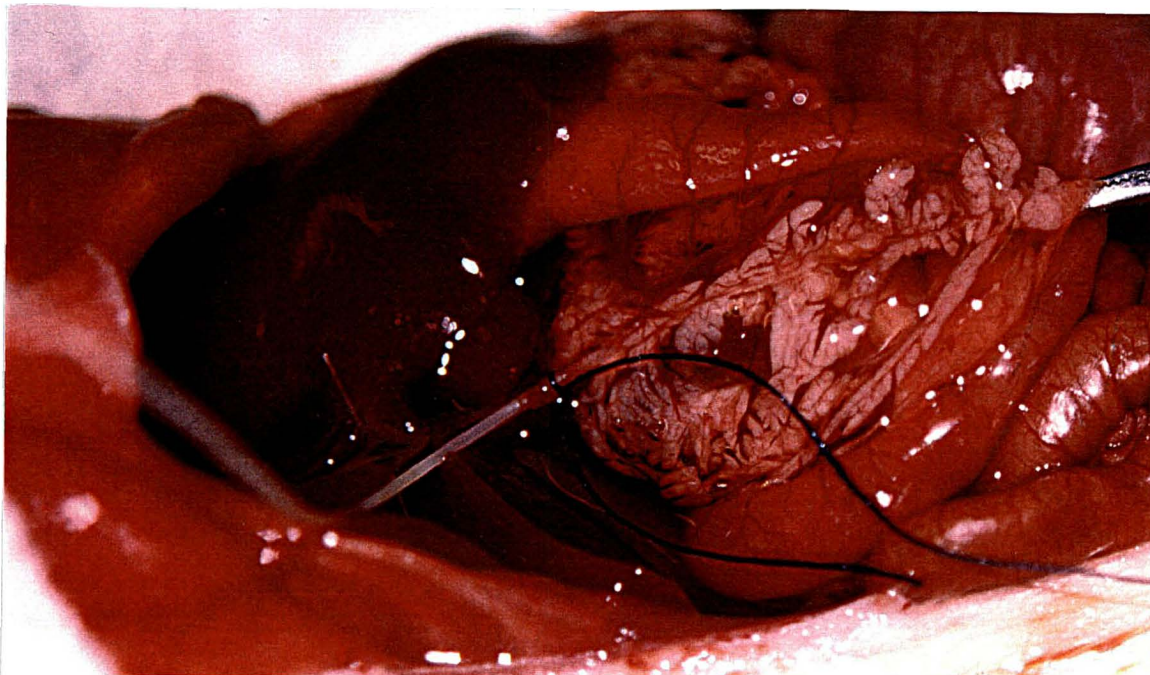


FIGURA 1: Distensão pancreática por inoculação da solução de colagenase no ducto pancreático de um rato doador.

Os ratos foram então sacrificados por perfuração cardíaca, após abertura do diafragma junto ao esterno. O pâncreas distendido foi ressecado, iniciando-se pela cauda (FIGURA 2). O órgão foi mantido em placa de Petri sobre gelo onde foram retirados grosseiramente vasos sanguíneos, linfáticos e tecido gorduroso. Procedeu-se da mesma forma em outros 4 ratos a fim de se obter o volume de ilhotas necessárias à reversão do diabete. Todas as cirurgias foram completadas no máximo em 1 hora.

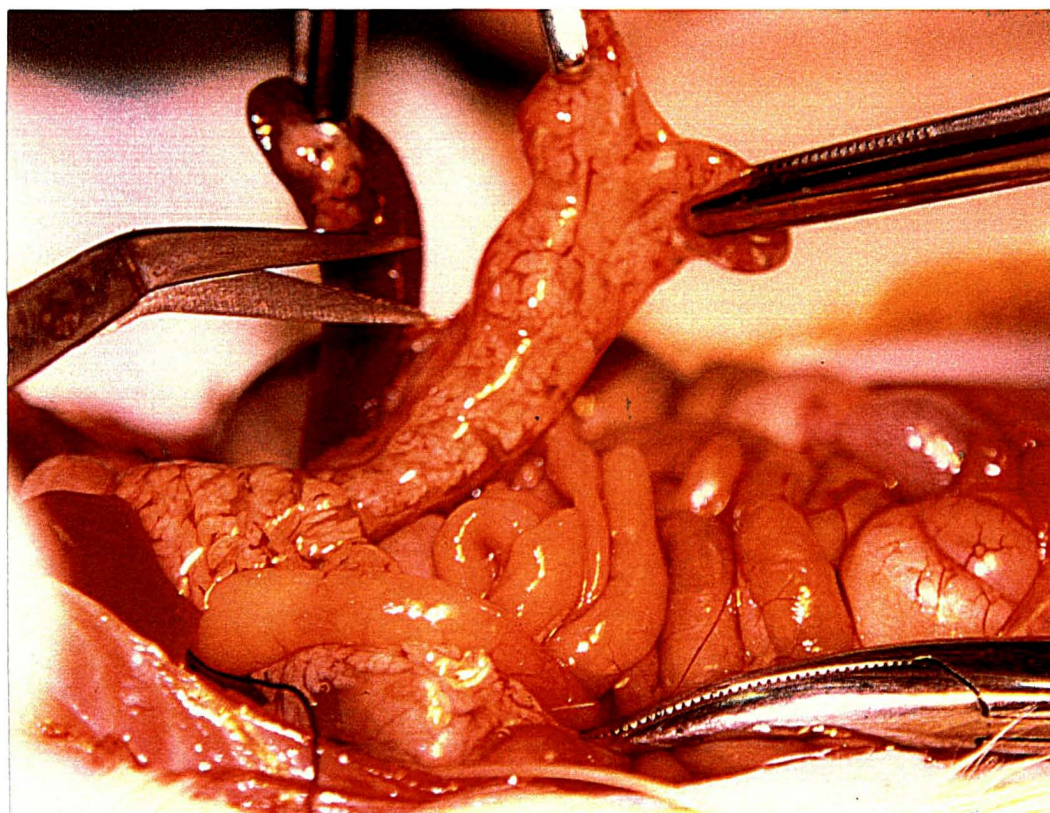


FIGURA 2: Pancreatectomia de um rato doador

3.7.2 MÉTODO DE ISOLAMENTO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

O tecido pancreático obtido foi imerso em banho-maria a 37 °C por 20 minutos para digestão estacionária. A seguir, 10 ml de solução de Hanks (TABELA 2) com soro fetal bovino 0,5% (CUTILAB) foram adicionados para lavagem, com agitação vigorosa por 10 segundos, em agitador automático (FANEN). Esta manobra provoca a rotura do tecido e liberação das ilhotas pancreáticas do tecido exócrino. A partir desse momento, todas as etapas foram realizadas em baixa temperatura e em materiais esterilizados. O volume foi centrifugado (BIO-RESEARCH) a 1200 rpm por 90 segundos. O sobrenadante foi desprezado, adicionou-se mais 10 ml de Hanks com soro fetal bovino e foram realizadas novas centrifugações até completar 3 lavagens. FIGURA 3

TABELA 2

Composição da solução de Hanks

SAIS	CONCENTRAÇÃO (g)
CaCl ₂ (Merck®)	185,5
KCl (Merck®)	400,0
MgSO ₄ (Merck®)	60,0
NaH ₂ PO ₄ (Merck®)	47,5
NaCl (Merck®)	8.000
D-glicose (Merck®)	1.000
Água bidestilada (pH:7,0-7,2)	1000 ml

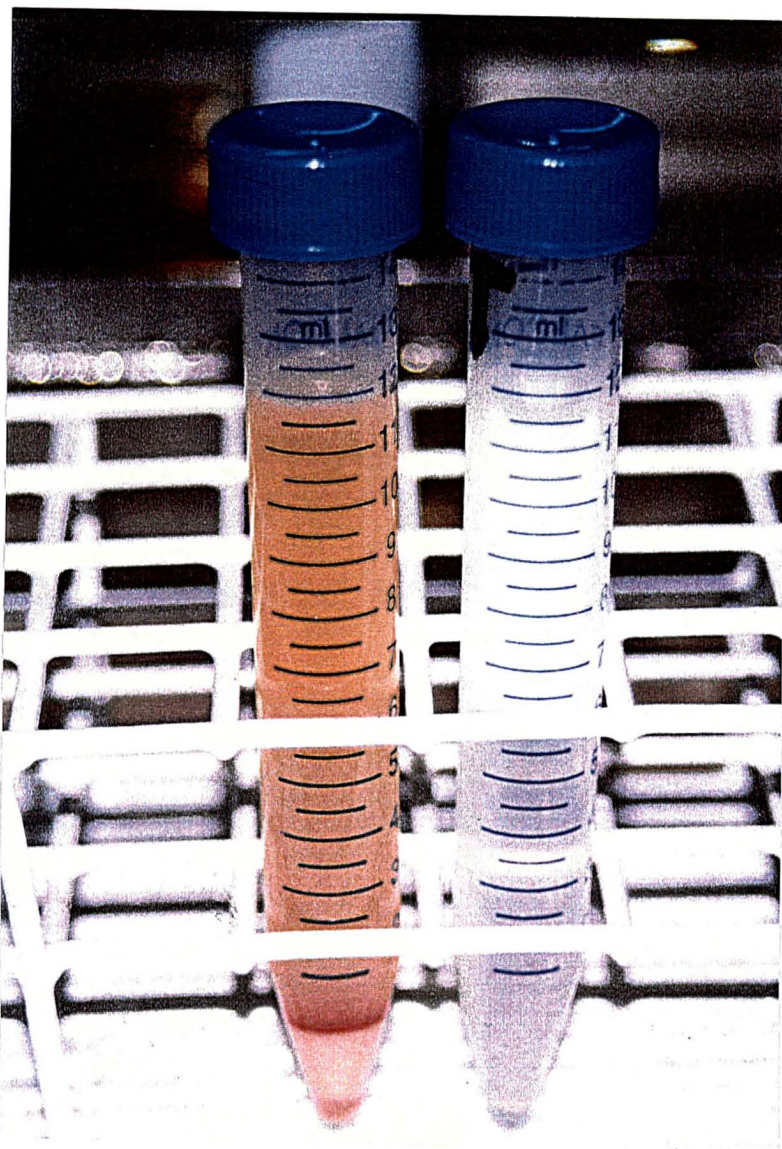


FIGURA 3: No sedimento (frasco da esquerda), observa-se tecido pancreático digerido e lavado após centrifugação.

O sedimento foi ressuspenso em 20 ml de Hanks e filtrado em tela de náilon esterilizada de 800 micra. Adicionou-se mais 20 ml de Hanks para lavagem da tela.

As células foram novamente submetidas à centrifugação a 1200 rpm por 90 segundos. O sobrenadante foi removido, deixando-se o mínimo de líquido possível no frasco.

