

ANTONIO CARLOS BOSCHERO

a BIBLIOTECA

AC Boschero

TRANSPLANTES HOMÓGENOS DE ILHOTAS
DE LANGERHANS EM RATOS DIABÉTICOS.

TESE DE DOUTORAMENTO
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BIBLIOTECA CENTRAL

CAMPINAS

1973

EM MEMÓRIA DE MEU PAI

À CARMEM

MÃE E
IRMÃOS

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Carlos Eduardo Negreiros de Paiva , pelo apoio que nos deu durante estes tres anos e pela orientação segura neste trabalho.

Ao Dr. Armando Freitas da Rocha, pela ajuda na computação e análise dos dados.

Aos Drs. Antonio Celso Ramalho e Ernesto José Dotaviano, pelo estímulo e colaboração na confecção desta tese.

Aos Drs. Rui Errerias Maciel, Décio Antonio de Almeida Costa, Décio Teixeira e Guido Menegatto, pelo incentivo e sugestões apresentadas durante a parte experimental.

Às Srtas. Maria Elidia dos Santos, pelo trabalho datilográfico, Ivete de Jesus Roque, pelas preparações histológicas e Sra. Ivanira Martins Bertin, pelo serviço de ilustração.

Ao pessoal técnico do Departamento, pelo trabalho durante a parte experimental, em especial aos Srs. Herval de Lara Almeida e José Ribeiro.

E a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

OBRIGADO.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	pg. 01
MATERIAL E MÉTODOS	pg. 15
RESULTADOS	pg. 23
DISCUSSÃO	pg. 42
RESUMO E CONCLUSÕES	pg. 58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	pg. 61

INTRODUÇÃO

A produção do diabetes em animais de laboratório proporcionou nestes últimos anos, a possibilidade de um estudo mais profundo sobre o metabolismo dos hidratos de carbono e suas alterações (COVIAN, 1946).

O diabetes experimental foi conseguido pela primeira vez por MERING e MINKOWSKI (1889), através da pancreatectomia em cães. Foi produzido também por administração de extrato hipofisário (YOUNG, 1937), por infusão contínua de glicose (LINK, 1953), por soro anti-insulínico (MOLONEY e COVAL, 1955) e por drogas, sendo que OKAMOTO (1955), relata nada menos de 87 compostos com ação diabetogênica. Dentre as drogas, a mais utilizada foi a aloxana.

Os primeiros pesquisadores a produzir diabetes através da aloxana foram: DUNN, SHEERHAN e MACLEITCHIE (1943) em coelhos; DUNN e MACLEITCHIE (1943) em ratos; GOLDNER e GOMORI (1943) em cães; PERALTA (1946) em gatos; JARRET (1946) em carneiros; HARRIS, ANDERSON e CHEN (1946) em hamsters; BARNEJEE (1947) em macacos e WAISBREN (1948) em camundongos.

No homem, a aloxana foi empregada na tentativa de eliminar carcinomas das ilhotas de Langerhans (BRUNDSCHWIG, ALLEN, OWENS e THORNTON, 1944 e BAYLEY e LE COMPTE, 1947).

A quantidade de aloxana necessária para a obtenção do diabetes, varia com a espécie animal e com a via de aplicação (LUKENS, 1948); com o peso corporal (BRUCKMANN, 1946) e com a dieta (MARTINEZ, 1945). Segundo KASS e WAISBREN (1945), a probabilidade de êxito na obtenção do diabetes é muito maior quando a aloxana é administrada ao animal em jejum.

A aloxana provoca necrose das células beta (DUNN, KIRKPATRICK, MACLEITCHIE e TELFER, 1943 e GOMORI e GOLDNER, 1943), acarretando hiperglicemias que costumam ser mais acentuadas em coelhos e ratos (300-600 mg%) do que em cães (200-350 mg%) (LAZAROW e PALAY, 1946).

O aparecimento frequente de hipoglicemias entre 3 e 8 horas após a administração da aloxana, foi constatado por JACOBS (1937) e, provavelmente se deve à liberação da insulina armazenada no citoplasma das células beta (GOLDNER e GOMORI, 1943).

Segundo HOUSSAY, BRIGNONE e MAZOCCO (1946), após a administração da aloxana ocorrem tres fases distintas: a primeira muito rápida, caracterizada por uma hiperglicemia devido à ação direta da aloxana no fígado; a segunda, também bastante rápida, caracterizada por hipoglicemia, deve-se à incapacidade do fígado

em fornecer glicose para a corrente sanguínea e a terceira, deve-se às lesões produzidas nas células beta, frequentemente mais duradoura, caracterizando-se por uma hiperglicemia.

O diabetes por aloxana pode ser reversível, principalmente quando produzido por pequenas doses (LAZAROW, 1952). Doses excessivas provocam a morte do animal antes mesmo de causar lesões nas células beta e, animais refratários à primeira dose, normalmente também o são às doses subsequentes (GOLDNER e GOMORI, 1943 e KASS e WAISBREN, 1945).

Segundo RUANGSIRI (1949), a aloxana provoca lesões já na primeira meia hora após a administração e, as primeiras manifestações se caracterizam por um contínuo desaparecimento das granulações do citoplasma das células beta, que se estende até 12 horas. Esse período é chamado de período das degenerações hidrópi cas. As modificações nucleares aparecem após 3 horas e, depois de 8 ou 9 horas, os núcleos encontram-se totalmente fragmentados, quando tem início a remoção dos restos celulares através dos macrófagos que invadem a área. CAVALLERO (1947), observou que a necrose total das ilhotas se completa em dois dias e a reabsorção das regiões degeneradas termina após o 4º dia.

A aloxana provoca efeitos colaterais como: catarata (DUFFY, 1945); lesões da retina (LEWIS, MOSES e SCHNEIDER, 1947); necrose dos túbulos renais (DUFF e STARR, 1944); degenerações gordurosas do fígado e necrose das células hepáticas (HOUSSAY, et alii, 1946); aumento do volume do trato digestivo (CHESLER e TISLOWTZ, 1945); atrofia da tireóide (BENNETT e KONEFF, 1946) e lesões na adrenal, principalmente na zona fasciculada (KENDALL, MEYER, LEWIS e VICTOR, 1945 e RUBEN e YARDUMIAN, 1946).

Como efeitos indiretos, a aloxana provoca poliúria,

polidipsia, polifagia e glicosúria (RUANGSIRI, 1949). Provoca também cetose, aumento dos ácidos graxos no plasma e aumento do glicogênio no tecido cardíaco (MANSFORD e OPIE, 1968). LACKEY, BUNDE, GILL e HARRIS (1944), constataram em animais diabéticos por aloxana, que enquanto o glicogênio aumentava no tecido cardíaco, diminuía consideravelmente no fígado e nos músculos.

Paralelamente ao estudo do metabolismo e de suas alterações, novas linhas de pesquisa surgiram depois da descoberta da insulina por BANTING e BEST (1922).

Inúmeros pesquisadores estudaram a ação da glicose sobre a formação e liberação da insulina "in vivo" e "in vitro".

A glicose, quando administrada continuamente em cobaias, provoca degranulação do citoplasma das células beta, hiperplasia das ilhotas de Langerhans e, não raro, degenerações hidrópicas (WOERNER, 1938 e 1939).

Através de injeções contínuas de glicose por via intraperitoneal, FRIEDMAN e CALDWELL (1939), obtiveram degranulações do citoplasma das células beta. Após a suspensão da glicose, novamente ocorria formação de grânulos.

WISLLER, FINDLEY e FRAZIER (1949), submeteram ratos à dieta forçada de hidratos de carbono e observaram degranulações no citoplasma das células beta, hiperplasia das ilhotas e, às vezes, glicosúria e cetonúria.

Estes trabalhos evidenciaram que a glicose, em altas concentrações, provoca alterações nas ilhotas de Langerhans devido a uma solicitação muito grande na produção de insulina. Comprovando estes resultados, METZ (1958) encontrou no plasma de cães quantidades cada vez maiores de insulina, à medida que a glicemia aumentava, através de injeções de glicose.

GOETZ (1967), observou que a administração de glicose em inúmeros animais, inclusive no homem, provoca aumento da concentração de insulina nas veias pancreáticas e, em menor escala, na circulação periférica.

A glicose em altas concentrações (acima de 100 mg%) também induz a liberação da insulina "in vitro". Isto foi comprovado através da perfusão de pâncreas de rato (ANDERSON e LONG, 1947a, 1947b); por incubação de fragmentos de pâncreas (GAGLIARDINO e MARTIN, 1966; MALAISSE, MALAISSE-LAGAE e KING, 1968 e GAGLIARDINO, HERNANDEZ, REBOLLEDO e BEVILACQUA, 1971); através da incubação de fragmentos de pâncreas com o tecido acinoso atrófico (KEEN, SELLS e JARRETT, 1965 e JONSSON, POTEN e THORRELL, 1966) e através da incubação de ilhotas isoladas por colagenase (MALAISSE, MALAISSE-LAGAE, LACY e WRIGHT, 1967; VANCE, BUCHANAN, CHALLONER e WILLIAMS, 1968; LACY, YOUNG e FINK, 1968; GERNER, L'AGAE-STEHR, TJIOE e WACKER, 1970; KOSTIANOVSKY, LACY, GREIDER e STILL, 1972 e HOSHI e SHREEVE, 1973).

O mecanismo da formação e armazenamento da insulina foi elucidado em grande parte por HOWELL e LACY (1970) e, segundo estes autores, a pro-insulina formada no retículo endoplasmático é transferida dentro de 25 a 45 minutos para o complexo de Golgi onde tem início a formação dos grânulos para a estocagem sob a forma de cristais. A conversão da pro-insulina em insulina tem início no próprio complexo de Golgi.

Para a liberação da insulina há necessidade da entrada do ion Ca^{2+} nas células beta, onde vai promover as alterações fisiológicas necessárias nos microtúbulos, resultando no deslocamento dos grânulos de insulina, para a periferia das células. Daí para o meio externo, a insulina é liberada por emiocitose.

Sobre o mecanismo da formação, liberação, relação com outros hormônios e ação da insulina sobre os diversos órgãos, algumas revisões recentes são encontradas na literatura: (GRODSKY e FORSHAM, 1966; FROHMAN, 1969; STEINER, KEMMLER, CLARK, OYER e RUBENSTEIN, 1972; RANDLE e HALES, 1972; FAJANS e FLOYD, 1972, GOODNER e PORTE, 1972 e MALAISSE, 1972 e 1973).

Dentre as doenças de cunho endócrino, o diabetes mellitus ocupa lugar de destaque no mundo e, somente nos Estados Unidos da América do Norte, existem atualmente alguns milhões de diabéticos, (BALLINGER e LACY, 1972).

O tratamento da referida doença é feito através da administração diária de insulina por via subcutânea e, mais recentemente, também através de hipoglicemiantes orais (GOETZ, 1967).

A correção do Diabetes mellitus idiopático, induzido por pancreatectomia ou por drogas, tem sido tentada através de transplante de tecido pancreático, por inúmeros autores em diferentes áreas receptoras. A primeira experiência nesse sentido foi realizada por MINKOWSKI (1892) que implantou cauda de pâncreas no tecido subcutâneo do mesmo animal, mantendo a circulação pelos vasos esplênicos.

GAYET e GUILLAUMIE (1927), transplantaram cauda de pâncreas em pescoço de cães normais, fazendo anastomose carótido-jugular com a circulação pancreática. Observaram que o pâncreas extranumerário não secretava quantidade suficiente de insulina para produzir grandes quedas da glicemia. Acreditaram que a liberação de insulina não era determinada por simples processo de difusão e sim, regulada pela quantidade de glicose circulante.

Com base nessas experiências, HOUSSAY, LEWIS e FOGLIA (1929), transplantaram 3 pâncreas em um cão normal, obser-

vando pequena queda da glicemia, porém, ainda dentro dos limites considerados normais. Em cães pancreatectomizados, apenas um enxerto foi suficiente para normalizar a glicemia.

Ao enxertar uma cauda de pâncreas na parede abdominal de cão, utilizando uma fístula para drenagem da secreção exócrina, SIMARD (1945), constatou que o sistema nervoso intrínseco e o complexo neuroinsular do pâncreas apresentavam sobrevida independentemente do sistema nervoso extrínseco.

CARNEVALLI, REMINE, GRINDLAY e HARRISON (1960), realizaram homotransplante de pâncreas em cães previamente pancreatectomizados, usando câmaras com filtros de poros microscópicos para impedir o contato de células do receptor com o enxerto. Esse procedimento não deu resultado pois, em todos os enxertos realizados, a glicemia do receptor não voltou a seus níveis normais. Estudos histológicos posteriores não evidenciaram sobrevivência das ilhotas transplantadas.

De JODE e HOWARD (1962), realizando enxertos do tipo pancreático-duodenal em cães pancreatectomizados, com anastomose da circulação e fístula para coleta da secreção exócrina, observaram que houve correção da glicemia nas primeiras 24 horas, porém a sobrevida máxima foi de apenas 8 dias.

REEMTSMA, LUCAS, ROGERS, SCHMIDT e DAVIS (1963), realizando 3 tipos de transplantes de pâncreas observaram que enxertos subcutâneos não reduziram a glicemia dos receptores previamente pancreatectomizados. Quando anastomosavam a circulação do receptor com a circulação do pâncreas transplantado, verificaram que 40% dos receptores apresentavam correção da glicemia e finalmente, quando promoviam a atrofia do tecido exócrino dos doadores, antes da realização do transplante, o sucesso era obtido

em 80% dos casos. O uso de drogas imunossupressoras como purinas análogas, 6-mercaptopurina e azotioquina em trabalho idêntico ao anterior não prolongou a sobrevivência dos enxertos (REENTSMA, HEWITT SMITH e WEICHERT III, 1964).

CHAYA, APPERT e HOWARD (1966), realizaram a ligação dos dutos pancreáticos dos cães doadores e após 2 a 3 meses enxertaram esses pâncreas atrofizados em cães diabéticos, na altura do pescoço ou fossa ilíaca, anastomosando a circulação do receptor com a do enxerto. Observaram que em aproximadamente 90% dos casos houve correção da glicemia logo após o enxerto, porém, a sobrevivência máxima foi de apenas 23 dias e as causas mais frequentes, responsáveis pelo insucesso dos enxertos, foram trombose nos primeiros casos e rejeição nos casos subsequentes.

GRENIER, GILLET, WONG, KLEIN e BARTH (1968), em cães previamente pancreatectomizados realizaram enxertos autólogos (parciais) e ^{homólogos} ~~homólogos~~ (totais) do tipo pancreático-duodenal na região cervical, anastomosando a circulação do receptor com a circulação do enxerto e com fístula para coleta da secreção exócrina. Nos ^{autólogos} ~~autólogos~~, a sobrevivência foi de 6 a 26 dias e nos ^{homólogos} ~~homólogos~~, de 3 a 23 dias com correção do nível glicêmico. Observaram que a rejeição era precedida de um aumento das enzimas digestivas no sangue do receptor e, 24 a 48 horas após esse evento, novamente o animal tornava-se hiperglicêmico.

ELLENBOGEN, LINS, RAIA, GARBIN, LOUZA, FERA e PINOTTI (1969), realizaram transplantes também do tipo pancreático-duodenal anastomosando a circulação do receptor com a circulação do enxerto. Nos animais em que não usaram medidas imunossupressoras houve correção da glicemia, com sobrevivência média de 12 dias. No segundo grupo em que usaram Azotioquina e Succinato de Prednisolona

na, a sobrevida média foi de 16 dias, sendo que um dos receptores continuou vivo 35 dias após o transplante.

PEMBERTON e MANAX (1971), em cães tornados diabéticos pela administração de aloxana, transplantaram cauda de pâncreas com tecido acinoso atrofico, observando que 33% dos receptores tiveram sua glicemia normalizada e a sobrevida máxima em um dos casos, foi de 32 dias.

Trabalhando com hamsters, HOUSE, BURTON, COOPER e ANDERSON (1958) e HOUSE, JACOBS e PANSKY (1961), enxertaram pâncreas de feto, de recém-nascido e de adulto, na bolsa geniana de receptores normais e diabéticos por aloxana, com idade entre 6 a 12 meses. Observaram que o sucesso ocorria em 90% dos receptores diabéticos e em 75% dos não diabéticos, e que o volume de pâncreas enxertado e a sua sobrevivência foram respectivamente 30% e 50% maiores nos receptores diabéticos do que nos normais.

A probabilidade de exito foi maior nos enxertos de pâncreas de feto e de recém-nascidos, e a diferenciação das células beta ocorria com maior intensidade quando os receptores eram diabéticos. A idade do receptor não influenciou no exito dos transplantes e quando os enxertos duravam pelo menos duas semanas a glicemia dos receptores diabéticos era corrigida.

Em trabalho semelhante, PANSKY, HOUSE e JACOBS (1962), usaram hormônios como cortisona, cortisona mais insulina e cortisona mais hormônio somatotrófico, antes, durante e após os transplantes, verificando que em todos os grupos o crescimento dos enxertos de pâncreas de recém-nascido foi acelerado, com excessão daqueles realizados em receptores diabéticos, tratados apenas com hormônio somatotrófico.

A correção da glicemia em 85% dos animais com diabe

tes leve (140-199 mg%), em 13% com diabetes moderado (200-299 mg%) e em 2% com diabetes grave (acima de 300 mg%) e ainda a recuperação do estado geral em 35% dos animais dos últimos dois grupos, foi atribuída a uma efetiva produção de insulina pelo pâncreas enxertado (HOUSE, PANSKY e JACOBS, 1963).

Em transplantes de pâncreas de recém-nascido, HOUSE, PANSKY, JACOBS, STREBEL e PAYAN (1965), usaram um inibidor do tecido exócrino (D-L Etionina) verificando que o crescimento e diferenciação das células beta foram significativamente maiores nos receptores tratados do que nos não tratados.

SAK, MACCHI e BEASER (1966), em hamster diabéticos tratados com insulina, insulina mais cortisona e insulina mais cortisona e mais tolbutamida, realizaram transplantes homogêneos de pâncreas de recém-nascido na bolsa geniana, observando que os melhores resultados foram obtidos no grupo de animais tratados antes dos transplantes com insulina mais cortisona e, depois dos transplantes com tolbutamida. O pior resultado quanto ao crescimento e diferenciação do tecido endócrino, foi verificado nos animais tratados somente com insulina, porém foi neste grupo que conseguiram maior sobrevivência, pois algumas células beta foram encontradas 1 ano após o transplante, em aparente estado de funcionamento.

