

ALOTRANSPLANTE DE ILHOTAS DE LANGERHANS NO FÍGADO DE RATOS SUBMETIDOS A MANIPULAÇÃO TÍMICA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS

Eleazar CHAIB, Apostolos PAPALOIS, Ingrid G. M. BRONS e Roy Y. CALNE

RESUMO – *Racional* - A maior indicação do transplante de pâncreas ou de ilhotas de Langerhans é o diabetes mellitus do tipo I. O processo deve suprir as necessidades de insulina, mantendo os níveis glicêmicos dentro da normalidade. *Objetivos* - Estudou-se o alotransplante de ilhotas de Langerhans no fígado de ratos Lewis, tendo como doadores de ilhotas ratos Wistar. No grupo controle (n = 8) injetava-se, no tímo, solução de Hanks e no grupo de estudo (n = 9), células dendríticas. *Material e Métodos* - No grupo controle com o método de separação e purificação das ilhotas de Langerhans obteve-se 3637 ± 783,3 ilhotas com pureza de 85% ± 3,52%. No grupo de estudo obteve-se 3268 ± 378 ilhotas de Langerhans com pureza de 87% ± 4,47% e com o método de isolamento e purificação das células dendríticas do baço obteve-se 3,34 x 10⁵ ± 1,16 células. *Resultados* – No grupo controle, o transplante de 3637 ± 783,3 ilhotas de Langerhans no fígado, normalizou a glicemia que chegou a 7,21 ± 0,57 mmol/L no segundo pós-operatório (diferença significativa com relação ao pré-operatório). Do pós-operatório imediato até o 8º pós-operatório a glicemia não se elevou significativamente, porém a partir do 10º pós-operatório houve aumento significativo deste parâmetro, o que pode ser compatível com rejeição aguda do enxerto. No grupo de estudo, o transplante de 3258 ± 378 ilhotas de Langerhans no fígado, normalizou a glicemia, que chegou a 9,3 ± 2,85 mmol/L no segundo pós-operatório (diferença significativa com relação ao pré-operatório). Do 4º ao 10º pós-operatório, a glicemia elevou-se significativamente, o que pode ser compatível com quadro de rejeição aguda do enxerto e certamente precoce. *Conclusão* - A inoculação de células alogênicas apresentadoras de antígenos (células dendríticas) no tímo de ratos imunossuprimidos e diabéticos, antes do alotransplante de ilhotas de Langerhans no fígado, ao contrário de inibir a reação do receptor contra o enxerto, prolongando a sobrevida média das ilhotas e, possivelmente, levando ao estado de tolerância imunológica, induziu ao processo de rejeição aguda precoce.

DESCRITORES – Transplante das ilhotas de Langerhans. Transplante homólogo. Ratos.

INTRODUÇÃO

O objetivo do transplante de pâncreas ou de ilhotas de Langerhans é prover fonte de insulina que seja suficiente para manter a glicemia dentro dos limites da normalidade. Como consequência, o transplante deve prevenir as complicações secundárias do diabetes, como também melhorar a qualidade de vida dos pacientes, liberando-os da dependência de injeções de insulina.

A maior indicação do transplante de pâncreas ou de ilhotas de Langerhans é o diabetes mellitus do tipo I, doença em que as células beta das ilhotas de Langerhans são destruídas por processo auto-imune, resultante de inter-relação complexa entre fatores genéticos e ambientais desconhecidos⁽⁵⁾.

Antes do início da chamada era “insulínica”, o coma diabético era a causa de morte em pelo menos 2/3 dos pacientes com diabetes mellitus do tipo I, de qualquer idade, porém com a introdução da insulina, em 1922, houve notável regressão

nesses números, aumentando, significativamente, a longevidade dos doentes⁽³⁾.

Mais de meio século após a introdução do tratamento do diabetes mellitus pela insulina, os diabéticos ainda morrem mais cedo do que os não-diabéticos. A taxa de mortalidade por sexo e por idade, nos diabéticos, é mais alta, em qualquer faixa etária, quando comparada à população normal.

A diferença na taxa de mortalidade é, em parte, dependente da idade. Entre 20 e 40 anos de idade, o risco de morte é 10 ou mais vezes maior no diabético do tipo I do que em não-diabéticos, enquanto em diabéticos acima de 50 anos, é, apenas, de duas vezes.

A causa de morte está, também, relacionada com a idade: pacientes mais jovens tendem a morrer de nefropatia, enquanto os mais idosos de doenças cardiovasculares⁽³⁾.

Na Inglaterra, a causa mais comum de cegueira, no período produtivo da vida, é o diabetes mellitus. A retinopatia diabética é esperada em praticamente todos os diabéticos e pode ser detectada

Trabalho realizado no Departamento de Cirurgia da Universidade de Cambridge, Inglaterra.
Endereço para correspondência: Dr. E. Chaib - Rua Embaú, 206 - apt.131 - 04039-060 - São Paulo, SP.

em, aproximadamente, 80% dos pacientes doentes por mais de 20 anos e em 100% daqueles com 40 anos de doença diagnosticada^(12, 30).

A prevalência da doença, em nosso meio, ainda não está bem estabelecida, porém nos Estados Unidos é bem conhecida. Existe mais de 1 milhão de pacientes com diabetes mellitus insulino-dependente, nesse País. A incidência anual da doença é de 55 novos casos por milhão de população, ou 12.000 novos casos por ano. A maioria dos casos são crianças, embora em todas as faixas etárias existam grupos de risco^(9, 31).

A alternativa de tratamento para esses doentes é o transplante de pâncreas que, como se sabe, pode normalizar o metabolismo de carboidratos⁽¹⁷⁾. No entanto, se por um lado essa terapêutica pode prevenir ou reverter as complicações vasculares, comumente vistas nos diabéticos tratados com insulina, por outro, parece improvável que o estrito controle da glicemia pela administração de insulina minimize as complicações^(16, 29).

Os resultados do transplante vascularizado de pâncreas têm melhorado nos últimos anos, no entanto, a cirurgia e a necessidade de imunossupressão continuam sendo responsáveis pela significativa morbimortalidade do procedimento.

Desde que muitos dos problemas relacionados com este procedimento terapêutico são inerentes da técnica cirúrgica ou da porção exócrina do pâncreas transplantado, a simples implantação de ilhotas purificadas de Langerhans seria uma alternativa viável.

Muito tem sido feito nos últimos 20 anos para o aperfeiçoamento das técnicas de transplante de ilhotas de Langerhans: a grande atração dessa modalidade terapêutica é de que elas podem ser injetadas, por via endovenosa, em órgão bem vascularizado (como por exemplo o baço ou o fígado), evitando-se assim, a necessidade de intervenção cirúrgica, como também as inconveniências imunológicas e inflamatórias conseqüentes do transplante de tecido exócrino pancreático.

Apesar dos resultados encorajadores em roedores, o transplante alogênico de ilhotas de Langerhans em grandes animais como também no homem, não tem demonstrado produção significativa de insulina, por longos períodos^(14, 24). Por outro lado, o transplante de ilhotas de Langerhans vem enfrentando dificuldades não só na rejeição imunológica, como também problemas anatômicos específicos⁽²⁹⁾.

Sabe-se que as ilhotas de Langerhans dispersam-se entre os ácinos pancreáticos e constituem entre 1% e 2% da massa do pâncreas. Assim, o seu transplante tem necessitado de métodos complexos e às vezes ineficientes de seu isolamento e purificação.