O sedimento foi ressuspendido em 5 ml de ficol na densidade 1077 (Histopaque® - SIGMA) e homogeneizado agitando-se o frasco. A esse volume, foi adicionado 5 ml de Hanks sem soro fetal bovino de forma lenta, escorrendo pela parede do tubo, formando gradiente entre as duas soluções (FIGURA 4). O gradiente foi centrifugado por 20 minutos a 2400 rpm, sem freio e com aceleração lenta, na temperatura de 10 °C.

As ilhotas pancreáticas aparecem e são coletadas na interface das soluções. As ilhotas obtidas foram lavadas por 3 vezes adicionando-se 10 ml da solução de Hanks com soro fetal bovino e centrifugando-se inicialmente a 1200 rpm por 2 minutos e a seguir na mesma rotação por 90 segundos completando-se os 3 ciclos. O sedimento foi suspenso em 1 ml de Hanks para injeção intraportal.

3.7.3 - MÉTODO DE CONTAGEM DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS

Ao final do processo de isolamento, 0,1 ml do concentrado de ilhotas pancreáticas foi colocado em placa de Petri e corado com 10 mg de difenilcarbazona (Ditizona® - SIGMA). As ilhotas coram-se em vermelho tornando-se facilmente identificáveis através de uma lupa com magnificação de 10 vezes. O número de ilhotas da amostra foi contado e projetado uma estimativa para o volume total do inóculo.

3.7.4 - IMPLANTE INTRAPORTAL DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

O rato receptor, diabético e imunodeprimido, era submetido a anestesia inalatória superficial com éter sulfúrico e inoculação intraperitoneal de 3,2 ml/kg de hidrato de cloral a 10%. Neste momento, foi colhida uma gota de sangue para dosagem da glicemia, pouco antes do transplante. Após tricotomia abdominal e degermação com polivinil pirrolidona era realizada incisão mediana de 3 cm no abdômen superior. A veia porta foi identificada e se inoculou 1 ml da solução com ilhotas pancreáticas, através de agulha 23G. Foi aspirado e injetado 0,5 ml de sangue para lavagem da seringa. FIGURA 4

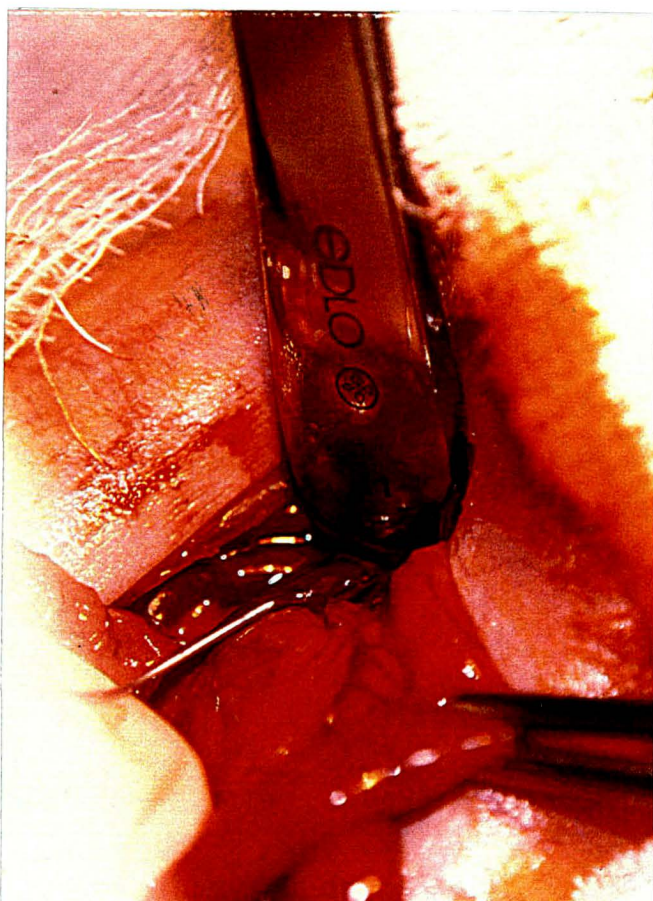


FIGURA 4: Momento da inoculação intraportal das ilhotas pancreáticas.

3.8 - HISTOPATOLOGIA

As peças foram fixadas em formol a 10% e cortadas em bloco de parafina. A coloração utilizada foi a hematoxilina e eosina. A observação foi realizada em microscópio ótico.

3.9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados constou de testes de comparação dos valores observados nos três grupos nos momentos T0, T1, T3, T5, T7, T10 e T14. A princípio aplicou-se a Análise da Variância Clássica (COCHRAN e SNEDECOR, 1967). Este é um procedimento estatístico paramétrico que necessita de algumas premissas para as variáveis aleatórias. A suposição de Gaussianidade foi verificada pelo teste de Filliben (FILLIBEN, 1975), a homogeniedade das variâncias foi testada pelo procedimento de Bartlett (COCHRAN e SNEDECOR, 1967) e a independência por meio de gráficos dos resíduos do modelo contra a ordem em que foram obtidos. Quando uma dessas premissas não se verificou aplicou-se o procedimento não paramétrico de Kruskal-Wallis (LEHMANN, 1975). De qualquer maneira os dois procedimentos foram sempre usados e um confirmou a decisão indicada pelo outro. Os valores -p que constam nos resultados, referem-se sempre ao teste teoricamente garantido.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADO DAS DOSAGENS SÉRICAS DA GLICOSE

No dia da inoculação intraportal (T0), as dosagens plasmáticas da glicose do grupo diabete foram, estatisticamente, iguais ao grupo transplante sendo ambos, diferentes do grupo controle.

Em todas as medições da glicemia nos tempos subseqüentes (T1, T3, T5, T7 e T14) os grupos controle e transplante foram, estatisticamente, iguais entre si e diferentes do grupo diabete.

Pelo método de contagem realizado, aproximadamente 1200 ilhotas pancreáticas foram inoculadas em cada rato receptor.

O GRÁFICO 1 demonstra as variações das médias das glicemias durante o seguimento, nos grupos controle, diabete e transplante.

Na TABELA 3, observamos a média e o desvio padrão das glicemias e o valor -p da análise estatística, durante o seguimento, nos grupos controle, diabete e transplante.

Os valores das dosagens plasmáticas da glicose, de cada animal, encontram-se no ANEXO 1.

GRÁFICO 1

Evolução das dosagens da glicemia e desvio padrão

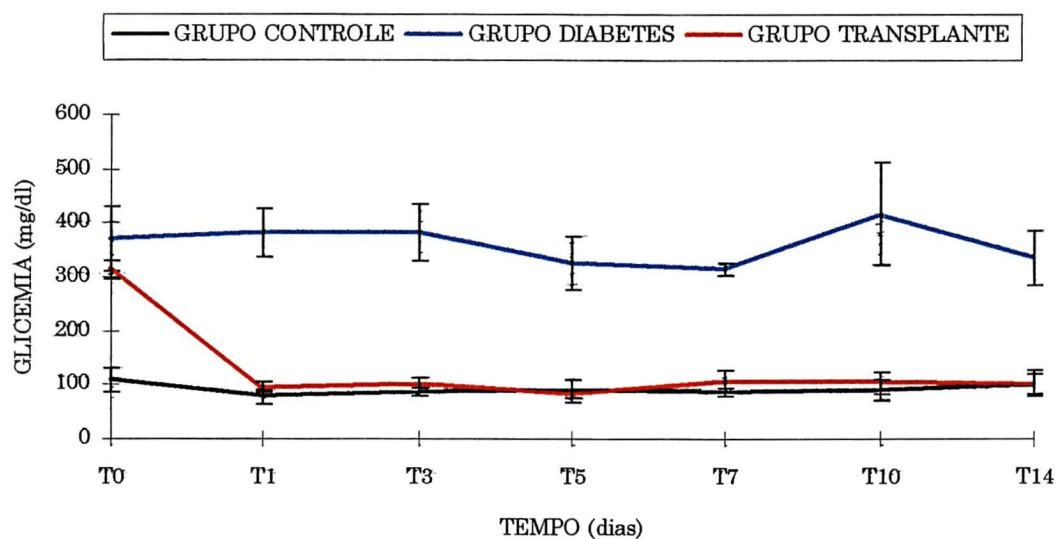


TABELA 3

Valores médios de glicemia e desvio padrão

	GRUPO CONTROLE	GRUPO DIABETE	GRUPO TRANSPLANTE	VALOR -p
T0	109,4 ± 23,55	371,8 ± 58,76	313,4 ± 16,92	0,000
T1	77,6 ± 12,6	382,6 ± 43,33	95 ± 9,14	0,003
T3	85 ± 7,84	382,4 ± 53,73	99,6 ± 13,89	0,005
T5	88,8 ± 21,61	327,6 ± 49,23	82,8 ± 8,61	0,000
T7	87 ± 8,46	314,2 ± 11,21	106,8 ± 21,16	0,000
T10	90,4 ± 17,4	418 ± 96,17	103,6 ± 19,78	0,000
T14	102,6 ± 24,4	335,8 ± 50,97	100,8 ± 19,88	0,000

4.2 RESULTADOS DAS MEDIÇÕES DO PESO

Nos grupos controle e transplante, não houve alteração estatisticamente significativa do peso dos animais entre os tempos T0 e T14.

No grupo diabete, observamos aumento significativo do peso entre as medições nos tempos T0 e T14.

O GRÁFICO 2 demonstra as variações das médias das medições do peso, durante o seguimento, nos grupos controle, diabete e transplante.

Na TABELA 4, observamos a média e desvio padrão das medições do peso e o valor -p da análise estatística, durante o seguimento, nos grupos controle, diabete e transplante.

Os valores das medições de peso, de cada animal, encontram-se no ANEXO 2.

