

**TRANSPLANTE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS: REVISÃO DA LITERATURA E IMPLANTAÇÃO DE UM LABORATÓRIO DE ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS**

*HUMAN PANCREATIC ISLET TRANSPLANTATION: LITERATURE REVIEW AND ESTABLISHMENT OF A PANCREATIC ISLET ISOLATION LABORATORY*

Jakeline Rheinheimer<sup>1</sup>, Cristiane Bauermann Leitão<sup>1</sup>, Carolina Meurer Rohde<sup>1</sup>, Tatiana Helena Rech<sup>1</sup>, Caroline Kaercher Kramer<sup>1</sup>, Thais Steemburgo<sup>1</sup>, Sabrina Sigal Barkan<sup>1</sup>, Tomaz de Jesus Maria Grezzana Filho<sup>2</sup>, Cléber Rosito Pinto Kruef<sup>2</sup>, Alessandro Bersch Osvaldt<sup>3</sup>, Mirela Jobim de Azevedo<sup>1</sup>, Jorge Luiz Gross<sup>1</sup>, Daisy Crispim<sup>1</sup>

**RESUMO**

O diabetes melito tipo 1 (DM1) está associado ao desenvolvimento de complicações crônicas de elevada morbi-mortalidade em indivíduos jovens em idade produtiva. A terapia intensiva com insulina comprovadamente diminui o aparecimento das complicações crônicas da doença. Entretanto, essa terapia ainda está associada ao aumento da incidência de hipoglicemia. Em pacientes com “DM1 lábil”, os quais apresentam hipoglicemias graves sem sintomas de alerta, o transplante de ilhotas pancreáticas humanas é uma das melhores alternativas para restaurar a secreção de insulina e a percepção da hipoglicemia. Cerca de 80% dos pacientes que receberam transplante de ilhotas de mais de um doador, submetidos ao tratamento imunossupressor do protocolo de *Edmonton*, adquiriram independência de insulina após 1 ano do transplante. Porém, apenas 10% destes pacientes permaneceram livres de insulina após 5 anos. Entretanto, mesmo aqueles pacientes que necessitaram utilizar novamente insulina tiveram a normalização da homeostase glicêmica e da percepção da hipoglicemia, com prevenção da hipoglicemia grave. Sendo assim, o transplante de ilhotas é capaz de diminuir os níveis de glicose plasmática e HbA1c, reduzir a ocorrência de hipoglicemias graves e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. O objetivo deste artigo foi fazer uma breve revisão da literatura sobre o isolamento e transplante de ilhotas pancreáticas humanas e relatar a implantação de um laboratório de isolamento de ilhotas humanas no Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

**Palavras-chave:** *Ilhotas pancreáticas humanas; diabetes melito tipo 1; isolamento de ilhotas; transplante de ilhotas*

**ABSTRACT**

Type 1 diabetes mellitus (DM1) is associated with chronic complications of high morbidity and mortality in young adults in a productive age. Insulin therapy has proved to reduce the chronic complications of diabetes. However, this therapy is still associated to an increased incidence of hypoglycemia. In patients with “brittle DM1”, who have severe hypoglycemia without any symptoms (hypoglycemia unawareness), the pancreatic islet transplantation is one of the best alternatives for restoring insulin secretion and hypoglycemia perception. About 80% of the patients who received islet transplantation from more than one donor, on immunosuppressive treatment with the Edmonton’s protocol, maintained insulin independence 1 year after transplantation. Nevertheless, only 10% of these patients remained free of insulin after 5 years post-transplantation. However, even those patients who returned to insulin treatment had a normalization of the glucose homeostasis and hypoglycemia perception. Therefore, islet transplantation is able to diminish plasmatic glucose and HbA1c levels, to reduce the occurrence of severe hypoglycemia, and to improve the quality of life of the patients. The purpose of this paper is to briefly review islet isolation and transplantation process, and report the establishing of a human islet isolation laboratory in the Endocrine Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

**Keywords:** *Human pancreatic islets; type 1 diabetes mellitus; islet isolation; islet transplantation.*

*Rev HCPA 2010;30(4):407-418*

O diabetes melito tipo 1 (DM1) é responsável por 10% dos casos de diabetes e está associado ao desenvolvimento de complicações crônicas de elevada morbidade e mortalidade em indivíduos jovens em idade produtiva (1,2). O DM1 é decorrente da destruição autoimune das células-β pancreáticas, o que determina a deficiência total de secreção de insulina e a necessidade de administração de insulina exógena para a sobrevivência e prevenção de complicações crônicas do diabetes (1).

