

UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE  
CAMPINAS

**BC/5830**  
**IB/81193**

DOUTORADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

*1984*

AURIA VIEIRA

*Este exemplar corresponde a redação  
final da tese defendida pela Prof. Auria  
Vieira e aprovada pela Comissão julgadora  
de Campinas, 13 de agosto de 1984  
Walter Bentes Junior*

PANCREAS FETAL DE RATO CULTURA E TRANSPLANTE PARA O TRATAMENTO  
DO DIABETES INDUZIDO POR ALOXANA

TESE SUBMETIDA AO INSTITUTO DE  
BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTA-  
DUAL DE CAMPINAS PARA A OBTEN-  
ÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM  
CIÊNCIAS NA ÁREA DE GENÉTICA.

CAMPINAS

1984

|          |         |
|----------|---------|
| lassif.  | T       |
| utor     | 20673-p |
|          | Ex.     |
| ombo BC/ | 5830    |
| B/       | 597     |

1B/ 81193  
BC/ 5830

Este trabalho foi realizado gra<sub>u</sub>ças às condições oferecidas pelo Laboratório particular do Dr. WALTER PINTO JUNIOR e dos Departamentos de Fisiologia e Biofísica e Genética Médica da UNICAMP.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor CARLOS EDUARDO NEGREIROS DE PAIVA, por ter me sugerido esta linha de pesquisa e orientado nos trabalhos iniciais.

Ao Professor Doutor WALTER PINTO JUNIOR, pelos ensinamentos constantes e orientação.

Ao Professor Doutor ERNESTO JOSÉ DOTTAVIANO , pela co-orientação prestada ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor ANTONIO CARLOS BOSCHERO , pelas "dicas" que muito contribuíram na realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor ANTONIO CORDEIRO, e Sr. ANTONIO SIDNEY SORRATINI, realização da análise estatística dos dados.

À Srta. ELIANA MARIA DO PRADO, pela colaboração na manipulação das culturas de tecido realizadas e serviços fotográficos.

Aos Sr. ANTONIO FABIO BRINO GUERRA, pelo auxílio nos trabalhos de cultura e serviços fotográficos.

À Srta. IVETE DE JESUS ROQUE, pela colabora-ção nas cirurgias de transplantes e histologia.

Aos Srs. LÉSCIO DOMINGOS TEIXEIRA e WASHING - TON LUIZ GOMES, pela colaboração na parte técnica.

À Srta. MARIA ELIDIA DOS SANTOS, pela realização dos serviços datilográficos.

E a todos que de alguma forma contribuíram ,

OBRIGADA.

## ÍNDICE

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. INTRODUÇÃO .....                                                                                               | 01 |
| I.1. Considerações iniciais .....                                                                                 | 01 |
| I.2. Aspectos imunológicos dos alotransplantes pancreáticos .....                                                 | 02 |
| I.3. A expressão dos determinantes de maior barreira de histocompatibilidade sobre as ilhotas de Langerhans ..... | 03 |
| I.4. Cuidados para minimizar a histocompatibilidade e imunogenicidade nos transplantes pancreáticos ..            | 05 |
| I.5. Transplante experimental de enxertos livres e tecido de ilhotas em animais .....                             | 07 |
| I.6. Enxertos de ilhotas livres de pâncreas adulto e segmento pancreático .....                                   | 08 |
| I.7. Utilização do tecido pancreático fetal para enxertos .....                                                   | 10 |
| I.8. Imunogenicidade de ilhotas adultas e fetais ....                                                             | 11 |
| I.9. Idade adequada do tecido pancreático fetal para o transplante .....                                          | 13 |
| I.10. Efeito das condições de cultura .....                                                                       | 13 |
| I.11. Conteúdo de insulina de pâncreas fetal em cultura e após o transplante .....                                | 16 |
| I.12. Tempo ideal de cultura do tecido pancreático fetal para transplante .....                                   | 17 |
| I.13. Número de pâncreas fetais utilizados nos enxertos .....                                                     | 17 |
| I.14. Sítios imunologicamente privilegiados para enxertos de tecido pancreático fetal .....                       | 18 |

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I.15. Crescimento e diferenciação do pâncreas fetal após o transplante "isogênico" .....                                             | 19 |
| I.15. Período de latência entre o transplante e a reversão do diabetes .....                                                         | 21 |
| II. OBJETIVOS .....                                                                                                                  | 22 |
| III. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                        | 24 |
| III.1. Retrocruzamento, para a obtenção de uma linhagem de fetos "isogênica" , utilizados na formação de um grupo experimental ..... | 24 |
| III.2. Indução e monitoramento do diabetes .....                                                                                     | 26 |
| III.3. Glicemia .....                                                                                                                | 26 |
| III.4. Obtenção dos explantes pancreáticos .....                                                                                     | 27 |
| III.5. Cultura do tecido pancreático .....                                                                                           | 27 |
| III.6. Transplantes .....                                                                                                            | 28 |
| III.6.1. Preparação do animal receptor .....                                                                                         | 28 |
| III.6.2. Cirurgia .....                                                                                                              | 28 |
| III.7. Cuidados pós-transplantes .....                                                                                               | 29 |
| III.8. Grupos experimentais .....                                                                                                    | 30 |
| III.9. Análise estatística e cálculos .....                                                                                          | 30 |
| IV. RESULTADOS .....                                                                                                                 | 31 |
| IV.1. A morfologia do pâncreas fetal de rato antes e após o cultivo .....                                                            | 31 |
| IV.2. Aspecto morfológico do enxerto após 30 dias de transplante .....                                                               | 35 |
| IV.3. Aspecto funcional do enxerto .....                                                                                             | 39 |

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| IV.3.1. Comparação entre os pesos médios (inicial, pré e pós transplantes) entre os grupos "isogênico" e alogênico.... | 39 |
| IV.3.2. Média da diferença de peso intra- par entre os grupos "isogênico e alogênico e para cada grupo .....           | 44 |
| IV.3.3. Correlação entre os pesos médios dos animais dos grupos "isogênico" e alogênico e para cada grupo .....        | 47 |
| IV.3.4. Glicemia média antes e após os transplantes .....                                                              | 56 |
| V. DISCUSSÃO .....                                                                                                     | 67 |
| VI. RESUMO .....                                                                                                       | 72 |
| VII. CONCLUSÕES .....                                                                                                  | 74 |
| VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                 | 76 |

## I - INTRODUÇÃO

### I.1. Considerações iniciais

Todos os aspectos históricos dos transplantes de tecido pancreático para normalizar a glicemia de indivíduos diabéticos foram publicados por Hegre & Lazarow (1977) e posteriormente, por Eloy, Doillon & Dubois (1980), Sutherland (1981), entre outros. Segundo Eloy *et alii*, (1980) a era moderna dos transplantes pancreáticos iniciou-se em 1970, com vários estudos, alguns bem sucedidos, em várias espécies utilizadas como modelos experimentais: ratos (Ballinger & Lacy, 1972; Boschero & Negreiros de Paiva, 1977; Matas, *et alii*, 1977a); camundongos (Panijayanond, Soroff & Monaco, 1973); porcos (Sutherland *et alii*, 1974); cães (Mirrovicth & Campiche, 1976; Lorenz *et alii*, 1979).

As fontes de tecido doador foram tecido adulto, neonatal e fetal, transplantados como aloenxertos ou isoenxertos em diferentes sítios no receptor (sob a cápsula do rim, no baço, intramuscular, etc).

As tentativas para a adaptação de novas técnicas em aloenxertos de ilhotas livres ou tecido pancreático, inclusive no homem, não têm sido bem sucedidas (Najarian, *et alii*, 1977; Groth, *et alii*, 1980 e Sutherland, 1981 e 1982. A rejeição ocorre rapidamente, devido à vulnerabilidade universal das ilhotas de Langerhans transplantadas aliado ao fato de que os regimes imunossupressores, utilizados em transplantes de rim, por exemplo, têm sido ineficientes.

Segundo Sutherland, *et alii* (1980b), o insucesso

so nesses transplantes, se deve às seguintes causas:

- a. transplante de poucas ilhotas viáveis quando obtidas de doadores adultos;
- b. transplantes em sítios inapropriados;
- c. utilização de tecido alogênico (dissimilar antígenicamente) que é mais susceptível à rejeição;
- d. ineficiência do tratamento por métodos utilizados na imunossupressão, como por exemplo, a administração de corticóides, os quais desenvolvem um meio não favorável às ilhotas e são potencialmente diabetogênicos. Além disso tem sido demonstrado que a imunossupressão tem sérios efeitos colaterais e no caso do *Diabetes mellitus*, que é uma doença crônica, os riscos da imunossupressão podem ser maiores do que os riscos de um tratamento contínuo com insulina exógena (Sutherland, 1981). Este autor enumera em sua revisão uma variedade de drogas e seus protocolos de imunossupressores que têm sido testados em vários modelos experimentais para transplantes de ilhotas. Contudo, a despeito da imunossupressão generalizada ter prolongado a sobrevivência de aloenxertos de ilhotas em alguns modelos experimentais, tais resultados são ainda muito controversos, Schulak, Frankling & Reckard, 1977.

## I.2. Aspectos imunológicos dos alotransplantes pancreáticos

Entre indivíduos antígenicamente dissimilares, a rejeição tem sido considerada uma das graves consequências dos transplantes pancreáticos, tal como nos transplantes de outros órgãos (Lillehei, *et alii*, 1970). O diagnóstico da rejeição é usualmente feito quando a hiperglicemia retorna.

Os exames histológicos dos aloenxertos pancreá

ticos rejeitados mostram edema, hemorragia intersticial e in filtração celular (Umeyama, *et alii*, 1980).

Duas teorias tentam explicar as causas da rejeição:

- a. Teoria dos linfócitos migradores - Segundo Snell (1957) , os linfócitos do doador carregados dentro do enxerto, evo cam a rejeição imunológica.
- b. Teoria de Medawer (1963) - Esta teoria propõe que a presença de antígenos em todas as células do enxerto causam a rejeição do mesmo. Entretanto, Lafferty (1980) sugere que a rejeição resulta de uma interação entre antígenos e linfócitos ativadores presentes no enxerto, para que os antígenos de histocompatibilidade sejam reconhecidos pelo hospedeiro . Sendo assim, um tratamento que reduza ou elimine os linfócitos do enxerto, como a cultura *in vi* tro , impediria que a rejeição ocorra, pois os antígenos por si só não constituem barreira para a aceitação dos aloenxertos.

### I.3. A expressão dos determinantes de maior barreira de histocompatibilidade sobre as ilhotas de Langerhans.

Os antígenos HL-A são glicoproteínas associadas à membrana da células, que exibem um grande polimorfismo. O sistema HL-A é típico de uma classe de complexo molecular de maior histocompatibilidade encontrada na maioria, senão em todas as espécies de mamíferos, inclusive no homem. O sistema análogo de histocompatibilidade em camundongos é chamado H-2, no ra to Ag-B ou H1 e no cão DL-A (Amos & Ward, 1975).

A região do ADN para o sistema H-2 em camundongos é um aglomerado de *loci* gênicos com funções relacionadas à resposta imune. O produto gênico dessa região pode ser

dividido em dois grupos funcionais:

- antígenos classe I codificados pelos determinantes H-2K e H-2D (HL-A-B e C em humanos), que estão presentes na maioria das células nucleadas e são antígenos alvos nas reações de transplantes.
- antígenos classe II ou Ia, codificados pela região I, têm um papel nos fenômenos de resposta imune e ativação linfocítica. Estes últimos são responsáveis pelas interações célula a célula e estão diretamente implicados numa variedade de respostas em aloenxertos (Klein, 1975 apud Faustman, Lacy & Davie, 1982). Os produtos gênicos da região I têm uma distribuição mais restrita nos tecidos, e se expressam apenas nos linfócitos T e B (Abbas *et alii*, 1976); em macrófagos (Cowing, Schwartz & Dicker, 1978), em células da epiderme e espermatozóides (Hammerling *et alii*, 1974) e em células epiteliais intestinais (Curman *et alii*, 1979).

A presença de antígenos classe I sobre a ilhotas é ainda controversa. Muitas evidências sugerem que elas são H-2 negativas. Baekkeskov, Lernmark & Klareskog (1981) confirmaram a presença de antígenos classe I e não conseguiu demonstrar antígenos da classe II em ilhotas de Langerhans. Por outro lado, Rabinovith *et alii*, estudando ratos (1982) localizaram os antígenos da classe II (Ia) tanto em ilhotas de Langerhans quanto em linfócitos, macrófagos e células do endotélio dos capilares de ilhotas frescas, sendo as células endoteliais as que apresentam maior quantidade de antígenos Ia.

#### I.4. Cuidados para minimizar a histocompatibilidade e imunogenicidade nos transplantes pancreáticos.

A indução de tolerância imunológica específica, no período neonatal, é uma alternativa clássica para prolongar a sobrevivência do enxerto pancreático em ratos. Esta técnica consiste em inocular  $50 \times 10^6$  células da medula óssea de uma linhagem de ratos em outra (recém-nascidos de 24 horas). A presença do estado tolerante é confirmada em cada receptor através da aceitação de enxertos de pele do doador (Perloff, Naji & Barker, 1980; Naji *et alii*, 1982).

Como a sobrevivência dos aloenxertos era limitada a alguns dias ou semanas, vários investigadores passaram a utilizar tratamento com imunossuppressores. Tais tratamentos consistiram no uso isolado ou combinado de azathioprina, corticosteróides e soro antilinfocítico (ALS) ministrados aos animais receptores dos enxertos (Kyriakides *et alii*, 1979; Bewick *et alii*, 1981). Entretanto, o problema continuou pois os resultados foram semelhantes: aqueles que não morriam de complicações técnicas, tinham uma sobrevivência média de 3-5 semanas.

Recentemente, a ciclosporina-A foi utilizada em ratos (Morris *et alii*, 1980; Rynasiewicz *et alii*, 1982) e em cão, (McMaster *et alii*, 1980). Este último grupo obteve uma sobrevivência média do enxerto de 55 dias com a utilização dessa droga em cães.

Outra técnica, a irradiação do tecido linfóide, tem sido utilizada para evitar a rejeição do pâncreas aloenxertado em ratos (Rynasiewicz *et alii*, 1980).

Amplamente utilizadas atualmente são as técni-

cas de cultura *in vitro*, desenvolvidas para alterar ou diminuir o conteúdo dos elementos responsáveis pelo mecanismo da rejeição sem, contudo, afetar a estrutura e função das células parenquimatosas. Esses elementos são as células portadoras de antígenos (APC) e os leucócitos migradores cuja depleção pela cultura pode prolongar a sobrevivência dos aloenxertos (Jacobs, 1974; Bowen & Lafferty, 1980 ; Mandel *et alii*, 1982; Rabinovitch *et alii*, 1982).

A restrição do complexo de maior histocompatibilidade (MHC) relacionada aos antígenos de transplantes têm sido demonstrada de maneira convincente por Gordon, Samelson & Simpson (1977) e Goulmy *et alii* (1982) em seus estudos *in vitro*. Bartlett *et alii*, (1983) e Silvers *et alii*, (1984), acreditam que a restrição do MHC, também funciona *in vivo*, com um papel muito importante na rejeição dos aloenxertos. Para esses autores, os antígenos de transplantes (APC) somente são reconhecidos quando estão associados com o MHC das células que fazem parte do sistema imune (macrófago, célula dentrítica, célula de Langerhans). Se o MHC dessas células for diferentes do MHC do enxerto, este não será reconhecido como tecido estranho, isto é, não será rejeitado. Por outro lado, se as combinações doador-receptor forem MHC compatíveis haverá rejeição.

Por exemplo, a cultura de ilhotas promove a sua sobrevivência em camundongos MHC-incompatíveis e não em animais MHC-compatíveis por que as células portadoras de antígenos (APC), normalmente leucócitos migradores, são eliminados. Sendo assim, o MHC do enxerto se ligará ao APC do hospedeiro, que se forem MHC-compatíveis haverá rejeição, mas quando forem MHC-incompatíveis a rejeição não ocorrerá.

Se esta hipótese for correta, os aloenxertos cultivados e transplantados para receptor MHC-incompatível, são permanentemente aceitos. Por outro lado, ilhotas frescas serão mais viáveis em receptores MHC-compatíveis.

Outra observação importante deste grupo é a de que os enxertos endócrinos MHC-compatíveis, cultivados ou não, são mais hábeis para sobreviver em camundongos do que em ratos, sendo a cultura do tecido mais efetiva para remover os leucócitos migradores dos tecidos dos camundongos.

#### I.5. Transplante experimental de enxertos livres e tecido de ilhotas em animais.

As tentativas de reverter o diabetes experimental consistem em transplantes de:

- a. ilhotas isoladas de pâncreas adulto;
- b. tecido pancreático adulto disperso;
- c. pâncreas neonatal ou fetal, rico em ilhotas.

Um grande número de experimentos têm sido realizados em roedores. Os modelos experimentais, constituídos de linhagens isogênicas permitem avaliar o efeito dos transplantes, independentes dos fatores imunológicos. Quando são usadas ilhotas livres, o maior problema, é obter ilhotas de um único doador, em número suficiente para um transplante efetivo (Sutherland, 1981).

Como modelos experimentais para transplantes utilizaram-se animais pancreatectomizados, (Helmke, Slijepcevic & Federlin (1975), portadores de diabetes espontâneo (Barker, Frangipane & Silvers, 1977), induzido por virus

(Howard *et alii*, 1979 e Naji *et alii*, 1979) ou com indução química provocada pela aloxana ou estreptozotocina (Matas *et alii*, 1977a, Boscherro & Negreiros de Paiva, 1977).

#### I.6. Enxerto de ilhotas livres de pâncreas adulto e segmento pancreático

As ilhotas de pâncreas adulto podem ser isoladas pela técnica da collagenase com um rendimento de 5 - 10 % (Hess & Root, 1938). Por esta técnica, as ilhotas são funcionais (Lacy, Walker & Fink, 1972) mas não há dados quantitativos sobre a porcentagem de ilhotas que são viáveis no final do processo de isolamento. Em geral, vários doadores são requeridos para a obtenção de ilhotas suficientes para um transplante bem sucedido em um único receptor (Matas *et alii*, 1977b).

Têm sido realizadas várias modificações nesta técnica básica de isolamento de ilhotas, com a finalidade de melhorar a produção e a viabilidade. Uma delas consiste na digestão por collagenase e a separação em gradiente de ficoll, tendo já sido experimentado em camundongos, (Panijayanond *et alii* 1973); cães (Lorenz *et alii*, 1979), porcos (Sutherland *et alii*, 1974); macacos (Scharp *et alii*, 1975); e humanos (Najarian, Sutherland & Steffes 1975). Em geral, a aplicação desta técnica em animais maiores tem sido trabalhosa por ser o pâncreas mais fibroso, a identificação das ilhotas por morfologia grosseira mais difícil e o rendimento baixo (Scharp *et alii*, 1980).

Recentemente, Lacy *et alii* (1982) aperfeiçoaram a técnica de isolamento de ilhotas

de pâncreas de bovinos e suínos. O procedimento envolve o uso de tiras de Velcro para reter o colágeno parcialmente digerido durante o isolamento das ilhotas pela técnica da colagenase. Por esse processo a recuperação de ilhotas de pâncreas desses animais é maior.

Segundo Squifflet *et alii* (1983), os enxertos de ilhotas livres são mais sensíveis à rejeição do que o transplante de um segmento de pâncreas imediatamente vascularizado, mesmo tendo uma massa de ilhotas menor do que em enxertos de ilhotas livres.

Múltiplos fatores podem influenciar os resultados dos alotransplantes de ilhotas, incluindo a combinação doador-receptor (Reckard & Barker 1973), o sítio do transplante (Barker, Reckard, Ziegler 1975), o número de ilhotas transplantadas (Finch & Morris 1977 e Matas *et alii*, 1977a) e se a imunossupressão é ou não utilizada, (Reckard & Barker, 1973; Finch & Morris, 1977). Mesmo quando a massa de células é maior no enxerto de ilhotas livres, as manifestações fisiológicas da rejeição ocorrem rapidamente. Há várias explicações possíveis para esses resultados. A preparação de ilhotas por digestão pela colagenase, pode expor os antígenos da membrana celular, tornando-as mais imunogênicas enquanto que, ilhotas em enxertos com vascularização dos podem ser protegidas parcialmente dos mecanismos efetores de rejeição pela barreira endotelial dos capilares (Squifflet *et alii*, 1983). Para esses autores, a rejeição rápida das ilhotas livres acontece por uma razão qualitativa e não quantitativa como supôs Sutherland *et alii*, (1980a).

tos nas membranas.

Ilhotas livres aloenxertadas são rejeitadas entre 2-4 semanas após o transplante. (Simeonovic *et alii*, 1980) ou mesmo em 4 dias e meio, segundo Squifflet *et alii* (1983).

#### I.7. Utilização do tecido pancreático fetal para enxertos

Vários investigadores têm preferido usar o pâncreas de feto, como fonte potencial de ilhotas, pelas seguintes razões:

a. apresenta alta proporção de tecido endócrino em relação ao exócrino em comparação com o pâncreas adulto (Lazarou *et alii*, 1973 Brown *et alii*, 1978). De fato, noze por cento do seu peso é constituído de ilhotas, enquanto que no pâncreas de adulto, tal proporção é de apenas quatro por cento (Sutherland, 1981).

b. possui dez vezes mais insulina por unidade de tecido, do que o pâncreas de adulto (Matas *et alii*, 1976).

c. pode ser transplantado intacto por técnicas simples (Brown *et alii*, 1976; Mandel *et alii*, 1980) ou previamente digerido por collagenase (Prowse *et alii*, 1982).

d. um curto período de cultura do órgão permite a sobrevivência seletiva e a proliferação das ilhotas, enquanto que o componente exócrino se degenera (Hegre *et alii*, 1971 e McEvoy *et alii*, 1973).

e. uma vez transplantado, as ilhotas fetais continuam a proliferar (Hegre *et alii*, 1976; Brown *et alii*, 1981 e Prowse *et alii*, 1982).

f. um único pâncreas fetal de rato por receptor é suficiente para reverter o diabetes, (Mandel & Higginbotham 1979 e Brown *et alii*, 1981).

g. é mais vantajoso pela sua menor imunogenicidade após a cultura em transplantes alogênicos (Browning & Resnick, 1952; Heslop 1969; Prowse *et alii*, 1982).