BROWNING e RESNIK (1951), realizaram transplantes homogêneos intra-oculares de tecido pancreático de embriões, de recém-nascidos e de adultos em camundongos normais de mesma linhagem, ou de linhagens diferentes. Efetuaram também, transplantes de pâncreas de fetos e de recém-nascidos, em receptores diabéticos de mesma linhagem, utilizando como áreas receptoras a cápsula do baço e o tecido subcutâneo. Esses autores observaram que em recep-

tores normais de mesma linhagem, os transplantes de tecido pancreático embrionário cresceram, diferenciaram-se e persistiram por longo período; os de recém-nascido apresentaram diferenciação e permanência por longo tempo, porém, dificilmente cresceram, e os de adultos nunca apresentaram crescimento, embora persistissem durante longo tempo. Em receptores de linhagens diferentes, os de tecido embrionário e de recém-nascido quase não cresceram e foram absorvidos após a 3a. semana. Em transplantes de tecido adulto, a absorção se iniciava logo após o enxerto.

Nos transplantes executados em camundongos diabéticos da mesma linhagem, apenas obtiveram êxito quando enxertavam de uma só vez no tecido subcutâneo, 4 pâncreas de recém-nascidos. Vinte e um dos 38 receptores deste grupo sobreviveram por período de 30 dias sendo que em 12 animais a glicosúria desapareceu e nos outros 13 ocorreram reduções significativas.

Vários pesquisadores tentaram o transplante de pâncreas em ratos. COUPLAND (1957), transplantou com êxito, na câmara anterior do olho de ratas gestantes, pâncreas de seus próprios fetos e, após 6 meses, observou que o tecido endócrino sobrevivia normalmente, tendo crescido e se diferenciado, enquanto que o tecido exócrino havia regredido. Dois anos depois, realizando o mesmo tipo de experiência confirmou as observações anteriores, verificando então que a persistência se estendia por 1 ano e que as células alfa estavam ausentes no tecido transplantado (COUPLAND, 1960).

GRIMELIUS, HULTQUIST, THORELL e WIMBLADH (1964), realizaram na câmara anterior do olho de ratos normais e diabéticos, transplantes autógenos, isógenos e homogêneos de pâncreas com tecido acinoso atrófico, obtidos de doadores adultos. Em recepto-

res normais de transplantes autógenos, observaram que 90% das ilhotas enxertadas se apresentavam íntegras 2 a 4 semanas depois. Nos transplantes isógenos, em idêntico período, essa porcentagem foi de 77%, e nos homógenos caiu para 37%. Após 6 meses, 89% dos autógenos e 22% dos homógenos ainda sobreviviam, enquanto os transplantes executados em receptores diabéticos, apresentavam as células beta com degenerações hidrópicas.

Em trabalhos posteriores, HULTQUIST, GRIMELIUS, LUNDIN, THORELL e WIMBLADH (1965), verificaram que os enxertos podiam persistir por 1 ano, e que as células beta apresentavam maior capacidade de sobrevivência do que as células alfa.

Realizando transplantes homógenos de pâncreas de feto em testículos de ratos diabéticos por aloxana, DU BOIS e GONNET (1961); GONNET, (1961) e GONNET e RENOLD (1965), observaram correção do diabetes em 20% dos casos. Nos primeiros dias, ocorria rápida proliferação das células beta e degeneração do tecido acinoso. Segundo esses autores, o tecido enxertado produz insulina suficiente para normalizar a glicemia do receptor, nos 2 primeiros meses, induzindo ainda no pâncreas deste, a neo-formação de células beta. Após esse período, o órgão enxertado regride e, nesta altura, o pâncreas do animal receptor já está apto a produzir sua própria insulina em tal quantidade, que a normalização da glicemia não é afetada.

LEE, CHANDLER, KRUBEL, NAKAJI, ROSEN e ORLOFF (1971) e REEMTSMA (1970), em transplantes de pâncreas total de ratos de mesma linhagem, com anastomoses vasculares e drenagem dos produtos exócrinos, obtiveram sucesso em períodos de até 6 meses, com correção do nível glicêmico.

Na literatura também constam algumas tentativas de

transplantes heterôgenos, e como exemplo, podemos citar as experiências de PEPPIN, ETO, HOWARD e PAIRENT (1968) e de REEMTSMA (1970). Os primeiros transplantaram pâncreas fibrosado de carneiro em cães diabéticos, observando que apesar de medidas imunossupressoras, a rejeição ocorria em poucos minutos após o término das anastomoses vasculares. O segundo transplantou em ratos diabéticos, tecido pancreático endócrino de peixe, dentro de câmaras de poros microscópicos, observando queda do nível glicêmico para valores normais ou mesmo abaixo do normal em 85 dos 135 receptores, tendo inclusive, 14 desses 85 animais, morrido em hipoglicemia.

Transplantes de pâncreas na espécie humana, somente foram executados a partir de 1966, e MERKEL (1971), relacionou na da menos que 24 operações deste tipo. Os resultados não foram animadores, pois todos os receptores morreram ou voltaram a tomar a mesma dose de insulina dentro de 1 ano.

Um dos receptores morreu após 11 meses, em acidente automobilístico, mantendo-se até aquela data, normoglicêmico.

Segundo MERKEL (1971), o transplante de pâncreas tem sido indicado principalmente nos casos de diabetes juvenil, quando problemas renais parecem ser mais agudos e, não raro, são necessários enxertos de pâncreas e de rim ao mesmo tempo.

Os enxertos realizados até 1971 foram executados com ou sem drenagem externa da secreção exócrina. Quase todos fora do sistema porta-hepático e, embora a maioria tenha sido do tipo pancreático-duodenal, usaram-se os vasos ilíacos para suprimento e drenagem sanguínea.

Mais recentemente, GLIEDMAN, ROSS, SOBERMAN, ZARDAY, TELLIS, FREED e VEITH (1973), em transplantes humanos obtiveram sucessos por períodos mais prolongados utilizando os ureteres pa-

ra a drenagem dos produtos exócrinos e, verificaram após 12 meses que os ureteres usados não apresentavam danos aparentes.

Em 1965, MOSKALEWSKI introduziu um novo método de isolamento de ilhotas de Langerhans, através da incubação de fragmentos de pâncreas com colagenase, que foi aperfeiçoado por LACY e KOSTIANOVSKY em 1967, acelerando o isolamento, através de sedimentações sucessivas do material incubado.

Esse método possibilitou a MOSKALEWSKI (1969) , transplantar ilhotas de Langerhans em cobaias normais observando a viabilidade das mesmas.

Em virtude disso, no presente trabalho pretendemos verificar se ilhotas isoladas em grande número pelo método da colagenase e transplantadas para ratos previamente tornados diabéticos por aloxana, podem sobreviver e corrigir a hiperglicemia dos animais receptores.

MATERIAL E MÉTODO

ANIMAIS

Foram utilizados 472 ratos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) de ambos os sexos com 2 a 24 meses de idade, pesando entre 100 e 380 gramas, mantidos antes e durante o período de experimentação com ração balanceada padrão e água "ad libitum" e, distribuídos em 3 grupos: (Tabela 1).

TABELA 1

GRUPOS	SUB-GRUPOS	Nº RATOS
A - Doadores	—	408
B - Receptores	—	15
C - Testemunhos (não operados)	1 - NORMAIS	10
	2 - DIABÉTICOS	16
	3 - DIABÉTICOS TRATADOS COM INSULINA	14
D - Testemunhos (cirurgia simulada)	1 - NORMAIS	3
	2 - DIABÉTICOS	3
	3 - DIABÉTICOS TRATADOS COM INSULINA	3

DOADORES - (Grupo A) - 408 ratos de ambos os sexos, pesando entre 100 e 300 gramas. Cada animal era sacrificado por concussão cerebral, decapitado para sangria e toracolaparotomizado. A aorta foi canulada abaixo das artérias renais e ligada acima do diafragma. Através dessa cânula, injetou-se lentamente 20 a 40 ml de vermelho neutro (1: 15.000 em 0,15 M NaCl), com a finalidade de corar as ilhotas de Langerhans (BENSLEY, 1911).

Em seguida o duto biliar comum foi canulado próximo ao hilo do fígado e ligado na porção distal adjacente ao duodeno.

Injetou-se lenta e continuamente 10 a 12 ml de solução de Hanks* que, fluindo através dos dutos pancreáticos, intumesciu ao máximo todo o tecido acinoso promovendo assim sua divisão.

O pâncreas foi retirado, eliminando-se cuidadosamente os nódulos linfáticos bem como o tecido adiposo e, com uma tesoura, reduzido a pequenos fragmentos. A seguir, o material foi lavado 3 vezes em solução de Hanks, com a finalidade de remover as enzimas pancreáticas, possivelmente liberadas durante a fragmentação.

Isolamento das Ilhotas de Langerhans

Em média, 5 pâncreas preparados de acordo com a descrição acima, foram incubados em solução de Hanks (8 ml) contendo colagenase numa proporção de 10 mg/ml (Colagenase 125 a 200 unidades/mg)**, a 37°C durante um período de 13 ± 3 minutos, de acordo com o tamanho das partículas e a quantidade de tecido incubado. Durante a incubação o material foi agitado continuamente por um bastão de vidro conectado a um agitador (Eastern-Stirrer modelo 4), 300 a 400 r.p.m.

Em seguida, por meio de uma seringa de 20 ml, sem agulha, o material foi aspirado e ejetado várias vezes no interior do recipiente de incubação para, mecanicamente, isolar de vez as ilhotas de Langerhans do tecido exócrino. Após a realização desta etapa, o material foi passado através de uma peneira de malha 40 (420 micra) para eliminação dos fragmentos maiores e

* solução preparada segundo PENSO e BALDUCCI, 1963.

** Sigma Chemical Company.

lavado 6 vezes em solução de Hanks para remoção da colagenase e das enzimas pancreáticas liberadas durante a incubação e ressuspensões.

Prosseguindo, o material foi centrifugado em 4 tubos de 50 ml durante 2 minutos a 800 g. Cada tubo continha soluções de Ficoll* em concentrações e volumes diferentes, constituindo 3 fases: a primeira fase, 5 ml a 9%; a segunda, 15 ml a 13,5% e a terceira 10 ml a 26%. Após a centrifugação, a grande maioria das ilhotas (80%) e pequena parte do tecido exócrino depositou-se na interfase 13,5-26% e a maior parte do mesmo, juntamente com algumas ilhotas, depositou-se no fundo dos tubos e foi rejeitada. Com auxílio de uma seringa e agulha de grosso calibre (70/20), o material da interfase (13,5-26%) foi colhido por aspiração e depositado em placa de Petri, contendo 5 a 10 ml de solução de Hanks.

As ilhotas foram coletadas, sob lupa, com aumento de 10 ou 20 vezes por meio de uma seringa de 3 ml, ligada a um tubo de polietileno nº 10 e, transferidas para outro frasco contendo solução de Hanks. Cada pâncreas forneceu em média 200 ilhotas.

Exceto as operações de incubação e centrifugação, todas as demais foram realizadas a baixa temperatura ($\pm 4^{\circ}\text{C}$).

RECEPTORES - (Grupo B) - 15 ratos machos, sendo 14 jovens de 2 a 4 meses de idade, pesando entre 140 e 260 gramas e 1 adulto pesando 380 gramas, previamente tornados diabéticos pela administração intraperitoneal de aloxana** (140 mg/Kg de peso), após jejum de 24 horas. Para prevenir possíveis hipoglicemias, deixou-se à disposição dos animais uma solução de água e açúcar, durante as primeiras horas após a administração de aloxana.

* Ficoll (Sigma): polímero não iônico da sacarose, PM= 400.000.

** Monohidrato de aloxana - Carlo Erba.

Em 13 ratos deste grupo, os transplantes foram realizados em áreas drenadas pelo sistema porta hepático sendo: 8 no mesentério, 3 no mesentério e baço concomitantemente, 1 no baço e 1 no pâncreas. Esses animais foram anestesiados com éter e laparotomizados através de uma incisão mediana, dissecação dos planos para acesso às áreas receptoras, abrindo-se sempre a cavidade peritoneal.

Apenas 2 ratos receberam enxertos fora do sistema porta hepático. Um deles nos testículos e o outro na parede abdominal, cujas áreas receptoras foram preparadas através de incisão da pele para exposição do testículo e do tecido muscular.

A preparação do animal receptor foi feita nos minutos finais do período de coleta das ilhotas e, estas foram rapidamente transplantadas para o mesmo, em suspensão na solução de Hanks em que se encontravam, por injeção com uma seringa de 3 ml e agulha nº 10/5.

Cada receptor foi submetido a 3, 4 ou 5 operações, realizadas a intervalos regulares de 3 a 5 dias, até que fosse enxertado o número de ilhotas pré-estabelecido.

Todos os ratos desse grupo foram tratados com doses diárias de insulina durante o pré e pós-operatório imediato, período esse de aproximadamente 18 dias.

TESTEMUNHOS - (Grupos C e D) - 49 animais distribuídos de acordo com a tabela 1. Os ratos testemunhos dos sub-grupos C-2, C-3, D-2 e D-3 foram tornados diabéticos segundo a técnica descrita para os animais receptores.

Os animais do grupo D (cirurgia simulada) foram submetidos a igual número de intervenções que os ratos enxertados

e, ao invés de ilhotas, receberam pequenos fragmentos de pâncreas exócrino ou de tecido muscular

As intervenções cirúrgicas realizadas nos animais doadores, receptores e testemunhos (cirurgia simulada), bem como todos os passos necessários para o isolamento das ilhotas, foram executados assepticamente.

Com excessão dos animais doadores, todos os ratos tiveram seu peso e sua glicemia avaliados em intervalos regulares de 3 a 5 dias durante 45 a 90 dias. O consumo diário de ração foi avaliado em todos os ratos dos sub-grupos C-1, D-1, D-2 e D-3 e, em 50% dos ratos dos sub-grupos C-2 e C-3 e do grupo B.

Para dosagem da glicemia empregou-se a micro-técnica de SOMOGYI-NELSON (1952), onde 0,05 ml de sangue eram retirados da ponta da cauda do animal, previamente anestesiado com éter.

Para o grupo receptor e todos os sub-grupos testemunhos diabéticos utilizamos somente ratos com glicemia superior a 350 mg%. A insulina exógena também foi administrada nos sub-grupos testemunhos C-3 e D-3 à semelhança dos ratos receptores e, este tratamento consistiu de injeções diárias de insulina (Lilly NPH 40 unidades), numa proporção de 2,5 a 20 unidades por Kg de peso.

HISTOLOGIA

Os animais receptores foram sacrificados a partir do 15º, 20º, 30º, 40º, 50º e 60º dia após suspensão do tratamento insulínico e/ou transplante. Rapidamente, as áreas receptoras, bem como o pâncreas do animal receptor, eram retirados e fixados

em formol a 10%. Para a confecção das lâminas, seguiu-se a rotina histológica da inclusão em parafina. As peças foram cortadas em série na espessura de 5 micra e coradas com aldeido-fucsina (GOMORI, 1950 ou CAMERON e STEELE, 1959), ou hematoxilina eosina.

Para o estudo das condições morfológicas das ilhotas após o isolamento e antes do transplante, algumas foram fixadas em formol a 10% e preparadas segundo a técnica descrita acima. Para evitar a perda das ilhotas na sua passagem pelas várias etapas, elas foram coradas levemente com eosina (5 segundos) durante a desidratação.

CÁLCULOS

Tabulação

A tabulação dos dados obtidos com as dosagens realizadas a intervalos regulares (3 a 5 dias), referiu-se às seguintes variáveis:

- 1º) peso do animal,
- 2º) dia de dosagem,
- 3º) glicemia e
- 4º) consumo de ração.

Dividimos o período de observação dos animais controles e enxertados, em 3 fases.

A primeira compreende o espaço desde o início das observações (1º ponto) até o dia anterior ao do tratamento insulínico e/ou transplante.

A segunda, inclui o último ponto da primeira fase e vai até o último dia do tratamento insulínico e/ou transplante.

A terceira fase abrange o período entre o último

dia (ponto) da segunda fase e o dia do sacrifício dos animais ; 15, 20, 30, 40, 50 ou 60 dias, após o término do tratamento insulínico e/ou transplante.

A seguir, os dados foram transferidos para cartões IBM e processados em um computador (IBM 1130, 32K, 5 unidades de disco IBM Corporation, Data Processing Division), do Centro de Computação da UNICAMP.

Tratamento Estatístico

Calculou-se as médias de peso, consumo e glicemia para as 3 fases, utilizando-se para analisar as diferenças entre as médias destas fases, a técnica de população correlata, uma vez que cada uma pode ser considerada controle das outras duas.

Usou-se o cálculo de regressão, principalmente para exprimir as relações Peso e Consumo em função do dia, isto porque pudemos utilizar as seguintes relações:

$$P = A + bP \cdot D \quad e$$

$$C = A_1 + bC \cdot D$$

onde

P = Peso

C = Consumo

A = Constante Linear

D = Dia

b = Coeficiente de Regressão

Na avaliação da significância estatística usou-se para as funções, o teste de correlação e, para as médias e os coeficientes de regressão, o teste t de Student, admitindo-se neste caso níveis de significância entre 10 e 5%.

RESULTADOS

Nas tabelas 2, 3 e 4, pode-se observar os resultados de todos os grupos e sub-grupos analisados em relação às três fases, no que diz respeito às médias de peso, glicemia e consumo de alimento, bem como os coeficientes de correlação das funções PESO/DIA e CONSUMO/DIA. Pode-se observar ainda o número de ratos utilizados em cada grupo ou sub-grupo e o número de óbitos em cada fase durante o período de experimentação.

GRUPO B - RECEPTORES

Todos os ratos deste grupo apresentaram bom estado geral durante a segunda e terceira fase do período de experimentação, não ocorrendo nenhum óbito.

A quantidade média de insulina administrada diariamente em cada rato, durante a segunda fase foi de aproximadamente 9,5 unidades/Kg de peso.

Os pesos médios foram significativamente diferentes nas tres fases e, a função PESO/DIA, nas fases segunda e terceira, foi traduzida pelas retas:

$$P_2 = \frac{D + (-52 \pm 17)}{(0,402 \pm 0,078)} \quad \text{e} \quad P_3 = \frac{D + (-71 \pm 52)}{(0,492 \pm 0,219)}$$

Estas duas retas são coincidentes indicando que os animais ganharam peso na mesma proporção nas duas fases.

A glicemia apresentou queda acentuada na segunda fase. Na terceira estabilizou-se, mantendo-se nos níveis alcançados na anterior. As diferenças foram significativas somente entre a primeira e as duas fases subsequentes.

A função CONSUMO/DIA, neste grupo foi avaliada em 7 ratos, sendo representada na primeira fase pela reta:

$$C = \frac{D + (4,89 \pm 1,0)}{(1,32 \pm 0,09)}$$

e o consumo médio foi ligeiramente menor na segunda fase. No gráfico 1 estão representadas as médias de peso, glicemia e consumo do grupo B durante o período de experimentação.