Um dos principais problemas da perda do enxerto é a rejeição aguda. Grande passo para a sua solução foi dado por POSSELT et al.⁽²²⁾, que obtiveram pela primeira vez a tolerância ao alotransplante das ilhotas de Langerhans em ratos, inoculando no timo desses animais as mesmas ilhotas transplantadas em outro órgão, associando-se dose única de soro anti-linfocitário, por via sistêmica.

Neste estudo serão apresentados os efeitos da inoculação de células apresentadoras de antígenos (células dendríticas) no timo de ratos submetidos ao alotransplante de ilhotas de Langerhans no fígado, como forma de manipulação para provável obtenção de tolerância imunológica.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em 68 *Rattus albinus*, sendo 51 doadores fêmeas da raça Wistar (RT1^U) e 17 receptores machos, da raça Lewis (RT1^L). Água e dieta foram administradas ad libitum.

Para a separação das ilhotas de Langerhans, foram utilizados ratos fêmeas (Wistar (RT1^U)), de peso corpóreo entre 120 e 210 g. Para receptores das ilhotas de Langerhans, utilizaram-se ratos machos (Lewis (RT1^L)), com peso corpóreo entre 170 e 220 g, onde o diabetes foi induzido por injeção de estreptozotocina, na veia peniana.

Separação e purificação das ilhotas de Langerhans

Digestão do pâncreas – O pâncreas distendido pela colagenase era colocado em tubo com solução de Hanks e, a seguir, em banho com água a 37°C e incubado por 17 minutos. Tomava-se cuidado para se monitorizar o tempo e a temperatura após a água estar a 37°C.

A fim de se interromper a digestão pancreática, o tubo era retirado da água morna e a solução de Hanks aquecida era desprezada e substituída pela mesma solução fria, sendo o tecido pancreático colocado em box com gelo e, a seguir, passado por peneira com poros de 400 u.

O tecido digerido era re-suspenso em 20 mL de líquido de lavagem (solução de Hanks) e centrifugado por 2 minutos à 1000 rpm, sendo este procedimento repetido por 2 ou 3 vezes.

O tempo de centrifugação era curto e a velocidade não muito alta para remover-se apenas células exócrinas e os “debris”.

Método de purificação das ilhotas de Langerhans – Após a digestão enzimática tecidual, o pâncreas era lavado como descrito acima e após a decantação do sobrenadante, obtinha-se o material para ser purificado.

O método de purificação utilizado foi com Dextran (Sigma Industrial D - 3759) com peso molecular entre 70.000 e 90.000. Cento e sessenta e nove mg de Dextran eram dissolvidos em 500 mL de Hanks (densidade = 1094) no período de 1 hora, sendo a densidade da nova solução conferida com hidrômetro.

O material digerido era re-suspenso em 10 mL de Dextran a 31%, dissolvido em solução de Hanks e misturado cuidadosamente. Os gradientes de Dextran usados foram: 29% (11,27 mL Dextran + 1,3 mL de Hanks), 25% (9,8 mL Dextran + 2 mL de Hanks) e 11% (4,4 mL Dextran + 6,4 mL Hanks).

Em tubo universal colocavam-se 3 mL de Dextran a 31%, a seguir a solução obtida (tecido pancreático) era sobreposta por 4 mL de Dextran a 29%, 4 mL a 25% e 4 mL a 11%, sendo todo o material centrifugado a 400 rpm por 4 minutos e 2000 rpm por 16 minutos⁽³⁾.

Separação das ilhotas de Langerhans

Após a centrifugação, a separação das ilhotas era obtida da interface das seguintes concentrações de Dextran: 11%-25% e 25%-29%. A seguir, eram removidas com pipeta plástica de Pasteur e lavadas duas vezes com solução de Hanks: a primeira por 3 minutos a 1000 rpm, e a segunda por 1 minuto.

Amostra de cada interface era examinada e contada numa placa de Petri, sob visão direta, com auxílio de microscópio. As ilhotas obtidas eram, então, utilizadas imediatamente para o transplante.

Método de contagem das ilhotas isoladas

O método usado para a contagem do número das ilhotas isoladas era, em resumo, o seguinte: re-suspenção das células em 2 mL de solução de Hanks, misturando-se adequadamente, a seguir 10 alíquotas de 20 µL eram colocadas em placa de Petri.

As ilhotas eram contadas sob visão direta de microscópio com aumento de 10 vezes.

A fórmula usada para calcular o número de ilhotas era:

$$\frac{\text{média do número total de ilhotas (10 gotas)} \times 100}{\text{número total de ilhotas em 2 mL}}$$

Identificação das ilhotas de Langerhans

Embora as ilhotas em roedores possam ser facilmente identificadas usando-se microscópio de dissecação, método simples de coloração das mesmas foi usado para quantificar-se a pureza da preparação.

As ilhotas podem ser coradas antes ou depois da separação com DTZ (diphenylthiocarbazono - Sigma D-5130), que facilita a visualização das células na interface das concentrações do Dextran.

Também foi demonstrado que este método de coloração não altera a função das ilhotas *in vitro* e *in vivo*⁽¹⁾. O DTZ é substância que se liga às moléculas de zinco nos grânulos de insulina, produzindo a cor avermelhada.

A solução de coloração foi preparada acrescentando-se seis gotas de 1 mMol de hidróxido de amônio (30%) à 20 mg de DTZ dissolvido em 6 mL de etanol a 96%, o que resultou numa solução de 13 mMol de DTZ com pH = 7,8.

A solução final com Ph = 7,4 foi obtida acrescentando-se 300 µL dessa solução a 100 mL de PBS (phosphate-buffered saline). Assim, um volume do pâncreas digerido e nove volumes da solução de DTZ foram misturados e incubados à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos.

Procedimento operatório

Todo procedimento operatório foi realizado sob condições limpas. Os instrumentos cirúrgicos eram colocados em recipiente com etanol a 70%, pelo menos 6 horas antes do ato cirúrgico.

Os ratos eram anestesiados em câmara de vidro utilizando-se éter etílico (May; Baker Ltd., Dagenham, Inglaterra). Essa anestesia era utilizada para os procedimentos de curta duração. Para as intervenções prolongadas usava-se o Hypnorm (0,04 mL/100 g de peso corpóreo) (Janssen Pharmaceuticals Ltd., Grove, Oxford - OX12 ODQ, UK), citrato de fentanyl (0,315 mg/mL) e fluanizone (10 mg/mL) através de injeção intramuscular na coxa dos animais, juntamente com o Diazepan (CP Pharmaceuticals Ltd., Wrexham, UK), 10 mg/2 mL, por via intraperitoneal.

A tricotomia do abdome era realizada com máquina elétrica e o animal era colocado em prancha de cortiça na posição supina, com os membros fixados.

Indução do diabetes mellitus

O animal era submetido a anestesia superficial por inalação de éter etílico (May; Baker Ltd., Dagenham, Inglaterra) e colocado em posição supina em prancha de cortiça.

Colhia-se neste momento, da veia da cauda do animal, amostra sanguínea para dosagem da glicemia sérica. A seguir, a veia peniana era canulada (com seringa de insulina de 1 mL e agulha de 12 mm x 0,4 mm) e a estreptozotocina (60 mg/kg) era injetada (a estreptozotocina era dissolvida em PBS na concentração de 10 mg/mL). O pH do PBS era ajustado previamente para 4,5 com ácido cítrico.