#### I.8. Imunogenicidade de ilhotas adultas e fetais

Eloy *et alii* (1980) mencionam em sua revisão, que não se conhece uma relação entre imunogenicidade e idade do doador de tecido. Algumas evidências, no entanto, sugerem que os órgãos fetais, incluindo o pâncreas, são menos imunogênicos do que os tecidos adultos. Como exemplo desse fato pode ser citada a maior sobrevivência de aloenxertos de pele de feto. Em ratos, a sobrevivência do mesmo tecido varia de acordo com a idade do doador, tornando-se progressivamente menor entre o nascimento e a idade adulta.

Entretanto, observações de Simeonovic *et alii*, (1980) revelaram que aloenxertos de pâncreas fetal de camundongos, mesmo cultivados por 10 dias, são rejeitados agudamente tanto quanto o tecido adulto fresco. O tecido mostra óbvios sinais de rejeição com ilhotas danificadas. Após quatro semanas, restam apenas tecido cicatrizado e infiltrado mononuclear. Mesmo através de uma fraca barreira de histocompatibilidade, Spence, Perloff & Barker (1979) relataram evidências histológicas de rejeição do tecido pancreático fetal (15-19 dias de gestação). Além disso, Jonasson (1979) não obteve sucesso em evitar a rejeição de material fetal para a mãe ou do feto para os primos, utilizando fragmentos pancreáticos mesmo após

um pré-tratamento de imunossupressão com ciclofosfamida.

A resposta exata do hospedeiro adulto ao tecido fetal mesmo de origem singênica não é bem entendida. *Simionovic et alii*, (1980), sugeriram que a cultura do órgão é mais efetiva em preparar ilhotas de tecido adulto do que tecido de feto, e atribuem essa diferença ao maior compo- nente linfóide associado ao tecido fetal. Esse tecido linfóide, como visto anteriormente, não é do próprio pân- creas, mas do mesentério que envolve o pâncreas difuso, *in situ*. Essa explicação justifica o desenvolvimento de uma estrutura semelhante a um grande nodo linfático após iso- transplante de pâncreas fetal não cultivado. A cultura do órgão danifica esse tecido linfóide e assim tais nódulos não se desenvolvem. Esses mesmos autores observaram linfói- des remanescentes em associação com o pâncreas fetal culti- vado por 10 dias e, atribuem a esse tecido residual a rejei- ção dos alotransplantes. Eles sugerem 17-20 dias de cultu- ra para que o enxerto seja bem sucedido, embora tenham nota- do que com esse tempo prolongado de cultura a capacidade funcional do tecido diminui. *Rabinovitch et alii* (1982) detectaram a presença de antígenos Ia em células endote- liais, nos capilares, linfócitos e macrófagos do tecido da ilhota e verificaram que apenas sete dias de cultura são suficientes para reduzir ou eliminar tais antígenos.

Por outro lado, *Millard et alii* (1980) con- firmaram os resultados publicados por *Brown et alii*, (1976) à respeito dos isoenxertos de pâncreas fetal cultivado. Es- tes corrigem completamente o diabetes experimental no rato e produzem, sem dúvida, resultados superiores àqueles obti- dos com ilhotas adultas.

### I.9. Idade adequada do tecido pancreático fetal para o transplante.

Brown *et alii*, (1976) constataram que a melhor idade do pâncreas doador está entre 16 1/2 e 17 1/2 dias de gestação. Nesta fase ele contém um pequeno número de ilhotas imaturas, algum tecido ductal e uma quantidade considerável de tecido acinoso em vários estágios de diferenciação, além de tecido linfóide do mesentério que o envolve, (Simeonovic *et alii*, 1980). O pâncreas nessa idade pesa aproximadamente 1 mg (McEvoy, Schmitt & Hegre, 1978) e mede 3 x 4 mm (Mullen & Shintaku, 1980). O conteúdo de insulina de cada pâncreas fetal não cultivado é de  $90 \pm 10$  ng, aumentando para  $457 \pm 123$  ng após 16 dias de cultura (Hoffman, Mandel & Carter, 1982).

### I.10. Efeito das condições de cultura

Já vimos anteriormente que os transplantes de ilhotas pancreáticas isoladas, singênicas, resultam em reversão permanente do diabetes induzido quimicamente em roedores (Sutherland, 1981). Ao contrário, os resultados com aloenxertos têm tido limitado sucesso. Contudo, resultados promissores tem sido relatado em experimentos nos quais a imunogenicidade das ilhotas do enxerto tem sido reduzida por um período de cultura (Anderson & Sandler, 1984). Esses estudos foram iniciados após Lafferty *et alii* (1975) ter demonstrado que a sobrevivência de aloenxerto de tireóide sobrevive por um tempo prolongado após 26 dias de cultura na presença de 95% de oxigênio.

Vários grupos de pesquisadores têm mostrado que a cultura de tecido pancreático reduz a imunogenicidade das células das ilhotas do enxerto. Entre eles podem ser citado Kedinger *et alii*, 1977; Lacy, Davie & Finke, 1979; Prowse *et alii*, 1982; Agren *et alii*, 1980; Anderson, 1978, 1982 e Anderson & Sandler, 1984. Entre os diferentes meios testados estão os seguintes: RPMI-1640, DMEM, 199 e HAM F-10. Estes devem ser suplementados com soro (fetal ou adulto) ou líquido amniótico, além de antibióticos. De um modo geral, os enxertos cultivados em meios normoglicêmicos (glicose, 1g/l) funcionam melhor como enxertos, segundo Mandel *et alii* (1980), em estudos realizados com pâncreas fetal de rato,

A necessidade de soro; para as culturas da maioria das células *in vitro*, pode ser devido a dois fatores, segundo Raines & Ross (1982):

- nutrientes e cofatores, usados no interior da célula e
- macromoléculas regulatórias (fatores de crescimento; que atuam como hormônios).

Devido à natureza complexa do soro e à sua multiplicidade de ações, o seu papel no crescimento das células em cultura é difícil interpretar. O que já está claro é a presença de um fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), maior macromolécula contida no soro de mamíferos, liberado durante o processo de coagulação. (Kohler & Lipton, 1974; Ross *et alii*, 1974 e Raines & Ross, 1982). Outro fator de crescimento, descrito por Glenn & Ross (1981), liberado no soro é o fator produzido pelos monócitos (MDGF). Tanto o PDGF quanto o MDGF têm função estimulante da síntese do ADN e do crescimento celular.

Dentre os suplementos mais usados no meio de

cultura de tecido pancreático, mereceu destaque os soros de origem bovina (fetal - SFB ou adulto - SB) e o líquido amniótico. Recentemente, Anderson & Sandler (1984) compararam os efeitos desses suplementos sobre a função das células de camundongo. Os resultados obtidos foram os seguintes: na presença de qualquer um dos três suplementos houve um acúmulo de insulina no meio de cultura em relação ao meio controle (sem suplemento). No entanto, a liberação foi maior em meio suplementado com líquido amniótico ( $2.645 \pm 175$  mg/placa) seguido do SFB ( $1823 \pm 193$  mg/placa) e do SB ( $865 \pm 85$  mg/placa) comparados com o controle ( $385 \pm 100$  mg/placa). Apenas as culturas com fluido amniótico tiveram a capacidade de aumentar a atividade das ilhotas. Estudos que estão sendo desenvolvidos por este grupo sugerem que, pelo menos em parte, este efeito se deve à presença de alfa feto proteína (AFP) no fluido amniótico. Por outro lado, esse fato não deve ser verdadeiro, uma vez que no SBF a concentração de alfa feto proteína é 200 vezes maior do que no líquido amniótico, comunicação pessoal Pinto Junior.

Segundo McEvoy (1980), o soro fetal deve ser inativado para um ótimo desenvolvimento das ilhotas. A inativação reduz a atividade proteolítica do soro e a concentração de insulina nestas condições se torna estável. A explicação para este efeito é a redução da degradação da insulina durante o período de cultura. Além disso, o volume das células é maior com o soro inativado. Esta é uma evidência de que o fator (ou fatores), presumivelmente enzimas, são destruídos pela inativação. Tais enzimas, teriam também uma influência negativa sobre o crescimento da célula. Assim, segundo o mesmo autor, o alto nível de insulina no meio, com soro inativado, poderia ter uma influência positiva sobre o

desenvolvimento da célula , pois este hormônio, promove o crescimento de muitas células *in vitro*.

#### I.11. Conteúdo de insulina de pâncreas fetal em cultura e após o transplante.

O conteúdo insulínico do pâncreas fetal de rato aumenta quatro vezes em cultura atingindo um pico entre o 14º e o 16º dias, permanecendo elevado mesmo após 35 dias *in vitro*. Estes estudos realizados por Collier *et alii* (1981) foram confirmados por Hoffman *et alii* (1982).

Após o transplante, o conteúdo de insulina excede aquele observado no pâncreas mantido *in vitro*. Aumenta 30 vezes em 9 semanas, tempo em que se torna igual ou maior ao do pâncreas removido de um camundongo macho, adulto, não diabético. Observações histológicas feitas por Hoffman *et alii*, (1981) revelaram um aumento acentuado do tamanho do enxerto com a presença de numerosas figuras mitóticas. Estas observações, segundo Hoffman, Mandel & Carter (1982), justificam os resultados obtidos quanto à quantidade de insulina e sugerem que esta proliferação é, pelo menos em parte, o fator responsável. Em contraposição, Brown *et alii* (1981) obtiveram apenas 19-22% do conteúdo de insulina de pâncreas de rato normal. Além disso, esses últimos autores usaram como tratamento com insulina após os transplantes de pâncreas não cultivados, enquanto que Hoffman *et alii* (1981) verificaram que se o pâncreas fetal era cultivado sob condições normoglicêmicas, o diabetes era revertido independente do tratamento insulínico após os transplantes.

Experimento similar realizado por Timble *et alii* (1980) com ilhotas de rato adulto (aproximadamente 1000 por receptor, obtidas de vários doadores) demonstrou que o conteúdo de insulina não aumentava após 20 semanas de transplantes (24 g) comparado com o conteúdo de insulina de pâncreas de rato normal (126 - 173 g), indicando a falta de proliferação de ilhotas adultas.

#### I.12. Tempo ideal de cultura do tecido pancreático fetal para transplante.

Para que o tecido acinoso seja destruído são necessários 2-3 dias de cultura em meio apropriado, segundo Mandel & Higginbothan (1979) e Brown *et alii* (1981).

Por outro lado, Simeonovic *et alii* (1980) sugerem que o tecido pancreático fetal, cultivado por 10 dias, apresenta ainda tecido acinoso diferenciado, principalmente na periferia do órgão. Com esse tempo de cultura, o pâncreas se condensa em uma massa compacta encapsulada em uma película de tecido conjuntivo, a proporção de tecido linfóide se reduz e o número de ilhotas aumenta. São necessários de 17 a 20 dias para que todo o tecido linfóide, associado ao tecido pancreático, seja totalmente destruído. Porém, com 17-20 dias de cultura, a capacidade funcional do enxerto fica reduzida.

#### I.13. Número de pâncreas fetais utilizados nos enxertos

Em geral pelo menos quatro pâncreas de feto devem ser transplantados (Sutherland, 1981). A reversão do

diabetes está correlacionada ao número de pâncreas feitas utilizados para transplantes. Entretanto, Mullen *et alii* (1977) verificaram que apenas um pâncreas fetal era suficiente para normalizar a glicemia de animais diabéticos, desde que fosse previamente enxertado sob a capsula do rim de animal normoglicêmico e então transferido para animal diabético. Observações de que a utilização de apenas um pâncreas fetal, enxertado sob a cápsula do rim, é adequada para manter normal a homeostase de glicose, foram realizadas por Mandel *et alii* (1981), Brown *et alii*, (1981, 1982 e 1984).

#### 1.14. Sítios adequados para transplantes de tecido pancreático.

Os sítios de transplantes de ilhotas isoladas ou tecido pancreático de feto são de grande importância principalmente com respeito à possibilidade de ser utilizado em humanos. Sob o ponto de vista funcional, os sítios drenados pelo sistema venoso portal como, por exemplo, a injeção de ilhotas isoladas na veia porta (Boschero e Negreiros de Paiva, 1977) no omentum intestinal (Yasunami *et alii*, 1983c) são considerados ideais quando comparados àqueles drenados pela circulação sistêmica. Estes últimos consistem em enxertos de pró-ilhotas, ilhotas isoladas ou fetal na cavidade peritoneal (Ballinger & Lacy, 1972), cápsula do rim (Brown, Molnar & Clark, 1974), baço (Mirkovitch e Campiche, 1976), músculo (Axen & Pi-Sunyer, 1981), testículo (Bobzien *et alii*, 1983) e ventrículo cerebral (Tze & Tai, 1983).

Brown *et alii* (1979) demonstraram a importância da circulação porta-hepática para a ação da insulina em

transplantes realizados sob a cápsula do rim em ratos isogênicos. Os ratos se tornavam normoglicêmicos apenas quando a drenagem venosa do enxerto era feita na veia porta- hepática através de uma derivação ("shunt").

Por outro lado, o sítio de transplante deve ser avaliado sob o ponto de vista imunológico, quando se trata de enxertos alogênicos. Trabalhos recentes têm considerado o ventrículo cerebral (Tze & Tai, 1983) ou o testículo (Bobzien *et alii*, 1983) como sítios imunologicamente privilegiados.

A facilidade de acesso ao enxerto é um fator que deve ser considerado, para que ele possa ser avaliado quanto à sua efetividade. Os sítios sob a cápsula do rim ou intramusculares se prestam a esse objetivo. Segundo Yasunami *et alii* (1983) entre esses vários sítios já utilizados para transplantes, cada um tem apenas uma ou outra das vantagens mencionadas acima. Quanto aos enxertos intramusculares, Lacy *et alii* (1979) afirmam que eles reduzem a hiperglicemia significativamente e os animais recuperam seus ganhos de pesos mas não se tornam normoglicêmicos. Por outro lado, Axen & Pi-Sunyer (1981) conseguiram reversão total usando 32 pâncreas fetais enquanto que Spence, Perloff & Barker (1979) não conseguiram reverter o diabetes em ratos utilizando este mesmo sítio.

### I.15. Crescimento e diferenciação do pâncreas fetal após o transplante isogênico.

Eloy *et alii* 1980 demonstraram que o tecido embrionário sobrevive, cresce, se diferencia e se organiza após a sua transferência para a câmara anterior do olho. O mesmo foi verificado com tecido pancreático neonatal ou embrionário, no sítio em que for transplantado (Browing & Resnick, 1952). Coupland (1960) observou que o tecido pancreático fetal, implantado na câmara anterior do olho, apresenta o tecido acinar degenerado nas duas primeiras semanas.

Quando previamente cultivado, o tecido acinar desaparece durante o período de cultura. Por outro lado, proliferam o epitélio dos ductos e as ilhotas com células  $\alpha$  e  $\beta$ . A presença de células  $\beta$  no enxerto confirma o crescimento do tecido transplantado (Leonard, Lazarow & Hegre, 1973).

Extensiva análise morfométrica quantitativa do tecido transplantado foi realizada por Hegre, Wells & Lazarow (1972); McEvoy & Hegre (1979); Millard *et alii* (1980). Este último grupo verificou que durante as duas primeiras semanas pós-transplante, o tecido endócrino, mas não o exócrino, se desenvolve amplamente nos isoenxertos, numa taxa correspondente àquela *in vitro*. Estes resultados foram comprovados por ensaios enzimáticos e insulínicos da cultura, confirmando as observações de Brown *et alii* (1976) de que os enxertos podem corrigir o diabetes induzido em ratos e produzir um estímulo funcional superior ao obtido com ilhotas adultas.

A imaturidade do tecido exócrino, observada

pós-transplante é um fenômeno ainda não esclarecido, mas segundo Millard *et alii* (1980) pode ser devido à denervação associada ou à ausência de secretagogos que normalmente estimulam o tecido pancreático *in situ*.

Exames histológicos do isoenxertos previamente cultivados por 20 dias, à vários intervalos pós-transplante, mostram um declínio na sobrevivência da ilhota, em relação ao tecido não cultivado, (Simeonovic *et alii*, 1980).

Enxerto pancreático fetal, não cultivado, mostra após a segunda e terceira semanas pós-transplante, numerosas e grandes ilhotas e alguns capilares entre as ilhotas. Notam-se, também, células das ilhotas espalhadas ao acaso, além de células precursoras e células indiferenciadas. Estas últimas se degeneram posteriormente e os ductos aparecem mais amplos e menos numerosos. Após o 14º dia, forma-se tecido adiposo, em quantidade moderada, no parênquima do enxerto (Hegre *et alii*, 1976; Millard *et alii*, 1980; McEvoy & Hegre, 1978 e 1979; McEvoy, 1980, 1981; Hegre, Schmitt & MacEvoy, 1979). O tratamento insulínico após o transplante, segundo esses autores, resulta em um aumento adicional na massa de células  $\beta$ , de 2 a 3 vezes. Este tratamento pode ser benéfico no período de neovascularização, crescimento e diferenciação. Por outro lado, um estado de deficiência endócrina pode ser importante para o estabelecimento da função do enxerto. Entretanto, para Hoffman *et alii* (1981), o diabetes é revertido, independentemente do tratamento insulínico, se o enxerto for de pâncreas fetal cultivado em meio normoglicêmico.

#### I.16. Período de latência entre o transplante e a reversão do diabetes.

Após o transplante de pâncreas fetal há um período de latência de 2 a 3 semanas até a reversão do diabetes (Mullen *et alii*, 1977 e Brown *et alii*, 1978). Entretanto, McEvoy & Hegre (1978), McEvoy & Hegre (1979) observaram em estudos quantitativos detalhados de enxertos de pâncreas fetal de ratos que o intervalo médio para a reversão do diabetes era de 11 semanas após o transplante de mais de 4 pâncreas e se o número fosse de apenas 4 pâncreas o período de latência era de 8 a 19 semanas.

Por outro lado, Millard *et alii* (1980) verificaram que alguns ratos podem tornar-se normoglicêmicos logo após os nove dias do enxerto com tratamento insulínico, enquanto que outros ratos necessitam de 2 a 3 semanas pós transplante.

## II. OBJETIVOS

O interesse geral no desenvolvimento de métodos alternativos para a manutenção do nível de glicose dentro da faixa normal em indivíduos diabéticos tem sido, nas últimas décadas, uma preocupação constante. A insulina exógena administrada pelas técnicas usuais, embora melhore a glicemia dos indivíduos com *diabetes mellitus* dependentes de insulina, não consegue evitar flutuações da mesma (Molnar, Taylor & Ho, 1972). Para evitar o grande risco do desenvolvimento de complicações microvasculares em indivíduos jovens e de meia idade, é necessário um controle rígido da glicemia, e os meios de terapia disponíveis são apenas parcialmente efetivos (Cahill, Etzmiller & Freinkel, 1976). Os sistemas destinados a administrar insulina exógena continuamente, podem ser hábeis para a manutenção do nível normal mas, não são tão eficazes quanto à célula  $\beta$  funcional (Sutherland, 1981). Além disso, existem ainda indivíduos que produzem anticorpos contra a insulina comercializada, tornando-os pacientes que merecem cuidados especiais. A aplicação clínica dos transplantes de pâncreas tem sido difícil devido às complicações técnicas e sobretudo à rejeição, e estão frequentemente associados com alta mortalidade e morbidez (Lillehei *et alii*, 1970; Largiader *et alii*, 1975 e Sutherland, 1982). Por esses motivos, surgiu um grande interesse em relação aos transplantes experimentais de ilhotas livres ou de tecido pancreático. Já foi constatado que enxertos de ilhotas podem reverter o diabetes em vários modelos experimentais, já mencionados ante-

riormente. Infelizmente, enxertos de ilhotas livres, alogênicas são extremamente vulneráveis à rejeição. A recuperação das ilhotas livres viáveis, de apenas um único doador é pequena e o resultado funcional é pobre consistindo portanto, um dos maiores problemas para a utilização desses métodos. Apesar disso, os transplantes de ilhotas associados à imunossupressão melhorada, para alterar a imunogenicidade do enxerto, são conjunturas em potencial no tratamento do diabetes (Sutherland, 1981, 1982).

Desta forma nos pareceu interessante dar continuidade a essa linha de investigação, iniciada em nosso Departamento pelo Dr. Antonio Carlos Boschero e Dr. Carlos Eduardo Negreiros de Paiva em 1977. Os nossos objetivos iniciais são:

- verificar o efeito dos transplantes intramusculares de pâncreas fetais de ratos, previamente cultivados por 8 a 10 dias, em modelos experimentais diabetizados por aloxana cujo coeficiente de parentesco é igual à 37,5%, obtidos por poucos acasalamentos.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

No presente experimento, foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus*), linhagem Wistar, pesando entre 300 e 400 gramas, como receptores dos enxertos pancreáticos fornecidos por fetos de 17 1/2 dias de gestação.

III.1. Retrocruzamento, para a obtenção de uma linhagem de fetos "isogênicos", utilizados na formação de um grupo experimental.