Os resultados dos animais receptores estão agrupa--

T A B E L A 2

GRUPO B - RECEPTORES

	Nº DE RATOS	FASES	MÉDIA PESO (g)	MÉDIA GLICEMIA (mg%)	MÉDIA CONSUMO (g/dia)	Nº DE ÔBITOS	COEF. CORR. PESO/DIA	COEF. CORR. CONSUMO/DIA
B RECEPTORES	15	1a.	182 ± 14*	372 ± 9	21,3 ± 1,3	-	-	0902
		2a.	204 ± 11	352 ± 18	21,7 ± 1,5	-	0731	-
		3a.	225 ± 10	319 ± 22	22,9 ± 1,2	-	0821	-
B-1 RECEPTORES	7	1a.	163 ± 12	362 ± 15	21,8 ± 1,4	-	-	-
		2a.	196 ± 10	284 ± 13	21,0 ± 1,7	-	0817	-
		3a.	229 ± 9	249 ± 11	21,6 ± 1,3	-	0945	-
B-2 RECEPTORES	8	1a.	204 ± 31	380 ± 12	21,0 ± 1,0	-	-	-
		2a.	212 ± 27	392 ± 22	21,0 ± 1,2	-	-	-
		3a.	222 ± 23	413 ± 16	23,4 ± 1,5	-	-	-

(*) - Desvio padrão da média.

dos na tabela 2. Ao exame desta tabela, observa-se uma divisão deste grupo em dois sub-grupos B₁ e B₂, assim distribuídos, de acordo com os resultados obtidos na correção da glicemia.

Sub-Grupo B-1 - (Gráfico 2) - Neste sub-grupo, os pesos médios foram diferentes nas tres fases, aumentando consideravelmente nas fases dois e tres. Nestas, a função PESO/DIA foi traduzida pelas retas:

$$P_2 = \frac{D + (49 \pm 15)}{(0,363 \pm 0,49)} \quad \text{e} \quad P_3 = \frac{D + (155 \pm 33)}{(0,895 \pm 0,139)}$$

diferentes entre si, indicando maior ganho de peso na segunda fase.

A glicemia média foi significativamente diferente nas tres fases, diminuindo na segunda e caindo ainda mais na terceira.

O consumo avaliado em somente 3 dos ratos, apresentou variações sensíveis, pois, diminuiu consideravelmente na segunda fase, subindo novamente na terceira, sem entretanto voltar aos valores da primeira.

Sub-Grupo B-2 - (Gráfico 3) - As médias dos pesos foram semelhantes nas tres fases ocorrendo o mesmo com a glicemia que também não variou. Neste sub-grupo, o consumo foi analisado em 4 ratos, e estes animais tiveram seu consumo diminuído na segunda fase, retornando na terceira aos valores da primeira.

GRUPO C - TESTEMUNHOS - (NÃO OPERADOS)

Sub-Grupo C-1 - Normais (Tabela 3) - Todos os animais apresenta-

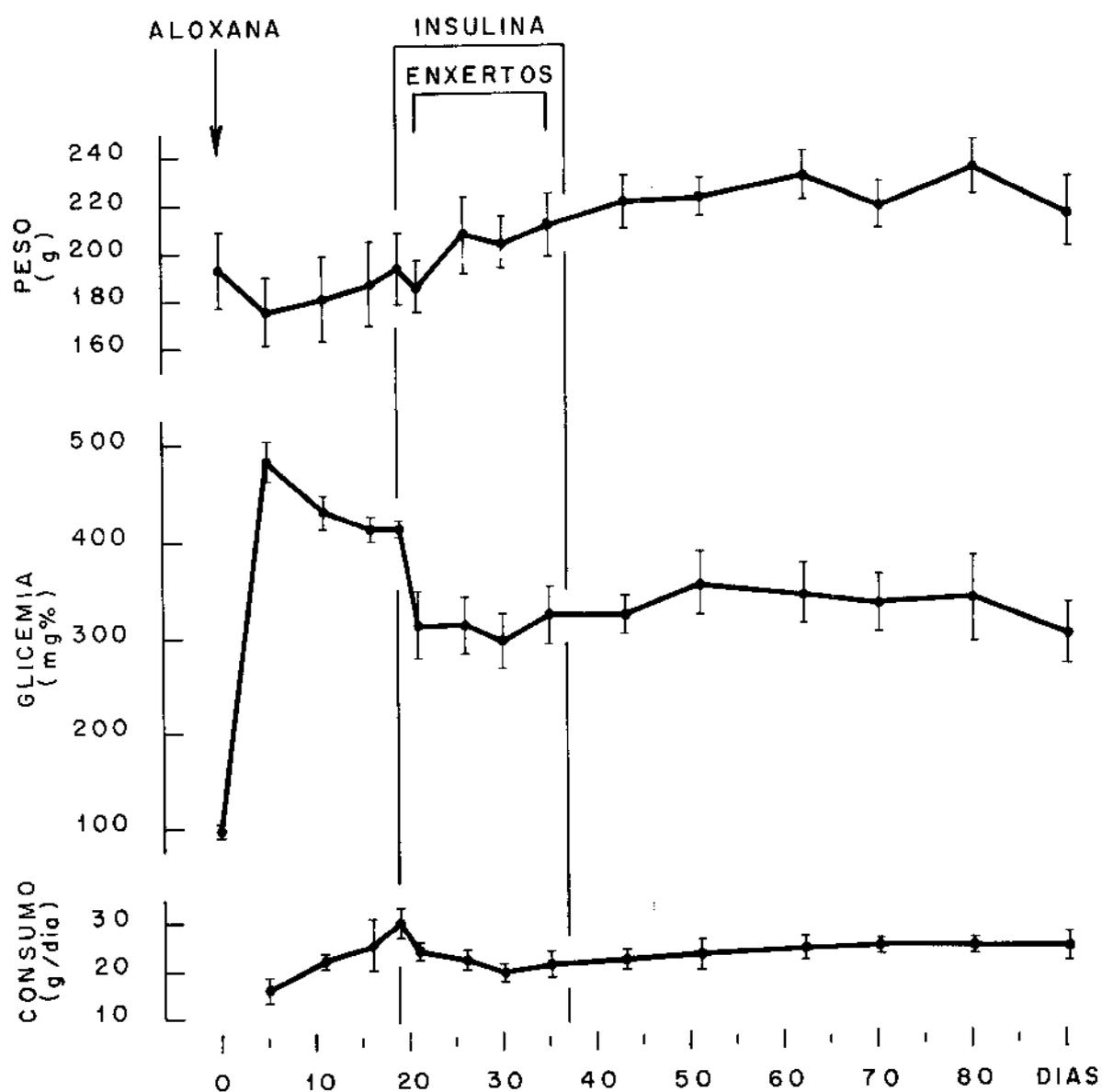


Gráfico 1 - Grupo B (Receptores): Médias de peso, glicemia e consumo, antes, durante e depois da realização dos transplantes de ilhotas de Langerhans e do tratamento insulínico. O desvio padrão de cada média está representado pelas barras verticais.

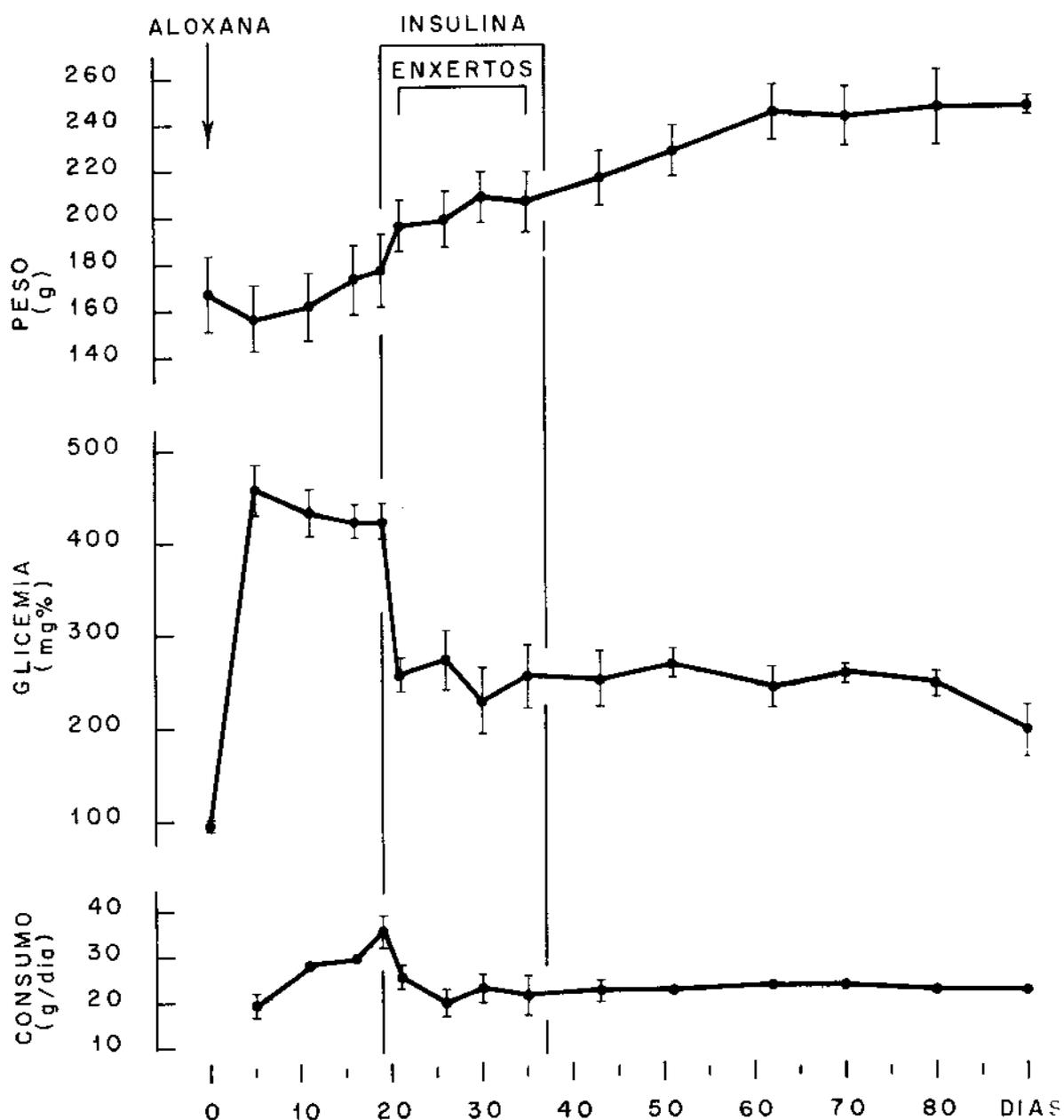


Gráfico 2 - Sub-grupo B-1 (Receptores): Médias de peso, glicemia e consumo, antes, durante e depois da realização dos transplantes de ilhotas de Langerhans e do tratamento insulínico. O desvio padrão de cada média está representado pelas barras verticais.

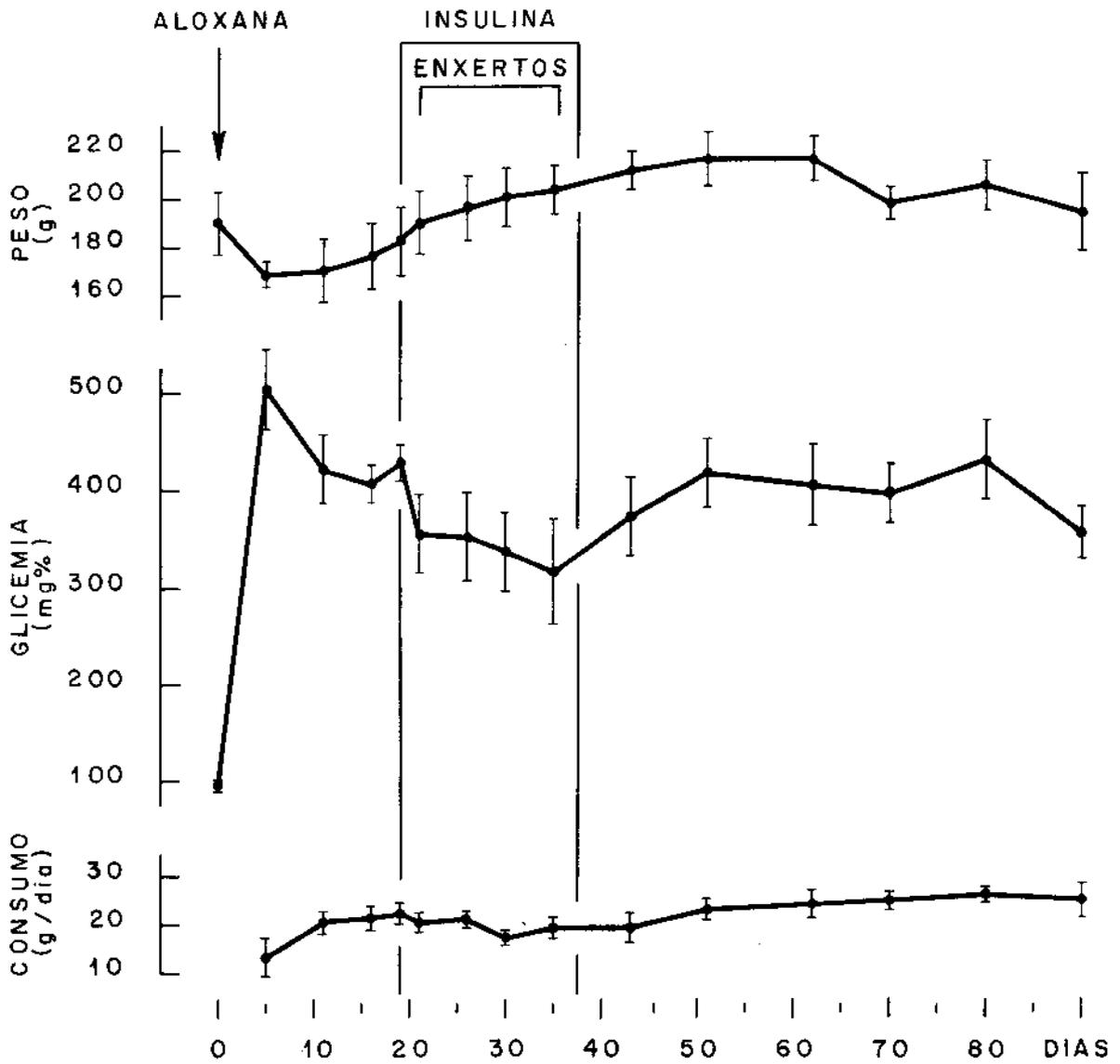


Gráfico 3 - Sub-grupo B-2 (Receptores): Médias de peso, glicemia e consumo, antes, durante e depois da realização dos transplantes de ilhotas de Langerhans e do tratamento insulínico. O desvio padrão de cada média está representado pelas barras verticais.

T A B E L A 3

TESTEMUNHOS - NÃO OPERADOS

	Nº DE RATOS	FASES	MÉDIA PESO (g)	MÉDIA GLICEMIA (mg%)	MÉDIA CONSUMO (g/dia)	Nº DE ÓBITOS	COEF. CORR. PESO/DIA	COEF. CORR. CONSUMO/DIA
C-1 NORMAIS	10	1a.	229 ± 6*	96 ± 1,2	18,0 ± 1,4	-	0960	-
		2a.	256 ± 6	99 ± 1,4	18,4 ± 1,4	-	0911	-
		3a.	292 ± 7	102 ± 1,3	19,0 ± 1,3	-	0971	-
C-2 DIABÉTICOS	16	1a.	163 ± 6	423 ± 14	22,7 ± 0,8	-	-	0940
		2a.	154 ± 6	495 ± 15	23,3 ± 0,7	-	-	0851
		3a.	157 ± 7	472 ± 15	25,3 ± 0,8	8	-	-
C-3 DIABÉTICOS TRATADOS	14	1a.	162 ± 8	401 ± 7	21,0 ± 1,0	-	-	0938
		2a.	190 ± 9	370 ± 17	21,2 ± 1,0	-	0947	0951
		3a.	194 ± 9	422 ± 12	23,6 ± 1,0	2	-	-

(*) - Desvio padrão da média.

ram bom aspecto durante os 90 dias do período de experimentação, não ocorrendo nenhum óbito durante o mesmo. A função PESO/DIA pode ser traduzida pelas equações:

$$P_1 = \frac{D + (-234 \pm 97)}{(1,035 \pm 0,409)}, \quad P_2 = \frac{D + (-159 \pm 21)}{(0,736 \pm 0,091)} \quad \text{e} \quad P_3 = \frac{D + (-252 \pm 25)}{(1,093 \pm 0,144)},$$

representando respectivamente a primeira, segunda e terceira fase.

As retas P_1 e P_3 são coincidentes e, a P_2 apresenta maior inclinação, indicando que os ratos tiveram maior ganho de peso durante a segunda fase.

O peso aumentou, sendo significativas as diferenças entre as tres fases, o que não aconteceu com as médias de glicemia e consumo que se mantiveram constantes (Gráfico 4).

Sub-Grupo C-2 - Diabéticos - (Tabela 3) - O estado geral apresentado pela maioria dos animais deste sub-grupo, declinou consideravelmente com o decorrer da experimentação.

Após o 45º dia, a maioria apresentou profundo estado de caquexia e o número de óbitos foi elevado (50%). A mortalidade restringiu-se aos animais que apresentaram peso menor no início da experimentação, cujo comportamento é destacado no gráfico 5.

A tabela 3 mostra os resultados da análise do grupo como um todo. Pode ser observado que, quanto ao peso, houve diferença significativa somente entre a primeira e segunda fase, com os animais perdendo peso durante esta última, para estabilizar-se na terceira.

A glicemia variou nas tres fases, aumentando na segunda e estabilizando-se na terceira em níveis ligeiramente mais

baixos. O consumo médio também variou, apresentando os maiores valores durante a terceira fase.

A função CONSUMO/DIA, para a primeira e segunda fase pode ser expressa pelas retas:

$$C_1 = \frac{D + (3,425 \pm 0,26)}{(1,29 \pm 0,05)} \quad e \quad C_2 = \frac{D + (-17,2 \pm 0,78)}{(1,19 \pm 0,02)}$$

que são diferentes entre si, evidenciando maior consumo diário na segunda fase (Gráfico 5).

Sub-Grupo C-3 - Diabéticos Tratados - (Tabela 3) - Durante o tratamento insulínico observou-se sensível melhora do estado geral. A quantidade média de insulina administrada diariamente para cada rato foi de 15 unidades/Kg.