A seguir, suspendia-se a anestesia inalatória e o animal era colocado em gaiola isolada para controle da glicemia a cada 2 dias.

Os animais com níveis de glicemia acima de 13 mmol/L foram utilizados para o transplante de ilhotas de Langerhans.

Cirurgia do doador - pancreatectomia

Utilizaram-se 51 ratos, fêmeas, da raça Wistar (RT1^U), com peso corpóreo que variou de 120 a 210 gramas.

Incisão mediana era feita no abdome do animal e o ducto biliopancreático era visualizado. A ligadura da parte proximal do ducto era feita o mais próximo possível do duodeno, usando-se fio monofilamentar 5-0 (Ethicon Ltd., UK) e reparando-o com uma pinça hemostática tipo “mosquito” para visualização de sua parte distal.

O ducto era, então, canulado com auxílio de microscópio (Zeiss, Alemanha - OPM1 6-SH), inserindo-se cânula de plástico fina e amarrando-a com fio de algodão 4-0.

Antes da injeção enzimática o animal era exsanguinado, por secção da aorta abdominal, na emergência dos vasos ilíacos.

Após o coração parar de bater, volume de 4 a 5,5 mL (25 mL/kg) de solução de colagenase (Sigma do tipo XI, C-7657, na dosagem de 0,7 mg/mL + DNase dissolvida em HBSS (Hanks balanced salt solution) - Sigma D-0876) era injetado no ducto biliopancreático, onde se observava a distensão pancreática.

Após o órgão encontrar-se totalmente preenchido pela colagenase, era realizada a pancreatectomia, dissecando-se o pâncreas da grande curvatura gástrica, do duodeno, do retroperitônio, do intestino grosso, do intestino delgado e do baço, com tesoura de microcirurgia, tomando-se o cuidado de não se romper a cápsula pancreática, para que não houvesse extravazamento da colagenase.

A seguir, o pâncreas era colocado em tubo universal que, imediatamente, era transferido para “box” de gelo, e levado ao laboratório. O tempo de isquemia fria não era superior a 30 minutos.

Cirurgia do receptor - transplante de ilhotas de Langerhans

Nove ratos, machos da raça Lewis (RT1^L) pesando entre 170 e 220 g foram usados como receptores de ilhotas de Langerhans de doadores fêmeas da raça Wistar (RT1^U).

O diabetes era induzido por injeção, endovenosa, na veia peniana de estreptozotocina (60 mg/kg). Quatro dias depois da indução do diabetes, o animal era anestesiado com a associação Hypnorm intramuscular (0,04 mL/100 g de peso corpóreo) e Diazepan intraperitoneal (0,05 mL/100 g de peso corpóreo) colhendo-se amostra sanguínea, da veia da cauda do rato, para dosagem da glicemia antes da laparotomia.

O estômago, o intestino grosso e o delgado eram envolvidos em gaze úmida e afastados para o lado direito do abdome. A veia porta era visualizada e puncionada com Butterfly nº 23 (Venisystems, TM, Abbott, Ireland Ltd.), com agulha de 19,1 mm e diâmetro de 0,5 mm.

As ilhotas suspensas em 0,5 mL de PBS, eram aspiradas em seringa de 1 mL com solução salina e injetadas, via veia porta, no fígado. Após a injeção, a agulha era retirada da veia porta e esponja de material absorvível (Spongostan e Standard 70 x 50 x 10 mm, Ferrosan - Denmark) era colocada no local da punção, comprimindo-se o vaso suavemente por 2 minutos, para evitar o sangramento.

O abdome era, então, fechado em dois planos de sutura contínua usando-se algodão 4-0 para o plano muscular e para a pele.

O animal era avaliado diariamente no pós-operatório, e dosagens de glicemias eram feitas a cada 2 dias.

Separação e purificação das células dendríticas do baço

Ratos fêmeas, da raça Wistar (RT1^U), foram utilizados como doadores de células dendríticas. As células dendríticas purificadas eram extraídas do baço dos animais, segundo modificação do método de Klinkert.

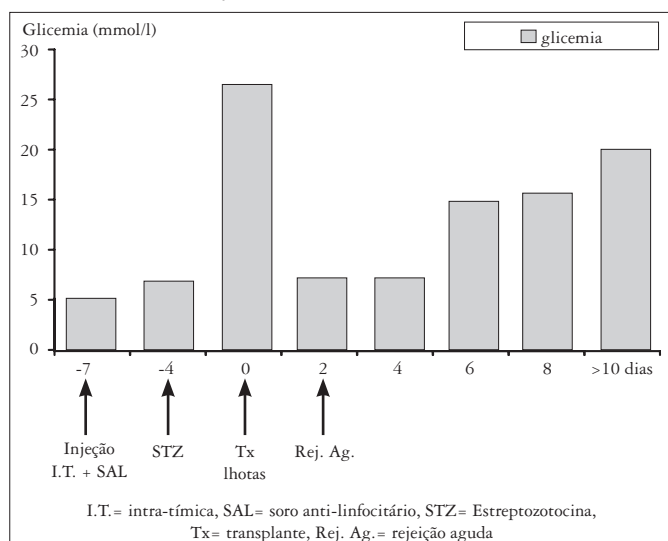
Resumindo, o animal era esplenectomizado e todo tecido gorduroso e conectivo periesplênico era retirado, sendo o órgão colocado em solução de HBSS dentro de recipiente com gelo e transferido para o laboratório. A seguir, o material obtido era macerado e passado suavemente através de peneira de metal, onde os esplenócitos eram coletados e colocados em placa de Petri.

As células mononucleares eram obtidas por centrifugação (1200 rpm por 10 minutos), utilizando-se gradiente com 1 mL de albumina bovina sérica (ABS), (densidade 1,1 g/mL, 330 mOsm) e 4,85 mL de PBS (densidade de 1081 g/mL). A seguir, as células eram recobertas por 0,5 mL de PBS (phosphate-buffered saline) e centrifugadas a 12500 rpm por 10 minutos, em centrífuga do tipo Beckman.

As células aderentes eram removidas, ficando em cultura de tecido por uma noite a 37° C com 5% de CO₂ no ar ambiente. Coletavam-se, cuidadosamente, as células da interface e lavavam-se as mesmas, por duas vezes com HBSS (Hanks balanced salt solution), sendo em seguida, centrifugadas (2300 rpm por 20 minutos), utilizando-se 5 mL da solução de células e misturando-as a 3 mL de metrizamida a 13,68%.

As células dendríticas obtidas da interface das soluções tinham pureza de mais de 90%, estavam contaminadas por alguns linfócitos do tipo B e eram avaliadas por coloração imunistoquímica, utilizando-se anticorpos monoclonais (Figura 1).

GRÁFICO 1 - Grupo controle – (WAG - LEWIS). Injeção intra-tímica de solução de Hanks



Inoculação de células dendríticas

O animal era anestesiado utilizando-se a associação Hypnorm (0,04 mL/100 g de peso corpóreo) e Diazepam (0,05 mL/100 g de peso corpóreo), colocado em posição supina, com sua região cervical sob microscópio cirúrgico (Zeiss, Alemanha, OPMI 6-SH) e com o cirurgião posicionando-se na extremidade cefálica do animal.