Nas últimas décadas ocorreu um avanço significativo no manejo dos pacientes com DM1. Estudos demonstraram que a terapia intensiva com insulina comprovadamente diminui o aparecimento das complicações micro e macrovasculares do diabetes (3,4). Além disso, o desenvolvimento dos análogos de insulina e de bombas de infusão subcutânea permitiu aos pacientes um estilo de vida mais flexível (4). No entanto, apesar das melhorias no tratamento do DM1, a terapia intensiva com insulina ainda está as-

1. Laboratório de Biologia das Ilhotas Pancreáticas Humanas, Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

2. Equipe de Transplante de Fígado, HCPA.

3. Equipe de Cirurgia das Vias Biliares e Pâncreas, Serviço de Cirurgia, HCPA.

**Contato:** Daisy Crispim. E-mail: [dcmoreira@hcpa.ufrgs.br](mailto:dcmoreira@hcpa.ufrgs.br). (Porto Alegre, RS, Brasil).

sociada a um aumento de três vezes na incidência de hipoglicemia (5,6). Uma fração dos pacientes com DM1 apresenta o chamado "DM1 lábil", o qual é caracterizado por incursões imprevisíveis da glicemia ao longo de poucas horas, com hiperglicemias seguidas por hipoglicemias graves. Estes pacientes estão expostos a risco de vida, podendo evoluir para convulsões e coma e, até mesmo, para morte (6,7). Neste grupo de pacientes, o tratamento mais adequado ainda não foi estabelecido e terapias de substituição de células- $\beta$  pancreáticas através de transplante de pâncreas inteiro ou de ilhotas são as únicas alternativas concretas capazes de restaurar a secreção de insulina endógena e a percepção dos sintomas hipoglicêmicos (8,9).

O transplante de pâncreas como órgão inteiro promove controle glicêmico adequado e reduz a ocorrência das complicações crônicas, sendo indicado para pacientes com DM1 com insuficiência renal terminal, no momento do transplante renal (10,11). Apesar dos pacientes submetidos ao transplante de pâncreas apresentarem uma boa sobrevida a longo prazo, esse tipo de transplante não é indicado para pacientes com DM1 sem indicação de transplante renal, uma vez que o procedimento está associado à morbi-mortalidade de uma cirurgia de grande porte (8,10,11). Nestes casos, o transplante alogênico de ilhotas pancreáticas é, atualmente, uma opção. O transplante de ilhotas não requer cirurgia ou anestesia geral. Isto ocorre porque somente a porção do pâncreas responsável pela secreção de insulina, ou seja, as ilhotas, que representam apenas 2% do órgão, são purificadas e infundidas no fígado pela veia porta, através de técnicas de radiologia (8). Sendo assim, nossos objetivos neste artigo foram fazer uma breve revisão da literatura sobre o isolamento e o transplante de ilhotas pancreáticas humanas em pacientes com DM1 e relatar o estabelecimento de um laboratório para isolamento de ilhotas pancreáticas humanas no Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

## HISTÓRICO DO TRANSPLANTE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS

Os primeiros relatos de tentativas de "transplante" de ilhotas pancreáticas ocorreram em 1894 (12), mas foi somente em 1972 que Lacy (13) conseguiu reverter o DM induzido por estreptozocina em ratos com a infusão de ilhotas normais. Na década de 1980 foram relatados transplantes autólogos de ilhotas pancreáticas em pacientes submetidos à pancreatectomia total por dor intratável decorrente de pancreatite crônica (14,15), com obtenção de independên-

cia de insulina até 13 anos após o transplante (16). A partir destes resultados, muitos pesquisadores pensaram que a utilização do transplante de ilhotas para tratamento do DM1 traria uma possível cura para essa doença.