As médias do peso variaram, sendo significativa a diferença entre a primeira e as outras duas fases. Esses animais perderam peso na primeira, ganharam na segunda e estabilizaram-se na terceira. Na segunda fase, a função PESO/DIA foi representada pela reta:

$$P = \frac{D + (23 \pm 3)}{(0,255 \pm 0,018)}$$

A glicemia média caiu na segunda fase, sendo estatisticamente diferente das observadas na primeira e terceira. O consumo, aferido somente em 7 ratos, foi semelhante entre a primeira e segunda fase, porém diferente entre a terceira e as anteriores. Na última fase o consumo foi maior. A função CONSUMO/DIA, para as primeira e segunda fases, foram traduzidas pelas equações:

$$C_1 = \frac{D + (4,35 \pm 0,46)}{(1,73 \pm 0,16)} \quad e \quad C_2 = \frac{D + (-31,53 \pm 3,3)}{(2,16 \pm 0,17)}$$

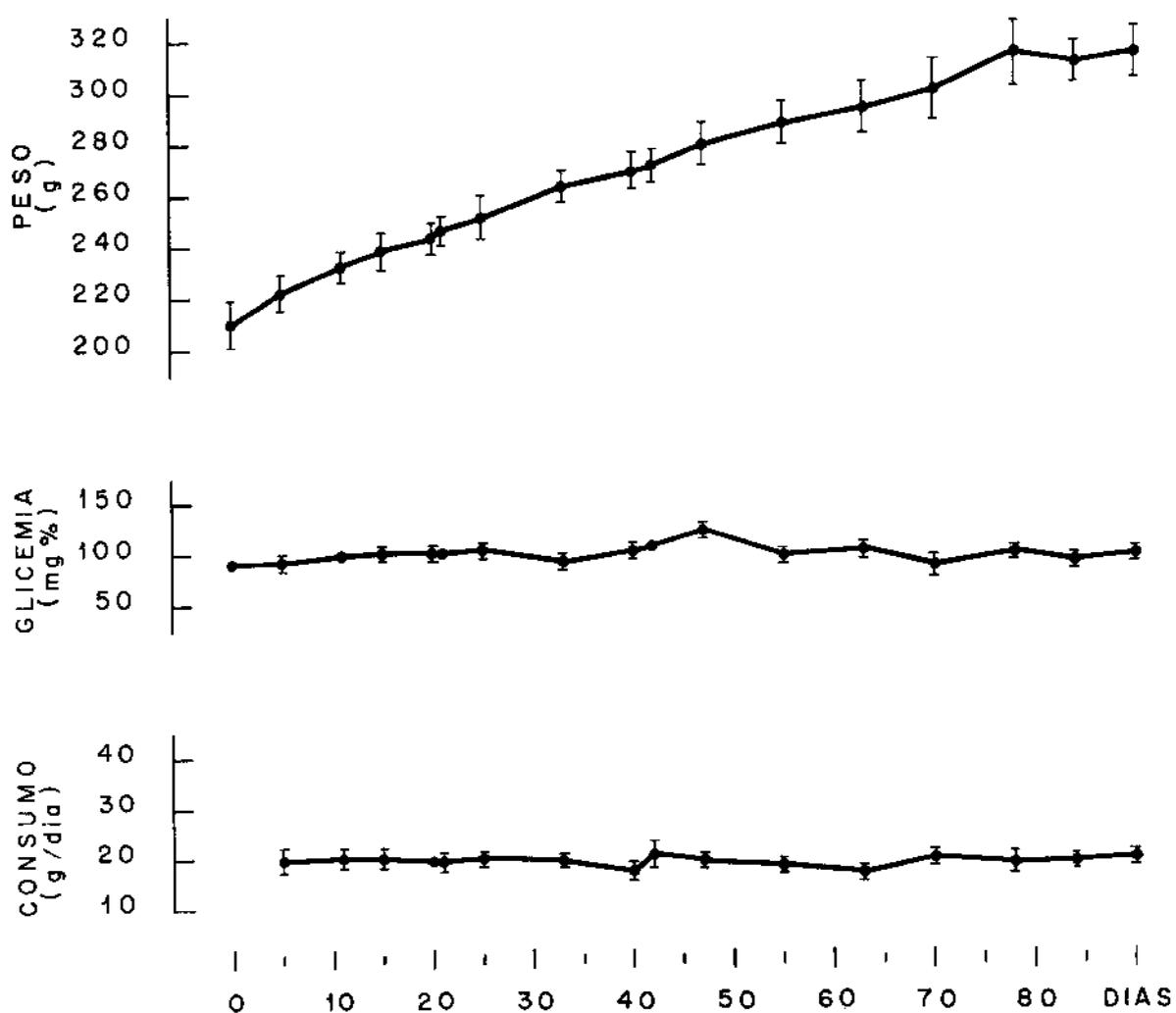


Gráfico 4 - Sub-grupo C-1 (Testemunhos normais - não operados):
Médias de peso, glicemia e consumo durante o período de experimentação. O desvio padrão de cada média está representado pelas barras verticais.

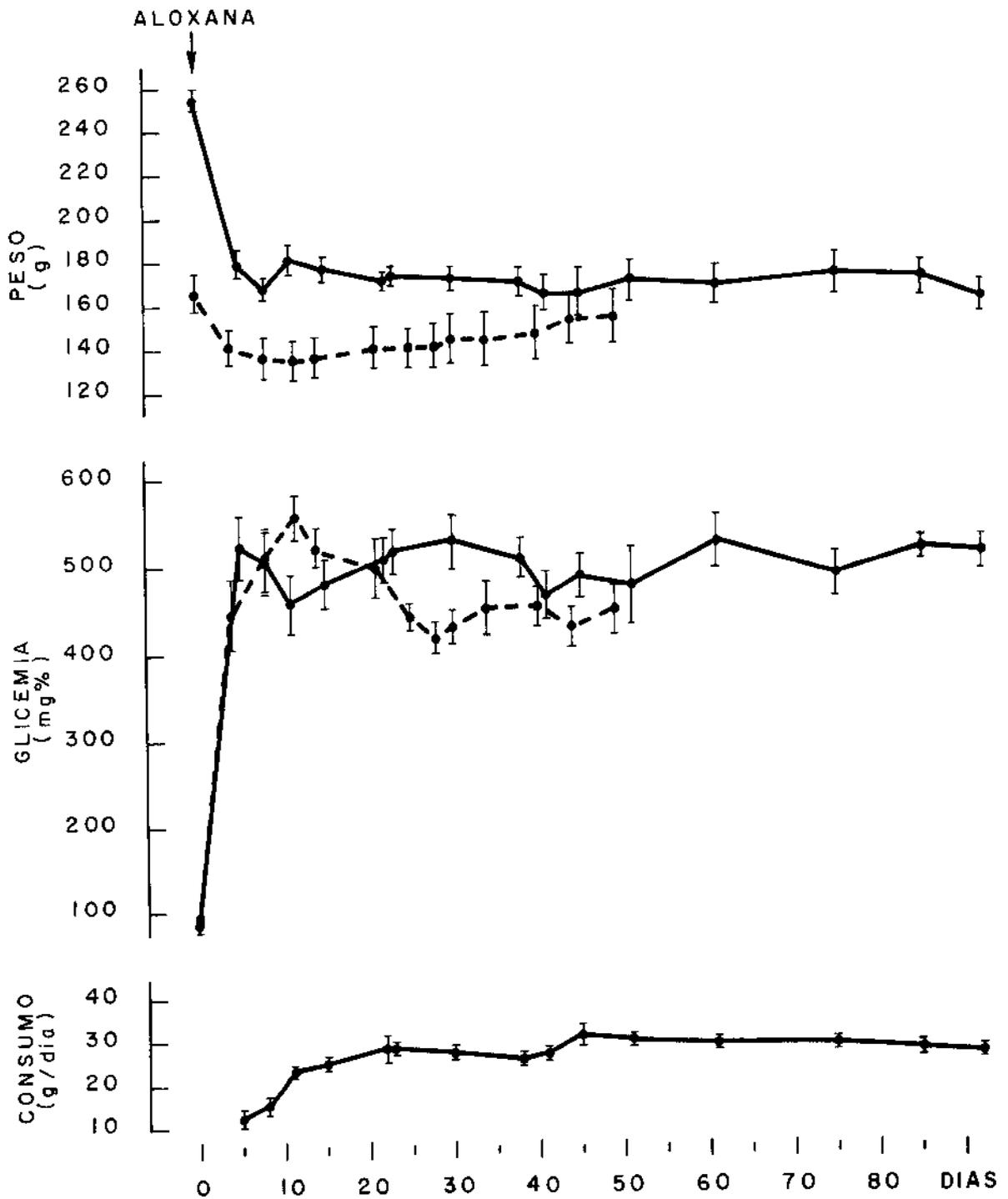


Gráfico 5 - Sub-grupo C-2 (Testemunhos diabéticos - não operados): Médias de peso, glicemia e consumo, antes e depois da administração da aloxana.

(—) animais que apresentaram maior peso inicial.
(.....) animais que apresentaram menor peso inicial e que morreram após o 50º dia. O desvio padrão de cada média está representado pelas barras verticais.

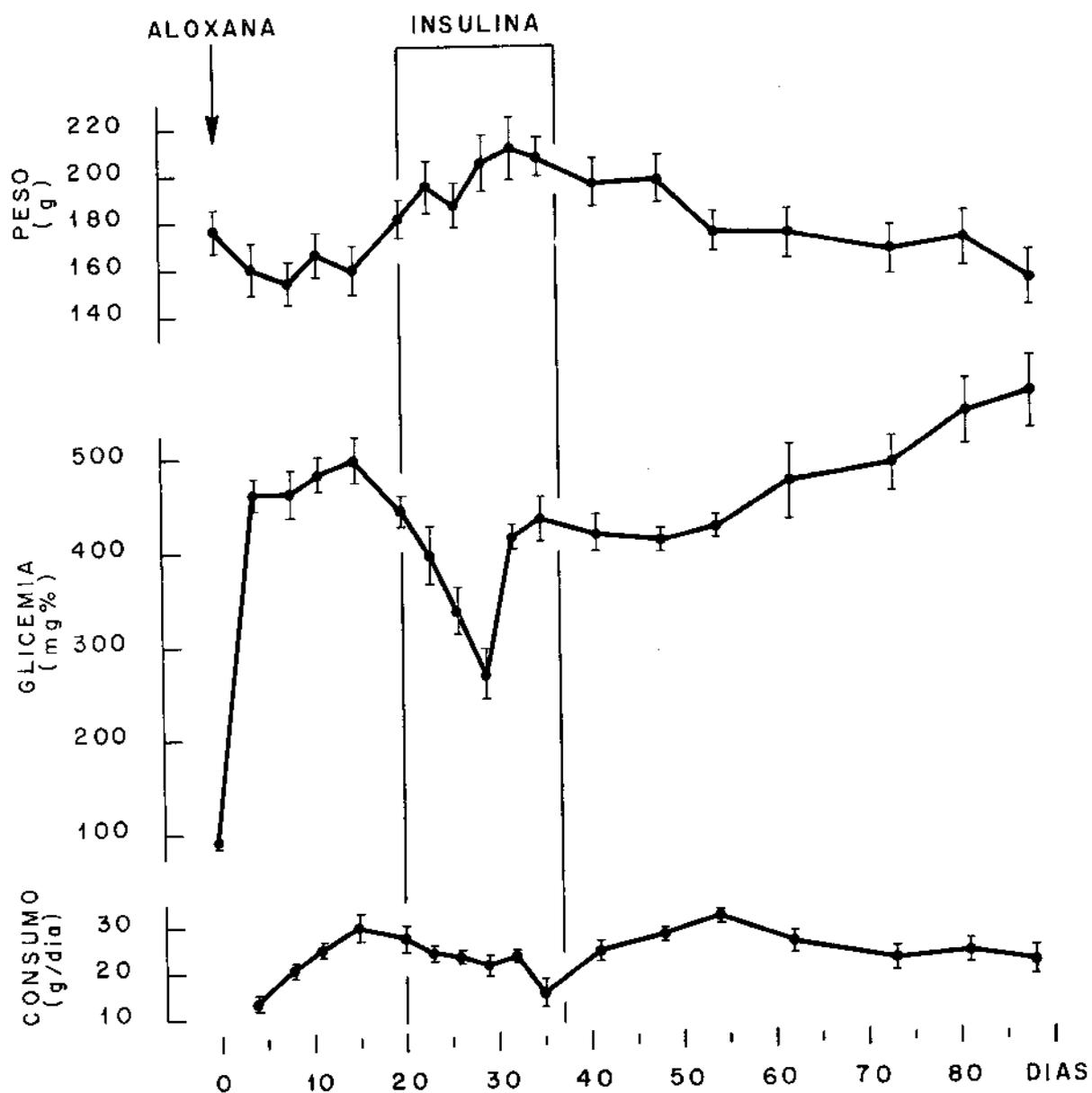


Gráfico 6 - Sub-grupo C-3 (Testemunhos diabéticos - não operados e tratados com insulina): Médias de peso, glicemia e consumo, antes, durante e depois do tratamento insulínico. O desvio padrão de cada média está representado pelas barras verticais.

T A B E L A 4

TESTEMUNHOS - CIRURGIA SIMULADA

	Nº DE RATOS	FASES	MÉDIA PESO (g)	MÉDIA GLICEMIA (mg%)	MÉDIA CONSUMO (g/dia)	Nº DE ÓBITOS	COEF. CORR. PESO/DIA
D-1 NORMAIS	3	1a.	233 ± 0,2*	110 ± 2,9	20,1 ± 0,7	-	0970
		2a.	253 ± 2,4	124 ± 9,6	20,2 ± 0,8	-	-
		3a.	293 ± 4,0	100 ± 5,5	19,5 ± 0,7	-	0957
D-2 DIABÉTICOS	3	1a.	185 ± 9	375 ± 15	22,4 ± 1,2	-	-
		2a.	170 ± 10	457 ± 19	25,4 ± 2,0	-	-
		3a.	163 ± 7	452 ± 40	25,8 ± 2,8	1	-
D-3 DIABÉTICOS TRATADOS	3	1a.	179 ± 13	431 ± 10	22,2 ± 1,5	-	-
		2a.	182 ± 13	353 ± 5	22,2 ± 1,5	-	-
		3a.	187 ± 6	413 ± 4	24,4 ± 1,6	1	-

(*) - Desvio padrão da média.

não coincidentes, que mostraram maior consumo diário para a primeira fase. Os valores médios do peso, glicemia e consumo estão representados no gráfico 6 .

GRUPO D - TESTEMUNHOS - (CIRURGIA SIMULADA)

Sub-Grupo D-1 - Normais - (Tabela 4) - Neste sub-grupo as médias dos pesos foram significativamente diferentes entre si. Os ratos cresceram nas tres fases, porém observa-se ótimos coeficientes de correlação apenas na primeira e terceira fase, indicando que o crescimento desses animais foi satisfatório nestas duas. A glicemia apresentou diferença significativa apenas entre a segunda e terceira fase, enquanto que o consumo não variou. Os ratos deste grupo apresentaram aspecto normal, mesmo durante a segunda fase (Gráfico 7).

Sub-Grupo D-2 - Diabéticos - (Tabela 4) - Esses animais apresentaram mau aspecto geral durante todo o tempo de experimentação principalmente na segunda fase. Ocorreu um óbito no 50º dia de experiência. A perda de peso neste grupo foi significativa nas tres fases, a glicemia média não variou, o mesmo ocorrendo com o consumo (Gráfico 8).

Sub-Grupo D-3 - Diabéticos Tratados - (Tabela 4) - O estado geral dos animais desse sub-grupo foi idêntico ao do sub-grupo anterior, melhorando contudo na segunda fase durante o tratamento insulínico. Na terceira fase, estes ratos novamente apresentaram mau estado geral, ocorrendo um óbito no 20º dia após a suspensão do tratamento insulínico.

As médias dos pesos foram semelhantes, enquanto que a glicemia variou significativamente, caindo na segunda fase e voltando novamente a valores elevados na terceira (Gráfico 9).

O consumo não variou, e a quantidade de insulina administrada diariamente para cada rato foi em média de 10,0 unidades/Kg (Gráfico 9).

HISTOLOGIA

Pâncreas normal - Na foto número 1, podemos ver uma ilhota de um rato normal, exibindo os capilares bem abertos e as células intactas com suas granulações citoplasmáticas características.

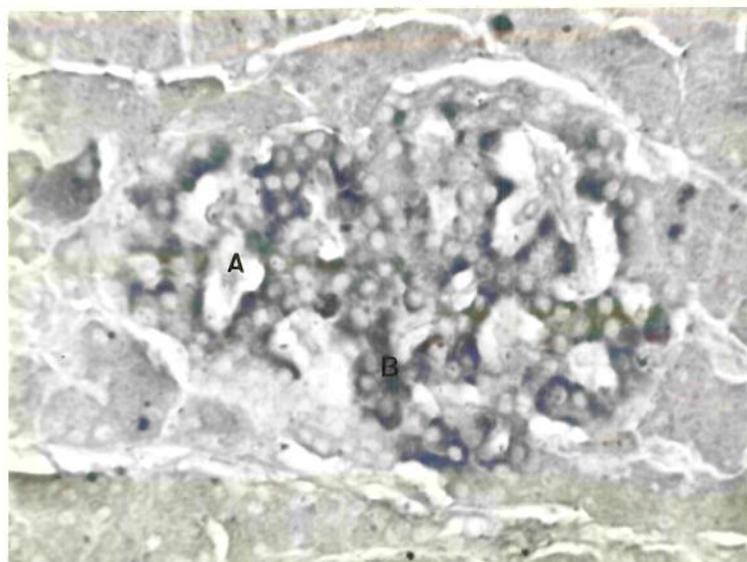


FOTO 1 - Pâncreas normal: A, capilares; B, granulações citoplasmáticas das células beta (Aldeido-Fucsina 1500 x).