Incisão mediana, de 3 cm, na região cervical anterior era realizada, estendendo-se até o 1/3 superior do esterno. Os músculos pré-traqueais eram dissecados e os pólos superiores do timo eram expostos.

O timo era, então, liberado do seu ligamento mediastinal fixo ao esterno. A margem cefálica do esterno e a junção esterno-clavicular

direita eram expostas, utilizando-se eletrocautério para pequenos animais. A seguir, esta junção era seccionada.

Neste momento, um assistente sentado em posição oposta ao cirurgião, afastava o esterno e a clavícula para melhor dissecação dos lobos do timo. Essa mobilização permitia ao cirurgião colocar o 1/3 superior do timo sob visão direta, através da lente do microscópio, utilizando-se 16 vezes de aumento. A injeção celular era realizada utilizando-se seringa Hamilton de 100 µL, com agulha de 25 mm, injetando-se 20 µL da suspensão celular (células dendríticas do baço - suspensão celular contendo 4 x 10⁵ destas células, diluídas em 20 µL de solução de Hanks), em cada um dos lobos do timo.

Para evitar a ruptura capsular do timo, o seu 1/3 superior era afastado cuidadosamente, sendo a agulha introduzida no pólo superior e movendo-se em direção ao pólo inferior, onde a injeção celular era completada. A agulha era retirada cuidadosamente, para minimizar a possibilidade de extravazamento.

O lobo contra-lateral do timo era injetado, utilizando-se a mesma técnica. A junção esterno-clavicular era reconstruída com ponto único, de fio monofilamentar 4-0, sendo os planos musculares e a pele fechados com alçofil 4-0 em sutura contínua.

A inoculação destas células no timo era realizada 7 dias antes do transplante de ilhotas de Langerhans e 3 dias antes da indução do diabetes mellitus.

Injeção intraperitoneal de soro anti-linfocitário

Junto com a inoculação das células dendríticas no timo dos animais, um mililitro de soro antilinfocitário (Accurate Scientific Company, Westbury, EUA), era injetado na fossa ilíaca direita dos animais receptores (Lewis - RT1^L), utilizando-se seringa de insulina de 1 mL e agulha de 12 mm x 0,4 mm, 7 dias antes do transplante de ilhotas de Langerhans e 3 dias antes da indução do diabetes mellitus.

Cirurgia do receptor - transplante de ilhotas de Langerhans

Grupo alogênico - solução de Hanks (Controle) – Oito ratos machos, da raça Lewis (RT1^L), pesando entre 140 e 320 g, foram usados como receptores para o transplante de ilhotas de Langerhans de doadores fêmeas da raça Wistar (RT1^U).

Três dias antes da indução do diabetes, os animais haviam sido submetidos a injeção intra-tímica de 20 µL de solução de Hanks em cada lobo do timo.

O diabetes foi induzido nos ratos por injeção endovenosa na veia peniana de estreptozotocina (60 mg/kg). Quatro dias depois da indução do diabetes, o animal era anestesiado com a associação Hypnorm intramuscular (0,04 mL/100 g de peso corpóreo) e Diazepam intraperitoneal (0,05 mL/100 g de peso corpóreo), colhendo-se amostra sanguínea da veia da cauda do rato, para dosagem da glicemia antes da laparotomia.

O estômago, o intestino delgado e o grosso eram envolvidos em gaze úmida e afastados para o lado direito do abdome. A veia porta era visualizada e puncionada com Butterfly n° 23 (Venisystems, TM, Abbott, Ireland Ltd.), com agulha de 19,1 mm e diâmetro de 0,5 mm.

As ilhotas suspensas em 0,5 mL de PBS eram aspiradas em seringa de 1 mL com solução salina e injetadas no fígado, via veia porta. Após a injeção a agulha era retirada da veia porta e esponja de material absorvível (Spongostan e Standard 70 x 50 x 10 mm, Ferrosan - Dinamarca) era colocada no local da punção, comprimindo-se o vaso suavemente por 2 minutos, para evitar-se o sangramento.

O abdome era, então, fechado em dois planos de sutura contínua, usando-se algofil 4-0 para o plano muscular e para a pele. O animal era avaliado diariamente, no pós-operatório.

Os níveis da glicemia foram medidos antes do transplante e valores acima de 15 mmol/L (em 2 dias consecutivos) confirmavam o estabelecimento do diabetes e/ou rejeição aguda após o transplante das ilhotas.

Grupo alogênico - células dendríticas – Nove ratos, machos, da raça Lewis (RT1^l), pesando entre 170 e 220 g foram usados como receptores de ilhotas de Langerhans de doadores fêmeas da raça Wistar (RT1^u).

Três dias antes da indução do diabetes, haviam sido submetidos a injeção intra-tímica de 4×10^5 células dendríticas em 20 µL de solução salina, em cada lobo do timo.

O diabetes era induzido por injeção endovenosa na veia peniana, de estreptozotocina (60 mg/kg). Quatro dias depois desta indução, o animal era anestesiado com a associação Hypnorm intramuscular (0,04 mL/100 g de peso corpóreo) e Diazepam (0,05 mL/100 g de peso corpóreo) colhendo-se uma amostra sanguínea, da veia da cauda do rato, para dosagem da glicemia antes da laparotomia.

O estômago, o intestino delgado e o grosso eram envolvidos em gaze úmida e afastados para o lado direito do abdome. A veia porta era visualizada e puncionada com Butterfly n° 23 (Venisystems TM, Abbott, Ireland Ltd.), com agulha de 19,1 mm e diâmetro de 0,5 mm. As ilhotas suspensas em 0,5 mL de PBS eram aspiradas em seringa de 1 mL com solução salina e injetadas, via veia porta, no fígado. Após a injeção, a agulha era retirada da veia porta e esponja de material absorvível (Spongostan e Standard 70 x 50 x 10 mm, Ferrosan - Dinamarca) era colocada no local da punção, comprimindo-se o vaso suavemente por 2 minutos, para evitar o sangramento.

O abdome era, então, fechado em dois planos de sutura contínua, usando-se algofil 4-0 para o plano muscular e a pele. O animal era avaliado diariamente, no pós-operatório.

Os níveis de glicemia foram medidos antes do transplante e valores acima de 15 mmol/L (em 2 dias consecutivos), confirmavam o estabelecimento do diabetes e/ou rejeição aguda após o transplante das ilhotas.

Análise estatística

Utilizou-se o teste, não-paramétrico, de Mann-Whitney na comparação entre as glicemias antes e depois do transplante de ilhotas de Langerhans dos seguintes grupos: controle (solução de Hanks) x (células dendríticas). Para todo o estudo foi considerado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Grupo Alogênico - (Wag-Lewis) – Controle-solução de Hanks

Cirurgia do doador – Com o método de purificação e separação das ilhotas de Langerhans obteve-se $3637 \pm 783,3$ ilhotas com pureza de $85,12 \pm 3,52\%$ (Tabela 1).

Cirurgia do receptor – A dose de estreptozotocina utilizada para a indução do diabetes mellitus, nos animais deste grupo, foi de $11,51 \pm 3,39$ mg, obtendo-se níveis de glicemia de $26,48 \pm 7,07$ mmol/L (Tabela 1).

