

VINICIUS DAHER ALVARES DELFINO

**EFEITOS DA INCLUSÃO DE RUTÊNIO VERMELHO EM 3
SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO CELULAR SOBRE A
VIABILIDADE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS MURINAS RECÉM-
ISOLADAS E PRESERVADAS A FRIO POR 24 E 48 HORAS.**

Campinas

2000

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

VINICIUS DAHER ALVARES DELFINO

**EFEITOS DA INCLUSÃO DE RUTÊNIO VERMELHO EM 3
SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO CELULAR SOBRE A
VIABILIDADE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS MURINAS RECÉM-
ISOLADAS E PRESERVADAS A FRIO POR 24 E 48 HORAS.**

*Tese de doutorado apresentada à
Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
a obtenção do título de Doutor em Clínica
Médica, área de concentração Clínica
Médica.*

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Figueiredo

Campinas

2000

UNIDADE BC
 N.º CHAMADA:
T. UNICAMP
D378e
 V. Ex
 TOMBO BC/ 44248
 PROC. 16-392101
 C ☐ D ☒
 PREÇO: R\$ 11,00
 DATA 03/05/01
 N.º CPD

CM-00154705-2

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
 UNICAMP**

D378e

Delfino, Vinicius Daher Alvares

Efeitos da inclusão de rutênio vermelho em 3 soluções de preservação celular sobre a viabilidade de ilhotas pancreáticas murinas recém-isoladas e preservadas a frio por 24 e 48 horas / Vinicius Daher Alvares Delfino. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientador : José Francisco Figueiredo

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Preservação de órgãos, tecidos, etc. 2. Rutênio. I. José Francisco Figueiredo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador(a): *Prof.Dr. José Francisco Figueiredo*

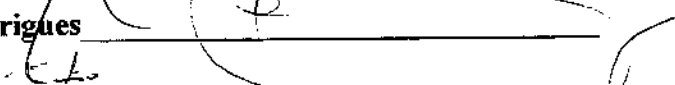


Membros:

1. Prof.Dr. Luis Felipe Gonçalves



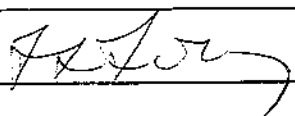
2. Prof.Dr. Marco Aurélio de Freitas Rodrigues



3. Prof. Dr. Gentil Alves Filho



4. Prof.Dr. Luis Sérgio Leonardi



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20/12/00

DEDICATÓRIA

***Ao Professor Doutor Derek W. R. Gray, por seu
empenho em minha iniciação científica e por sua
busca pelo saber.***

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor José Francisco Figueiredo pelo clima de amizade proporcionado e pela coerência e clareza na orientação dos trabalhos de pesquisa.

Aos colegas da disciplina de Nefrologia da Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Professor Doutor Altair Jacob Mocelin, pelo apoio e incentivo.

Ao colegas do laboratório de Pós-Graduação e do Biotério do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, em especial à Professora Maria Emília Favero, pelo interesse científico e pela colaboração nos projetos de pesquisa.

À Professora Doutora Tiemi Matsuo pela ajuda no planejamento experimental e análise estatística dos estudos.

	Pág.
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxv
1. INTRODUÇÃO.....	29
1.1. Impacto Populacional do Diabetes Mellitus.....	31
1.2. Transplante de Pâncreas e de Ilhotas Pancreáticas.....	33
1.3. Preservação a Frio de Ilhotas Pancreáticas.....	37
1.4. Efeitos Biológicos do Rutênio Vermelho.....	40
2. OBJETIVOS.....	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1. Materiais e Métodos Propriamente Ditos.....	49
3.1.1. Animais.....	49
3.1.2. Soluções de preservação.....	49
3.1.3. Esterilização.....	50
3.1.4. Preparo da collagenase.....	50
3.1.5. Gradientes de Euro-Ficol.....	50
3.1.6. Solução de ditizona.....	51
3.1.7. Solução tampão para estreptozocina (STZ).....	51
3.1.8. Produção de diabetes experimental.....	51
3.1.9. Coleta de amostras de sangue.....	51
3.1.10. Determinação da glicemia do rato.....	52

3.1.11. Isolamento das ilhotas pancreáticas do rato.....	52
3.1.12. Transplante intraportal de ilhotas pancreáticas no rato.....	53
3.1.13. Avaliação da viabilidade das ilhotas do rato por coloração supravital. Teste FDA/EB.....	54
3.1.14. Avaliação da viabilidade das ilhotas do rato pelo teste MTT.....	55
3.1.15. Avaliação da viabilidade das ilhotas pelo teste de exclusão de azul tripano.....	57
3.1.16. LDH e ilhotas pancreáticas do rato.....	58
3.2. Trabalho Experimental.....	58
3.2.1. Desenho Experimental.....	58
3.2.2. Detalhamento do trabalho experimental: 1.ª Parte.....	61
3.2.3. Detalhamento do trabalho experimental: 2.ª Parte.....	62
3.2.4. Detalhamento do trabalho experimental: 3.ª Parte.....	63
3.2.5. Detalhamento do trabalho experimental: 4.ª Parte.....	64
3.3. Análise Estatística.....	65
4. RESULTADOS.....	67
4.1. Resultados da 1.ª Parte do Trabalho Experimental.....	69
4.1.1. Teste MTT.....	69
4.1.2. Teste FDA/EB.....	70
4.1.3. Determinações de LDH.....	71
4.2. Resultados da 2.ª Parte do Trabalho Experimental.....	73
4.2.1. Número de ilhotas isoladas por pâncreas.....	73
4.2.2. Teste MTT.....	73
4.2.3. FDA/EB (24 horas de preservação).....	74

4.2.4. Teste FDA/EB (48 horas de preservação).....	75
4.2.5. Relação entre coloração por RV e azul tripano de ilhotas preservadas a frio por 24 horas em HBSS-RV, UW-RV and EC-RV.....	76
4.3. Resultados da 3. ^a Parte do Trabalho Experimental.....	78
4.3.1. Diabetes mellitus pela estreptozocina em ratos Ratos Wistar.....	78
4.3.2. Diabetes mellitus pela estreptozocina em ratos Ratos Lewis isogênicos	81
4.3.3. Diabetes mellitus pela estreptozocina em ratos Ratos Wistar-Furth isogênicos.....	83
4.4. Transplantes Intraportais de Ilhotas Pancreáticas em Ratos Lewis Isogênicos.	87
4.4.1. Diabetes induzido por 50 mg/kg de STZ: primeira série.....	87
4.4.2. Diabetes induzido por 50 mg/kg de STZ: segunda série.....	88
4.4.3. Diabetes induzido por 40 mg/kg de STZ.....	89
5. DISCUSSÃO.....	91
5.1. Rutênio Vermelho e Preservação Hipotérmica de Ilhotas Pancreáticas do Rato.....	93
5.2. LDH e Ilhotas Pancreáticas.....	101
5.3. Diabetes Experimental pela Estreptozocina.....	102
5.4. Transplantes Intraportais Isogênicos.....	105
6. CONCLUSÃO GERAL.....	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
8. ANEXOS.....	133

LISTA DE ABREVEATURAS

BSA	ALBUMINA SÉRICA BOVINA
EB	BROMETO DE ETÍDIO
EC	SOLUÇÃO EURO-COLLINS
DMSO	DIMETILSULFÓXIDO
DTZ	DITIZONA
ERMO	ESPÉCIE REATIVA DO METEBOLISMO DO OXIGÊNIO
FDA	DIACETATO DE FLUORESCEÍNA
HBSS	SOLUÇÃO BALANCEADA DE SAIS DE HANKS
LDH	DESIDROGENASE LÁTICA
LEW	RATO LEWIS
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
RPMI 1640	ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE 1640
RV	RUTÊNIO VERMELHO
SFBI	SORO FETAL BOVINO INATIVADO PELO CALOR
STZ	ESTREPTOZOCINA
UW	SOLUÇÃO DA UNIVERSIDADE DE WISCONSIN
WF	RATO WISTAR-FURTH

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 01 Comparação de doses (60 x 50 x 40 mg/Kg), utilizando-se a administração de STZ por uma das vias sublinguais	82
Tabela 02 Glicemias, em mg/dL, de ratos Lewis isogênicos pré e 2 semanas após administração endovenosa de 40 mg/Kg de estreptozocina e que não alcançaram a definição operacional de diabetes químico determinada. T0: administração de STZ. T2: 2 semanas após a administração da droga.....	83
Tabela 03 Evolução de 3 ratos isogênicos, WF, do grupo peritônio, que não alcançaram definição operacional de diabetes após a administração intraperitoneal de STZ, na dose de 60 mg/Kg.....	84

LISTA DE FIGURA

	Pág.
Figura 1 Teste MTT (1ª Parte trabalho experimental): percentagem de viabilidade de ilhotas pancreáticas do rato, frescas e preservadas a frio por 24 horas avaliada pelo teste MTT.....	70
Figura 2 (1ª Parte trabalho experimental): viabilidade, avaliada pelo teste FDA/EB, de ilhotas pancreáticas do rato frescas e preservadas a frio por 24 horas.....	71
Figura 3 Determinações de LDH em fígado, rim, pâncreas exócrino e endócrino de ratos Lewis (n = 4).....	72
Figura 4 (2ª parte do trabalho experimental): avaliação da viabilidade de ilhotas murinas, frescas e após 24 horas de preservação a frio, por meio do teste MTT.....	74
Figura 5 Teste FDA/EB (2ª parte do trabalho experimental) para a avaliação de ilhotas pancreáticas do rato após 24 horas de preservação hipotérmica.....	75
Figura 6 Teste FDA/EB (2ª parte do trabalho experimental) para a avaliação de ilhotas pancreáticas do rato após 48 horas de preservação hipotérmica.....	76
Figura 7 Correlação entre coloração por RV e azul tripano de ilhotas pancreáticas do rato preservadas a frio por 24 horas em HBSS-RV, UW-RV e EC-RV.....	77

Figura 8	Percentagem de morte celular: comparação de 3 testes em ilhotas do rato preservadas a frio por 24 horas em 3 soluções contendo RV.....	78
Figura 9	Pesos de ratos Wistar diabéticos pela STZ e controles. Tempo = 0 administração STZ.....	80
Figura 10	Glicemias de ratos Wistar diabéticos pela STZ e controles. Tempo = 0: administração STZ.....	80
Figura 11	Evolução dos pesos, a partir do desmame, em 20 ratos e 20 ratas Lewis isogênicos.....	81
Figura 12	Evolução dos pesos após administração de 60 mg/Kg de STZ (tempo 0) por 3 diferentes rotas, para ratos WF isogênicos.....	86
Figura 13	Evolução das glicemias após administração de 60 mg/Kg de STZ (tempo 0), por 3 diferentes rotas, para ratos WF isogênicos.....	86
Figura 14	Evolução ao longo prazo de transplantes intraportais isogênicos em ratos Lewis diabéticos por 50 mg/Kg de STZ: primeira série.....	87
Figura 15	Evolução ao longo prazo de transplantes intraportais isogênicos em ratos Lewis diabéticos por 50 mg/Kg de STZ: segunda série.....	88
Figura 16	Evolução ao longo prazo de transplantes intraportais isogênicos em ratos Lewis diabéticos por 40 mg/Kg de STZ.....	89

RESUMO

Existe a necessidade de se aumentar o número de ilhotas isoladas a partir de um único pâncreas e de se preservar ao máximo a viabilidade destas para permitir que alotransplantes pancreáticos humanos possam ser feitos na base de 1 doador: 1 receptor. Nós estudamos se a adição de rutênio vermelho (RV), um metal de transição complexo relatado como capaz de reduzir o dano pós reperfusão, para algumas soluções de preservação poderia melhorar o número de ilhotas isoladas por pâncreas e/ou a viabilidade de ilhotas pancreáticas murinas após preservação a frio. RV, 5 $\mu\text{mol/L}$, foi adicionado a solução balanceada de sais de Hanks (HBSS), solução da Universidade de Wisconsin (UW), e solução de Euro-Collins (EC) para dar origem a HBSS-RV, UW-RV, e EC-RV, respectivamente. A viabilidade das ilhotas foi avaliada após 24 e 48 horas de preservação a frio por coloração supravital e por azul tripano e pela redução de tetrazolina a formazan. Não se observou aumento no número de ilhotas obtidas por pâncreas pela adição de RV à HBSS utilizada para o isolamento. Preservação em HBSS/HBSS-RV diminuiu significativamente a viabilidade pós preservação das ilhotas do rato. Para 24 horas de preservação, EC/EC-RV conseguiram manter a viabilidade das ilhotas comparável à das ilhotas controles e preservadas em UW/UW-RV. Ilhotas preservadas por 48 horas em UW/UW-RV e EC-RV apresentaram viabilidade semelhante à das ilhotas controles. A viabilidade de ilhotas pancreáticas após 48 horas foi melhorada pela administração de RV para os ratos doadores de ilhotas e sua inclusão em EC, embora abordagem clínica semelhante pareça improvável devido a pobre penetração celular e toxicidade sistêmica do RV. Preservação em HBSS foi muito deletéria para ilhotas de rato. EC pode vir a ser um alternativa a HBSS para isolamento e preservação a frio de ilhotas pancreáticas humanas se os resultados destes estudos puderem ser repetidos em experimentos *in vivo* em roedores e animais de experimentação de maior porte. Modelos de diabetes mellitus químico e de transplante intraportal isogênico de ilhotas pancreáticas em ratos foram implementados localmente para o prosseguimento destes estudos.

ABSTRACT

There is a need to increase islets yields and to preserve to the maximum islet viability to allow human islet transplants to be done in a 1 : 1 donor: recipient basis. We studied if inclusion of ruthenium red (RR), a transitional metal complex reported to decrease reperfusion injury, to some preservation solutions could improve rat pancreatic islet yields and/or islet viability after cold storage. RR, 5 μ mol/L, was added to Hanks' based salt solution (HBSS), University of Wisconsin (UW), and Euro-Collins (EC) solutions to generate HBSS-RR, UW-RR and EC-RR. Islet viability after 24 to 48-hr cold-storage was tested with supravital and trypan blue staining, and reduction of tetrazolium to formazan. Islet yields were not increased by inclusion of RR to HBSS used for islet isolation. Preservation in HBSS/HBSS-RR significantly decrease islet viability. For 24-hr, EC/EC-RR kept islet viability similar to control and cold-stored islets in UW/UW-RR. Similarly to UW/UW-RR, EC-RR maintained islet viability comparable to control islets even after 48-hr cold storage. Rat islet viability after 48-hr preservation was improved by administration of RR to islet donors and its addition to EC, although similar clinical approach seems improbable mainly due to poor cell penetration and systemic toxicity of RR. Preservation in HBSS was very noxious to rat islets. EC could be an alternative to HBSS for islet isolation and short-term cold storage of human pancreatic islets if the results of these studies could be repeated in *in vivo* experiments with rodents and larger experimentation animals. Models of rat chemical diabetes mellitus and intraportal transplantation of pancreatic islets were developed locally to allow prosecution of these studies.

1. INTRODUÇÃO

1.1. IMPACTO POPULACIONAL DO DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus é uma das desordens endócrinas mais freqüentes em todas as populações e todos os grupos etários (MANDRUP-POULSEN, 1998). É uma síndrome geneticamente determinada com distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, associada a deficiência relativa ou absoluta de secreção de insulina e vários graus de resistência insulínica, que em sua forma completa de expressão é caracterizada por hiperglicemia e doença vascular aterosclerótica e microangiopática (FAJANS, 1991).

Os dois principais subgrupos da síndrome são classificados quanto à necessidade de insulina ao diagnóstico em tipo 1 (insulino-dependente) e tipo 2 (não insulino-dependente). O diabetes tipo 1 representa cerca de 10% dos casos enquanto o tipo 2 é responsável pela vasta maioria dos restantes (FAJANS, 1991; UNGER & FOSTER, 1998).

Estima-se que 4% da população mundial adulta seja portadora de diabetes mellitus e a projeção é que o número de acometidos passe de 135 milhões (1995) para 300 milhões em 2025, elevando a prevalência da síndrome no globo para 5,4%. Espera-se que o aumento maior ocorra em países em desenvolvimento (HILARY, AUBERT, HERMAN, 1998).

Em 1992, o estudo brasileiro multicêntrico sobre a prevalência de diabetes mellitus avaliou em 5 milhões o número de diabéticos no país - 7,6% dos 140 milhões de brasileiros - (MALERBI&FRANCO, 1992). Atualmente, o Brasil está entre os 10 países com maior número de diabéticos e deve encontrar-se nesta posição em 2025 (HILARY et al, 1998).

A importância desta síndrome pode ser apreciada quando se observa que: retinopatia diabética é a maior responsável por deficiência visual em adultos nos Estados Unidos (EUA) (CLARK Jr&LEE, 1995); nefropatia diabética é a causa preponderante de insuficiência renal crônica nos EUA, crescendo numa taxa 2 vezes maior do que a das demais causas (US RENAL DATA SYSTEM, 1998), sendo, também, no Brasil uma das causas mais freqüentes de uremia crônica, com incidência aumentando a cada ano

(COMISSÃO REGIONAL DE NEFROLOGIA SP E CENTRO DE INFORMÁTICA DA EPM, 1994); diabetes mellitus é a principal causa de neuropatia, amputação e impotência no mundo ocidental, uma das maiores causas de infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, e uma das mais freqüentes doenças crônicas debilitantes da infância (NATHAN, 1993; SELBY et al., 1993; UNGER&FOSTER, 1998).

O impacto econômico do diabetes mellitus não é menor do que seu impacto sobre a saúde dos acometidos. Atualmente, estima-se que cerca de 2-3% do orçamento da saúde dos países seja destinado ao manejo dos pacientes diabéticos. Com o aumento da prevalência mundial da desordem, os gastos devem crescer proporcionalmente (BENGT, 1998).

Nos EUA onde a prevalência de diabetes mellitus diagnosticado é cerca de 3%, 8% do orçamento da saúde em 1997 foi destinado para pacientes com a condição, uma vez que o gasto *per capita* com o indivíduo diabético é cerca de 4 vezes maior do que com os demais indivíduos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1998).

A descoberta de que o pâncreas estava envolvido no controle da concentração de glicose sanguínea de animais e de seres humanos e a posterior identificação de uma substância produzida pelas ilhotas de Langerhans do pâncreas que reduzia a glicose no sangue fazem parte de uma verdadeira saga de cientistas em busca do entendimento do diabetes mellitus. Tais estudos permitiram a Banting e MaCleod o isolamento da insulina, seu uso clínico em 1922, e a obtenção do prêmio Nobel de medicina em 1923. A história destas descobertas está além dos objetivos desta tese e foi recentemente por nós revista (DELFINO&MOCELIN, 1997).

A introdução da insulina na prática médica transformou o diabetes tipo 1 de uma condição aguda, rapidamente fatal, em uma doença crônica progressiva pois seu uso não evita, em cerca de 40-50% dos acometidos, após 10-20 anos de duração da doença, o aparecimento de complicações crônicas debilitantes, tais como, deficiência visual, nefropatia, neuropatia e doença cardiovascular que acarretam redução de pelo menos 10 anos na expectativa de vida destes pacientes (PIRART, 1978; DECKERT, POULSEN, LARSEN, 1978).

O principal determinante do desenvolvimento destas complicações crônicas nos diabéticos tipo 1 é a hiperglicemia mantida. Os estudos de REICHARD, NILSON, ROSENQVIST (1993) e do “Diabetes Control and Complications Trial” (DCCT, 1993) comprovaram que tratamento intensivo com insulina reduz em cerca de 50% o aparecimento de complicações microvasculares do diabetes. Nos EUA, foi estimado que a implementação de tratamento intensivo com insulina melhoraria a qualidade de vida e aumentaria em 5,1 anos a sobrevida dos diabéticos tipo 1 (de 56,5 para 61,6 anos), principalmente pela redução na prevalência da nefropatia diabética (DCCT, 1996).

Tal tratamento intensivo, no entanto, requer várias monitorizações da glicemia e pelo menos 3 injeções diárias de insulina, dificultando sua aceitação pelos pacientes e resultando em um número aumentado de episódios severos de hipoglicemia. Além disto, é mais dispendioso e não fornece o controle minuto a minuto da glicemia, como verificado pelos níveis subnormais de hemoglobina glicada.

Os resultados de REICHARD et al. (1993) e do DCCT (1993), somados ao reconhecimento dado pela Associação Americana de Diabetes ao transplante de pâncreas não apenas no contexto de transplante combinado de rim e pâncreas para o crônico renal mas, também, para aqueles diabéticos com hipoglicemias ou hiperglicemias ou cetoacidoses repetidas e sérias (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2000), reacenderam o ânimo dos médicos e pesquisadores envolvidos com a reposição da função endócrina do pâncreas por transplante para diabéticos tipo 1, quer seja por meio do pâncreas total, quer seja pelo transplante de ilhotas pancreáticas isoladas.

1.2. TRANSPLANTE DE PÂNCREAS E DE ILHOTAS PANCREÁTICAS

A primeira tentativa de transplante de partes do pâncreas de uma ovelha para um menino morrendo de cetoacidose diabética foi descrita em 1894 (WILLIAMS, 1894). Em 1966, KELLY, LILLEHEI, MERKEL realizaram o primeiro transplante pancreático efetivo em humanos (1967). Desde então, as curvas de sobrevida dos enxertos e dos receptores vêm melhorando progressivamente especialmente devido às melhorias nas

técnicas cirúrgicas, nas drogas imunossupressoras, na seleção dos receptores e no desenvolvimento de uma solução especificamente desenhada para a preservação deste órgão, solução da Universidade de Wisconsin (UW).

Para comparação, entre 1966-1977, 60 transplantes de pâncreas foram realizados no mundo: apenas 2 deles funcionaram por mais do que 1 ano e cerca de 60 % dos receptores morreram no período pós-operatório (SUTHERLAND, 1984). Atualmente, com mais de 15.000 transplantes relatados ao Registro Internacional de Transplantes de Pâncreas, sobrevividas de 1 ano para enxertos pancreáticos encontram-se entre 70-82%, menor para o pâncreas transplantado isoladamente do que em combinação com o rim. Para o mesmo intervalo, a sobrevida dos receptores encontra-se ao redor de 95%, independentemente do tipo de transplante de pâncreas realizado (BRETZEL, 1997). Tais figuras são semelhantes às verificadas em transplantes de outros órgãos sólidos.

Tem sido demonstrado que o pâncreas transplantado é capaz de funcionar por 10- 20 anos (ROBERTSON, SUTHERLAND, LANZ, 1999), de normalizar o metabolismo dos lípides, preservar a contra-regulação do glucagon e melhorar a qualidade de vida dos receptores, porém, sem efeito aparente na patologia retiniana e nas complicações macrovasculares do diabetes (ALLEN, 1997; HRICIK, 1998; STRATA 1998; ROBERTSON et al, 1999; NANKIVELL et al., 2000). Sugere-se que a falta de melhora na retinopatia seja devido a elevada prevalência de retinopatia proliferativa avançada quando do transplante destes pacientes (WANG et al.,1994), o que é reforçado por estudos de microscopia intravital com utilização de computador que revelam melhora significativa da microangiopatia da conjuntiva bulbar pelo transplante combinado de pâncreas e rim mas não no isolado de rim (CHEUNG, PEREZ, CHEN, 1999).

O transplante de pâncreas influencia positivamente o curso da neuropatia (TYDÉN et al., 1999; CASHION et al., 1999) e nefropatia (FIORETTO et al., 1998). Longo tempo de normoglicemia parece ser importante para a evidência de melhora da neuro e da nefropatia após o transplante pancreático (FIORETTO et al., 1993; NAVARRO et al., 1997; FIORETTO et al, 1998; STEGALL et al., 2000).

Há evidências recentes de que este tipo de transplante aumente também a sobrevida do diabético urêmico que o recebeu em oposição ao que foi transplantado apenas com o rim (TYDÉN et al, 1999; SMETS et al., 1999; BECKER et al., 2000).

Deve-se ressaltar o fato de que mesmo frente aos resultados apresentados o transplante de pâncreas é uma cirurgia de grande porte, não isenta de complicações potencialmente sérias (HRICIK, 1998; GETTMAN et al, 1998; BECKER, COLLINS, SOLLINGER, 1998; ROBERTSON et al, 2000), as quais são mais freqüentes em centros nos quais o procedimento encontra-se em fase de implementação.

Neste sentido, o transplante de ilhotas pancreáticas passa a ser uma alternativa atrativa, por ser um procedimento menor, sem os riscos das complicações potencialmente sérias verificadas com o transplante de pâncreas total e, pela possibilidade de imunoisolamento das ilhotas, abre perspectiva para xenotransplantes (LANZA&CHICK, 1997).

A promessa de reposição da função endócrina do pâncreas pelo transplante de ilhotas pancreáticas começou a se desenhar quando HELLERSTRÖM (1964), utilizando microdissecção manual sob visão estereomicroscópica demonstrou ser possível separar ilhotas de Langerhans, intactas, do restante do estroma pancreático.

No ano seguinte, MOSKALEWSKI (1965) utilizou collagenase pela primeira vez para obter o isolamento das ilhotas pancreáticas. BALLINGER&LACY (1972) comprovaram ser possível a reversão do estado diabético de roedores pelo transplante intraportal isogênico de ilhotas pancreáticas purificadas. A espera para a demonstração da funcionalidade deste transplante perdurou por quase 20 anos quando WARNOCK et al. (1991), utilizando ilhotas isoladas a partir de 5 pâncreas demonstraram que os resultados alcançados por Ballinger e Lacy em roedores podiam também ser obtidos em humanos.

Os resultados mundiais dos alotransplantes intraportais de ilhotas pancreáticas humanas, até muito recentemente, eram desapontadores se comparados aos obtidos com o transplante de pâncreas total: insulino-independência por mais que uma semana e mais que um ano em respectivamente 12 e 8% dos receptores (GRUESSNER, SUTHERLAND, GRUESSNER, 1998).

O interesse no transplante de ilhotas pancreáticas para a cura do diabetes tipo 1 foi renovado com a publicação recente dos estudos de SHAPIRO et al. (2000) que conseguiram obter insulino-independência em 7 pacientes diabéticos tipo 1, não urêmicos, pelo alotransplante de ilhotas pancreáticas. A imunossupressão foi baseada em indução com anticorpo monoclonal anti-CD25, sirolimus e baixa dose de tacrolimus, não se utilizando corticosteróides ou ciclosporina. Não houve, também, cultura das ilhotas previamente ao transplante e cada paciente recebeu ilhotas de 2 a 4 doadores em 2 ou 3 transplantes sucessivos.

Anteriormente a estes estudos, estimava-se que do total de cerca de 1 milhão de ilhotas pancreáticas contidas em um pâncreas humano (BISHOP&POLAK, 1991), o transplante de cerca de 300.000 equivalentes de ilhotas -número obtido por transformação matemática que faz com que todas as ilhotas obtidas sejam consideradas como tendo diâmetro médio de 150 μ m- fosse suficiente para abolir a necessidade de insulina do paciente diabético (PZYDROWSKI et al., 1992). Tal estimativa era feita a partir de auto-transplantes de ilhotas pancreáticas para pacientes que tiveram seus pâncreas removidos para alívio da dor da pancreatite crônica.

No entanto, nos estudos de SHAPIRO et al. (2000), para atingirem insulino-independência os receptores receberam, em média, mais que o dobro do volume previamente estimado como suficiente para reverter o estado diabético pós-pancreatectomia, em concordância com as observações anteriores do volume de ilhotas transplantadas nos casos de insulino-independência pelo alotransplante de ilhotas pancreáticas para diabéticos tipo 1 (SUTHERLAND et al., 1996; INTERNATIONAL ISLET TRANSPLANT REGISTRY, 2000).

Vários fatores parecem estar envolvidos na necessidade de uma massa maior de ilhotas pancreáticas para a reversão do diabetes mellitus tipo 1 por transplante, incluindo-se: alo e auto-imunidade, toxicidade direta para células β dos corticosteróides, ciclosporina e tacrolimus - torna-se ainda mais importante uma vez que estas drogas são várias vezes concentradas no fígado, local de implante das ilhotas transplantadas - , presença de isquemia fria após o isolamento das ilhotas e seu transplante (ROEP et al, 1999; ROBERTSON, 2000; WHITE et al., 2000; ROBERTSON et al, 2000).

O transplante de ilhotas pancreáticas não regulariza a contraregulação da insulina pelo glucagon (KENDALL et al, 1997) e sua função a longo prazo não é bem conhecida, embora revisões sobre o tema relatem que sobrevidas de auto e alotransplantes por 10-13 anos encontram-se documentadas (SUTHERLAND et al, 1996; INTERNATIONAL ISLET TRANSPLANT REGISTRY, 2000; ROBERTSON, 2000; ROBERTSON et al, 2000).

Para que se evite desperdício de pâncreas, um desafio a ser vencido é o de se conseguir aumentar o número de ilhotas obtidas a partir de cada pâncreas e manter ao máximo a viabilidade das ilhotas isoladas, objetivando-se uma maior massa de células β , capaz de promover reversão do diabetes na base de 1 doador: 1 receptor.

No transplante clínico de ilhotas pancreáticas existe um intervalo natural de tempo no qual as ilhotas isoladas devem ser preservadas, com a maior viabilidade possível, de forma que se possa proceder a seleção imunológica e o preparo adequado do receptor. Dentre as técnicas disponíveis, a preservação a frio é o método mais simples, menos dispendioso e com menor risco de contaminação (JINDAL&GRAY, 1994).