No entanto, as primeiras tentativas de transplante alogênico de ilhotas pancreáticas em humanos não obtiveram resultados muito animadores, com taxa de independência de insulina de apenas 10% (9,17,18). Dados obtidos a partir do *International Islet Transplant Registry (ITR)* no período de 1983 a 2000 documentam um total de 493 transplantes realizados em todo o mundo, com taxas de independência de insulina decrescentes com o passar do tempo após o transplante: 66% após 1 mês, 40% após 1 ano, 22% após 2 anos, 11% após 3 anos, 6% após 4 anos e apenas 2% após 5 anos (19).

A criação do protocolo de *Edmonton*, em 2000, possibilitou melhores resultados, com 100% de independência de insulina um ano após o transplante em sete pacientes (20). A melhor resposta ao transplante foi atribuída basicamente aos seguintes fatores: regime de imunossupressão sem uso de corticóides (indução com daclizumab e manutenção com sirolimus e baixa dose de tacrolimus) e múltiplas infusões de ilhotas de mais de um doador com o objetivo de aumentar a massa de ilhotas transplantada (20). Em 2005, o mesmo grupo relatou os resultados após 5 anos de seguimento de 65 pacientes submetidos ao transplante de ilhotas. A duração média da independência de insulina foi de 15 meses e apenas 10% dos pacientes permaneceram livres de insulina após 5 anos (21).

O protocolo de *Edmonton* foi reproduzido posteriormente em um estudo multicêntrico organizado pelo *Immune Tolerance Network* e que envolveu 36 pacientes com DM1 de nove centros dos EUA e Europa (22). Apenas 13,8% dos pacientes permaneceram livres de insulina após 2 anos de seguimento, mas aqueles pacientes que mantiveram pelo menos função parcial do enxerto tiveram uma melhora substancial do controle metabólico (22). As taxas de sucesso foram bastante variáveis entre os centros envolvidos no estudo, sendo que os centros com maior experiência obtiveram os melhores resultados, com até 80% dos pacientes permanecendo livres de insulina após 1 ano (22).

Diversos centros e programas de transplante de ilhotas foram criados na última década (23) e estudos de fase III vem sendo realizados pelo *Clinical Islet Transplantation Consortium*, com base nos EUA (24). No Brasil, o primeiro transplante de ilhotas ocorreu em 2002, em São Paulo, em um paciente de 45 anos com "DM1 lábil" (25). Apesar das disparidades no sucesso obtido entre os centros, atualmente o transplan-

te de ilhotas pode ser considerado bem sucedido no primeiro ano pós-transplante, apresentando um declínio na taxa de independência de insulina de cerca de 50% no segundo ano, com diminuição ainda maior nos anos subsequentes (23).

No entanto, o transplante de ilhotas não é indicado para todos os pacientes com DM1, mas apenas para aqueles com "DM1 lábil", sendo seu objetivo principal a prevenção da ocorrência de hipoglicemias graves. A prevenção das hipoglicemias depende do restabelecimento da homeostase glicêmica, não sendo a independência à insulina essencial para a recuperação dos sintomas de alerta da hipoglicemia (9). Neste contexto, o transplante de ilhotas é capaz de atingir as metas propostas, com diminuição dos níveis de glicose plasmática e normalização da HbA1c, redução da ocorrência de hipoglicemias graves, redução da ocorrência das complicações crônicas do diabetes e melhora na qualidade de vida dos pacientes (9,26-28).

#### **RISCOS E INDICAÇÕES PARA O TRANSPLANTE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS**

A relação de risco e benefício do transplante de ilhotas deve ser cuidadosamente avaliada para cada paciente uma vez que podem ocorrer alguns eventos adversos após o transplante (8,17). Os riscos do transplante de ilhotas podem ser decorrentes do procedimento de infusão percutânea das ilhotas na veia porta (sangramento intra-abdominal, trombose da veia porta, punção de órgãos vizinhos e aumento transitório das transaminases plasmáticas) ou da terapia de imunossupressão (infecções, úlceras orais, anemia, diarreia, perda de peso, fadiga, disfunção renal, hipertensão arterial, elevação do colesterol LDL, edema periférico e algumas neoplasias) (8,17). Entretanto, atualmente, o procedimento de infusão das ilhotas não está associado à mortalidade e a morbidade é minimizada com a utilização de fluoroscopia e ecografia para localização do sítio de punção da veia porta e pelo uso de cola biológica no trajeto de punção e de heparina para evitar a trombose. Os efeitos colaterais do tratamento imunossupressor são geralmente leves e facilmente tratados por uma equipe médica com experiência na área (8,17).