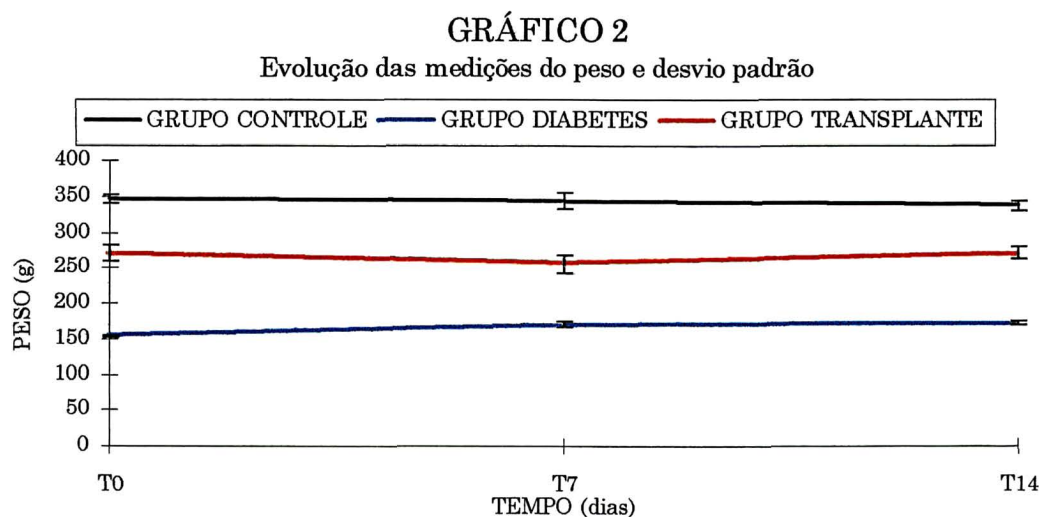


TABELA 4

Valores médios das medições de peso e desvio padrão

	GRUPO CONTROLE	GRUPO DIABETE	GRUPO TRANSPLANTE
T0	346 ± 5,03	153,6 ± 1,86	271 ± 10,5
T7	343,4 ± 10,5	170 ± 4,98	256,2 ± 12,8
T14	336,8 ± 6,03	171,8 ± 3,38	270,6 ± 8,07
	-p = 0,43	-p = 0,0038	-p = 0,96

4.3 RESULTADOS DO ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Nos grupos controle e diabete, o aspecto histológico do fígado não demonstra alterações. No grupo transplante, observamos no parênquima hepático e espaço porta, intenso infiltrado mononuclear linfocitário, compatível com rejeição celular por linfócito T. FIGURAS 5, 7 e 9.

No estudo histológico do tecido pancreático dos grupos controle, diabete e transplante, pela coloração utilizada, não é possível a observação de células beta. Em nenhum dos grupos foi observado alterações histológicas do tecido pancreático. FIGURAS 6, 8 e 10.



FIGURA 5: Tecido hepático de um rato do grupo controle com aspecto histológico normal. (Aumento 20X10. H&E)

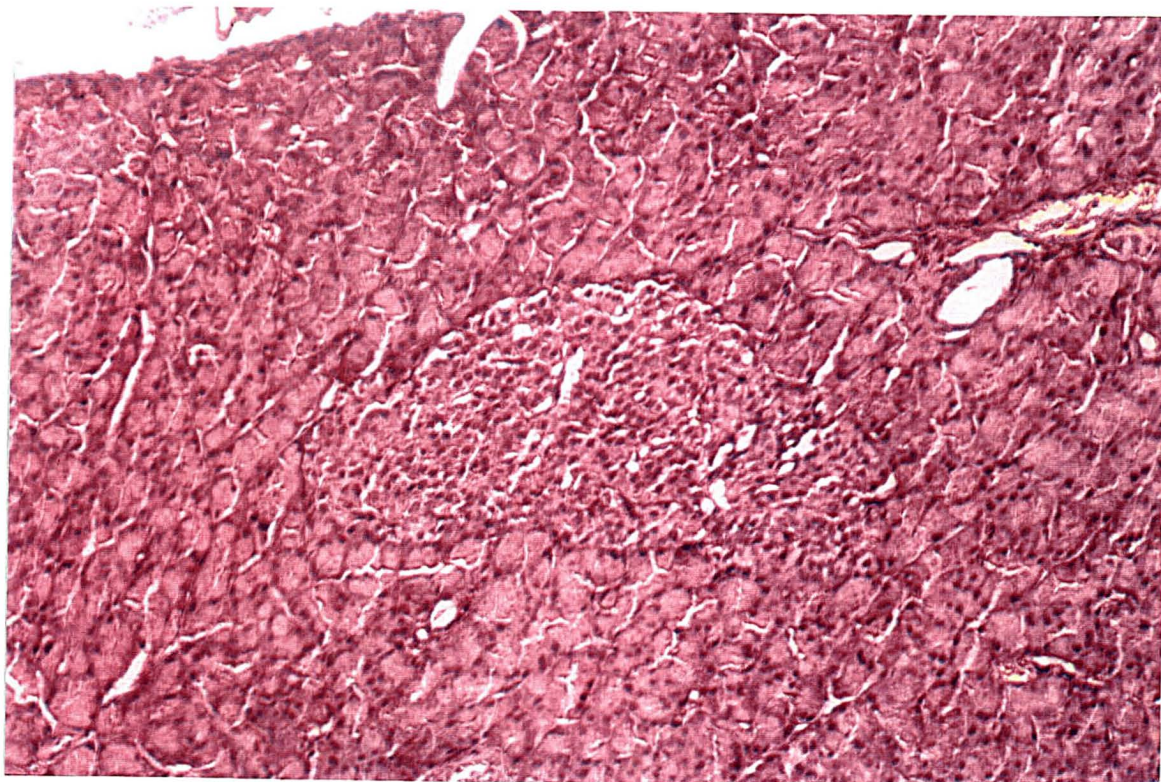


FIGURA 6: Tecido pancreático de um rato do grupo controle com ilhotas de Langerhans de aspecto histológico normal. (Aumento 20X10X1,5. H&E)

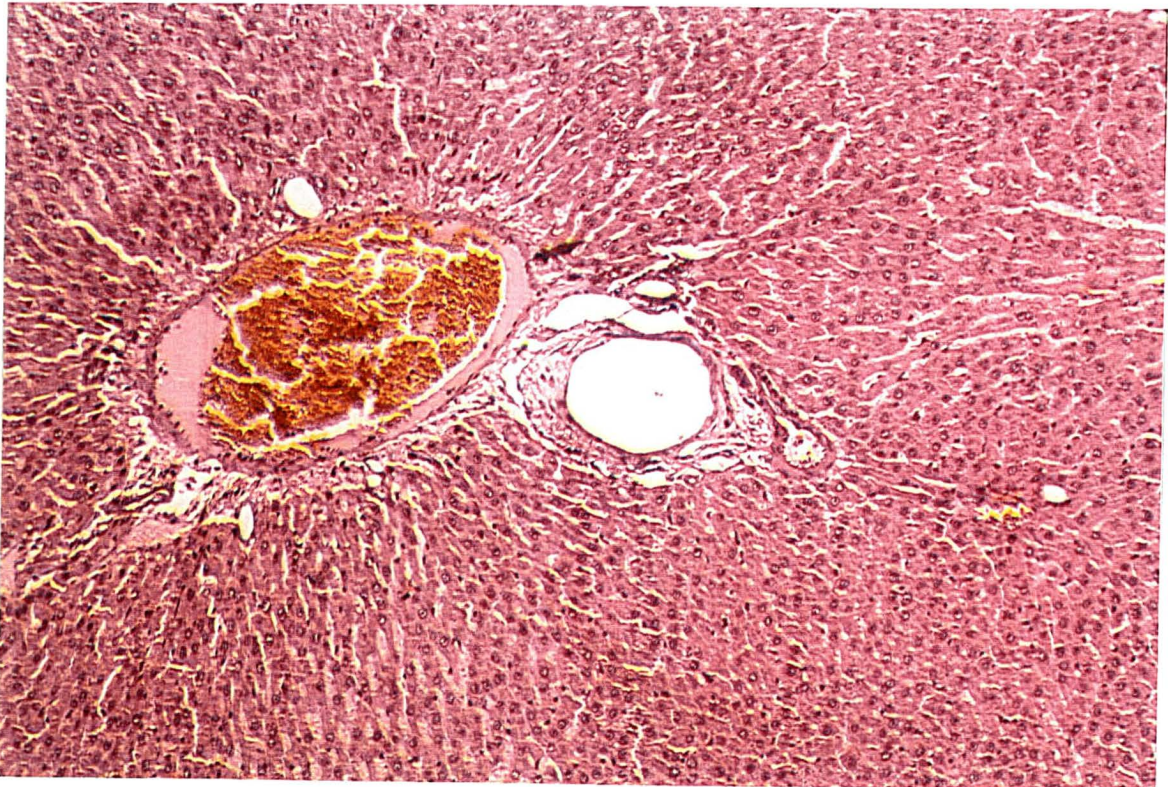


FIGURA 7: Tecido hepático de um rato do grupo diabete onde observamos aspecto histológico habitual. (Aumento 20X10X1,5. H&E)

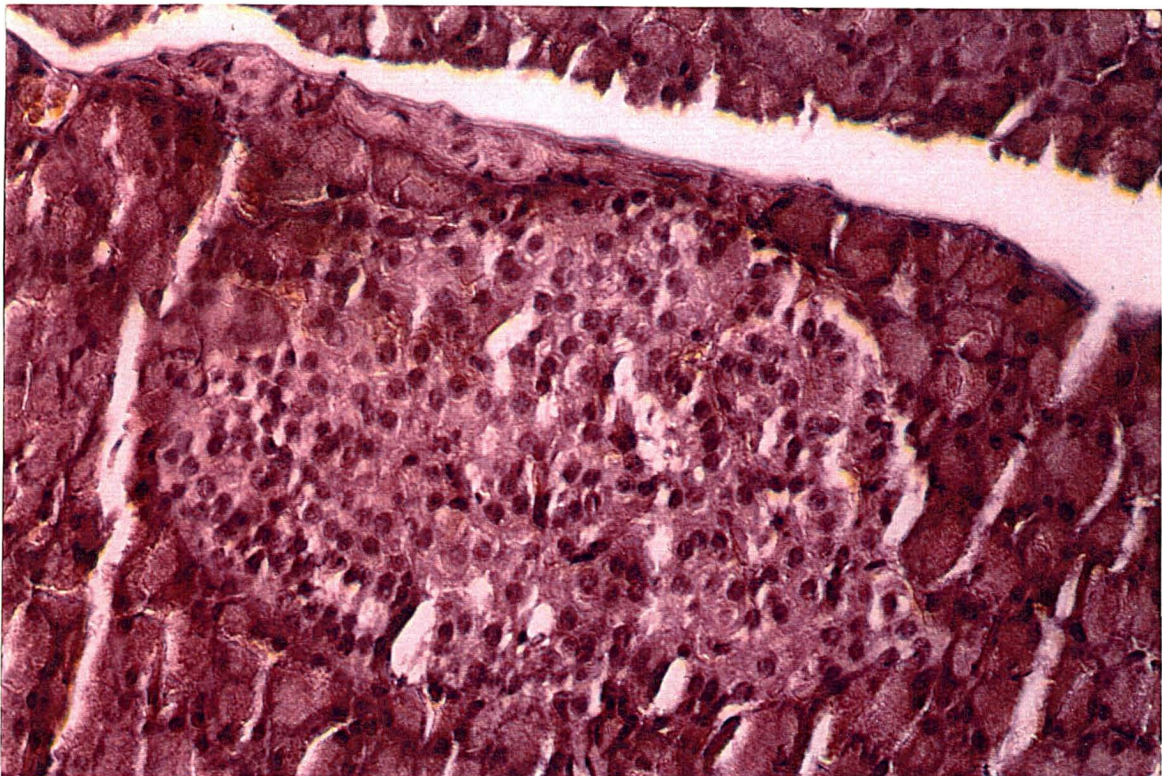


FIGURA 8: Tecido pancreático de um rato do grupo diabete onde observamos uma ilhota de Langerhans. Não é possível avaliar alterações de células beta. (Aumento 20X10. H&E)