TABELA 1 - Grupo controle - transplante de ilhotas de Langerhans (WAG-RT1^u - LEWIS-RT1^l) - Injeção intra-tímica de solução de Hanks

	STZ mg	Glic. dia 4	Peso (g)	Glic. dia 0	Glic. dia 2	Glic. dia 4	Glic. dia 6	Glic. dia 8	Glic. >10	Ilhotas (N°)	Pureza %
rato 1	19,2	7,34	320	31,6	7	8,8	28,4	32,8	28	3880	87
rato 2	8,7	7,98	150	18,3	6,3	4,9	7	12,8	9,7	2440	85
rato 3	11,4	6,89	220	25,8	7,1	5,8	5,4	6,4	29,8	4220	80
rato 4	11,4	7,43	185	35,9	7,3	8,3	15,5	22,7		3520	85
rato 5	12	8,23	200	35,1	8,3	8,7	27,8			2520	87
rato 6	9,6	9,65	140	20,6	7,6	7,5	16,9	13,1	13,1	3740	87
rato 7	8,4	7,57	140	18,8	7	7,4	12,5	15,3	9,7	4560	90
rato 8	11,4	6,99	220	25,8	7,1	5,8	5,4	6,4	29,8	4220	80
média	11,51	6,88	196,8	26,48*	7,21*	7,15	14,86	15,64	20,01*	3637	85,12
SD	3,39	2,78	59,81	7,07	0,57	1,48	9,27	9,39	10,15	783,3	3,52

* diferente significativamente para $P \leq 0,05$

O transplante de $3637 \pm 783,3$ ilhotas de Langerhans no fígado desses animais, normalizou a glicemia que chegou a $7,21 \pm 0,57$ mmol/L no segundo dia de pós-operatório (PO) (diferença significativa com relação ao pré-operatório). Do PO imediato até o 8° dia de PO, a glicemia não se elevou significativamente, porém a partir do 10° dia de PO houve aumento significativo desse parâmetro, o que pode ser compatível com rejeição aguda do enxerto (Tabela 1). A demonstração gráfica desses valores pode ser observada na Figura 1.

O tempo médio de sobrevida das ilhotas transplantadas está na Tabela 5.

TABELA 5 - Sobrevida do alotransplante de ilhotas de Langerhans no fígado de ratos(WAG-RT1^u - LEWIS-RT1^l) diabéticos e imunossuprimidos, 7 dias após a inoculação de células dendríticas no timo

Inoculação timo	n	Dia da rejeição	Tempo médio de sobrevida das ilhotas (dias)
Solução Hanks	8	5,5,5,7,9,9,>60, >60	9
CD** (4×10^5)	9	1,1,1,1,3,3,3,5,5	3

** Células dendríticas

Grupo alogênico - (Wag-Lewis) - Células dendríticas

Cirurgia do doador – Com o método de separação e purificação das ilhotas de Langerhans obteve-se 3268 ± 378 ilhotas com pureza de $87 \pm 4,47\%$ (Tabela 2).

TABELA 2 - Grupo alogênico - transplante de ilhotas de Langerhans (WAG-RT1^u - LEWIS-RT1^l) - Injeção intra-tímica de células dendríticas

	N° células	STZ (mg)	Glic. dia -4	Peso (g)	Glic. dia 0	Glic. dia 2	Glic. dia 4	Glic. dia 6	Glic. dia 8	Glic. Dia >10	Ilhotas N°	Pureza %
rato1	5	8,4	7,89	170	21	11,4	27,2	22,2			3100	90
rato2	4,3	10	7,34	190	33,3	11	29,8	26,8	26,7		3840	90
rato3	2,7	13,2	6,98	220	33,2	6,6	12,5	28,6			3460	90
rato4	2,7	13,2	8,95	220	16,7	5,8	7,4	20,7	28	31,1	2940	85
rato5	5	10,2	6,84	180	33,3	11,7	25,2	29,2	30,1		3000	80
média	3,94**	11	7,60	196	27,5*	9,3*	20,42*	25,5*	28,26*	31,1	3268	87
SD	1,16	2,12	0,85	23,02	8,04	2,85	9,86	3,83	1,71		378,0	4,47

* diferente significativamente para $P \leq 0,05$

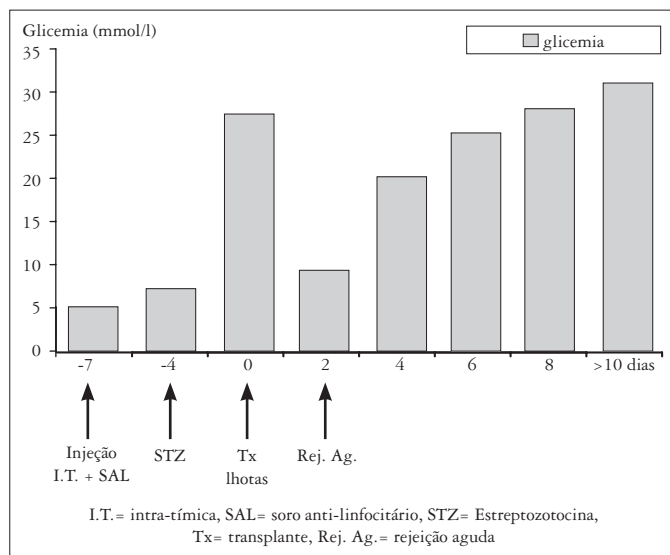
** o valor do número de células é multiplicado por 10⁵

Com o método de separação e purificação das células dendríticas do baço obteve-se $3,34 \times 10^5 \pm 1,16$ células (Tabela 2).

Cirurgia do receptor – A dose de estreptozotocina utilizada para a indução do diabetes mellitus, nos animais deste grupo, foi de $11 \pm 1,16$ mg, obtendo-se níveis de glicemia sérica de $27,5 \pm 8,04$ mmol/L (Tabela 2).

O transplante de 3258 ± 378 ilhotas de Langerhans no fígado desses animais, normalizou a glicemia que chegou a $9,3 \pm 2,85$ mmol/L no 2º PO (diferença significativa com relação ao pré-operatório). Do 4º PO ao 10º PO a glicemia elevou-se significativamente, o que pode ser compatível com quadro de rejeição aguda do enxerto e certamente precoce (Tabela 2). A demonstração gráfica desses valores pode ser observada na Figura 2.

GRÁFICO 2 - Grupo estudo (WAG - LEWIS). Injeção intra-tímica de células dendríticas



O tempo médio de sobrevida das ilhotas transplantadas está na Tabela 5.

“Primary non-function”

Cirurgia do doador – Com o método de separação e purificação das ilhotas de Langerhans obteve-se $3080 \pm 878,3$ ilhotas com pureza de $86,75 \pm 2,36$ % (Tabela 3).

Com o método de separação e purificação das células dendríticas do baço obteve-se $4,12 \times 10^5 \pm 1,04$ células (Tabela 3).

Cirurgia do receptor – A dose de estreptozotocina utilizada para a indução do diabetes mellitus, nos animais deste grupo, foi de $11,6 \pm 2,09$ mg, obtendo-se níveis de glicemia sérica de $26,37 \pm 7,77$ mmol/L (Tabela 3).

O transplante de $3080 \pm 878,3$ ilhotas de Langerhans no fígado desses animais não normalizou a glicemia, que se manteve em níveis superiores a 20 mmol/L por todo o P.O., o que é compatível com o não funcionamento do transplante (Tabela 3). A demonstração gráfica desses valores pode ser observada na Figura 3.