Conforme as recomendações da Associação Americana de Diabetes (ADA), o transplante de ilhotas para tratamento do DM1 somente deve ser realizado no contexto de pesquisa clínica, sendo ainda considerada uma terapia experimental (29). As indicações para o transplante são "DM lábil", definido por amplas variações da glicemia capilar ao longo do dia, tipicamente maiores do que 200 mg/dl e que interfiram com

a qualidade de vida do paciente ou hipoglicemias graves sem sintomas adrenérgicos de alerta (6,7). Para esses pacientes, o transplante alogênico de ilhotas pode ser oferecido como: 1) transplante isolado de ilhotas em pacientes não-urêmicos; 2) transplante de ilhotas após transplante renal para pacientes com doença renal terminal; 3) transplante simultâneo de ilhotas e rim (17,30).

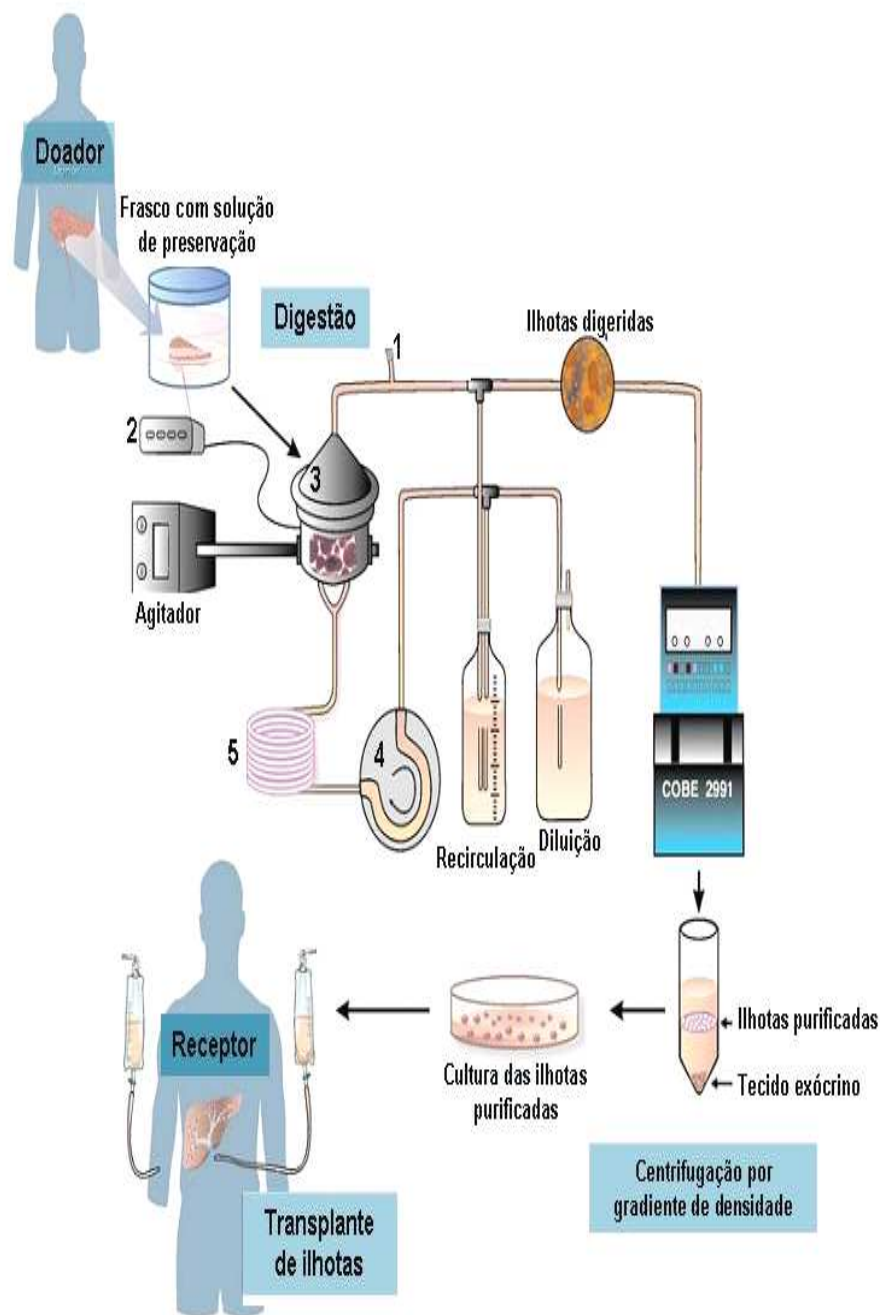
Até o momento, os pacientes incluídos nos protocolos de transplante de ilhotas apresentaram as seguintes características: idade entre 18 e 65 anos, DM1 por mais de 5 anos com níveis indetectáveis de peptídeo-C, ocorrência de hipoglicemias graves recorrentes e progressão das complicações crônicas do diabetes (28). No estudo *Immune Tolerance Network* (22), a presença de doença arterial coronariana não-tratada, índice de massa corporal (IMC) >26 kg/m<sup>2</sup>, necessidade de uso de dose de insulina >0,7 UI/kg, HbA1c >12%, creatinina >1,5 mg/dl e/ou albuminúria >300mg/24h, presença de infecções ou doenças psiquiátricas foram considerados critérios de exclusão para o transplante.