Pâncreas dos receptores - Ao exame histológico dos pâncreas dos animais receptores, podemos observar que as ilhotas invariavelmente estão lesadas e, quando coradas com aldeido-fucsina, que as

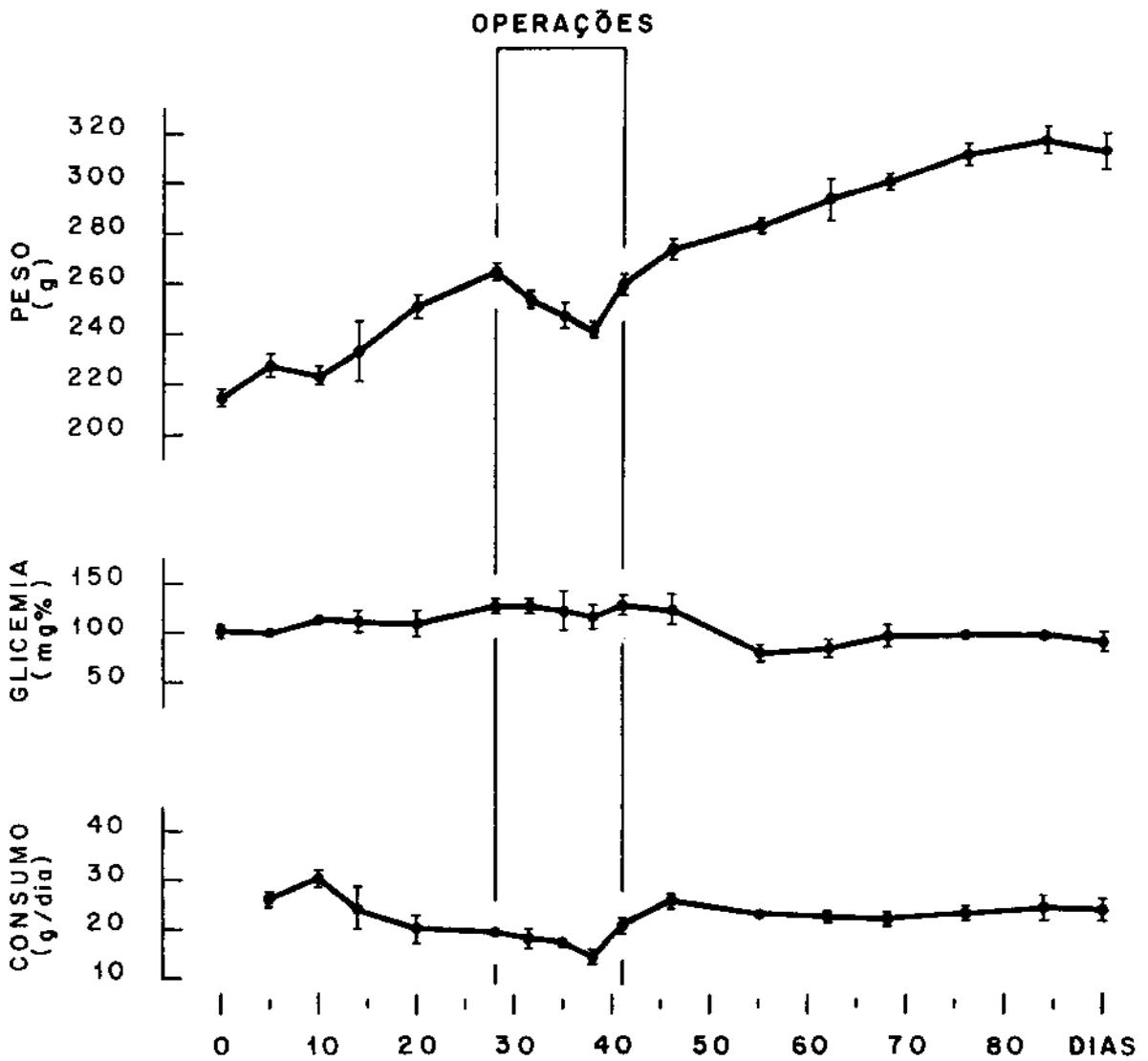


Gráfico 7 - Sub-grupo D-1 (Testemunhos normais - cirurgia simulada): Médias de peso, glicemia e consumo, antes, durante e depois das cirurgias simuladas quando foram transplantados fragmentos de tecido pancreático exócrino ou de tecido muscular. O desvio padrão de cada média está representado pelas barras verticais.

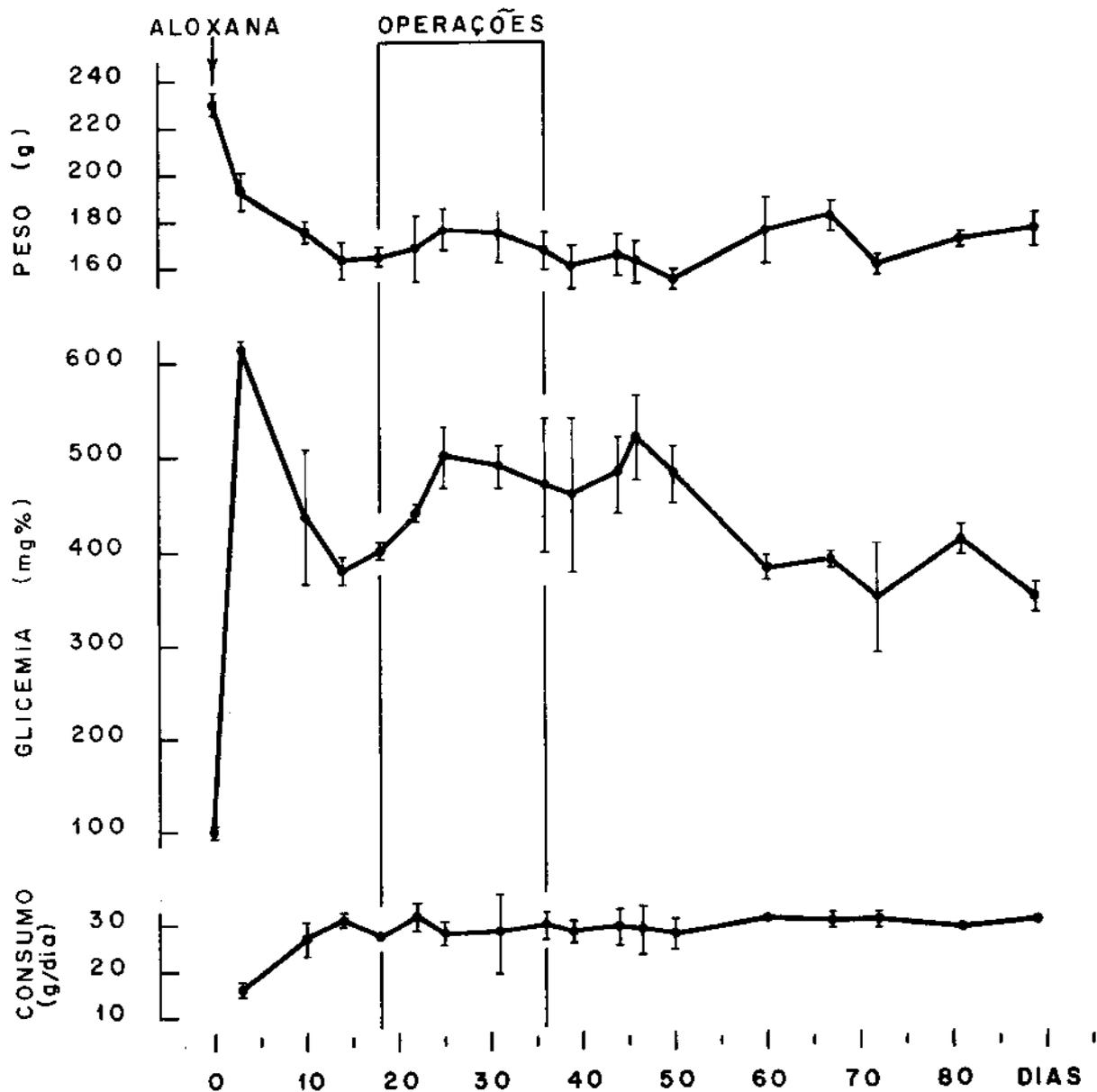


Gráfico 8 - Sub-grupo D-2 (Testemunhos diabéticos - cirurgia simulada): Médias de peso, glicemia e consumo, antes, durante e depois do período das cirurgias simuladas quando foram transplantados fragmentos de tecido pancreático exócrino ou de tecido muscular. O desvio padrão de cada média está representado pelas barras verticais.

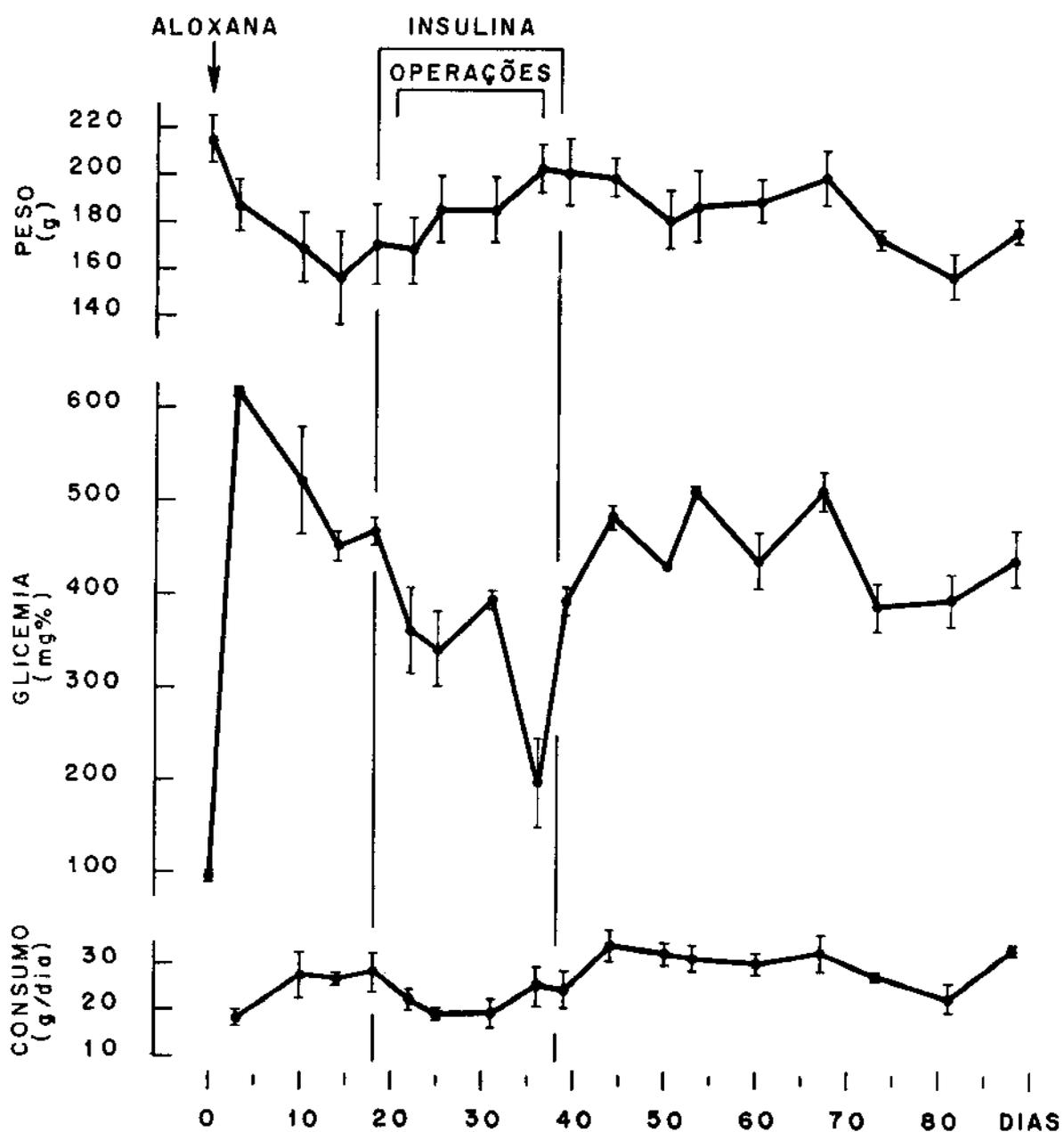


Gráfico 9 - Sub-grupo D-3 (Testemunhos diabéticos - cirurgia simulada, tratados com insulina): Médias de peso, glicemia e consumo, antes, durante e depois do período de cirurgias simuladas quando foram transplantados fragmentos de tecido pancreático e ôcrino ou de tecido muscular. O desvio padrão de cada média está representado pelas barras verticais.

granulações do citoplasma das células beta estão ausentes. Apenas em algumas ilhotas desses animais, observa-se esporadicamente células com granulações no citoplasma, tenham ou não apresentado correção de sua glicemia, como podemos observar na foto 2.

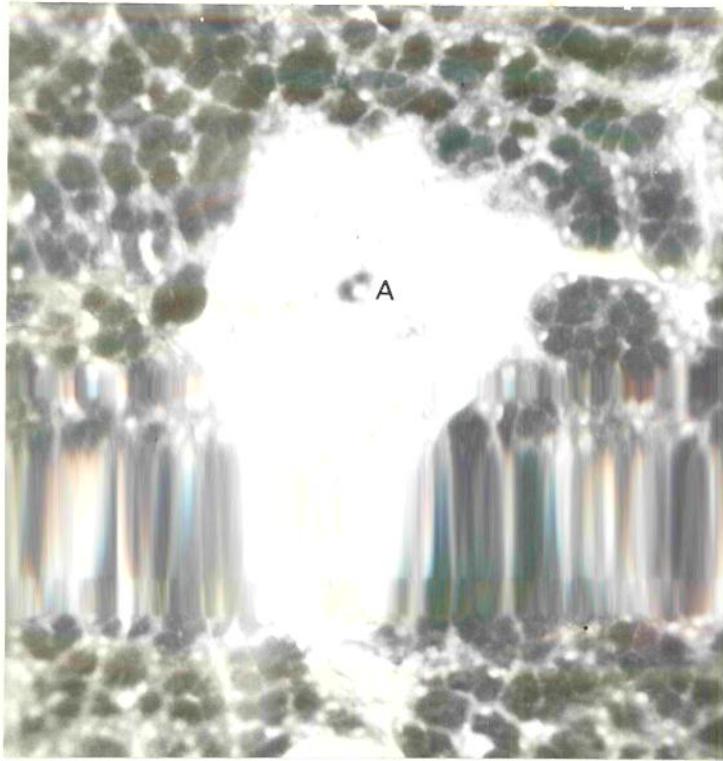


FOTO 2 - Pâncreas de um animal receptor: A, célula beta com citoplasma apresentando granulações (Aldeido-Fucsina 900 x).

Ilhotas isoladas - Ao exame das ilhotas isoladas pelo método da colagenase, podemos observar que elas se apresentam sob forma esférica ou mesmo ovalada. Poucas exibem na periferia, pequenas porções de tecido exócrino não separadas durante o isolamento. As ilhotas mostram seus capilares bem abertos e as lesões na periferia, quando presentes, são muito reduzidas (foto 3).

Coradas com hematoxilina eosina, exibem os núcleos das células íntegros e, com aldeido-fucsina, mostram intensa granulação do citoplasma.

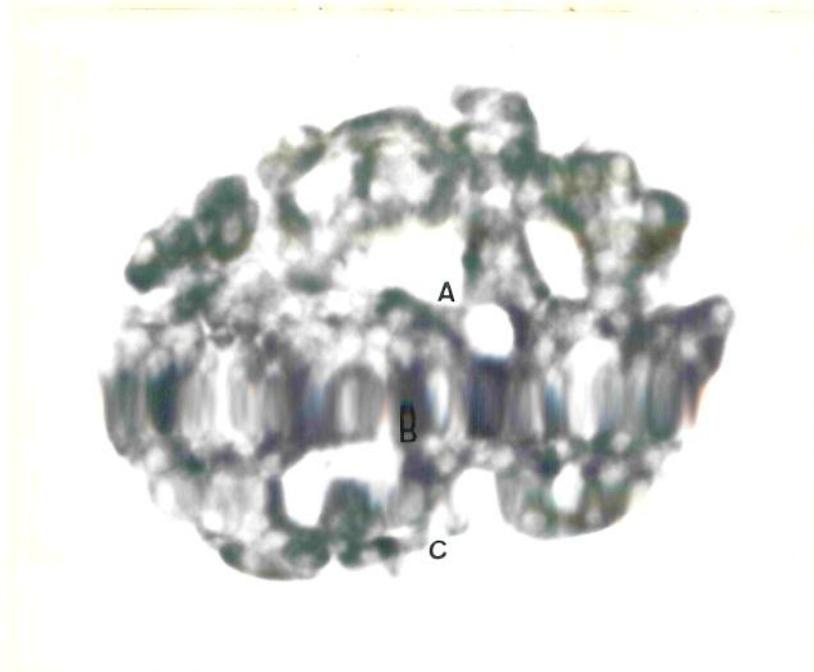


FOTO 3 - Ilhota isolada: A, capilares; B, granulações das células beta; C, lesões na periferia (Aldeído-Fucsina 1800 x).

Ilhotas transplantadas - Os exames histológicos do mesentério de receptores sacrificados após 15 dias do último transplante, revelam a presença de ilhotas, notando-se que os tecidos adjacentes às mesmas, não apresentam alterações reacionais conforme se verifica na foto número 4. Em algumas áreas, porém distantes das ilhotas, houve aparentemente aumento do número de macrófagos.

Na ilhota da foto número 4, notam-se além de suas células comuns, a presença de uma hemácia dentro de um dos capilares, cortado transversalmente, indicando possível revascularização.

Na foto número 5, uma ilhota transplantada e corada com aldeído-fucsina, exhibe suas células beta com abundante granulação no citoplasma.

Examinando o restante do material, não encontramos as ilhotas transplantadas e nem sinais que pudessem indicar a absorção do material enxertado.



FOTO 4 - Ilhota transplantada no mesentério (15 dias): A, capilar contendo hemácia (Hematoxilina Eosina 1200 x).

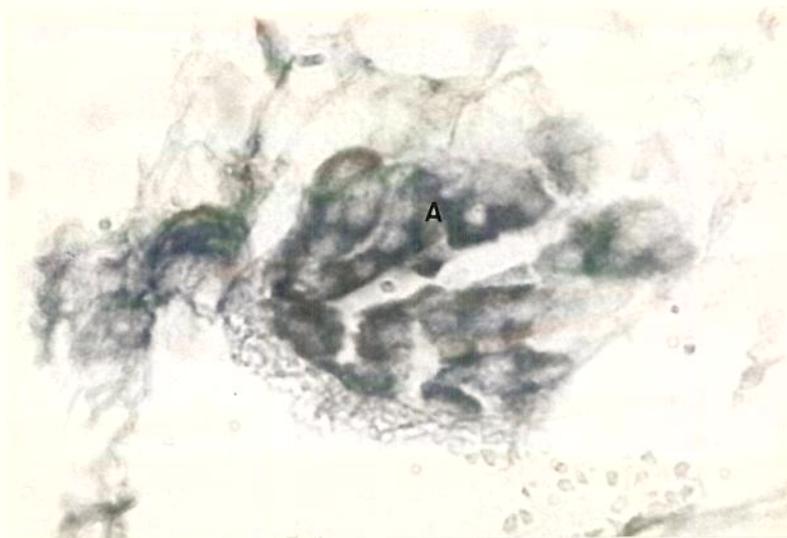


FOTO 5 - Ilhota transplantada no mesentério (15 dias): A, granulações citoplasmáticas (Aldeido-Fucsina 1800 x).