A média e o desvio-padrão do grupo controle (solução de Hanks) comparado ao de células dendríticas, estão representados na Tabela 4.

TABELA 3 - Grupo alogênico - transplante de ilhotas de Langerhans (WAG-RT1u - LEWIS-RT11) - Injeção intra-tímica de células dendríticas - “Primary non-function”

	Nº células	STZ (mg)	Glic. dia -4	Peso (g)	Glic. dia 0	Glic. dia 2	Glic. dia 4	Glic. dia 6	Glic. dia 8	Glic. dia >10	Ilhotas Nº	Pureza %
rato1	2,7	14,4	6,31	240	18,9	19,7	18,3	17,3			2180	90
rato2	4,3	10	7,54	190	22,4	25,1	22,6	28,3	24		4240	87
rato3	4,3	10	7,98	190	36,8	26,3	27,4	33,5			2700	85
rato4	5,2	12	6,87	200	27,4	23,6	27,3	24,1	28,2	22	3200	85
Média	4,12**	11,6	7,17	205	26,37*	23,67*	23,9*	25,4*	26,1*	22*	3080	86,75
SD	1,04	2,09	0,73	23,8	7,77	2,87	4,35	6,84	2,97		878,3	2,36

** o valor do número de células é multiplicado por 10⁵.
* igual para P ≤ 0,005

GRÁFICO 3 - Grupo alogênico - (WAG-RT1u - LEWIS-rt11). Injeção intra-tímica de células dendríticas. “Primary non-function”

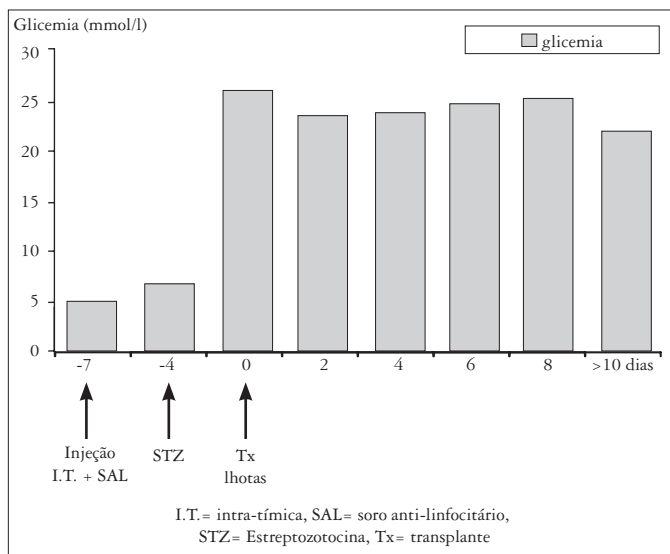


TABELA 4 - Transplante alogênico de ilhotas de Langerhans (WAG-RT1^u - LEWIS-RT1¹). Média e o desvio padrão do grupo controle (solução de Hanks) comparado ao de células dendríticas

	Controle solução Hanks	Células dendríticas
Glicemia dia 0	26,48 ± 7,07	27,5 ± 8,04
Glicemia dia 2	7,21 ± 0,57	9,3 ± 2,85
Glicemia dia 4	7,15 ± 1,48	20,42 ± 9,86 *
Glicemia dia 6	14,86 ± 9,27	25,5 ± 3,83
Glicemia dia 8	15,64 ± 9,39	28,26 ± 1,71
Glicemia dia >10	20,01 ± 10,15	31,1

* diferente significativamente para P ≤ 0,05

DISCUSSÃO

O método de isolamento, purificação e transplante isogênico das ilhotas de Langerhans em ratos, já foi descrito por CHAIB et al.⁽⁴⁾, assim passou-se a investigar o transplante alogênico (entre espécies),

em animais manipulados no timo com injeção de células alogênicas apresentadoras de antígenos (células dendríticas), com intuito de induzir-se tolerância imunológica.

Optou-se pela utilização de ratos da raça Wistar, como doadores de células (ilhotas de Langerhans e células dendríticas), com complexo de histocompatibilidade maior ou haplotipo (RT^{1U}) e ratos da raça Lewis, como receptores, também, com haplotipo conhecido (RT^{1I}) e incompatíveis.

No grupo controle seriam transplantadas as ilhotas de Langerhans, dos ratos da raça Wistar, em ratos da raça Lewis diabéticos (por injeção de estreptozotocina endovenosa) já imunossuprimidos, com dose única de soro antilinfocitário, e manipulados no timo apenas com injeção de solução tampão de Hanks, 7 dias antes do transplante.

Neste grupo injetava-se estreptozotocina na veia peniana dos animais receptores, 4 dias antes do transplante de ilhotas de Langerhans, na dosagem de $11,51 \pm 3,39$ mg. A dose era suficiente para a indução do diabetes, mostrando que a glicemia, no dia do transplante (dia 0), era de $26,48 \pm 7,07$ mmol/L, significativamente superior aos valores pré-operatórios.

O transplante de $3637 \pm 783,3$ ilhotas de Langerhans no fígado, via veia porta, foi eficiente na normalização da glicemia que até o 4º dia de PO, manteve-se igual aos valores pré-operatórios. A partir daí, iniciou-se o processo de provável rejeição aguda que se estabeleceu, definitivamente, a partir do 9º dia de PO, quando a glicemia sérica superou os níveis de 15 mmol/L, chegando no 10º dia de PO a $20,01 \pm 10,15$ mmol/L, o que é, significativamente, superior aos níveis encontrados até o 4º dia de PO, como demonstra a Figura 1.

Sabendo-se que o alotransplante (Wag-Lewis) das ilhotas de Langerhans, em receptores imunossuprimidos com soro antilinfocitário, eram rejeitadas no 9º dia de PO, restava investigar em primeira etapa, se a inoculação de células dendríticas purificadas extraídas do baço dos ratos doadores atuavam como moduladoras da resposta imunológica.

O “rationale” para esta inferência seria que as células apresentadoras de antígenos (células dendríticas), provindas dos animais doadores, quando injetadas no timo dos animais receptores, entrariam em contato direto com este órgão e por conseguinte com os linfócitos T e B, que por certo são os responsáveis pela aceitação ou rejeição dos transplantes de órgãos.

Supondo-se que durante a gênese e maturação, no timo, dos linfócitos T e B, estes reconhecessem as células apresentadoras de antígenos (células dendríticas) como próprias, provavelmente não rejeitariam as ilhotas de Langerhans que, posteriormente, seriam transplantadas e provindas, também, dos mesmos doadores, conseguindo-se com isto a obtenção de um estado de não resposta imunológica ou tolerância ao transplante, como conseguiu POSSELT et al.⁽²²⁾, quando injetou as próprias ilhotas de Langerhans, que seriam transplantadas posteriormente no timo dos animais receptores.

Assim, nesse grupo de estudo os animais foram, 7 dias antes do transplante de ilhotas, inoculados em ambos os lobos do timo com $3,94 \pm 1,16 \times 10^5$ células dendríticas purificadas, ao mesmo tempo em que era administrado, por via intraperitoneal, o soro antilinfocitário.

A injeção de $11 \pm 2,12$ mg de estreptozotocina endovenosa, na veia peniana desses animais, 4 dias antes do transplante das ilhotas de Langerhans, foi eficiente na produção do diabetes, mostrando que a glicemia no dia do transplante (dia 0) era de $27,5 \pm 8,04$ mmol/L, o que é significativamente superior aos valores pré-operatórios.