O transplante autólogo de ilhotas é indicado para a prevenção de diabetes iatrogênico após pancreatectomia para tratamento de pancreatite crônica, neoplasia benigna ou trauma e, devido à segurança deste procedimento, pode também ser realizado em pacientes idosos ou com cirrose hepática (16,31,32).

#### **ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS**

Ilhotas de Langerhans são *clusters* de células endócrinas espalhadas pelo pâncreas e que correspondem a apenas 2% da massa total deste órgão. Interações complexas entre as células que formam as ilhotas (células- $\alpha$ , produtoras de glucagon; células- $\beta$ , produtoras de insulina; células- $\delta$ , produtoras de somatostatina; e células-PP, produtoras de polipeptídeo pancreático) e destas com o tecido exócrino regulam finamente o metabolismo da glicose. O objetivo do isolamento e purificação das ilhotas é liberá-las do tecido conectivo e exócrino, preservando a integridade estrutural e funcional (28).

Os métodos de isolamento de ilhotas melhoraram significativamente nas últimas três décadas (8,17) e o avanço fundamental nesta área veio com o uso do método semiautomático para digestão controlada do pâncreas desenvolvido por Camillo Ricordi em 1989 (33). Esse método é composto pelas seguintes etapas: limpeza do pâncreas, canulação dos ductos pancreáticos, perfusão, distensão e digestão enzimática do pâncreas, diluição, purificação e cultura das ilhotas (figura 1).



**Figura 1** - Isolamento das ilhotas pancreáticas e transplante: do doador ao receptor. Modificada a partir da referência 17. 1 = porta de amostragem para coleta e monitoramento das ilhotas digeridas; 2 = sonda de temperatura para monitoramento da temperatura da câmara (37°C); 3 = Câmara de Ricordi com esferas de silicone e solução de colagenase; 4 = bomba peristáltica para circulação das soluções no sistema; 5 = serpentina de aquecimento localizada dentro de banho-maria a 50°C.

O processo laboratorial inicia-se com o recebimento e verificação das condições do pâncreas pela equipe de isolamento e termina com a liberação das ilhotas isoladas para o transplante ou pesquisa pela equipe de controle de qualidade (CQ). A primeira etapa do processamento do pâncreas é a limpeza do órgão, isto é, a retirada de gordura e a lavagem com soluções antibióticas e antifúngicas. A fase seguinte é a separação das ilhotas do pâncreas exócrino e

tecido ductal por digestão, realizada através da perfusão de uma colagenase purificada no ducto pancreático. Neste processo ocorre aumento do volume do pâncreas (distensão). O pâncreas é então cortado e transferido para a Câmara de Ricordi (33), que contém 7-9 esferas de silicone e é preenchida com solução de colagenase, para a realização da fase de digestão, a qual é auxiliada pela agitação mecânica da câmara (digestão química e mecânica). O tecido pancreático

co digerido é coletado em um grande volume de solução de diluição, a qual interrompe a digestão. No passo de purificação, as ilhotas são separadas do tecido exócrino usando-se gradientes de densidade contínuos ou descontínuos na centrífuga COBE 2991. A purificação tem por objetivo garantir a infusão de uma maior quantidade de ilhotas em um volume menor de tecido, a fim de se reduzir o risco de desenvolvimento de hipertensão portal (18). Após o isolamento, é realizada a cultura das ilhotas por até 3 dias (34,35).