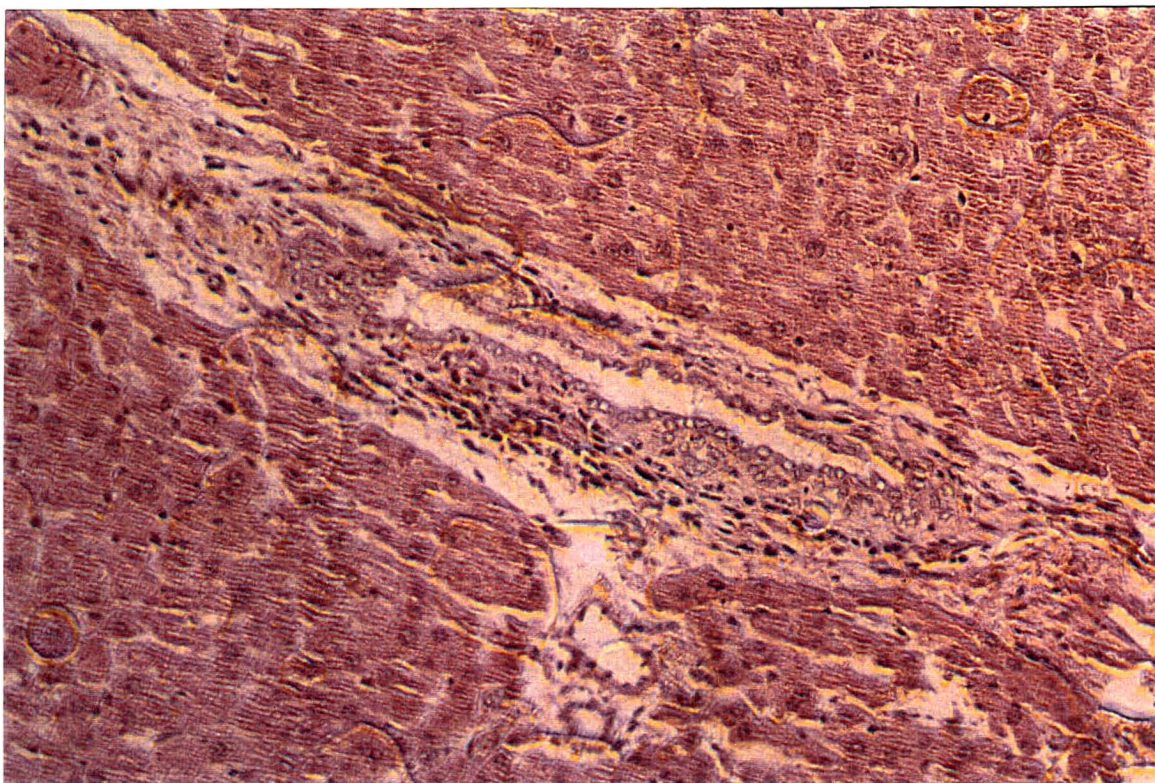


FIGURA 9: Tecido hepático de um rato do grupo transplante onde observamos espaço porta com infiltrado linfocitário. (Aumento 20X10X1,5. H&E)

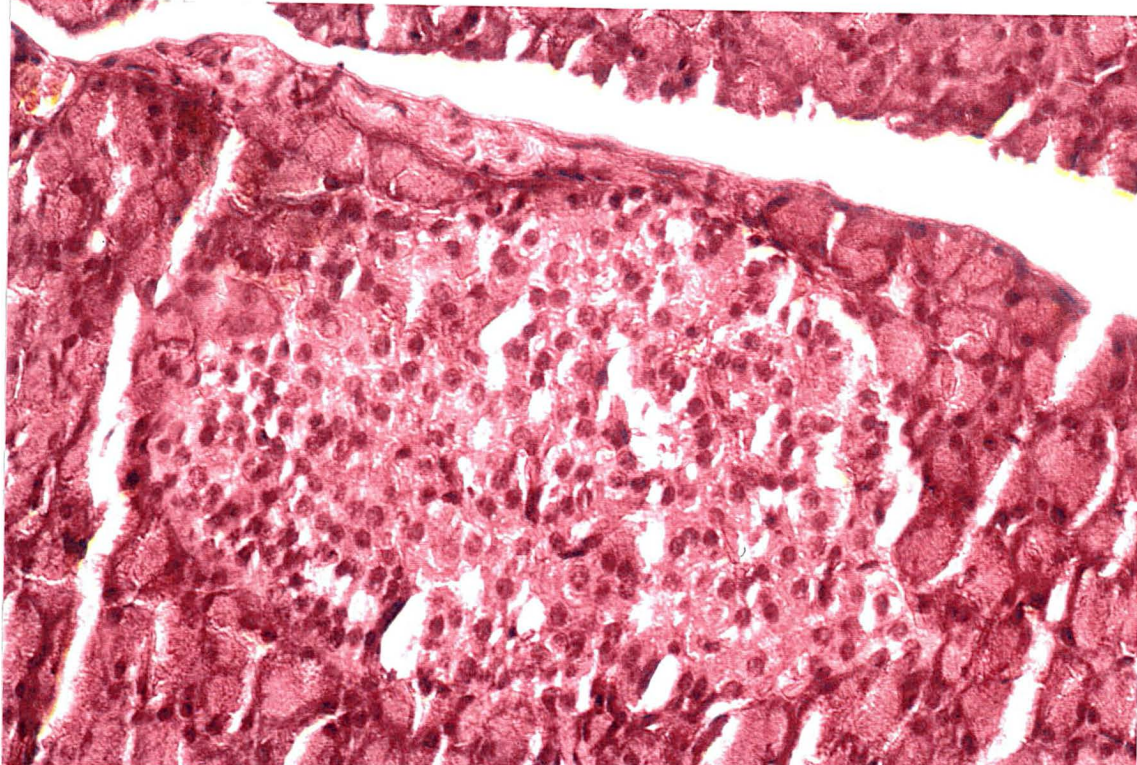


FIGURA 10: Tecido pancreático de um rato do grupo transplante. Não é possível avaliar alterações de células beta. (Aumento 20X10. H&E)

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Atualmente, o transplante das ilhotas pancreáticas é o procedimento mais promissor para o tratamento do diabetes tipo I ou insulino-dependente. O objetivo do transplante é inserir a unidade fundamental produtora de insulina (células beta), no paciente que apresenta deficiência na produção deste hormônio, levando a regulação da glicemia. (ANTUNES e MATOS, 1992)

A intervenção precoce, antes do estabelecimento das complicações decorrentes da doença seria o ideal. Com o transplante experimental de ilhotas pancreáticas, observou-se prevenção do espessamento da membrana basal glomerular, evitando a nefropatia. Previne também as lesões oculares e neurológicas. (SUTHERLAND et al., 1978; LEOW et al., 1995)

5.1 INDUÇÃO DO DIABETE EM MODELOS ANIMAIS

Pela dificuldade de obtenção e elevado custo de animais geneticamente manipulados para estudos em diabetes experimental, no nosso meio, o desenvolvimento do DMID em ratos fica restrito aos induzidos quimicamente ou pancreatectomizados.

A pancreatectomia a 90%, 95% ou 99,5% é método pouco fiel para redução do número de células beta. Ocorrem resultados imprevisíveis e de difícil reprodutibilidade. Seu resultado passa da simples intolerância à glicose ou leve hiperglicemia (pancreatectomia a 90% ou 95%) ao diabetes severo que sem tratamento evolui para óbito (pancreatectomia a 99,5%) (LEAHY, 1984; MENDEZ e RAMOS, 1994). Alguns autores, obtiveram bons resultados com a

utilização desse modelo. (SCOW, 1956; MARTIN e LACY, 1963; MIGLIORINI, 1970; NOGUCHI et al., 1994; HOSOKAWA et al., 1996)

Atualmente, as drogas mais utilizadas para produzir o diabetes são a aloxana e a estreptozotocina que, em doses adequadas atuam especificamente nas células beta das ilhotas de Langerhans. Os resultados ora obtidos confirmam a literatura, onde a inoculação endovenosa de 60 mg de estreptozotocina induz o diabetes experimental em ratos (JUNOD, 1969). Confirmamos esses resultados para a linhagem WISTAR TECPAR com boa sobrevivência. A inoculação endovenosa de estreptozotocina, provocou hiperglicemia em todos os ratos inoculados. Não se avaliou as complicações vasculares, e a ingestão dos animais, devido a natureza desse estudo, de curto seguimento, que objetiva a reversão da hiperglicemia pelo transplante intraportal de ilhotas de Langerhans.

A estreptozotocina é um agente nitrosureico antineoplásico que induz a lesão no DNA das ilhotas pancreáticas. Doses altas provocam um efeito tóxico direto à célula beta e doses baixas resultam em insulite e hiperglicemia 1 a 2 dias após a injeção (WEIDE e LACY, 1991). Observações ultraestruturais revelam necrose de células beta e infiltrado de linfócitos e macrófagos. Células alfa e delta mostram-se normais. A aparência inflamatória da lesão sugere que a estreptozotocina inicia uma reação imunológica com mediação celular dirigida às células beta (ROSSINI et al., 1977). Há redução do conteúdo pancreático de insulina e pouco efeito no conteúdo de somatostatina e glucagon (BONNER-WEIR et al. 1981). Sendo linfócito T dependente, macrófagos são os primeiros a aparecer, resultando em insulite. Desta forma, alterações nos macrófagos ou linfócitos T pela irradiação, esteróides ou sílica previnem o desenvolvimento da doença (ROSSINI et al., 1977; WEIDE e LACY, 1991; WEST et al., 1996). Em nosso estudo, não observamos alterações ou presença de células inflamatórias nas ilhotas pancreáticas nos grupos diabetes e transplante. O fato se deve a incapacidade de identificação de células beta com a coloração utilizada. Ideal seria a realização da imunohistoquímica. Anticorpos marcados proporcionariam a identificação das células beta onde, provavelmente, observaríamos necrose e redução do número de células beta em relação ao grupo controle.

A regeneração pancreática pós-pancreatectomia ou regeneração de células beta após o uso de substâncias citotóxicas como a estreptozotocina foi observada em camundongos, porém sem repercussões clínicas. Na pancreatectomia parcial, a regeneração do tecido pancreático foi estudada por BONNER-WEIR et al. (1983), que descreveram regeneração do tecido remanescente 8 a 10 semanas após a pancreatectomia a 90%.