1.3. PRESERVAÇÃO A FRIO DE PÂNCREAS E ILHOTAS PANCREÁTICAS

Os princípios gerais que dirigem a preservação a frio de órgãos foram alvo de revisões (BELZER&SOUTHARD, 1988; WEIGHT, BELL, NICHOLSON, 1996). As particularidades da preservação do pâncreas, como por exemplo, a importante suscetibilidade ao edema celular (especialmente do componente exócrino), fluxo sanguíneo mais lento comparativamente ao rim (lesão endotelial se perfundido com pressão semelhante à utilizada para rins), maior predisposição para acidose intracelular devido a maior permeabilidade para glicose e pelo fato da glucoquinase tissular (hexoquinase IV), não ser inibida pela glicose 6 fosfato (G-6-P), foram salientadas por FLORACK (1988) e BELZER&SOUTHARD (1988), formando a base para o desenvolvimento de uma solução especificamente desenhada para a preservação a frio do pâncreas (WAHLBERG, SOUTHARD, BELZER, 1986; WAHLBERG et al., 1987), a solução da Universidade de Wisconsin, (UW, Viaspan®).

BELZER&SOUTHARD (1988), relatam que a hipotermia ocasiona diminuição no ritmo em que as enzimas celulares degradam os componentes essenciais para a viabilidade dos tecidos, sendo que a maioria das enzimas de animais homeotérmicos têm sua atividade 1,5-2 vezes diminuída para cada 10 ° C de decréscimo da temperatura abaixo da temperatura corporal.

CALNE et al. (1963), utilizando os conceitos de hipotermia, demonstraram que a simples manutenção em gelo de rins de cães contendo sangue autólogo heparinizado poderia resultar em preservação funcional, demonstrada por autotransplante, para cerca de 12 horas.

A atividade da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ é fundamental para a manutenção do volume celular. Frente a hipotermia ocorre inibição de sua atividade e por gradientes eletroquímicos e de concentrações, íons sódio e água entram na célula, enquanto outros íons, especialmente potássio e magnésio, saem. Devido à excesso de ânions não difusíveis no intracelular, o balanço acarreta edema e rotura da célula e de suas organelas (MaCKNIGHT&LEAF, 1977).

COLLINS, BRAVO-SHUGARMAN, TERASAKI (1969), demonstraram que preservação em gelo com uma solução de conteúdo de potássio e magnésio semelhante ao intracelular possibilitava sobrevida funcional de rins de doadores cadáveres por 30 horas. Posteriormente, foi observado que o magnésio, o qual, por vezes, precipitava-se na forma de fosfato de magnésio, poderia ser omitido da solução de Collins sem que ocorresse deterioração para os órgãos nela preservados (solução de Euro-Collins), muito embora COLLINS et al. (1984) insistam que a presença do magnésio seja importante para a preservação renal, especialmente por períodos maiores do que 24 horas.

Necrose e apoptose contribuem para o dano celular que ocorre na isquemia-reperfusão (SAIKUMAR et al.,1998). Tal dano é decorrente de múltiplos mecanismos complexos e interconectados, incluindo-se: ativação de fosfolipase A_2 , proteases, e enzimas lisossomais, com subsequente autodigestão de membranas e componentes celulares; acúmulo local de polimorfonucleares com produção de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO, termo sugerido para a literatura nacional por

FERREIRA&MATSUBARA, 1997); produção intracitoplasmática de ERM por diferentes vias metabólicas, incluindo-se a da conversão de xantina-desidrogenase para xantina-oxidase (produção intramitocondrial de ERM também ocorre) e formação de megacanal mitocondrial, com subsequente inibição da fosforilação oxidativa e aceleração da hidrólise de ATP. Há evidências de que o aumento de cálcio citosólico e mitocondrial visto no período de isquemia-reperfusão possa estar envolvido nestes mecanismos citados de morte celular (COTTERILL et al., 1989; TAKEYAMA, MATSUO, TANAKA, 1993; WEIGHT et al., 1996; KRISTIÁN&SIESJÖ, 1998).

BELZER&SOUTHARD (1988), sugerem que as soluções de preservação a frio devam conter elementos que minimizem o edema celular causado pela hipotermia, previnam a acidose celular, evitem a injúria dos tecidos por ERM e forneçam substratos energéticos para a regeneração de adenosina trifosfato (ATP) durante a reperfusão.

Para a preservação clínica a frio do pâncreas, várias soluções como, por exemplo, citrato hipertônico e Euro-Collins, têm sido utilizadas, sendo a solução da Universidade de Wisconsin a associada com os melhores resultados (KALAYOGLU et al., 1988; D'ALESSANDRO et al., 1989)

Quanto ao isolamento de ilhotas de pâncreas submetidos a preservação hipotérmica, ilhotas viáveis podem ser obtidas de pâncreas de ratos, cães e humanos, após períodos de até 24 horas de hipotermia em solução de UW (MUNN et al., 1989; ZUCKER et al., 1989; KNETMAN et al., 1990), e a mesma solução e algumas soluções derivadas são as mais apropriadas para a preservação das ilhotas isoladas no período que antecede o transplante (DELFINO et al., 1993; JINDAL&GRAY, 1994).

Com referência à HBSS, solução freqüentemente utilizada para isolamento e preservação a frio por curto prazo de ilhotas pancreáticas de animais de experimentação e seres humanos, a mesma vem sendo mostrada como deletéria para a preservação das ilhotas mesmo para períodos muito curtos de preservação (KENMOCHI et al., 1998; SUGIYAMA et al., 1999).

Com a metodologia atualmente utilizada, a obtenção das ilhotas pancreáticas representa processo traumático para as mesmas, que são submetidas, entre outros fatores, à ação de enzima proteolítica, collagenase ou liberase - collagenase altamente purificada - (LINETSKY et al., 1997), bruscas alterações de temperatura, múltiplas centrifugações em diferentes fluidos, de diversas propriedades físico-químicas. O isolamento de ilhotas pancreáticas constitui-se num período ultracurto de isquemia fria e um período, ainda que curto, de preservação a frio é esperado para a maioria dos transplantes a serem realizados.

Existe espaço para desenvolvimento de novas soluções de preservação ou inclusão de aditivos para as já existentes, visando-se reduzir ainda mais estas injúrias, na tentativa de se obter aumento da massa viável de células β a partir de um único doador e tornar o alotransplante de ilhotas pancreáticas ainda mais competitivo frente ao transplante do pâncreas total.

1.4. EFEITOS BIOLÓGICOS DO RUTÊNIO VERMELHO

Rutênio vermelho (RV), $[(\text{NH}_3)_5\text{-Ru-O-Ru}(\text{NH}_3)_4\text{-O-Ru}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_6$, forma oxiclorada do metal de transição rutênio, tem sido utilizado como um marcador para microscopia eletrônica devido a sua capacidade de formar complexos eletro-densos com o tetróxido de ósmio (LUFT, 1971a; LUFT, 1971b). O corante é capaz de inibir a entrada de cálcio no citoplasma (HOWELL, MONTAGUE, TYHURST, 1975; MALÉCOT, BITO, ARGIBAY, 1998) e mitocôndria de muitos tipos celulares (REED&BYGRAVE, 1974; CARAFOLI, 1994). Em modelos experimentais, o RV tem sido capaz de diminuir o dano reperfusional em corações (FIGUEREDO et al., 1991; BENZI&LERCH, 1992; MIYAME et al., 1996) e em mitocôndrias hepáticas isoladas (TAKEYAMA et al., 1993; LEMASTERS et al., 1997).

RV foi mostrado como altamente efetivo contra o dano do estresse oxidativo em hepatócitos (GROSKREUTZ, BRONK, GORES, 1992), miócitos (PARAIDATHATHU, DE GROOT, KEHRER, 1992), esplenócitos (ZAMZAMI et al., 1995), e capaz de diminuir a toxicidade celular em muitos modelos onde o ciclo

mitocondrial de cálcio é julgado importante, como na toxicidade neuronal por glutamato (DESSI, BEM-ARI, CHARRIAUT-MARLANGUE, 1995), toxicidade retiniana experimental por chumbo (MEDRANO&FOX, 1994), injúria celular renal induzida por cisplatina e por conjugados de cisteína (CHEN, JONES, STEVENS, 1994; KIM, JUNG, KIM, 1997), cardiotoxicidade da doxorubicina (CHACON&ACOSTA, 1991). Rutênio vermelho é também capaz de diminuir *in vitro* e *in vivo* a função de células T de maneira semelhante à rapamicina (DWYER, GORDON, JONES, 1995).

Rutênio vermelho é biologicamente ativo em células β onde inibe canais de cálcio voltagem-dependentes no sarcolema, diminui a entrada mitocondrial de cálcio e a secreção de insulina (HOWELL et al., 1975; HERCHUELZ, COUTURIER, MALAISSE, 1980). Tais ações combinadas justificam a tentativa de utilização do RV como aditivo para soluções de preservação celular a frio.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- 1) Avaliar se a adição de RV à solução balanceada de sais de Hanks (HBBS) poderia aumentar o número de ilhotas isoladas por pâncreas e/ou preservar melhor a viabilidade de ilhotas pancreáticas recém-isoladas do rato.
- 2) Estudar se a inclusão de RV em HBSS, solução da Universidade de Wisconsin (UW) e solução de Euro-Collins (EC) poderia melhorar a viabilidade de ilhotas pancreáticas murinas após 24 e 48 horas de preservação a frio.
- 3) Estabelecer os modelos do rato diabético e do transplante intraportal isogênico de ilhotas pancreáticas para permitir realização de estudos *in vivo* de preservação a frio de ilhotas pancreáticas do rato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS PROPRIAMENTE DITOS

O trabalho experimental foi realizado no Biotério do Hospital Universitário e no Laboratório de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina, Paraná. Sempre que foi necessário o concurso de um colaborador em um dado experimento, o mesmo foi Maria Emília Favero.

3.1.1. Animais.

Ratos Wistar machos entre 12-16 semanas de vida, obtidos junto ao biotério central da Universidade Estadual de Londrina. Ratos Lewis (LEW) isogênicos (12-22 semanas) e Wistar-Furth (WF) isogênicos (12-31 semanas) foram fornecidos pelo Biotério do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. Todos os animais receberam alimentação apropriada para ratos (Nuvilab CR 1 ®) e água *ad libitum*.

3.1.2. Soluções de preservação.

UW foi obtida junto à Du Pont Pharmaceutical (Willmington, DE). HBSS foi comprada de Sigma Chemical Co., St, Louis, MO, e EC foi adquirida de Fresenius Laboratories, Campinas, Brasil. 20 mmol/L de 1 M tampão HEPES foram adicionados à HBSS antes do uso. 3 mmol/L de glutathiona reduzida (GSH, Sigma) foram acrescentados à UW imediatamente antes de seu uso. 5 µmol/L de RV (Sigma, 40% puro), foram adicionados à HBSS, UW e EC dando origem às soluções HBSS-RV, UW-RV e EC-RV. Aditivos para UW (insulina 10 U/L, trimetoprim/sulfametoxazol 0,5 mL/L e dexametasona 8 mg/L) não foram utilizados neste estudo. A composição de HBSS, UW e EC é apresentada no anexo 1.

3.1.3. Esterilização.

Os estudos foram realizados com o menor grau de contaminação possível. Os instrumentos cirúrgicos e as vidrarias, após terem sido lavados, foram passados em solução de HCl a 10% e completamente enxaguados com água destilada para remover quaisquer resíduos, sendo, então, esterilizados por autoclave. Qualquer material plástico foi adquirido pré-esterilizado. As soluções foram esterilizadas por filtração através de filtros Millipore® de poros de 0,2 µm ou 0,45 µm de diâmetro, na dependência da solução a ser esterilizada.

3.1.4. Preparo da collagenase.

Solução de collagenase foi preparada pela adição de collagenase tipo XI, Sigma, obtida de cultura de *Clostridium histolyticum*, à HBSS. A concentração de collagenase utilizada foi de 1 mg/mL. Um misturador magnético foi utilizado para assegurar a completa dissolução da collagenase. As soluções foram filtradas através de filtros Nalgene® de poro 0,45 µm e transferidas, dentro de uma câmara de fluxo laminar, para tubos plásticos cônicos estéreis de centrifugação de 50 mL, previamente identificados. As soluções assim preparadas foram mantidas a -70 °C, até seu uso.

3.1.5. Gradientes de Euro-Ficol.

Ficol 400, Sigma, foi dissolvido lentamente, com auxílio de um misturador magnético e a temperatura ambiente em Euro-Collins. Peso/Volume, foram preparados gradientes com as seguintes proporções: 25%, 23%, 21% e 11%. Após o preparo, os gradientes, em câmara de fluxo laminar, foram filtrados através de filtros Millipore® de poro 0,45 µm para tubos estéreis, de 50 mL, e armazenados em geladeira.

3.1.6. Solução de ditizona.

6,8 mg de ditizona, Sigma, foram dissolvidos em 4 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e depois adicionados à 16 mL de HBSS. Água destilada foi adicionada até completar o volume de 100 mL e a solução filtrada em papel filtro. A ditizona tem alta afinidade por zinco, material abundante nos grânulos das ilhotas pancreáticas e escasso no tecido exócrino pancreático. Esta solução cora as ilhotas fortemente em vermelho e não cora o tecido exócrino (LATIF, NOEL, ALEJANDRO, 1988).

3.1.7. Solução tampão para estreptozocina (STZ).

A solução de tampão acetato-ácido acético para estreptozocina (Sigma) foi preparada como se segue: 82 mg de acetato de sódio foram adicionados à 900 mg de cloreto de sódio. A mistura foi a seguir dissolvida em 50 mL de água destilada. O pH da solução foi reduzido à 5 pela adição de ácido acético glacial e água destilada foi adicionada até completar 100 mL. A solução foi, então, filtrada em filtros Nalgene® de 0,2 µm.

3.1.8. Produção de diabetes experimental.

Para indução de diabetes experimental, estreptozocina (STZ), Sigma, foi dissolvida na solução tampão acima descrita (20 mg/mL), mantida a 4 °C, e utilizada imediatamente após o preparo. Cada rato era pesado, anestesiado com éter etílico, e recebia injeção de 40, 50 ou 60 mg de estreptozocina em uma das veias sublinguais, na dependência do estudo. STZ foi também administrada endovenosamente (EV) em uma das veias da cauda e intraperitonealmente (i.p.) para ratos Wistar-Furth. O estado diabético foi documentado por perda de peso e por 2 glicemias acima de 400 mg/dL (22,1 mmol/L), 14 dias ou mais após a injeção.

3.1.9. Coleta de amostras de sangue.

Amostras de sangue foram obtidas pela amputação de um fragmento muito fino das pontas das caudas dos animais. Sob anestesia inalatória com éter etílico, cerca de 0,2 mL de sangue eram coletados em microfrascos Ependorff de centrifugação de 0,4 mL, com tampa. O soro era separado, por centrifugação, numa microcentrífuga Beckman.

3.1.10. Determinação da glicemia do rato.

As glicemias foram determinadas em um glicosímetro Beckman II. Este glicosímetro mede a queda na tensão de oxigênio que ocorre quando uma amostra de 10 µl de soro é introduzida em seu receptáculo contendo glicose oxidase. A glicose oxidase desdobra glicose à ácido glicurônico e peróxido de hidrogênio. O instrumento era previamente calibrado contra uma solução padrão de 150 mg/dL de glicose, Beckman e o padrão checado após cada 10 determinações. Para manter a linearidade das leituras, as amostras dos animais diabéticos foram previamente diluídas ao meio com água destilada.

3.1.11. Isolamento das ilhotas pancreáticas do rato.

Ilhotas pancreáticas foram isoladas por injeção ductal de collagenase como descrito por SUTTON et al., (1986). Após indução anestésica com éter etílico, os animais foram submetidos à tricotomia abdominal. Enquanto mantidos em anestesia inalatória com éter, por meio de uma laparotomia mediana, o ducto biliar comum foi canulado no ponto da entrada do ducto no duodeno e fixado no local com fio de seda 4-0. O ducto biliar comum era ligado ao nível do hilo hepático para evitar refluxo de collagenase para este órgão. O animal era exangüinado, após o que 5 mL de collagenase a 4°C eram injetados intraductalmente de modo a obter distensão homogênea do órgão. O pâncreas era removido, transferido para um tubo plástico de 50 mL, e transportado em gelo até o laboratório de isolamento de ilhotas pancreáticas.

No laboratório, o pâncreas era transferido para outro frasco semelhante, contendo 5 mL de HBSS previamente aquecida a 38 °C. Após isto, era incubado na mesma temperatura por 20 minutos, quando o frasco era removido e agitado levemente por 30 segundos. Neste ponto, 10 mL de HBSS gelada contendo 4 g/L de Albumina Sérica Bovina fração V, (BSA, Sigma), eram adicionados ao tubo contendo o pâncreas para promover cessação da digestão enzimática da colagenase. HBSS gelada foi utilizada em todas as etapas de lavagem posteriores. O pâncreas digerido era filtrado através de uma peneira de náilon -poro de 0,75 mm-.

Após o filtrado ter sido centrifugado e lavado por 2 vezes, o sobrenadante era cuidadosamente removido e o precipitado suspenso em 5 mL de Euro-Ficol 25% por pâncreas. Consecutivamente, este material era recoberto por camadas de 2 mL/pâncreas de Euro-Ficol 23%, 21% e 11%. Uma última camada de HBSS era então adicionada. O tubo era centrifugado, 800 x g, numa centrifuga refrigerada a 4 °C, por 10 minutos. As ilhotas foram obtidas da interface Euro-Ficol 21%/11%, centrifugadas e lavadas por 2 vezes. O total de ilhotas foi avaliado por técnica de amostragem e a pureza confirmada após coloração com ditizona. Anexos 2 e 3 apresentam figuras representativa de ilhotas pancreáticas do rato separadas do tecido exócrino em gradientes descontínuos de ficol. No anexo 4 podem ser vistas ilhotas pancreáticas do rato recém-isoladas coradas pela ditizona.

3.1.12. Transplante intraportal de ilhotas pancreáticas no rato.

Receptores com diabetes químico induzido por estreptozocina, com glicemia persistentemente acima de 400 mg/dL, eram submetidos à anestesia geral com cloridrato de cetamina (70 mg/kg), i.p., e após tricotomia abdominal, laparotomia mediana era realizada de forma a expor a veia porta.

Para cada transplante, na dependência do experimento, de 2000 a 3000 ilhotas isoladas a partir de 2-4 doadores eram lavadas e suspensas em 0,5 mL de HBSS, transferidas para uma seringa plástica de 1 mL e injetadas na veia porta dos receptores, como descrito por KEMP et al. (1973).

Após a injeção das ilhotas, mantendo-se a agulha em posição, a seringa era lavada por 2 vezes com sangue do receptor, para evitar que ilhotas permanecessem na seringa. Um pequeno pedaço de espuma estéril era colocado no local da injeção sob leve pressão para se evitar sangramento. Após a hemostasia, a parede era fechada com fio categute cromado 4-0.

Sucesso do transplante foi definido como normalização da glicemia na 1ª semana pós-transplante, associada a ganho de peso, e mantida pelo período de observação.

3.1.13. Avaliação da viabilidade das ilhotas do rato por coloração supravital. Teste FDA/EB.

A avaliação da viabilidade *in vitro* das ilhotas foi feita com combinação de coloração por diacetato de fluoresceína (FDA; solução estoque: 5 mg/mL em acetona) e brometo de etídio (EB; solução estoque: 200 µg/mL em HBSS), (GRAY&MORRIS, 1987).

Para a coloração FDA/EB, tubos Eppendorf de 1mL contendo cada um cerca de 100 ilhotas foram centrifugados 50 vezes a gravidade por 10 segundos, os sobrenadantes descartados e repostos com 400 µL de HBSS com 4 g/L de BSA. 400 µL de uma mistura homogênea constituída de 10 µL de FDA para cada 1mL de EB, preparada imediatamente antes de seu uso, foram então adicionados aos tubos contendo as ilhotas. Os mesmos foram fechados e mantidos 4 °C por 2 minutos, após o que as ilhotas foram resuspensas em HBSS contendo 4 g/L de BSA, centrifugadas como já descrito anteriormente, e os sobrenadantes descartados. As lavaduras foram repetidas para remover qualquer fluorescência de fundo e as ilhotas imediatamente examinadas sob microscopia de imunofluorescência (Nikon) na objetiva de 10 vezes.

Por meio de um sistema de escores previamente relatado e validado (VASIR, GRAY, MORRIS, 1989), as primeiras 20 ilhotas observadas na lâmina, correndo-se a lâmina da esquerda para a direita, foram analisadas por um colaborador como se compostas de 3 camadas concêntricas onde células viáveis aparecem como verdes e células mortas como vermelhas. Cada camada da ilhota recebeu um valor de 0-5, na dependência do

padrão de fluorescência que se observou pela movimentação do foco do microscópio para baixo e para cima, permitindo a análise completa de cada ilhota. Uma ilhota completamente viável recebeu um escore de 15 enquanto que uma completamente não viável foi registrada como 0. Figuras ilustrativas de uma ilhota com viabilidade perfeita e de uma com viabilidade comprometida são apresentadas nos anexos 5 e 6, respectivamente

3.1.14. Avaliação da viabilidade das ilhotas do rato pelo teste MTT.

MTT, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), Sigma, é um substrato amarelo que quando incubado com célula vivas tem seu anel tetrazolínico quebrado por uma sequência de desidrogenases mitocondriais (SLATER, SAWYER, STRÄULI, 1963), transformando-se em um produto azul escuro (formazan). A produção de formazan constitui-se em um índice do estado funcional da cadeia respiratória e MOSMANN (1983) propôs o uso da capacidade de redução do MTT como um teste de viabilidade para linfócitos (teste MTT).

O teste MTT tem sido utilizado e validado como um meio de avaliação da viabilidade de uma gama de células, inclusive de células β pancreáticas de ratos e humanos (KHUN et al., 1989; JANJIC&WOLLHEIM, 1992; BURKART et al., 1992). Para células β , os resultados do teste MTT foram demonstrados correlacionar-se estreitamente com o metabolismo celular avaliado por estudos de secreção de insulina e de utilização de glicose (JANJIC&WOLLHEIM, 1992). Modificações visando melhorar a sensibilidade e a confiabilidade no teste proposto por Mosmann foram utilizadas em nossos estudos (DENIZOT&LANG, 1986; SLADOWSKI et al., 1993).

Para a realização do teste MTT em nossos experimentos, decidimos utilizar incubações em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) a 37 °C, sem vermelho fenol, contendo baixa (50 mg/dL = 2,8 mmol/L) ou alta concentração (300 mg/dL = 16,7 mmol/L) de glicose com o intuito de estimular a síntese de insulina e aumentar a formação de formazan e adicionar 10 % soro fetal bovino inativado pelo calor (SFBI) ao meio. RPMI 1640 foi preparado a partir de solução de sais e aminoácidos

(Sigma) para que se pudesse variar, no laboratório, a concentração de glicose no meio. Decidimos, também, não selecionar apenas um dado número de ilhotas de um determinado diâmetro para o estudo e sim utilizar técnica de amostragem por sentirmos que tal abordagem poderia nos dar uma idéia geral de viabilidade das ilhotas isoladas e não apenas expressar a viabilidade de um subgrupo de ilhotas de forma preservada e diâmetro pré-estabelecido.

MTT 5% foi preparado em RPMI 1640 contendo concentração baixa de glicose. A solução foi filtrada (filtro de 0,2 μ m de diâmetro), mantida no escuro a 4 °C e utilizada dentro de uma semana, pois foi demonstrada ser estável nestas condições por este período de tempo (LUFT, 1971a; REED&BYGRAVE, 1974). Para avaliação da viabilidade de ilhotas pancreáticas murinas recém-isoladas, duplicatas de aproximadamente 50 ilhotas foram acondicionadas em tubos Eppendorf de 1 mL contendo 200 μ L de RPMI 1640/10% SFBI e incubadas a 37 °C por 30 minutos (pré-incubação).

Após a pré-incubação, os sobrenadantes foram removidos e as ilhotas incubadas a 37 °C por 2 horas. Uma duplicata foi incubada em RPMI 1640/10% SFBI contendo baixa concentração de glicose e a outra no mesmo meio desta vez contendo alta concentração de glicose. Ao final deste estágio, os meios de incubação foram renovados, 20 μ L de MTT 5% adicionados a cada tubo, e as ilhotas submetidas a um período de incubação adicional de 2 horas. Ao término do segundo período de incubação, os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados para evitar a remoção de cristais de formazan produzidos e 200 μ L de DMSO foram adicionados a cada tubo. Os tubos foram incubados a 37 °C por 15 minutos para garantir completa dissolução dos cristais. As densidades óticas dos sobrenadantes foram lidas em um leitor de ELISA (Murex) sob o comprimento de onda de 492 nm (com filtro de referência de 630 nm).

Para o teste MTT de ilhotas preservadas a frio por 24 horas, 2 duplicatas de aproximadamente 50 ilhotas foram utilizadas para cada solução de preservação em estudo (uma duplicata para o teste em RPMI 1640/10% SFBI com concentração de glicose baixa e outra para o mesmo meio com concentração alta de glicose). Deve ser ressaltado que no teste MTT realizado na 2ª parte do trabalho experimental, as amostras de ilhotas recém-

isoladas e as preservadas por 24 horas foram mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos antes dos sobrenadantes serem removidos e RPMI 1640/10% SFBI na temperatura ambiente ser adicionado aos tubos para o início das incubações (na 1ª parte do trabalho experimental, imediatamente após o isolamento, os sobrenadantes foram removidos e repostos com RPMI 1640 10% SFBI a 4 °C antes do início dos testes)

3.1.15. Avaliação da viabilidade das ilhotas pelo teste de exclusão de azul tripano.

Nos últimos 5 experimentos consecutivos da 2ª parte do trabalho experimental, a viabilidade de ilhotas preservadas por 24 horas em soluções contendo RV foi avaliada adicionalmente pela coloração por azul tripano.

Para isto, triplicatas de 100 ilhotas de ratos que receberam RV i.p. foram transferidas para tubos Eppendorf de 1 mL, previamente codificados, contendo 800 µL de HBSS-RV, UW-RV ou EC-RV. Depois de 24 horas de preservação, as ilhotas de cada tubo foram removidas juntamente com 100 µL de solução e colocadas em placas de Petri. Um colaborador, desconhecedor do sistema de codificação, avaliou a percentagem de cor vermelha nas ilhotas sob um estereomicroscópio Lambda. Depois de cada avaliação, as ilhotas foram coradas com 10 µL de 0,1% azul tripano em RPMI 1640 com baixa glicose e agitadas levemente para permitir a distribuição homogênea do corante. As placas de Petri foram então cobertas e deixadas a 4 °C por 60 minutos quando foram então embaralhadas antes que o mesmo colaborador avaliasse a percentagem de coloração azul das ilhotas.

Nos dois últimos experimentos desta série, 3 alíquotas de cerca de 50 ilhotas recém-isoladas foram transferidas para salina isotônica, aquecidas até 90 °C por 15 minutos e coradas com 5 µmol/L de RV. Outras 3 alíquotas semelhantes não foram submetidas ao calor mas foram coradas com a mesma concentração de RV. Todas as alíquotas coradas foram examinadas por um colaborador quanto a percentagem de coloração avermelhada das ilhotas

3.1.16. LDH e ilhotas pancreáticas do rato.

As determinações da atividade de LDH foram realizadas num equipamento automatizado Cobas Mira, pelo método UV otimizado, utilizando-se kit da Biodiagnóstica®. Concentração de proteína tissular foi determinada pelo método de LOWRY et al. (1951).

3.2. TRABALHO EXPERIMENTAL

3.2.1. Desenho Experimental.

O trabalho experimental foi dividido em 4 partes:

1ª Parte: Avaliação da viabilidade de ilhotas pancreáticas de ratos LEW recém-isoladas e preservadas por 24 horas em HBBS e UW com e sem RV.

Avaliação da viabilidade das ilhotas: teste MTT, teste FDA/EB, determinação de LDH. Número de experimentos (n) = 10 para teste MTT e FDA. Determinação de LDH, n = 4

2ª Parte: Avaliação da viabilidade de ilhotas pancreáticas de ratos LEW recém-isoladas com e sem administração de RV pré-pancreatectomia, e preservadas por 24 e 48 horas em HBSS, UW e EC contendo ou não RV.

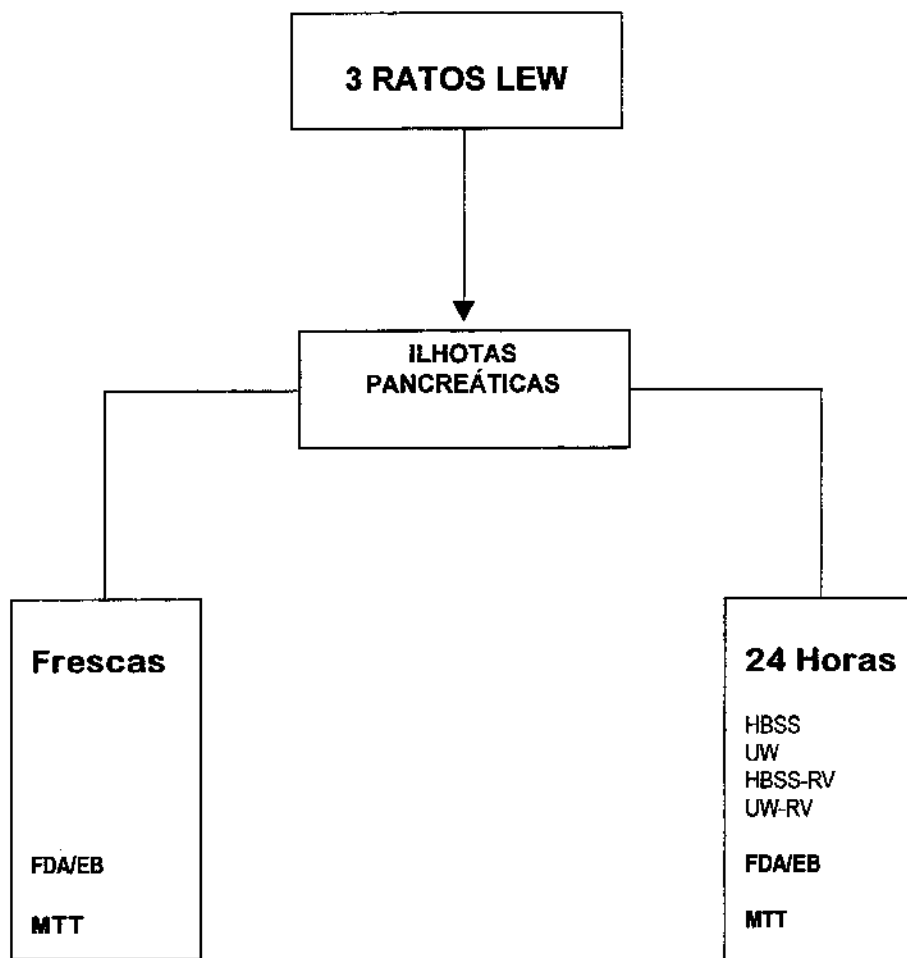
Avaliação da viabilidade das ilhotas: teste MTT e teste FDA/EB (n = 10); teste de exclusão do azul tripano (n = 5).

3ª Parte: Diabetes mellitus pela estreptozocina em ratos Wistar, Wistar-Furth isogênicos, Lewis isogênicos.

4ª Parte: Transplantes de ilhotas pancreáticas em ratos Lewis isogênicos.

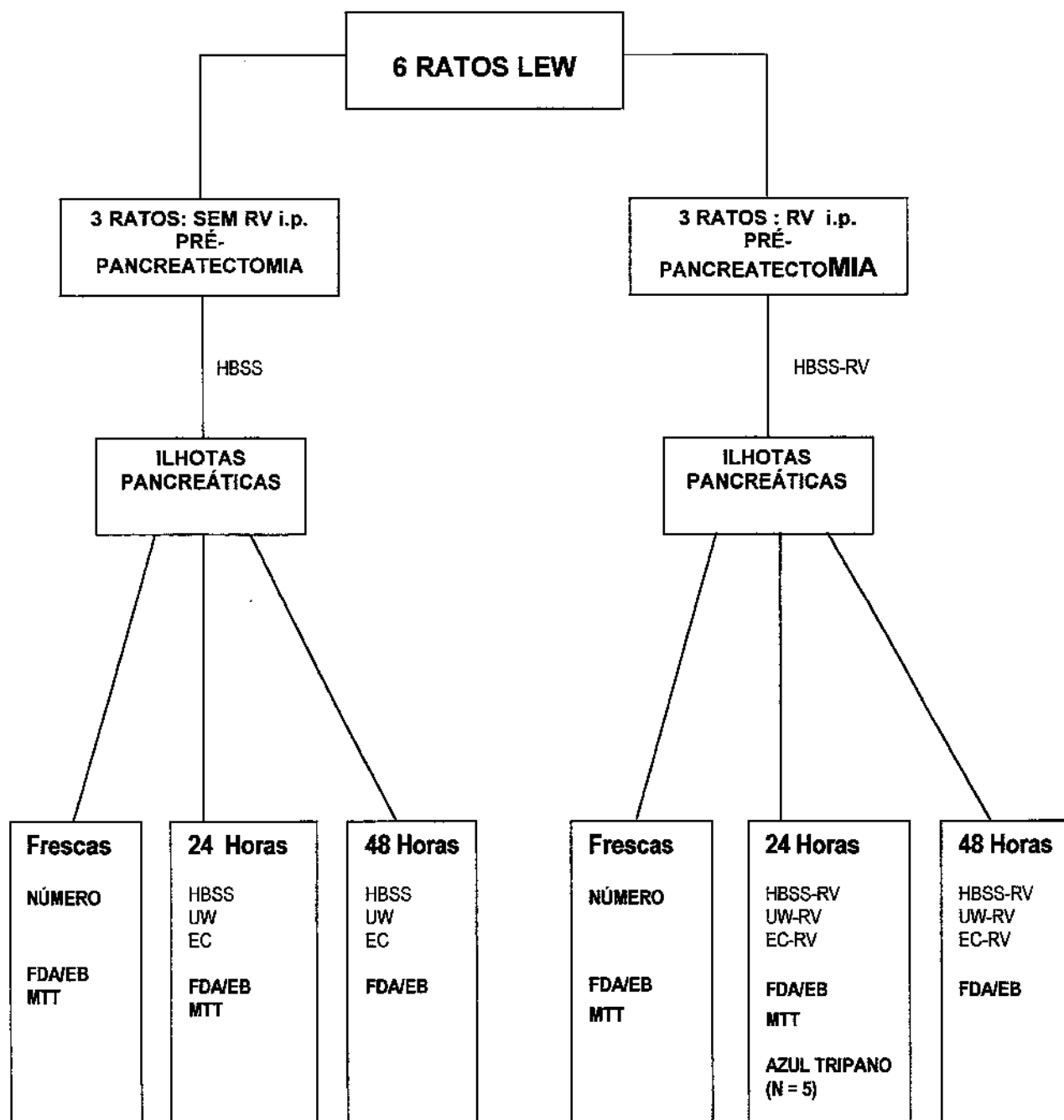
Por conterem experimentos com número maior de etapas, para facilidade de entendimento são apresentadas a seguir as representações esquemáticas da 1ª e da 2ª parte do trabalho experimental.

DESENHO EXPERIMENTAL: 1ª PARTE
(N = 10)



DESENHO EXPERIMENTAL: 2ª PARTE

(N = 10)



3.2.2. Detalhamento do trabalho experimental: 1ª Parte. Avaliação da viabilidade de ilhotas pancreáticas de ratos LEW recém-isoladas e preservadas por 24 horas em HBBS e UW com e sem RV.

Em cada experimento, 3 ratos LEW isogênicos foram utilizados como doadores de ilhotas. A viabilidade das ilhotas foi testada imediatamente após o isolamento e após 24 horas de preservação a frio (4 °C) em HBSS, HBSS-RV, UW e UW-RV, através de coloração supravital com diacetato de fluoresceína (FDA) e brometo de etídio (EB) (teste FDA/EB) e redução de MTT a formazan (teste MTT).

Para os estudos com corantes supravitalis, cerca de 100 ilhotas foram distribuídas para 4 tubos Eppendorf de 1 mL contendo 800 µL de cada uma das quatro soluções em estudo. Os tubos foram codificados para assegurar que o colaborador encarregado da leitura dos testes não estivesse consciente de qual solução estava sendo utilizada. A alocação das ilhotas para cada solução foi feita por tabela de números aleatórios.

Para o teste MTT de ilhotas preservadas a frio, cerca de 50 ilhotas foram distribuídas para 16 tubos Eppendorf de 1 mL contendo 400 µL de cada uma das soluções anteriormente mencionadas (4 para cada uma das soluções a serem testadas: uma duplicata para teste MTT com glicose baixa e outra para teste MTT com glicose alta). O sistema de codificação foi o mesmo anteriormente citado.

Nesta parte do trabalho experimental estudamos, também, a validade da determinação da atividade da desidrogenase láctica (LDH) em soluções de preservação celular (HBSS, HBSS-RV, UW, UW-RV) como forma de avaliação da viabilidade pós-preservação hipotérmica de ilhotas pancreáticas do rato. As determinações da atividade tecidual da enzima LDH foram realizadas, em duplicatas, em ilhotas pancreáticas, tecido pancreático exócrino, rins e fígados de 4 ratos LEW isogênicos.

Para determinação da atividade da enzima em rins e fígados foi removido todo o sangue possível dos órgãos. Logo após a retirada, os fígados e rins foram transferidos

para tubos cônicos de 50 ml contendo salina isotônica e mantidos em gelo. A partir de cada rato, 2 fragmentos de 100 mg de fígado e rim foram colocados em tubos de vidro contendo 2 mL de HBSS gelada, macerados com bastão de vidro, sonicados por 3 vezes por 10 segundos e congelados (-20°C)/descongelados por 3 vezes. Os materiais foram então centrifugados a frio (4°C), 1.200 g por 10 minutos. Dosagem de proteínas e de LDH foram efetuadas em alíquotas dos sobrenadantes.

Para o tecido exócrino pancreático, após a centrifugação em gradientes de Ficol, o material contido no precipitado foi removido dos tubos e lavado por 2 vezes em HBSS gelada. 2 alíquotas de 100 mg foram reservadas para cada rato. Para cada rato, 2 amostras adicionais foram coradas com ditizona e confirmadas conter acima de 95 % de tecido exócrino. Desta altura em diante, a metodologia foi seguida como para determinação de LDH em rins e fígados.

A determinação de LDH no tecido endócrino pancreático (ilhas pancreáticas), foi realizada imediatamente após cada isolamento. Duas amostras de ilhas pancreáticas isoladas de cada um dos ratos utilizados foram coradas com ditizona para a estimativa do número e da pureza (nas 4 ocasiões purezas das preparações acima de 90%). Duas alíquotas contendo aproximadamente 300 ilhas e 400 μL de HBSS foram utilizadas para cada animal. Os materiais foram sonicados (3 vezes; 10 segundos cada sonicação). Da sonicação em diante, o procedimento foi idêntico ao já descrito para os outros órgãos estudados

3.2.3. Detalhamento do trabalho experimental: 2ª Parte. Avaliação da viabilidade de ilhas pancreáticas de ratos LEW recém-isoladas com e sem administração de RV pré-pancreatectomia, e preservadas por 24 horas em HBSS, UW e EC contendo ou não RV.

Seis ratos LEW foram divididos em 2 grupos e utilizados como doadores de ilhas para cada experimento. Em um grupo, não foi utilizado o RV e as ilhas obtidas foram preservadas a frio (4°C) em HBSS, UW e EC por 24 e 48 horas. No outro grupo, 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ de peso de RV foram administrados intraperitonealmente para os ratos doadores

de ilhotas, 20 minutos antes da pancreatectomia, e 5 $\mu\text{mol/L}$ RV foram adicionados à HBSS utilizada durante o processo de isolamento. As ilhotas foram então preservadas a 4 °C em HBSS-RV, UW-RV e EC-RV por 24 e 48 horas.

Para ambos os grupos de ilhotas, a viabilidade foi avaliada imediatamente após o isolamento das mesmas (teste FDA/EB, teste MTT) e após 24 horas (teste FDA/EB, teste MTT, teste de exclusão do azul tripano) e 48 horas (teste FDA/EB) de preservação hipotérmica, como anteriormente descrito na 1ª parte do trabalho experimental.

3.2.4. Detalhamento do trabalho experimental: 3ª Parte. Diabetes mellitus pela estreptozocina em ratos Wistar, Wistar-Furth isogênicos, Lewis isogênicos.

a) Wistar não isogênicos

13 animais receberam STZ, 60 mg/kg, EV. Uma amostra de sangue foi obtida destes animais na ocasião da administração da droga para a determinação da glicemia basal. A confirmação do estado diabético foi feita pela determinação dos pesos e das glicemias 3 semanas após a injeção de STZ. Posteriormente, os pesos e as glicemias foram obtidos na 6ª e 8ª semana para os 4 primeiros animais injetados e na 4ª, 5ª, 7ª e 9ª semana pós-STZ para os 6 restantes.

Para documentar inexistência de diabetes espontâneo nesta população de ratos Wistar, 10 animais machos foram seguidos como acima descrito para os animais diabéticos.

b) Wistar-Furth isogênicos

Para estudo a longo prazo do diabetes mellitus promovido pela STZ administrada na dose de 60 mg/kg, por 3 diferentes rotas (EV sublingual; EV cauda; Intraperitoneal), 40 ratos foram estudados. 10 ratos receberam STZ por cada uma das diferentes vias mencionadas e 10 ratos funcionaram como controles. Os grupos foram construídos pelo pareamento das idades quando da injeção de STZ. Pesos e glicemias foram documentados no dia do estabelecimento dos grupos e após 1, 2, 4, 8, 12, 20, 30 e 40 semanas de observação.

c) Lewis isogênicos

Para determinar a idade apropriada de uso dos ratos desta colônia, 20 fêmeas e 20 machos, após o desmame (4 semanas), foram pesados semanalmente por 18 semanas.

Para promoção de diabetes químico nestes ratos, STZ foi administrada EV na dose de 60 (n = 16), 50 (n = 10) e 40 mg/kg (n = 11), e os animais tiveram seus pesos e glicemias aferidos nesta ocasião e 2, 3, 4, 6, 10 e 12 semanas após.

3.2.5. Detalhamento do trabalho experimental 4ª Parte: Transplantes de ilhotas pancreáticas em ratos Lewis isogênicos.

a) Diabetes induzido por 50 mg/kg de STZ: primeira série

Transplante (Tx) realizado 12 semanas após indução do diabetes experimental. Rato LD10a recebeu 2.000 ilhotas intraportal e ratos LD30, LD50, e LD70 receberam 3.000 ilhotas. Seguimento com peso e glicemias semanalmente por 12 semanas e nos meses 9, 12 e 15 após o transplante.

b) Diabetes induzido por 50 mg/kg de STZ: segunda série

Foram coletadas glicemias e pesos registrados nos dias 1, 2, 3, 5, 7, 10 e a seguir semanalmente até a 5ª semana pós-Tx. Depois disto, aferições de peso e glicemias foram feitas 7, 10 e 15 meses após uso de STZ. Transplantes realizados na terceira semana após indução do diabetes químico com 2.000 ilhotas.

c) Diabetes induzido por 40 mg/kg de STZ

Os Ratos LD207, LD209, LD212 foram transplantados na terceira semana pós-indução do diabetes com 2.500 ilhotas.

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Comparações estatísticas das médias dos resultados dos testes MTT e FDA/EB da 1ª parte do trabalho experimental foram feitas por Análise de Variância (ANOVA) com 1 fator e teste de Tukey. Para a 2ª parte do trabalho experimental, os resultados do teste MTT foram analisados por ANOVA com 3 fatores, com análise de interação. Os resultados do teste FDA/EB foram avaliados por ANOVA com 1 fator e teste de Tukey. O número de ilhotas obtidas a partir de cada pâncreas foi comparado pelo teste t de Student. Correlações entre coloração por azul tripano e por RV das ilhotas foram estimadas pelo coeficiente de correlação de Pearson e a análise do grau de morte celular detectada pelo azul tripano foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis. ANOVA com 1 fator e transformação potência igual a 2 na escala, para adequação dos pressupostos da ANOVA, foi utilizada para as comparações entre a atividade de LDH nos tecidos estudados. Teste t de Student foi também utilizado para comparações de médias de pesos e de glicemias nos estudos de diabetes experimental em ratos Wistar. ANOVA para medidas repetidas foi utilizada para avaliar a resposta de perda de peso e de hiperglicemia após estreptozocina em ratos Wistar-Furth isogênicos. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se um pacote estatístico SAS para Windows (versão 6.12).

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DA 1ª PARTE DO TRABALHO EXPERIMENTAL

4.1.1. Teste MTT.

Anexo 7, mostra o espectro das absorbâncias das soluções e reagentes utilizados durante os teste MTT realizados nesta 1ª parte do trabalho experimental. Na dose de RV utilizada nos experimentos, o mesmo não apresenta absorbância significativa nos comprimentos de onda verificados. Uma concentração 10 vezes maior foi incluída no espectro para demonstrar que nesta concentração a faixa de absorbância do RV é semelhante à do formazan. Absorbâncias de EC e EC-RV não foram incluídas nesta figura porque na parte do trabalho em que as mesmas foram aferidas estas soluções não estavam sendo utilizadas. Posteriormente, foram medidas no comprimento de onda 492 nm apenas onde, a exemplo das demais soluções testadas, não apresentaram praticamente nenhuma absorbância.

Nos experimentos com o teste MTT desta fase, nem ilhotas frescas nem ilhotas preservadas a frio por 24 horas em HBSS, HBSS-RV, UW and UW-RV aumentaram a produção de formazan em resposta ao aumento da concentração de glicose no meio de incubação. As absorbâncias verificadas no teste MTT para ilhotas frescas foram significativamente maiores do que as observadas no teste do MTT realizado para ilhotas preservadas a frio por 24 horas ($P < 0,05$). Não foram observadas diferenças na viabilidade pós-preservação das ilhotas do rato entre as soluções de preservação ou efeito atribuível a adição de RV para HBSS ou UW. Os resultados destes experimentos encontram-se representados na figura 1 e em forma de tabela no anexo 8.

Para a confecção do gráfico dos testes MTT realizados nesta parte do trabalho experimental, as absorbâncias observadas após a preservação a frio das ilhotas nas soluções testadas foram comparadas, dentro de cada experimento, com às das ilhotas recém-isoladas (viabilidade considerada ser 100%).

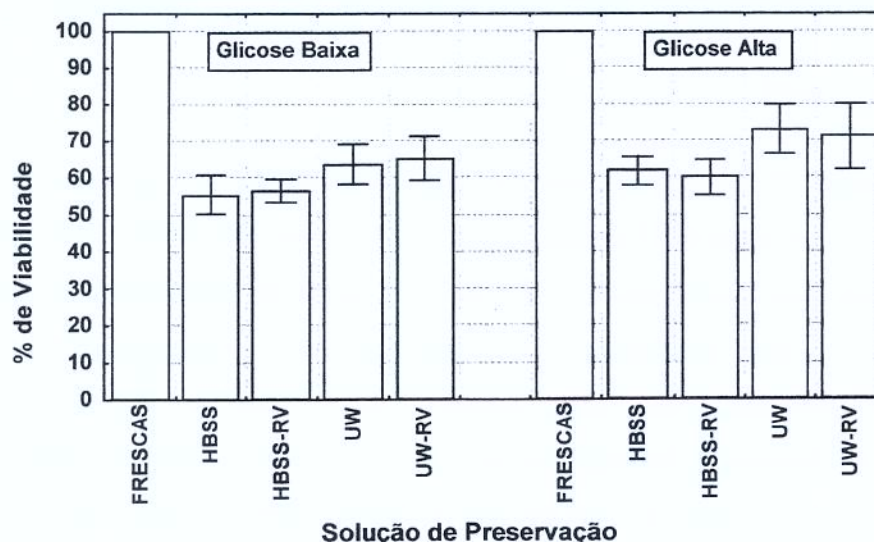


Figura 1. Teste MTT (1ª Parte trabalho experimental): percentagem de viabilidade de ilhotas pancreáticas do rato, frescas e preservadas a frio por 24 horas, avaliada pelo teste MTT.

4.1.2. Teste FDA/EB.

Nenhum efeito da adição de RV pôde ser registrado tanto para ilhotas recém-isoladas quanto para ilhotas preservadas a frio por 24 horas quer em HBSS-RV quer em UW-RV. A viabilidade das ilhotas pancreáticas avaliada pelo teste FDA/EB após 24 horas de preservação em UW e UW-RV não foi diferente da verificada para ilhotas controles. Ilhotas preservadas em UW tiveram viabilidade significativamente maior do que ilhotas mantidas em HBSS ($P < 0,05$). Semelhantemente, ilhotas preservadas a frio em UW-RV apresentaram melhor desempenho do que ilhotas preservadas a frio em HBSS-RV ($P < 0,05$). Os resultados do teste FDA/EB da 1ª parte do trabalho experimental são apresentados na figura 2. No anexo 9 podem ser encontrados tabulados os dados destes experimentos.

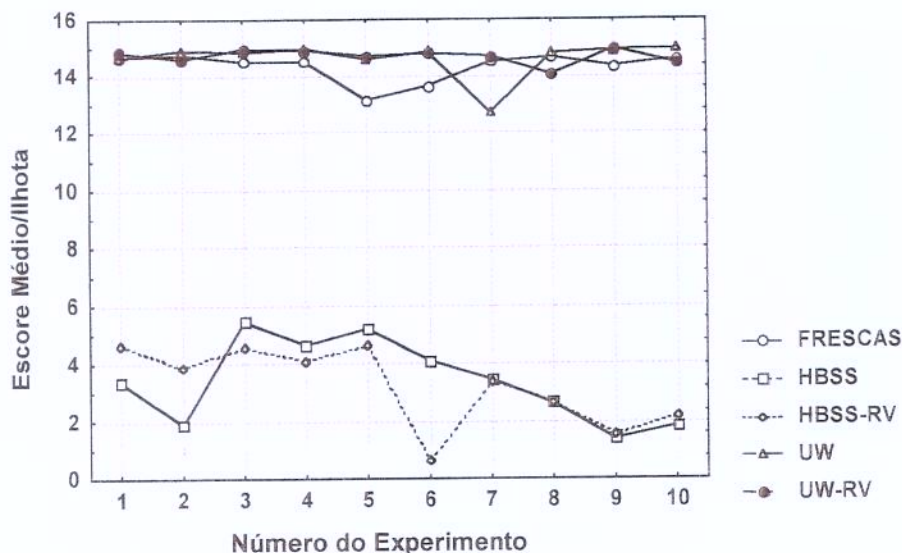


Figura 2. (1ª Parte trabalho experimental): viabilidade, avaliada pelo teste FDA/EB, de ilhotas pancreáticas do rato frescas e preservadas a frio por 24 horas.

4.1.3. Determinações de LDH.

Os resultados dos experimentos envolvendo a determinação da atividade tissular de LDH em alguns tecidos do rato são apresentados na figura 3 e em forma de tabela no anexo 10.

Os resultados finais foram expressos em nmol/min/μg proteína, para permitir comparações entre os materiais biológicos estudados. A atividade da enzima nas ilhotas foi 4, 42 e 84 vezes menor nas ilhotas do que no tecido pancreático exócrino, rim e fígado, respectivamente. Os níveis de atividade de LDH diferiram significativamente entre cada um dos tecidos estudados ($P < 0,005$).

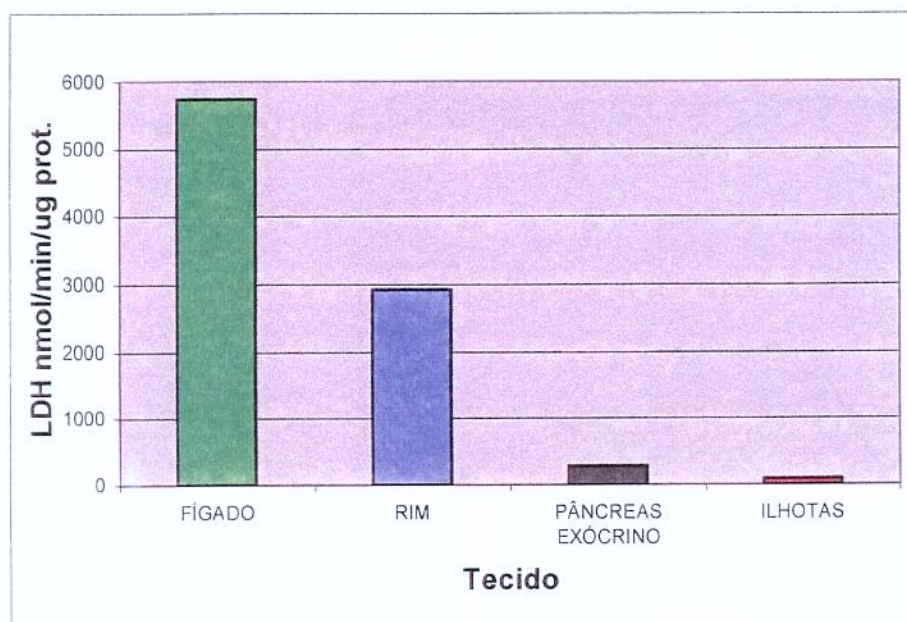


Figura 3. Determinações de atividade de LDH em fígado, rim, pâncreas exócrino e endócrino de ratos Lewis (n = 4).

4.2. RESULTADOS DA 2^A PARTE DO TRABALHO EXPERIMENTAL

4.2.1 Número de ilhotas isoladas por pâncreas.

A injeção intraperitoneal de 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ RV, previamente a pancreatectomia, seguida pela inclusão de 5 $\mu\text{mol/L}$ of RV para HBSS utilizada durante a isolamento das ilhotas não produziu nenhuma alteração significativa no número de ilhotas obtido/pâncreas. O número médio ($\pm\text{D.P.}$) de ilhotas isoladas para cada pâncreas murino foi 976 ± 328 para ilhotas isoladas em HBSS versus 991 ± 378 para ilhotas isoladas na presença de HBSS-RV.

4.2.2. Teste MTT.

Nenhum efeito atribuível ao RV ou à concentração de glicose no meio de incubação do teste ($P = 0,4331$ e $P = 0,2783$, respectivamente) pôde ser observado. A absorbância verificada no teste MTT de ilhotas recém-isoladas foi significativamente maior que a registrada no mesmo teste feito com ilhotas preservadas por 24 horas, em todas as soluções testadas ($P<0,05$). Além disto, ilhotas preservadas a frio por 24 horas em HBSS produziram menores absorbâncias do que as ilhotas preservadas tanto em UW quanto em EC ($p<0,05$). A figura 4 apresenta os resultados do teste MTT feito em RPMI 1640 contendo baixa e alta concentração de glicose. Os anexos 11 e 12, respectivamente, contém os dados dos testes MTT desta fase feitos em meio de incubação com baixa e alta concentração de glicose.

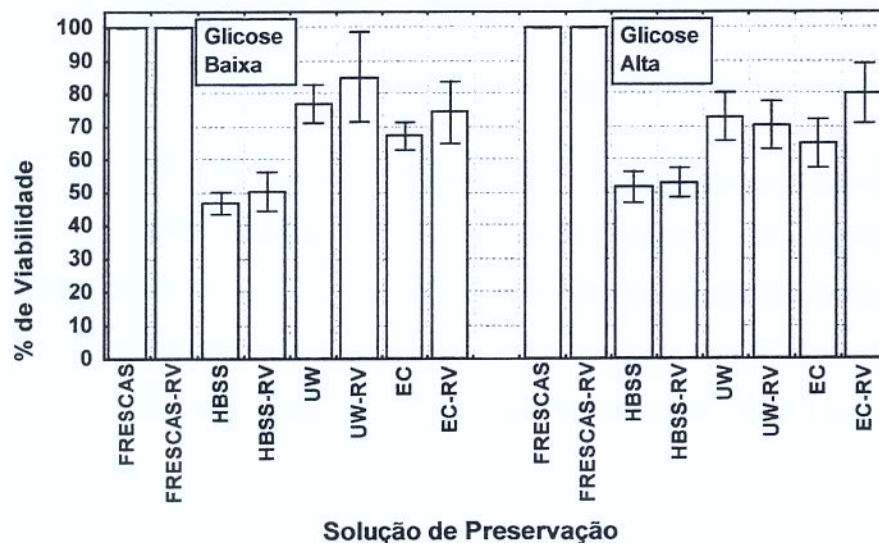


Figura 4 (2ª parte do trabalho experimental): avaliação da viabilidade de ilhotas murinas, frescas e após 24 horas de preservação a frio, por meio do teste MTT.

4.2.3. FDA/EB (24 horas de preservação).

Nenhum efeito da adição de RV para as soluções de preservação estudadas pôde ser documentado pelo teste FDA/EB de ilhotas do rato preservadas a frio por 24 horas. Os escores médios do teste FDA/EB de ilhotas preservadas em HBSS e HBSS-RV foram significativamente menores do que os das ilhotas recém-isoladas ou preservadas a frio por 24 horas em UW, UW-RV, EC, EC-RV ($P < 0,05$). Os resultados do teste FDA/EB para ilhotas do rato preservadas a frio por 24 horas são apresentados na figura 5 e em forma tabulada no anexo 13.

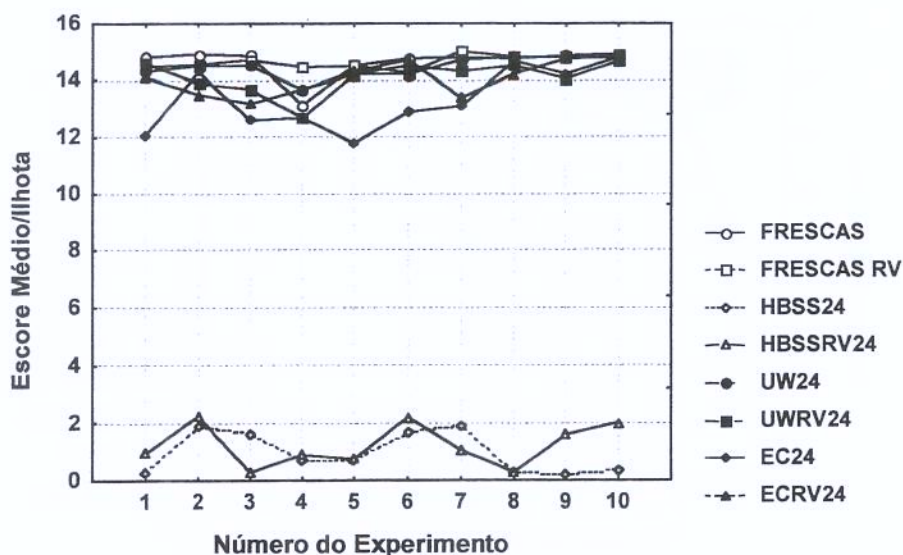


Figura 5. Teste FDA/EB (2ª parte do trabalho experimental) para a avaliação de ilhotas pancreáticas do rato frescas e após 24 horas de preservação hipotérmica.

4.2.4. Teste FDA/EB (48 horas de preservação).

Depois de 48 horas de preservação hipotérmica, ilhotas preservadas em EC apresentavam escores médios do teste FDA/EB significativamente menores do que ilhotas frescas ou ilhotas preservadas por 48 horas em UW, UW-RV, EC-RV ($P < 0,05$). Os resultados do teste FDA/EB para ilhotas preservadas por 48 horas são apresentados na figura 6 e em forma de tabela no anexo 14.