O transplante de 3268 ± 378 ilhotas no fígado, por via portal, fez com que a glicemia tivesse queda significativa no 2º dia de PO, chegando a níveis de $9,3 \pm 2,85$ mmol/L, no entanto, a partir do 3º dia de PO

observou-se elevação significativa nos níveis da glicemia, estando no 4º dia de PO em $20,42 \pm 9,86$ mmol/L, denotando com isso início de processo de rejeição aguda ao enxerto, como mostra a Figura 2.

Assim, ficou evidente que a sobrevida média dessas ilhotas de Langerhans transplantadas não foi superior a 3 dias e que a inoculação das células dendríticas purificadas no timo desses animais, ao contrário do que se esperava, não proporcionou melhor aceitação do enxerto e sim acelerou o processo de rejeição aguda, fazendo supor que houve, o que se poderia chamar de rejeição aguda precoce.

Vale neste ponto destacar que não se acredita que tenha havido processo de sensibilização do receptor ao enxerto, uma vez que a imunossupressão com soro antilinfocitário em ratos é bastante potente para manter os animais imunodeprimidos por tempo relativamente longo, por depleção dos linfócitos circulantes. Corroborando com este fato, viu-se que no grupo controle a rejeição aguda, em animais também imunodeprimidos, somente se iniciou no 9º dia de PO.

O tratamento com soro antilinfocitário rapidamente depleta os linfócitos T periféricos circulantes, ocorrendo então, profunda linfopenia que persiste por 2-4 semanas⁽¹⁸⁾, ficando a resposta imunológica bastante suprimida, como também, acelera a cinética de células toti-potentes para o timo⁽¹³⁾.

Em ratos, com a injeção única de soro antilinfocitário a população de células T periféricas é transitoriamente (14 dias) depletada a 10% dos níveis normais, quando avaliado por FACS (“fluorescence-activated cell sorter”)⁽²²⁾.

Outros pesquisadores produziram linfopenia em animais tratados com soro antilinfocitário⁽³²⁾.

SACHS et al.⁽²⁵⁾ mostraram que em ratos tratados por soro antilinfocitário produzido em coelho, por via intraperitoneal, o grau de linfopenia em 24 horas é dose dependente e, ao contrário de outros, esses autores não acharam perda da efetividade do soro em períodos longos de administração deste imunossupressor.

Nem todos os estudos apontam para papel único do soro antilinfocitário no controle da rejeição de transplante. Assim, sabe-se que as células T periféricas não entram no timo⁽²⁸⁾, permitindo que células transplantadas com antígenos estranhos sobrevivam em ambiente relativamente protegido da vigilância imunitária.

Outros experimentos⁽¹⁾, mostraram que as células T maduras inativadas, quando ativadas, não têm capacidade de migrar para o timo, do mesmo modo que a inoculação de células sanguíneas estranhas no timo evitaram a interação de antígenos do doador com as células T periféricas circulantes maduras⁽²¹⁾, prevenindo assim, a sua ativação. Isto permite aos tímócitos maduros reconhecer antígenos estranhos sem rejeição.

Além do mais, os achados de que o pré-tratamento com pequenas doses de imunossupressão é irrelevante para alcançar-se a subsequente tolerância, sugerem que as lesões das células tímicas, induzidas por imunossupressão⁽²⁷⁾, não são os mecanismos responsáveis pela sobrevida dos transplantes em estudos prévios⁽²³⁾.

Quatro dos nove animais deste grupo (células dendríticas) apresentaram “primary non-function” ou seja, o mal funcionamento primário do enxerto. Este fato ocorreu apesar dos cuidados técnicos na separação e preparação das ilhotas, e assim os animais após serem transplantados com $3080 \pm 878,3$ ilhotas, não conseguiram normalizar a glicemia sérica que se manteve em patamares elevados, não mostrando diferença significativa entre os valores pré e pós-transplante como mostra a Figura 3.

Alguns fatores estão envolvidos na síndrome do não funcionamento adequado do transplante de ilhotas de Langerhans. Os principais são: má perfusão do órgão quando do momento da realização da cirurgia do doador,

o não resfriamento do pâncreas logo após a injeção da colagenase, a demora no processo de digestão pancreática, pela colagenase, no laboratório, aumentando, com isto, o tempo de isquemia fria das ilhotas de Langerhans, e por fim, o implante não adequado das ilhotas no tecido hepático.

Os mecanismos celulares envolvidos na rejeição aguda dos alotransplantes são complexos e o papel preciso das várias subpopulações de células T nesse processo, continua obscuro.

Muitos estudos têm mostrado que as células CD+4, são os pivôs da indução da rejeição⁽¹⁰⁾, enquanto outros estudos têm, também, identificado a ativação dependente das células CD+4 das células T citotóxicas (CD+8) como importante mecanismo efetor na rejeição dos alotransplantes com complexo de histocompatibilidade, classe I e classe II, incompatíveis⁽¹⁵⁾.

A expressão celular do antígeno do complexo de histocompatibilidade maior classe II é considerado como envolvido na iniciação ou na perpetuação da destruição mediada imunologicamente, que ocorre em doenças auto-imunes⁽²⁾ e na rejeição de alotransplantes⁽¹⁹⁾.

No transplante de ilhotas um decréscimo de suas células, que expressam antígenos classe II, está correlacionado com o prolongamento da sobrevida dos enxertos⁽⁶⁾.

Dentro das ilhotas de Langerhans, células classe II positivas residem com células endócrinas que, normalmente, não expressam antígenos classe II e sim, apenas pequenos níveis de antígenos classe I⁽¹¹⁾.

Essas células classe II positivas “leucócitos passageiros”, células dendríticas ou apresentadoras de antígenos são necessárias para a apresentação do antígeno para o hospedeiro ou na produção de um co-estimulador (citocina primária ou secundária) para ativação do processo do antígeno pelo hospedeiro que resultaria na iniciação da rejeição do enxerto⁽¹¹⁾.

As ilhotas podem ser preparadas de pâncreas de ratos neonatos que estão sem células apresentadoras de antígenos, como também transplantadas contra grande diferenças de antígenos de histocompatibilidade, sem rejeição ou imunossupressão⁽¹¹⁾.

A rejeição de aloilhotas de Langerhans isoladas mostra número de achados que são típicos da rejeição de órgãos vascularizados, como também de outros alotransplantes como: controle genético⁽²⁰⁾, latência⁽²⁶⁾, dependência da dosagem⁽⁸⁾, expressão sistêmica⁽⁷⁾ e dependência da célula T⁽²⁶⁾.

Em conclusão, a inoculação de células alogênicas apresentadoras de antígenos (células dendríticas) no timo de ratos imunossuprimidos e diabéticos, antes do alotransplante de ilhotas de Langerhans no fígado, ao contrário de inibir a reação do receptor contra o enxerto, prolongando a sobrevida média das ilhotas e, possivelmente, levando ao estado de tolerância imunológica, induziu à aceleração do processo de rejeição aguda.

Chaib E, Papalois A, Brons IGM, Calne RY. Alogenic islet transplantation on the rat liver after alogenic dendritic cells injection in the thymus. *Arq Gastroenterol* 2005;42(1):41-9.