Segundo a *Food and Drug Administration (FDA)*, para que as ilhotas alogênicas possam ser disponibilizadas como uma terapia viável, alguns problemas devem ser abordados, tais como: segurança, pureza, potência e eficácia das ilhotas. Para que o lote de ilhotas seja aprovado, o produto final do isolamento e o processo usado para isolar e purificar as ilhotas terão que ser definidos e validados, demonstrando a consistência da qualidade do produto (36). Sendo assim, a última etapa do processo de isolamento das ilhotas é constituída pelos testes de CQ, os quais são: avaliação da pureza, número de equivalentes de ilhotas (IEQ – um IEQ corresponde a uma ilhota com 150  $\mu$ m ou mais de diâmetro), viabilidade e função das células e esterilidade (37). A avaliação da pureza (isto é, a quantidade de ilhotas em comparação a outros tecidos) é realizada nas diversas etapas do isolamento e após a cultura das ilhotas. A pureza deve ser >30% para que as ilhotas sejam liberadas para o transplante. O número de IEQ é determinado pelo diâmetro estimado das ilhotas e o lote somente é liberado para transplante caso o IEQ seja >5000 IEQ/kg em um volume de no máximo 5-10 ml (37). A viabilidade das ilhotas (número de células vivas/número de células mortas) é determinada pela integridade da membrana celular após coloração com dois corantes (diacetato de fluoresceína, que cora em verde as células viáveis, e iodeto de propídeo, que cora em vermelho as células com membrana celular danificada) e visualização em um microscópio de fluorescência (38). O lote de ilhotas é liberado se apresentar viabilidade acima de 70%. A função das ilhotas é avaliada pela determinação dos níveis secretados de insulina após incubação estática com glicose em baixas e altas concentrações (20). A esterilidade do material é comprovada através de cultura para bactérias aeróbicas e anaeróbicas, cultura para fungos e micoplasma e teste para presença de endotoxinas (18,37).

### PRINCIPAIS DESAFIOS

Os desafios para implantação de um laboratório de isolamento de ilhotas humanas são inúmeros e podem ser divididos em: financeiros,

administrativos, técnico-laboratoriais e médicos (9,17,28,39).

### Desafios financeiros e administrativos

O alto investimento inicial, referente à compra de equipamentos e gastos relacionados à realização de obras para adequação do espaço físico, é expressivo. Além disso, os custos relacionados à manutenção do laboratório, pagamento de profissionais treinados e compra de reagentes e outros materiais necessários para cada isolamento necessitam ser cuidadosamente planejados (39,40). Em 2004, um estudo francês avaliou o custo do transplante de ilhotas, desde a retirada do órgão do doador ao transplante e posterior acompanhamento dos pacientes transplantados, e mostrou que o processo de isolamento das ilhotas realizado no laboratório é a fase mais dispendiosa, correspondendo a 30% dos gastos totais (41). Como o transplante de ilhotas é ainda considerado um procedimento experimental, as fontes requeridas para o desenvolvimento e manutenção do laboratório geralmente dependem de fundos de pesquisas governamentais e não-governamentais.

Uma equipe administrativa bem estruturada também é essencial para garantir o bom funcionamento das atividades laboratoriais e médicas relacionadas ao transplante (9). Além disso, o desenvolvimento de um laboratório de isolamento de ilhotas para transplante deve seguir aspectos regulatórios específicos. Nos EUA, o processamento de ilhotas para transplante deve seguir normas para uso de “medicamentos” e “produtos biológicos”, estabelecidas pela *FDA* e pelo *Public Health Service Act* (42). No Brasil ainda não há uma legislação que regule especificamente o transplante de ilhotas. No entanto, a construção do laboratório e todas as etapas do isolamento das ilhotas devem estar de acordo com as normas da RDC 210 (DOU 04/08/03 - “Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos”) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (43), já que as ilhotas também são consideradas como um medicamento constituído por produto biológico (39).