O cruzamento foi realizado conforme o esquema abaixo:

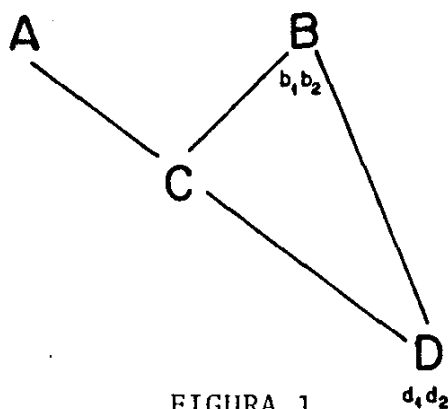


FIGURA 1

De acordo com este esquema, o coeficiente de endogamia em B é igual a zero ou seja:  $F_B = 0$  e o coeficiente de parentesco (R) é igual a 37,5% de acordo com os cálculos abaixo. Considerando-se o coeficiente de parentesco\* entre os indivíduos B D e sendo  $b_1, b_2$  os alelos de B e  $d_1, d_2$  os alelos de D temos:

---

\* O coeficiente de parentesco nos dá a porcentagem de genes que são mantidos em comum por dois indivíduos, devido a seus ancestrais comuns.

$$C_{BD} = \frac{1}{4} \quad P(d_1 = b_1) + P(d_1 = b_2) + P(d_2 = b_1) + P(d_2 = b_2)$$

como

$$P(d_1 = b_1) = \frac{1}{4}$$

$$P(d_1 = b_2) = \frac{1}{4}$$

$$P(d_2 = b_1) = \frac{1}{2}$$

$$P(d_2 = b_2) = \frac{1}{2}$$

então

$$C_{BD} = \frac{1}{4} \quad \frac{1}{4} + \frac{1}{4} + \frac{1}{2} + \frac{1}{2} = \frac{1}{4} \quad \left( \frac{1}{2} + 1 \right)$$

$$C_{BD} = \frac{1}{4} \quad \frac{3}{2} = \frac{3}{8} \quad \text{ou} \quad 37,5\%$$

Para isto, foram selecionadas fêmeas em estro (A) e submetidas ao acasalamento, por machos que seriam os receptores do enxerto pancreático (B). Na manhã seguinte ao acasalamento, as ratas foram submetidas ao teste de concepção, que consiste na detecção de espermatozóides na vagina.

As fêmeas fecundadas foram identificadas, assim como os machos, e colocados em gaiolas individuais, com ração e água *ad libitum*. O dia do teste foi considerado a partir do dia zero de gravidez. Quando as fêmeas nascidas desse acasalam<sup>ento</sup> atingiram mais de 35 dias de idade (C), eram colocadas em gaiolas com seus respectivos pais para serem acasaladas. (B x C). Confirmada a gravidez, eram identificadas e colocadas em gaiolas individuais, onde permaneciam até o 17º dia de gestação quando então, eram submetidas à histerectomia

para a obtenção dos explantes pancreáticos dos fetos (D) doadores.

O macho, no dia seguinte ao acasalamento, era tornado diabético por aloxana e conservado em gaiola metabólica, para que o seu estado diabético fosse controlado antes e após o enxerto pancreático.

### III.2. Indução e acompanhamento do diabetes

Após um período de 24 horas em jejum, os ratos receberam uma dose de aloxana (Carlo Erba 40 mg/Kg de peso) diluída em tampão citrato 0,05M, pH 4.5, por via venosa (veia dorsal do pênis), segundo Boschero & Negreiros de Paiva (1977). Para aumentar a taxa de sobrevivência dos ratos aloxanizados, usamos um pré-tratamento com 1,0 ml de glicose à 5% i.p. duas horas antes da injeção de aloxana como sugerido por Parr, Oliver & King (1982). Somente os animais que atingiram uma faixa glicêmica acima de 300 mg%, foram utilizados como receptores. Quanto ao efeito da aloxana, ver Dulin & Soret (1977).

O estado diabético foi avaliado através do volume urinário, ingestão de alimentos, ganho de peso, glicosúria e glicemia. Esta foi feita com intervalos de 8 a 10 dias.

### III.3 Glicemia

As amostras de sangue foram coletadas da veia da cauda em tubos capilares, centrifugados em uma centrífuga para micro-hematócrito, ADAMS READACRIT por 5 min e processados através do KIT A - 900 (DOLES) para a dosagem de glicose no plasma. As leituras foram feitas em espectrofotômetro UNI-

DEC-2, Jasco.

#### III.4. Obtenção dos Explantes Pancreáticos

Aos dezessete dias e meio de gestação (considerando como zero o dia seguinte ao acasalamento), as ratas (C) mães dos fetos que, por sua vez, doaram os pâncreas para os enxertos, foram mortas por deslocamento cervical e submetidas à laparotomia e histerectomia. O útero contendo os fetos foram colocados em placa de Petri e numa área de trabalho, com vestes, campos e material cirúrgico estéreis, assepsias das mãos com álcool, procedeu-se à remoção do tecido pancreático, sob a lupa\*. Os pâncreas dos fetos de cada rata foram colocados intactos em frascos estéreis contendo meio de cultura e transportados ao laboratório onde foram lançadas as culturas em tubos de Leighton.

Para controle de contaminação, os frascos contendo o meio de cultura no qual foram transportados os pâncreas, eram deixados em estufa à 37°C por 10-15 dias.

#### III.5. Cultura do tecido pancreático

No laboratório, em câmara asséptica, os pâncreas eram transferidos para os tubos de Leighton de 4 x 1,1 cm de superfície plana e incubados durante 3 dias à 37°C, sem a adição de meio de cultura, para que eles aderissem às paredes do tubo. Decorrido esse período, eram adicionados 2 ml de meio de cultura, Ham F-10 (Difco), enriquecido com so

---

\* (Luxo Magnifier-Lamp FL-1)

ro fetal bovino à 15%, inativado, e antibióticos (100U/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina). Cada tubo continha os pâncreas dos fetos de uma rata doadora (8 em média).

Após 8-10 dias de cultura, o tecido era examinado ao microscópio comum com o auxílio de um suporte de vidro, constituído por um segmento de tubo de ensaio cortado em sentido sagital o qual é fixado à uma lâmina de microscópio com auxílio de araldite, (Nazareth, Pinto Junior & Andrade, 1981).

Por observação grosseira, isto é, se não houvesse sinais de necrose ou contaminação, a cultura era transferida para a sala de cirurgia onde foram realizados os transplantes. Amostras do tecido foram fixadas em Boin para processamento histológico.

### III.6. Transplantes

#### III.6.1. Preparação do animal receptor

Os receptores dos enxertos foram anestesiados com éter sulfúrico e fixados em decúbito dorsal na placa cirúrgica. Em seguida era realizada a tricotomia no abdome e a limpeza asséptica da pele com sabão neutro, álcool e éter.

#### III.6.2. Cirurgia

A cirurgia para a realização dos transplantes foi realizada assepticamente, como descrito anteriormente na obtenção dos explantes pancreáticos.

Sob lupa, foi feita uma pequena incisão próxima à linha média ventral. A pele e o tecido subcutâneo fo-

ram afastados e o músculo oblíquo do abdome, foi exposto. Em seguida foi feita uma pequena bolsa entre a fâscia e o músculo, onde foram enxertados, em média, 8 pâncreas de fetos de ambos os sexos, retirados cuidadosamente dos tubos de Leighton e lavados em meio de cultura sem soro fetal bovino. Terminada a operação foram feitas as suturas em três planos, músculo, tecido conjuntivo subcutâneo e pele, com fio de seda estéril 8.0.

### III.7. Cuidados pós-transplantes

Na fase pós-cirúrgica imediata, o animal era colocado em gaiolas metabólicas bem limpas, e aquecidos até cessar o efeito da anestesia. Antes de completa cicatrização foram feitos curativos com merthiolate.

O acompanhamento do animal foi feito diariamente durante os 30 dias após os transplantes. Após esse tempo foram sacrificados para a remoção do enxerto e processamento histológico.

Dois critérios independentes foram usados para a determinação da sobrevivência dos enxertos de acordo com Mullen & Shintaku (1980).

1. a aparência grosseira dos enxertos *in situ* e análise dos cortes histológicos ao microscópio, como um critério morfológico.
2. Glicemia e ganho de peso como um critério funcional.

### III.8. Grupos experimentais

Inicialmente realizamos experimentos "pilotos", utilizando pâncreas fetal de rato de 16 1/2 - 17 1/2 dias de gestação como doadores para os transplantes nos seguintes grupos:

- A - explantes não cultivados para transplantes alogênicos;
- B - explantes não cultivados para transplantes isogênicos;
- C - explantes cultivados para transplantes alogênicos;
- D - explantes cultivados para transplantes isogênicos.

Após estes testes optamos pelos grupos C e D , para a realização deste trabalho.

### III.9. Análise estatística e cálculos

A tabulação e análise dos dados (peso do animal e glicemia obtidos ao final de cada semana), para a avaliação dos transplantes, foram processados por computador no Departamento de Estatística da UNICAMP.

O tratamento estatístico consistiu basicamente em análise de variância, teste t e teste de correlação.

### III.10. Processamento histológico

O enxerto e a musculatura bem como, amostras do pâncreas do receptor foram removidos e fixados em Bcin e, posteriormente embebidos em parafina. Foram feitas secções de 7 µm de espessura, coradas com aldeído fucsina pela técnica de Gomori, para a visualização dos grânulos de insulina da célula β da ilhota, e coloração por hematoxilina e eosina pelas

técnicas convencionais. Foram feitas também, preparações his  
tológicas do pâncreas fetal antes e após a cultura do teci-  
do.

## RESULTADOS

### IV.1. A morfologia do pâncreas fetal de rato antes e após o cultivo.

O aspecto morfológico das secções de pâncreas fetais de 17 1/2 dias de gestação, revelam a presença de ilhotas imaturas, algum tecido de ducto e uma considerável quantidade de tecido acinar. As células  $\beta$  são pouco granuladas nas ilhotas em desenvolvimento, como pode ser verificado nas (Figuras 2 e 3).

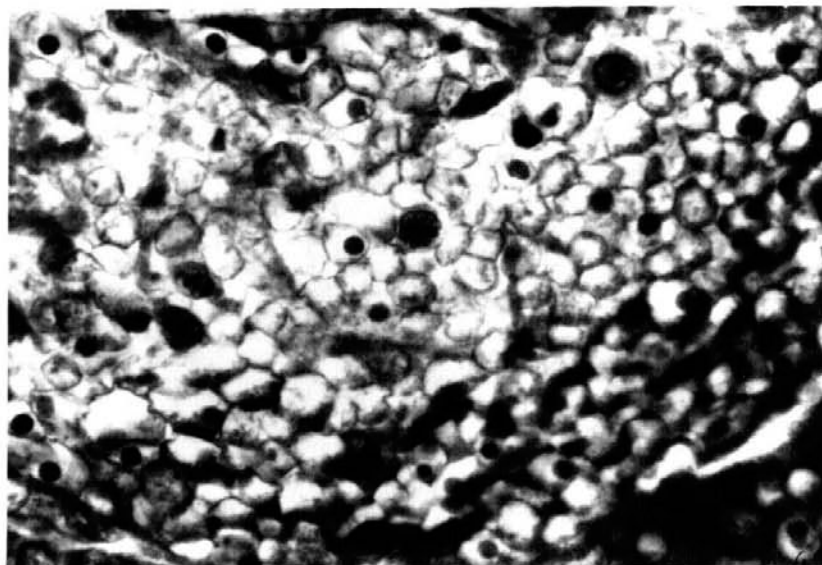


FIGURA 2. Pâncreas não cultivado de feto de rato de 17 1/2 dias de gestação. As ilhotas em desenvolvimento se caracterizam pela ausência de granulações aldeído-fucsina positivas na maioria das células  $\beta$  (aldeído fucsina x 1000).

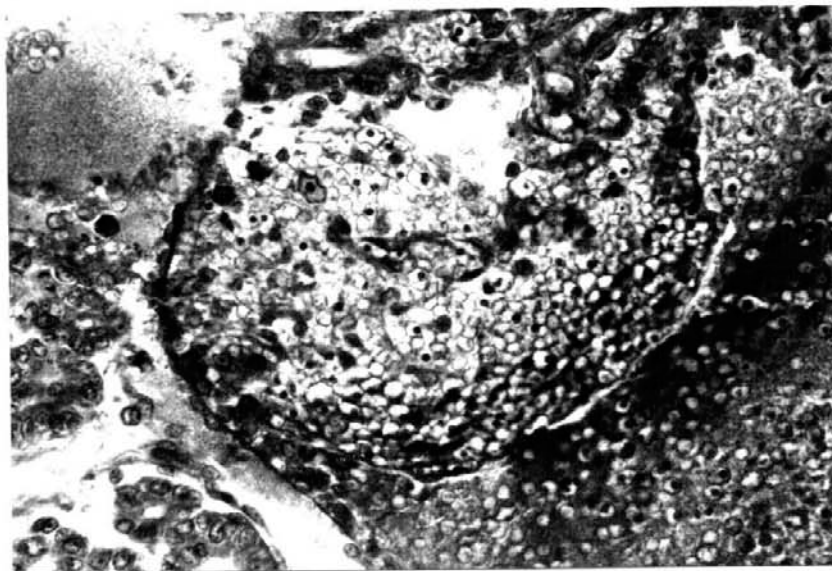


FIGURA 3. Pâncreas não cultivado de feto de rato, de 17 1/2 dias de gestação, mostrando uma ilhota e tecido acinar na periferia (hematoxilina e eosina x 1000).

Após um período de cultivo de 10 dias em meio HAM F-10, suplementado com soro fetal bovino e antibióticos em 95% de O<sub>2</sub>, o tecido acinoso se degenera, tornando-se rara a sua presença, geralmente na região periférica do órgão. Desse modo as ilhotas aparentemente intactas e viáveis permanecem. As células acinosas degeneradas são presumivelmente removidas, gradualmente, por macrófagos e pela lise após a cultura. As células da ilhota permanecem agregadas como discretos grupos e algumas são altamente granuladas, como constatado pela coloração com aldeido fucsina vista na Figura 4. A massa do tecido da ilhota aumenta após 10 dias de cultura *in vitro* como pode ser constatado pela Figura 5 a e b.

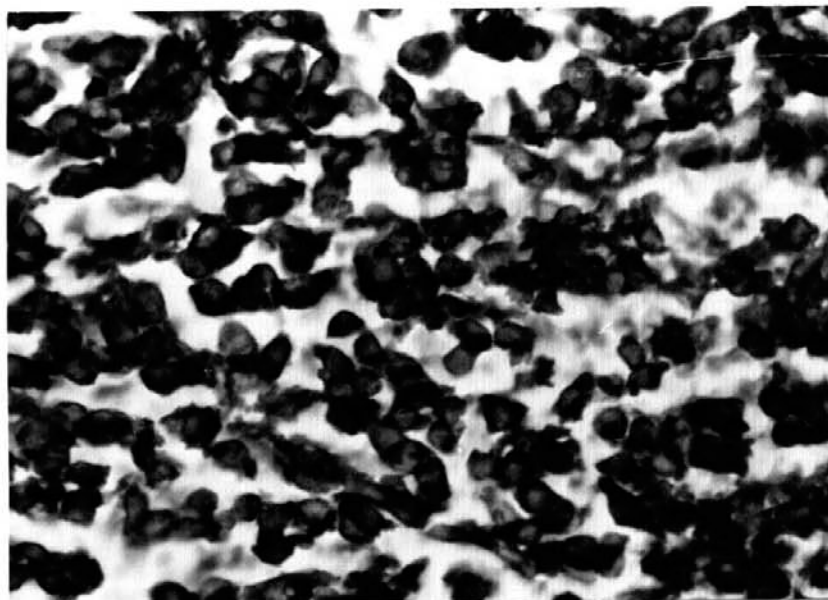
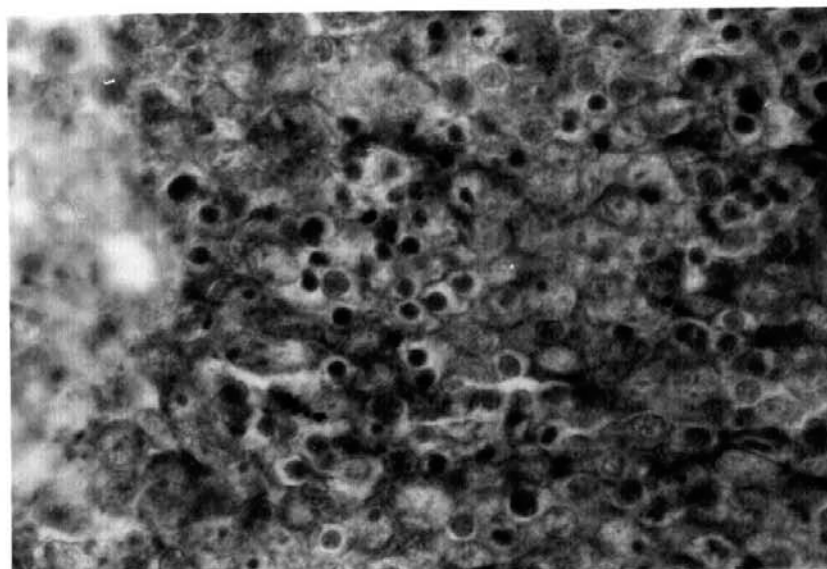
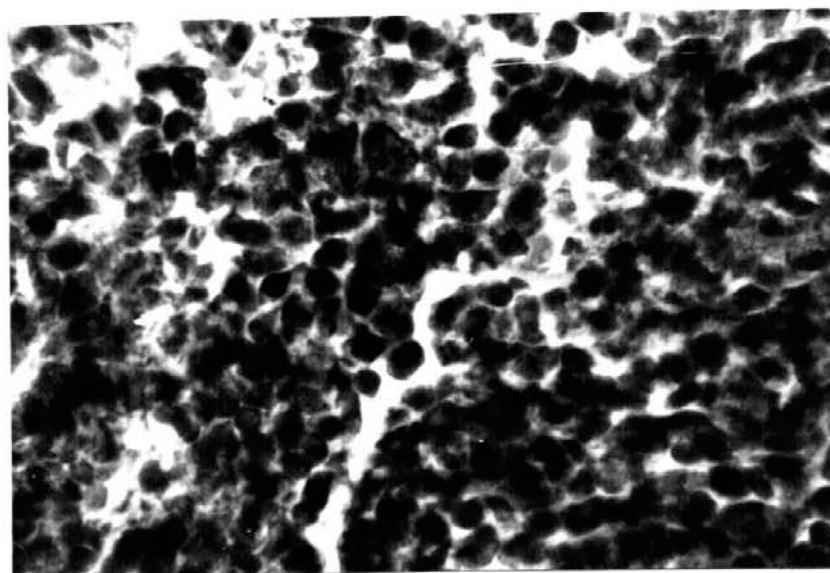


FIGURA 4. Pâncreas fetal de ratos de 17 1/2 dias de gestação após um período de cultivo de 10 dias. A maioria das células são intensamente granuladas e permanecem próximas a ductos (aldeído fucsina x 1000).



a



b

FIGURA 5. a: micrografia de pâncreas fetal de rato corado com hematoxilina e eosina (x 1000);  
b: pâncreas fetal de rato cultivado por 10 dias mostrando células da ilhota, e pouca quantidade de outros tecidos viáveis (hematoxilina e eosina x 1000).

IV. 2. Aspecto morfológico do enxerto após 30 dias de transplante.

Após 30 dias de transplante, as secções do músculo abdominal, em cada um dos receptores do grupo "isogênico" mostram ilhotas (Figura 6) com algumas células  $\beta$  muito granuladas e, outras ligeiramente granuladas, (Figura 7). A presença de numerosos vasos sanguíneos próximos às células  $\beta$  é constante evidenciando neo-vascularização, (Figura 8). No limite neste músculo e tecido enxertado, era frequente a presença de células  $\beta$  menos aglomeradas se infiltrando no tecido muscular, (Figura 9).

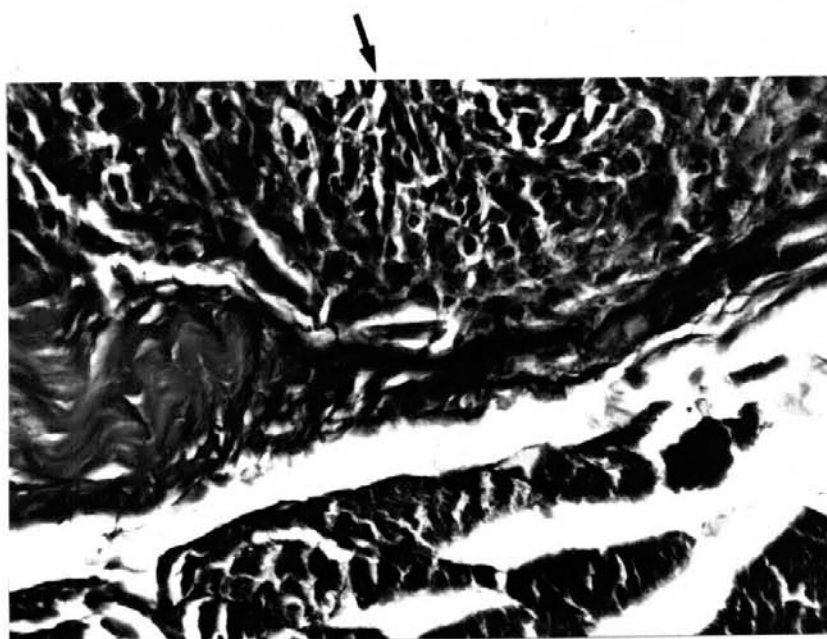


FIGURA 6. As setas indicam o tecido pancreático fetal cultivado e implantado no músculo abdominal de ratos "isogênicos" após 30 dias de transplante (hematoxilina e eosina 400 x ).