ABSTRACT – Background - The major indication for pancreas or islet transplantation is diabetes mellitus type I. This process has to supply the insulin necessity keeping glucose under control. **Aim** - We studied alogenic islet transplantation on the rat liver, Wistar (RT1^u) to Lewis (RT1^l) as a recipient. Control group (n = 8) and dendritic cell group (n = 9) respectively with injection of Hanks solution and dendritic cells in the thymus before islet transplantation. **Material and Methods** - With the method of isolation and purification of the islets we obtained both in the control group 3637 ± 783,3 islets with purity of 85 ± 3,52% and dendritic cell group 3268 ± 378 islets with purity of 87 ± 4,47%. The dendritic cells were retrieved from the spleen and we obtained 3,34 x 10⁵ ± 1,16 cells. Diabetes was induced by i.v. streptozotocin. **Results** - Control group the transplantation of 3637 ± 783,3 islets in the rat liver normalized glucose test, 7,21 ± 0,57 mmol/L in the second post-operative day. Acute rejection came in the 10 postoperative day with significantly increase of glucose test. Dendritic cell group, the transplantation of 3258 ± 378 islets in the rat liver, normalized the glucose test was 9,3 ± 2,85 mmol/L in the second postoperative day. From the 4th postoperative day to 10th postoperative day the glucose test increase significantly showing an early acute rejection. **Conclusion** - The injection of dendritic cells in the thymus before alogenic islet transplantation in the rat liver lead to an early acute rejection.

HEADINGS – Islets of Langerhans transplantation. Transplantation, homologous. Rats.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agus DB, Surch CD, Sprent J. Reentry of T cells to the adult thymus is restricted to activated T cells. *J Exp Med* 1991;173:1039-42.
2. Botazzo GF, Pujol-Borrell R, Hanafusa T, Feldmann M. Hypothesis: role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in the induction of endocrine immunity. *Lancet* 1983;2:1115.
3. Brent L, Sells RA. Organ transplantation: current clinical and immunological concepts. London: Baillière Tindall; 1989.
4. Chaib E, Papalois A, Brons IGM, Calne RY. Transplante isogênico de ilhotas de Langerhans no fígado de ratos. (Metodologia para separação e purificação das ilhotas de Langerhans). *Arq Gastroenterol* 2000;37:44-51.
5. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 1986;314:1360-8.
6. Faustmann DL, Hauptfeld V, Lacy PE, Davie J. Prolongation of immune islet allograft survival by pretreatment of islet with antibody directed to Ia determinants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:5156-9.
7. Gray DWR, Morris PJ. Developments in isolated pancreatic islet transplantation. *Transplantation* 1987;43:321-31.
8. Gotoh M, Maki T, Satomi S, Porter J, Monaco AP. Immunological characteristics of purified pancreatic islet grafts. *Transplantation* 1986;42:387-90.
9. Harris MJ, Hanaman RF. Diabetes in America. Bethesda, MD: NIH Publ.; 1985. p.85-1468.
10. Heidecke CD, Kupiec-Weglinskiuw, Lear PA, Abbud-Filho M, Araujo JL, Arameda D, Strow TB, Tilney NL. Interactions between T lymphocytes subsets supported by interleukin-2 rich lymphokines produce acute rejection of vascularized cardiac allografts in T cell deprived rats. *J Immunol* 1984;133:582-88.

11. Kover K, Hegre O, Popiela H, Biggs T, Moore WV. Cross-reactivity of organs in allograft rejection. Comparison of effect of thyroid allografts on established islet allografts. *Diabetes* 1987;36:1268-70.
12. Krolewski AS, Warram JR, Rand LI. Risk of proliferative diabetic retinopathy in type I diabetes, a 40 year follow-up study. *Diabetes Care* 1986;9:443.
13. Lance EM, Medawar PB, Taub RN. Antilymphocyte serum. *Adv Immunol* 1973;17:1-92.
14. London NJ. Clinical studies of human islet transplantation. *Ann R Coll Surg Engl* 1995;77:263.
15. Lowry RP, Forbes RDC, Balckburn JH, Marghesco DM. Immune mechanisms in organ allograft rejection V. Pivotal role of cytotoxic-suppressor T cell subset in the rejection of heart grafts bearing isolated class I disparities in the inbred rat. *Transplantation* 1985;40:545-50.
16. Mauer SM, Sutherland DER, Steffes MW. Pancreatic islet transplantation: effects on the glomerular lesions of experimental diabetes in the rat. *Diabetes* 1974;23:748.
17. Miranda MP. Estado atual e experiência clínica inicial com transplante de pâncreas [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1997.
18. Monaco AP, Wood ML, Gray JG, Russel PS. Studies on heterologous antilymphocyte serum in mice. II. Effect on the immune response. *J Immunol* 1966;96:229.
19. Morris PJ, Ting A. Studies of HLA-DR with relevance to renal transplantation. *Immunol Rev* 1982;66:103-31.
20. Morrow CE, Sutherland DE, Steffes MW, Najarian JS, Bach FH. H2 antigen-class: effect on mouse islet allograft rejection. *Science* 1983;219:1337-9.
21. Perico N, Rossini M, Imberti O, Remuzzi G. Evidence of the central role of the thymus in the induction of donor-specific unresponsiveness to a renal allograft. *Transplantation* 1992;54:943-5.
22. Posselt AM, Barker CF, Tomaszewski JE, Markmann JF, Chati Ma, Naji A. Induction of donor-specific unresponsiveness by intrathymic islet transplantation. *Science* 1990;249:1293-5.
23. Remuzzi G, Rossini M, Imberti O, Perico N. Kidney graft survival in rats without immunosuppression after intrathymic glomerular transplantation. *Lancet* 1991;337:750.
24. Ricordi C, Tsakis AG, Carrol PB, Zeng Y, Rilo HLR, Alejandro R, Shapiro R, Fung JJ, Demetris AJ, Mintz DH, Starzl TE. Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. *Transplantation* 1992;53:407.
25. Sachs JH, Filipone DR, Hume DM. Studies of immune destruction of lymphoid tissue. I. Lymphocytotoxic effect of rabbit anti-rat lymphocyte antiserum. *Transplantation* 1964;56:1197-201.
26. Shizuru JA, Gregory AK, Chao CTB, Fathman CG. Islet allograft survival after a single course of treatment of recipient with antibody to L3T4. *Science* 1987;237:278-80.
27. Smith CA, Willians GT, Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JJT. Antibodies to CD3/Tcell receptor complex induce death by apoptosis in immune T cells in thymic cultures. *Nature* 1989;337:181-4.
28. Stutman O. Intrathymic and extrathymic T cell maturation. *Immunol Rev* 1978;42:138.
29. Sutherland DER, Najarian JS, Greenberg BZ, Senske BJ, Anderson GE, Francis RS, Goetz FC. Hormonal and metabolic effects of an endocrine graft: vascularized segmental transplantation of the pancreas in insulin-dependent patients. *Ann Intern Med* 1981;95:537.
30. Tchobroutrky G. Relation of diabetic control to development of microvascular complications. *Diabetes* 1978;15:143.
31. West KM. Epidemiology of diabetes and its vascular lesions. New York: Elsevier; 1978.
32. Woodruff MFA, Anderson N. Effect of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula and administration of anti-lymphocyte serum on the survival of skin homografts in rats. *Nature* 1963;200:702.

Recebido em 5/9/2003.
Aprovado em 18/2/2004.