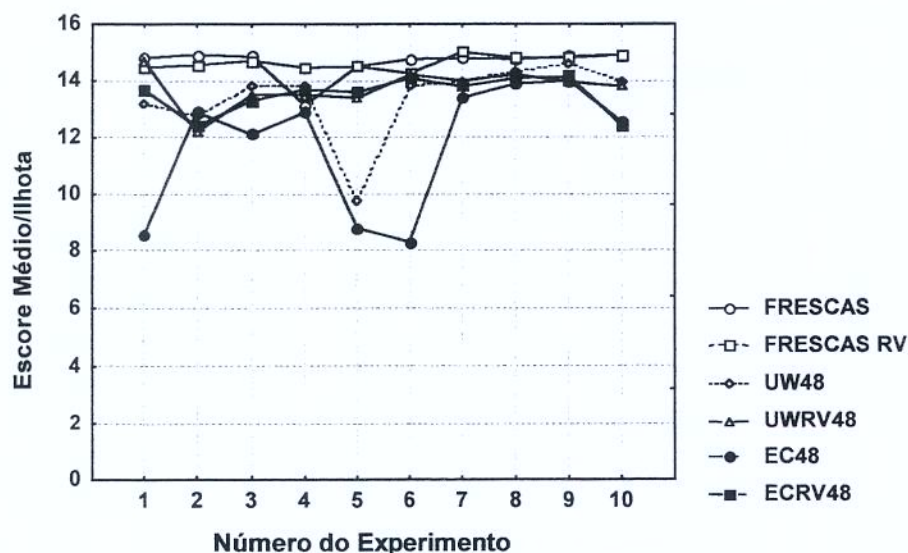


Figura 6. Teste FDA/EB (2ª parte do trabalho experimental) para a avaliação de ilhotas pancreáticas do rato após 48 horas de preservação hipotérmica.

4.2.5. Relação entre coloração por RV e azul tripano de ilhotas preservadas a frio por 24 horas em HBSS-RV, UW-RV and EC-RV.

Ilhotas isoladas de ratos que receberam RV i.p. pré-pancreatectomia e isoladas utilizando-se HBSS-RV para lavaduras não se encontravam coradas pelo RV imediatamente após o isolamento. Apenas alguns pequenos fragmentos de ilhotas e de tecido exócrino continham alguma coloração avermelhada. No anexo 15 pode ser vista uma figura representativa destas ilhotas.

Após 24 horas de preservação a frio em HBSS-RV, UW-RV e EC-RV, houve uma forte correlação entre a percentagem de coloração por RV das amostras de ilhotas e a percentagem de coloração por azul tripano das mesmas amostras ($R = 0,9854$; $P < 0,001$). Estes resultados são apresentados na figura 7. Os anexos 16 e 17 contém, respectivamente, figuras representativas de ilhotas preservadas por 24 horas em UW-RV e HBSS-RV. Ilhotas preservadas em EC-RV por este período tinham aparência idêntica à das preservadas em UW-RV. Anexo 18 contém ilustração de ilhotas preservadas por 24 horas em HBSS-RV, da mesma amostra contida no anexo 17, após terem sido coradas por azul tripano.

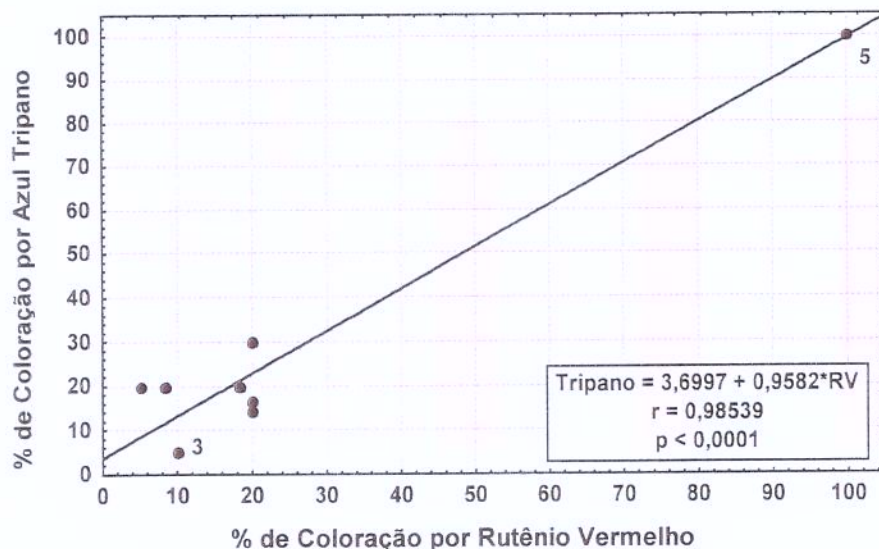


Figura 7. Correlação entre coloração por RV e por azul tripano de ilhotas pancreáticas do rato preservadas a frio por 24 horas em HBSS-RV, UW-RV e EC-RV.

A percentagem de morte celular como avaliada pela coloração por azul tripano foi significativamente maior em ilhotas preservadas por 24 horas em HBSS-RV (100%) do que em ilhotas preservadas pelo mesmo intervalo em UW-RV ($9,84 \pm 6,94$) ou em EC-RV ($21,34 \pm 5,05$), $P = 0,0023$.

Para comparação, como as ilhotas submetidas ao teste FDA/EB destes últimos 5 experimentos desta 2ª parte do trabalho experimental foram provenientes dos mesmos animais que as submetidas à análise de correlação RV/azul tripano, construímos a figura 8 que apresenta os dados provenientes dos testes FDA/EB transformados para representar % de morte celular (Escore 15 = 0% de morte; Escore 0 = 100% de morte) paralelamente aos dados de % de coloração das ilhotas do rato por RV e azul tripano. H-RV6, UW-RV6, EC-RV6 e assim sucessivamente, fazem referência ao número dos experimentos de onde os dados foram obtidos.

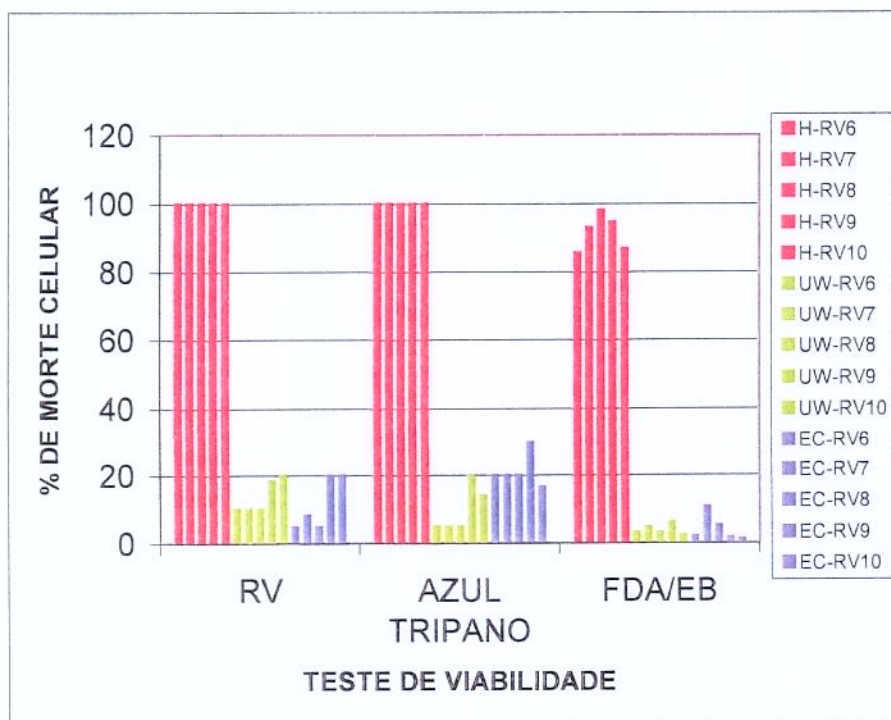


Figura 8. Percentagem de morte celular: comparação de 3 testes em ilhotas do rato preservadas a frio por 24 horas, em 3 soluções contendo RV.

Referente às observações das ilhotas do rato mortas pelo calor e então coradas com RV, nos dois experimentos houve coloração pelo RV em 100% das ilhotas nas 6 alíquotas. Cerca de 5% das ilhotas controle (0, 5, 5, 5, 5, 0, 5%) encontravam-se coradas pelo RV.

4.3. RESULTADOS DA 3ª PARTE DO TRABALHO EXPERIMENTAL. DIABETES MELLITUS PELA ESTREPTOZOCINA EM RATOS RATOS WISTAR, WISTAR-FURTH ISOGÊNICOS E LEWIS ISOGÊNICOS

4.3.1. Diabetes mellitus pela estreptozocina em ratos Ratos Wistar

Dos 13 animais que receberam a estreptozocina, 3 não foram incluídos na análise do efeito da STZ sobre peso e glicemia. Em um dos animais (WDC14 = Wistar

Diabético Controle 14), a injeção endovenosa (EV) da droga não foi julgada ideal. Neste animal, a glicemia não foi coletada concomitantemente à injeção da droga. No entanto, 3 semanas após a injeção da STZ, a glicemia era 498 mg/dL e o seu peso tinha caído de 330 g para 289 g. O animal WDC10 foi excluído por morte durante a anestesia com éter para a coleta da glicemia, 3 semanas após a administração de STZ. Seu peso havia caído de 322 para 280 g. WDC11 não foi incluído porque o tubo para a determinação da glicemia 3 semanas após o uso de STZ rompeu-se durante a centrifugação. Na quarta semana após injeção de STZ sua glicemia era de 620 e seu peso tinha caído de 310 para 260 g. Todos os 10 animais restantes ficaram diabéticos pela STZ e permaneceram assim por todo o tempo de seguimento.

Entre os controles, 1 animal (WNL16 = Wistar controle Normal 16) foi excluído por não ter sido possível documentar sua glicemia no ponto inicial de seguimento, visto que o tubo com o sangue coletado do animal partiu-se durante o processo de centrifugação. Nestes controles normais, não se registrou durante toda a observação o aparecimento espontâneo de diabetes mellitus. Adicionalmente, neste grupo de animais, após jejum de 15 horas e água *ad libitum*, a glicemia caiu de forma significativa (Sem jejum: $163,9 \pm 27,4$ x Jejum $129,4 \pm 11,7$; $p = 0,002$).

Análise estatística comparando as médias e desvios padrões dos pesos e das glicemias pré e 3 semanas após STZ revelou que os pesos (diabéticos: $357,7 \pm 21,7$ x controles: $368,7 \pm 40,1$; $p = 0,463$) e as glicemias (diabéticos: $171,1 \pm 17,8$ x controles: $152,3 \pm 38,1$; $p = 0,178$) não diferiam no início do período de experimentação. Entretanto, após 3 semanas da injeção da STZ, os pesos (diabéticos: $303,1 \pm 64,7$ x controles: $421,7 \pm 47,2$; $P < 0,001$) e as glicemias (diabéticos: $532,8 \pm 49,8$ x controles: $164,6 \pm 29,0$; $P < 0,001$), diferiram significativamente.

As figuras 9 e 10 representam, respectivamente, as evoluções de pesos e de glicemias 3 semanas após a administração de STZ para estes ratos.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

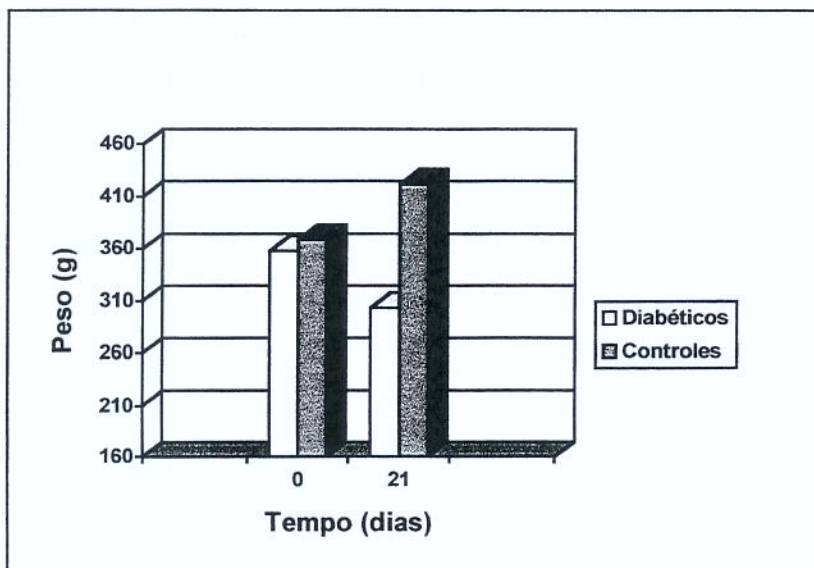


Figura 9. Pesos de ratos Wistar diabéticos pela STZ e controles. Tempo 0 = administração de STZ.

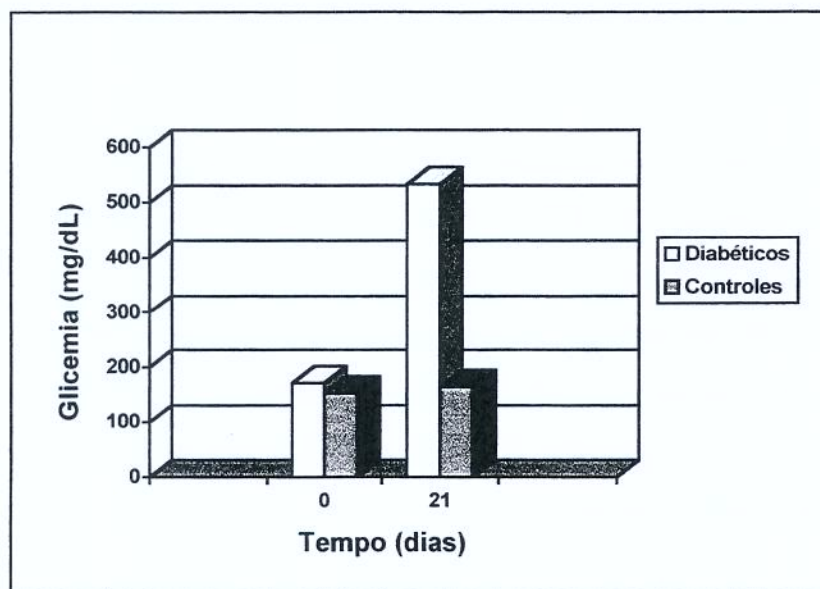


Figura 10. Glicemias de ratos Wistar diabéticos pela STZ e controles. Tempo 0 = administração de STZ.

4.3.2. Diabetes mellitus pela estreptozocina em ratos Ratos Lewis isogênicos

Referente as curvas de ganho de peso de LEW machos, nas colônias locais, o peso pretendido para a sua utilização (250-350 g) é verificado entre 12-22 semanas de vida. Os dados desta observação são apresentados na figura 11 e em forma de tabela no anexo 19.

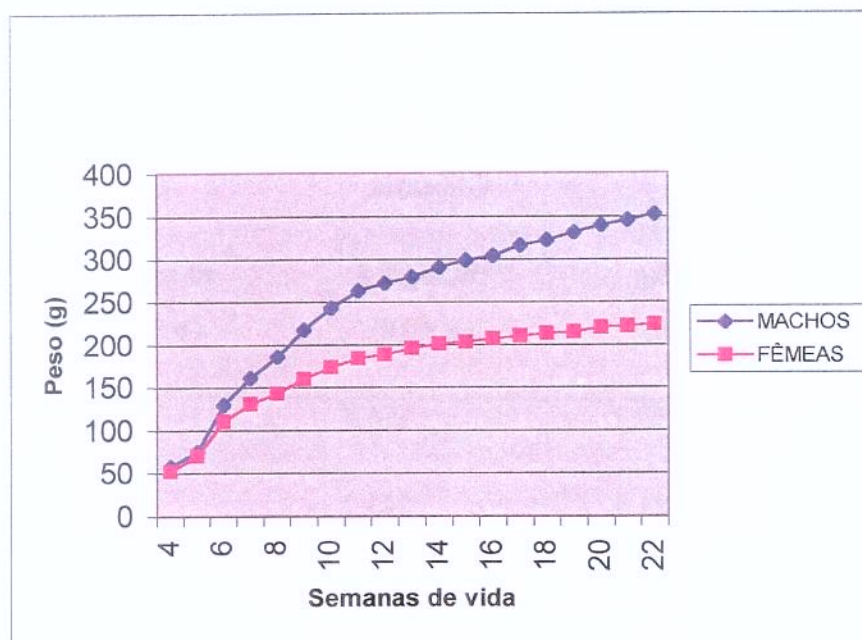


Figura 11. Evolução dos pesos, a partir do desmame, em 20 ratos e 20 ratas Lewis isogênicos.

Dos 16 animais injetados com 60 mg/kg, 6 tornaram-se severamente doentes e morreram antes de completar 2 semanas pós-STZ. Os 10 restantes permaneceram diabéticos pelas 6 semanas de observação pós-STZ.

Todos os animais injetados com 50 mg/kg tornaram-se diabéticos e assim permaneceram, exceto um que morreu 1 semana antes, por 6 semanas.

Com 40 mg/kg de STZ, apenas 5 dos 11 animais injetados alcançaram o critério operacional previamente estabelecido de diabetes químico para este estudo.

Na tabela 1, são apresentados os dados obtidos com as diferentes doses utilizadas de STZ (60 x 50 x 40 mg/kg). Os dados de 6 semanas não são disponíveis para o grupo 40 mg/kg pois o seguimento foi interrompido com a observação que a dose não era diabetogênica.

Tabela 1- Comparação de doses (60 x 50 x 40 mg/kg), utilizando-se a administração de STZ por uma das veias sublinguais.

Semana	Glicemia		
	60 mg/kg (n = 10)	50 mg/kg (n = 10)	40 mg/kg (n = 5)
Zero (STZ,EV)	156,3	154,4	134,9
2	584,4	543,2	440,3
6	632,5	600,8*	-

* Apenas 9 observações disponíveis

Os dados de evolução dos ratos injetados com 40 mg/kg de STZ e que não ficaram diabéticos como definido para o estudo são mostrados na tabela 2.

Tabela 2- Glicemias, em mg/dL, de ratos Lewis isogênicos pré e 2 semanas após administração endovenosa de 40 mg/kg de estreptozocina e que não alcançaram a definição operacional de diabetes químico determinada. T0: administração de STZ. T2: 2 semanas após a administração da droga.

Rato número	Glicemia T0	Glicemia T2
210	131	146
213	149	330
214	147	306
215	127	390
216*	145	398
217*	151	402

*216: Glicemia 398mg/dL após 2 semanas. 3 medidas na terceira semana: 480; 444; 318 mg/dL.

*217: Glicemia 402 mg/dL após 2 semanas. Nova medida na terceira semana: 241 mg/dL

4.3.3. Diabetes mellitus pela estreptozocina em ratos Ratos Wistar-Furth isogênicos

A idade média dos animais dos quatro grupos foi semelhante na época da formação dos grupos experimentais: controle: $22,36 \pm 9,79$; peritônio: $19,86 \pm 6,53$; cauda: $19,86 \pm 7,27$; língua: $21,10 \pm 7,19$.

No grupo controle nenhum animal morreu ou se tornou espontaneamente diabético durante as 40 semanas de observação.

No grupo peritônio, 3 animais não ficaram diabéticos (30% de falha) como definido para o estudo (WF110 = rato Wistar-Furth 110; WF123; WF103). Interessantemente, o animal WF 103 encontrava-se severamente diabético na primeira semana pós-STZ (glicemia 538 mg/dL) e na semana seguinte sua glicemia caiu para 376 mg/dL. A tabela 3 apresenta os pesos e as glicemias destes animais. Dos animais restantes, todos alcançaram, diabéticos, 40 semanas de observação exceto o rato WF124 que permaneceu diabético por 20 semanas mas morreu antes de completar a 30^a e o rato WF111 que morreu diabético (glicemia 676 mg/dL) durante anestesia inalatória com éter para coleta da glicemia na primeira semana de observação.

Tabela 3- Evolução de 3 ratos isogênicos, WF, do grupo peritônio, que não alcançaram definição operacional de diabetes após a administração intraperitoneal de STZ, na dose de 60 mg/kg.

Seguimento	WF103		WF110		WF123	
	Peso	Glicemia	Peso	Glicemia	Peso	Glicemia
T0	240	103	240	98	260	123
2semanas	234	376	246	97	260	60
20 semanas	266	295	283	88	298	76
40 semanas	268	272	300	101	286	110

No grupo cauda, 1 animal WF127, achado morto 4 dias após injeção da estreptozocina (peso pré: 318 g; peso 4º dia: 255 g); outro animal, WF126, morreu durante a anestesia inalatória com éter para coleta da glicemia na 2ª semana (glicemia: 452 mg/dL), um terceiro animal WF114, morreu antes de alcançar 12 semanas de observação. Na 8ª semana, glicemia: 540 mg/dL. A droga administrada por esta rota, nesta dose, nestes ratos, promoveu diabetes em 100% dos casos, sendo que 1 rato morreu de toxicidade atribuível à STZ na primeira semana de observação. Nos ratos que puderam ser observados por 40 semanas não se observaram reversões espontâneas do diabetes quimicamente induzido.

No grupo língua, 3 animais morreram antes de completar 2 semanas de observação. WF119 morreu no dia 5 pós-STZ. Já no dia 4 parecia bastante doente e seu peso havia caído de 298 g para 222 g. Não foi coletada glicemia por receio que animal não sobrevivesse a anestesia com éter. WF120 morreu no dia 6 pós-STZ. Como também estava doente no dia 5, coletada glicemia: 762 mg/dL. WF128, 1 semana após STZ tinha glicemia de 498 mg/dL e no dia 8, dia do óbito, glicemia de 694 mg/dL. Um quarto animal WF107, permaneceu diabético por 20 semanas porém morreu antes da 40ª. A droga administrada por esta rota, ocasionou 30% de mortalidade inicial. Nos sobreviventes, promoveu diabetes em 100% dos casos e nos ratos que puderam ser observados, o diabetes induzido permaneceu pelas 40 semanas de observação.

Com relação à severidade do diabetes induzido, a administração de STZ na dose de 60 mg/kg promoveu diabetes de magnitude semelhante independentemente da rota utilizada (peritônio, veia da cauda, veia sublingual; $P = 0,1226$). Analisando-se os 3 grupos, houve redução significativa do peso e aumento significativo da glicemia 2 semanas após administração da STZ ($P < 0,0001$ em ambas as situações).

As figuras 12 e 13 e os anexos 20 e 21 apresentam, respectivamente, os dados de evolução de pesos e glicemias dos 4 grupos de animais deste experimento. Embora dados de peso e glicemia sejam ainda disponíveis para as semanas 1, 4, 8, 12 e 30 pós-STZ, para facilidade de análise apenas os dados relativos a T0 (dia da injeção do tóxico), 2 semanas, 20 semanas e 40 semanas após administração de STZ serão apresentados.

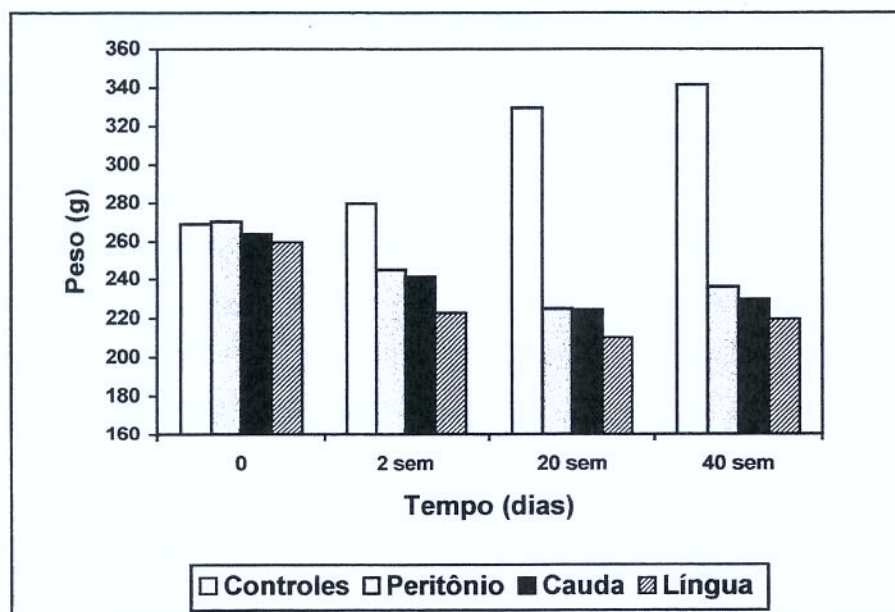


Figura 12. Evolução dos pesos após administração de 60 mg/kg de STZ (tempo 0) por 3 diferentes rotas, para ratos WF isogênicos.

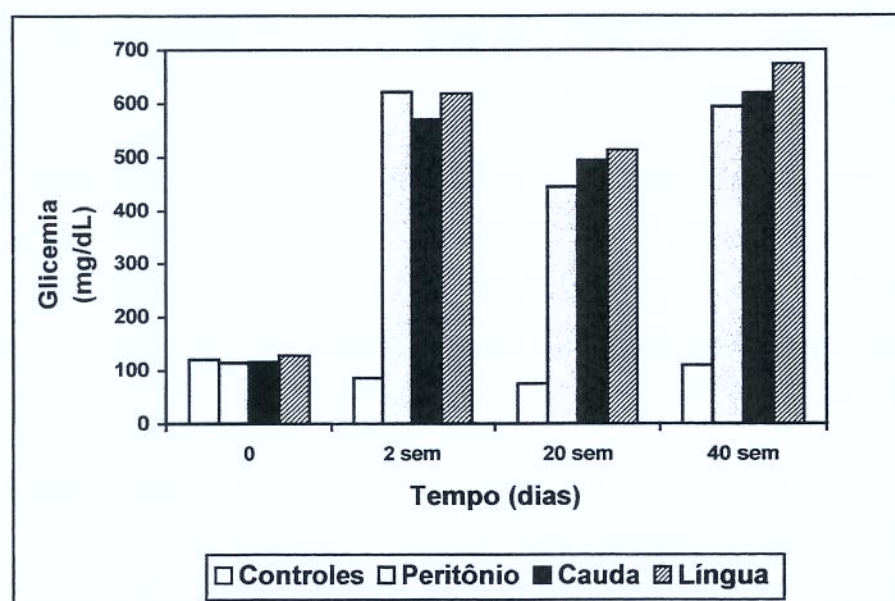


Figura 13. Evolução das glicemias após administração de 60 mg/kg de STZ (tempo 0) por 3 diferentes rotas, para ratos WF isogênicos.

4.4. TRANSPLANTES INTRAPORTAIS DE ILHOTAS PANCREÁTICAS EM RATOS LEWIS ISOGÊNICOS

4.4.1. Diabetes induzido por 50 mg/kg de STZ: primeira série

Transplantes (Tx) realizados 12 semanas após indução do diabetes experimental. Rato LD10a recebeu 2.000 ilhotas intraportal e ratos LD30, LD50, e LD70 receberam 3.000 ilhotas. O Rato LD70 não foi incluído nas análises pois apresentou sangramento incontrolável no local da injeção das ilhotas na veia porta e foi sacrificado. O anexo 22 apresenta os dados de seguimento a longo prazo destes animais e a figura 14 sua representação gráfica. O rato LD30 morreu antes de completar 15 meses de observação.

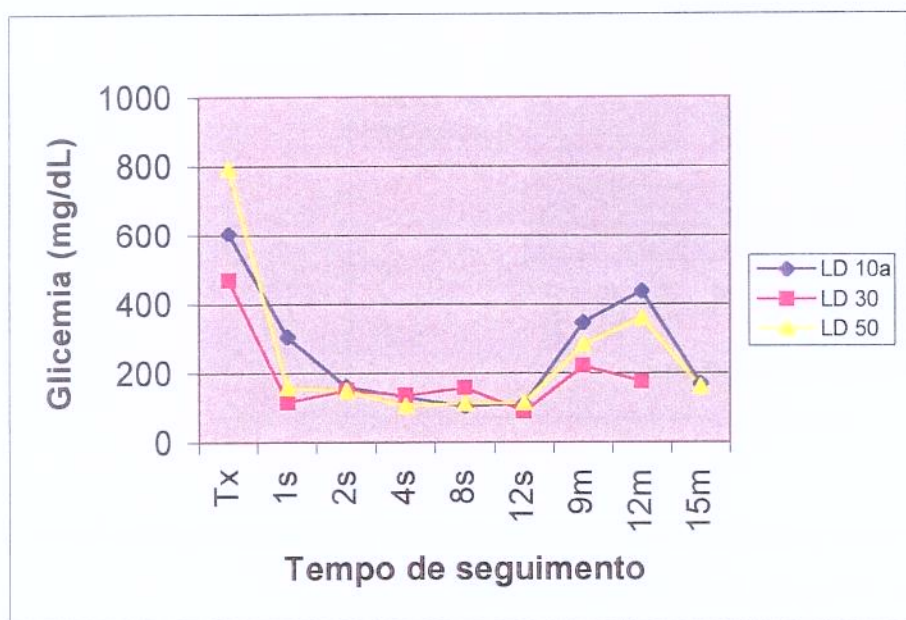


Figura 14. Evolução a longo prazo de transplantes intraportais isogênicos em ratos Lewis diabéticos por 50 mg/kg de STZ: primeira série.

4.4.2 Diabetes induzido por 50 mg/kg de STZ: segunda série

Foram coletadas glicemias e pesos registrados nos dias 1, 2, 3, 5, 7, 10 e a seguir semanalmente até a 5ª semana pós-Tx e depois no 7º, 12º e 15º mês pós-transplante. Transplantes realizados na terceira semana após indução do diabetes químico com 2.000 ilhotas. Os dados de seguimento destes animais encontram-se figura 15 e tabulados no anexo 23.

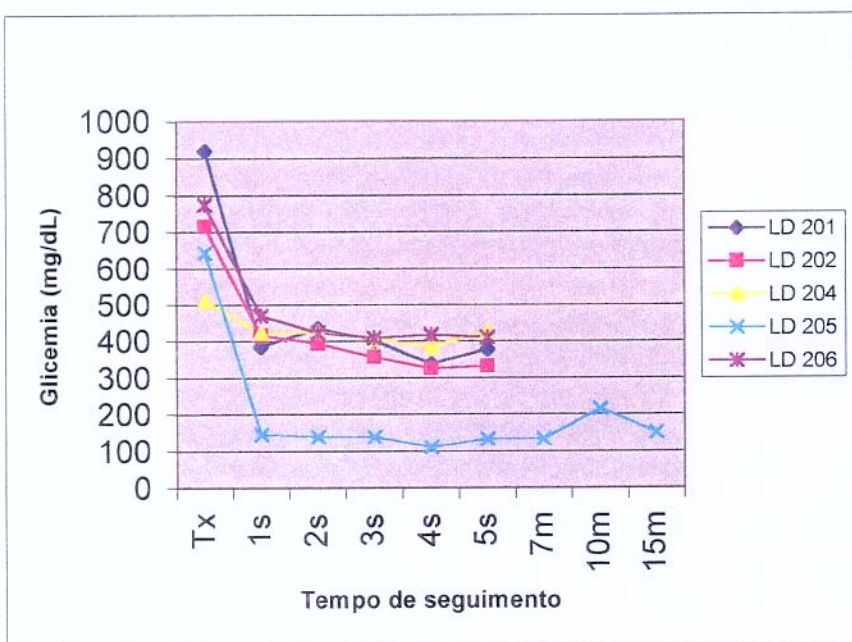


Figura 15. Evolução a longo prazo de transplantes intraportais isogênicos em ratos Lewis diabéticos por 50 mg/kg de STZ: segunda série.

4.4.3 Diabetes induzido por 40 mg/kg de STZ

Os Ratos LD207, LD209, LD212, e LD217 foram transplantados na terceira semana pós- indução do diabetes com 2.500 ilhotas. A figura 16 representa a evolução deste grupo de animais. Os dados numéricos desta evolução podem ser observados no anexo 24.

Os três animais normalizaram a hiperglicemia imediatamente (24 horas) pós-transplante e assim permaneceram pela duração do experimento.

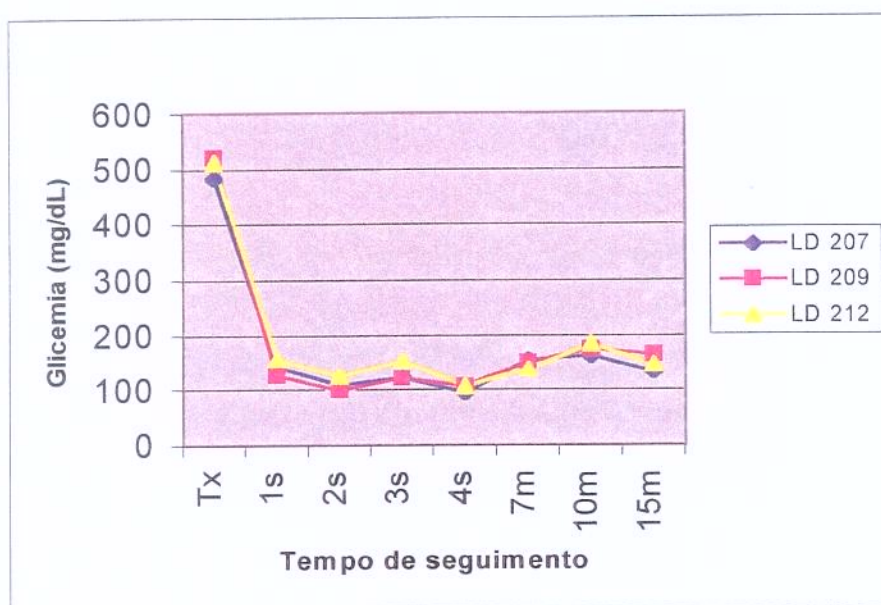


Figura 16. Evolução a longo prazo de transplantes intraportais isogênicos em ratos Lewis diabéticos por 40 mg/kg de STZ.

5. DISCUSSÃO

5.1. RUTÊNIO VERMELHO E PRESERVAÇÃO HIPOTÉRMICA DE ILHOTAS PANCREÁTICAS DO RATO

Com a recente demonstração de que o alotransplante de ilhotas pancreáticas pode obter sucesso na reposição da função pancreática endócrina para diabéticos do tipo 1 (SHAPIRO et al, 2000), uma nova onda de transplantes de ilhotas pancreáticas é esperada em todo o mundo. Estudos multicêntricos estão sendo organizados para a implementação do protocolo desenvolvido em Edmonton por Shapiro e colaboradores (WHITE et al, 2000).

A partir de um ponto de vista operacional, um breve período de preservação a frio é esperado ocorrer na maioria dos alotransplantes de ilhotas pancreáticas a serem realizados. Além do mais, todo o processo de isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas representa um curto período de preservação a frio para as ilhotas (KENMOCHI et al, 1998).

Para manter a melhor viabilidade possível para as ilhotas a serem transplantadas existe necessidade de pesquisas destinadas a encontrar soluções de preservação ou aditivos para as mesmas que possam resultar em melhor preservação das ilhotas isoladas. Nós estudamos se a adição de RV para HBSS, UW e EC poderia melhorar a viabilidade pós-preservação a frio de ilhotas pancreáticas. Se RV é adicionado à HBSS ou UW após o isolamento, antes da preservação a frio das ilhotas, nenhum efeito atribuível ao RV pôde ser observado após 24 horas de preservação, quer se utilizando o teste MTT ou o teste FDA/EB.

Os resultados destes estudos demonstraram que ilhotas de rato preservadas a frio quer em HBSS ou HBSS-RV apresentaram menores escores médios do que ilhotas preservadas semelhantemente em UW ou UW-RV ($P < 0,05$). Nestes experimentos, ilhotas preservadas a frio por 24 horas em UW e UW-RV apresentaram viabilidade semelhante à de ilhotas controles. Quando RV foi administrado i.p. para os ratos doadores de ilhotas antes da pancreatectomia, adicionado à HBSS utilizada durante o procedimento de isolamento, e então incluído em HBSS, UW e EC, nenhum efeito desta adição pôde ser observado após 24 horas de preservação a frio destas ilhotas. Os testes FDA/EB e MTT demonstraram que após 24 horas de preservação, ilhotas de rato mantidas em HBSS e

HBSS-RV apresentavam viabilidade significativamente menor do que ilhotas preservadas pelo mesmo intervalo em UW e EC com ou sem a presença de RV ($P<0,05$).

Quando o período de preservação foi estendido para 48 horas, os resultados do teste FDA/EB mostraram que viabilidade pós-preservação semelhante à das ilhotas controles pôde ser verificada para as ilhotas mantidas em UW, UW-RV e EC-RV, enquanto que a omissão de RV resultou em preservação inferior para ilhotas preservadas a frio em EC ($P<0,05$). Como na 1ª parte do trabalho experimental não testamos EC e EC-RV como soluções de preservação nem analisamos a viabilidade das ilhotas após 48 horas de preservação a frio, não podemos comentar sobre a possibilidade de se obter melhora na preservação hipotérmica de ilhotas do rato pelo uso de EC-RV como solução de preservação sem se efetuar a injeção i.p. de RV previamente a pancreatectomia.

Em nossos testes utilizando redução do MTT (teste MTT), não pudemos observar aumento da produção de formazan pelo aumento da concentração de glicose do meio, como demonstrado por JANJIC&WOLLHEIM (1992). Nossos estudos, no entanto, diferem em vários pontos dos estudos destes autores, especialmente pelo fato de não termos utilizados pré-cultura a 37 °C das ilhotas por 24 horas para permitir a recuperação funcional destas.

Laboratórios envolvidos em estudos de secreção de insulina de ilhotas pancreáticas recém-isoladas deparam-se, freqüentemente, com níveis basais elevados de insulina e não adequadamente regulados por secretagogos comuns como a glicose. Este defeito na secreção de insulina é ainda maior se as ilhotas são isoladas em gradientes de ficol, como feito em nossos estudos, comparativamente a gradientes de albumina bovina (LAKE, ANDERSON, CHAMBERLAIN, 1987).

Tal fato deve-se, aparentemente, à lesão estrutural dos grânulos secretórios das células β , como evidenciado por estudos de microscopia eletrônica (PAI et al., 1993). Estas anormalidades na secreção de insulina podem ser corrigidas pela cultura a 37 °C das ilhotas isoladas (GOTOH et al, 1987). Nos estudos de JANJIC&WOLLHEIM (1992), a produção aumentada de formazan esteve correlacionada com a maior secreção de insulina pelas ilhotas.

Não incluímos a etapa de pré-cultura nos testes MTT destes estudos pois entendemos que testes que avaliem a viabilidade de ilhotas pancreáticas, para terem futura aplicabilidade clínica, não podem depender de pré-cultura das ilhotas, uma vez que esta etapa tende a ser abolida dos alotransplantes de ilhotas pancreáticas humanas, especialmente agora depois dos resultados obtidos por SHAPIRO et al. (2000). Como realizado na segunda parte do trabalho experimental, o teste MTT mostrou que pode ser de utilidade neste sentido.

Quanto ao maior poder discriminatório do teste MTT realizados na 2ª parte do trabalho experimental, pensamos que a introdução de uma etapa intermediária realizada em temperatura ambiente possa ter permitido melhor recuperação funcional das ilhotas ao evitar que estas fossem submetidas a brusca alteração de temperatura (de 4 °C para 37 °C).

Durante o curso do trabalho experimental observamos que ilhotas preservadas a frio por 24 horas em HBSS-RV adquiriam uma intensa coloração vermelha, visível a olho nu, enquanto que ilhotas mantidas pelo mesmo intervalo em UW-RV e EC-RV ou não apresentavam nenhuma coloração avermelhada ou adquiriam uma leve tonalidade rósea. Como em experimentos anteriores já havíamos documentado que a preservação a frio de ilhotas pancreáticas em HBSS estava associada a um alto grau de morte celular (DELFINO et al., 1993), consideramos que a coloração vermelha observada em ilhotas preservadas a frio em HBSS-RV pudesse estar ligada a dano celular irreversível.

Para testar esta hipótese, documentamos que se ilhotas de rato recém-isoladas em HBSS são transferidas para solução salina isotônica e aquecidas por 15 minutos a 90 °C, um procedimento já conhecido de promoção de morte para ilhotas pancreáticas, e a seguir coradas com 5 µmol/L RV, tornam-se completamente vermelhas.

Adicionalmente, nos estudos que fizemos com ilhotas preservadas por 24 horas em HBSS-RV, UW-RV e EC-RV, pudemos demonstrar que quando ilhotas preservadas em HBSS-RV foram vistas sob o estereomicroscópio a percentagem de coloração em vermelho das mesmas foi estimada em 100% em triplicatas de 5 experimentos consecutivos. Estas mesmas amostras quando coradas com 0,1% azul tripano tornaram-se completamente azuis. Coloração celular por azul tripano implica em morte celular uma vez

que o corante apenas consegue penetrar células quando existem roturas nas membranas citoplasmática. O teste de exclusão do azul tripano é correntemente utilizado como um teste para viabilidade de ilhotas pancreáticas (BELLMANN et al, 1997; BENNET et al, 1999; KIM et al, 2000).

Os dados apresentados sugerem que o RV possa ser utilizado como substituto para o azul tripano em testes de viabilidade celular para ilhotas pancreáticas do rato. Em concordância, DYBOSWSKA, KRAWCZYNSKA, SOBOTA (1996) demonstraram recentemente que os dois corantes foram capazes de penetrar membranas citoplasmáticas de amebas, em proporções semelhantes, após eletroporação das mesmas.

O achado de uma significativa correlação entre coloração por RV e por azul tripano ($R = 0,9854$; $P < 0,001$) em ilhotas pancreáticas de rato preservadas a frio por 24 horas em HBSS-RV, UW-RV e EC-RV sugere fortemente que no modelo estudado RV não pôde penetrar através da membrana citoplasmática das células de ilhotas pancreáticas vivas e que a significativa proteção na viabilidade celular, aferida após preservação a frio por 48 horas pelo teste FDA/EB, das ilhotas mantidas em EC-RV quando comparadas às preservadas em EC possa estar ligada a ação do RV em nível de membrana citoplasmática das células das ilhotas, possivelmente prevenindo o acúmulo citoplasmático de cálcio e as suas conseqüências (COTTERILL et al., 1989; TAKEYAMA, et al., 1993; WEIGHT et al., 1996; KRISTIÁN&SIESJÖ, 1998).

Outros efeitos do RV observados em células isoladas podem resultar em proteção das membranas celulares como, por exemplo, redução da produção de ERMO, da lipoperoxidação e da proteólise (CARPENTER-DEYO& REED, 1991; GROSKREUTZ et al., 1992; ZAMZAMI et al., 1995) e não podem ser excluídos.

Os resultados, também, sugerem cautela ao se analisar os dados relatados de ação protetora do RV em nível de mitocôndria isoladas e tentar extrapolá-los para células e tecidos. Tem sido dito, com sentido geral, que o RV pode penetrar células vivas (SASAKI et al., 1992; MEINICKE et al., 1996; MEINICKE, BECHARA, VERCESI, 1998). Das referências citadas para justificar estas afirmativas (FORBES&SPERALAKIS, 1979; McCORMCAK&ENGLAND, 1983; HANSFORD, 1987; GUPTA et al., 1989), pôde ser

visto que alguma penetração inequívoca do corante pôde ser registrada para músculos esqueléticos e miócitos, de uma maneira tempo e concentração de RV dependentes.

Ainda com respeito a internalização celular do RV, Velasco e colaboradores mostraram que, em culturas de neurônios, RV foi capaz de penetrar neurônios mas não células gliais sugerindo que células de um diferente sistema podem se comportar diferentemente quanto à penetração do corante (VELASCO, MORÁN, TAPIA, 1995). Luft, quando estudou e descreveu a ação do RV como marcador para microscopia eletrônica para vários tipos celulares, já havia afirmado -exceção feita para mastócitos- que o RV não penetrava através de membranas celulares íntegras (LUFT, 1971b). De fato, RV vem sendo amplamente utilizado para documentar a integridade de membranas citoplasmáticas (TAYLOR-ROBINSON et al., 1991; ROSSI&SILVA, 1990; ESCANDE-GÉRAUD et al., 1988; JURA, 1984/1985).

Levando-se em consideração a hidrossolubilidade do RV, seu relativamente alto peso molecular (786, forma não-hidratada), e seu diâmetro (15 Å), o mesmo possui características gerais de substâncias que não conseguem passar passivamente pela membrana citoplasmática (RAISON et al., 1971). Ademais, RV reage prontamente com os polissacarídeos ácidos da porção externa da membrana celular (LUFT, 1971a). Sua penetração celular, portanto, é esperada ocorrer via endocitose (SZURBINSKA&LUFT, 1971), um processo dependente de energia.

Na 2ª parte de nossos estudos, o RV foi administrado *in vivo* 20 minutos antes da pancreatectomia. Alguma penetração celular era esperada ocorrer neste ponto se os dados de Gupta et al com corações de ratos fossem também aplicáveis às células de ilhotas pancreáticas (1989). Como o restante dos experimentos foi realizado sob hipotermia, um processo conhecido por diminuir marcadamente o metabolismo celular/produção de energia (BELZER&SOUTHARD, 1988; DOWNESS et al., 1973), ocorrência de endocitose foi altamente improvável.

Devido a pobre penetração celular do RV, novos bloqueadores da captação mitocondrial de cálcio estão sendo estudados, visando-se aplicabilidade clínica. Embora os resultados pareçam promissores, novamente a penetração celular dos novos inibidores da internalização mitocondrial de cálcio é suposta mas não comprovada (UNITT et al., 1999).

Assim, uma óbvia limitação para o uso de RV na preservação celular hipotérmica é o fato de que a 4 °C sua penetração celular e seus efeitos benéficos diretos relatados em mitocôndrias isoladas não são esperados. No único estudo que conseguimos localizar sobre o papel do RV na preservação celular hipotérmica, COTTERILL et al. (1989) demonstraram que a preservação de rins de coelhos em solução hipertônica de citrato e salina isotônica contendo 5 $\mu\text{mol/L}$ RV promoveu aumento da peroxidação de lipídeos.

A administração de RV para os doadores das ilhotas, previamente a retirada do pâncreas, como fizemos na 2ª parte deste trabalho experimental, representa uma tentativa de evitar o acúmulo celular de cálcio e um esforço para permitir a penetração celular do corante. Esta abordagem para humanos provavelmente será limitada pela baixa penetração celular, rápida depuração renal (MEYER, DAVIS, PERIANA, 1983) e toxicidade sistêmica do RV.

Em estudos preliminares, a administração i.p. de 5 $\mu\text{mol/kg}$ de RV para ratos LEW resultou em morte de 5 dos 6 animais injetados dentro de 30 minutos da injeção devido a toxicidade para sistema nervoso central, um achado em acordo com os dados de GARCÍA-UGALDE&TAPIA (1991), obrigando-nos a reduzir pela metade a dose inicialmente planejada de RV. Mesmo com esta dose menor, 5-10 minutos após a administração i.p. de RV, os animais apresentavam-se com o pelo eriçado, tornavam-se cambaleantes e letárgicos, parecendo muito doentes.

Além das limitações mencionadas para aplicabilidade clínica do RV, o RV disponível comercialmente é uma preparação de pureza entre 30-50%, sendo os maiores contaminantes o rutênio marrom e o rutênio violeta. Embora seja possível purificá-lo, em nossos estudos nós não o purificamos porque a forma não purificada é cerca de 7 vezes mais potente do que a forma purificada para o bloqueio da entrada de cálcio nas

mitocôndrias (KEHRER&PARK, 1991). Acreditamos que o principal achado de nossos estudos experimentais foi confirmar a inutilidade de HBSS para a preservação a frio de ilhotas pancreáticas do rato. Nós já havíamos anteriormente demonstrado que o mesmo é também aplicável a ilhotas humanas, uma vez que preservação a frio em UW e em 2 versões simplificadas desta solução resultou em melhor manutenção da viabilidade pós-preservação a frio destas ilhotas do que preservação em HBSS (DELFINO et al., 1993).

Estes achados têm sido substantiados pelos relatos recentes indicando que a viabilidade de ilhotas pancreáticas é diminuída após preservação a frio em HBSS por períodos tão curtos quanto 3 horas para ilhotas de rato (SUGIYAMA et al., 1998) ou mesmo tão curtos quanto 90 minutos para ilhotas humanas (KENMOCHI et al., 1998).

De fato, soluções com composição eletrolítica semelhante a do espaço extracelular tais como solução salina isotônica, Ringer Lactato e HBSS, não são apropriadas para preservação a frio uma vez que a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ da membrana celular é altamente sensível a hipotermia. A redução desta ATPase faz com que potássio e magnésio deixem a célula e sódio e outros íons se difundam para o seu interior, a favor de seus gradientes eletroquímicos, o que somado a presença de ânions não difusíveis intracelulares (especialmente proteínas e fosfato) leva a aumento na concentração osmótica intracelular, acarretando entrada de água e consequente edema e rotura da célula e de organelas intracelulares (MaCKNIGHT & LEAF, 1977).

Outro achado de nossos estudos foi o fato de que EC foi capaz de manter boa viabilidade das ilhotas do rato após 24 horas de preservação a frio, viabilidade comparável à de ilhotas frescas e preservadas em UW pelo mesmo intervalo.

Antes da introdução de UW na prática clínica, EC era a solução mais freqüentemente utilizada para a preservação a frio do pâncreas humano (ABOUNA et al., 1987, KALAYOGLU et al., 1988). OLACK et al. (1991) demonstraram que a substituição de HBSS por Euro-Collins para dissolver ficol (originando gradientes de Euro-Ficol) aumentava a pureza e o número de ilhotas isoladas a partir de pâncreas humanos e de cães.

Uma hora de incubação em EC do pâncreas digerido pela collagenase foi mostrada por BEHBOO et al. (1994) como capaz de melhorar o número de ilhotas isoladas por pâncreas e os autores sugeriram que devido a hiperosmolaridade da EC houve aumento da densidade do tecido exócrino e preservação da densidade das ilhotas, o que permitiu isolamento de número maior de ilhotas.

O método de digestão automatizada do pâncreas humano descrito por RICORDI et al. (1988) permitiu isolamento em larga escala de ilhotas pancreáticas a partir do pâncreas humano e de animais de experimentação maiores e é atualmente largamente aplicado para o isolamento de ilhotas pancreáticas humanas. Na publicação original, HBSS foi utilizada para o preparo da collagenase, como a solução submetida a aquecimento que progressivamente diluía a collagenase presente na câmara de isolamento e como a solução para lavadura das ilhotas coletadas. De fato, o uso de HBSS durante o procedimento automatizado de purificação de ilhotas pancreáticas continua a ser relatado (RICORDI et al., 1992; BENHAMOU et al., 1994; BRETZEL, 1997; ORLOFF et al., 1999; RABKIN et al., 1999; OBERHOLZER et al., 2000).

Poder-se-ia supor que neste cenário, a substituição de HBSS por outra solução de preservação viesse a ser benéfica para a manutenção da viabilidade das ilhotas. UW seria a escolha natural, porém, é uma solução muito viscosa com efeito inibitório sobre a ação da collagenase (CONTRACTOR et al., 1995). KENMOCHI et al. (1998) demonstraram que para o isolamento de ilhotas pancreáticas humanas, a solução de preservação Los Angeles 1 (LAP-1) e uma solução modificada de UW (UW sem fração 5 de amido para reduzir sua viscosidade) foram superiores a HBSS em termos de melhora no número de ilhotas obtidas e viabilidade global. EC é uma solução de baixo custo e pode vir a ser uma candidata a substituir HBSS no processo de isolamento automatizado de ilhotas pancreáticas humanas se nossos bons resultados utilizando EC para a preservação a frio de ilhotas pancreáticas forem repetido em modelos *in vivo* em roedores e animais de experimentação maiores.

5.2. LDH E ILHOTAS PANCREÁTICAS

Em se tratando de estudos de viabilidade celular, embora a melhor documentação da viabilidade pós-preservação hipotérmica de ilhotas pancreáticas do rato seja a reversão do estado de diabetes experimental pelo transplante de ilhotas isogênicas, existe necessidade de se utilizar testes rápidos e simples de viabilidade celular, tanto para estudos experimentais quanto para avaliação de ilhotas pancreáticas humanas antes do transplante clínico das mesmas.

A determinação da desidrogenase láctica (LDH) em soluções de preservação, vem sendo utilizada como marcador de dano celular pós-preservação a frio de vários órgãos e tecidos, incluindo pulmão, rim e fígado (SUGITA et al., 1999; ZAGER et al., 1999; MATSUDA et al., 1999) e nós tentamos avaliar sua utilidade para a apreciação da viabilidade pós-preservação a frio de ilhotas do rato.

Em estudos preliminares observou-se que quando 50 ilhotas pancreáticas eram preservadas a frio em 400 µL de HBSS, HBSS-RV, UW e UW-RV por 24 horas, não era possível observar-se atividade de LDH nas referidas soluções de preservação. Utilizando-se as mesmas soluções e período de preservação, mesmo dobrando-se o número de ilhotas por tubo e reduzindo-se o volume destas soluções pela metade, a atividade da LDH nestas soluções ainda se encontrava abaixo da linearidade do teste utilizado (valor mínimo para linearidade: 38 U/L; valores obtidos: 2-14 U/L).

Frente a estes resultados iniciais determinou-se a atividade de LDH em ilhotas pancreáticas e tecido pancreático exócrino e, também, em 2 órgãos onde a atividade da LDH é utilizada como marcador de dano celular pós-preservação: rim e fígado. Os resultados demonstraram que a atividade tecidual da LDH em ilhotas pancreáticas de ratos LEW é muito baixa para ser utilizada, com a metodologia empregada, como um marcador de dano celular pós-preservação e que esta atividade é significativamente menor do que verificada para o tecido pancreático exócrino, rins e fígados.

SEKINE et al., (1994) documentaram recentemente que as células β do pâncreas possuem baixa atividade tissular de LDH, baixo transporte transcelular de lactato, e aumentada atividade tissular de glicerol fosfato desidrogenase mitocondrial (GPDHm). Comparativamente ao fígado, a atividade de LDH encontrada pelos autores foi 100 vezes menor nas células β , em linha com os resultados por nós obtidos que demonstraram atividade 84 vezes menor (nas ilhotas, as células β compreendem 60-80% do conteúdo celular, sendo o restante constituído principalmente por células α , δ , PP e endoteliais). Estes autores sugerem que a baixa relação LDH/GPDHm nas células β seja importante na percepção das alterações e na estimulação preferencial da oxidação mitocondrial (glicólise oxidativa) sobre a glicólise anaeróbica nas células β frente aos aumentos de glicose, e comentam que a atividade da LDH em células β é pelo menos 100 vezes menor do que para todas as células de mamíferos até então estudadas.

JIAKLI et al. (1996) confirmaram os resultados de baixa atividade tissular de LDH em células β e a importância desta baixa atividade para a estimulação preferencial da glicólise oxidativa. ISHIHARA et al., (1999) em estudos promovendo expressão aumentada de transportadores de monocarboxilato nas membranas citoplasmáticas de células β (transportam lactato e piruvato), concluíram que a baixa atividade de transportadores de monocarboxilato nas membranas e a baixa atividade de LDH nas células β protegem as mesmas dos efeitos estimulatórios do lactato, evitando a secreção desnecessária, e ao nosso ver inadequada, de insulina em estados catabólicos como, por exemplo, exercício.

5.3. DIABETES EXPERIMENTAL PELA ESTREPTOZOCINA

Modelos animais experimentais são freqüentemente utilizados para pesquisas sobre diabetes mellitus. Embora vários modelos animais de promoção de diabetes mellitus estejam disponíveis (MENDEZ&RAMOS, 1994), o mais frequentemente utilizado é a indução de diabetes químico pela administração dos tóxicos para células β , aloxana e estreptozocina. A dose diabetogênica de uma dada substância é definida como a quantidade

do agente indutor que promove necrose de células β e hiperglicemia mantida em pelo menos 80% dos animais de uma dada espécie, mas não causa dano a outros órgãos.

Com relação a estreptozocina, a mesma foi isolada e caracterizada como um antimicrobiano de largo espectro a partir de colônias de *Streptomyces achromogenes* (HERR, EBLE, JAHNKE, 1960). Baseado nos estudos pré-clínicos da estreptozocina que revelaram que sua administração endovenosa em altas doses produzia diabetes mellitus em ratos e cães, RAKIETEN, RAKIETEN, NADKARNI (1963) estabeleceram que a administração de 50 mg/kg EV de STZ promovia diabetes de longa duração em ratos e cães e que as ilhotas de Langerhans dos animais diabéticos encontravam-se rotas e com diminuição importante ou ausência dos grânulos das células β .

Em uma série de estudos JUNOD et al. (1967; 1969) confirmaram a especificidade da lesão das células β , documentando que evidência histológica já é observável após 1 hora e máxima em 7 horas, sendo que após 24 horas o conteúdo de insulina das células β é reduzido em 95% ou mais, e estabeleceram a dose diabetogênica para ratos Wistar.

SCHNEDL et al. (1994) demonstraram que esta toxicidade dirigida para as células β é devida a similaridade da molécula de STZ com a da glicose o que permite que a mesma seja internalizada via transportadores GLUT2. GLUT 2 está presente ainda em hepatócitos, células epiteliais intestinais e renais, e astrócitos de alguns núcleos cerebrais, conferindo capacidade glico-sensora às células em que se encontra expresso (MACHADO, 1998). THULESEN et al. (1997) relataram que o tratamento com insulina diminui a expressão de GLUT2 nas células β pancreáticas e previne a ação diabetogênica da estreptozocina.

A ação celular da estreptozocina parece envolver produção de ERMO (ASPLUND et al., 1984) capazes de promover alquilação de bases de DNA em vários níveis, as quais quando reparadas causam alterações letais no metabolismo de células β por acarretarem depleção de NAD. Recentes evidências sugerem que o óxido nítrico possa estar envolvido neste mecanismo de citotoxicidade. De fato, o óxido nítrico está envolvido na

fragmentação de DNA vista em células apoptóticas e pode interagir com O_2 para gerar hidroxila, ERMO altamente reativa. Nitrito pode ser liberado por decomposição espontânea da STZ (TAKAMA et al., 1995) e acarretar produção de óxido nítrico. BEDOYA, SOLANO, LUCAS (1996) demonstraram que o bloqueio da produção de óxido nítrico nas ilhotas diminui a fragmentação de DNA promovida pela STZ.

Além do modelo tóxico acarretado pela injeção de dose única elevada de STZ, a mesma se administrada por 5 dias consecutivos, intravenosa ou intraperitonealmente, em doses pequenas, é capaz de induzir diabetes por insulinite em camundongos (LIKE&ROSSINI, 1976). WEIDE& LACY (1991) demonstraram que a natureza da insulinite é auto-imune, possivelmente devido a indução de neoantígenos nas ilhotas por ação da STZ.

Em nosso trabalho verificamos que para ratos Wistar não isogênicos estudados a dose diabetogênica de STZ é de 60 mg/kg. Já para os ratos Lewis isogênicos analisados a dose diabetogênica de 50 mg/kg, sendo a de 60 mg/kg por demais tóxica e a de 40 mg/kg insuficiente.