Devido à complexidade do procedimento utilizado, o isolamento bem sucedido das ilhotas só é possível com o envolvimento de uma equipe multidisciplinar comprometida e devidamente treinada para adequar-se a realidade brasileira, porém respeitando os padrões internacionais de isolamento e CQ das ilhotas (39). Essa equipe deverá ser formada por técnicos, biólogos, biomédicos, bioquímicos, médicos endocrinologistas e nefrologistas, cirurgiões, radiologistas e enfermeiras. Adicionalmente, a equipe envolvida diretamente no isolamento das ilhotas e acompanhamento dos pacientes após o transplante deverá obter treinamento em centros de referência no exterior (39).

**Desafios médicos relacionados ao doador**

A escassez de doadores de órgãos em morte encefálica (ME) deve ser sempre levada em conta como uma das principais limitações para a maioria dos centros que fazem transplante de ilhotas (9). No Brasil, conforme dados da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos somente 9,5% (N=158) dos pâncreas disponíveis de doadores de órgãos (N=1658) foram utilizados no ano de 2009 em todo o Brasil (44). No estado do Rio Grande do Sul ocorreram 126 doações de pâncreas no ano de 2009, 7 foram transplantados e o restante poderia ter sido disponibilizado para a realização do isolamento das ilhotas, o que demonstra oferta adequada de órgãos para a instalação de um programa de transplante de ilhotas.

As ilhotas começam a ser danificadas mesmo antes da retirada do pâncreas, uma vez que a ME está relacionada à produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, as quais induzem apoptose das células e diminuem a qualidade do enxerto (45). Além disso, os centros de isolamento de ilhotas geralmente recebem pâncreas não utilizados para o transplante de órgão inteiro, o que faz com que o tempo de isquemia fria do órgão seja acima do ideal (>12h) (9). Como a isquemia causa grandes danos ao tecido pancreático, o tipo de solução usada para preservação do pâncreas e diminuição dos efeitos deletérios da hipóxia tem um papel importante no resultado do transplante (28). A principal solução de preservação utilizada atualmente é a solução de UW (*University of Wisconsin*), a qual contém glicose, alguns eletrólitos, glutatona e outras substâncias que preservam a integridade celular (28). Mais recentemente, o uso combinado da solução UW e compostos com alta afinidade por oxigênio (método de duas camadas com perfluorocarbono) melhorou a preservação do órgão em alguns estudos (46-48), mas seu papel parece ser mais relevante nos casos de isquemia fria prolongada (49).

Características do doador, tais como idade, sexo, história médica prévia, IMC, causa de morte, uso de agentes vasopressores e o tamanho e o conteúdo de gordura do pâncreas são fatores que influenciam a qualidade das ilhotas isoladas (28,50,51). Pâncreas de doadores com um IMC >25 kg/m<sup>2</sup> e/ou com mais de 50 anos de idade estão associados a um número maior de ilhotas isoladas; porém estas ilhotas podem ter sua função prejudicada (50-53). Um curto tempo de isquemia fria e a retirada do pâncreas por uma equipe local também são fatores associados a um número maior de ilhotas isoladas (9,52).

**Desafios técnico-laboratoriais**

Sabe-se que um dos estágios primordiais para o sucesso do transplante de ilhotas é o laboratorial. Como já mencionado, a técnica de isolamento das ilhotas pancreáticas melhorou bastante após a introdução do método semiautomático de Ricordi (33). Entretanto, mesmo nos centros mais experientes, mais de 50% da massa de ilhotas é perdida durante as diferentes fases do isolamento, podendo até impedir que o transplante seja realizado caso a quantidade de ilhotas isoladas seja insuficiente (9). O trauma mecânico causado às ilhotas durante o isolamento e a própria ação da enzima colagenase usada durante a fase de digestão podem fragmentar as ilhotas, danificando principalmente as células- $\alpha$ , - $\delta$  e PP, localizadas na periferia das ilhotas (54). