

# ALOTRANSPLANTE DE ILHOTAS DE LANGERHANS NO FÍGADO DE RATOS SUBMETIDOS A MANIPULAÇÃO TÍMICA COM CÉLULAS NÃO-PARENQUIMATOSAS

Eleazar CHAIB, Apostolos PAPALOIS, Ingrid G. M. BRONS and 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** - Estudar o alotransplante de ilhotas de Langerhans no fígado de ratos Lewis (RT1<sup>l</sup>), tendo como doadores de ilhotas ratos Wistar (RT1<sup>u</sup>). No grupo controle (n = 8) injetava-se, no timo, solução de Hanks e no grupo de estudo (n = 8), células não-parenquimatosas hepáticas. **Material e métodos** - No grupo controle com o método de separação e purificação das ilhotas de Langerhans obteve-se 3.637 ± 783,3 ilhotas com pureza de 85 ± 3,52%. No grupo de estudo obteve-se 3.270 ± 770 ilhotas de Langerhans com pureza de 84,25 ± 2,76% e com o método de isolamento e purificação das células não-parenquimatosas hepáticas obteve-se 2 x 10<sup>6</sup> células. **Resultados** - No grupo controle, o transplante de 3.637 ± 783,3 ilhotas de Langerhans no fígado, quase normalizou a glicemia que chegou a 17,95 ± 5,33 mmol/L no 2º dia do pós-operatório (diferença significativa com relação ao pré-operatório). Do pós-operatório imediato até o 8º dia do pós-operatório a glicemia não se elevou significativamente, porém a partir do 10º dia do pós-operatório houve aumento significativo deste parâmetro, o que pode ser compatível com rejeição aguda do enxerto. No grupo de estudo, o transplante de 3.270 ± 770 ilhotas de Langerhans no fígado, quase normalizou a glicemia que chegou a 17,95 ± 5,33 mmol/L no 2º dias do 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 não-parenquimatosas hepáticas) 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 ao processo de rejeição aguda precoce.

**DESCRIPTORIOS** – Transplante das ilhotas pancreáticas. Transplante homólogo. Fígado. Diabetes mellitus tipo I. Células apresentadoras de antígenos. Ratos.

## INTRODUÇÃO

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<sup>(7)</sup>.

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<sup>(20)</sup>.

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

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

de Langerhans: a grande atração desta modalidade terapêutica é de que as ilhotas 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<sup>(4,5)</sup>.

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<sup>(18,24)</sup>. Por outro lado, o transplante de ilhotas de Langerhans vem enfrentando dificuldades não só na rejeição imunológica, como também problemas anatômicos específicos<sup>(26)</sup>.

Um dos principais problemas da perda do enxerto é a rejeição aguda. O grande passo para a sua solução foi dado por POSSELT et al.<sup>(23)</sup>, que obtiveram pela primeira vez a tolerância ao alotransplante das ilhotas de Langerhans em ratos, inoculando no timo destes animais as mesmas ilhotas transplantadas em outro órgão, associando dose única de soro anti-linfocitário, por via sistêmica.

Recentemente o presente grupo apresentou os efeitos da inoculação de células dendríticas (apresentadoras de antígenos) no timo de ratos submetidos ao alotransplante de ilhotas de Langerhans no fígado, não conseguindo aumento na tolerância imunológica, mas aceleração no processo de rejeição aguda<sup>(6)</sup>.

Nesta mesma linha de investigação, trabalhando com células apresentadoras de antígenos, propõe-se ao estudo dos efeitos da inoculação de células não-parenquimatosas no timo de ratos submetidos ao alotransplante de ilhotas de Langerhans no fígado.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em 64 *Rattus albinus*, sendo 48 doadores fêmeas, da raça Wistar (RT1<sup>U</sup>) e 16 receptores machos, da raça Lewis (RT1<sup>L</sup>). Água e dieta foram administrados ad libitum.

Para a separação das ilhotas de Langerhans, foram utilizados ratos fêmeas, Wistar (RT1<sup>U</sup>), de peso corpóreo entre 120 e 210 g. Para receptores das ilhotas de Langerhans utilizaram-se ratos machos, Lewis (RT1<sup>L</sup>), com peso corpóreo entre 160 e 230 g, em que o diabetes foi induzido por injeção, na veia peniana, de estreptozotocina.

A digestão do pâncreas, o método de purificação de ilhotas de Langerhans, sua separação, contagem e identificação bem como a indução do diabetes mellitus já foram descritos previamente<sup>(5)</sup>.

Os procedimentos cirúrgicos para retirada do pâncreas do doador bem como para o transplante de ilhotas de Langerhans no receptor também foram descritos previamente<sup>(6)</sup>.

### Separação e purificação das células não-parenquimatosas do fígado

Ratos fêmeas, da raça Wistar (RT1<sup>U</sup>), foram utilizados como doadores de células não-parenquimatosas. O método utilizado para separação e purificação dessas células, foi o descrito por KROKOS et al.<sup>(16)</sup> e está assim resumido:

Após anestesia por inalação com éter etílico, o animal era submetido a laparotomia mediana, sendo a veia porta e a veia cava infra e supra-hepática expostas. Canulava-se a veia porta com cateter de polietileno fino, sendo a veia cava infra-hepática ligada com fio de algodão 4-0.

Concomitantemente à secção da veia cava supra-hepática, por onde o animal era exsanguinado, injetava-se na veia porta, de 4 a 6 mL de solução de collagenase resfriada, sendo observada distensão da cápsula do fígado e mudança da coloração do parênquima hepático.

O fígado era, então, retirado do animal doador e colocado em frasco que continha a mesma solução de collagenase, sendo então, transportado para o laboratório, onde era macerado e transformado em suspensão, após a digestão pela collagenase.

O sobrenadante obtido dessa suspensão era rico em células não-parenquimatosas. Um g do sedimento dessa suspensão era purificado por centrifugação, num gradiente de 16% de metrizamide, na rotação de 2.670 por grama durante 45 minutos à temperatura de 4° C.

As células da interface entre as soluções eram removidas e lavadas por várias vezes, com solução de Hanks;  $1 \times 10^6$  células não-parenquimatosas purificadas eram colocadas em seringa totalizando-se volume de 20  $\mu$ L, para posterior injeção no timo dos animais receptores.

Os tipos celulares contidos nessa suspensão de células apresentadoras de antígenos (células não-parenquimatosas) eram avaliados por coloração imunoistoquímica usando-se anticorpos monoclonais, como descrito por BARCLAY<sup>(2)</sup>.

Mais de 70% das células eram positivas para ED2 e 3 (anticorpos monoclonais específicos para células de Kupffer) e diferentes tipos de macrófagos em ratos.

Assim, essa suspensão de células não-parenquimatosas continha, aproximadamente, 60% de células de Kupffer, 30% de macrófagos, alguns linfócitos T e B, células endoteliais e raros hepatócitos.

### Inoculação de células não-parenquimatosas

Após a separação e purificação das células não-parenquimatosas do fígado dos animais doadores (WAG - RT1<sup>U</sup>), suspensão celular contendo  $2 \times 10^6$  células, diluídas em 20  $\mu$ L de solução de Hanks, eram injetadas em cada lobo do timo dos animais receptores (Lewis - RT1<sup>L</sup>). Utilizava-se para esse procedimento seringa de insulina e agulha de 0,33 mm x 13 mm B-D (EUA). A inoculação dessas células no timo era realizada 7 dias antes do transplante de ilhotas de Langerhans e 3 dias antes da indução do diabetes mellitus.

Ao final deste ato, 1 mL de soro anti-linfocitário era injetado na cavidade peritoneal.

### Injeção intraperitoneal de soro anti-linfocitário

Junto à inoculação das células não-parenquimatosas no timo dos animais, 1 mL de soro anti-linfocitário (Accurate Scientific Company, Westbury, EUA), era injetado na fossa ilíaca direita dos animais receptores (Lewis - RT1<sup>L</sup>), 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.

**Grupo alogênico - solução de Hanks (Controle)**

Oito ratos machos, da raça Lewis (RT1<sup>b</sup>), pesando entre 140 e 320 gramas, foram usados como receptores para o transplante de ilhotas de Langerhans de doadores fêmeas da raça Wistar (RT1<sup>u</sup>).

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 Diazepan intraperitoneal (0,05 mL/100 g de peso corpóreo), colhendo-se amostra sanguínea da veia da cauda do rato, para a 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 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-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 acompanhado 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 não-parenquimatosas**

Oito ratos machos da raça Lewis (RT1<sup>b</sup>) pesando entre 160 e 230 g foram usados como receptores de ilhotas de Langerhans de doadores fêmeas da raça Wistar (RT1<sup>u</sup>).

Três dias antes da indução do diabetes, haviam sido submetidos a injeção intra-tímica de 2 x 10<sup>6</sup> células não-parenquimatosas 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 da indução, o animal era anestesiado com a associação Hypnorm intramuscular (0,04 mL/100 g de peso corpóreo) e Diazepan (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 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-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 acompanhado 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 de 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 não-parenquimatosas). 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 3.637 ± 783,3 ilhotas com pureza de 85,12 ± 3,52% (Tabela 1).

**TABELA 1** – Grupo controle - transplante de ilhotas de Langerhans (WAG-RT1<sup>u</sup>-Lewis-RT1<sup>b</sup>) - 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

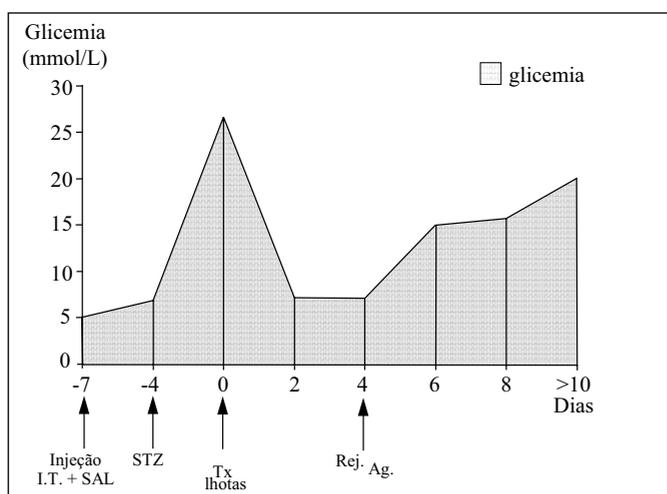
\* diferente significativamente para P<0,05

**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 sérica de  $26,48 \pm 7,07$  mmol/L (Tabela 1).

O transplante de  $3\ 637 \pm 783,3$  ilhotas de Langerhans no fígado destes animais, normalizou a glicemia que chegou a  $7,21 \pm 0,57$  mmol/L no 2º dia do pós-operatório (diferença significativa com relação ao pré-operatório). Do pós-operatório (P.O.) imediato até o 8º dia P.O., a glicemia não se elevou significativamente, porém a partir do 10º dia P.O. houve aumento significativo deste parâmetro, o que pode ser compatível com rejeição aguda do enxerto (Tabela 1). A demonstração gráfica destes valores pode ser observada na (Figura 1).

O tempo médio de sobrevida das ilhotas transplantadas está na Tabela 2.



I.T.= intra-tímica; SAL= Soro anti-infecidário; STZ= Estreptozotocina; Tx= transplante; Rg. Ag.= rejeição aguda

**FIGURA 1** – Grupo controle – Alotransplante de ilhotas de Langerhans em ratos (WAG-Lewis). Injeção intra-tímica de solução de Hanks

**TABELA 2** – Sobrevida do alotransplante de ilhotas de Langerhans no fígado de ratos (WAG-RT1<sup>u</sup>-Lewis-RT1<sup>l</sup>) diabéticos e imunossuprimidos, 7 dias após a inoculação de células não-parenquimatosas no timo

Inoculação timo	nº de ratos	Dia da rejeição	Tempo médio de sobrevida das ilhotas (dias)
Solução Hanks	8	5,5,5,7,9,9,>60,>60	9
CNP* (2 x 10 <sup>6</sup> )	8	Tempo médio de sobrevida das ilhotas (dias)	2

\*Células não-parenquimatosas

**Grupo alogênico - (WAG-Lewis) - Células não-parenquimatosas**

**Cirurgia do doador**

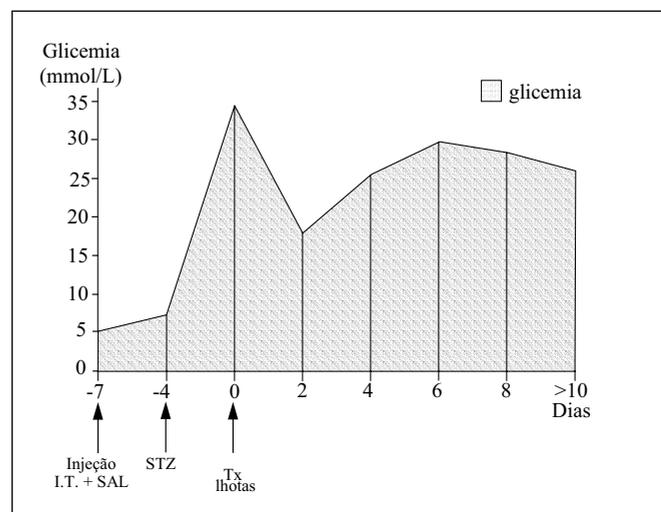
Com o método de separação e purificação das ilhotas de Langerhans obteve-se  $3\ 270 \pm 770$  ilhotas com pureza de  $84,25 \pm 2,76\%$  (Tabela 3).

Com o método de separação e purificação das células não-parenquimatosas do fígado obteve-se  $2 \times 10^6$  células (Tabela 3).

**Cirurgia do receptor**

A dose de estreptozotocina utilizada para a indução do diabetes mellitus nos animais deste grupo, foi de  $12,06 \pm 1,86$  mg, obtendo-se níveis de glicemia sérica de  $34,72 \pm 7,04$  mmol/L (Tabela 3).

O transplante de  $3.270 \pm 770$  ilhotas de Langerhans no fígado destes animais, reduziu significativamente a glicemia que chegou a  $17,95 \pm 5,33$  mmol/L no 2º dia P.O., por outro lado houve aumento significativo de seus níveis nos dias subseqüentes, o que é compatível com o quadro de rejeição aguda e certamente precoce (Tabela 3). A demonstração gráfica destes valores pode ser observada na Figura 2.



I.T.= intra-tímica; SAL= Soro anti-infecidário; STZ= Estreptozotocina; Tx= Transplante

**FIGURA 2** – Grupo alogênico. Transplante de ilhotas de Langerhans (WAG-Lewis). Injeção intra-tímica de células não-parenquimatosas

**TABELA 3** – Grupo alogênico - transplante de ilhotas de Langerhans (WAG-RT1<sup>u</sup>-Lewis-RT1<sup>l</sup>) - Injeção intra-tímica de células não-parenquimatosas

	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 %
rato 1	2	13,5	8,97	230	41,2	17,7	23,6	19,6	29,9		3040	85
rato 2	2	12,6	7,98	230	31,9	19,3	21,4	28,2	28,1		2880	80
rato 3	2	13,8	6,43	230	43,4	23,5	33,7	34,5			4060	87
rato 4	2	13,8	6,12	230	29,9	17,3	25,7	35,2			3760	85
rato 5	2	9,6	7,54	160	36,7	14,8	24,3	26	22,5	29,1	2960	87
rato 6	2	10	8,06	190	32,9	20,7	23,9	31,6	34	30,8	2880	85
rato 7	2	10	6,87	190	39,9	23,3	30,2	36,5	28,8		2100	80
rato 8	2	13,2	7,34	220	21,9	7	22,8	27,1	28	23,3	4480	85
Média	2**	12,06	7,41	210	34,72*	17,95*	25,7*	29,83*	28,5*	26,2*	3270	84,25
SD	0	1,86	0,93	26,72	7,04	5,33	4,15	5,7	4,14	4,1	770	2,76

\* diferente significativamente para P<0,05

\*\*o valor do número de células é multiplicado por 106

A média e o desvio padrão das glicemias do grupo controle (solução de Hanks) comparados ao de células não-parenquimatosas, estão representados na Tabela 4.

**TABELA 4** – Transplante alogênico de ilhotas de Langerhans (WAG-RT1u-Lewis-RT1<sup>l</sup>). Média e o desvio padrão dos grupos: controle (solução de Hanks) comparados ao de células não-parenquimatosas

	Controle solução Hanks	Células não-parenquimatosas
Glicemia dia 0	26,48 ± 7,07	34,72 ± 7,04*
Glicemia dia 2	7,21 ± 0,57	17,95 ± 5,33*
Glicemia dia 4	7,15 ± 1,48	25,7 ± 4,15 *
Glicemia dia 6	14,86 ± 9,27	29,83 ± 5,7*
Glicemia dia 8	15,64 ± 9,39	28,5 ± 4,14*
Glicemia dia >10	20,01 ± 10,15	26,2 ± 4,1*

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

## DISCUSSÃO

O método de isolamento, purificação e transplante isogênico das ilhotas de Langerhans em ratos já fora descrito<sup>(5)</sup>; assim, passou-se à investigar o transplante alogênico (entre espécies), em animais manipulados no timo com injeção de células alogênicas apresentadoras de antígenos como as células dendríticas extraídas do baço<sup>(6)</sup> e no presente estudo, com células não-parenquimatosas hepáticas 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 não-parenquimatosas hepáticas), com complexo de histocompatibilidade maior ou haplotipo (RT1<sup>u</sup>) e ratos da raça Lewis, como receptores, também, com haplotipo conhecido (RT1<sup>l</sup>) 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 anti-linfocitário, 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 ± 3,39 mg. A dose era suficiente para a indução do diabetes, mostrando que a glicemia sérica, no dia do transplante (dia 0), era de 26,48 ± 7,07 mmol/L, significativamente superior aos valores pré-operatórios.

O transplante de 3.637 ± 783,3 ilhotas de Langerhans no fígado, via veia porta, foi eficiente para a normalização da glicemia que até o 4º dia P.O., 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 P.O., quando a glicemia sérica superou os níveis de 15 mmol/L, chegando no 10º P.O. à 20,01 ± 10,15 mmol/L, o que é, significativamente superior aos níveis encontrados até o 4º dia P.O., como demonstra a Figura 1.

Sabendo-se que o alotransplante (WAG-Lewis) das ilhotas de Langerhans, em receptores imunossuprimidos com soro anti-linfocitário, eram rejeitadas no 9º P.O., restava investigar se a inoculação de células não-parenquimatosas, extraídas do fígado dos ratos doadores, atuariam como moduladoras da resposta

imunológica, uma vez que em estudo anterior verificou-se que células dendríticas extraídas do baço aceleraram a rejeição ao transplante de ilhotas de Langerhans no fígado de ratos, ao invés de induzir a tolerância imunológica<sup>(6)</sup>.

O rationale para esta inferência seria que as células apresentadoras de antígenos (células não-parenquimatosas hepáticas), 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 não-parenquimatosas hepáticas) como próprias, provavelmente não rejeitariam as ilhotas de Langerhans que, posteriormente, seriam transplantadas, 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.<sup>(23)</sup>, quando injetou as próprias ilhotas de Langerhans, que seriam transplantadas posteriormente, no timo dos animais receptores.

O presente grupo de estudo baseou-se no alotransplante de ilhotas de Langerhans com inoculação tímica de células não-parenquimatosas.

Uma semana antes do alotransplante das ilhotas os animais receberam, em cada lobo do timo, 2 x 10<sup>6</sup> células não-parenquimatosas purificadas, ao mesmo tempo em que era administrado, intraperitonealmente, o soro anti-linfocitário.

A injeção de 12,06 ± 1,86 mg de estreptozotocina na veia peniana dos animais, 4 dias antes do alotransplante, elevou a glicemia sérica a níveis de 34,72 ± 7,04 mmol/L, o que é significativamente superior aos níveis pré-operatórios, tornando-os, assim, ratos diabéticos.

O transplante de 3.270 ± 770 ilhotas no fígado, por via portal, fez com que a glicemia sérica tivesse queda significante (17,95 ± 5,33 mmol/L) no 2º dia P.O., porém ainda um pouco acima dos limites da normalidade adotados no presente estudo.

Com isso, pode-se observar que ou a glicemia sérica após o transplante das ilhotas nunca chegou a níveis inferiores a 15 mmol/L ou os animais iniciaram o processo de rejeição aguda no 1º dia P.O., caracterizando-se com isso, o mesmo fato ocorrido com o grupo de estudo das células dendríticas<sup>(6)</sup> ou seja, rejeição aguda precoce.

O mecanismo celular envolvido na rejeição aguda dos alotransplantes é complexo e o papel preciso das várias subpopulações de células T neste processo, continua obscuro.

Muitos estudos têm mostrado que as células CD+4 são os pivôs da indução da rejeição<sup>(12, 14)</sup>, enquanto outros estudos têm também identificado a ativação dependente das células CD+4 das células T citotóxicas (CD+8) como um importante mecanismo efetor na rejeição dos alotransplantes com complexo de histocompatibilidade, classe I e classe II, incompatíveis<sup>(14, 17, 19)</sup>.

A expressão celular do antígeno do complexo de histocompatibilidade maior classe II é considerada como mecanismo envolvido na iniciação ou na perpetuação da destruição mediada imunologicamente que ocorre em doenças auto-imunes<sup>(3)</sup> e na rejeição de alotransplantes<sup>(21)</sup>.

No transplante de ilhotas, um decréscimo nas células das ilhotas que expressam antígenos classe II está correlacionado com o prolongamento da sobrevivência dos enxertos<sup>(8)</sup>.

Dentro das ilhotas de Langerhans, células classe II positivas residem com células endócrinas que normalmente não expressam antígenos classe II, porém apenas pequenos níveis de antígenos classe I<sup>(13, 15)</sup>.

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<sup>(15)</sup>.

As ilhotas podem ser preparadas de pâncreas de ratos neonatos que estão sem células apresentadoras de antígenos como também transplantadas contra grandes diferenças de antígenos de histocompatibilidade, sem rejeição ou imunossupressão<sup>(13, 15)</sup>.

A rejeição de alo-ilhotas de Langerhans isoladas mostra um número de achados que são típicos da rejeição de órgãos vascularizados, como também de outros alotransplantes como: controle genético<sup>(22)</sup>, latência<sup>(9, 10, 11, 25)</sup>, dependência da dosagem<sup>(9, 11)</sup>, expressão sistêmica<sup>(10)</sup>, dependência da célula T<sup>(25)</sup>.

Descarta-se a possibilidade de “primary non-function” neste grupo (células não-parenquimatosas) visto que houve queda significativa dos valores glicêmicos antes e depois do alotransplante de ilhotas. Outro fator que poderia colaborar para explicação deste fato é que quando se compara a glicemia no dia do alotransplante de ilhotas (dia 0) entre os três grupos (controle x células não-parenquimatosas), verifica-se que a do grupo de células não-parenquimatosas é, em média,

a mais elevada que os demais sendo esta diferença estatisticamente significativa. Portanto, a queda da glicemia foi importante, porém como estes animais partiram de um patamar mais elevado, talvez o número de ilhotas transplantadas tenha sido insuficiente para normalizar níveis glicêmicos tão elevados.

O tempo médio de sobrevivência das ilhotas de Langerhans, neste grupo, não foi superior a 2 dias, denotando também que a inoculação de células não-parenquimatosas no timo destes animais, ao contrário de possibilitar a melhor aceitação do enxerto como se supunha inicialmente, levou a aceleração do processo de rejeição aguda por estes animais.

Para se ter uma idéia do conjunto dos grupos de alotransplante de ilhotas de Langerhans estudados e de suas respectivas alterações glicêmicas pode-se observar a Figura 2.

Por fim, apesar deste estudo não ter obtido a indução de tolerância nos alotransplantes de ilhotas de Langerhans como está demonstrado acima, deve-se por questão de justiça e homenagem histórica mencionar que o fenômeno da tolerância imunológica foi descrito, pela primeira vez, por BILLINGHAM et al.<sup>(1)</sup>, sustentando a promessa que os transplantes clínicos poderiam ser feitos sem o uso da imunossupressão.

Deste modo, após a observação dos resultados deste estudo, fica aberta esta linha de pesquisa, na área de imuno-modulação de transplantes de ilhotas de Langerhans, experimental e clínico, na esperança de que futuros pesquisadores dediquem-se a esta causa, o que por certo, em futuro próximo, contribuirá de modo definitivo para o controle do diabetes mellitus, poupando-se, com isso, o sofrimento e a dor de milhões de pacientes afetados por esta doença, em todo o mundo.

Chaib E, Papalois A, Brons IGM, Calne RY. Allogenic islet transplantation on the rat liver after allogenic nonparenchymal cells injection in the thymus. *Arq Gastroenterol*. 2006;43(4):321-7.

**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 allogenic islet transplantation on the rat liver, Wistar (RT1<sup>u</sup>) to Lewis (RT1<sup>l</sup>) as a recipient. Control group (n = 8) and nonparenchymal cell group (n = 8) respectively with injection of Hanks solution and nonparenchymal 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 3.637 ± 783,3 islets with purity of 85 ± 3,52% and nonparenchymal cell group 3.270 ± 770 islets with purity of 84,25 ± 2,76%. The nonparenchymal cells were retrieved from the liver and we obtained 2 x 10<sup>6</sup> cells. Diabetes was induced by i.v. streptozotocin. **Results** - Control group the transplantation of 3.637 ± 783,3 islets in the rat liver normalized glucose test, 7,21 ± 0,57 mmol/L in the 2nd postoperative day. Acute rejection came in the 6th postoperative day with significantly increase of glucose test in nonparenchymal cell group, the transplantation of 3.270 ± 770 islets in the rat liver, almost normalized the glucose test was 17,95 ± 5,33 mmol/L in the 2nd 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 nonparenchymal cells in the thymus before allogenic islet transplantation in the rat liver lead to an early acute rejection.

**HEADINGS** – Islet of Langerhans transplantation. Transplantation, homologous. Liver. Diabetes mellitus, type I. Antigen-presenting cells. Rats.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*. 1953;172:603-6.
2. Barclay NA. The localization of populations of lymphocytes defined by monoclonal antibodies in rat lymphoid tissues. *Immunology*. 1981;42:593-600.
3. 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.
4. Chaib E. Comportamento do alotransplante de ilhotas de Langerhans no fígado de ratos submetidos a inoculação de células apresentadoras de antígenos no timo [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1996.
5. 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.
6. Chaib E, Papalois A, Brons IGM, Calne RY. Alotransplante de ilhotas de Langerhans no fígado de ratos submetidos a manipulação tímica com células dendríticas. *Arq Gastroenterol*. 2005;42:41-9.
7. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease. *N Engl J Med*. 1986;314:1360-8.
8. 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.
9. Finch DRA, Morris PJ. The effect of increasing islet numbers on survival of pancreatic islet allograft in immunosuppressed diabetic rats. *Transplantation*. 1977;23:104-6.
10. Gray DWR, Morris PJ. Developments in isolated pancreatic islet transplantation. *Transplantation*. 1987;43:321-31.
11. Gotoh M, Maki T, Satomi S, Porter J, Monaco AP. Immunological characteristics of purified pancreatic islet grafts. *Transplantation*. 1986;42:387-90.
12. Hall BM, Saxe I, Dorsch SE. The cellular basis of allograft rejection in vivo. *Transplantation*. 1983;36:700-5.
13. Hegre OD, Hickey GE, Marshall S, Serie JR. Modification of allograft immunogenicity in perinatal islet isolated and purified in vitro. *Transplantation*. 1984;37:227-33.
14. Heidecke CD, Kupiec-Weglinskiw, 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;133:582-8.
15. Kover K, Hegre O, Popiela H, Biggs T, Moore WV. Cross-reactivity of organs i allograft rejection. Comparison of effect of thyroid allografts on established islet allografts. *Diabetes*. 1987;36:1268-70.
16. Krokos NV, Brons IGM, Sriwatanawongsa V, Makisalo H, Katami M, Davies HS, Calne RY. Intrathymic injection of donor antigen-presenting cells prolongs heart graft survival ? *Transpl Proc*. 1993;25:303-4.
17. LeFrançois L, Bevan MJ. A reexamination of the role of Lyt-2-positive cells in murine skin graft rejection. *J Exp Med*. 1984;159:57-67.
18. London NJ. Clinical studies of human islet transplantation. *Ann R Coll Surg Engl*. 1995;77:263.
19. 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.
20. Miranda MP. Estado atual e experiência clínica inicial com transplante de pâncreas [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1997.
21. Morris PJ, Ting A. Studies of HLA-DR with relevance to renal transplantation. *Immunol Rev*. 1982;66:103-31.
22. Morrow CE, Sutherland DE, Steffes MW, Najarian JS, Bach FH. H2 antigen-class: effect on mouse islet allograft rejection. *Science*. 1983;219:1337-9.
23. 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.
24. Ricordi C, Tsakis AG, Carrol PB, Zeng Y, Rilo HR, 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. 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.
26. 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.

Recebido em 24/8/2005.  
Aprovado em 4/2/2006.