Nos estudos com diferentes rotas de administração de estreptozocina para ratos Wistar-Furth isogênicos, comprovamos que a dose de 60 mg/kg EV (quer veia sublingual, quer veia de cauda) promove diabetes mantido por 40 semanas em 100% dos animais estudados. Com esta dose, porém, toxicidade sistêmica apreciável ocorreu após o uso da droga pela veia sublingual, a exemplo do verificado com a mesma dose e via para Lewis isogênicos. A administração de STZ por via intraperitoneal não promoveu em 30% dos animais, após 2 semanas de observação, diabetes como definido operacionalmente. Um dos ratos deste experimento, inclusive, encontrava-se severamente diabético na primeira semana após a administração de STZ enquanto que na segunda semana regressão parcial deste estado havia ocorrido.

SIMON&WEST (1992), estudando a administração i.p. de STZ para ratos Wistar encontraram diabetes leve e instável na dose de 45 mg/kg, porém, na dose de 60 mg/kg, como por nós utilizado, o diabetes ocorreu em 100% dos animais e foi duradouro.

Recomendamos, com base em nossos resultados em ratos Wistar-Furth, que caso a via intraperitoneal pela sua natural facilidade for a preferida, que se espere pelo menos 2 semanas para excluir-se reversões espontâneas do diabetes. Sugere-se, também, que para cada determinado grupo de animais a ser estudados seja determinada a dose diabetogênica ideal antes do início dos experimentos propriamente ditos.

Em nossos experimentos, por vezes, houve rotura dos tubos Ependorff durante a centrifugação para obtenção do soro para glicemia. Tal fato é realmente negativo, especialmente levando-se em conta que o reduzido volume plasmático destes animais diabéticos dificulta coletas múltiplas diárias de sangue. Desde que adotamos a conduta de pré-testar os tubos utilizando dobro do tempo previsto para a centrifugação, isto passou a não ser mais um problema.

5.4. TRANSPLANTES INTRAPORTAIS ISOGÊNICOS

Sobre nossos estudos de transplantes intraportais com ilhotas pancreáticas, alguns comentários podem ser feitos. Quanto à época após a indução do diabetes na qual os animais devem ser transplantados, parece-nos prudente que o transplante seja feito de 2-4 semanas após a indução do estado hiperglicêmico para que se evitem transplantes em animais com diabetes ainda instável ou que se transplante animais já bastante debilitados por longa duração do estado hiperglicêmico.

Para nossa colônia de Lewis isogênicos, a melhor dose para indução do diabetes para transplante é a de 50 mg/kg, EV, 40 mg/kg produz um diabetes mais leve, porém, com possibilidade de reversão parcial espontânea para limites aquém do estabelecido como critério operacional de diabetes, dificultando a análise dos resultados. No primeiro grupo de animais transplantados (STZ, 50 mg/kg) pôde-se observar perfeita função dos enxertos por 12 semanas sendo que as glicemias nos meses 9 e 12 pós-transplante encontravam-se elevadas, normalizando-se no 15º mês. Tal comportamento pode refletir deterioração tempo dependente das células β dos transplantes intraportais experimentais, como inicialmente descrito por ZIEGLER, RECKARD, BARKER (1974) e confirmado

posteriormente por outros autores (ALEJANDRO et al., 1986; ORLOFF et al., 1988; HILLER et al., 1991).

Ao contrário do sucesso da primeira série de transplantes na segunda série de transplantes (diabetes pela STZ, 50 mg/kg), embora tenha ocorrido redução da hiperglicemia de todos os receptores pelo transplante, apenas 1 dos 5 animais transplantados pôde ser considerado curado do diabetes experimental. Na análise das possíveis causas, foi identificado que o pH da HBSS em uso -3 frascos distintos preparados na mesma data- era 8 (temperatura ambiente e 4 °C) . As colagenases preparadas com HBSS destes lotes tinham pH = 8 a 4 °C e entre 7,8-7,9 em temperatura ambiente. O pH do HBSS imediatamente após o preparo, pré-filtragem em filtros 0,2 µm da Nalgene®, tinha sido 7,2. Foi preparado, então, novo lote de HBSS. Novamente, após filtragem com os filtros acima mencionados, o pH, a 4 °C, elevou-se de 7,2 para 8,5 em HBSS e 8,5 na colagenase preparada a partir deste HBSS. Por atraso na chegada do material, os filtros utilizados já tinham sua validade expirada. Depois que foram utilizados filtros do mesmo fabricante dentro do prazo de validade, o pH da HBSS pós-filtração não se elevou mais que 0,2 acima do basal verificado imediatamente após o preparo das soluções.

Os resultados dos transplantes foram uniformes com os ratos diabéticos pela STZ na dose de 40 mg/kg. Houve normalização da glicemia já no primeiro dia pós-transplante e isto foi mantido por 15 meses. No entanto, a dose de 40 mg/kg de STZ para induzir diabetes experimental para transplantes não nos pareceu adequada pois 1 animal considerado diabético foi transplantado e quando do transplante a glicemia não se encaixava nos parâmetros de definição de diabetes para os estudos. O fato de que estes 3 animais não apresentaram alterações do controle glicêmico a longo prazo, ao contrário dos animais constantes da primeira série de transplantes, pode sugerir que os primeiros possam ter sido realizados com ilhotas com a viabilidade um pouco comprometida pelo pH da HBSS. A demora em mais de 1 semana para normalização da glicemia pelo transplante para um dos animais da primeira série é uma outra observação na mesma linha de raciocínio. Dados de pH pós-filtração da HBSS preparada para a primeira série de transplantes não são, no entanto, disponíveis.

6. CONCLUSÃO GERAL

1) No momento, a forma mais consistente de reposição das células β por transplante para o paciente insulino-dependente é o transplante do pâncreas total, em que pesem as potenciais complicações associadas a este procedimento.

A confirmação da efetividade dos transplantes intraportais de ilhotas pancreáticas para a cura da hiperglicemia dos diabéticos tipo 1 (Shapiro et al., 2000) representa um grande avanço na área médica e se os resultados deste grupo forem confirmados nos estudos multicêntricos em curso, pela simplicidade do procedimento e pela ausência dos riscos do transplante da parte exócrina do pâncreas, tal transplante deixará de ocupar o lugar de procedimento quase experimental para alcançar estágio de tratamento clinicamente validado.

Para fazer frente ao transplante do órgão total, insulino-independência pelo transplante de ilhotas pancreáticas precisará ser alcançada, de preferência, com transplante das ilhotas obtidas do pâncreas de um único doador. Devido a isto, há necessidade de se incrementar pesquisas visando obter um número maior de ilhotas isoladas por pâncreas e de se minimizar a perda da viabilidade das mesmas durante os períodos de isolamento e preservação a frio que antecedem seu transplante, elevando ao máximo o volume de células β a serem transplantadas.

Em nossos estudos a tentativa de obtenção de um número maior de ilhotas pancreáticas a partir do pâncreas murino pela administração i.p. de RV pré-pancreatectomia seguida de sua adição à HBSS utilizada durante o isolamento não logrou aumentar o número ou a viabilidade das ilhotas obtidas.

2) Com os testes utilizados, a adição de 5 $\mu\text{mol/L}$ de RV para HBSS e UW não melhorou a viabilidade de ilhotas pancreáticas do rato preservadas a frio por 24 horas. Embora a administração intraperitoneal de RV e sua inclusão em Euro-Collins tenham se mostrado benéficas para a viabilidade das ilhotas pancreáticas do rato (48 horas de preservação hipotérmica, teste FDA/EB), acreditamos que estas manobras não deverão encontrar aplicabilidade clínica, principalmente devido a toxicidade para o sistema nervoso e a baixa penetração celular do RV.

Nossos experimentos, em linha com evidências recentes disponíveis na literatura, mostraram que preservação a frio das ilhotas pancreáticas do rato em HBSS, solução utilizada por vários centros para o isolamento e preservação a frio por curto período de ilhotas pancreáticas de animais de experimentação e humanas, resultou em importante redução da viabilidade celular após 24 horas de preservação, por todos os testes de viabilidade celular utilizados.

O bom desempenho da solução de Euro-Collins em nossos estudos, a qual foi capaz de preservar por 24 horas a viabilidade de ilhotas pancreáticas do rato de maneira idêntica à solução de UW, solução padrão para a preservação a frio de pâncreas e ilhotas pancreáticas, sugere que a mesma possa vir a ser testada, em substituição à HBSS, para o isolamento de ilhotas pancreáticas humanas, especialmente porque a solução de UW, escolha natural, é muito viscosa e tem efeito inibitório sobre a ação da collagenase em pâncreas humanos.

3) Embora testes *in vitro* sejam indispensáveis para estudos de soluções de preservação celular, em se tratando de estudos com ilhotas pancreáticas a prova definitiva de viabilidade pós-preservação a frio destas é obtida pela demonstração de reversão da hiperglicemia de animais isogênicos com diabetes experimental pelo transplante das mesmas.

Como resultado de nossos estudos, estabelecemos junto ao Laboratório de Pós-Graduação e ao Biotério do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina os modelos do rato diabético pela estreptozocina e do transplante intraportal isogênico de ilhotas pancreáticas, modelos estes que serão utilizados para o prosseguimento de estudos *in vivo* envolvendo preservação a frio de ilhotas pancreáticas.

A partir de nossas observações com estes modelos podemos sugerir que se determine a dose diabetogênica de estreptozocina para cada colônia de animais a ser estudada, previamente ao início dos estudos propriamente ditos, e que, para o transplante intraportal de ilhotas panceáticas murinas, utilizem-se animais diabéticos entre 2-4 semanas após a administração de STZ, uma vez que neste intervalo o diabetes químico já se encontra estável e os animais ainda não se encontram muito debilitados pelo diabetes experimental.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUNA, G.M.; SUTHERLAND, D.E.R.; FLORACK, G.; NAJARIAN, J. – Function of transplanted human pancreatic allografts after preservation in cold storage for 6 to 26 hours. **Transplantation**, **43**: 630-36, 1987.
- ALEJANDRO, R.; CUTFIELD, R.G.; SHIENVOLD, F.L.; POLONSKY, K.S.; NOEL, J.; OLSON, L.; DILLBERGER, J; MILLER, J.; MINTZ, D.H. - Natural history of intrahepatic canine islet cell autografts. **J. Clin. Invest.**, **78**: 1339-48, 1986.
- ALLEN, R.D.M. – Pancreas transplantation. In: FORSYTHE, J.L.R. – **Transplantation Surgery**. London. Saunders, 1997. p.166-201.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. - Economic consequences of diabetes mellitus in the US in 1997. **Diabetes Care** **21**: 296-309, 1998.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. - Pancreas transplantation for patients with tipe 1 diabetes. **Diabetes Care** **23**(suppl.1): S85-S86, 2000.
- ASPLUND, K.; GRANKVIST, K.; MARKLUND, S.; TÄLJEDAL, I-R. - Partial protection against streptozotocin-induced hyperglycaemia by superoxide dismutase linked to polyethylene glycol. **Acta Endocrinol.**, **107**: 390-394, 1984.
- BALLINGER, W.F. & LACY, P.E. - Transplantation of intact pancreatic islets in rats. **Surgery** **72**: 175-86, 1972.
- BECKER, B.N.; BRAZY, P.C.; BECKER, Y.T.; BECKER, J.S.O.; PINTAR, T.J.; COLLINS, B.H.; PIRSCH, J.D.; LEVERSON, G.E.; HEISEY, D.M.; SOLLINGER, HW. - Simultaneous pancreas-kidney transplantation reduces excess mortality type 1 diabetic patients with end-stage renal disease. **Kidney Int.**, **57**: 2129-35, 2000.
- BECKER, Y.T.; COLLINS, B.H.; SOLLINGER, H.W. – Technical complications of pancreas transplantation. **Curr. Opin. Org. Transplant.**, **3**: 253-57, 1998.
- BEDOYA, F.J.; SOLANO, F.; LUCAS, M.; - N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formationin pancreatic rat islets. **Experientia**, **52**: 344-347, 1996.

- BEHBOO, R.; CAROLL, P.B.; UKAH, F.; GAO, W.; KIRSH, D.; DEDOUSIS N.; PHIPPS, J.; RICORDI, C. One-hour incubation in Euro-Collins improves islet purification. **Transplant. Proc.**, **26**: 645, 1994.
- BELLMANN, K.; HIU, L.; RADONS, J.; BURKART, V.; KOLB, H. - Low stress response enhances vulnerability of islet cell in diabetes prone BB rats. **Diabetes**, **46**: 232-36, 1997.
- BELZER, F.O. & SOUTHARD, J.H. - Principles of solid-organ preservation by cold storage. **Transplantation**, **45**: 673-76, 1988.
- BENGT, J. - The economic impact of diabetes. **Diabetes Care**, **21**(suppl.3): 7C-10C, 1998.
- BENHAMOU, P.Y.; WATT, P.C.; MULLEN, Y.; INGLES, S.; WATANABE, Y.; NOMURA, Y.; HOBER, C.; MIYAMOTO, M.; KENMOCHI, T.; PASARO, E.P.; ZINNER, M.J.; BRUNICARDI, C. - Human islet isolation in 104 consecutive cases: factors affecting isolation success. **Transplantation**, **57**: 1804- 1994.
- BENNET, W.; SUNDBERG, B.; GROTH, C.G.; BRENDEN, M.D, BRANDHORST D, BRANDHORST, H.; BRETZEL, R.G.; ELGUE, G.; LARSON, R; NILSSON, B.; KORSGREN, O. - Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans: a finding with implications for clinical islet transplantation? **Diabetes**, **48**: 1907-14, 1999.
- BENZI, R.H, & LERCH, R. - Dissociation between contractile function and oxidative metabolism in postischemic myocardium: attenuation by ruthenium red administered during reperfusion. **Circ. Res.**, **71**: 567-76, 1992.
- BISHOP, A.E. & POLAK, J.M. - The anatomy, organization and ultrastructure of islets of Langerhans. In: PICKUP, J.C.; WILLIAMS, G. - **Textbook of diabetes**. London. Blackwell, 1991. p.57-71
- BRETZEL, R.G. - Pancreatic transplantation (islet cell). In: **Transplantation surgery**. London. Saunders, 1997. p.203-228.

- BURKART, V.; KOIKE, T.; BRENNER, H.H.; KOLB, H. – Oxygen radicals generated by the enzyme xanthine oxidase lyse rat pancreatic cells in vitro. **Diabetologia**, **35**: 1028-34, 1992.
- CALNE R.Y.; PEGG D.E.; PRYSE-DAVIES J.; BROWN F.L. – Renal preservation by ice-cooling: an experimental study relating to kidney transplantation to cadavers. **Br. Med. J.**, **2**: 651-655, 1963.
- CARAFOLI, E. - The signaling function of calcium and its regulation. **J Hypert.**, **12**(suppl.10): S47-S56, 1994.
- CARPENTER-DEYO, L. & REED, D.J. – II. Involvement of calcium and iron in Quin 2 toxicity to isolated hepatocytes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **258**: 747-752, 1991.
- CASHION, A.K.; HATHAWAY, D.K.; MILSTEAD, E.J.; REED, L.; GABER, O. - Changes in patterns of 24-hr heart rate variability after kidney and kidney-pancreas transplant. **Transplantation**, **68**: 1846-50, 1999.
- CHACON, E. & ACOSTA, D. - Mitochondrial regulation of superoxide by Ca^{++} : an alternate mechanism for the cardiotoxicity of doxorubicin. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, **107**: 117-28, 1991.
- CHEN, Q.; JONES, T.W.; STEVENS, J.L. - Early cellular events couple covalent binding of reactive metabolites to cell killing by nephrotoxic cystein conjugates. **J. Cell Physiol.**, **161**: 293-302, 1994.
- CHEUNG, A.T.W.; PEREZ, R.V.; CHEN, P.C.Y. – Improvements in diabetic microangiopathy after successful simultaneous pancreas-kidney transplantation: a computer-assisted intravital microscopy study on the conjunctival microcirculation. **Transplantation**, **68**: 927-32, 1999.
- CHRISTOPHE, D.; VANOVERSCHDELDE, J.H.; GOUDEMANT, J.F.; MOTTET, I. – Protection against injury by nonvasoactive concentrations of nitric oxid synthase inhibitors in the perfused heart. **Circulation**, **92**: 1911-1918, 1995.

- CLARK Jr, C.M. & LEE, A. – Prevention of the complications of diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, **322**: 1210-17, 1995.
- COLLINS, G.M.; BRAVO-SHUGARMAN, M.; TERASAKI, P.E. Kidney preservation for transplantation: initial perfusion and 30 hours'ice storage. **Lancet**, **2**: 1219-1222, 1969.
- COLLINS, G.M.; BARRY, J.M.; MAXWELL, J.G.; SAMPSON, D.; VANDER WERF, B.A. – The value of magnesium in flush solutions for human cadaveric kidney preservation. **J. Urol.**, **131**: 220-22, 1984.
- COMISSÃO REGIONAL DE NEFROLOGIA SP E CENTRO DE INFORMÁTICA DA EPM - Idade, sexo e diagnóstico dos pacientes em diálise na grande São Paulo. **J. Bras. Nefrol.** **16**: 83-86, 1994.
- CONTRACTOR, H.H.; JOHNSON, P.R.; CHADWICK, D.R.; ROBERTSON, G.S.; LONDON, N.J. – The effect of UW solution and its components on the collagenase digestion of human and porcine pancreas. **Cell Transpl.**, **4**: 615-19, 1995.
- COTTERILL, L.A.; GOWER, J.D.; FULLER, J.; GREEN, C.J. - Oxidative damage to kidney membranes during cold ischemia: evidence of a role for calcium. **Transplantation**, **48**: 745-51, 1989.
- D'ALESSANDRO, A.M.; STRATTA, R.J.; SOLLINGER, H.W.; KALAYOGLU, M.; PIRSCH, JD; BELZER, F.O. - Use of UW solution in pancreas transplantation. **Diabetes**, **38**(suppl.1): 7-9, 1989.
- DCCT RESEARCH GROUP. - The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, **329**: 977-86, 1993.
- DCCT RESEARCH GROUP. – Lifetime benefits and costs of intensive therapy as practiced in the Diabetes Control and Complications Trial. **JAMA**, **276**: 1409-15, 1996.

- DECKERT, T.; POULSEN, J.E.; LARSEN, M. – Prognosis of diabetics with diabetes before the age of thirtyone. II. Factors influencing the prognosis. **Diabetologia**, **14**: 371-77, 1978.
- DELFINO, V.D.A.; GRAY, D.W.R.; LEOW, K.; SHIMIZU, S.; Ferguson, D.J.P., MORRIS, P.J. – A comparison of four solutions for cold storage of pancreatic islets. **Transplantation**, **56**: 1325-30, 1993.
- DELFINO, V.D.A. & MOCELIN, A.J. – Diabetes mellitus: uma viagem ao passado. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, **41**: 43-46, 1997.
- DENIZOT, F. & LANG, R. – Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods**, **89**: 271-77, 1986.
- DESSI, F.; BEM-ARI, Y.; CHARRIAUT-MARLANGUE, C. Ruthenium red protects against glutamate-induced neuronal death in cerebellar culture. **Neurosci. Lett.**, **201**: 53-56, 1995.
- DOWNESS, G.; HOFFMAN, R; HUANG, J.; BELZER, F.O. – Mechanisms of action of washout solutions for kidney preservation. **Transplantation**, **16**: 46-53, 1973.
- DWYER, D.S.; GORDON, K.; JONES, B. - Ruthenium red potently inhibits immune responses both *in vitro* and *in vivo*. **Int. J. Immunopharmacol.**, **17**: 931-40, 1995.
- DYBOWSKA, U.; KRAWCZYNSKA, W.; SOBOTA, A. - Phagocytosis occurs in *Acanthamoeba castelani* after electroporation. **Cell Mol. Biol.**, **42**: 881-888, 1996.
- ESCANDE-GÉRAUD, M.L.; ROLS, M.P.; DUPONT, M.A.; GAS, N.; TEISSIÉ, J. – Reversible plasma membrane ultrastructural changes correlated with electroporation in Chinese hamster ovary cells. **Bioch. Biophys. Acta**, **939**: 247-59, 1988.
- FAJANS, S.S. – Diabetes mellitus: classification and testing procedures. In DeGROOT, L.J. – **Endocrinology**. 9 ed. Philadelphia. Saunders, 1991. p.1346-1356.

- FERREIRA, A.L.A. & MATSUBARA, L.S. – Radicais livres: conceito, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Bras.**, **43**: 61-68, 1997.
- FIGUEREDO, V.M.; DRESDNER Jr, K.P.; WOLNEY, A.C.; KELLER, A.M. - Postischaemic reperfusion injury in the isolated rat heart: effect of ruthenium red. **Cardiov. Res.**, **25**: 337-42, 1991.
- FIORETTO, P.; MAUER, S.M.; BILOUS, R.W.; GOETZ, F.C.; SUTHERLAND, D.E.R.; STEFFES, M.W. – Effects of pancreas transplantation on glomerular structure in insulin-dependent patients with their own kidneys. **Lancet**, **342**: 1193-96, 1993.
- FIORETTO, P.; STEFFES, M.W.; SUTHERLAND, D.E.R.; GOETZ, F.C.; MAUER, M. - Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. **N. Engl. J. Med.**, **339**: 69-75, 1998.
- FLORACK, G. - Preservation of pancreatic grafts. In: GROTH, G.G. – **Pancreatic transplantation**. Philadelphia. Saunders, 1988. p.61-85.
- FORBES, M.S. & SPERALAKIS N. - Ruthenium-red staining of skeletal and cardiac muscles. **Cell Tissue Res.**, **200**: 367-82, 1979.
- GARCÍA-UGALDE, G. & TAPIA, R. - Convulsion and wet-dog shakes produced by systemic or intrahippocampal administration of ruthenium red in the rat. **Exp. Brain Res.**, **86**: 633-40, 1991.
- GETTMAN, M.; LEVY, J.B.; ENGEN, D.E.; NEHRA, A. – Urological complication after kidney-pancreas transplantation. **J. Urol.** **159**: 38-42, 1998.
- GOTOH, M.; MAKI, T.; SATOMI, S.; PORTER, J.; BONNER-WIER, S.; O'HARA, C.J.; MONACO, A.P. – Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic duct or portal venous collagenase injection. **Transplantation**, **43**: 725-30, 1987.

- GRAY, D.W.R & MORRIS, P.J. - The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a viability stain for isolated islets of Langerhans. **Stain Technol.**, **62**: 373-381, 1987.
- GROSKREUTZ, J.L.; BRONK, S.F.; GORES, G.J. - Ruthenium red delays the onset of cell death during oxidative stress of rat hepatocytes. **Gastroenterology**, **102**: 1030-38, 1992.
- GRUESSNER, A. C.; SUTHERLAND, D.E.R, GRUESSNER, R.W. - Report of the International Pancreas Transplant Registry. **Transplant. Proc.**, **30**: 242-43, 1998.
- GUPTA, M.P.; DIXON, I.M.C.; ZHAO, D.; DHALLA, N.S. - Influence of ruthenium red on heart subcellular calcium transport. **Can. J. Cardiol.**, **5**: 55-63, 1989.
- HANSFORD, R.G. - Relation between cytosolic free Ca^{2+} concentration and the control of pyruvate dehydrogenase in isolated cardiac myocytes. **Biochem. J.**, **24**: 145-51, 1987.
- HELLESTRÖM C. - A method for microdissection of intact pancreatic islets of mammals. **Acta Endocrinol.**, **45**: 122-132, 1964.
- HERCHUELZ, A.; COUTURIER, E.; MALAISSE, W.J. - Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: Glucose-induced calcium-calcium exchange. **Am. J. Physiol.**, **238**: E96-103, 1980.
- HERR, R.R.; EBLE, T.E.; JAHNKE, H.K. - Isolation and characterization of streptozotocin. *In* **Antibiotic Annual 1959-1960**. New York, Antibiotica, 1960. p. 236-240.
- HILARY, K.; AUBERT, R.E.; HERMAN, W. - Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates and projections. **Diabetes Care**, **21**: 1414-31, 1998.
- HILLER, W.F.A.; KLEMPNAUER, J.; LÜCK, R.; STEINIGER, B. - Progressive deterioration of endocrine function after intraportal but not kidney subcapsular rat islet transplantation. **Diabetes**, **40**: 134-40, 1991.

- HOWELL, S.L.; MONTAGUE, W.; TYHURST, M. - Calcium distribution in islets of Langerhans: a study of calcium concentrations and of calcium accumulation in B cell organelles. **J. Cell. Sci.**, **19**: 395-409 , 1975.
- HRICIK, D.E. – Combined kidney-pancreas transplantation. **Kidney Int.**, **1998**: 1091-102, 1998.
- INTERNATIONAL ISLET TRANSPLANT REGISTRY. **Newsletter N° 8**, draft. www.med.uni-giessen.de/itr/ (acessado em 12 novembro 2000).
- ISHIHARA, H.; HAIYAM, W.; DREWES, L.R.; WOLLHEIM, C.B. – Overexpression of monocarboxylate transporter and lactate dehydrogenase alters insulin secretory responses to pyruvate and lactate in [beta] cells. **J. Clin. Invest.**, **104**: 1621-1629, 1999.
- JANJIC, D. & WOLLHEIM, C.B. Islet cell metabolism is reflected by the MTT (tetrazolium) colorimetric assay. **Diabetologia**, **35**: 482-485, 1992.
- JJAKLI, H.; RASSCHAERT, J.; NADI, A.B.; LECLERCQ-MEYER, V.; SENER, A.; MALLAISE, W.J. – Relevance of lactate dehydrogenase activity to the control of oxidative glycolysis in pancreatic islet B-cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, **327**: 260-264, 1996.
- JINDAL, R. & GRAY, D. - Preservation and storage of pancreatic islets. **Transplantation** **57**: 317-321, 1994.
- JUNOD, A; LAMBERT, A.E.; ORCI, L; GONET, A.E.; RENOLD, A.E. - Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (32401). **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **126**: 201-205, 1967.
- JUNOD, A; LAMBERT, A.E.; STAUFFACHER, W.; RENOLD, A.E. Diabetogenic action of streptozocin: relationship of dose to metabolic response. **J. Clin. Invest.**, **48**: 2129-2139, 1969.

- JURA, W.G.Z.O. - The integrity of host lymphocyte plasmalemma during its invasion by *Theileria annulata* sporozoites as demonstrated by ruthenium red staining. *Vet. Parasitol.*, **17**: 279-86, 1984/1985.
- KALAYOGLU, M.; STRATTA, R.J.; HOFFMAN, R.M.; SOLLINGER, H.W., D'ALESSANDRO, A.M.; PIRSCH, J.D.; BELZER, F.O. - Extended preservation of the liver for clinical transplantation. *Lancet*, **1**: 617-619, 1988.
- KEHRER, J.P.; & PARK, Y. Purity of ruthenium red used in pharmacological research. *J. Pharmacol. Methods*, **25**: 179-183, 1991.
- KELLY, W.D.; LILLEHEI, R.C.; MERKEL, F.K. - Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery*, **61**: 827-37, 1967.
- KEMP, C.B.; KNIGHT, M.J.; SCHARP, D.W.; LACY, P.E.; BALLINGER, W.F. Transplantation of isolated pancreatic islets into the portal vein of diabetic rats. *Nature*, **244**: 447, 1973.
- KENDALL, D.M.; TEUSCHER, A.U.; ROBERTSON, R.P. - Defective glucagon secretion during sustained hypoglycemia following successful islet allo- and auto transplantation in humans. *Diabetes*, **46**: 23-27, 1997.
- KENMOCHI, T.; MIYAMOTO, M.; SASAKI, H.; UNE, S.; NAKAGAWA, Y.; MOLDOVAN S.; BENHAMOU, P.Y.; BRUNICARDI, F.C.; TANAKA, H.; MULLEN, Y. - LAP-1 cold preservation solution for isolation of high-quality human pancreatic islets. *Pancreas*, **17**: 367-77, 1998.
- KIM, B.J.; KIM, Y.H.; KIM, S.; KIM, J.W.; KOH, J.Y.; OH, S.H.; LEE, M.K.; KIM, K.W. LEE, M.S. - Zinc as a paracrine effector in pancreatic islet cell death. *Diabetes*, **49**: 367-72, 2000.
- KIM, Y.K.; JUNG, S.H.L.; KIM, Y.W. - Effects of antioxidants and Ca^{2+} in cisplatin-induced cell injury in rabbit renal cortical slices. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **146**: 261-69, 1997.

- KNETMAN, N.M.; DeGROOT, T.J.; WARNOCK, G.L.; RAJOTTE, RV. - Pancreas preservation prior to islet isolation: evaluation of storage solutions in a rodent model. **Transplant. Proc.**, **22**: 541-542, 1990.
- KRISTIÁN, T. & SIESJÖ, B.K. – Calcium in ischemic cell death. **Stroke**, **29**: 705-718, 1998.
- KUHN, F.; ABRI, O.; LÖHDE, E., GUTTE, N; SCHULZ, H.J.; JAHR, H. – In vitro rapid colorimetric assay for viability control of fresh isolated and deep-frozen human pancreatic islets. **Diabetes**, **38**(suppl.1): 278, 1989.
- LAKE, S.P.; ANDERSON, J.; CHAMBERLAIN, J.; GARDNER, S.J.; BELL, P.R.F.; JAMES, R.F.L. – Bovine serum albumin density gradient isolation of rat pancreatic islets. **Transplantation**, **43**: 805-808, 1987.
- LANZA, R.P. & CHICK, W.L. – Transplantation of encapsulated cells and tissues. **Surgery**, **121**: 1-8, 1997.
- LATIF, Z.A.; NOEL, J.; ALEJANDRO, R. - A simple method of staining fresh and cultured islets. **Transplantation**, **45**: 827-830, 1988.
- LEMASTERS, J.H., NIEMINEN, A.; QIAN, T., TROST, L.C.; HERMAN, B. - The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. **Mol. Cell Biochem.**, **174**: 159-65, 1997.
- LIKE, A.A & ROSSINI, A.A. - Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. **Science**, **193**: 415-17, 1976.
- LINETSKY, E.; BOTTINO, R.; ROGER, L.; ALEJANDRO, R.; INVERARDI, L.; RICORDI, C. – Improved human islet isolation using a new enzyme blend, liberase. **Diabetes**, **46**: 1120-23, 1997.

- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. – Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, **193**: 265-75, 1951.
- LUFT HL. - Ruthenium red and violet: I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. **Anat. Rec.**, **171**: 347-368, 1971a.
- LUFT HL. Ruthenium red and violet: II. Fine structural location in animal tissues. **Anat. Rec.**, **171**: 369-416, 1971b.
- MACHADO, U.F. – Transportadores de glicose. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, **42**: 413-21, 1998.
- MaCKNIGHT, A.D.C. & LEAF, A. – Regulation of cellular volume. **Physiol. Rev.**, **3**: 510-73, 1977.
- MALÉCOT, C.O.; BITO, V. ARGIBAY, J.A. - Ruthenium red as an effective blocker of calcium and sodium currents in guinea-pig isolated ventricular heart cells. **Br. J. Pharmacol.**, **124**: 465-72, 1998.
- MALERBI, D.A. & FRANCO, L.J. – The Brazilian Cooperative Group on the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in urban brazilian population aged 30-69 years **Diabetes Care**, **15**: 1509-15, 1992.
- MANDRUP-POULSEN, T. – Recent advances: diabetes . **Br. Med. J.**, **316**: 1221-25, 1998.
- MARK, S.; LARSON, T.S.; KUDVA, Y.C.; GRANDE, J.P.; NYBERG, S.L.; PRIETO, M.; VELOSA, J.A.; RIZZA, R.A. – Pancreas transplantation for the prevention of diabetic nephropathy. **Mayo Clin. Proceed.**, **75**: 49-56, 2000.
- MATSUDA, H.; YAGI, T.; MATSUOKA, J.; YAMAMURA, H.; TANAKA, N. Subzero nonfreezing storage of isolated hepatocyte in Universitu of Wisconsin solution. – **Transplantation**, **67**: 186-91, 1999.

- MCCORMACK, J.G. & ENGLAND, P.J. - Ruthenium red inhibit the activation of pyruvate dehydrogenase caused by positive inotropic agents in perfused rat heart. **Biochem. J.**, **214**: 581-85, 1983.
- MEDRANO, C.J. & FOX, D.A. - Substrate-dependent effects of calcium on retinal mitochondrial respiration: physiological and toxicological studies. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, **125**: 309-21, 1994.
- MEINICKE, A.R.; ZAVAN, S.S.; FERREIRA, A.M.C.; VERCESI, A.E.; BECHARA, J.H. - The calcium sensor ruthenium red can act as a Fenton-type reagent. **Arch. Biochem. Biophys.**, **2**: 239-244, 1996.
- MEINICKE, A.R.; BECHARA, E.J.H.; VERCESI, A. Ruthenium red-catalyzed degradation of peroxides can prevent mitochondrial oxidative damage induced by either tert-butyl hydroperoxide or inorganic phosphate. **Arch. Biochem. Biophys.**, **349**: 275-280, 1998.
- MENDEZ, J.D. & RAMOS, HG. - Animals models in diabetes research. **Arch. Med. Res.**, **25**: 367-75, 1994.
- MEYER, C.D.; DAVIS, M.A.; PERIANA, C.J. - Synthesis and biological distribution of radiolabeled ammineruthenium (III) -amino acid complexes as potential pancreatic imaging agents as potential pancreatic imaging agents. **J. Med. Chem.**, **26**: 737-42, 1983.
- MIYAMAE, M.; CAMACHO, A.S.; WEINER, M.W.; FIGUEREDO, V.M. - Attenuation of postischemic reperfusion injury is related to prevention of $[Ca^{2+}]_m$ overload in rat hearts. **Am. J. Physiol.**, **271**: H2145-2153, 1996.
- MOSKALEWSKI, S. - Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. **Gen. Comp. Endocrinol.**, **5**: 342-353, 1965.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.**, **65**: 55-63, 1983.
- MUNN, S.R.; KAUFMAN, D.B.; FIELD, M.J.; VISTE, M.J.; SUTHERLAND, D.E.R. - Cold storage of the canine and rat pancreas prior to islet isolation. **Transplantation**, **47**: 28-31, 1989.
- NANKIVELL, B.J.; SIEW-GEK, L.; CHAPMAN, J.R.; O'CONNEL, P.J.; FLETCHER, J.P.; ALLEN, R.D.M. - Progression of the macrovascular disease after transplantation. **Transplantation**, **69**: 574-81, 2000.
- NATHAN, D.M. - Long term complications of diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med**, **328**: 1676-85, 1993.
- NAVARRO, X; SUTHERLAND, D.E.R.; KENNEDY, W.R. - Long-term effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy. **Ann. Neurol.** **42**: 727-36, 1997.
- OBERHOLZER, J.; TRIPONEZ, F.; MAGE, R.; ANDEREGGEN, E.; BÜHLER, L.; CRÉTIN, N.; FOURNIER, B.; GOUMAZ, C.; LOU, J.; PHILIPPE, J.; MOREL, P. - Human islet transplantation: lessons from 13 autologous and 13 allogenic transplantations. **Transplantation**, **69**: 1115-23 2000.
- OLACK, B.; SWANSON, C.; McLEAR, M.; LONGWITH, J.; SCHARP, D.; LACY, P.E. - Islet purification using Euro-Ficoll gradients. **Transplant. Proc.**, **23**: 774-776, 1991.
- ORLOFF, M.A.; MACEDO, A.; GREENLEAF, G.E.; GIRARD B. - Comparison of the metabolic control achieved by whole pancreas transplantation and pancreatic islet transplantation in rats. **Transplantation**, **45**: 307-12, 1988.
- PAI, G.M.; SLAVIN, B.G.; TUNG, P.; WOLK, B.W.; JOHNSON, D.G.; ANDERSON, D.G.; LEVIN, S.R. - Morphologic basis for loss of regulated insulin secretion by isolated rat pancreatic islets. **Anat. Rec.**, **237**: 498-05, 1993.

- PARAIDATHATHU, T.; DE GROOT, H.; KEHRER, J. - Production of reactive oxygen by mitochondria from normoxic and hypoxic rat heart tissue. **Free Radic. Biol. Med.**, 13: 289-297, 1992.
- PIRART, J. - Diabetes mellitus and its complications: a prospective study of 4400 patients observed between 1947 and 1973. **Diabetes Care**, 1: 168-188, 1978.
- PYZDROWSKI, K.; KENDALL, D.M.; HALTER, J.B.; NAKHLEH, R.E.; SUTHERLAND, D.E.R.; ROBERTSON, P.R. - Preserved insulin secretion and insulin independence in recipients of islet autografts. **N. Engl. J. Med.**, 327: 220-226, 1992.
- RABKIN, J.; OLYAEI, A.J.; ORLOFF, S.L.; GEISLER, S.M.; WAHOFF, D.C.; HERING, B.J.; SUTHERLAND, D.E.R. - Distant processing of pancreas islets for autotransplantation following total pancreatectomy. **Am. J. Surg.**, 177: 423-27, 1999.
- RAISON, J.K.; LYONS, J.M.; MEHLHORN, R.J.; KEITH, A.D. - Temperature-induced phase changes in mitochondrial membranes detected by spin labeling. **J. Biol. Chem.**, 246: 4036-40, 1971.
- RAKIETEN, N.; RAKIETEN, L.; NADKARNI, M. - Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). **Cancer Chemother. Rep.**, 29: 91-98, 1963.
- REED, K.C. & BYGRAVE, F.L. - The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red. **Biochem. J.**, 140: 143-55, 1974.
- REICHARD, P.; NILSON, B.Y.; ROSENQVIST, U. - The effect of long-term intensified insulin treatment on the development of microvascular complications of diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, 329: 304-309, 1993.
- RICORDI, C.; LACY, P.E.; FINKE, E.H.; OLACK, B.J.; SHARP, D.W. - Islet isolation assessment in man and large animals. **Diabetes**, 37: 185-189, 1988.

- RICORDI, C.; TZAKIS, A. G.; CARROL, P. B.; ZENG, Y.; RILO, H.L.R.; ALEJANDRO, R.; SHAPIRO, R.; FUNG, J.J.; DEMETRIS, A. J.; MINTZ, D.; STARZL, T.E. – Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. **Transplantation**, **53**: 407-14, 1992.
- ROBERTSON, R.P.; SUTHERLAND, D.E.R.; LANZ, K.J. – Normoglycemia and preserved insulin secretory reserve in diabetic patients 10-18 years after pancreas transplantation. **Diabetes**, **48**: 1737-40, 1999.
- ROBERTSON, R.P. - Succesful islet transplantation for patients with diabetes- fact or fantasy? **N. Engl. J. Med.**, **343**: 289-290, 2000. [Letter]
- ROBERTSON, R.P.; CONNIE, D.; LARSEN, J.; STRATTA, R.; SUTHERLAND, D.E.R. – Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. **Diabetes Care**, **23**: 112-16, 2000.
- RODGER, W. - Insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. **Can. Med. Assoc. J.**, **145**: 1227-37, 1991.
- ROEP, B.O.; STOBBE, I.; DUINKERKEN, G.; van ROOD, J.J.; LERNMARK, A.; KEYMEULEN, B.; PIPELEERS, D.; FRANS, H.J.; de VRIES, R.R.P. - Auto- and alloimmune reactivity to human islets allografts transplanted into type 1 diabetic patients. **Diabetes**, **48**: 484-90, 1999.
- ROSSI, M.A. & SILVA, J.S. - Permeability alteration of the sarcolemmal membrane, particularly at the site of macrophage contact, in experimental chronic *Trypanosoma cruzi* myocarditis in mice. **Int. J. Exp. Path.**, **71**: 545-55, 1990.
- SAIKUMAR, P.; DONG, Z.; WEINBERG, J.M.; VENKATACHALAM, M. A. – Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. **Oncogene**, **17**: 3341-49, 1998.

- SASAKI, T.; NAKA, M.; NAKAMURA, F.; TANAKA, T. – Ruthenium red inhibits the binding of calcium to calmodulin required for enzyme activation. **J. Biol. Chem.**, **267**: 21518-21523, 1992.
- SCHNEDL, W.J; FERBER, S.; JOHNSON, J.H.; NEWGARD, C.B. - STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2-expressing cells. **Diabetes**, **43**: 1326-1333, 1994.
- SEKINE, N.; CIRULLI, V.; REGAZZI, R.; BROWN, L.J.; GINE, E.; TAMARIT-RODRIGUEZ, J.; GIROTTI, M.; MARIE, S.; MacDONALD, M.J.; WOLLHEIM, C.B.; RUTTER, G.A. - Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial in pancreatic glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic β cells. **J. Biol. Chem.**, **269**: 4895-4902, 1994.
- SELBY, J.V.; FITZSIMMONS, S.C.; NEWMAN, J.M.; KATZ, P.P.; SEPE, S.; SHOWSTACK, J. - The natural history and epidemiology of diabetic nephropathy: implications for prevention and control. **JAMA**, **263**: 1954-60, 1993.
- SHAPIRO, A.M.J.; LAKEY, J.R.T.; RYAN, E.A.; KORBUTT, G.S., TOTH, E.; WARNOCK, G.L.; KNETEMAN, N.M.; RAAJOTTE, R.V. - Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. **N. Engl. J. Med.**, **343**: 230-38, 2000.
- SIMON, O.R. & WEST, M.E. – Unstable diabetic state produced by small dose of streptozotocin in rats. **W. I. Med. J.**, **42**: 146-149, 1992.
- SLADOWSKI, D.; STEER, S.J.; CLOTHIER, R.H.; BALLS, M. – An improved MTT assay. **J. Immunol. Methods**, **157**: 203-07, 1993.
- SLATER, T.F.; SAWYER, B.; STRÄULI, U. – Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. **Biochim. Biophys. Acta**, **77**: 382-93, 1963.

- SMETS, Y.F.C.; WESTENDORP, R.G.; van der PIJL, J.W.; Th de CHARRO, F.; RINGERS, J.; de FIJTER, J.W.; LEMKES, H.H.P.J. – Effect of simultaneous pancreas-kidney transplantation on mortality of patients with type-1 diabetes mellitus and end-stage renal failure. **Lancet**, **353**: 1915-19, 1999.
- STEGALL, M.D.; LARSON, T.S.; KUVDA, Y.C.; GRANDE, J.P.; NYBERG, S.L.; PRIETO, M.; VELOSA, J.A.; RIZZA, R.A. – Pancreas transplantation for the prevention of diabetic nephropathy. **Mayo Clin. Proc.**, **75**: 49-56, 2000.
- STRATA, R.J. – Impact of pancreas transplantation on the complications of diabetes. **Curr. Opin. Org. Transplant.**, **3**: 258-73, 1998.
- SUGITA, M.; SUZUKI, S.; KONDO, T.; NODA, M.; FUJIMURA, S. – Transalveolar fluid absorption ability in rat lungs preserved with Euro-Collins solution and EP4 solution. **Transplantation**, **67**: 349-54, 1999.
- SUGIYAMA, A.; KANAZAWA, S.; GORE, P.F.; FIELD, J.M.; McKNIGHT, S.; SUTHERLAND, D.E.R.; LURIE, K.G. - Preoperative assessment of adenylcyclase activity as a functional marker of islet cell quality after transplantation in rats. **J. Lab. Clin. Med.**, **133**: 384-390, 1999.
- SUTHERLAND, D.E.R. - Pancreas and islet transplant registry data. **World J. Surg.**, **8**: 270-75, 1984.
- SUTHERLAND, D.E.R.; GORES, P.F.; HERING, B.J.; WAHOFF, D.; McKEEHEN, D.A.; GRUESSNER, R.W.G. – Islet transplantation: an update. **Diab. Metab. Rev.**, **12**: 137-50, 1996.
- SUTTON, R.; PETERS, M.; McSHANE, P.; GRAY, D.W.R.; MORRIS, P.J. - Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase. **Transplantation**, **42**: 689-691, 1986.
- SZURBINSKA, B.; LUFT, J.H. - Ruthenium red and violet. III. Fine structure of the plasma membrane and extraneous coats in amoeba (A Proteus and Chaos chaos). **Anat. Rec.**, **171**: 417-42, 1971

- TAKAMA, Y.; SHIMIZU, H.; SATO, N.; MORI, M.; SHINOMURA, Y. - Involvement of spontaneous nitric oxide production in the diabetogenic action of streptozotocin. **Pharmacology**, **50**: 69-73, 1995.
- TAKEYAMA, N.; MATSUO, N.; TANAKA, T. - Oxidative damage to mitochondria is mediated by the Ca^{2+} -dependent inner membrane permeability transition. **Biochem. J.**, **294**: 719-25, 1993.
- TAYLOR-ROBINSON, D.; DAVIES, H.A.; SARATHCHANDRA, P.; FURR, P.M. - Intracellular location of mycoplasma in cultured cells demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. **Int. J. Exp. Path.**, **72**: 705-14, 1991.
- THULESEN, J.; ORSKOV, C.; HOLST, J.J.; POULSEN, S.S. - Short term insulin prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. **Endocrinology**, **38**: 62-68, 1997.
- TYDÉN, G.; BOLINDER, J.; SOLDERS, G; BRATTSTRÖM, C.; TIBELL, A.; GROTH C. - Improved survival in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and end-stage nephropathy 10 years after combined pancreas and kidney transplantation. **Transplantation**, **67**: 645-48, 1999.
- UNGER, R.H. & FOSTER, D.W. - Diabetes mellitus. In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W.; KRONENBERG, H.M.; LARSEN, P.R. - **Williams textbook of endocrinology**. 9th ed. Philadelphia, Saunders, 1998. p.973-1059.
- UNITT, J.F.; BODEN, K.L.; WALLACE, A.V.; INGALL, A.H.; COOMBS, M.E.; INCE, F. - Novel cobalt complex inhibitors of mitochondrial calcium uptake. **Bioorg. Med. Chem.**, **7**: 1891-96, 1999.
- US RENAL DATA SYSTEM: USRDS 1998 ANNUAL DATA REPORT. - Incidence and prevalence of ESRD. **Am. J. Kidney Dis.**, **32**(suppl.1):S38-S49, 1998.
- VASIR, B.S.; GRAY, D.W.R.; MORRIS, P.J. - Normalization of hyperglycemia in diabetic rats by intraportal transplantation of cryopreserved islets from four donors. **Diabetes**, **38**(suppl.1):185-188, 1989.

- VELASCO, I.; MORÁN, J.; TAPIA, R. - Selective neurotoxicity of ruthenium red in primary cultures. **Neurochem. Res.**, **20**: 599-04, 1995.
- WAHLBERG, J.A., SOUTHARD, J.H., BELZER, F.O. - Development of a cold storage solution for pancreas preservation. **Cryobiology**, **23**: 477-482, 1986.
- WAHLBERG, J.A., LOVE, R. LANDERGAARD, L.; SOUTHARD, J.H.; BELZER, F.O. - 72-hour preservation of the canine pancreas. **Transplantation**, **43**: 5-8, 1987.
- WANG Q.; KLEIN, R.; MOSS, S.E.; KLEIN, B.E.K.; HOYER, C.; BURKE, K.; SOLLINGER, H.S. - The influence of combined kidney-pancreas transplantation on the progression of diabetic retinopathy. **Ophthalmology**, **101**: 1071-76, 1994.
- WARNOCK, G.L.; KNETEMAN, N.M.; RYAN, E.; SEELIS, R.E.A.A.; RABINOVITCH, A; RAJOTTE, R.V. - Normoglycaemia after transplantation of freshly isolated and cryopreserved pancreatic islets in type I (insulin dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, **34**: 55-58, 1991.
- WEIDE, L.G. & LACY P. - Low-dose streptozotocin-induced autoimmune diabetes in islet transplantation model. **Diabetes**, **40**: 1157-1162, 1991.
- WEIGHT, S.C.; BELL, P.R.F.; NICHOLSON, M.L. - Renal ischaemia-reperfusion injury. **Br. J. Surg.**, **83**: 162-170, 1996.
- WHITE, S.; NICHOLSON, M.L.; HERING, B.J. - Can islet cell transplantation treat diabetes? : small studies show promise, now multicentre trials are going ahead. **Brit. Med. J.**, **321**: 651-52, 2000. [Letter]
- WILLIAMS, P.W. - Notes on diabetes treated with extract and by grafts of sheep's pancreas. **Br. Med. J.**, **2**: 1303-04, 1894.
- ZAGER, R.A.; SACKS, B.M.; BURKHART, K.M.; WILLIAMS, A.C. Plasma membrane phospholipid integrity and orientation during hypoxic and toxic proximal tubular attack. **Kidney Int.**, **56**: 104-117, 1999.

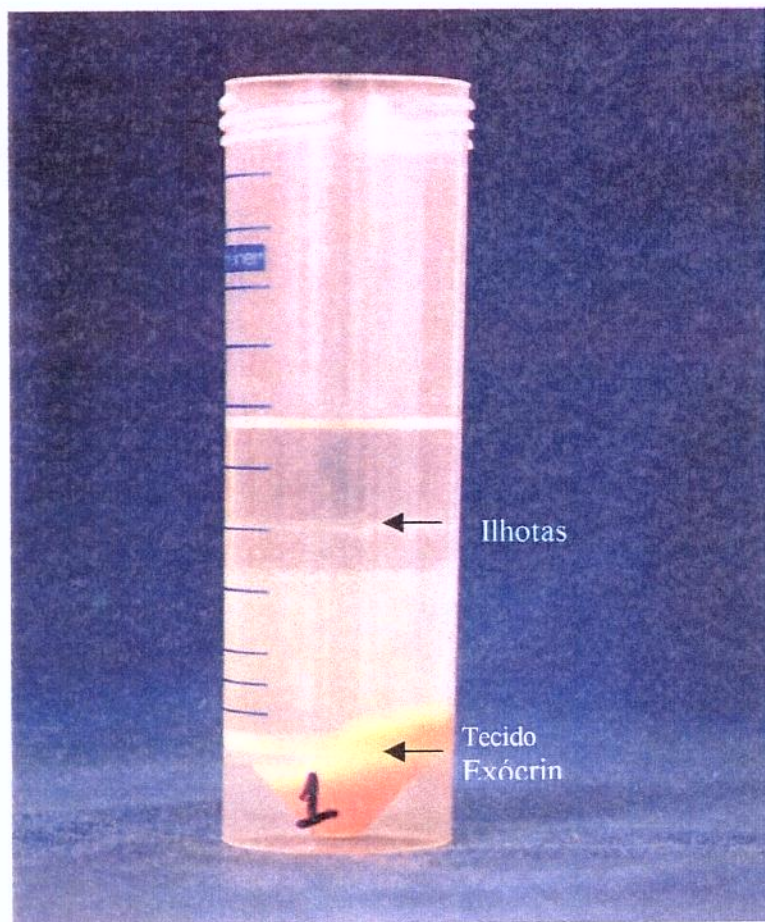
- ZAMZAMI, N.; MARCHETI, P.; CASTEDO, M.; DECAUDIN, D.; MACHO, A.; HIRSCH, T.; SUSIN, S.A.; PETIT, P.X.; MIGNOTTE, B.; KROEMER, G. - Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. **J. Exp. Med.**, **182**: 367-77, 1995.
- ZIEGLER, M.M.; RECKARD, C.R.; BARKER, C.F. - Long-term metabolic and immunological considerations in transplantation of pancreatic islets. **J. Surg. Res.**, **16**: 575-581, 1974.
- ZUCKER, P.F.; BLOOM, A.D.; STRASSER, S.; ALEJANDRO, R. - Successful cold storage preservation of the canine pancreas with UW-1 solution prior to islet isolation. **Transplantation**, **48**: 168-170, 1989.

8. *ANEXOS*

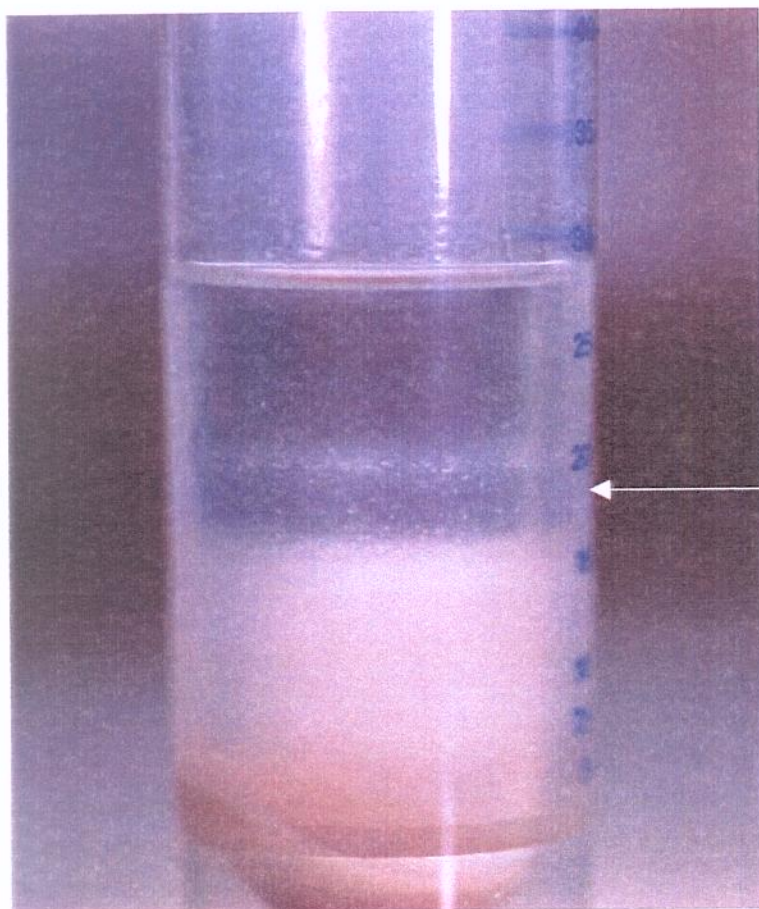
ANEXO 01- Tabela com os componentes das soluções HBSS, UW e EC.

Componentes	HBSS (mmol/L)	UW (mmol/L)	EC (mmol/L)
Sódio	138,0	30,0	10,0
Potássio	5,8	120,0	115,0
Cálcio	1,3	-	-
Magnésio	0,8	5,0	-
Bicarbonato	4,2	-	10,0
Cloreto	144,5	-	15,0
Fosfato	15,3	25,0	57,0
Sulfato	0,8	5,0	-
Glicose	5,6	-	198,0
Fração 5 de amido	-	5,0 g%	-
Lactobionato	-	100,0	-
Rafinose	-	30,0	-
Adenosina	-	5,0	-
Glutathiona	-	3,0	-
Alopurinol	-	1,0	-
Osm (mOsm/L)	316,0	320,0	405,0
pH	7,2-7,4	7,2-7,4	7,2-7,4

ANEXO 02. Tubo de centrifugação com gradientes descontínuos de ficol utilizado para isolamento das ilhotas pancreáticas do rato. Tecido exócrino fica no precipitado. Ilhotas na parte superior dos gradientes.

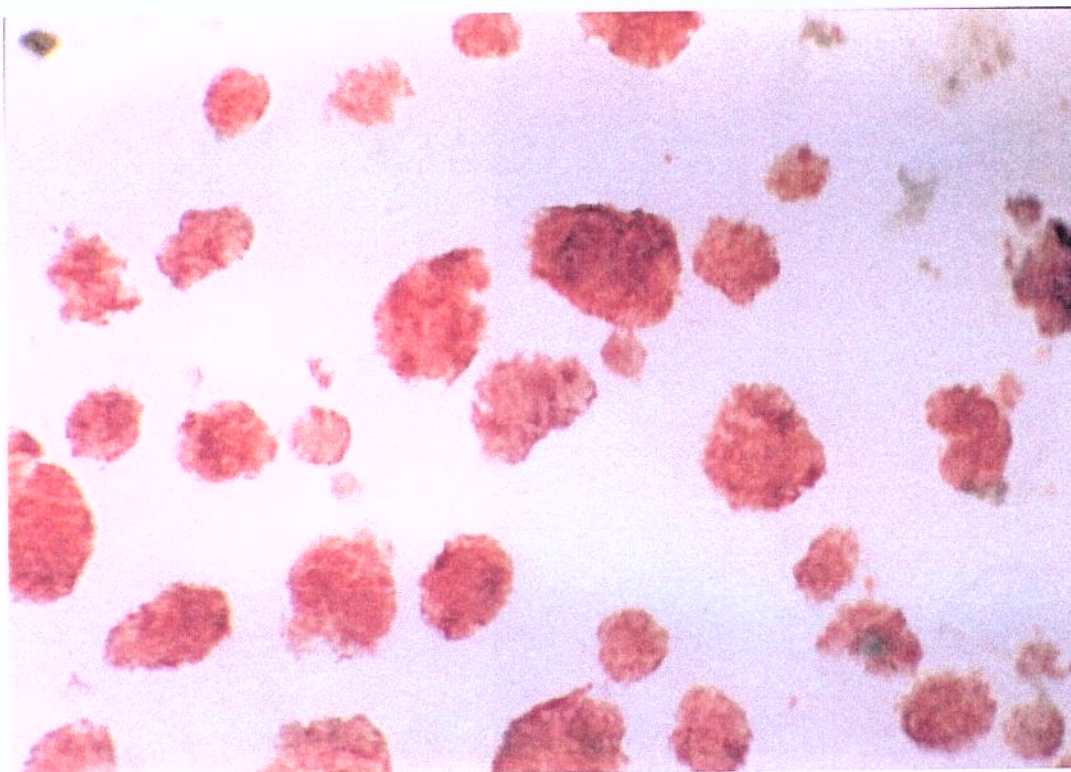


ANEXO 03. Visão aproximada para melhor visualização das ilhotas contidas nos gradientes de ficol da figura contida no ANEXO 2.