5.2 ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS

Vários métodos de isolamento de ilhotas pancreáticas têm sido utilizados desde 1967 quando LACY e KOSTIANOVSKY (1967) empregaram a colagenase e o gradiente de ficol no processo de digestão e purificação do tecido pancreático (MACEDO et al., 1986). Nesses 30 anos, houve grande aperfeiçoamento da técnica com aumento da viabilidade e do número de ilhotas isoladas. Atualmente, as ilhotas de Langerhans de doador adulto, neonatal ou fetal podem ser isoladas a fresco, cultivadas ou criopreservadas. (FEDERLIN e BRETZEL, 1984)

Enzimas originárias da fermentação da bactéria *Clostridium histolyticum*, as colagenases tipo V e XI, são utilizadas para digestão pancreática, mergulhando-se o tecido pancreático fragmentado ou, mais recentemente, injetando-se uma diluição desta enzima em vasos ou ductos pancreáticos (LACY e KOSTIANOVSKY, 1967; GOTOH, et al., 1987). Hoje, está estabelecida a superioridade da inoculação intraductal (SHAPIRO et al., 1995). Um estudo comparativo entre a inoculação da solução de colagenase por via intraductal ou vascular, mostrou que apesar da via intravascular proporcionar a obtenção de maior número de ilhotas (intravascular=682±27 e intraductal=417±39), existe maior perda da viabilidade celular que a intraductal. Quando transplantadas 100 ilhotas, número muito reduzido ao recomendado para boa função do enxerto, houve retorno da glicemia a nível menor que 200 mg/dl apenas nos ratos

submetidos à inoculação intraductal de colagenase (GOTOH et al., 1987). Provavelmente, os melhores resultados nos ratos submetidos à inoculação intraductal são devidos à distensão dos ácinos provocando separação mecânica dos tecidos exócrino e endócrino e à digestão direta do tecido exócrino pela colagenase.

O tempo de digestão e a concentração da colagenase influenciam diretamente no rendimento final do enxerto. Enzimas em baixas concentrações e tempo insuficiente de digestão podem proporcionar tecido pancreático parcialmente digerido. O oposto, provoca digestão também das células da ilhota. Diferentes concentrações e tempos de digestão foram analisados por MAYUMI et al. (1985), GOTOH et al. (1987) e OHZATO et al. (1991). Segundo OHZATO et al. (1991), a concentração ideal de colagenase tipo V por via intraductal para um tempo de digestão entre 40 a 50 minutos é aproximadamente 2 mg/ml. No presente estudo, obteve-se bom rendimento de ilhotas utilizando colagenase tipo V nessa concentração mas, diminuimos o tempo de digestão para 25 minutos. Somente após sucessivas tentativas foi possível determinar a dose e tempo de digestão efetivos para cada lote colagenase.

No processo de purificação do enxerto, utilizamos um gradiente, isto é, uma solução que em várias densidades e após centrifugação, seleciona ilhotas pancreáticas próximo a faixa de centrifugação correspondente a densidade 1,080. O gradiente de ficol é amplamente utilizado e minimiza a contaminação pelo tecido exócrino (BALLINGER e LACY, 1972; CALAFIORE et al., 1990). Na tentativa de aumentar o rendimento de ilhotas isoladas, outras substâncias também são utilizadas para produção de gradiente como dextran, sacarose e mais recentemente albumina (PERDRIZET et al.; 1995; FIELD et al., 1996). Adotamos para este estudo o método preconizado por WEIR et al. (1994) que utiliza o ficol somente na densidade 1,077. Obtivemos rendimento de 200 a 300 ilhotas por pâncreas.

A ditizona é um corante que se liga ao zinco e não altera a função das células. Pode ser utilizada após o transplante, via endovenosa, para facilitar a identificação das ilhotas implantadas no tecido hepático. No presente estudo,

emulcionamos a ditizona numa amostra da solução de ilhotas facilitando a diferenciação do material exócrino no processo de contagem das células. (LATIF et al., 1988; FIEDOR et al., 1995)

A determinação da viabilidade e capacidade de produção endócrina de ilhotas pancreáticas isoladas permanece incerta tanto "*in vivo*" como "*in vitro*". O assunto é particularmente importante no ser humano, especialmente no caso de doadores já com parada cardíaca, por não ser possível a reversão do diabete utilizando-se doador único. Seria necessário a preservação do tecido para obtenção de maior número de células, sugerindo a formação de um banco de ilhotas.

Tentativas de avaliação de função e viabilidade, como integridade da membrana celular, sua incorporação com nucleotídeos, conteúdo de enzimas e quociente respiratório celular foram realizadas com resultados variáveis (RICORDI et al., 1990). A habilidade das células regularem um estímulo de glicose *in vitro*, demonstra sua capacidade de secreção que, apesar de estimar o funcionamento da ilhota, não reflete sua performance após o implante.

Experimentalmente, o transplante permanece o único método eficaz para a confirmação da viabilidade de ilhotas pancreáticas isoladas. Novas técnicas de avaliação, principalmente na linha da criopreservação, o uso do laser ou da taxa de síntese pancreática, ainda permanecem em desenvolvimento. (MERCHANT et al., 1996; MIYAUCHI et al., 1996)

5.3 TRANSPLANTE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS

O local para implantação do tecido endócrino pancreático deve ser seguro, de fácil avaliação e acesso, imunologicamente privilegiado e que permita completa implantação e viabilidade a longo prazo. Nos estudos experimentais, a melhor função do enxerto tem sido relacionada aos sítios de maior vascularização

como fígado, baço e rim (FELDMAN et al., 1977; FINCH et al., 1977; REECE-SMITH et al., 1981; GORES et al., 1987; AR'RAJAB et al., 1989). Da mesma forma, resultados insatisfatórios são descritos nos implantes em tecido muscular e na cavidade peritoneal onde é necessário um maior número de células para reversão da glicemia. (WEBER et al., 1978; SELAWRY e WHITTINGTON, 1984; BARKER et al., 1991; LIM et al., 1994; GUAN et al., 1995)

Em estudo controlado, com seguimento de 18 meses, observou-se boa função de 3000 ilhotas pancreáticas transplantadas tanto via intraportal como subcapsular renal. Entretanto, somente no grupo de implante intraportal, o transplante de 100 ilhotas foi capaz de reverter o diabete. (LEOW et al., 1995)

Fisiologicamente, a secreção endócrina deve drenar por via portal. Ilhotas pancreáticas implantadas em órgãos ou tecidos com drenagem venosa via veia porta como fígado, baço, reto ou omento ofereceriam melhor resultado metabólico pois a insulina seria inicialmente metabolizada no fígado para então atuar de forma sistêmica. Em ratos, observa-se maior produção de insulina nos enxertos implantados em vias não portais de drenagem, como a cavidade peritoneal e a cápsula renal. (GUAN et al., 1995) Pela ausência de metabolização hepática, as vias não portais de drenagem necessitam maior produção de insulina por parte do enxerto, para alcançar a normoglicemia. A longo prazo, grande demanda de insulina, proporcionaria estresse celular com perda progressiva de função da célula beta. Em humanos, o implante intraportal de ilhotas não purificadas é freqüentemente seguido de severa hipertensão portal, coagulação intravascular disseminada e trombose hepática. (MEHIGAN et al., 1980; NOMURA et al, 1996)

O local do implante também deve ser selecionado visando diminuir o índice de rejeição. Comparou-se a implantação intracerebral na cisterna magna com implante intra-hepático em ratos não imunodeprimidos. Ratos com implante intracerebral mantiveram normoglicemia até 210 dias após o transplante enquanto no implante intra-hepático observou-se perda de função do enxerto, por rejeição, entre o dia 7 e 15 (LEE et al, 1992). Outras situações como testículos de localização intra-abdominal e rim, são também imunologicamente privilegiadas. (REECE-SMITH et al., 1981; SELAWRY e WHITTINGTON, 1984)

O tecido exócrino pancreático interfere no funcionamento das ilhotas implantadas, aumentando sua imunogenicidade, o que torna o enxerto mais vulnerável. (GORES e SUTHERLAND, 1993)

Estudando o efeito da contaminação de 50% e 90% de tecido exócrino nos enxertos de implantação subcapsular renal em ratos e macacos, GRAY et al. (1988) observaram menor dosagem de insulina tecidual do enxerto com contaminação, quando comparado ao implante puro.

SUTHERLAND et al. (1978) relataram também sucesso no transplante do pâncreas dispersado e sem isolamento específico, se a contaminação exócrina for apenas minimizada através da ligadura do ducto pancreático ou do tratamento com substâncias tóxicas ao pâncreas exócrino como DL-ethionina.

Neste estudo, com o auxílio da coloração pela ditizona, observou-se que o inóculo apresentou ilhotas pancreáticas livres de material exócrino, garantido boa função ao enxerto.

5.4 IMUNODEPRESSÃO EM TRANSPLANTE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS

Resultados satisfatórios com a utilização de ciclofosfamida em associação ou não com outros medicamentos imunodepressores são descritos por WENNBERG et al. (1995). O autor comparou ciclosporina, prednisona, FK506, rapamicina, RS-61443, 15-deoxispergualina, ciclofosfamida e a associação dessas drogas no tratamento imunodepressor em xenotransplantes porco-rato. Os transplantes foram seguidos de avaliações histológicas e imunohistoquímicas. Menor rejeição foi observada com a associação de ciclosporina com rapamicina e no uso de FK506 com a associação de ciclosporina e ciclofosfamida. Nessa

associação, houve menor infiltrado celular (macrófagos, linfócitos T e células NK) e maior sobrevida do enxerto.

THOMAS et al. (1990), comparando a histopatologia, a sobrevida e os padrões de toxicidade em mais de 25 drogas imunodepressoras definiu redução na resposta humoral ao xenotransplante em combinações envolvendo globulina antilinfocitária e FK506 ou 15-deoxispergualina. As drogas mais promissoras para a terapia combinada, foram 15-deoxispergualina e globulina antitimócito de coelho.

BRAYMAN et al. (1990) conferiram proteção às células beta, após tratamento com ciclofosfamida, com a injeção neonatal de células de linfonodos e baço (MHC compatíveis e irradiadas).

O uso da ciclosporina como agente imunodepressor tem se mostrado controverso, pois altas doses deste medicamento reduzem significativamente a secreção de insulina. (ANTUNES e MATOS, 1992)

Permanece em foco de pesquisas, outras formas de indução de tolerância ao enxerto, como a inoculação de anticorpos antiantígeno da classe II e complemento, tratamento das ilhotas com anticorpos monoclonais para células dendríticas, injeção das células do enxerto no timo ou células da medula no timo. (ANTUNES e MATOS, 1992; NOMURA et al., 1993; DELLAGIACOMA et al., 1994)

A ciclofosfamida na dosagem de 200 mg/kg via intraperitoneal, demonstrou, histologicamente neste estudo, a ocorrência de moderado infiltrado celular mononuclear o que sugere a ocorrência de rejeição celular por linfócito T. Entretanto, não se observou perda da função do enxerto, durante o seguimento de 15 dias.