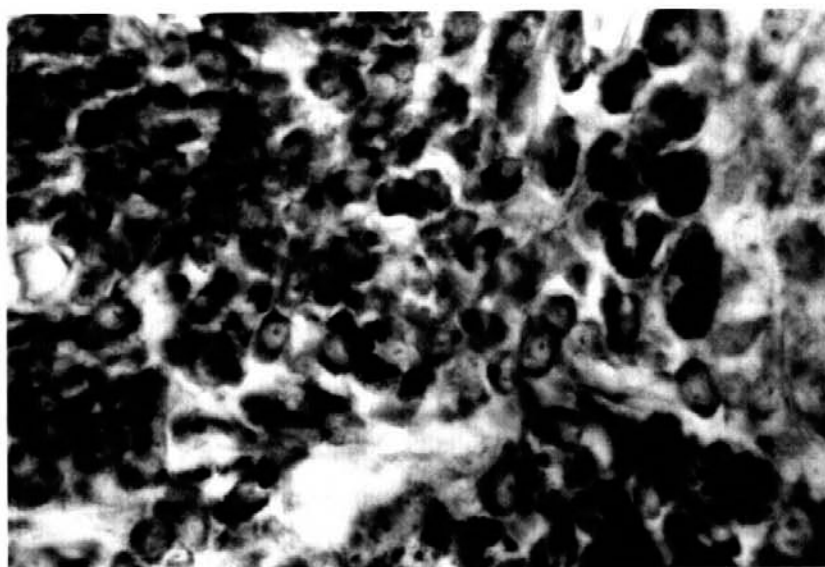


FIGURA 7. O enxerto visto na Figura 6 em grande aumento, mostrando células  $\beta$  altamente granuladas coradas com aldeido fucsina (x 1000).

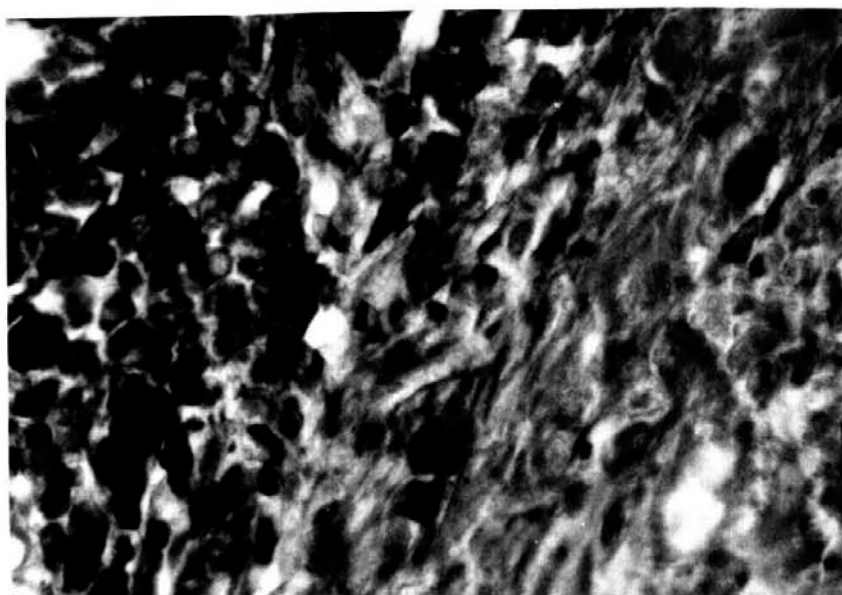


FIGURA 8. Micrografia de pâncreas fetal de rato, cultivado por 10 dias, implantado no músculo abdominal (aludeido fucsina x 1000).

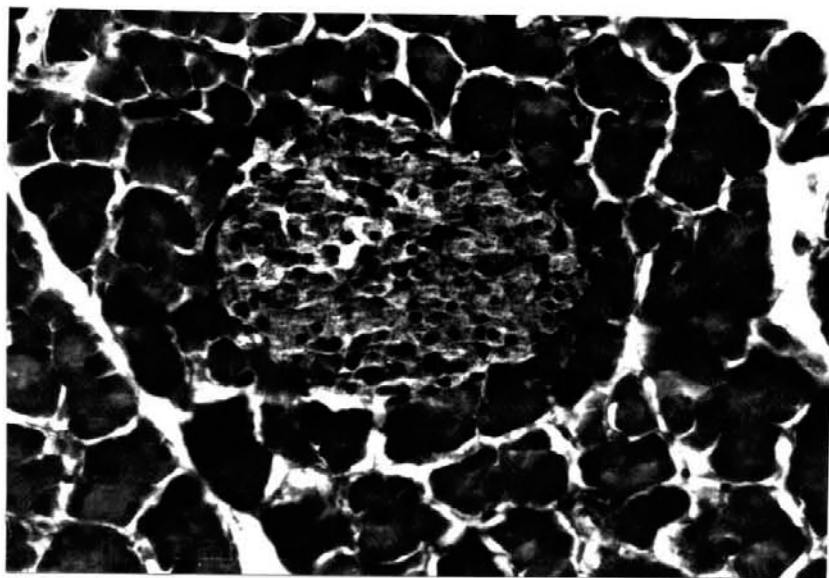


FIGURA 9. Pâncreas de rato adulto normal mostrando uma ilha entre os ácinos (hematoxilina eosina x 400).

### IV.3. Aspecto funcional do enxerto

Vinte e quatro horas após a injeção de aloxana, os ratos se tornaram diabéticos apresentando o quadro clínico típico da doença (poliúria, glicosúria, polidipsia e hiperglicemia). Aos 8 ou 10 dias do estado diabético já evidenciavam também, perda de peso. Após esse período foram feitos os transplantes. A Tabela I apresenta os dados de peso antes e após os transplantes) e glicemia (antes e após os transplantes) tanto do grupo "isogênico" quanto do grupo alogênico. Esses dados foram utilizados para a análise de variância e teste t, para a avaliação dos transplantes.

#### IV.3.1. Comparação entre os pesos médios (inicial, pré e pós transplantes) entre os grupos "isogênico" e alogênico.

Comparando os pesos médios (no início, imediatamente antes e ao final do experimento) entre os grupos "isogênico" e alogênico, constatamos o seguinte:

1. peso médio inicial - o grupo "isogênico" apresentou um peso médio inicial de  $355.47 \pm 47.8g$  e o grupo alogênico,  $227.00 \pm 25.3g$ . A diferença de peso médio entre os dois grupos foi significativa à 0.01 de acordo com a análise de variância da Tabela II;  $F(1,28) = 16.59, p < 0.01$ ;
2. peso médio pré transplante - a diferença dos pesos médios entre os dois grupos também foi significativa de acordo com a análise de variância mostrada na Tabela III. O grupo "isogênico" com  $305.80 \pm 43.7g$  e o grupo alogênico  $253.9 \pm 29.6g$  e  $F(1,28) = 14.09, p < 0.001$
3. Após os transplantes - ao final do experimento a diferença de peso médio também foi significativa. O grupo "isogênico" com

TABELA 1 - Grupos experimentais e parâmetros considerados para a avaliação dos enxertos dos animais do grupo "isogênico" e alogênico.

| Nº | C   | C <sub>1</sub> | C <sub>2</sub> | C <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> | C <sub>5</sub> |
|----|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 1  | 265 | 250            | 250            | 551            | 315            | 1              |
| 2  | 260 | 230            | 251            | 551            | 305            | 1              |
| 3  | 320 | 300            | 298            | 400            | 315            | 1              |
| 4  | 390 | 340            | 365            | 337            | 300            | 1              |
| 5  | 380 | 360            | 390            | 375            | 102            | 1              |
| 6  | 341 | 305            | 320            | 390            | 254            | 1              |
| 7  | 374 | 360            | 465            | 397            | 220            | 1              |
| 8  | 317 | 315            | 315            | 390            | 332            | 1              |
| 9  | 330 | 320            | 370            | 300            | 259            | 1              |
| 10 | 375 | 370            | 370            | 550            | 320            | 1              |
| 11 | 380 | 262            | 370            | 288            | 250            | 1              |
| 12 | 355 | 300            | 295            | 600            | 305            | 1              |
| 13 | 390 | 340            | 360            | 597            | 205            | 1              |
| 14 | 260 | 255            | 265            | 571            | 293            | 1              |
| 15 | 295 | 280            | 260            | 480            | 310            | 1              |
| 16 | 280 | 240            | 240            | 434            | 525            | 2              |
| 17 | 325 | 270            | 250            | 371            | 610            | 2              |
| 18 | 306 | 255            | 255            | 346            | 535            | 2              |
| 19 | 260 | 230            | 200            | 380            | 764            | 2              |
| 20 | 265 | 245            | 235            | 478            | 380            | 2              |
| 21 | 295 | 285            | 290            | 541            | 328            | 2              |
| 22 | 250 | 245            | 250            | 450            | 181            | 2              |
| 23 | 250 | 210            | 195            | 393            | 473            | 2              |
| 24 | 322 | 320            | 315            | 420            | 397            | 2              |
| 25 | 270 | 290            | 290            | 278            | 408            | 2              |
| 26 | 260 | 240            | 332            | 295            | 110            | 2              |
| 27 | 255 | 250            | 260            | 491            | 469            | 2              |
| 28 | 270 | 245            | 250            | 480            | 398            | 2              |
| 29 | 270 | 230            | 243            | 325            | 344            | 2              |

C = peso inicial

C<sub>1</sub> = peso antes do transplante

C<sub>2</sub> = peso depois do transplante

C<sub>3</sub> = glicemia antes do transplante

C<sub>4</sub> = glicemia depois do transplante

C<sub>5</sub> = 1 = isogênico; 2 = alogênico

TABELA II. Análise de variância. Peso inicial - "isogênico" contra alogênico.

| Fonte                         | GL | SS    | MS=SS/DF      | Razão F |
|-------------------------------|----|-------|---------------|---------|
| Fator                         | 1  | 24754 | 24754         | 16.59*  |
| Erro                          | 27 | 40292 | 1492          |         |
| Total                         | 28 | 65045 |               |         |
| Nível                         | N  | Média | Desvio Padrão |         |
| 1                             | 15 | 335.5 | 47.8          |         |
| 2                             | 14 | 277.0 | 25.3          |         |
| Desvio padrão do Grupo = 38.6 |    |       |               |         |

1 = isogênico

2 = alogênico

\*  $p < 0.01$

TABELA IV Análise de variância. Peso médio (g) após os transplantes "isogênico" contra alogênico.

| Fonte | GL | SS     | MS=SS/DF | Razão F |
|-------|----|--------|----------|---------|
| Fator | 1  | 37644  | 37644    | 14.02*  |
| Erro  | 27 | 72473  | 2684     |         |
| Total | 28 | 110117 |          |         |

| Nível | N  | Média | Desvio Padrão |
|-------|----|-------|---------------|
| 1     | 15 | 329.6 | 61.6          |
| 2     | 14 | 257.5 | 38.6          |

Desvio padrão do Grupo = 51.8

1 = isogênico

2 = alogênico

\*p < 0.001

TABELA III. Análise de variância. Peso médio (g) imediatamente  
antes dos transplantes "isogênico" contra alogênico.

| Fonte | GL | SS    | MS=SS/DF | Razão F |
|-------|----|-------|----------|---------|
| Fator | 1  | 19484 | 19484    | 14.09 * |
| Erro  | 27 | 37323 | 1382     |         |
| Total | 28 | 56807 |          |         |

| Nível | N  | Média | Desvio Padrão |
|-------|----|-------|---------------|
| 1     | 15 | 305.8 | 43.7          |
| 2     | 14 | 253.9 | 28.6          |

Desvio padrão do Grupo = 37.2

---

1 = isogênico

2 = alogênico

\*p < 0.001

329.6 $\pm$ 61.6g e o grupo alogênico 257.5 $\pm$ 38.6. A diferença entre os dois grupos, foi significativa à 0.001 de acordo com a análise de variância apresentada na Tabela IV;  $F(1,28) = 14.02, p < 0.001$ ).

#### IV.3.2. Média da diferença de peso intra-par entre os grupos "isogênico" e alogênico e para cada grupo.

1. entre o peso inicial e o peso pré-transplante, foi constatado que ambos os grupos perderam peso em consequência do diabetes induzido pela aloxana. Para o grupo "isogênico" a diferença média intra-par foi de -29.7 $\pm$ 29.9g e de -23.1 $\pm$ 21.2 g para o grupo alogênico. Para o primeiro grupo o teste t não foi significativo à 5%;  $t(27) = 1.775, p > 0.05$  enquanto que para o segundo grupo, houve uma diferença significativa à 5%;  $t(25) = 2.263, p < 0.05$ . Entre os dois grupos as diferenças de peso não foram significativas à 5% de acordo com a análise de variância apresentada na Tabela V,  $F(1,28) = 0.46, p > 0.05$ ;
2. entre o peso pré e pós transplante, o grupo isogênico apresentou ganho de peso igual à 23.8 $\pm$ 37.6 considerado significativo à 5% de acordo com o teste t;  $t(14) = 2.450, p < 0.05$ . Enquanto que o grupo alogênico teve um ganho de apenas 3.6 $\pm$ 28.1, não significativo à 5% de acordo com o teste t;  $t(13) = 0.475, p > 0.05$ . Entre os dois grupos, houve diferença significativa à 5% de ganho de peso de acordo com a análise de variância apresentada na Tabela VI  $F(1,28) = 2.66, p > 0.05$ ;
3. entre o peso médio inicial e o peso final, verificamos que faltaram apenas 5.9 $\pm$ 31.1g para que o grupo "isogênico"

TABELA V. Análise de variância da diferença a primeira pesagem e peso imediatamente antes dos transplantes, "Isogênico" contra alogênico.

| Fonte | GL | SS    | MS=SS/DF | Razão F |
|-------|----|-------|----------|---------|
| Fator | 1  | 315   | 315      | 0.46 *  |
| Erro  | 27 | 18396 | 681      |         |
| Total | 28 | 18711 |          |         |

| Nível | N  | Média | Desvio Padrão |
|-------|----|-------|---------------|
| 1     | 15 | -29.7 | 29.9          |
| 2     | 14 | -23.1 | 21.2          |

Desvio padrão do Grupo = 26.1

1 = isogênico

2 = alogênico

\*  $p > 0.05$

TABELA VI. Análise de variância. Ganho de peso (g) entre os pesos médios pré e pós os transplantes "isogênicos" contra alogênico.

| Fonte | GL | SS    | MS=SS/DF | Razão F |
|-------|----|-------|----------|---------|
| Fator | 1  | 2963  | 2963     | 2.66*   |
| Erro  | 27 | 30092 | 1115     |         |
| Total | 28 | 33055 |          |         |

| Nível | N  | Média | Desvio Padrão |
|-------|----|-------|---------------|
| 1     | 15 | 23.8  | 37.6          |
| 2     | 14 | 3.6   | 28.1          |

Desvio padrão do Grupo = 33.4

1 = isogênico

2 = alogênico

\*  $p > 0.05$ .

recuperasse o peso médio inicial, essa diferença não foi significativa para o grupo à 5% de acordo com o teste  $t$ ;

$t(26) = 0.291$ ,  $p > 0.05$ , como também não foi significativa à 5% a perda de peso de  $19.5 \pm 38.1$  para o ganho alogênico;  $t(22) = 1.581$ ,  $p > 0.05$ . Entre os grupos a diferença entre as perdas de peso não foram significativas à 5% de acordo com a análise de variância mostrada na Tabela VII,  $F(1,28) = 1.01$ ,  $p > 0.05$ .

#### IV.3.3. Correlação entre os pesos médios dos animais dos grupos "isogênico" e alogênico e para cada grupo.

Os coeficientes de correlação entre os pesos (inicial, pré e pós transplantes) foram calculados e os resultados avaliados à nível de 5%. Serão apresentados à seguir:

1. a correlação entre os pesos (inicial e pré transplantes) foi positiva para os indivíduos "isogênicos" e alogênicos e o coeficiente de correlação foi igual à 0.848 (Figura 10). Isto confirma que a diferença de perda de peso entre os dois grupos, nesta fase foi semelhante;
2. entre os pesos pré e pós transplantes para ambos os grupos, também houve correlação e o coeficiente foi igual à 0.846. Observar que a maioria dos indivíduos "isogênicos" aumentou de peso (Figura 11).
3. entre os pesos no início do experimento e ao final, para indivíduos "isogênicos" e alogênicos houve, também, correlação com o coeficiente igual à 0.814. Pela distribuição dos pontos apresentados na (Figura 12) pode-se observar que a maioria dos indivíduos isogênicos manteve ou aumentou o peso inicial, exceto o nº 12, e os alogênicos mantiveram ou perderam peso.

TABELA VII. Análise de variância da diferença de peso entre a primeira pesagem e peso depois dos transplantes, entre os grupos "isogênico" e alogênico.

| Fonte | GL | SS    | MS=SS/DF | Razão F |
|-------|----|-------|----------|---------|
| Fator | 1  | 1346  | 1346     | 1.01*   |
| Erro  | 27 | 36039 | 1335     |         |
| Total | 28 | 37385 |          |         |

| Nível | N  | Média | Desvio Padrão |
|-------|----|-------|---------------|
| 1     | 15 | - 5.9 | 35.1          |
| 2     | 14 | -19.5 | 38.1          |

Desvio padrão do Grupo = 36.5

1 = isogênico

2 = alogênico

\*  $p > 0.05$

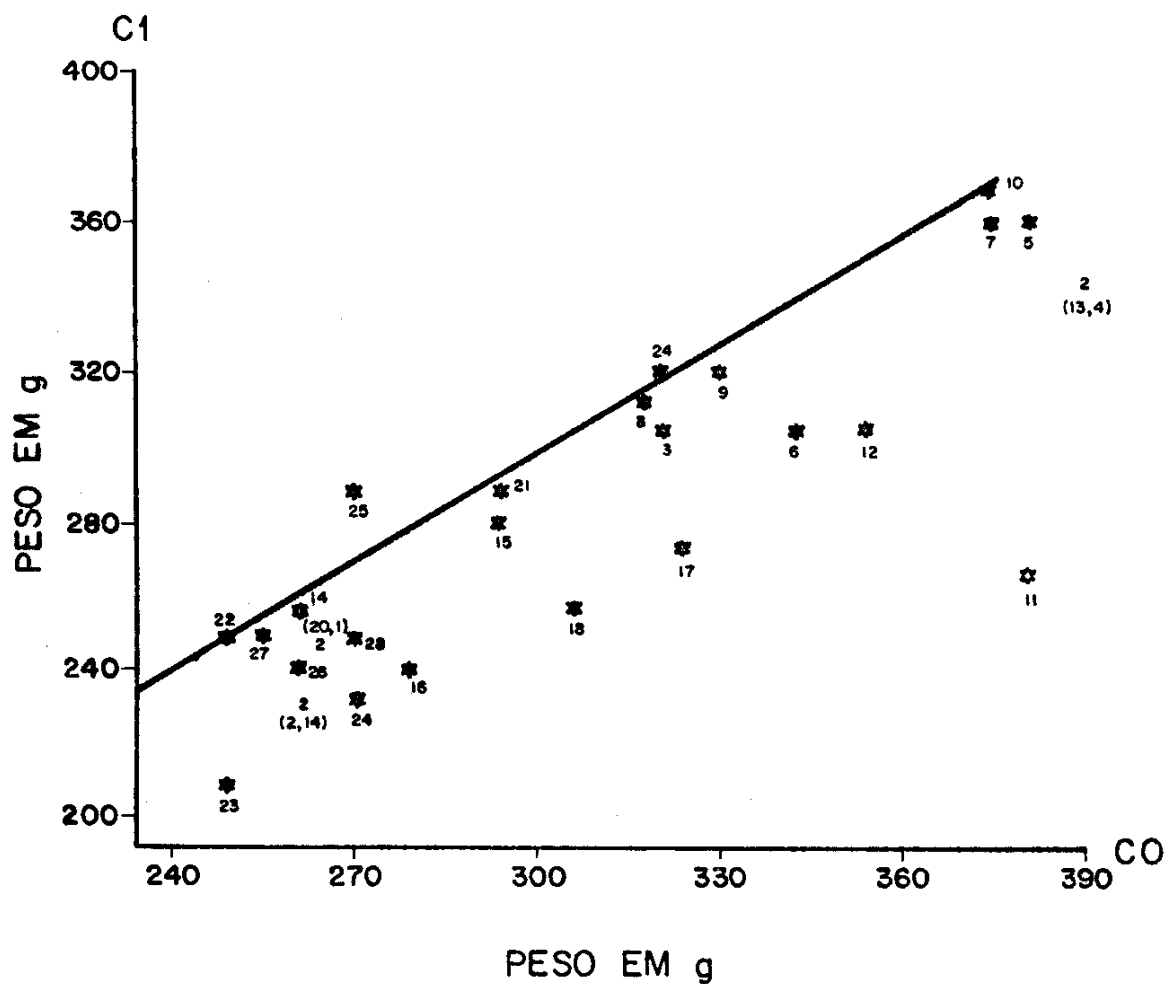


FIGURA 10 . Correlação dos pesos, inicial ( $C_0$ ) e pré - transplantes ( $C_1$ ) entre os indivíduos "isogênicos" (1-15) e alogênicos (16-29) listados na Tabela I. O coeficiente é igual à 0.848 , considerado significativo à 5%.