DISCUSSÃO

Já nos referimos na introdução do presente trabalho, que inúmeros autores tentaram o transplante de pâncreas total ou parcial, realizando as anastomoses vasculares necessárias entre o órgão enxertado e o animal receptor, sem contudo obter sucesso permanente (MINKOWSKI, 1892; GAYET e GUILLAUMIE, 1927; HOUSAY et alii, 1929; REEMTSMA et alii, 1963).

A criação de fístulas para drenagem dos produtos exócrinos (SIMARD, 1945; DE JODE e HOWARD, 1962 e GRENIER et alii, 1968) ou mesmo a atrofia prévia do tecido acinoso (REEMTSMA et alii, 1964) aumentaram muito pouco a sobrevivência dos enxertos.

Com a mesma finalidade, também foram executados transplantes de pâncreas de feto ou de recém-nascido, em várias espécies animais (GONET, 1961; DU BOIS e GONET, 1961; GONET e RE-NOLD, 1965; HOUSE et alii 1958; HOUSE et alii, 1961; PANSKI et alii, 1963; HOUSE et alii, 1965 e SAK et alii, 1966).

Dentre todas as experiências relatadas, poucas obtiveram êxito permanente e, dentre estas, a maior parte ocorreu com os transplantes de tecidos jovens, confirmando as observações de BROWNING, (1949), ANDRESEN, MONROE e HASS (1952) e MAY (1957), que a probabilidade de êxito de um transplante está diretamente relacionada com a idade do doador, confirmando igualmente as experiências de DAMERON (1950) e WODRUFF (1952) que os transplantes de tecidos endócrinos para receptores carentes dos mesmos, apresentam maiores probabilidades de sucesso.

Com excessão dos transplantes de pâncreas de feto e de recém-nascidos, em animais de pequeno porte, todos os outros necessitam de anastomoses vasculares. Neste particular, reside um dos grandes problemas dos enxertos de órgãos, pois, segundo ELLENBOGEN et alii (1968), deve-se tomar cuidado todo especial com os vasos a serem anastomosados, principalmente quanto ao calibre destes, porque a perfeita adaptação do leito vascular do órgão enxertado ao caudal sanguíneo, é fundamental para que não ocorram trombooses.

A introdução por MOSKALEWSKI (1965) de um método, empregando a colagenase, possibilitou o isolamento de um número razoavelmente grande de ilhotas e, a posterior comprovação de que ilhotas isoladas dessa maneira podem secretar insulina "in vitro", abriram novas perspectivas no campo dos transplantes do pâncreas endócrino (LACY e KOSTIANOVSKY, 1967 e MALAISSE et alii, 1967).

Em 1969, MOSKALEWSKI enxertou ilhotas isoladas por esse método em músculos, pâncreas, testículos e sob a capsula renal de cobaias normais, observando que após 14 dias as ilhotas aparentemente se encontravam em perfeitas condições, mostrando inclusive abundante granulação no citoplasma das células beta.

Baseados nos trabalhos de MOSKALEWSKI (1965, 1969), propusemo-nos num estudo prévio, transplantar em ratos diabéticos um número razoavelmente grande de ilhotas isoladas pelo método da colagenase, e verificar se essas ilhotas podiam sobreviver e corrigir o diabetes induzido no receptor.

O método de isolamento por incubação de fragmentos de pâncreas com colagenase, permite separação de um grande número de ilhotas, em período relativamente curto, quando comparado com o método de microdissecção proposto por HELLERSTROM (1964).

Entretanto, mesmo permitindo o isolamento de muitas ilhotas (200 em média de cada pâncreas), nossas dificuldades iniciais foram enormes, visto que, de acordo com o planejamento inicial, o número de ilhotas a ser transplantado era pelo menos 10 vezes maior.

Em 1970, GERNER et alii introduziram no método, a centrifugação do material incubado em meios descontínuos de Ficoll e, após algumas modificações deste método, passamos a utilizá-lo, trabalhando com um número maior de doadores, o que nos possibilitou isolar um número muito maior de ilhotas em tempo bastante reduzido.

O Ficoll, por seu alto peso molecular e pelo reduzido tempo de contato, praticamente não interfere osmoticamente sobre as células das ilhotas e, por não produzir efeitos tóxicos, passou a ser usado também por outros pesquisadores

em substituição à técnica dos meios descontínuos de glicose, empregada por LACY E KOSTIANOVSKY (1967).

O processo de centrifugação provavelmente não produz lesões nas ilhotas, visto que, quando colocadas em meios contendo concentrações crescentes de glicose, secretam insulina também em quantidades crescentes (GERNER et alii, 1970). Através do estudo histológico de ilhotas isoladas, também não constatamos lesões, a não ser na periferia das mesmas, representadas por pequenas desagregações, muito provavelmente causadas pela ação da colagenase, como refere MOSKALEWSKI (1965).

Confirmando essas observações, mais recentemente LEONARD, LAZAROW e HEGRE (1973), centrifugaram ilhotas a 1300 rpm, sem provocar lesões evidentes.

No presente trabalho, conseguimos isolar as ilhotas por centrifugação empregando uma aceleração de 800 g durante 3 minutos, enquanto que GERNER et alii (1970), usaram 1000 g. por 15 minutos. Devido à redução da aceleração e do tempo, acreditamos ter reduzido os riscos de danos para as ilhotas que o método provavelmente oferece.

As lesões na periferia das ilhotas foram evitadas, em grande parte, quando reduzimos o tempo de incubação de 35 a 45 minutos (MOSKALEWSKI, 1965) para 13 ± 3 minutos. Entretanto, reduzindo-se o período de incubação, torna-se imperativo suspender o material incubado várias vezes, para que as ilhotas fiquem totalmente separadas do tecido exócrino.

Após as primeiras coletas, com a experiência adquirida, a identificação das ilhotas tornou-se progressivamente mais fácil, o que nos levou a dispensar o uso do corante vital (vermelho neutro), reduzindo ainda mais o tempo de isolamento.

A injeção sob pressão de solução de Hanks, através dos dutos pancreáticos, promovendo a divulsão do tecido acinoso, é fundamental para a posterior digestão pela colagenase pois, quando tentamos suprimir esta etapa, não conseguimos separar as ilhotas do tecido exócrino, confirmando assim as observações de MOSKALEWSKI (1965).

Seguindo a sugestão de LACY e KOSTIANOVSKY (1967), tentamos prolongar a sobrevivência das ilhotas "ex vivo", realizando, exceto a incubação, todos os demais passos do isolamento à baixa temperatura.

Nossa preocupação em reduzir ao máximo o tempo de isolamento coincide com a de BALLINGER e LACY (1972), que isolaram 400 a 600 ilhotas em 90 minutos, acreditando que para evitar lesões irreversíveis, o tempo de isolamento deve ser reduzido ao máximo possível a não ser que novas técnicas venham favorecer a sua preservação.

Essa preocupação, em parte provém das observações de MOSKALEWSKI (1969), que comparou histologicamente ilhotas cultivadas com ilhotas transplantadas em cobaias normais, encontrando estas últimas em condições muito melhores que as cultivadas. Para MOSKALEWSKI (1969), as condições oferecidas pelo animal receptor superam qualquer meio de cultura.

No presente trabalho, acreditamos ter obtido êxito quanto ao tempo de isolamento e ao número de ilhotas isoladas, pois, em 120 minutos, conseguimos isolar 1500 a 2000 ilhotas que ao exame histológico imediato (foto 3) ou após 15 dias no animal receptor (fotos 4 e 5), aparentavam perfeitas condições.

No presente trabalho, tornamos os receptores diabéticos através da aloxana, por ser a droga diabetogênica mais co-

nhecida e porque, de acordo com os trabalhos de LAZAROW (1952) , as reversões totais do diabetes aloxânico ao estado normal ocorrem somente após 1 ano.

Para maior segurança, apenas utilizamos ratos cuja glicemia durante a primeira fase (+ 18 dias), nunca estava abaixo de 350 mg%.

A obtenção do diabetes por pancreatectomia total , não foi utilizada, pois segundo LUKENS (1959), dificilmente os animais sobrevivem, devido aos problemas colaterais da falta de enzimas digestivas produzidas pelo pâncreas exócrino.

O tratamento insulínico, durante o período de transplante, melhorou as condições gerais dos receptores que passaram a apresentar glicemias mais baixas durante o tratamento. Este, inclusive, provavelmente protegeu as ilhotas recém enxertadas de uma solicitação funcional muito grande, pois inúmeros pesquisadores já comprovaram "in vivo" e "in vitro" que a liberação da insulina para o meio, depende do nível glicêmico (GAYET e GUILLAUMIE, 1927; HOUSSAY et alii, 1929; FRIEDMAN e CADWELL, 1939; LACY et alii, 1968; KOSTIANOVSKY et alii, 1972). Além dessa proteção, a insulina exógena, quando empregada nos primeiros dias após a administração da aloxana evita a regeneração das células beta (CAVALLERO, 1947), o que nos permite admitir com maior segurança que as quedas glicêmicas observadas após os transplantes, pelo menos nos primeiros dias, resultaram do funcionamento das ilhotas enxertadas.

O sucesso ou não dos transplantes, foi evidenciado pelo estudo do peso, glicemia e consumo de alimento, comparando-se os resultados observados nos ratos receptores com aqueles dos animais testemunhos não operados e animais testemunhos submetidos à cirurgia simulada.

Tentando reproduzir com maior fidelidade as condições em que normalmente se encontram as ilhotas, na maioria dos nossos transplantes, optamos por uma região que fôsse drenada pelo sistema porta hepático, em busca de um sítio mais favorável à sua sobrevivência.

FIELD (1972), observou que 40 a 50% da insulina produzida pelo pâncreas endócrino é retida normalmente pelo fígado e, como já havia sido anteriormente demonstrado, este órgão é um importante regulador da insulina na circulação sistêmica.

A correção parcial do diabetes foi observada em 8 dos 15 animais receptores. Dentre esses 8 ratos, 7 apresentaram correção durante o período de experimentação após os enxertos, que variou de 15 a 60 dias. O outro, mostrou correção transitória por um período de aproximadamente 10 dias, voltando a seguir para glicemias tão altas quanto aquelas observadas na primeira fase (gráfico 10).

Os enxertos realizados fora do sistema porta hepático (2 casos) falharam, enquanto que os executados em território portal (13 casos) foram bem sucedidos em aproximadamente 2/3 dos animais. Nesses casos, o êxito foi de 100% (3 casos) quando se empregou como áreas receptoras o mesentério e baço, concomitantemente. Quanto aos insucessos, 1 ocorreu no baço, 1 no pâncreas e 3 no mesentério.

Vários fatores devem ter concorrido para os insucessos verificados. Dentre eles, podemos citar como mais importantes: número insuficiente de ilhotas (BALLINGER e LACY, 1972) e rejeição (RECKARD, ZIEGLER e BERKER, 1973). Não afastamos também a possibilidade de que lesões não detectadas, provocadas durante o isolamento das ilhotas, e má irrigação das mesmas nas áreas utilizadas, possam também ter contribuído. Embora no estudo histológico não

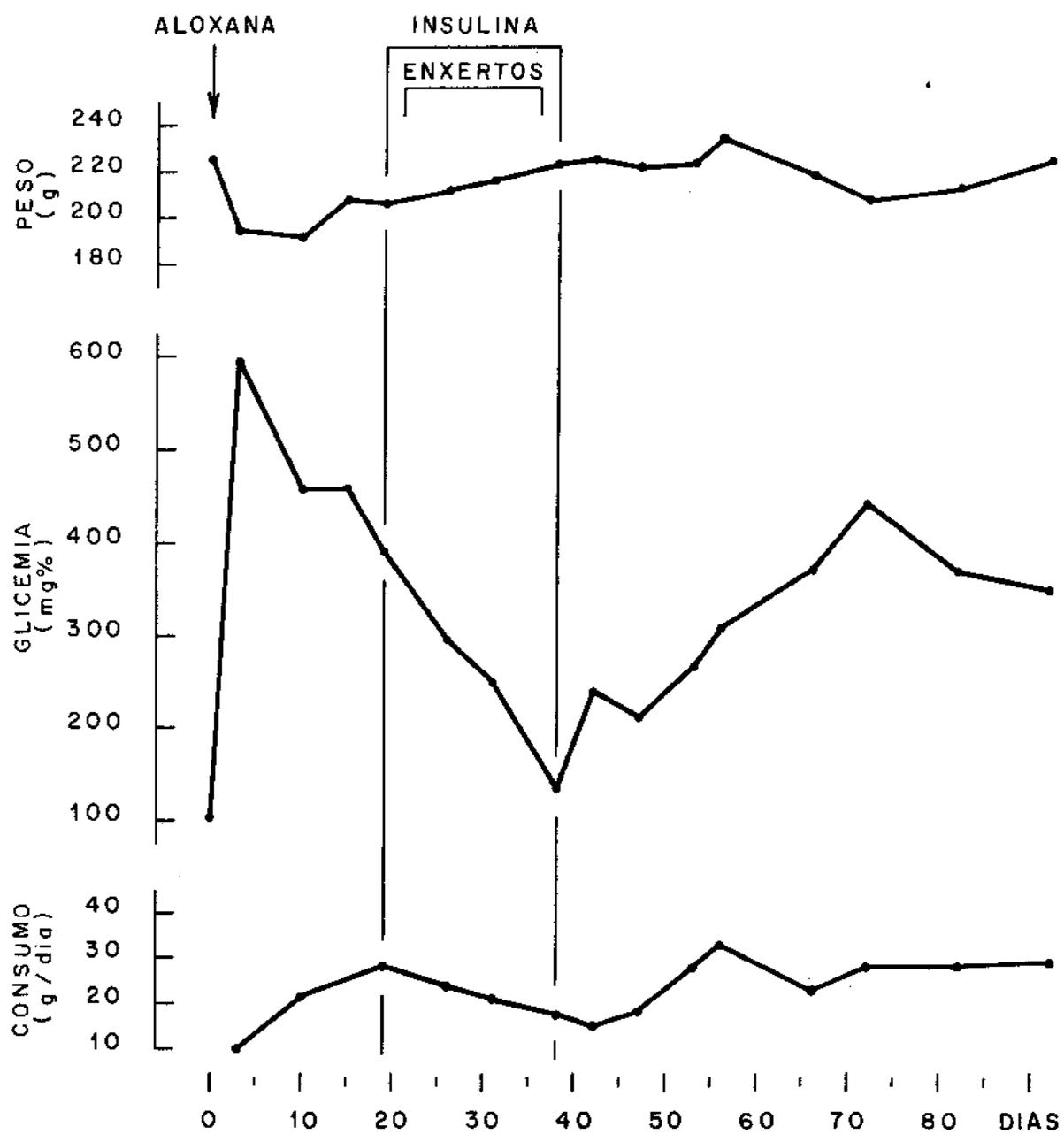


Gráfico 10 - Representação do peso, glicemia e consumo de um receptor, antes, durante e após os transplantes de ilhotas no mesentério, que aparentemente permaneceram funcionantes por um período aproximado de 10 dias.

fossem observados sinais que indicassem absorção do material transplantado, pode ser que isto tenha ocorrido em alguns casos, visto que os ratos doadores provindos de vários laboratórios seguramente não apresentavam carga genética semelhante aos receptores.

Para a explicação dos sucessos apenas parciais, acreditamos que o principal fator é representado pelo número insuficiente de ilhotas. Porém, se RECKARD et alii (1973), em transplantes isôgenos de 600 a 1200 ilhotas, conseguiram correção total do nível glicêmico, é provável que muitas ilhotas por nós transplantadas não tenham produzido insulina no animal receptor. Isto pode ter ocorrido por rejeição das mesmas, por tratar-se de transplantes homogêneos, por lesões das ilhotas durante o isolamento ou ainda por condições insatisfatórias das áreas receptoras, impedindo uma boa nutrição do tecido enxertado.

Nos receptores cujas hiperglicemias não sofreram redução alguma, aparentemente o material enxertado não secretou insulina e, nestes casos, acreditamos que o principal fator foi a rejeição; contudo, não afastamos a hipótese de que os outros fatores já apontados também tenham contribuído.

Para o enxerto executado no baço, aparentemente sem sucesso, além dos fatores já enumerados podemos apontar ainda a idade do animal receptor, pois foi o único rato adulto do grupo que pesou inicialmente 380 gramas. Esta suposição baseia-se nos trabalhos de BROWNING (1949), ANDRESEN et alii (1952) e MAY (1957). Estes, observaram que o sucesso de um enxerto também depende da idade do receptor, embora em transplantes homólogos em hamsters com 6 a 12 meses de idade, HOUSE et alii (1961), tentando comprovar as experiências dos autores citados acima, não constataram diferença alguma entre os receptores de várias idades.

IB/683

Quanto ao transplante efetuado no pâncreas, igualmente sem sucesso, acreditamos que a liberação de enzimas proteolíticas durante as manobras operatórias, tenham influenciado negativamente, embora MOSKALEWSKI (1969), tenha enxertado com êxito em cobaias normais, algumas ilhotas nesta área, que sobreviveram até 14 dias.

Através dos gráficos e tabelas pode-se observar substancial ganho de peso e queda da glicemia após os transplantes quando se compara os animais receptores (gráfico 1) com os testemunhos diabéticos não tratados (gráfico 5) e diabéticos tratados com insulina (gráfico 6).

Quanto ao consumo de ração, nota-se que os receptores consumiram quantidade praticamente igual aos testemunhos, porém, ganharam muito mais peso quando comparados aos diabéticos tratados e não tratados. Apesar disso, o ganho de peso foi menor nos ratos receptores que nos testemunhos normais (gráfico 4) e, a glicemia em nenhum dos receptores foi totalmente corrigida.

A análise dos resultados dos animais receptores, quando distribuídos nos sub-grupos B1 e B2, mostra para o primeiro (gráfico 2) uma redução mais acentuada do nível glicêmico que, de 420 mg% ao final da primeira fase diminuiu para 250 mg% em média na terceira, evidenciando uma correção de 60%.

No sub-grupo B2 (gráfico 3), não houve correção da glicemia, visto que, após a suspensão do tratamento insulínico no final da segunda fase, o nível glicêmico voltou aos valores da primeira. A evolução do peso dos animais deste sub-grupo foi idêntica à dos animais testemunhos diabéticos operados (gráfico 9), evidenciando assim, provável falha dos enxertos realizados.