Está comprovada a eficiência do transplante de ilhotas pancreáticas na reversão do diabetes por longo prazo. Estudos investigando o índice de replicação em ilhotas transplantadas, mesmo após estimulação metabólica ou induzida por drogas, mostram que a replicação celular no tecido transplantado, após seguimento de até 9 meses, não difere do pâncreas normal. (TRIMBLE et al., 1980; MONTAÑA et al., 1995)

A performance do enxerto é em geral dependente do seu tamanho. Logo, a função secretória de insulina é proporcional ao número de ilhotas transplantadas (VAN SUYLICHEM et al., 1994). Um estudo de TOBIN et al. (1993) em ratos diabéticos por estreptozotocina, o transplante intraportal de 500, 1000, 2000 e 3000 ilhotas demonstrou correlação proporcional entre o número de ilhotas implantadas e as dosagens de glicemia e insulina. FINEGOOD (1992) obteve resultados similares quando calculou que o volume endócrino, acima de 25% do pâncreas normal, reverte o estado hiperglicêmico. No presente estudo, o número de células implantadas foi adequado, visto que se observou redução nos níveis plasmáticos de glicose já no primeiro dia após o transplante.

O transplante de ilhotas fetais ou neonatais é o que obtem, proporcionalmente, maior volume de células de ilhotas pancreáticas em relação ao tecido exócrino (YDERSTRAEDE et al., 1995). Embora represente somente 4% do peso do pâncreas do rato adulto, o pâncreas neonato possui 11% da massa de ilhotas do pâncreas adulto. O pâncreas fetal ou neonato representa portanto uma importante fonte de ilhotas para utilização em transplantes. (SUTHERLAND et al., 1978)

Na avaliação histológica deste experimento observamos, em alguns espaços porta, um infiltrado celular mononuclear sugerindo que este seria o local de implantação das ilhotas transplantadas.

O desenvolvimento observado no transplante de ilhotas pancreáticas em humanos, estimula novas pesquisas. É um procedimento mais fácil que o transplante de pâncreas total, com menor risco e menor custo. Antes da descoberta da insulina, jovens morriam em coma diabético. O descobrimento de Banting e Best em 1922, foi capaz de proporcionar décadas de vida. Provavelmente, aperfeiçoando-se o isolamento do tecido endócrino produtor de insulina, poderemos oferecer além de longevidade, melhor qualidade de vida.

6 CONCLUSÕES

6 - CONCLUSÕES

O presente estudo, permite as seguintes conclusões:

1 - A estreptozotocina na dose de 60 mg/kg via endovenosa foi efetiva na indução de diabetes sustentada por 14 dias em ratos Wistar.

2 - O alotransplante de ilhotas de Langerhans reverte, a níveis normais, a hiperglicemia plasmática induzida por estreptozotocina em ratos Wistar.

ANEXOS

ANEXO 1

Dados referentes aos valores das medições de glicemia nos ratos dos grupos controle, diabete e transplante.

GRUPO CONTROLE

Animal Número	Glicemias (mg/dl)						
	T0	T1	T3	T5	T7	T10	T14
1	96	69	85	54	80	81	95
2	148	89	98	94	92	65	143
3	93	90	82	86	85	105	106
4	116	61	77	112	79	106	81
5	94	79	83	98	99	95	88

GRUPO DIABETE

Animal Número	Glicemias (mg/dl)						
	T0	T1	T3	T5	T7	T10	T14
6	359	317	426	297	315	477	344
7	462	392	312	338	298	272	269
8	382	398	436	259	325	444	302
9	300	371	342	371	324	379	367
10	356	435	396	373	309	518	397

GRUPO TRANSPLANTE

Animal Número	Glicemias (mg/dl)						
	T0	T1	T3	T5	T7	T10	T14
11	309	90	104	83	82	84	83
12	313	86	116	79	98	103	97
13	293	99	80	81	99	84	81
14	312	91	92	74	137	122	122
15	340	109	106	97	118	125	121

ANEXO 2

Dados referentes aos valores das medições de peso nos ratos dos grupos controle, diabete e transplante.

GRUPO CONTROLE

Animal Número	Peso (g)		
	T0	T7	T14
1	335	311	337
2	364	337	318
3	349	374	330
4	340	356	351
5	342	339	348

GRUPO DIABETE

Animal Número	Peso (g)		
	T0	T7	T14
6	155	163	163
7	160	189	181
8	153	168	175
9	150	169	175
10	150	161	165

GRUPO TRANSPLANTE

Animal Número	Peso (g)		
	T0	T7	T14
11	253	263	275
12	252	249	268
13	292	273	282
14	301	285	287
15	257	211	241

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANTUNES, L.J.; MATOS, K.T.F. Transplantes e GVH In: **Imunologia médica**. São Paulo: Atheneu, 1992, p. 255-265.
2. AR'RAJAB, A.; AHREN, B.; ALUMETS, J.; BENGMARK, S. Islet transplantation to the renal subcapsular space in streptozotocin-diabetic rats. **Acta Chirurgica Scandinavia**, v. 155, p.503-508, 1989.
3. ATKINSON, M.A.; MACLAREN, N. K. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 21, p. 1428-1436, 1994.
4. BACH, J.F. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 4, p. 516-542, Aug. 1994.
5. BALLINGER, W.F.; LACY, P. E. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. **Surgery**, v. 72, n. 2, p. 175-186, Aug. 1972.
6. BARKER, C.F.; MARKMANN, J.F.; POSSELT, A.M.; NAJI, A. Studies of privileged sites and islet transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 23, n. 4, p. 2138-2142, Aug. 1991.
7. BLISS, M. The discovery of insulin. In: PICKUP, V.; WILLIAMS, G. **Textbook of diabetes**. Oxford: Blackwell, 1991. p. 10-14
8. BONNER-WEIR, S.; TRENT, D.F.; HONEY, R.M.; WEIR, G.C. Responses of neonatal rats islets to streptozotocin. Limited B-cell regeneration and hyperglycemia. **Diabetes**, v. 30, n. 1, p. 64-69, Jan. 1981.
9. BONNER-WEIR, S.; TRENT, D.F.; WEIR, G.C. Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release. **Journal of Clinical Investigation**, v. 71, p. 1544-1553, Jun. 1983.
10. BOTAZZO, G. F. On the honey disease. A dialog with Socrates. **Diabetes**, v. 42, p. 778-800, May 1993.
11. BRAYMAN, K.L.; NAJI, A.; BARKER, C.F. Studies of host immunomodulation and prevention of pancreatic beta cell destruction. **Transplantation Proceedings**, v. 22, n. 2, p. 851-852, Apr. 1990.

12. BROUSSOLLE, C.; JEANDIDIER, M.; HANAIRE-BROUTIN, H. French multicentre experience of implantable insulin pumps. *The Lancet*, v. 343, p. 514-515, Feb. 1994.
13. CALAFIORE, R.; CALCINARO, F.; BASTA, G.; FALORNI, A.; PIETROPAOLO, M.; PICCHIO, M.L.; BRUNETTI, P. A simple method for bulk separation of highly purified human islets of Langerhans. *Transplantation Proceedings*, v. 22, n. 2, p. 789-790, Apr. 1990.
14. CARNAUD, C. The contribution of animal models to the understanding of the pathogenesis of type I diabetes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 28, n. 8, p. 925-929, 1995.
15. CHAIB, E. **Comportamento do alo-transplante de ilhotas de Langerhans no fígado de ratos submetidos à inoculação de células apresentadoras de antígenos no timo.** São Paulo, 1996. Tese (Livro-Docência) - Departamento de Gastroenterologia, Universidade de São Paulo.
16. CLARK Jr, C.M.; LEE, D.A. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, v. 332, n. 18, p. 1210-1217, May 1995.
17. COCHRAN, W.G.; SNEDECOR, G.H. In: **Statistical methods** The Iowa State University Press.: Iowa, 1967. p. 296-298.
18. DECKERT, T.; POULSEN, J.E.; LARSEN, M. Prognosis of diabetics with diabetes onset before the age of thirty-one. Survival, causes of death and complications. *Diabetologia*, v. 14, p. 363-370, 1978.
19. DELFINO, V.D.A. **Viabilidade de ilhotas pancreáticas.** Avaliação após preservação em 4 soluções distintas. Londrina, 1995. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) - Departamento de Clínica Médica, Universidade Estadual de Londrina.
20. DELLAGIACOMA, G.; ROSSI, M.; CASTAGNA, M.T.; RADIN, S.; VECCHIONI, I. Injection of bone marrow cells into the thymus to achieve tolerance in an islet xenotransplant (human-to-rat) model. *Transplantation Proceedings*, v. 26, n. 3, p. 1114-1115, Jun. 1994.
21. THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, v. 329, n. 14, p. 977-986, Sep. 1993.

- 22.DIB, S.A.; RUSSO, E.M.K.; CHACRA, A.R. Diabetes melito tipo I. In: WAJCHENBERG, B.L. **Tratado de endocrinologia clínica**. São Paulo: Roca, 1992. p. 683-706.
- 23.DIBELIUS, A.; KÖNIGSBERGER, H.; WALTER, P. ; PERMANETTER, W.; BRENDDEL, W.; VON SPECHT, B.U. Prolonged reversal of diabetes in the rat by transplantation of allogenic islets from a single donor and cyclosporine treatment. **Transplantation**, v. 41, n. 4, p. 426-431, 1986.
- 24.DOWNING, R. Historical review of pancreatic islet transplantation. **World Journal of Surgery**, v. 8, n. 2, p. 137-142, Apr. 1984.
- 25.DUNN, J.S.; McLETCHE, N. G.B. Experimental alloxan diabetes in the rat. **The Lancet**, v. 2, n. 6255, p. 384-387, Sep. 1943.
- 26.EISENBARTH, G.S. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 21, p. 1360-1368, May 1986.
- 27.FAJANS, S.S. Diabetes mellitus classification and testing procedures. In: DE GROOT, L.J. **Endocrinology**. Philadelphia : W.B. Saunders Company, 1995. p. 1346- 1356.
- 28.FEDERLIN, K.F. ; BRETZEL, R.G. The contribution of pancreatic transplantation to current concepts in diabetes. **Transplantation Proceedings**, v. 16, n. 3, p. 583-586, Jun.1984
- 29.FELDMAN, S.D; HIRSHBERG, G.E.; DODI, G.; RAIZMAN, M.E.; SCHARP, D.W.; BALLINGER, W.F.; LACY, P. E. Intrasplenic islet isografts. **Surgery**, v. 82, n. 3, p. 386-394, Sep. 1977.
- 30.FERNANDEZ-CRUZ, L.; CASANOVAS, D. ; LLOVERAS, G. Pancreas transplantation, is islets transplantation the future? **Transplantation Proceedings** v. 24, n. 6, p. 2379-2382, Dec.1992.
- 31.FIEDOR, P. ; SUNG, R.S.; GOODMAN, E.R.; OLUWOLE, S.F.; LICINSKA, I.; MAZUREK, P. A.; ROWINSKI, W. Efficacy and safety of dithizone in staining of islet cell transplants. **Transplantation Proceedings**, v. 27, n. 6, p. 2984, Dec.1995.
- 32.FIELD, J.; FARNEY, A.; SUTHERLAND, D.E.R. 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, May 1996.