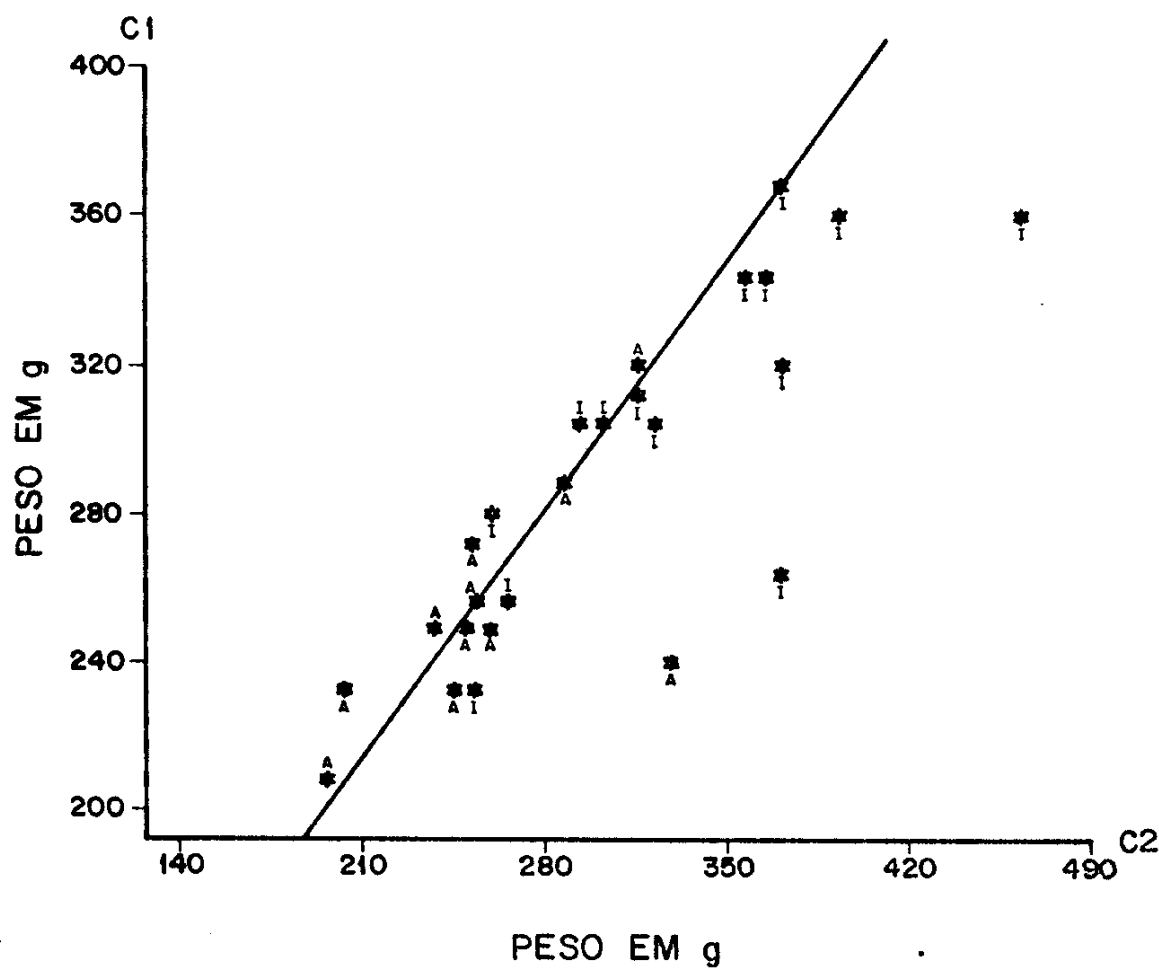


FIGURA 11. Correlação do peso pré ( $C_1$ ) e peso pós ( $C_2$ ) transplantes, dos indivíduos isogênicos (I) e alogênicos (A). O coeficiente de correlação é igual à 0,846 significativo à 5%.

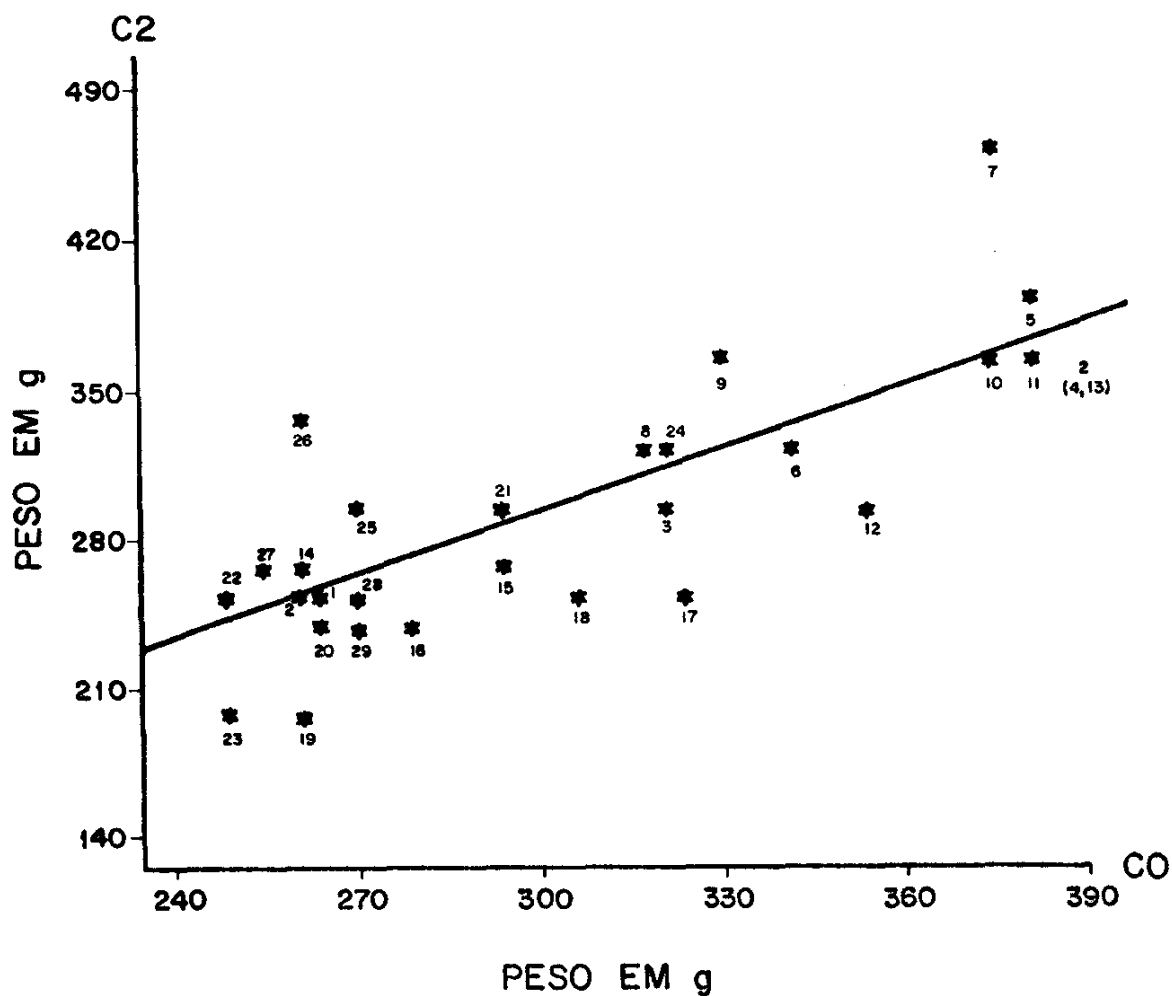


FIGURA 12. Correlação do peso inicial ( $C_0$ ) e após os transplantes ( $C_2$ ), entre os indivíduos "isogênicos" (1-15) e alogênicos (16-27) de acordo com a Tabela I. O coeficiente de correlação é igual à 0.814, significativo à 5%, mostrando a tendência de manutenção do peso principalmente pelos "isogênicos".

Para os indivíduos do grupo alogênico as correlações também foram significativas à 5%, de acordo com os coeficientes a seguir:

1. Entre os pesos iniciais e pré transplantes, o coeficiente de correlação foi de 0.696. Indicando ter havido perda de peso semelhante após a indução do diabetes. (Figura 13).
2. Entre os pesos pré e pós transplantes o coeficiente foi de 0.687 indicando que os indivíduos deste grupo não ganharam peso após os transplantes, exceto o indivíduo nº 26 de acordo com a distribuição de pontos da (Figura 14)
3. Entre os pesos iniciais e após os transplantes o coeficiente de correlação foi igual à 0.349, ainda considerado significativo. Porém, este nível de correlação, indica que houve pouca recuperação do peso inicial pelos animais deste grupo. (Figura 15).

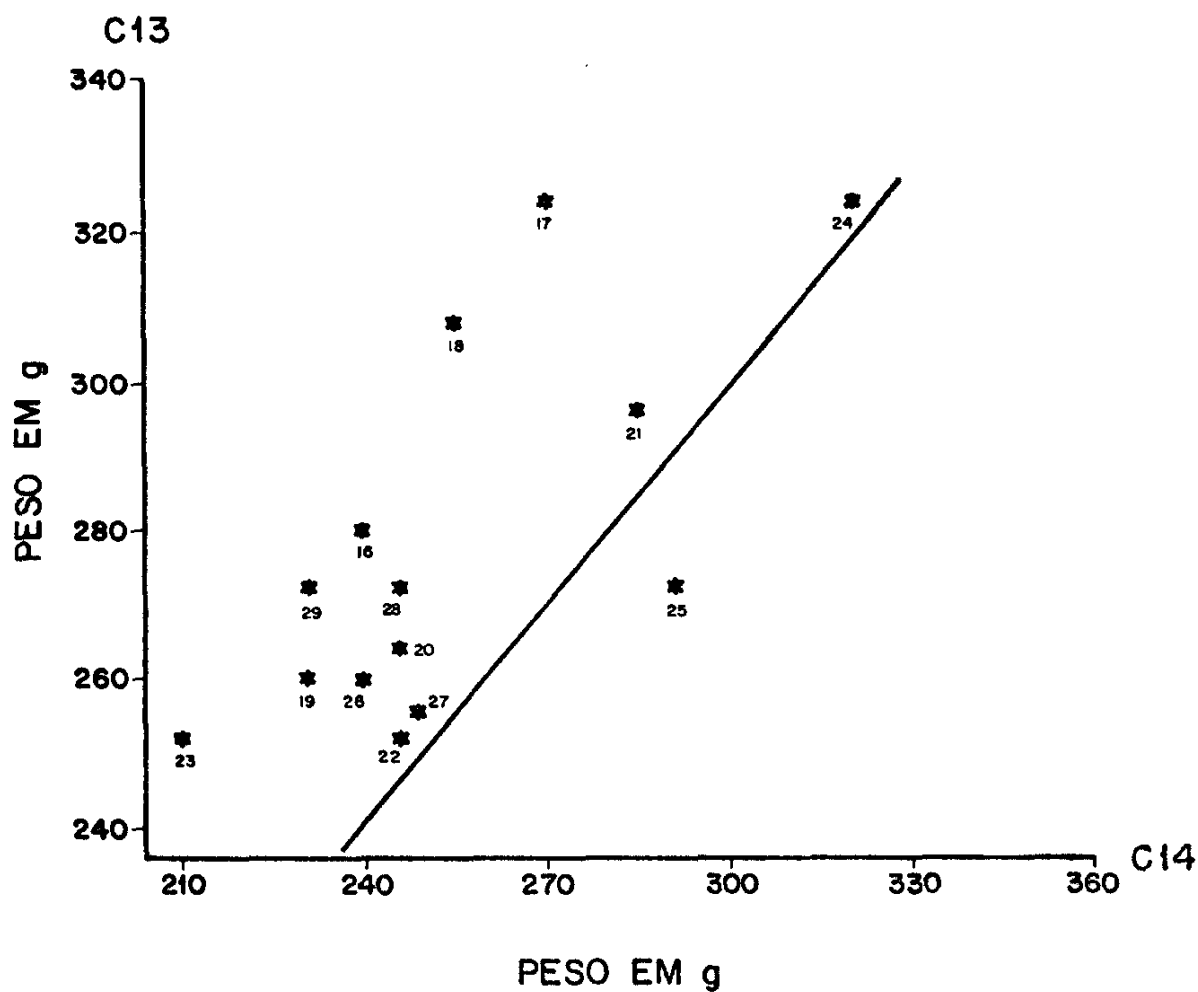


FIGURA 13. Correlação do peso inicial ( $C_{13}$ ) e peso pré ( $C_{14}$ ) transplantes dos indivíduos alogênicos (16-29) listados na Tabela I. O coeficiente de correlação é igual à 0.696, significativo à 5%.

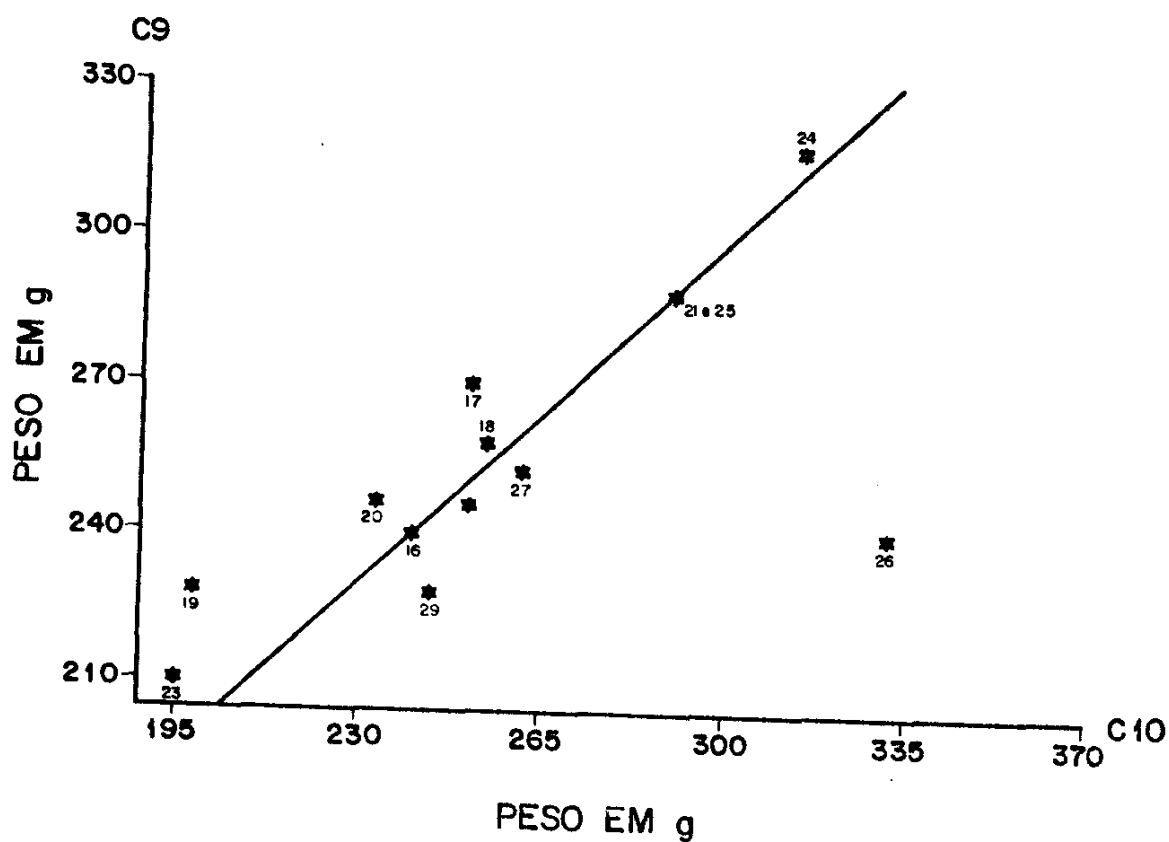


FIGURA 14. Correlação do peso pré ( $C_9$ ) e peso pós ( $C_{10}$ ) transplantes, do grupo alogênico. Os números representam os indivíduos listados na Tabela I. Coeficiente de correlação é igual a 0.687 considerado significativo a 5%.

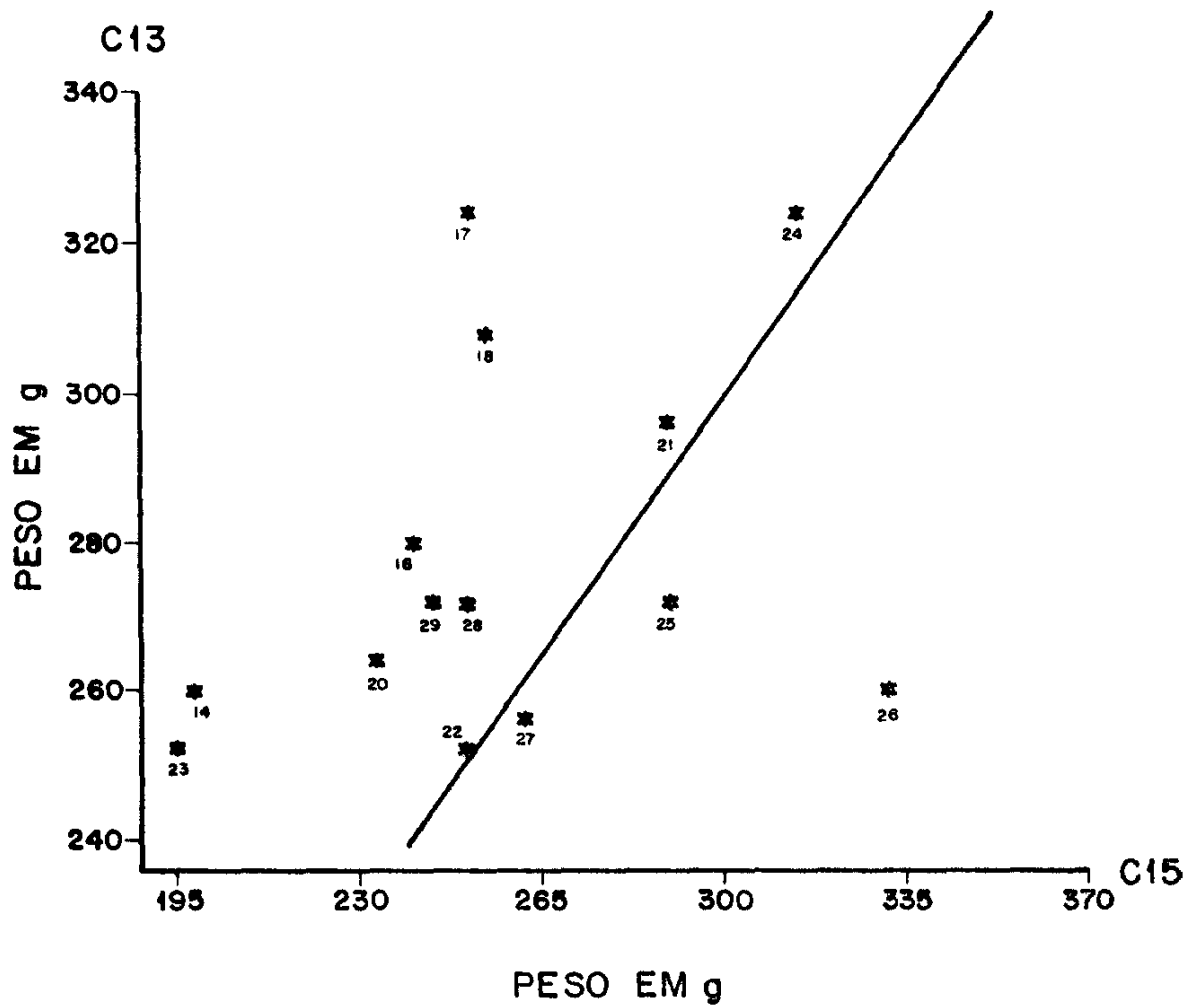


FIGURA 15. Correlação do peso inicial ( $C_{13}$ ) e após os transplantes ( $C_{15}$ ) do grupo alogênico. Os animais são os indivíduos listados na Tabela I. O coeficiente de correlação é igual à 0.349. Significativo à 5%.

Considerando a correlação entre os pesos (inicial, pré e pós transplantes) para os indivíduos do grupo "isogênico", verificamos que a mesma foi significativa à 5% em todos os casos, de acordo com o coeficiente de correlação a seguir:

1. entre os pesos iniciais e pré transplantes, o coeficiente de correlação foi de 0.789. Isto indica que todos perderam peso após a indução do diabetes; (Figura 16).
2. entre os pesos pré e pós transplantes, o coeficiente de correlação foi de 0.796. Embora a correlação seja positiva, pode-se notar pela Figura 17 que a maioria dos pontos estão distribuídos à direita da reta, evidenciando aumento de peso;
3. entre os pesos iniciais e após os transplantes, este grupo apresentou o maior coeficiente (0.824) significativo a 5% indicando uma recuperação do peso pela maioria dos indivíduos. Comparando o coeficiente de correlação deste grupo com o coeficiente de correlação do grupo alogênico (0.349) fica evidente a melhoria do primeiro em relação ao segundo quanto ao peso, após os transplantes. (Figura 18).

#### IV.3. . Glicemia média antes e após os transplantes

O nível glicêmico médio dos animais diabéticos do grupo "isogênico" ( $451.8 \pm 110.1 \text{ mg\%}$ ) não foi significativamente diferente daquele do grupo à 10% alogênico ( $405.9 \pm 78.4 \text{ mg\%}$ ) antes dos transplantes, de acordo com a análise de variância onde  $F(1,28) = 1.65$ ,  $p > 0.10$ , mostrada na Tabela VIII.. Entretanto, após os transplantes, o grupo "isogênico" sofreu uma redução da taxa glicêmica média para

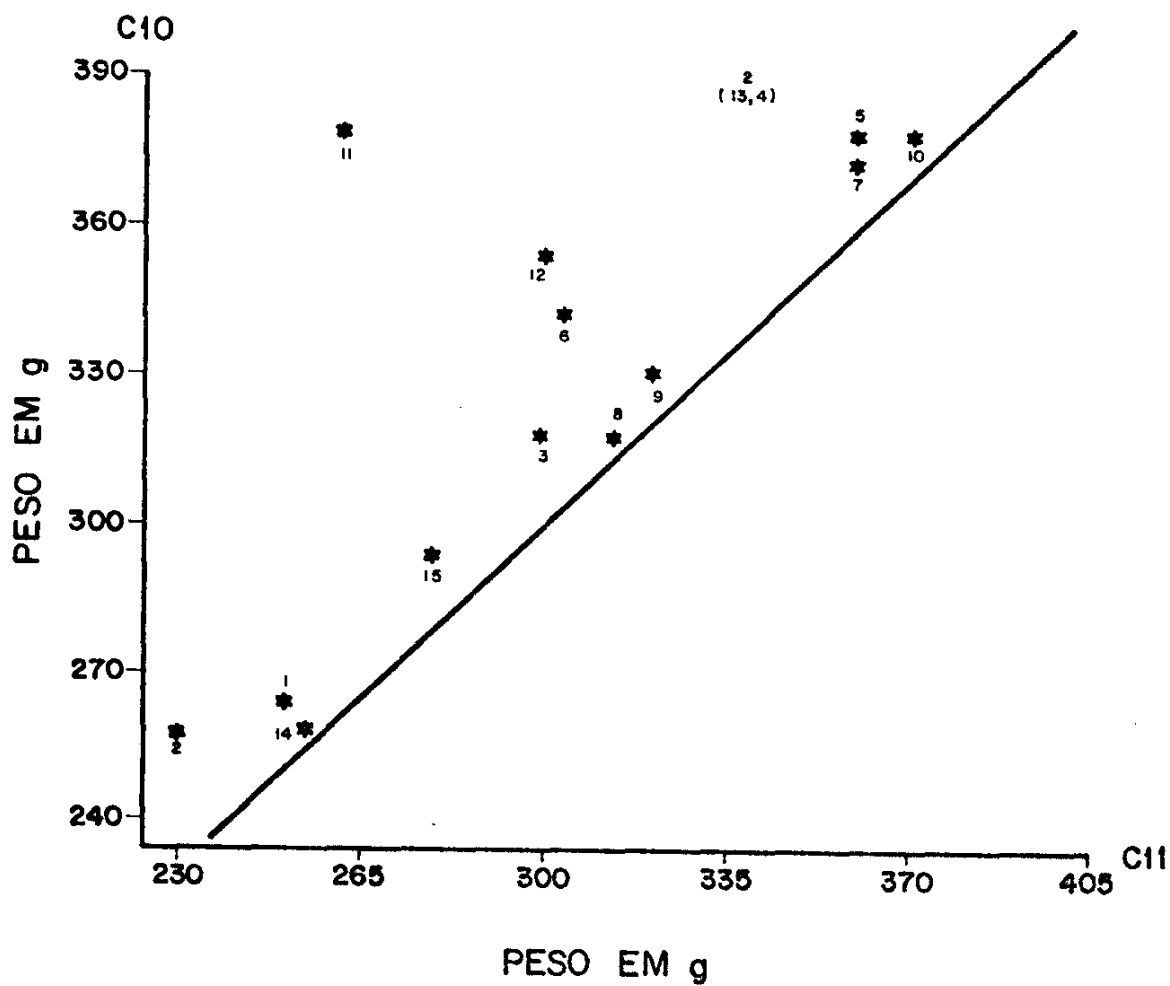


FIGURA 16. Correlação do peso inicial ( $C_{10}$ ) e pré ( $C_{11}$ ) transplantes para os indivíduos do grupo "iso gênico" (1-15) listados na Tabela I. O coeficiente é igual à 0.789, considerado significativo à 5%.

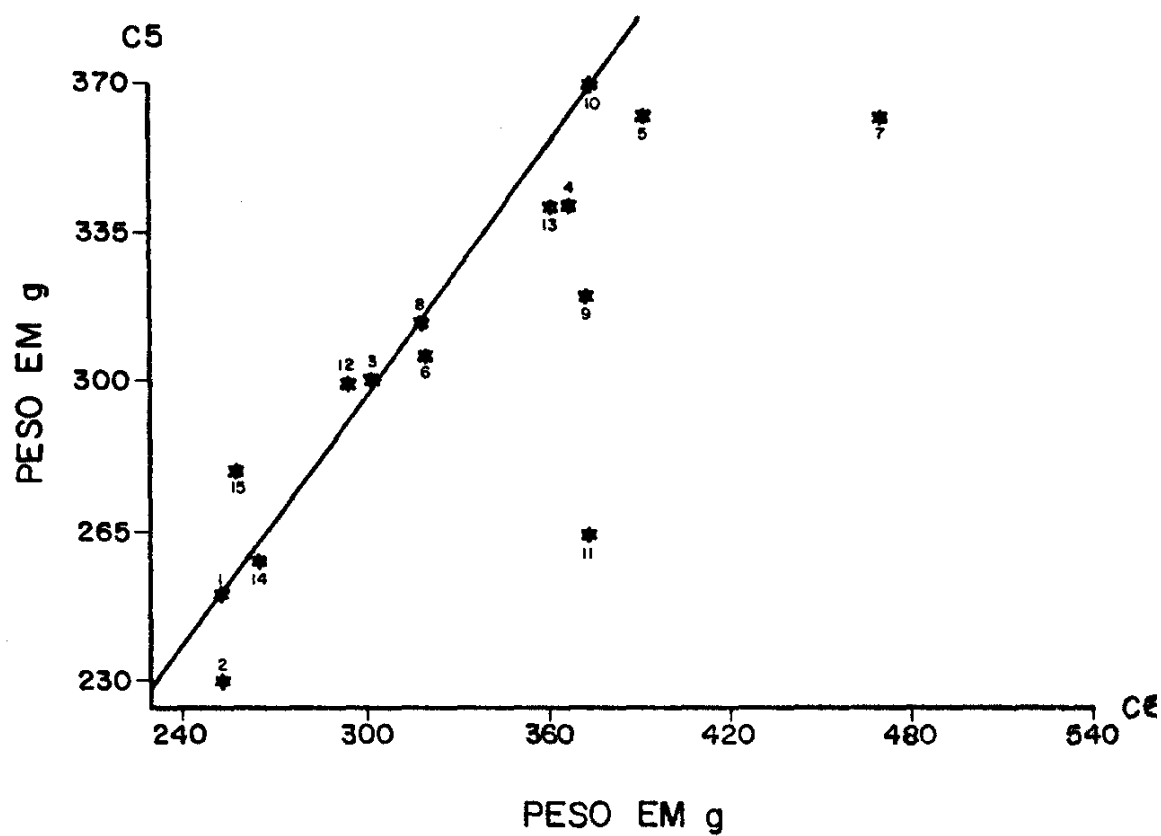


FIGURA 17. Correlação do peso pré ( $C_5$ ) e pós ( $C_6$ ), transplantes do grupo isogênico. Os números representam os indivíduos listados na Tabela I. O coeficiente de correlação foi igual à 0,796, considerado significativo à 5%.

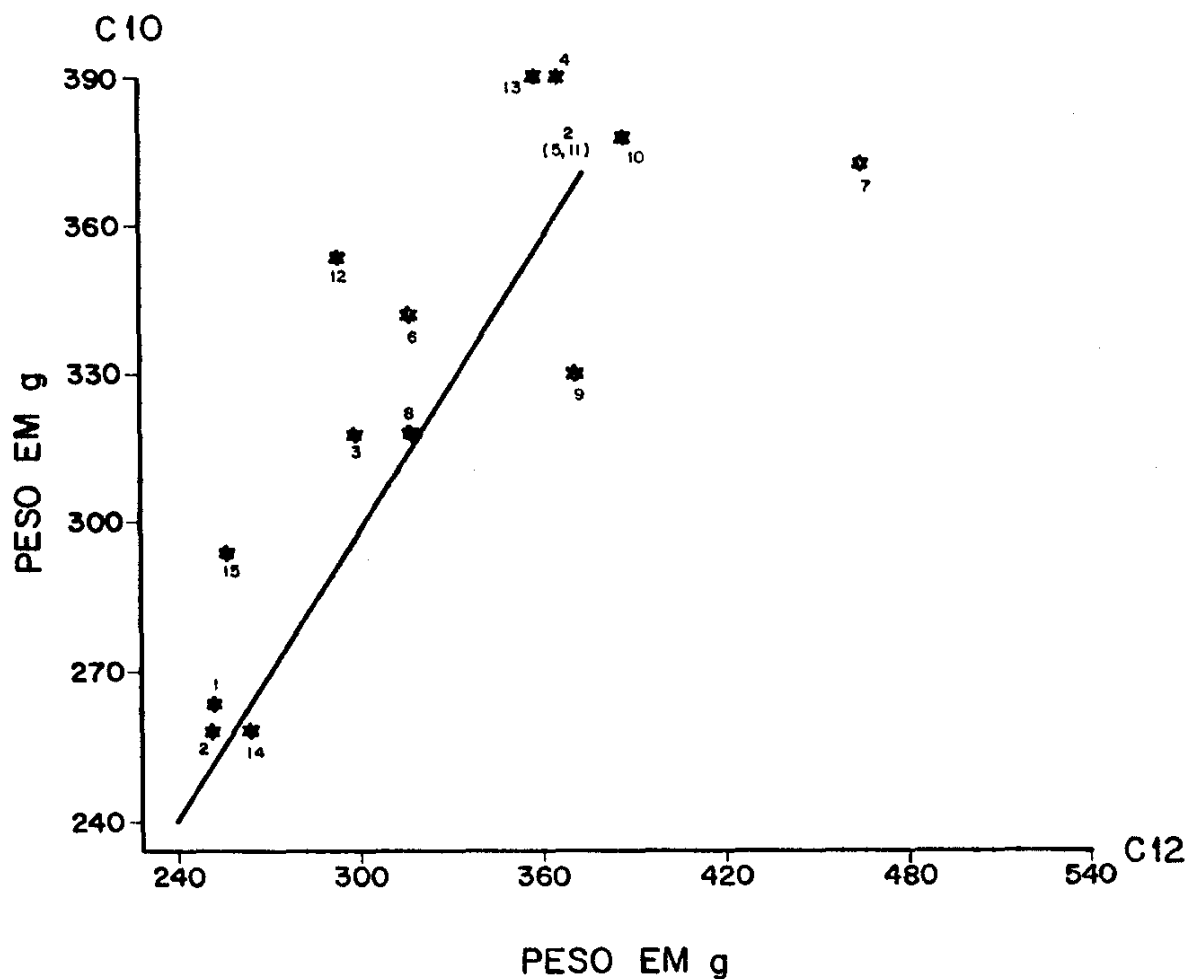


FIGURA 18. Correlação do peso inicial ( $C_{10}$ ) e após os transplantes ( $C_{12}$ ) para os indivíduos "isogênicos" (1-15) listados na Tabela I. O coeficiente de correlação é igual à 0.824, significativo à 5%.

TABELA VIII. Análise de variância da glicemia em mg% antes dos transplantes entre os grupos "isogênicos" e alogênicos.

| Fonte | GL | SS     | MS=SS/DF | Razão F |
|-------|----|--------|----------|---------|
| Fator | 1  | 15307  | 15307    | 1.65*   |
| Erro  | 27 | 249732 | 9249     |         |
| Total | 28 | 265038 |          |         |

| Nível | N  | Média | Desvio Padrão |
|-------|----|-------|---------------|
| 1     | 15 | 451.8 | 110.1         |
| 2     | 14 | 405.9 | 78.4          |

Desvio padrão do Grupo = 96.2

1 = isogênico

2 = alogênico

\*  $p > 0.10$

272±60mg% enquanto que o grupo alogênico teve um aumento do nível glicêmico para 423±165mg%. Entre os dois grupos a diferença foi significativa à 1% de acordo com a análise de variância apresentada na Tabela IX, onde  $F(1,28) = 11.07$ ,  $p < 0.01$ . Quanto à diferença de glicemia média para cada grupo verificamos que foi de -180.17±110mg% para o grupo "isogênico", significativa de acordo com o teste t, onde  $t(14) = -6.331$ ,  $p < 0.001$  e para o grupo alogênico, a diferença foi de 17.143±183mg%, não significativa de acordo com o teste t onde  $t(13) = 0.350$ ,  $p > 0.05$ . Entre os dois grupos essas diferenças também foram significativas à 5% de acordo com a análise de variância mostrada na Tabela X onde  $F(1,28) = 12.53$ ,  $p < 0.001$ .

As correlações para os valores da taxa glicêmica antes e após os transplantes não foram significativas para o grupo "isogênico", alogênico ou entre os grupos, à nível de 5%.

O coeficiente de correlação para o grupo isogênico foi de 0.271. De acordo com o gráfico da (Figura 19) pode-se notar que todos os pontos estão situados acima da reta, indicando uma redução da taxa de glicemia, para a maioria dos indivíduos. O coeficiente de correlação para o grupo alogênico foi igual a -0.010. O Gráfico da (Figura 20) mostra os pontos dispersos evidenciando inalteração ou aumento da taxa glicêmica da maioria dos indivíduos. Finalmente, a (Figura 21) mostra a correlação entre os indivíduos alogênicos e "isogênicos e o coeficiente de correlação foi de 0.070. Este gráfico confirma os dados anteriores.

TABELA IX. Análise de variância da glicemia em mg% após os transplantes entre os grupos "isogênicos" e alogênicos.

| Fonte | GL | SS     | MS=SS/DF | Razão F |
|-------|----|--------|----------|---------|
| Fator | 1  | 165840 | 165840   | 11.07 * |
| Erro  | 27 | 404405 | 14978    |         |
| Total | 28 | 570246 |          |         |

| Nível | N  | Média | Desvio Padrão |
|-------|----|-------|---------------|
| 1     | 15 | 272   | 60            |
| 2     | 14 | 423   | 165           |

Desvio padrão do Grupo = 122

1 = isogênico

2 = alogênico

\*  $p < 0.01$

TABELA X. Análise de variância da diferença de glicemia em mg% entre os grupos "isogênico" e alogênico.

| Fonte | GL | SS     | MS=SS/DF | Razão F |
|-------|----|--------|----------|---------|
| Fator | 1  | 281914 | 281914   | 12.53 * |
| Erro  | 27 | 607482 | 22499    |         |
| Total | 28 | 889396 |          |         |

| Nível | N  | Média | Desvio Padrão |
|-------|----|-------|---------------|
| 1     | 15 | -180  | 110           |
| 2     | 14 | 17    | 183           |

Desvio padrão do Grupo = 150

1 = isogênico

2 = alogênico

\*  $p < 0.001$

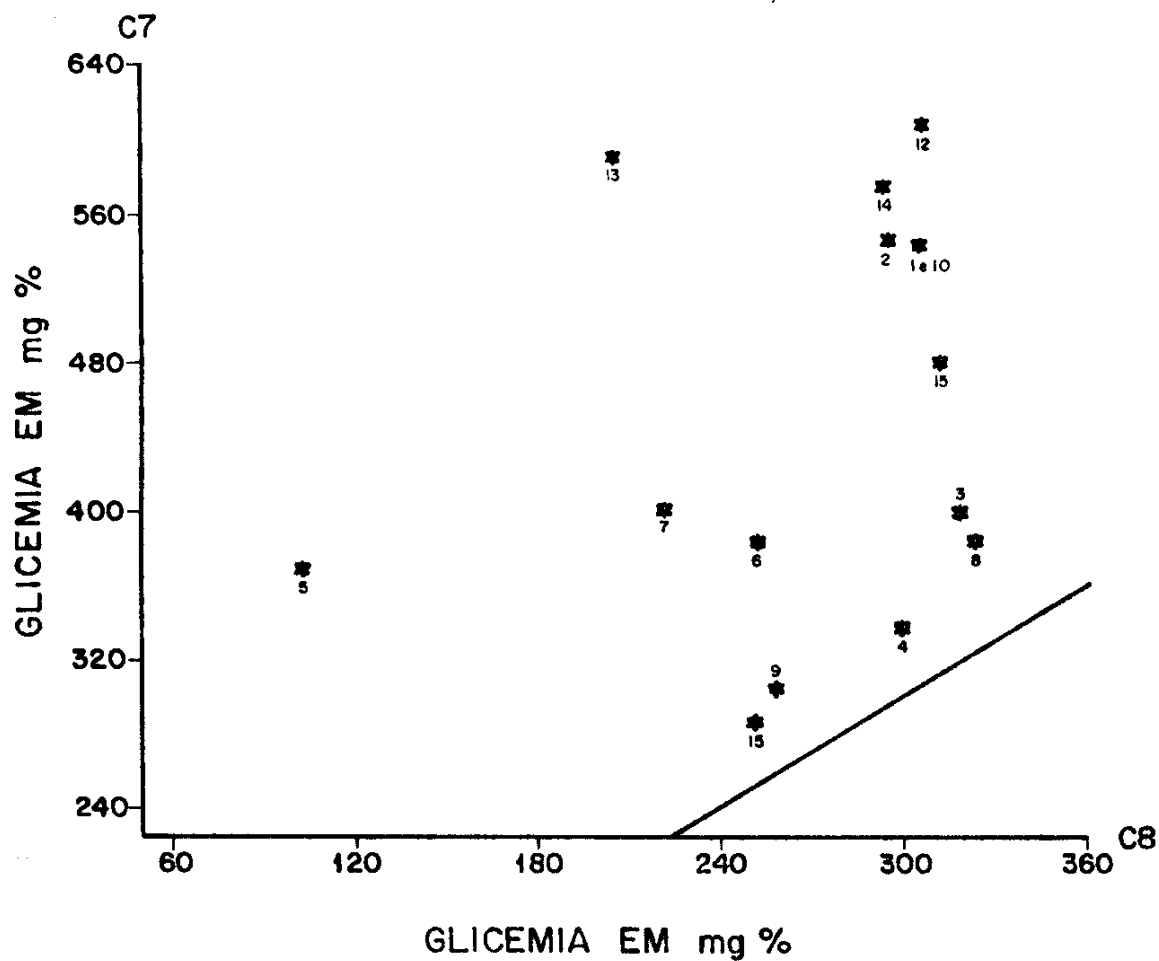


FIGURA 19. Correlação da glicemia antes (C<sub>7</sub>) e glicemia após (C<sub>8</sub>) os transplantes dos indivíduos isogênicos . Os números representam os indivíduos listados na Tabela I. O coeficiente de correlação é igual à 0,271, não significativo à 5%.

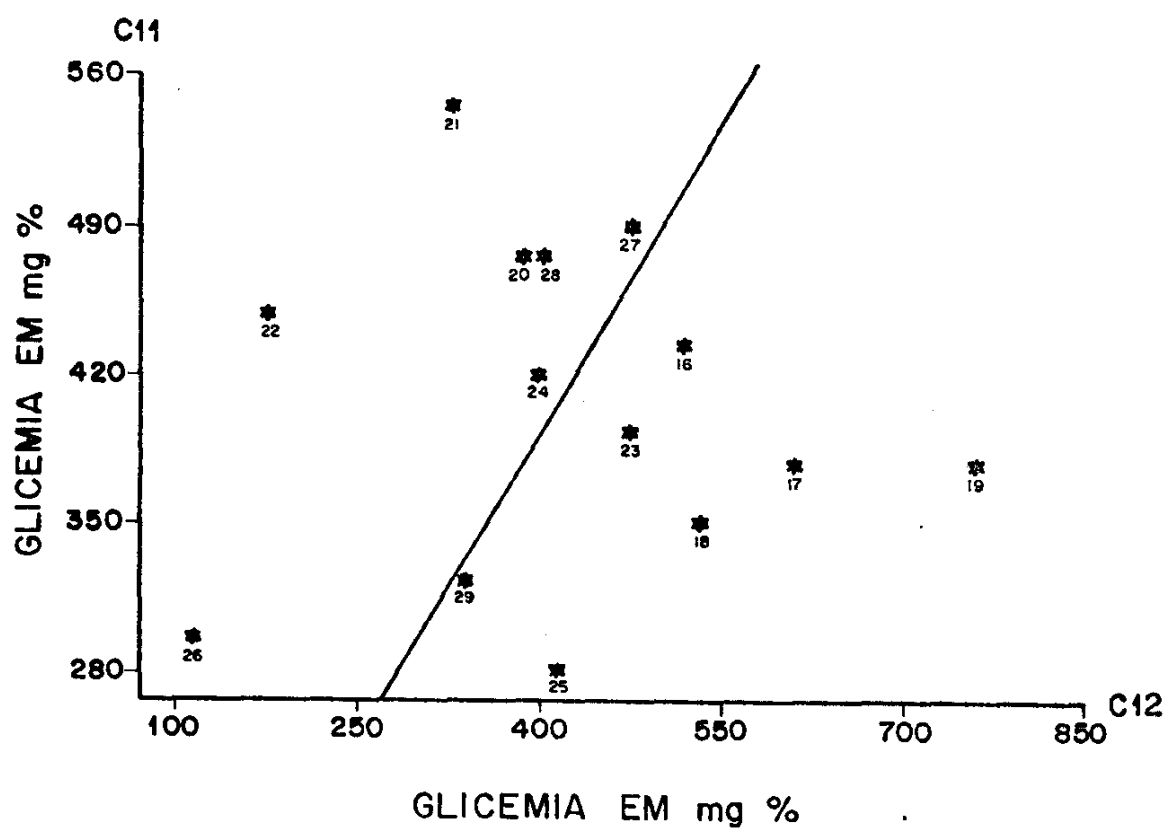


FIGURA 20. Correlação de glicemia antes ( $C_{11}$ ), glicemia após ( $C_{12}$ ) os transplantes dos indivíduos alogênicos. Os números representam os indivíduos tratados na Tabela I. O coeficiente de correlação é igual à 0.010 = não significativo à 5%.