No gráfico 11, estão representados os resultados de um dos casos do sub-grupo B1 e outro do sub-grupo B2, na tentativa de salientar as diferenças entre um enxerto bem sucedido e outro aparentemente sem sucesso.

O êxito dos transplantes do sub-grupo B1 fica mais evidente ainda quando são comparados os seus resultados com os dos animais diabéticos não tratados do sub-grupo C2 (gráfico 5). No primeiro, nenhum óbito foi verificado durante o período de experimentação, enquanto que no segundo, ocorreram 8 óbitos. A glicemia reduziu acentuadamente no sub-grupo B1, permanecendo em níveis elevados nos testemunhos diabéticos. O ganho de peso foi acentuado no primeiro sub-grupo, enquanto os animais diabéticos perderam peso.

Comparando-se os resultados apresentados pelos animais submetidos à cirurgias simuladas (gráficos 7, 8 e 9) com os animais testemunhos não operados (gráficos 4, 5 e 6), observamos que não ocorrem diferenças acentuadas quanto ao peso, glicemia e consumo. Apenas na segunda fase, os animais normais submetidos à cirurgias simuladas (gráfico 7) apresentaram menor ganho de peso e glicemia ligeiramente mais elevada em relação aos testemunhos normais não operados (gráfico 4).

Estas observações comprovam que as cirurgias simuladas e os transplantes de fragmentos de tecido pancreático exócrino ou de tecido muscular, não interferem no comportamento dos testemunhos, possibilitando-nos descartar qualquer influência deste tipo nos resultados positivos observados nos receptores.

O uso da insulina exógena parece ser fundamental e sua importância pode ser comprovada no sub-grupo diabético tratado (gráfico 6) onde o aumento de peso, a redução da glicemia e

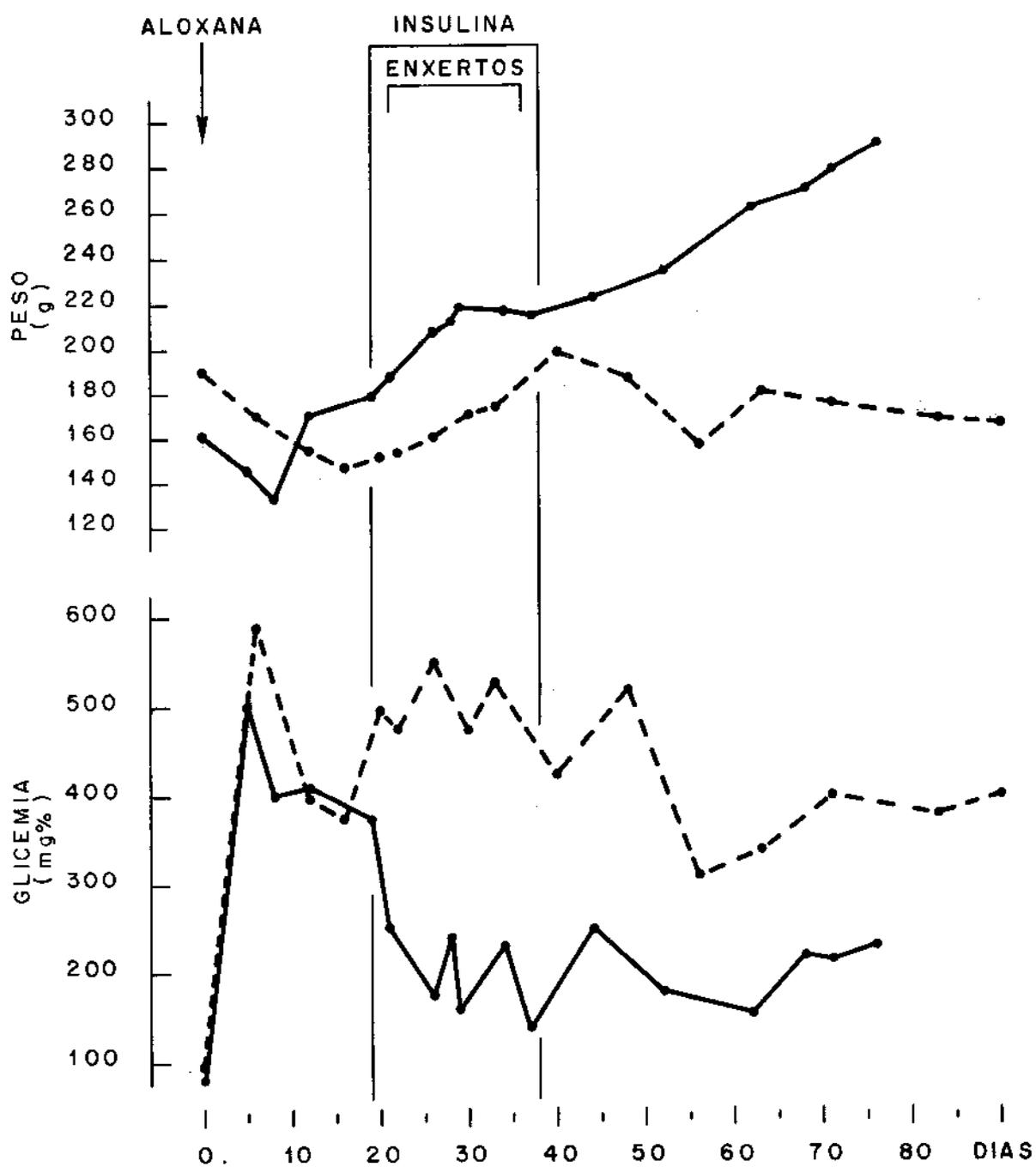


Gráfico 11 - Representação dos pesos e glicemias de dois receptores, antes, durante e após os transplantes de ilhotas no mesentério:

(—) rato do sub-grupo B-1.

(.....) rato do sub-grupo B-2.

do consumo, foram patentes na segunda fase. Essa proteção tornou-se mais evidente ainda nos sub-grupos submetidos à cirurgia simulada onde os diabéticos tratados, quanto ao estado geral, se apresentaram em condições muito melhores do que os não tratados.

Os resultados verificados em nosso trabalho assemelham-se aos obtidos por BALLINGER e LACY (1972) que, em transplantes isôgenos de 400 a 600 ilhotas em ratos diabéticos por estreptozotocina, observaram queda da glicemia dos receptores, que permaneceu entre 100 e 350 mg%. Os ratos passaram a ganhar peso e a mortalidade inexistiu. Nossos resultados, quanto à glicemia, são ainda mais semelhantes aos obtidos pelos mesmos autores em transplantes homogêneos (13 casos), quando empregaram drogas imunossupressoras; dos 8 receptores sobreviventes, 6 tiveram a glicemia reduzida após os enxertos, flutuando entre 100 e 250 mg%. Neste grupo, porém, os receptores não ganharam peso, o que não aconteceu com aqueles submetidos aos transplantes isôgenos e também com os receptores cuja glicemia foi parcialmente corrigida no presente trabalho.

No trabalho dos referidos autores, o nível glicêmico dos receptores antes dos transplantes foi semelhante ao dos receptores do presente trabalho, porém, como não empregamos medidas imunossupressoras, possivelmente o número de ilhotas 10 vezes maior enxertado por nós, possa ter compensado a falta do medicamento.

Alguns dos nossos receptores que apresentaram glicemias muito elevadas antes dos enxertos (550 a 650 mg%) e que se mostraram refratários ao tratamento insulínico, não tiveram a glicemia reduzida. A glicemia muito elevada destes receptores pode ter exigido insulina em demasia das ilhotas, nos primeiros dias pós transplantes, provocando a falência das mesmas.

LEONARD et alii (1973), confirmam nossa opinião quando, em transplantes de ilhotas de ratos recém-nascidos em ratos diabéticos, verificaram que a possibilidade de êxito dos enxertos foi maior quando os receptores apresentavam diabetes menos severo e/ou eram geneticamente semelhantes aos doadores (transplantes isôgenos).

Em transplante de 600 a 1200 ilhotas, obtidas de ratos adultos, RECKARD et alii (1973), obtiveram sucesso na correção da glicemia durante um período de 3 a 12 meses, apenas em transplantes isôgenos. Este autores sugerem que o tecido pancreático endócrino também está sujeito aos processos de rejeição como outro tecido qualquer, embora MERKEL (1971), tenha admitido que o tecido pancreático, está sujeito a um menor grau de rejeição do que muitos outros tecidos.

BALLINGER e LACY (1972), chamaram a atenção para o fato de que num indivíduo normal, por ser a sua concentração de insulina 10 vezes maior na veia porta do que na circulação periférica, seria necessário transplantar as ilhotas para uma área que seguramente fôsse drenada pelo sistema porta hepática, assegurando dessa maneira um afluxo maior de insulina para o fígado. Confirmando esta observação, RECKARD et alii (1973), através de testes de tolerância à glicose, executados em ratos receptores cujas ilhotas foram transplantadas na cavidade peritoneal e em ratos normais, observaram nos receptores desvio das curvas para a direita em relação as curvas normais. Estes autores concluem que a cavidade peritoneal não é a região mais adequada para este tipo de transplante.

Quanto à parte histológica, infelizmente apenas conseguimos encontrar as ilhotas nos receptores sacrificados 15 dias

após a realização do último enxerto. A morfologia dessas ilhotas permite admitir que, pelo menos por 15 dias, elas sobreviveram no mesentério do receptor, inclusive exibindo células com abundante granulação citoplasmática (foto 5), o que indica a funcionalidade das mesmas. O aparente aumento do número de macrófagos observado em áreas distantes das ilhotas, parece não estar relacionado com a presença das mesmas.

Um fato interessante que nos chamou a atenção foi que a maioria das ilhotas encontradas estavam localizadas nas vizinhanças de pequenos vasos sanguíneos, e a presença em algumas delas, de hemácias dentro de capilares, como mostra a foto 4, evidencia uma possível neovasogênese também observada por BALLINGER e LACY (1972), nos transplantes de ilhotas em músculo.

O pequeno número de células beta remanescentes nos pâncreas dos receptores apresentando granulações no citoplasma, ao nosso ver não produziram quantidade suficiente de insulina para proporcionar as quedas glicêmicas verificadas. Estas células com abundante granulação também foram encontradas no pâncreas dos receptores cujos enxertos não corrigiram a hiperglicemia, e também no pâncreas dos ratos testemunhos diabéticos.

Esta observação foi confirmada por BALLINGER e LACY (1972) e por LEONARD et alii (1973), que também encontraram no pâncreas dos animais receptores, ou mesmo dos testemunhos diabéticos, células beta apresentando as referidas granulações.

Com base nos resultados observados no presente trabalho e na literatura, ainda pouco numerosa sobre o assunto, acreditamos que os enxertos de ilhotas de Langerhans isoladas venham a ser empregados no futuro com grandes possibilidades de sucesso.

Dentre as vantagens que o método oferece, as princi

país são: dispensa das anastomoses vasculares, eliminação do tecido pancreático exócrino e pequena massa de tecido transplantado.

Os transplantes de pâncreas total ou parcial no homem, não oferecem 2 das vantagens enumeradas acima, pois, é evidente que a atrofia prévia do tecido exócrino, por ligadura dos dutos pancreáticos do doador antes da realização do transplante é impraticável, e embora o problema de drenagem dos produtos exócrinos tenha sido resolvido satisfatoriamente por GLIEDMAN et alii (1973), existe ainda a necessidade de praticar anastomoses vasculares entre o receptor e o órgão enxertado, muitas vezes problemáticas.

Particularmente, quanto aos transplantes de ilhotas isoladas no homem, acreditamos que sejam viáveis dentro de um futuro muito próximo.

Nossa previsão, baseia-se não só nos resultados animadores colhidos no presente trabalho, como também nos resultados obtidos por ASHCROFT, BASSET e RANDLE (1971) e BALLINGER e LACY (1972), que incubando ilhotas humanas isoladas pelo método da collagenase, observaram que elas podem produzir e secretar insulina "in vitro".

RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho, foram realizados em ratos diabéticos, transplantes homogêneos de ilhotas de Langerhans, isoladas pelo método da colagenase, com a finalidade de verificar se o material transplantado pode sobreviver e corrigir a hiperglicemia dos animais receptores.

Para o isolamento, fragmentos de pâncreas de ratos normais foram incubados com colagenase e, após a centrifugação do material em meios descontínuos de Ficoll, as ilhotas foram coletadas sob lupa.

As ilhotas assim isoladas foram transplantadas em número de 3 a 10 mil para cada animal receptor, preferencialmente em áreas drenadas pelo sistema porta hepático (mesentério e baço).

Foram utilizados 408 ratos doadores, 15 receptores e 49 testemunhos. Os testemunhos, foram distribuídos em 2 grupos: animais não operados e animais submetidos à cirurgias simuladas. Os animais do grupo de cirurgias simuladas, receberam ao invés de ilhotas, fragmentos de tecido exócrino ou de tecido muscular. Os ratos dos grupos testemunhos, foram ainda subdivididos em 3 subgrupos; normais, diabéticos e diabéticos tratados com insulina.

Cinquenta por cento dos ratos receptores mostraram correção parcial do nível glicêmico, sendo que em um dos casos, essa correção foi da ordem de 70%, enquanto que os animais testemunhos diabéticos e diabéticos tratados com insulina de ambos os grupos, não a evidenciaram.

As ilhotas transplantadas, somente foram encontradas no mesentério dos receptores sacrificados no 15º dia após o último transplante. No restante do material, obtido de receptores sacrificados no 20º, 30º, 40º, 50º e 60º dia após os enxertos, não foram encontrados as ilhotas transplantadas e nem sinais que pudessem indicar a absorção do material enxertado, mesmo nos receptores que apresentaram correção do nível glicêmico até o dia do sacrifício.

Os resultados obtidos permitem-nos concluir que:

- 1 - As ilhotas isoladas em grande número, pelo método da colagenase, e transplantadas para receptores diabéticos, podem sobreviver e corrigir pelo menos em parte o diabetes dos receptores.

- 2 - A correção do diabetes parece estar diretamente relacionada com o número de ilhotas transplantado.
- 3 - O tratamento insulínico durante o período de enxertos é importante pois, se não protege as ilhotas recém transplantadas , melhora sensivelmente o estado geral dos receptores e também dos testemunhos diabéticos.
- 4 - A rejeição exerce um papel importante cuja magnitude não foi possível aquilatar.

BIBLIOGRAFIA

- 01 - ANDERSON, E. and J. A. LONG - The effects of hyperglycemia on insulin secretion as determined with the isolated rat pancreas in a perfusion apparatus. Endocrinology, 40: 92-98, 1947a.
- 02 - ANDERSON, E. and J. A. LONG - Supression of insulin secretion by the growth hormone of the anterior pituitary as determined with the isolated rat pancreas in a perfusion apparatus. Endocrinology, 40: 98-103 , 1947b.
- 03 - ANDERSON, R. H.; C. W. MONROE and G. H. HASS - The pattern of tissue reactions to autologous and homologous musculofascial transplants. J. Exp. Med., 95: 509-522, 1952.
- 04 - ASHCROFT, S. J. H.; J. M. BASSET and P. J. RANDLE - Isolation of human pancreatic islets capable of releasing insulin and metabolising glucose in vitro. Lancet, 1: 888-889, 1971.
- 05 - BAILEY, C. C. and P. LE COMPTE - Clinical implications of aloxan diabetes. Med. Clin. North. America, 31: 427-428, 1947.
- 06 - BALLINGER, W. F. and P. E. LACY - Transplantation of intact pancreatic islets in rats. Surgery, 72: 175-186 , 1972.
- 07 - BANTING, F. G. and C. H. BEST - The internal secretion of the pancreas. J. Lab. Clin. Med., 7: 251-266, 1922.
- 08 - BARNEJEE, S. - Effect of certain substances on the preven-

- tion of diabetogenic action of alloxan. Science ,
106: 128-130, 1947.
- 09 - BENNETT, L. L. and A. A. KONEFF (1946) apud F. D. W. LUKENS
in "Alloxan diabetes" p. 316 - Physiol. Rev., 28:
304-330, 1948.
- 10 - BENSLEY, R. R. - Studies on the pancreas of the guinea pig.
Amer. J. Anat., 12: 297-338, 1911.
- 11 - BROWNING, H. C. - Homologous and heterologous growth of
transplants of various tissues during the course
of development in the mouse. Cancer, 2: 646-672 ,
1949.
- 12 - BROWNING, H. C. and P. RESNIK - Homologous and heterologous
transplantation of pancreatic tissue in normal and
diabetic mice. Yale J. Biol. Med., 24: 141-152 ,
1951.
- 13 - BRUCKMANN, G. - A method for the determination of alloxan.
J. Biol. Chem., 165: 103-113, 1946.
- 14 - BRUNSWIG, A.; J. G. ALLEN; F. M. OWENS and T. F. THORNTON-
Alloxan in the treatment of insulin producing isle
ts cell carcinoma of pancreas. J. Am. Med. Assoc.,
124: 212-216, 1944.
- 15 - CAMERON, M. L. and J. E. STEELE - Simplified aldehyde - fuch
sin staining of neurosecretory cells. - Staun. Te-
chnol., 34: 265-266, 1959.
- 16 - CARNEVALLI, J. F.; W. H. REMINE; J. H. GRINDLAY; and E. G.
HARRISON - Experiences with the autotransplanta --
tion of islet cell tissue in dogs. Ama Arch. Surg.
81: 708-714, 1960.
- 17 - CAVALLERO, C. - Application de la méthode colchicinique à
l'étude du diabète alloxanique chez le rat. Rev.

- Belg. Path., 18: 323-332, 1947.
- 18 - CHAYA, A.; H. E. APPERT and J. M. HOWARD - Canine allografts (Homografts) of islet cell tissue. Arch. Surg. 93: 598-605, 1966.
- 19 - CHESLER, A. and R. TISLOWITZ - Effect of alloxan diabetes on the growing rat. Science, 101: 468, 1945.
- 20 - COUPLAND, R. E. - Growth of pancreatic islet tissue in the anterior chamber of the eye. Nature, 179: 51-52, 1957.
- 21 - COUPLAND, R. E. - The survival and growth of pancreatic tissue in the anterior chamber of the eye of the albino rat. Endocrinology, 20: 69-77, 1960.
- 22 - COVIAN, F. G. - Aspectos fisiológicos de la diabetes experimental por alloxana. Cadern. Cient., 1: 263-290, 1946.
- 23 - DAMERON, J. T. - Homologous transplantation of endocrine tissue. S. Forum, 570-578, 1950.
- 24 - DE JODE, L. R. and J. M. HOWARD - Studies in pancreaticoduodenal homotransplantation. Surgery, 114: 553-558, 1962.
- 25 - DUBOIS, A. M. et A. GONET - Régénération des îlots de Langerhans au cours de la correction du diabète expérimental du rat par bréphoplastie pancréatique. Z. Zellforsch., 53: 481-491, 1961.
- 26 - DUFF, G. L. and H. STARR - Experimental alloxan diabetes in hooded rats. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 57: 280-282, 1944.
- 27 - DUFFY, E. (1945) apud F. D. LUKENS in "Alloxan diabetes" p. 312. Physiol. Rev., 28: 304-330, 1948.