33. FILLIBEN, J.J. The probability plot correlation coefficient test for normality. *Tecnometrics*, v.17, n.1, p. 111, 1996.
34. FINCH, D.R.A.; WISE, T.H.; MORRIS, P. J. Successful intra-splenic transplantation of syngenic and allogenic isolated pancreatic islets. *Diabetologia*, v. 13, v.195-199, 1977.
35. FINEGOOD, D.T.; TOBIN, B.W.; LEWIS, J.T. Dynamics of glycemic normalization following transplantation of incremental islet masses in streptozotocin-diabetic rats. *Transplantation*, v. 53, n. 5, p. 1033-1037, May 1992.
36. GOLDNER, M.G.; GOMORI, G. Studies on the mechanism of alloxan. *Diabetes*, v. 35, p. 241-248, Oct. 1944.
37. GORES, P. F.; RABE, F.; SUTHERLAND, D.E.R. Prolonged survival of intraportal versus subrenal capsular transplanted islet allografts. *Transplantation*, v. 43, n. 5, p. 747-749, may, 1987.
38. GORES, P. F. ; SUTHERLAND, D.R. Pancreatic islet transplantation, v. is purification necessary? *The American Journal of Surgery*, v. 166, p. 538-542, Nov. 1993.
39. GOTOH, M.; MAKI, T.; SATOMI, S.; PORTER, J.; BONNER-WEIR, S.; O'HARA, C.J.; MONACO, A., P. Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. *Transplantation*, v. 43, n. 5, p. 725-730, 1987.
40. GRAY, D.W.R.; SUTTON, R.; McSHANE, P. ; PETERS, M.; MORRIS, P. J. Exorine contamination impairs implantation of pancreatic islets transplanted beneath the kidney capsule. *Journal of Surgical Research*, v. 45, n. 5, p. 432-442, Nov. 1988.
41. GUAN, J.; ZUCKER, P. F.; ATKINSON, P. ; BEHME, M.T.; DUPRE, J.; STILLER, C.R. Liver-omental pouch and intrahepatic islet transplants produce portal insuline delivery and prevent hyperinsulinemia in rats. *Transplantation Proceedings*, v. 27, n. 6, p. 3236, Dec. 1995.
42. HOSOKAWA, Y.A.; HOSOKAWA, H.; CHEN, C.; LEAHY, J.L. Mechanism of impaired glucose-potentiated insulin secretion in diabetic 90% pancreatectomy rats. *Journal of Clinical Investigation*, v. 97, n. 1, p. 180-186, Jan. 1996.

43. HOUWING, H.; BENTHEM, L.; VAN SUYLICHEN, P. T.R.; VAN DER LEEST, J.; STRUBBE, J.H.; STEFFENS, A.B. Islet transplantation in diabetic rats normalizes basal and exercise-induced energy metabolism. *Diabetologia*, v. 38, n. 8, p. 919-926, Aug. 1995.
44. JARA-ALBARRÁN, A.; ARRANZ, A.; ALVAREZ, S.; SOTO, M.L.; MARTÍNEZ, B.; MARTÍN-SCAPA, M.C. Severity of hypoglycemia in rats when insulin is applied after islet allotransplantation in the liver. *Transplantation Proceedings*, v. 27, n. 6, p. 3217-3219, Dec. 1995.
45. JUNOD, A.; LAMBERT, A.E.; STAUFFACHER, W.; RENOLD, A.E. Diabetogenic action of streptozotocin, v. relationship of dose to metabolic response. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 48, p. 2129-2139, 1969.
46. KEMP, C.B.; KNIGHT, M.J.; SCHARP, D.W.; BALLINGER, W.F.; LACY, P. E. Effect of transplantation site on the results of pancreatic islet isografts in diabetic rats. *Diabetologia*, v. 9, n. 6, p. 486-491, 1973.
47. KRALL, L., P.; LEVINE, R.; BARNETT, D. The history of diabetes. In: *JOSLIN'S Diabetes Mellitus*. 13.ed. Philadelphia: Lea & Fibiger, 1994. Cap. 1, p. 1-25.
48. LABHART, A. Intuition, luck and misfortune in diabetes research. *Diabetologia*, v.14, p. 353-358, 1978.
49. LACY, P. E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islet of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, v. 16, p.35-39, Jan. 1967.
50. LATIF, Z.A.; NOEL, J.; ALEJANDRO, R. A simple method of staining fresh and cultured islets. *Transplantation*, v. 45, n. 4, p. 827-830, Apr. 1988.
51. LEAHY, J.L.; BONNER-WEIR, S.; WEIR, G.C. Abnormal glucose regulation of insulin secretion in models of reduced B-cell mass. *Diabetes*, v. 33, n. 7, p. 667-673, Jul. 1984.
52. LEE, H.C.; AHN, K.J.; LIM, S.K.; KIM, K.R.; AHN, Y.S.; LEE, K.E.; HUH, B. Allotransplantation of rat islets in to the cisterna magna of streptozotocin-induced diabetic rat. *Transplantation*, v. 53, n. 3, p. 513-516, Mar. 1992.
53. LEHMANN, E.L. In: *Nonparametrics statistical methods based on banks*. Holden-Day: San Francisco, 1975, p. 203-209.

54. LEOW, C.K.; GRAY, D.W.R.; MORRIS, P. J. The long term metabolic function of intraportal and renal subcapsular islet isografts and the effect on glomerular basement membrane thickness in rats. *Diabetologia*, v. 38, n. 9, p. 1014-1024, Sep. 1995.
55. LIM, A.A.; LI, S.Q.; POH, L.H.; LIM, M.K.; SEAH, M.L.; HENG, K.K. The rectum as a novel site for islet cell transplantation. *Transplantation*, v. 57, n. 2, p.294-296, Jan.1994.
56. MACEDO, C.S.; MERCADANTE, M.C.S.; MACEDO, A.R. Controle do diabetes por meio do transplante de ilhotas de Langerhans preparadas sem o emprego da digestão enzimática, estudo experimental no rato. *Revista do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo*, v. 41, n. 2, p. 55-60, 1986.
57. MACFARLANE, I.A. The milenia before insulin. In: PICKUP, J.C.; WILLIAMS, G. *Textbook of diabetes*. Oxford: Blacwell, 1991. p. 3-9.
58. MARTIN, J.M.; LACY, P.E. The prediabetic period in pancially pancreatectomized rats. *Diabetes*, v. 12, n. 3, p. 238-242, 1963.
59. MARTÍN, A.V.; LÓPEZ, A.C.; PÉREZ, N. R.; BARRIOS, A.C.; ROCA, F.C. Modelo diabético en ratas. *Revista Cubana de Medicina*, v. 25, p. 295-305, mar. 1986.
60. MAYUMI, H.; HIMENO, K.; TOKUDA, N. ; NOMOTO, K. An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. *Transplantation*, v. 40, n. 4, p. 437-441, 1985.
61. MEHIGAN, D.G.; BELL, W.R.; ZUIDEMA, G.D.; EGGLESTON, J.C. ; CAMERON, J.L. Disseminated intravascular coagulation and portal hypertension following pancreatic islets autotransplantation. *Annals of Surgery*, v. 191, n. 13, p. 287-293, Mar. 1980.
62. MENDEZ, J.D.; RAMOS, H.G. Animal models in diabetes research. *Archives of Medical Research*, v. 25, n. 4, p. 367-375, 1994.
63. MERCHANT, F.A.; DILLER, K.R.; AGGARWAL, S.J.; BOVIK, A.C. Viability analysis of cryopreserved rat pancreatic islets using laser scanning confocal microscopy. *Cryobiology*, v. 33, n. 2, p. 236-252, Apr.1996.
64. MIYAUCHI, H.; ASANO, T.; UEMATSU, T.; HASEGAWA, M.; MARUYAMA, M.; YWASHITA, T.; ISONO, K. Evaluation of pancreas graft function by the management of pancreatic protein synthesis rate. *Transplantation Proceedings*, v. 28, n. 1, p. 361-362, Feb.1996.

- 65.MIGLIORINI, R.H. Two-stage procedure for total pancreatectomy in the rat. **Diabetes**, v. 19, n.9, p. 694-697, Sep. 1970.
- 66.MONTAÑA, E.; NACHER, V.; SOLER, J. Beta-cell replication in long-term transplanted islets. **Transplantation Proceedings**, v. 27, n. 6, p. 3201, Dec. 1995.
- 67.MOSKALEWSKI, S. Isolation and culture of the islet of Langerhans of the guinea pig. **General And Comparative Endocrinology**, v. 5, n. 3, p. 342-353, Jun. 1965.
- 68.MUIR, A.; SCHATZ, D.A.; MACLAREN, N. K. The pathogenesis, prediction, and prevention of insulin-dependent diabetes mellitus. **Endocrinology and Metabolism Clinics Of North America**, v. 21, n. 2, p. 199-219, Jun. 1992.
- 69.NAJARIAN, J.S.; SUTHERLAND, D.E.R.; MATAS, A.J.; STEFFES, M.W.; SIMMONS, R.L.; GOETZ, F.C. Human islet transplantation, v. a preliminary report. **Transplantation Proceedings**, v. 9, n. 1, p. 233-236, Mar. 1977.
- 70.NATHAN, D. Long-term complications of diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 23, p. 1676-1685, Jun.1993.
- 71.NATIONAL DIABETES DATA GROUP. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. **Diabetes**, v. 28, p.1039-1057, Dec. 1979.
- 72.NOGUCHI, Y.; YOUNES, R.N.; CONLON, K.C.; VYDELINGUM, N.A.; MATSUMOTO, A.; BRENNAN, M. The effect of prolonged hyperglycemia on metabolic alterations in the subtotally pancreatectomized rats. **The Japanese Journal of Surgery**, v. 24, n. 11, p. 987-993, 1994.
- 73.NOMURA, Y.; ITO, S.; ICHIKAWA, N. ; MEIGATA, K.; KIKUCHI, K.; ANDO, Y.; WATANABE, K.; DEGAWA, H.; BECK, Y.; TOMIKAWA, S.; NAGAO, T.; UCHIDA, H. Unpurified islet cell transplantation in diabetic rats. **Transplantation Proceedings**, v. 28, n. 3, p. 1849-1850, Jun. 1996.
- 74.NOMURA, Y.; STEIN, E.; MULLEN, Y. Prevention of overt diabetes and insulinitis by intrathymic injection of syngenic islets in newborn nonobese diabetic (NOD) mice. **Transplantation**, v. 56, n. 3, p. 638-642, Sep. 1993.