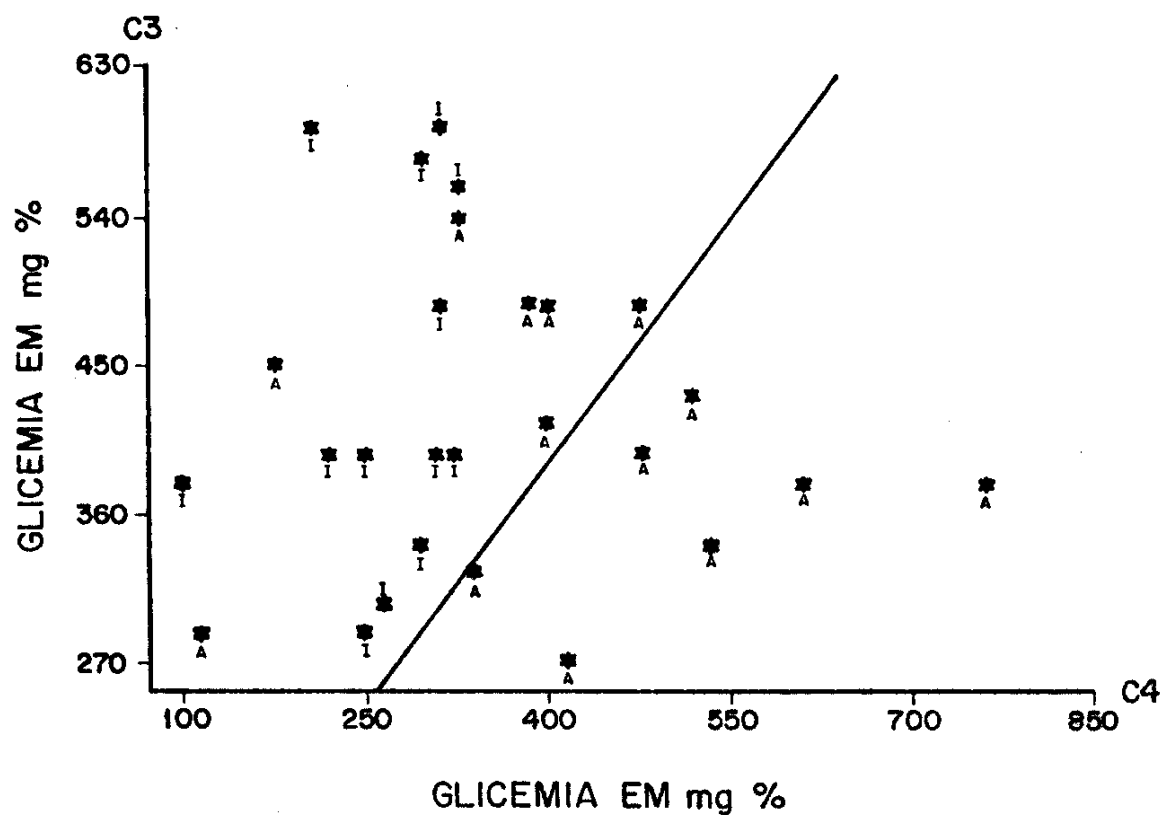


FIGURA 21. Correlação da glicemia antes ( $C_3$ ) e glicemia após ( $C_4$ ) os transplantes dos grupos alogênico (A) e isogênico (I). O coeficiente de correlação é igual a 0,070 não significativo a 5%.

## V. DISCUSSÃO

Já havia sido demonstrado anteriormente por vários investigadores, entre os quais, McEvoy *et alii* (1973), Hegre & Lazarow (1977) , a sobrevivência seletiva e a proliferação das ilhotas em meio de cultura. As observações dos cortes histológicos do tecido cultivado após 8 à 10 dias, em nosso estudo, também evidenciaram este fato (Figura 4).

Por não terem sido constatadas áreas necróticas nas partes centrais do tecido, podemos sugerir que a taxa de difusão foi compatível com a sobrevivência das células de acordo com Agren *et alii* (1980). Estes autores entre outros, constataram um acentuado aumento no conteúdo de hormônio, por unidade de peso úmido dos explantes cultivados e explicam que isto se deve ao efeito combinado de vários processos independentes, entre os quais:

1. a falta de circulação sanguínea através das ilhotas que pode dificultar a liberação do hormônio pelas células.
2. a perda do tecido acinoso que pode levar à um aumento na proporção das células das ilhotas, o que por sua vez eleva o conteúdo hormonal.

Com relação a este aspecto, nós observamos uma coloração mais intensa, com aldeido fucsina nas ilhotas cultivadas em relação às frescas (Figuras 4 e 7).

Pudemos constatar também, através dos enxertos, que o pâncreas fetal de rato retém a sua viabilidade após 8 a 10 dias de cultura.

Quanto aos transplantes, verificamos que os mesmos não parecem ter sido rejeitados no grupo "isopênico".

Nossas evidências para esse fato, são substantiadas pela melhoria do estado diabético nestes grupos e pela ausência de infiltração de células mononucleadas no enxerto, de acordo com os cortes histológicos. Além disso, nossa suposição inicial é corroborada pelas seguintes fatos:

1. uma infiltração linfocítica, ocorre 48 horas após o transplante, atingindo o máximo no quarto dia (Franklin, Schullack & Reckard, 1979);
2. a rejeição do tecido estranho ocorre devido à presença de linfócitos migradores carregados dentro do enxerto (teoria de Snell, 1957) e antígenos de transplante (teoria de Medawer, 1963) localizados nas células do enxerto e em maior quantidade nas células endoteliais dos capilares da ilhotas (Parr *et alii*, 1982). Ou, a rejeição ocorre devido à interação entre antígenos, linfócitos ativadores do enxerto e células do sistema imune do receptor. Isto é, as células linfoides do doador estimulam o reconhecimento dos antígenos do enxerto pelo hospedeiro. Sendo assim, a resposta da rejeição, não é iniciada sem os linfócitos do doador segundo as explicações de Lafferty (1980), e durante o período de cultura, tanto os antígenos (principalmente devido à degeneração dos capilares) quanto os linfócitos são destruídos ou reduzidos (Parr *et alii*, 1982, Faustman *et alii*, 1982 e Rabinovith *et alii*, 1982).

Como em nossos experimentos os enxertos foram previamente cultivados, não deveriam apresentar tais elementos, pelo menos em grande quantidade, constituindo, portanto, um tecido adequado para o transplante. Pois, já está bem estabelecido que o sistema de cultura afeta os leucócitos migradores do explante, quanto a mesma é feita em siste-

ma fechado à 37°C, com a utilização dos meios de cultura usuais (Yasunami *et alii*, 1983 a e b).

Em nosso estudo, o cultivo do tecido pancreático fetal por 10 dias em meio Ham F-10, suplementado com soro fetal bovino à 15%, inativado (1 hora à 56°C) e antibióticos parece ter sido efetivo para manter as ilhotas morfológica e funcionalmente intactas, de acordo com os exames dos cortes histológicos antes e após os transplantes apresentando células betas intensamente coradas com aldeido fucsina (Figuras 4 e 7).

Pela comparação tanto dos pesos médios (inicial, pré e pós transplantes) entre os grupos "isogênico" e alogênico e das diferenças de pesos médios entre esses grupos nos períodos inicial- pré transplantes, pré-pós transplantes e ainda entre o período inicial e pós transplantes, feitas pelas análises de variância e testes t, verificamos ter havido uma recuperação significativa do peso inicial pelo grupo "isogênico". Este grupo obteve um ganho de peso médio igual a  $23.8 \pm 37.6$  g ( $p < 0.05$ ) entre o período pré e pós transplante após os 30 dias de observação, enquanto que para o grupo alogênico a diferença foi de apenas  $3.6 \pm 28$  g ( $p > 0.05$ ).

A reversão do diabetes não foi total de acordo com a rejeição da hiperglicemia observada no grupo "isogênico" ao final do experimento ( $272 \pm 60$  mg%). Entretanto, a diferença de  $-180.17 \pm 110$  ( $p < 0.001$ ) entre os períodos pré e pós transplantes, foi significativa para este grupo. Este resultado era previsto de acordo com os dados da literatura quanto aos transplantes intramusculares. Segundo Lacy *et alii* (1979), os transplantes nestes sítios reduzem

significativamente a hiperglicemia e os indivíduos recuperam seu ganho de peso, porém não se tornam normoglicêmicos. O sítio de transplante de ilhotas ou tecido pancreático fetal é de grande importância com relação ao possível uso do mesmo para transplantes em humanos. Sob o ponto de vista funcional, os sítios que são drenados pelo sistema venoso portal (injeção de ilhotas na veia porta, *omentum* intestinal) são os ideais quando comparados com aqueles drenados pela circulação sistêmica (sítio intramuscular, cápsula renal, baço, etc.). Quando a drenagem do enxerto é feita pelo sistema porta, o alvo primário para a ação da insulina, após ter sido liberada pelo enxerto, é o fígado, daí a sua importância. Este fato também foi demonstrado por Boscher e Negreiros de Paiva (1977), e Brown *et alii* (1979). Estes últimos realizaram experimentos nos quais os transplantes sob a cápsula renal em ratos isogênicos, apresentavam a drenagem venosa da veia cava inferior à veia porta hepática através da realização de uma derivação entre elas. Por outro lado, o sítio de transplante deve ser avaliado sob o ponto de vista imunológico, quando se trata de aloenxertos. Trabalhos recentes têm considerado o ventrículo cerebral (Tze & Tai, 1983) ou o testículo (Bobzien *et alii*, 1983) como sítios imunologicamente privilegiados. Os resultados destes estudos em xenoenxertos foram satisfatórios. Entretanto, os isoenxertos levam vantagem em relação aos aloenxertos por evitarem as complicações iniciais do diabetes como aquelas que envolvem o sistema microvascular do rim, dos olhos e o suprimento do sistema venoso autônomo para o colon, em animais experimentais.

Em nossos estudos procuramos solucionar o problema imunológico utilizando pâncreas fetal de rato cultivado e receptores que apresentavam coeficiente de parentesco igual a 37,5%. A sobrevivência do enxerto, pelo menos por 30 dias foi maior nestes animais do que nos receptores sem grau de parentesco, aliado ao fato, de não ter sido necessária a utilização de tratamento imunossupressor.

A opção pelo sítio intramuscular foi devido às facilidades de procedimento cirúrgico e acesso para a recuperação e avaliação do enxerto quanto ao aspecto morfológico, através do qual pudemos observar, inclusive, que a neo-vascularização foi ótima neste local.

A escolha do tecido fetal foi devida ao fato de sua conhecida potencialidade para a replicação continuada das células da ilhota, provendo assim uma quantidade suficiente para afetar o estado diabético. Este tecido tem sido sugerido para transplante em humanos dadas as suas qualidades e com isto, pequenas quantidades do mesmo podem ser usadas com sucesso em sítios apropriados para reverter o estado diabético (Lazarow *et alii*, 1973).

Resta saber por quanto tempo além dos 30 dias sobreviveriam os enxertos e se a utilização de sítios fisiologicamente mais apropriados, como por exemplo, os sistema utilizado utilizado por Yasunami, Lacy & Finke (1983), dariam melhores resultados. Esses autores implantaram ilhotas livres no *omentum* intestinal encapsuladas no *peritoneum* do receptor e sugerem que este é um sítio fisiologicamente adequado porque a insulina é liberada dentro do sistema venoso portal.

## VI. RESUMO

Neste estudo, o pâncreas fetal de rato, cultivado, foi utilizado como órgão doador para o tratamento do diabetes induzido por aloxana.

O efeito deste tratamento foi comparado entre dois grupos experimentais:

1. doadores e receptores com um coeficiente de parentesco 37.5%, obtidos por endocruzamento de ratos da linhagem Wistar;
2. doadores e receptores sem grau de parentesco, da mesma linhagem.

Os primeiros foram chamados de grupo "isogênico" e os outros, de grupo alogênico.

Os pâncreas fetais foram enxertados em sítios intramusculares. O efeito desses enxertos sobre o estado diabético dos receptores foi avaliado, morfológica e fisiologicamente, após 30 dias de acompanhamento, e os resultados obtidos foram os seguintes:

Quanto ao aspecto morfológico, apenas os enxertos "isogênicos" foram facilmente encontrados e a seguir examinados ao microscópio comum. Estes pareceram bem estabelecidos, com aglomerados de células  $\beta$ , vascularização intrínseca sem aparente infiltração de células mononucleadas ou fibrose intersticial.

Quanto ao aspecto funcional verificamos também, que os ratos do grupo "isogênico" responderam satisfatoriamente aos enxertos, pois recuperaram seu peso médio inicial apresentando uma diferença de apenas  $-5.9 \pm 35.1g$  ( $P > 0.05$ )

significativa à 5% entre o peso médio inicial e o peso médio após os 30 dias de transplante. Quanto à glicemia média o "isogênico" apresentou uma redução significativa de  $-180.17 \pm 110\text{mg\%}$  ( $p < 0.001$ ) após transplantes. No concernente ao grupo alogênico ocorreu o oposto, isto é, houve incremento significativo de  $12,5\text{mg\%}$  de glicemia ( $p < 0.001$ ).

Em resumo esse trabalho fala a favor de que fetos semelhantes de alto coeficiente de parentesco numa geração, poderão ser utilizados como modelo de transplantes.

## VII. CONCLUSÕES

Considerando o interesse geral no desenvolvimento de métodos alternativos para a normalização da glicemia em indivíduos diabéticos, e a importância dos transplantes experimentais como um desses métodos alternativos, podemos concluir, segundo nossos estudos em ratos que:

1. os enxertos pancreáticos fetais podem ser adequados para melhorar o estado diabético quando transplantado no músculo;
2. os enxertos fetais por apresentarem alta proporção de tecido endócrino em relação ao exócrino se prestam ao transplante;
3. durante o período de cultura as ilhotas de tecido pancreático fetal se proliferam e o tecido acinoso se degenera, assim como se degeneram também os linfócitos. Este último fato parece ser de grande importância para imunogenicidade dos transplantes, explicando pelo menos em parte a melhoria na sobrevivência do tecido pancreático fetal enxertado;
4. havendo aumento do tecido endócrino, provavelmente há também aumento na produção de insulina;
5. Em animais com diabetes severo, os transplantes são menos efetivos;
6. o modelo alogênico deve ser recusado, tendo em vista os péssimos resultados obtidos, provavelmente devido à sua alta imunogenicidade;
7. o modelo com alto coeficiente de endocruzamento parece ser o mais adequado, uma vez que torna desnecessário o uso de animais resultantes de numerosas gerações e é o único

que poderá, do ponto de vista prático, ser extrapolado para outras espécies animais.

# VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; DORF, M.; KARNOVISKY, M. & UNANUE, E. The distribution of Ia antigens on the surface of lymphocytes. *J. Immunol.*, 116:371-78, 1976.

AGREN, A.; ANDERSON, A.; BJORKÉN, C.; GROTH, C.C.; GUNNARSSON, R.; HELLERSTROM, C.; LINDMARK, G.; LUNDOVIST, G.; PETERSSON, B. & SWENNE, J. Human fetal pancreas: culture and function in vitro. *Diabetes*, 29(Supp. 1) pp. 64-9, 1980.

AMOS, D.B. & WARD, F.E. Immunogenetics of the HL-A system. *Physiol. Rev.*, 55(2):206-46, 1975.

ANDERSON, A. Isolated mouse pancreatic islets in culture: effects of serum and different culture media on the insulin production of the islets. *Diabetologia*, 14:397-404, 1978.

———. Reversal of hyperglycemia by intraesplenic transplantation of 4-week-cultured allogeneic mouse islets. *Diabetes*, 31(4):78-82, 1982.

——— & SANDLER, S. Culture and cryopreservation of isolated pancreatic islet. *Immunol. in Diabetes*, pp. 177-86, 1984.

AXEN, K.V. & PI-SUNYER, F.X. Long-term reversal of streptozotocin - induced diabetes in rats by intramuscular islet implantation. *Transplantation*, 31(6):439-41, 1981.

- BAEKESKOV, S.; LERNMARK, A. & KLARESKOG, L. Expression of major histocompatibility antigens on pancreatic islet cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78:6456-60, 1981.
- BALLINGER, W.F. & LACY, P.E. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery*, 72:175-86, 1972.
- BARKER, C.F.; RECKARD, C.K. & ZIEGLER, M.M. The liver as an immunologically privileged site for rat pancreatic islet allografts. *Diabetes*, 24(2):418, 1975.
- ; FRANGIPANE, L.G. & SILVERS, W.K. Islet transplantation in genetically determined diabetes. *Ann. Surg.*, 186:401-410, 1977.
- BARTLETT, S.T.; NAJI, A.; SILVERS, W.K. & BARKER, C.F. Influence of culturing functioning of major-histocompatibility-complex-compatible and incompatible islet grafts in diabetic mice. *Transplantation*, 36(6):687-90, 1983.
- BEWICK, M.; MUNDY, A.R.; EATON, B. & WATSON, F. The endocrine function of the heterotopic pancreatic allotransplant in dogs. I. Normal and rejection. *Transplantation*, 31:15-18, 1981.
- BOBZIEN, B. YOSHICHI, Y.; MAJERCIK, M.; LACY, P.E. & DAVIE, J.M. Intratesticular transplants of islet xenografts (rat to mouse). *Diabetes*, 32(33):213-216, 1983.
- BOSCHERO, A.C. & NEGREIROS DE PAIVA, C.E. Transplantation of islet of Langerhans in diabetic rat. *Acta Physiol. Latinoam.*, 27:1-6, 1977.

BROWN, J.; MOLNAR, I.G. & CLARK, W. Control of experimental diabetes mellitus in rats by transplantation of fetal pancreases. *Science*, 184:1377, 1974.

—————; CLARK, W.R.; MOLNAR, I.G. & MULLEN, Y.S. Fetal pancreas transplantation for reversal of streptozotocin induced Diabetes in rats. *Diabetes*, 25(1):56-64, 1976.

—————; ————; MAKOFF, R.K.; WEISMAN, H.; KEMP, J.A. & MULLEN, Y.S. Pancreas transplantation for diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.*, 89:951-65, 1978.

—————; MULLEN, Y.S.; CLARK, W.E. & MOLNAR, I.G. Importance of hepatic portal circulation for insulin action in streptozotocin - diabetic rats transplanted with fetal pancreases. *J. Clin. Invest.*, 64:1688-94, 1979.

—————; HEININGER, D.; KURET, J. & MULLEN, Y.S. Islet cells grow after transplantation of fetal pancreas and control of diabetes. *Diabetes*, 30:9-13, 1981.

—————; ————; ————- & ————. Normal response to pregnancy in rats cured of streptozotocin diabetes by transplantation of one fetal pancreas. *Diabetologia*, 22: 273-75, 1982.

—————; DAVINOLOVS, J.A.; CLARK, W.R. & MULLEN, Y.S. Fetal pancreas as a donor organ World. *J. Surg.*, 8:152-57, 1984.

- BOWEN, K.M. & LAFFERTY, K.J. Reversal of diabetes by allogeneic transplantation without immuno-suppression. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 58:441, 1980.
- BROWNING, H. & RESNICK, P. Homologous and heterologous transplantation of pancreatic tissue in normal and diabetic mice. *Yale J. Biol. Med.*, 24:141-52, 1952.
- CAHILL, G.F. Jr.; ETZWILER, D.D. & FREINKEL, N. Blood glucose control in diabetes. *Diabetes*, 25:237-39, 1976.
- COLLIER, S.; MANDEL, T.E.; HOFFMAN, L. & CARUSO, G. Organ culture of fetal mouse pancreas. The effect of culture condition on insulin and glucagon secretion. *Diabetes*, 30:804-12, 1981.
- COUPLAND, R.E. The survival and growth of pancreatic tissue in the anterior chamber of the eye of the albino rat. *J. Endocrinol.*, 20:69-77, 1960.
- CURMAN, B.; KAMPE, O.; RASK, L. & PETERSON, P. Presence of alloreactive Ia antigens on murine intestine epithelial cells. *Scand. J. Immunol.*, 10:11-15, 1979.
- COWING, C.; SCHWARTZ, B. & DICKLER, H. Macrophage Ia antigens. I. Macrophage populations differ in their expression of Ia antigens. *J. Immunol.*, 120:378-84, 1978.

- DULIN, W.E. & SORET, M.G. Chemically and hormonally induced diabetes. In: B.W. Volk and K.F. Wellmann (ed.) *The Diabetes pancreas*. N.Y., Plenum Press, pp. 425-43, 1977.
- ELOY, R.; DOILLON, C. & DUBOIS, P. Fetal pancreatic transplantation-review of experimental data. *Transplantation Proceedings*, XII - 4 (Supp.2): December, pp.179-85, 1980.
- FAUSTMAN, D.; LACY, P.E. & DAVIE, J.M. Transplantation without immunosuppression. *Diabetes*, 31(Supp. 4): pp. 11-16, 1982.
- FINCH, D.R.A. & MORRIS, T.J. The effect of increasing islet numbers on survival of pancreatic islet allografts in immunosuppressed diabetic rats. *Transplantation*, 23: 104 - 106, 1977.
- FRANKLIN, W.A.; SCHULAK, J.A. & RECKARD, C.R. The fate of transplanted pancreatic islets in the rats. *Am. J. Pathol.*, 94:85-96, 1979.
- GLENN, K.C. & ROSS, R. Human monocyte-derived growth factor(s) for mesenchymal cells. Activation of secretion by endotoxin and concavalin A. *Cell*, 25:603-615, 1981.
- GORDON, R.D.; SAMELSON, L.E. & SIMPSON, E. Selective response to H-Y antigen by F<sub>1</sub> female mice sensitized to P<sub>1</sub> male cells. *J. Exp. Med.*, 146-606, 1977.

- GOULMY, E. van LEUWEN, A.; BLOKLAND, E. van ROOD, E.E. & BIDDISON, W.E. Major histocompatibility complex-restricted H-Y specific antibodies and cytotoxic T lymphocytes may recognize different self determinants. *J. Exp. Med.*, 155:1567, 1982.
- GROTH, C.G.; ANDERSON, A.; BJORKEN, C.; GUNNARSSON, R.; HELLERSTRON, L.; LUNDGREN, G.; PETERSON, B.; SWENNE, I. & OSTMAN, J. Transplantation of fetal pancreatic microfragments via the portal vein to a diabetic patient. *Diabetes*, 29(1):80-83, 1980.
- HAMMERLING, G.; MAUVE, J.; GOLBERG, E. & McDEVITT, H. Tissue distribution of Ia antigens: Ia on spermatozoa, macrophages and epidermal cells. *Immunogenetics*, 1:428 - 37, 1974.
- HEGRE, O.D.; McEVOY, R.C.; BACHELDER, V. & LAZAROW, A. Organ culture of fetal rat pancreas: quantitative analysis by linear scanning of islet and other tissue components. *In vitro*, 7:766-76, 1971.
- ; WELLS, L.J. & LAZAROW, A. Insulin content of fetal rat pancreases grown in organ culture and subsequently transplanted into maternal hosts. *Diabetes*, 21:193-203, 1972.

- ; LEONARD, R.J.; ERLARDSON, S.L. McEVOY, R.C.; PAR-  
SONS, J.A.; ELDE, R.P. & LAZAROW, A. Transplantation of  
islet tissue in the rat. *Acta Endocrinol.*, 83(205):257-  
278, 1976.
- ; —————; RUSIN, J.R. e LAZAROW, A. Growth of  
islet following organ culture and subsequent allo and  
iso transplantation. *Anat. Rec.*, 185:209-22, 1976.
- & LAZAROW, A. Islet cell transplantation; in the  
diabetic pancreas. Volk, B.W. & Wellman, K., editors .  
New York, Plenum Press, p. 517-550, 1977.
- ; SCHIMITT, R.V. & McEVOY, R.C. Syngeneic transplan-  
tation of fetal rat pancreas. I. Effect of insulin  
treatment on the reversal of diabetic. *Diabetes*, 27:  
982-87, 1979.
- HELMKE, K.; SLIJEPCEVIC, M. & FEDERLIN, K. Islet trans-  
plantation in experimental diabetes of the rat. II. Stu-  
dies allogenic pancreatectomized rats. *Horm. Metab. Res.*,  
7:210-14, 1975.
- HESS, W.N. & ROOT, K.W. Study of the pancreas of white rats of diffe-  
rent age groups. *Am. J. Anat.*, 63:489-98, 1938.
- HESLOP, B.F. Maturation of histocompatibility antigens and  
reactivity in the rat. *Transplant. Proc.*, 1:560-63, 1969.

HOFFMAN, L.; CARTER, W.; MANDEL, T.E.; MARTIN, F.I.R. & CAMPBELL, D. The effect of short term insulin treatment on the reversal of diabetes after transplantation of syngeneic cultured or incultured fetal mouse pancreas. *Transplantation*, 32:342-45, 1981.

———; MANDEL, T.E. & CARTER, W. Insulin content of fetal mouse pancreas in organ culture and after transplantation. *Diabetes*, 31:826-29, 1982.

HOWARD, R.J.; BALFOUR, H.H.; MATAS, A.J.; NAJARIAN, J.S. & SUTHERLAND, D.E.R. Encephalomyocarditis virus induced diabetes mellitus treated by islet transplantation. *Transplantation*, 27:200-202, 1979.

JACOBS, B.B. Ovarian allograft survival. *Transplantation*, 18:454, 1974.

JONASSON, O. Transplantation of the pancreas. *Transpl. Proc.*, 11(1):325, 1979.

KEDINGER, M.; HAFFEN, K.; GRENIER, J. & ELOY, R. In vitro culture reduce immunogenicity of pancreatic endocrine islet. *Nature*, 270:736-38, 1977.

KOHLER, N. & LIPTON, A. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp. Cell Res.*, 87:297-301, 1974.

KYRIAKIDES, G.K.; SUTHERLAND, D.E.R.; OLSON, L.; MILLER, J. & NAJARIAN, J.S. Segmental pancreatic transplantation in dogs. *Transplant Proc.*, 11:530-32, 1979.

LACY, P.E.; WALKER, M.M. & FINK, C.E.J. Perfusion of isolated rat islet in vitro. *Diabetes*, 21:987-98, 1972.

—————; DAVIE, J. & FINKE, E. Induction of rejection of successful allografts of rat islet by donor peritoneal exudate cells. *Transplantation*, 28:415-20, 1979.

—————; LACY, E.T.; FINKE, E.H. & YASUNAMI, Y. An improved method for the isolation of islets from the beef pancreas. *Diabetes*, 31(4):109-116, 1982.

LAFFERTY, K.J.; COOLEY, M.A.; WOOLNOUGH, J. & WALKER, K.Z. Thyroid allograft immunogenicity is reduced after a period in organ culture. *Science*, 188:259-61, 1975.

LAFFERTY, K.J. Immunogenicity of foreign tissues. *Transplantation*, 29:179-81, 1980.

LARGIADER, F.; UHLSCHMID, G.; BINSWANGER, U. & ZARUBA, K. Pancreas rejection in combined pancreaticoduodenal and renal allotransplantation in man. *Transplantation*, 19:185-187, 1975.

LAZAROW, A.; WELLS, L.J.; CARPENTER, A.M.; HEGRE, O.D.; LEONARD, R.J. & McEVOY, R.C. Islet differentiation, organ culture, and transplantation. *Diabetes*, 23:413-28, 1973.

LEONARD, R.J.; LAZAROW, A. & HEGRE, O.D. Pancreatic islet transplantation in the rat. *Diabetes*, 22:413-28, 1973.

- LILLEHEI, R.C.; SIMMONS, R.L.; NAJARIAN, J.S.; WEIL, R. ;  
UCHIDA, H.; RUIZ, J.O.; KJELLSTRAND, C.M. & GOETZ, F. C.  
Pancreatic duodenal allotransplantation. Experimental  
and clinical experience. *Ann. Surg.*, 172:405-436 ,  
1970.
- LORENZ, D.; LIPPERT, J.; TIETZ, W.; WORM, V.; DORN, A. KOCH,  
G.; ZIEGLER, M. & ROSENBAUN, K.D. Transplantation of  
isolated islets of Langerhans in diabetic dogs. I. Re-  
sults after allogenic intraportal islet transplantation .  
*J. Surg. Res.*, 27:181-92, 1979.
- MANDEL, T.E. & HIGGINBOTHAN, L. Organ culture and transplan-  
tation of fetal mouse pancreatic islets. *Transplant.*  
*Proc.* 11:1501-506, 1979.
- ; COLLIER, S.; CARTER, W.; HIGGINBOTHAN, L. & MARTIN,  
F.I.R. Effect of in vitro glucose concentration on fetal  
mouse pancreas cultures used as grafts in syngeneic dia-  
betic mice. *Transplantation*, 30(3):231-33, 1980.
- ; HOFFMAN, L. & CARTER, W.M. Long term isografts of  
cultured fetal mouse pancreatic islets. The ontogenic ef-  
fects of streptozotocin on the prevention of diabetic re-  
nal complications. *Am. J. Pathol.*, 104:227-236, 1981.
- ; HOFFMAN, L.; COLLIER, S.; CARTER, W.M. & KOULMANDA,  
M. Organ culture of fetal mouse and fetal human pancrea-

- tic islet for allografting. *Diabetes*, 31(4):30-47, 1982.
- MATAS, A.J.; SUTHERLAND, D.E.R.; STEFFES, M.W.; NAJARIAN, J. S. Islet transplantation using neonatal rat pancreas: Quantitative studies. *J. Surg. Res.*, 20:143-147, 1976.
- ; SUTHERLAND, D.E.R.; STEFFES, M.W. & NAJARIAN, J. S. Islet transplantation. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 145: 757-772, 1977a.
- ; PAYNE, W.D.; ECKHARDT, J. & NAJARIAN, J.S. A mouse model of islet transplantation using neonatal donors. *J. Surg. Res.*, 24(5):389-393, 1977b.
- McEVOY, R.C. Fetal rat pancreas in organ culture: effects of serum on the development of the endocrine cells. *Differentiation*, 17:105-109, 1980.
- . Fetal rat pancreas in organ cultures: effect of exogenous insulin on the development of the islet cells. *Horm. Metab. Res.*, 13:5-8, 1981.
- ; HEGRE, O.D.; LEONARD, R.J. & LAZAROW, A. Differentiation of acinar cell component in vivo and in vitro. *Diabetes*, 22:384-89, 1973.
- & —————. Syngeneic transplantation of fetal rat pancreas. *Diabetes*, 27(10):988-95, 1978.

- ; SCHMITT, R.V. & HEGRE, O.D. Syngeneic transplanta  
tion of fetal rat pancreas. *Diabetes*, 27(10): 982-97 ,  
1978.
- & HEGRE, O.D. Syngeneic transplantation of fetal  
rat pancreas. III. Effects of insulin treatment on the  
growth and differentiation of the pancreatic implants af-  
ter reversal of diabetes. *Diabetes*, 28:141, 1979.
- McMASTER, P.; PROCYSHYN, A.; CALNE, R.Y.; VALDES, R.; ROLLES,  
K. & SMITH, D. Prolongation of canine pancreas allograft  
survival with cyclosporin A. *Br. Med. J.*; 280:444-45,  
1980.
- MEDAWAR, P. Introduction definition of the immunologically  
competent cell. In: *The Immunologically competent cell:  
Its nature and origin*. Wolsteuholme, G.I.W. & Knaght, J.  
(eds.) Ciba Foundation Study Group, 16: p.1, 1963.
- MILLARD, P.R.; PATH, M.R.C.; GARVEY, J.F.W.; JEFFERY, E. L.  
& MORRIS, P.J. The grafted fetal rat pancreas. *Am. J.*  
*Pathol.*, 100:209-224, 1980.
- MIRROVITCH, V. & CAMPICHE, M. Successful intrasplenic autotrans  
plantation of pancreatic tissue in totally pancrea-  
tectomy dogs. *Transplantation*, 21:265, 1976.
- MOLNAR, G.D.; TAYLOR, W.F. & HO, M.M. Day to day variation  
of continuously monitored glycaemia: A further measure

of diabetes instability. *Diabetologia*, 8:342-48, 1972.

MORRIS, P.J.; FINCH, D.R.; GARVEY, J.F.; POULE, M.D. & MILLARD, P.R. Suppression of rejection of allogenic islet tissue in the rat. *Diabetes*, 29(1):107-112, 1980.

MULLEN, Y.S.; CLARK, W.R.; KEMP, J.; MOLNAR, I.G. & BROWN, J. Reversal of experimental diabetes by fetal rat pancreas. II. Critical procedures for transplantation. *Transp. Proc.*, 9:329-32, 1977.

MULLEN, Y.S. & SHINTAKU, I.P. Fetal pancreas allografts for reversal of diabetes in rats. *Transplantation*, 29(1): 35-42, 1980.

NAJARIAN, J.S.; SUTHERLAND, D.E.R. & STEFFES, M.W. Isolation of human of human islets of Langerhans for transplantation. *Transplant. Proc.*, 7:611-13, 1975.

—————; —————; MATAS, A.J. & STEFFES, M.W.; SIMMONS, R.L. & GOETZ, F.C. Human islet transplantation: a preliminary report. *Transplant Proc.*, 9:233-36, 1977.

NAJI, A.; SILVERS, W.K.; POLKINS, S.E.; DEFOE, D. & BARKER, C.F. Successful islet transplantation in spontaneous diabetes. *Surgery*, 86:218-26, 1979.

—————; BELLGRAU, D.; ANDERSSON, A.; SILVERS, W.K. & BARKER, C.F. Transplantation of islet and bone marrow cells to animals with immune insulinitis. *Diabetes*, 31(4): 84-89, 1982.

- NAZARETH, H.R.S.; PINTO JUNIOR, W. & ANDRADE, J.A.D. Diagnóstico pré-natal de aberrações cromossômicas. Primeira experiência brasileira. *Rev. Bras. Gen.*, *1V*(3): 459 - 470, 1981.
- OUTZEN, H.C. & MEITER, E.H. Transplantation of pancreatic islet into cleared mammary fat pads. *Transplantation*, *32*(2):101-105, 1981.
- PANIJAYAMOND, P.; SOROFF, H.S. & MONACO, A.P. Pancreatic islet isografts in mice. *Surg. Forum*, *24*:329-331, 1973.
- PARR, E.L.; OLIVER, J.R. & KING, N.J.C. The surface concentration of H-2 antigens on mouse pancreatic  $\beta$ -cells and islet cell transplantation. *Diabetes*, *31*(4):1-10, 1982.
- PERLOFF, L.J.; NAJI, A. & BARKER, C.F. Vascularized pancreas versus isolated islet transplant on an immunological comparison. *Surgery*, *88*:222-230, 1980.
- PROWSE, S.J.; LAFFERTY, K.J.; SIMEONOVIC, C.J.; AGOSTINO, M. BOWEN, K.M. & STEELE, E.J. The reversal of diabetes by pancreatic islet transplantation. *Diabetes*, *31*(4): 30-37, 1982.
- RABINOVITCH, A.; MULLER, W.A.; VASTUTIC, I.; MALAISSE-LAGAE, F. & MINTZ, D.H. Pancreatic islet iso-transplantation: influence of severity of diabetes in the recipient. *Diabetologia*, *12*:145, 1976.

- ; —————; FERGUSON, R.M.; SQUIFFLET, J.P.; MORROW , C.E.; GOETZ, F.C. & NAJARIAN, J.S. Cyclosporin A for immunosuppression; observation in rat heart, pancreas and islet allograft models and in human renal and pancreas . *Diabetes*, 31(4):1-120, 1982.
- SCHARP, D.W.; MURPHY, J.J.; NEWTON, N.T.; BALLINGER, W. F. & LACY, P.E. Transplantation of islets of Langerhans in diabetic rhesus monkeys. *Surgery*, 77:100-105, 1975.
- ; DOWING, R.; MERRELL, R.C. & GREIDER, M. Isolating the elusive islet. *Diabetes*, 29(1):19-30, 1980.
- SILVERS, W.K.; BARTLETT, S.T.; CHEN, H.D.; FLEMING, H.L.; NAJI, A. & BARKER, C.F. Major histocompatibility complex restriction and transplantation immunity. *Transplantation*, 37(1):26-32, 1984.
- SIMEONOVIC, C.J.; BOWEN, K.M.; KOTLARSKI, I. & LAFFERTY, K. J. Modulation of tissue immunogenicity by organ culture. *Transplantation*, 30:174-79, 1980.
- SNELL, G. The reaction homograft. *Ann. Rev. Microbiol.*, 11: 439-58, 1957.
- SPENCE, R.K.; PERLOFF, L.J. & BARKER, C.F. Fetal pancreas in treatment of experimental diabetes in rats. *Trans - plant. Proc.*, 11:533-36, 1979.

- ; DOWING, R.; MERRELL, R.C. & GREIDER, M. Isolating the elusive islet. *Diabetes*, 29(1):19-30, 1980.
- ; ALEJANDRO, R.; NOEL, J.; BRUSCHWING, J.P. & RYAN, V.S. Tissue culture reduces Ia antigen-bearing cells in rat islets and prolongs islet allograft survival. *Diabetes*, 31(4):48-59, 1982.
- RAINES, E. W. & ROSS, R. Platelet-derived growth factor I. High yield purification and evidence for multiple forms. *J. Biol. Chem.*, 257(9):5154-5160, 1982.
- REEMTSMA, K.; WEBER, C.J.; Pi-SUNYER, F.X.; LERNER, R. L. & HARDY, M.A. Alternatives in pancreatic islet transplantation. Tissue culture studies. *Diabetes*, 29(1) : 45-51, 1980.
- RECKARD, C.R. & BARKER, C.R. Transplantation of isolated pancreatic islets across strong and weak histocompatibility barriers. *Transplant. Proc.*, 5:761-63, 1973.
- ROSS, R.; GLOMSET, J.; KARIYA, B. & HARKER, L. A platelet dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cell *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71(4):1207-1210, 1974.
- RYNASIEWICZ, J.J.; SUTHERLAND, D.E.R.; KWAHARA, K. & NAJARIAN, J.S. Total lymphoid irradiation prolongation for pancreas and islet allografts in rats. *Surg. Form.*, 31:359-360, 1980.

- ; DOWING, R.; MERRELL, R.C. & GREIDER, M. Isolating the elusive islet. *Diabetes*, 29(1):19-30, 1980.
- ; ALEJANDRO, R.; NOEL, J.; BRUSCHWING, J.P. & RYAN, V.S. Tissue culture reduces Ia antigen-bearing cells in rat islets and prolongs islet allograft survival. *Diabetes*, 31(4):48-59, 1982.
- RAINES, E. W. & ROSS, R. Platelet-derived growth factor I. High yield purification and evidence for multiple forms. *J. Biol. Chem.*, 257(9):5154-5160, 1982.
- REEMTSMA, K.; WEBER, C.J.; Pi-SUNYER, F.X.; LERNER, R. L. & HARDY, M.A. Alternatives in pancreatic islet transplantation. Tissue culture studies. *Diabetes*, 29(1) : 45-51, 1980.
- RECKARD, C.R. & BARKER, C.R. Transplantation of isolated pancreatic islets across strong and weak histocompatibility barriers. *Transplant. Proc.*, 5:761-63, 1973.
- ROSS, R.; GLOMSET, J.; KARIYA, B. & HARKER, L. A platelet dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cell *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71(4):1207-1210, 1974.
- RYNASIEWICZ, J.J.; SUTHERLAND, D.E.R.; KWAHARA, K. & NAJARIAN, J.S. Total lymphoid irradiation prolongation for pancreas and islet allografts in rats. *Surg. Form.*, 31:359-360, 1980.

—————; —————; FERGUSON, R.M.; SQUIFFLET, J.P.; MORROW , C.E.; GOETZ, F.C. & NAJARIAN, J.S. Cyclosporin A for immunosuppression; observation in rat heart, pancreas and islet allograft models and in human renal and pancreas . *Diabetes*, 31(4):1-120, 1982.

SCHARP, D.W.; MURPHY, J.J.; NEWTON, N.T.; BALLINGER, W. F. & LACY, P.E. Transplantation of islets of Langerhans in diabetic rhesus monkeys. *Surgery*, 77:100-105, 1975.

—————; DOWING, R.; MERRELL, R.C. & GREIDER, M. Isolating the elusive islet. *Diabetes*, 29(1):19-30, 1980.

SILVERS, W.K.; BARTLETT, S.T.; CHEN, H.D.; FLEMING, H.L.; NAJI, A. & BARKER, C.F. Major histocompatibility complex restriction and transplantation immunity. *Transplantation*, 37(1):26-32, 1984.

SIMEONOVIC, C.J.; BOWEN, K.M.; KOTLARSKI, I. & LAFFERTY, K. J. Modulation of tissue immunogenicity by organ culture. *Transplantation*, 30:174-79, 1980.

SNELL, G. The reaction homograft. *Ann. Rev. Microbiol.*, 11: 439-58, 1957.

SPENCE, R.K.; PERLOFF, L.J. & BARKER, C.F. Fetal pancreas in treatment of experimental diabetes in rats. *Trans - plant. Proc.*, 11:533-36, 1979.

SQUIFFLET, J.P.; SUTHERLAND, D.E.R.; MORROW, C.E.; FLORACK, G.; FIELD, J. & NAJARIAN, J.S. Comparison of rejection on intraportal islet versus immediately vascularized segmental pancreatic allografts in rats in relation to beta cell man engrafted. *Transplant. Proc.*, 15(1): 1344-46, 1983.

SUTHERLAND, D.E.R. Pancreas and islet transplantation. I. Experimental studies. *Diabetologia*, 20(3):161-85, 1981.

———. Report of international human pancreas and islet transplantation registry cases through 1980. *Diabetes*, 31(4):112-116, 1982.

———; STEFFES, M.W.; MAUER, S.M. & NAJARIAN, J.S. Isolation of human and porcine islets of Langerhans and islets transplantation in pigs. *J. Surg. Res.*, 16:102-11, 1974.

———; MATAS, A.J.; GOETZ, F.C. & NAJARIAN, J.S. Transplantation of dispersed pancreatic islet tissue in human-autografts and allografts. *Diabetes*, 29(1):31-44, 1980a.

———; RYNASIEWICZ, J.J.; KAWALIAPA, K.; GORECKI, P. & NAJARIAN, J.S. Rejection of islets versus immediately vascularized pancreatic allografts: A quantitative comparison. *J. Surg. Res.*, 29:240-46, 1980b.

SCHULAK, J.; FRANKLING, W. & RECKARD, C. Morphological and functional changes following intraportal islet alograft rejectio. Irreversibility with steroid pulse therapy. *Surg. Forum*, 28: 296, 1977.

TIMBLE, R.E.; KARAKASH, C.; MALAISSE-LAGAE, I.; VASSUTINE, I.; ORCI, L. & RENOLD, A.E. Effects of intraportal islet transplantation on the transplanted tissue and the recipient pancreas. I. Functional studies. *Diabetes*, 29: 341-47, 1980.

TZE, W.J. & TAI, J. Successful intracerebral allotransplantation of purified pancreatic endocrine cells in diabetic rat. *Diabetes*, 32:1135-87, 1983.

UMEYAMA, K.; HASHIMOTO, H.; SHIM, K. & STAKEK. Ultrastructural studies on the allotransplanted pancreas in dogs. *Transplantation*, 26:373-81, 1980.

YASUNAMI, Y.; LACY, P.E., DAVIE, J.M. & FINKE, E. Use of *in vitro* at 37°C to prolong islet xenograft survival (rat to mouse). *Transplantation Proc.*, 15(1):1371-72, 1983a.

YASUNAMI, Y.; LACY, P.E., DAVIE, J.M. & FINKE, E. Prolongation of islet xenograft survival (rat to mouse) by *in vitro* culture at 37°C. *Transplantation*, 35(4):281-84, 1983b.

TIMBLE, R.E.; KARAKASH, C.; MALAISSE-LAGAE, I.; VASSUTINE, I.; ORCI, L. & RENOLD, A.E. Effects of intraportal islet transplantation on the transplanted tissue and the recipient pancreas. I. Functional studies. *Diabetes*, 29: 341-47, 1980.

TZE, W.J. & TAI, J. Successful intracerebral allotransplantation of purified pancreatic endocrine cells in diabetic rat. *Diabetes*, 32:1135-87, 1983.

UMEYAMA, K.; HASHIMOTO, H.; SHIM, K. & STAKEK. Ultrastructural studies on the allotransplanted pancreas in dogs. *Transplantation*, 26:373-81, 1980.

YASUNAMI, Y.; LACY, P.E., DAVIE, J.M. & FINKE, E. Use of *in vitro* at 37°C to prolong islet xenograft survival (rat to mouse). *Transplantation Proc.*, 15(1):1371-72, 1983a.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Prolongation of islet xenograft survival (rat to mouse) by *in vitro* culture at 37°C. *Transplantation*, 35(4):281-84, 1983b.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ and FINKE, E. A new site for islet transplantation - A peritoneal - omental pouch. *Transplantation*, 36(2): 181-82, 1983c.