- 28 - DUNN, J. S.; J. KIRKPATRICK; N. G. B. McLETCHE and S. V. TELFER - Necrosis of the islets of Langerhans produced experimentally. J. Path. and Bact., 55: 245-257, 1943.
- 29 - DUNN, J. S.; H. L. SHEEHAN and N. G. B. McLETCHE - Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. Lancet, 1: 484-487, 1943.
- 30 - DUNN, J. S. and N. G. B. McLETCHE - Experimental alloxan diabetes in the rat. Lancet, 2: 384-387, 1943.
- 31 - DUNN, J. S.; E. DUFFY; M. K. GILMOUR; J. KIRKPATRICK and N. G. B. McLETCHE - Further observations on the effects of alloxan on the pancreatic islets. J. Physiol., 103: 233-243, 1944.
- 32 - ELLENBOGEN, G.; V. LINS; A. RAIA; W. LOUZA; S. FERA e H. W. PINOTTI - Transplante experimental de pâncreas em caães. Hospital, 75: 1575-1583, 1969.
- 33 - FAJANS, S. S. and J. C. FLOYD, JR. - Stimulation of islet cell secretion by nutrients and by gastrointestinal hormones released during digestion. In "Handbook of Physiology". Endocrinology, (Endocrine Pancreas) section 7 (v) 1: 473-493, Ed. by American Physiological Society, Washington, 1972.
- 34 - FIELD, J. B. - Insulin extration by the lives. In "Handbook of Physiology". Endocrinology, (Endocrine Pancreas) section 7 (v) 1: 505-513, Ed. by American Physiological Society, Washington, 1972.
- 35 - FRIEDMAN, C. N. B. and D. N. CALDWELL - Beta cell changes in guinea pig pancreas in relation to blood sugar level. Proc. Exp. Biol. and Med., 41: 567-570, 1939.

- 36 - FROHMAN, F. A. - The endocrine function of the pancreas. Ann. Rev. Physiol., 31: 353-382, 1969.
- 37 - GAGLIARDINO, J. J. and J. M. MARTIN - Studies, on the mechanism of insulin release. Metabolism, 15: 1068 - 1075, 1966.
- 38 - GAGLIARDINO, J. J.; R. E. HERNANDEZ; O. R. REBOLLEDO and S. BEVILACQUA - Variación circadiana de la capacidad de respuesta de la célula beta pancreática. Soc. Argent. Endocr. Metab., III Congreso. p. 52, 1971.
- 39 - GAYET, R. et M. M. GUILLAUMIE - La régulation de la sécrétion interne pancréatique par un processus humoral démontrée par des transplantations de pancréas. Experiences sur des animaux normaux. C. Rend. Soc. Biol., 97: 1613-1614, 1927.
- 40 - GERNER, R.; J. L'AGAE-STHER; T. O. TJIOE und A. WACKER- Zur Isolierung Langerhansscher Inseln aus Rattenpankreas. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 351: 309-312, 1970.
- 41 - GLIEDMAN, M. L.; H. RIFRIN; H. ROSS; R. SOBERMAN; Z. ZARDAY; V. TELLIS; S. FREED and F. J. VEITH - Clinical segmental pancreatic transplantation with ureter pancreatic duct anastomosis for exocrine drainage. Diabetes, 22 (suppl. 1) p. 295, 1973.
- 42 - GOETZ, F. C. - The regulation of insulin secretion. Minn. Med., 50: 321-327, 1967.
- 43 - GOLDNER, M. G. and G. GOMORI - Alloxan diabetes in the dog. Endocrinology, 33: 297-308, 1943.
- 44 - GOMORI, G. - Aldehyde-Fuchsin: A new stain for elastic tis -

- sue. Amer. J. Clin. Path., 20: 665-666, 1950.
- 45 - GOMORI, C. and M. G. GOLDNER - Production of diabetes mellitus in rats with aloxan. Proc. Soc. Exp. Biol. , 54: 287-290, 1943.
- 46 - GONET, A. - Correction du diabète expérimental du rat par la greffe pancréatique roetale. Thesis. Acta Endocr., (KBH) 38 (suppl. 62), 1-32, 1961.
- 47 - GONET, A. E.; A. E. RENOLD - Homografiting of foetal rat pancreas. Diabetologia, 1: 91-96, 1965.
- 48 - GOODNER, C. J. and D. PORTE, JR. - Determination of basal islets secretion in man. In "Handbook of Physiology" Endocrinology, (Endocrine Pancreas), section 7 , (v) 1: 597-609. Ed. by American Physiological - Society, Washington, 1972.
- 49 - GRENIER, J. F.; M. GILLET; P. WONG; A. KLEIN; A. M. BARTH et A. G. WEISS - Les transplantations de pancréas chez le chien. Les explorations fonctionnelles qu'elles permettent. C. Rend. Soc. Biol., 162: 256 - 260, 1968.
- 50 - GRIMELIUS, L.; G. T. HULTQUIST, J. J. THORELL and L. WINBLADH - Studies on islet tissue transplants in the anterior chamber of the eye in rats. In "The Structure and Metabolism of the Pancreatic Islets", 173 - 178. Ed. by Pergamon Press (Oxford), 1964.
- 51 - GRODSKY, G. M. and P. H. FORSHAN - Insulin and the pancreas. Ann. Rev. Physiol., 28: 347-380, 1966.
- 52 - HARRIS, P. N.; R. C. ANDERSON and K. K. CHEN, (1946) apud F. D. W. LUKENS in "Alloxan diabetes" p. 306. Physiol. Rev., 28: 304-330, 1948.

- 53 - HELLERSTRON, C. - A method for the microdissection of intact pancreatic islets of mammals. Acta Endocr. (Kbh) 45: 122-132, 1964.
- 54 - HOSHI, M. and W. W. SHREEVE - Release and production of insulin by isolated perfused rat pancreatic islets. Diabetes, 22: 16-24, 1973.
- 55 - HOUSE, E. L.; C. BURTON; H. COOPER and E. ANDERSON - The implantation of neo-natal pancreas into the cheek pouch of the alloxan diabetic hamster. Endocrinology, 63: 389-390, 1958.
- 56 - HOUSE, E. L.; M. S. JACOBS and B. PANSKY - Homoplastic transplantation of pancreas in diabetic hamsters. Transpl. Bull., 28: 55-61, 1961.
- 57 - HOUSE, E. L.; B. PANSKY and M. JACOBS - The effect of pancreatic homografts on the diabetic state of alloxan-treated hamsters. Anat. Rec., 140: 341-343, 1963.
- 58 - HOUSE, E. L.; B. PANSKY; M. S. JACOBS; R. STREBEL and H. PAYAN - The use of D-L ethionine in the transplantation of pancreatic tissue in hamsters. Anat. Rec., 211-216, 1965.
- 59 - HOUSSAY, B. A.; J. T. LEWIS et V. G. FOGLIA - Action compensatrice ou preventive de la greffe pancreatique sur la glicémie diabétique ou normale. C. Rend. Soc. Biol., 100: 140-142, 1929.
- 60 - HOUSSAY, B. A.; F. BRIGNONE y P. MAZOCCO - Diabetes metaalloxanica en el perro. Rev. Soc. Argent. Biol., 22: 195-231, 1946.
- 61 - HOWELL, S. L. and P. E. LACY - Biochemical and ultrastructural studies of insulin storage granules and their secretion. Mem Soc. Endocrinol., 19: 469-480, 1970.

1970.

- 62 - HULTQUIST, G.; L. GRIMELIUS; P. M. LUNDIN; J. THORELL and L. WINBLADH - Ocular transplants of islets tissue in diabetic and non diabetic rats. In "On the Nature and Treatment of Diabetes", 49-57. Ed. by Excerpta Medica Foundation (Amsterdam), 1965.
- 63 - JACOBS, H. R. - Hypoglycemic action of alloxan. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 37: 407-409, 1937.
- 64 - JARRET, I. G., (1946) apud F. D. W. LUKENS in " Alloxan diabetes", p. 306. Physiol. Rev., 28: 304-330, 1948.
- 65 - JONSSON, L. E.; J. PONTÉN and J. THORELL - Long Term production of insulin by adult rat pancreas "in vitro". Diabetologia, 2: 157-161, 1966.
- 66 - KASS, E. H. and B. A. WAISBREN - A method for consistent induction of chronic hyperglycemia with alloxan. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 60: 303-306, 1945.
- 67 - KEEN, H.; R. SELLS and R. J. JARRET - A method for the study of the metabolism of isolated mammalian islets of Langerhans and some preliminary results. Diabetologia, 1: 28-32, 1965.
- 68 - KENDALL, F. E.; W. MEYER; L. LEWIS and J. VICTOR - Alloxan diabetes in rabbits. Production of hypercholesterolemia, hyperlipemia and adrenal cortical lesions. Soc. Exp. Biol. and Med., 60: 190-195, 1945.
- 69 - KOSTIANOVSKY, M.; P. E. LACY; M. H. GREIDER and M. F. STILL - Long term (15 days) incubation of islets of Langerhans isolated from adult rats and mice. Lab. Invest., 27: 53-61, 1972.
- 70 - LACKEY, R. W.; C. A. BUNDE; A. J. GILL and L. C. HARRIS -

- Glycogen in alloxan-treated rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 57: 191-194, 1944.
- 71 - LACY, P. E.; and M. KOSTIANOVSKY - Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. Diabetes, 16: 35-39, 1967.
- 72 - LACY, P. E.; D. A. YOUNG and C. J. FINK - Studies on insulin secretion in vitro from isolated islets of the rat pancreas. Endocrinology, 83: 1155-1161, 1968.
- 73 - LAZAROW, A. - Spontaneous recovery from alloxan diabetes in the rat. Diabetes, 1: 363-372, 1952.
- 74 - LAZAROW, A. and S. L. PALAY - The production and course of alloxan diabetes in the rat. J. Lab. Clin. Med., 31: 1004-1015, 1946.
- 75 - LEE, S.; J. G. CHANDLER; R. KRUBEL; N. T. NAKAJI; H. ROSEN and J. ORLOFF - Relief of diabetes mellitus by heterotopic transplantation of the whole pancreas inbred rats. Surg. Forum, 22: 75-77, 1971.
- 76 - LEONARD, R. J.; A. LAZAROW and O. D. HEGRE - Pancreatic islets transplantation in the rat. Diabetes, 22: 413-428, 1973.
- 77 - LEWIS, L. A.; J. MOSES and R. W. SCHNEIDER - Plasma Proteins II. Alteration in alloxan diabetic rabbits especially in relation to ocular damage. Am. J. Med. Sci., 213: 214-220, 1947.
- 78 - LINK (1953) - apud F. D. W. LUKENS in "The pancreas: Insulin and glucagon" - p. 450. Ann. Rev. Physiol., 445-474, 1959.
- 79 - LUKENS, F. D. W. - Alloxan diabetes. Physiol. Rev., 28: 304

-330, 1948.

- 80 - LUKENS, F. D. W. - The pancreas: Insulin and glucagon. Ann . Rev. Physiol., 445-474, 1959.
- 81 - MALAISSE, W. - Hormonal and environmental modification of islet activity. In "Handbook of Physiology" Endocrinology, (Endocrine Pancreas), section 7 , (v) 1: 237-260, Ed. by American Physiological Society (Washington), 1972.
- 82 - MALAISSE, W. J. - Insulin secretion: Multifactorial regulation for a single process of release. Diabetologia, 9: 167-173, 1973.
- 83 - MANSFORD, K. R. L.; and L. OPIE - Comparison of metabolic abnormalities in diabetes mellitus induced by streptozotocin or by alloxan. Lancet, 1: 670-671, 1968.
- 84 - MALAISSE, W. J.; F. MALAISSE-LAGAE; P. E. LACY and P. H. WRIGHT - Insulin secretion by isolated islets in presence of glucose, insulin and anti-insulin serum. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 124: 497-500 , 1967.
- 85 - MALAISSE, W. J.; F. MALAISSE-LAGAE and S. KING - Quantitative and qualitative aspects of islets function in the rat. J. Lab. and Clin. Med., 71: 56-64, 1968.
- 86 - MARTINEZ, C. - Accion del aloxano y dieta. Rev. Soc. Argent. Biol., 21: 332-337, 1945.
- 87 - MAY, R. M. - The possibilities of nephroplastic transplants. Ann. N. Y. Acad. Sci., 64: 937-949, 1957.
- 88 - MERING, J. und O. MINKOWSKI - Diabetes mellitus nach Pankreasextirpation. Z. Klin. Med., 10: 393-394 , 1889.

- 89 - MERKEL, F. K. - Pancreas transplant registry report. In ACS/NIH Organ Transplant Registry. Jama, 217: 1528-1529, 1971.
- 90 - METZ, R. - The effect of the blood glucose on insulin secretion. J. Lab. Clin. Med., 52: 929-930, 1958.
- 91 - MINKOWSKI, O - Weitere Mittheilunger uber den Diabetes mellitus nach Extirpation des Pancreas. Ber. Klin. Wochenschr., 29: 90-94, 1892.
- 92 - MOLONEY, P. J. and M. COVAL (1955) - apud F. D. W. LUKENS in "The pancreas: Insulin and glucagon". pag. 466. Ann. Rev. Physiol., 445-474, 1959.
- 93 - MOSKALEWSKI, S. - Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. Gener. Comp. Endocr., 5: 342-253, 1965.
- 94 - MOSKALEWSKI, S. - Studies on the culture and transplantation of isolated islets of Langerhans of the guinea pig. Proc. Koninkl. Nederl. Akad. Van Wetenschappen - Amsterdam, 72: 157-171, 1969.
- 95 - OKAMOTO (1955) - apud F. D. W. LUKENS in "The pancreas: Insulin and glucagon" p. 450 e 451. Ann. Rev. Physiol. 445-474, 1959.
- 96 - PEMBERTON, L. B. and W. G. MANAX - Control of alloxan diabetes in dogs by islets cell transplantation. Surgery, 132: 75-80, 1971.
- 97 - PENSO, G. and BALDUCCI - in "Tissue cultures in Biological Research". pag. 70 - Ed. by Elsevier Publishing Company (Amsterdam), 1963.
- 98 - PEPIN, J.; K. ETO; J. M. HOWARD and F. W. PAIRENT - Hetero-transplantation of the pancreatic islet cell mass

- from sheep to dogs. Arch. Surg., (Chicago) 97 : 118-123, 1968.
- 99 - PERALTA, R. B. (1945) apud C. RUANGSIRI in "Changes in islets of Langerhans in living mice after alloxan administration". p. 401, Ann. Rec., 105: 399-427, 1949.
- 100 - RANDLE, P. J. and C. N. HALES - Insulin release mechanism : In "Handbook of Physiology". Endocrinology. (Endocrine Pancreas), section 7, (v) 1: 219-235, Ed. by American Physiological Society (Washington) , 1972.
- 101 - RECKARD, C. R.; M. M. ZIEGLER and C. F. BARKER - Islet transplantation in streptozocin induced diabetes in rats. Diabetes, 22 (suppl. 1) p. 295, 1973.
- 102 - REEMSTMA, K. - Experimental islets cell grafting: A transplantation Model. Transpl. Proc., 2: 513-515 , 1970.
- 103 - REEMSTMA, K.; J. F. LUCAS; R. E. ROGERS; F. E. SCHIMIDT and F. H. DAVIS - Islet cell function of the transplanted canine pancreas. Ann. Surg., 158: 645 - 654, 1963.
- 104 - REEMSTMA, K.; R. L. HEWITT; P. E. SMITH and R. F. WEICHERT III - Studies of endocrine function following transplantation of the canine pancreas. Ann. N. Y. Acad. Sci., 120: 656-666, 1964.
- 105 - RUANGSIRI, C. - Changes in islets of Langerhans in living mice after alloxan administration. Anat. Rec. , 105: 399-427, 1949.
- 106 - RUBEN, J. A. and K. YARDUMIAN - Diabetes produced by fee -

- ding alloxan to cats. Science, 103: 220-221 ,
1946.
- 107 - SAK, M. F.; I. A. MACCHI and S. B. BEASER - Structural and functional characteristics of neonatal pancreas homografts in alloxan diabetic golden hamsters. Diabetes, 15: 51-58, 1966.
- 108 - SIMARD; L. C. - Étude histologique de pancréas greffés dans la paroi abdominale, chez le chien. Rev. Canad. Biol., 4: 264-287, 1945.
- 109 - SOMOGY, M. - Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. , 195: 19-23, 1952.
- 110 - STEINER, D. F.; W. KEMMLER; J. L. CLARK; P. E. OYER and A. H. RUBENSTEIN - The biosynthesis of insulin . In "Handbook of Physiology" Endocrinology, (Endocrine Pancreas), section 7 (v) 1: 175-198, Ed. by American Physiological Society,(Washington), 1972.
- 111 - VANCE, J. E.; K. D. BUCHANAN; D. R. CHALLONER and R. H. WILLIAMS -Effect of glucose concentration on insulin and glucose release from isolated islets of Langerhans of the rats. Diabetes, 17: 187-193, 1968.
- 112 - WAISBREN, B. A. - Alloxan diabetes in mice. Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y., 67: 154-156, 1948.
- 113 - WISSLER, R. W.; J. W. FINDLEY, JR. and L. E. FRAZIER - Pancreatic islet hyperplasia in rats force fed high carbohydrate - Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. , 71: 308-313, 1949.
- 114 - WODRUFF, (1952) apud HOUSE, E. L.; M. S. JACOBS and B. PANSKY - In "Homoplastic transplantation of pancreas in diabetic hamster" p. 441 Transpl. Bull., 28:

435-441, 1961.

- 115 - WOERNER, C. A. - Studies of the islands of Langerhans after continuous intravenous injection of dextrose. Anat. Rec., 71 (suppl. 1): 33-57, 1938.
- 116 - WOERNER, C. A. - The effects of continuous intravenous injections of dextrose in increasing amounts on the blood sugar level, pancreatic islands and liver of guinea pigs. Anat. Rec., 75: 91-103, 1939.
- 117 - YOUNG (1937) apud F. G. COVIAN in "Aspectos fisiológicos de la diabetes experimental por la aloxana". p. 263. Cadern. Cient., 1: 263-290, 1946.