75. OHZATO, H.; GOTOH, M.; MONDEN, M.; DONO, K.; KANAI, T.; MORI, T.
Improvement in islet yield from a cold-preserved pancreas by pancreatic ductal collagenase distention at the time of harvesting.
Transplantation, v. 51, n. 3, p. 566-570, Mar. 1991.
76. PERDRIZET, G.A.; REWINSKI, M.J.; BARTUS, S.A.; HULL, D.; SCHWEIZE, R.T.; SCHARP, D.W. . Albumin improves islet isolation, v. specific versus nonspecific effects. **Transplantation Proceedings**, v. 27, n. 6, p. 3400-3402, Dec. 1995.
77. PERLOFF, J.R.; LEVY, M.M.; KETCHUM, R.J.; READ, A.D.; WHITE, D.; BRAYMAN, K.L. Streptozotocin-induced hyperglycemia in rats, analysis of complement activity after streptozotocin administration.
Transplantation Proceedings, v. 27, n. 6, p. 3399, Dec. 1995.
78. PERLOFF, L.J.; NAJI, A.; SILVERS, W.K.; McKEARN, T.J.; BARKER, C.F.
Vascularized pancreas versus isolated islet allografts, an immunological comparison. **Surgery**, v. 88, n. 2, p. 222-230, Aug. 1980.
79. RAIKIETEN, N.; RAIKIETEN, M.L.; NADKARINI, M.V. Studies on the diabetic action of streptozotocin. **Cancer Chemother. Rep.**, v. 29, p. 91, 1963.
80. REECE-SMITH, H.; DUTOIT, D.F.; MCSHANE, P.; MORRIS, P. J.
Prolonged survival of pancreatic islet allografts transplanted beneath the renal capsule. **Transplantation**, v. 31, n. 4, p. 305-306, Apr. 1981.
81. REICHARD, P.; NILSSON, B.; ROSENQVIST, U. The effect of long-term intensified treatment of microvascular complications of diabetes mellitus.
The New England Journal of Medicine, v. 329, n. 5, p. 305-309, 1993.
82. REICKARD, C.R.; ZIEGLER, M.M.; NAJI, A.; GALBUT, D.; BARKER, C.F.
Physiologic and immunologic status of long-functioning transplanted pancreatic islets in rats. **Surgical Forum**, v. 25, n. 0, p. 374-376, 1974.
83. RICORDI, C.; GRAY, D.W.R.; HERING, B.J.; KAUFMAN, D.B.; WARNOCK, G.L.; KNETEMAN, N. M.; LAKE, S.P.; LONDON, N. J.M.; SOCCI, C.; ALEJANDRO, R.; ZENG, Y.; SCHARP, D.W.; VIVIANI, G.; FALQUI, L.; TZAKIS, A.; BRETZEL, R.G.; FEDERLIN, K.; POZZA, G.; JAMES, R.F.L.; RAJOTTE, R.V.; DI CARLO, V.; MORRIS, P. J.; SUTHERLAND, D.E.R.; STARZL, T.E.; MINTZ, D.H.; LACY, P. E. Islet isolation assessment in man and large animals. **Acta Diabetologica**, v. 27, p. 185-195, 1990.

84. RICORDI, C.; TZAKIS, A.G.; CARROLL, P. B.; ZENG, Y.; RILO, H.L.R.; ALEJANDRO, R.; SCHAPIRO, R.; FUNG, J.J.; DEMETRIS, A.J.; MINTZ, D.H.; STARZL, T.E. Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. *Transplantation*, v. 53, n. 2, p. 407-414, Feb. 1992.
85. RODGER, W. Insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal*, v. 145, n. 10, p. 1227-1237, Nov. 1991.
86. ROSSINI, A. A.; HANDLER, E. S.; MORDES, J.P. ; GREINER, D.L. Animal models of human diseases. Human autoimmune diabetes mellitus, lessons from BB rats and NOD mice. *Caveat Emptor. Clinical Immunology and Immunopathology*, v. 74, n. 1, p. 2-9, Jan. 1995.
87. ROSSINI, A. A.; LIKE, A. A.; CHICK, W.L.; APPEL, M.C.; CAHILL, G.F. Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 6, p. 2485-2489, Jun. 1977.
88. SCHARP, D.W. Isolation and transplantation of islet tissue. *World Journal of Surgery*, v. 8, n. 2, p. 143-151, Apr. 1984.
89. SCHARP, D.W.; LACY, P. E.; SANTIAGO, J.V.; McCULLOUGH, C.S.; WEIDE, L.G.; BOYLE, P. J.; FALQUI, L.; MARCHETTI, P. ; RICCORDI, C.; GINGERICH, R.L.; JAFFE, A.S.; CRYER, P. E.; HANTO, D.H.; ANDERSON, C.B.; FLYE, M.W. Results of our first nine intraportal islet allografts in type I, insulin-dependent diabetic patients. *Transplantation*, v. 51, n. 1, p. 76-85, Jan. 1991.
90. SCOW, R.O. "Total" pancreatectomy in the rat: operation, effects, and postoperative care. *Endocrinology*, v. 60, p. 359-367, Jul./Dec. 1956.
91. SELAWRY, H.P. ; WHITTINGTON, K. Extended allograft survival of islets grafted into intra-abdominally placed testis. *Diabetes*, v. 33, p.405-406, Apr. 1984.
92. SHAPIRO, A.M.J.; HAO, E.; RAJOTTE, R.V.; KNETEMAN, N. M. Stationary digestion after intraductal collagenase improves islets recovery in the rat. *Transplantation Proceedings*, v. 27, n. 6, p. 3378, Dec. 1995.
93. SMITH, B.; SARVER, J.G. ; FOURNIER, R.L. A comparison of islet transplantation and subcutaneous insulin injections for the treatment of diabetes mellitus. *Computers Biology Medicine*, v. 21, n. 6, p. 417-427, 1991.
94. SUTHERLAND, D.E.R. Reports from the International Pancreas Transplant Registry. *Diabetologia*, v. 34, n. Supl. 1, p. S28-S39, Aug. 1991.

95. SUTHERLAND, D.E.R. Pancreas and islet cell transplantation, now and then. **Transplantation Proceedings**, v. 28, n. 4, p. 2131-2133, Aug. 1996.
96. SUTHERLAND, D.E.R.; MATAS, A. J.; NAJARIAN, J.S. Pancreatic islet cell transplantation. **Surgical Clinics Of North America**, v. 58, n. 2, p. 365-382, Apr. 1978.
97. THOMAS, F.T.; DeMASI, R.J.; ARANEDA, D.; MARCHMAN, W.; ALQAISI, M.; LARKIN, E.W.; CONDIE, R.M.; AROBBI, A. ; THOMAS, J.M. Comparative efficacy of immunosuppressive drugs in xenografting. **Transplantation Proceedings**, v.22, n. 3, p. 1083-1085, Jun. 1990.
98. THOMAS, F.T.; PITTMAN, K.; McFADDEN, T.; HAISCH, C.; PETERSON, R.; THOMAS, J. Reversal of type II diabetes by pancreas islet transplant in four separate animal models of type II diabetes. **Transplantation Proceedings**, v. 25, n. 1, p. 992-993, Feb. 1993.
99. TOBIN, B.W.; LEWIS, J.T.; CHEN, D.Z.X.; FINEGOOD, D.T. Insulin secretory function in relation to transplanted islet mass in stz-induced diabetic rats. **Diabetes**, v. 42, v.98-105, JANUARY, 1993.
100. TRIMBLE, E.R.; KARAKASH, C.; MALAISSE-LAGAE, F.; VASSUTINE, I.; ORCI, L. ; RENOLD, A.E. Effects of intraportal islet transplantation on the transplanted tissue and the recipient pancreas. **Diabetes**, v. 29, v.341-347, May 1980.
101. TZE, W.J.; TAI, J. Successful intracerebral allotransplantation of purified pancreatic endocrine cells in diabetic rat. **Diabetes**, v. 32, n. 12, p. 1185-1187, Dec. 1983.
102. TZE, W.J.; TAI, J.; CHEUNG, S.S.C.; MURASE, N. ; STARZL, T.E. Successful islet allotransplantation in diabetic rats immunosuppressed with FK506, a functional and immunological study. **Metabolism**, v. 43, n. 2, p. 135-139, Feb. 1994.
103. VAN SUYLICHEN, P. T.R.; STRUBBE, J.H.; HOUWING, H.; WOLTERS, G.H.J.; VAN SCHILFGAARDE, R. Rat islet isograft function. **Transplantation**, v. 57, n. 7, p. 1010-1017, Apr. 1994.
104. WAXMAN, K.; TURNER, D.; NGUYEN, S.T.; SELAM, J.L.; CHARLES, M.A. Implantable programmable insulin pumps for the treatment of diabetes. **Archives of Surgery**, v. 127, p.1032-1037, Sep.1992.

105. WEBER, C.J.; HAGLER, M.; KONIECZNY, B.; CHRYSOCHOOS, J.; RAJOTTE, R.; LAKKIS, F.; LOWRY, R. Encapsulated islet iso-, allo-, and xenografts in diabetic NOD mice. **Transplantation Proceedings**, v. 27, n. 6, p. 3308-3311, Dec. 1995.
106. WEBER, C.J.; SCI, D.M.; HARDY, M.A.; PI-SUNYER, F.X.; ZIMMERMAN, E.; REEMTSMA, K. Tissue culture preservation and intramuscular transplantation of pancreatic islets. **Surgery**, v. 84, n. 1, p. 166-174, Jul. 1978.
107. WEIDE, L.G.; LACY, P. E. Low-dose streptozotocin-induced autoimmune diabetes in islet transplantation model. **Diabetes**, v. 40, p. 1157-1162, Sep. 1991.
108. WEIR, G.C.; HOLLISTER, J.; DAVALLI, A.M.; BONNER-WEIR, S. Islet isolation from rodent pancreas. In: LANZA, R.P.; WILLIAM, I. **Pancreatic Islet Transplantation**. Landes Company, 1994, v. 1.
109. WENNBERG, L.; WALLGREN, A.C.; KARLSSON-PARRA, A.; KOZLOWSKI, T.; SUNDBERG, B.; TIBELL, A.; GROTH, C.G.; KORSGREN, O. Efficacy of various immunosuppressive drugs in preventing pig-to-rat islet xenograft rejection. **Transplantation Proceedings**, v. 27, n. 1, p. 266-267, Feb. 1995.
110. WEST, E.; SIMON, O.R.; MORRISON, E.Y. A Streptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose within six hours of injection into rats. **West Indian Medical Journal**, v. 45, n. 2, p. 60-62, Jun. 1996.
111. YDERSTRAEDE, K.B.; STARKLINT, H.; KEMP, E.; SALOMON, S.; BECK-NIELSEN, H. Transplantation of fetal and neonatal islet tissue, functional and morphological evaluation of free and encapsulated islets grafts. **Transplantation Proceedings** v. 27, n. 6, p. 3182-3183, Dec. 1995.