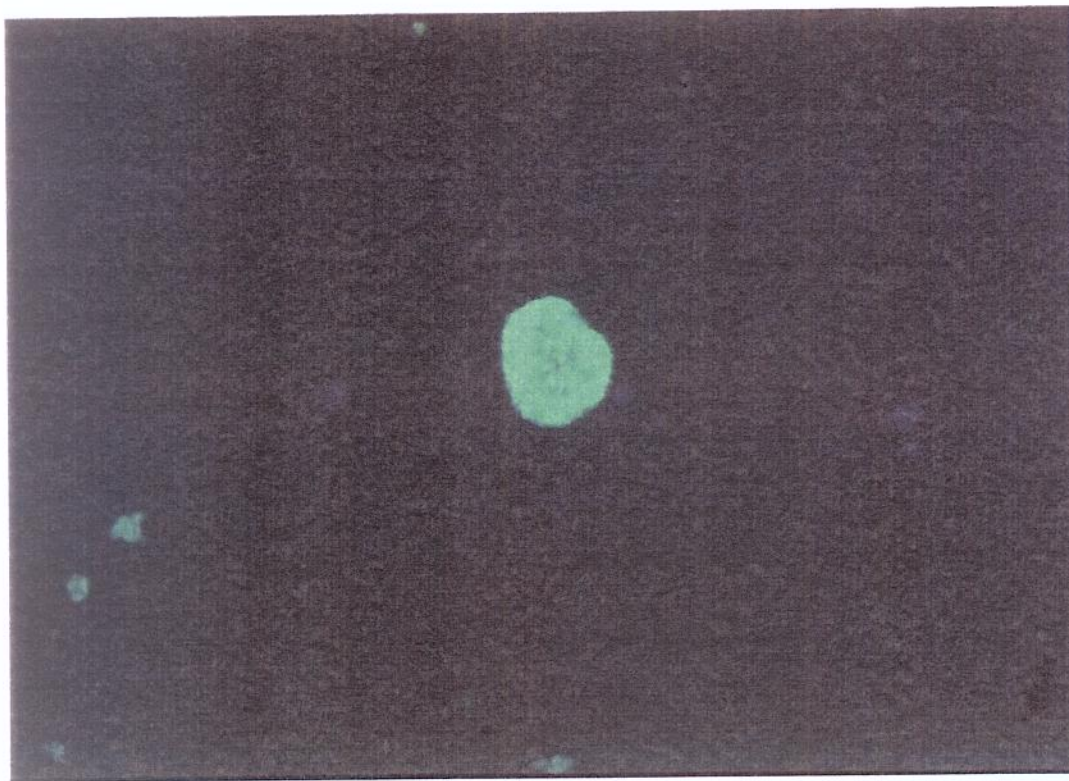


ILHOTAS

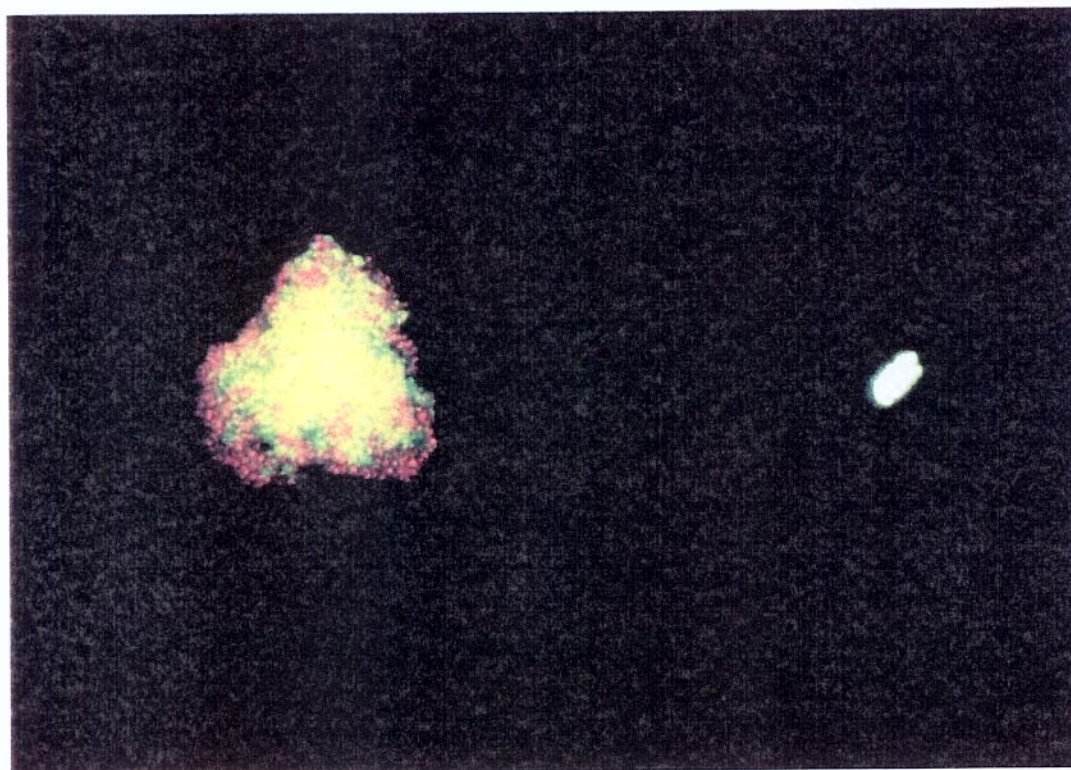
ANEXO 04. Ilhotas de ratos Lewis coradas por ditizona imediatamente após o isolamento. Preparação contendo acima de 95% de ilhotas. Fragmentos de tecido exócrino com coloração bem menos evidente. Aumento de 40 vezes.



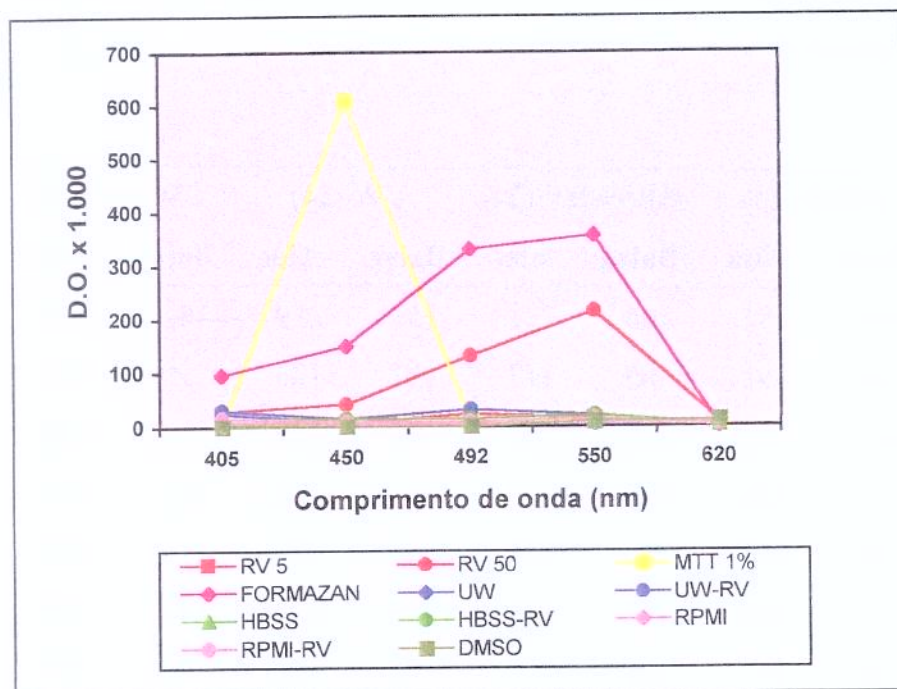
ANEXO 05. Figura representativa de ilhota pancreática do rato corada por FDA/EB. Ilhota completamente viável, verde. Aumento de 100 vezes.



ANEXO 06. Figura representativa de ilhota pancreática do rato preservada por 24 horas em HBSS e corada por FDA/EB. Ilhota com importante redução na viabilidade. Células da camada externa completamente mortas (vermelhas). Aumento de 100 vezes.



ANEXO 07- Espectro de absorção das diferentes soluções e reagentes utilizados no teste MTT.



ANEXO 08- Teste MTT (1ª Parte trabalho experimental) para ilhotas de ratos Lewis isogênicos frescas e preservadas a frio por 24 horas. Resultados das absorbâncias x 1.000. Na primeira coluna constam os números dos experimentos. Baixa e alta referem-se ao conteúdo de glicose do meio de incubação.

	Frescas		HBSS (24)		HBSS-RV (24)		UW (24)		UW-RV (24)	
	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta
1	321	254	102	191	166	221	158	219	181	109
2	250	250	88	91	85	117	112	126	99	132
3	206	218	161	137	123	97	146	153	137	152
4	242	258	97	146	135	159	157	162	211	151
5	163	140	116	110	115	106	158	171	160	201
6	248	243	167	166	132	137	146	178	162	178
7	259	256	138	147	150	153	95	108	93	139
8	271	301	206	200	178	208	209	231	186	172
9	201	194	97	120	118	115	135	147	137	140
10	197	174	103	92	109	66	135	122	127	150
$\bar{x}$	236,0	229,0	127,5	140,0	131,1	137,9	145,1	162,2	150,3	152,4
DP	45,3	47,5	39,1	38,0	27,7	48,7	30,5	39,6	39,0	25,9

ANEXO 09- Resultados do teste FDA/EB (1ª parte trabalho experimental) para ilhotas do rato Lewis isogênico frescas e preservadas a frio por 24 horas.

	Frescas	HBSS	HBSS-RV	UW	UW-RV
1	14,6	3,3	4,6	14,6	14,8
2	14,7	1,9	3,8	14,9	14,6
3	14,5	5,4	4,5	14,8	14,9
4	14,5	4,6	4,1	14,9	14,9
5	13,1	5,2	4,6	14,6	14,7
6	13,6	4,1	0,6	14,8	14,8
7	14,5	3,4	3,3	12,7	14,7
8	14,6	2,6	2,6	14,8	14,0
9	14,3	1,4	1,5	14,9	14,9
10	14,6	1,8	2,2	14,9	14,4
$\bar{x}$	14,3	3,4	3,2	14,6	14,7
D.P.	0,5	1,4	1,4	0,7	0,3

ANEXO 10- Atividade tecidual de LDH em rins, fígados, pâncreas exócrino e ilhotas pancreáticas de ratos Lewis isogênicos.

LDH nmol/min/μg prot	Tecido renal		Tecido hepático		Pâncreas exócrino		Ilhotas pancreáticas	
Duplicata 1	2410	3000	6130	4780	244	248	72	230
Duplicata 2	2680	3260	4200	6550	304	308	139	17
Duplicata 3	3000	3400	5440	6330	285	266	10	44
Duplicata 4	2820	2730	7000	5520	249	271	17	20
$\bar{x}$ duplicatas	2912,5		5745,5		271,9		68,6	
D.P. duplicatas	321,2		942,0		25,1		78,1	

ANEXO 11- Absorbâncias do teste MTT (2ª Parte trabalho experimental) para ilhotas de ratos Lewis isogênicos frescas e preservadas a frio por 24 horas. Resultados das absorbâncias x 1000. Incubação em RPMI 1640 com baixa concentração de glicose. Na primeira coluna constam os números dos experimentos.

	Frescas	Frescas- RV	HBSS (24)	HBSS- RV (24)	UW (24)	UW- RV (24)	EC (24)	EC- RV (24)
1	188	169	84	75	95	103	73	100
2	189	190	111	110	199	161	141	133
3	138	185	67	109	113	139	101	150
4	175	166	87	73	145	128	117	91
5	210	151	126	102	148	132	169	126
6	170	85	75	72	168	133	104	98
7	182	177	108	88	157	126	116	118
8	115	135	39	40	74	73	93	97
9	149	159	52	27	74	36	80	29
10	132	85	45	43	105	138	103	105
$\bar{x}$	164,8	150,2	79,4	73,9	127,8	116,9	109,7	104,7
D.P.	30,0	37,9	29,4	29,5	41,9	36,9	28,4	32,5

ANEXO 12- Absorbâncias do teste MTT (2ª Parte trabalho experimental) para ilhotas de ratos. Lewis isogênicos frescas e preservadas a frio por 24 horas. Resultados das absorbâncias x 1000. Incubação em RPMI 1640 com alta concentração de glicose. Na primeira coluna constam os números dos experimentos.

	Frescas	Frescas- RV	HBSS (24)	HBSS- RV (24)	UW (24)	UW- RV (24)	EC (24)	EC- RV (24)
1	170	162	81	70	113	106	109	112
2	181	196	84	116	155	132	166	155
3	147	251	87	138	112	127	90	142
4	154	169	105	51	116	111	102	119
5	190	152	144	110	160	139	153	127
6	156	164	84	94	126	96	121	133
7	244	157	129	88	160	155	80	116
8	165	123	50	84	95	93	68	172
9	174	149	47	44	42	42	58	51
10	118	116	64	68	135	120	119	131
$\bar{x}$	169,9	163,9	87,5	86,3	121,4	112,1	106,6	125,8
D.P.	32,9	38,0	31,4	29,5	37,7	31,3	34,8	32,1

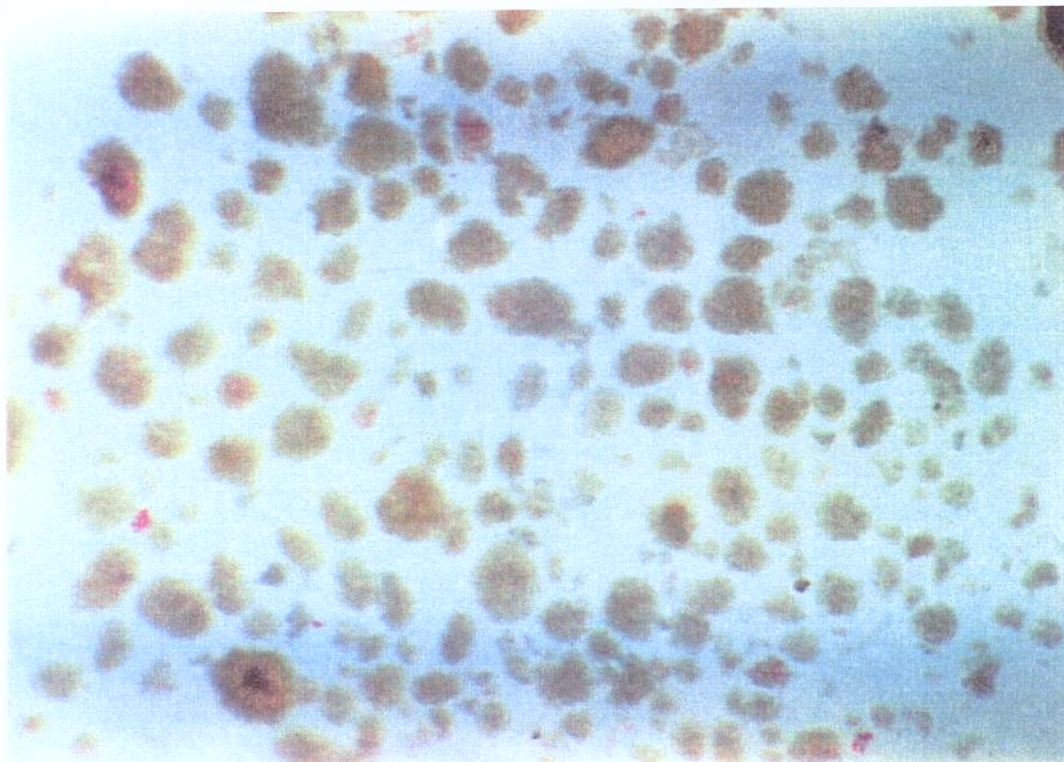
ANEXO 13- Resultados do teste FDA/EB (2ª parte trabalho experimental) para ilhotas do rato Lewis isogênico frescas e preservadas a frio por 24 horas

	Frescas	Frescas- RV	HBSS (24)	HBSS- RV (24)	UW (24)	UW- RV (24)	EC (24)	EC- RV (24)
1	14,8	14,4	0,2	0,9	14,3	14,6	12,1	14,1
2	14,9	14,5	1,9	2,2	14,5	13,9	14,3	13,5
3	14,8	14,7	1,6	0,3	14,5	13,7	12,6	13,2
4	13,1	14,4	0,7	0,9	13,7	12,7	12,7	13,7
5	14,5	14,5	0,7	0,7	14,2	14,2	11,8	14,3
6	14,7	14,2	1,7	2,2	14,2	14,5	12,9	14,7
7	14,8	15,0	1,9	1,0	14,7	14,3	13,1	13,4
8	14,7	14,8	0,3	0,3	14,8	14,5	14,6	14,2
9	14,8	14,8	0,2	1,6	14,8	14,0	14,2	14,7
10	14,9	14,9	0,3	2,0	14,8	14,6	14,8	14,8
$\bar{x}$	14,6	14,6	0,9	1,2	14,4	14,1	13,3	14,1
D.P.	0,5	0,2	0,7	0,7	0,4	0,6	1,1	0,6

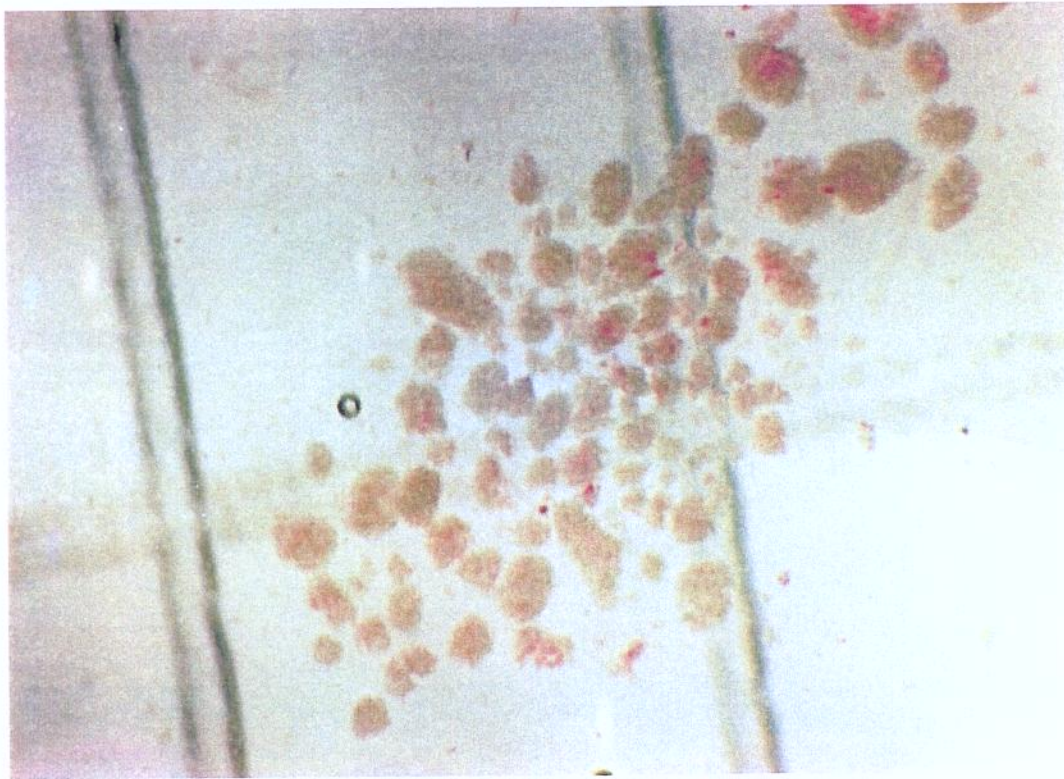
ANEXO 14- Resultados do teste FDA/EB (2ª parte trabalho experimental) para ilhotas do rato Lewis isogênico frescas e preservadas a frio por 48 horas.

	Frescas	Frescas-RV	UW (48)	UW-RV (48)	EC (48)	EC-RV (48)
1	14,8	14,4	13,2	14,7	8,55	13,7
2	14,9	14,5	12,8	12,2	12,9	12,4
3	14,8	14,7	13,8	13,5	12,1	13,3
4	13,1	14,4	13,8	13,5	12,9	13,7
5	14,5	14,5	9,7	13,4	8,8	13,6
6	14,7	14,2	13,8	14,2	8,3	14,1
7	14,8	15,0	14,0	14,0	13,4	13,8
8	14,7	14,8	14,3	14,2	13,9	14,1
9	14,8	14,8	14,6	13,9	14,0	14,1
10	14,9	14,9	14,0	13,8	12,5	12,4
$\bar{x}$	14,6	14,6	13,4	13,7	11,7	13,5
D.P.	0,5	0,2	1,4	0,7	2,3	0,6

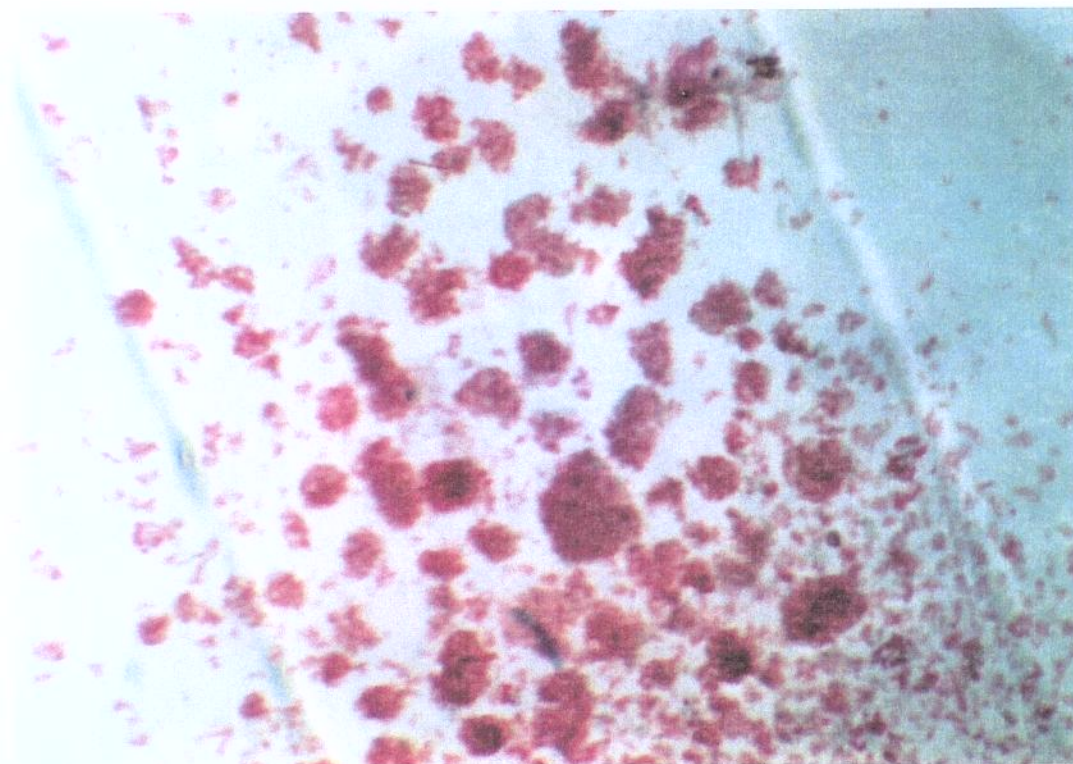
ANEXO 15. Ilhotas pancreáticas do rato imediatamente após isolamento (RV injetado no peritônio dos ratos doadores de ilhotas e HBSS-RV utilizado para lavaduras). Apenas raros fragmentos de tecido corados em vermelho. Aumento de 30 vezes.



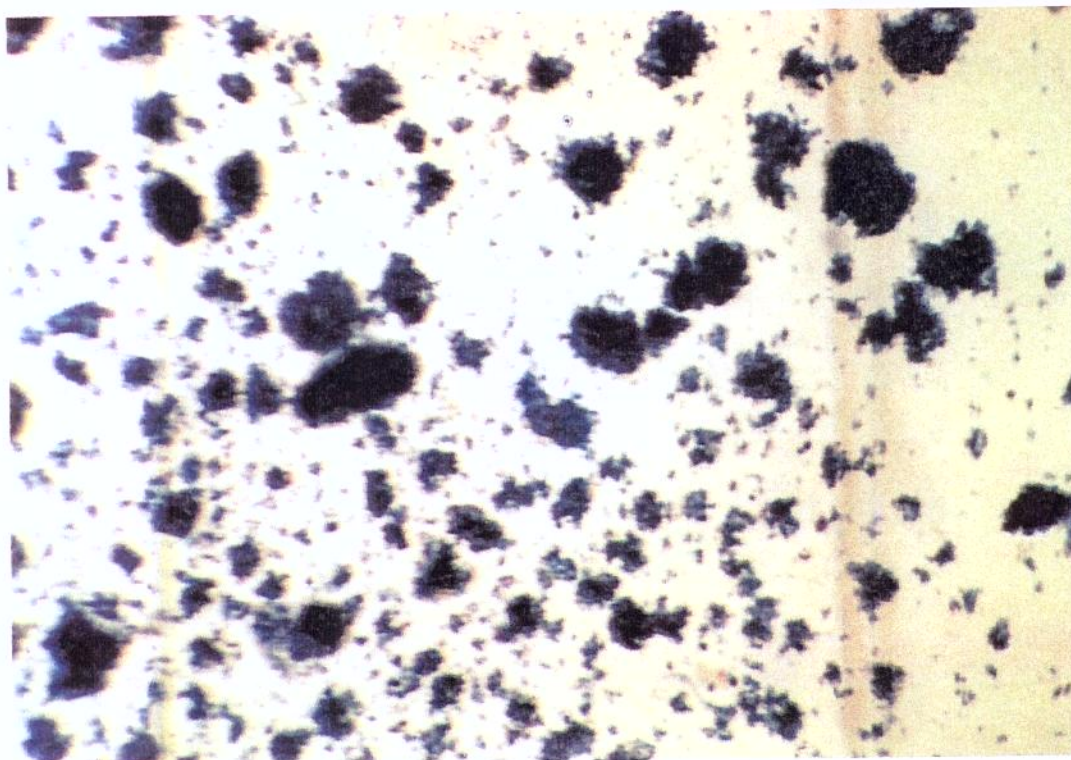
ANEXO 16. Ilhotas preservadas em UW-RV por 24 horas. Apenas pequenas porções de algumas ilhotas apresentam coloração avermelhada. Aumento de 30 vezes.



ANEXO 17. Ilhotas pancreáticas do rato após 24 horas de preservação a frio em HBSS-RV. Ilhotas e fragmentos completamente corados (vermelhos) por RV. Aumento de 30 vezes.



ANEXO 18. Ilhotas pancreáticas do rato, da mesma amostra do anexo 17, após terem sido coradas com azul tripano. Note-se a forte coloração azul das ilhotas indicativa de rotura da membrana citoplasmática. Aumento de 30 vezes.



ANEXO 19- Pesos semanais de 20 ratos e 20 ratas Lewis isogênicos com água e dieta (Nuvilab CR 1) *ad libitum*.

Semanas de vida	Peso dos machos (g)		Peso das fêmeas (g)	
	Média	D.P.	Média	D.P.
4	57,8	12,9	51,9	12,2
5	75,1	11,2	70,0	10,7
6	129,3	12,6	109,4	9,5
7	160,8	12,9	129,5	7,9
8	185,0	11,5	142,0	7,6
9	216,7	18,6	159,0	8,6
10	242,0	16,1	172,8	10,0
11	262,5	15,8	183,0	8,4
12	271,3	16,2	187,5	8,3
13	279,2	23,0	195,4	8,1
14	290,5	22,2	200,2	10,3
15	298,8	21,2	202,6	9,9
16	304,1	23,2	206,6	9,9
17	316,0	20,9	209,7	8,9
18	322,0	20,8	212,7	9,1
19	331,0	20,2	214,0	10,7
20	339,5	21,7	218,8	10,7
21	345,5	21,3	220,4	11,1
22	352,1	20,7	222,8	10,5

ANEXO 20- Evolução dos pesos nos tempos 0 (STZ), 2, 20 e 40 semanas pós-STZ em ratos WF isogênicos.

Grupos	Pré-STZ			2 semanas			20 semanas			40 semanas		
	$\bar{x}$	$\pm$	D.P.	$\bar{x}$	$\pm$	D.P.	$\bar{x}$	$\pm$	D.P.	$\bar{x}$	$\pm$	D.P.
Controle	269,0	$\pm$	16,6	279,5	$\pm$	14,5	329,4	$\pm$	13,2	341,4	$\pm$	15,0
Peritônio	270,2	$\pm$	15,0	244,7	$\pm$	9,3	224,6	$\pm$	20,0	235,8	$\pm$	19,3
Cauda	263,6	$\pm$	23,1	241,3	$\pm$	14,9	224,1	$\pm$	11,4	222,4	$\pm$	21,0
Língua	259,6	$\pm$	17,5	222,7	$\pm$	14,4	210,0	$\pm$	17,7	219,5	$\pm$	17,2

ANEXO 21- Evolução das glicemias nos tempos 0 (STZ), 2, 20 e 40 semanas pós-STZ em ratos WF isogênicos.

Grupos	Pré-STZ			2 semanas			20 semanas			40 semanas		
	$\bar{x}$	$\pm$	D.P.	$\bar{x}$	$\pm$	D.P.	$\bar{x}$	$\pm$	D.P.	$\bar{x}$	$\pm$	D.P.
Controle	120,7	$\pm$ 11,5		86,2	$\pm$ 14,1		75,0	$\pm$ 4,6		109,7	$\pm$ 9,8	
Peritônio	114,2	$\pm$ 13,0		621,3	$\pm$ 65,2		444,5	$\pm$ 21,0		593,8	$\pm$ 38,0	
Cauda	115,6	$\pm$ 15,8		570,6	$\pm$ 74,2		493,1	$\pm$ 65,0		619,1	$\pm$ 113,2	
Língua	129,1	$\pm$ 18,9		618,9	$\pm$ 74,1		514,3	$\pm$ 68,8		673,7	$\pm$ 82,0	

ANEXO 22- Evolução a longo prazo da primeira série de transplantes isogênicos para ratos Lewis previamente feito diabéticos por 50 mg/Kg de estreptozocina.

Seguimento	LD10a	LD30	LD50
Tx	604	468	792
1d	103	174	140
3d	268	-	200
5d	-	180	-
6d	-	-	155
7d	303	115	-
2s	160	148	147
3s	180	60	134
4s	131	134	105
5s	131	103	127
6s	123	112	144
7s	134	113	171
8s	104	156	112
9s	136	-	-
12s	110	89	114
9m	346	218	282
12m	435	174	359
15m	168	-	159

ANEXO 23- Evolução a longo prazo da segunda série de transplantes isogênicos para ratos Lewis previamente feito diabéticos por 50 mg/Kg de estreptozocina.

Seguimento	LD201	LD202	LD204	LD205	LD206
TX	919	714	510	642	774
1d	138	232	139	50	230
2d	576	510	474	165	512
3d	495	457	1152	186	471
5d	442	413	460	156	495
7d	385	415	421	144	469
10d	450	473	448	121	226
2s	433	392	425	137	422
3s	400	355	404	138	407
4s	338	324	385	109	417
5s	378	331	426	133	409
7m	-	-	-	132	-
10m	-	-	-	214	-
15m	-	-	-	150	-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ANEXO 24- Evolução a longo prazo de transplantes isogênicos para ratos Lewis previamente feito diabéticos por 40 mg/kg de estreptozocina.

Seguimento	LD207	LD209	LD212
Tx	484	521	512
1d	94	141	175
2d	133	124	176
3d	194	179	164
4d	164	194	241
5d	134	177	239
6d	148	127	200
7d	142	126	156
2s	108	99	124
3s	122	121	154
4s	95	106	106
7m	155	152	138
10m	164	175	185
15m	133	165	147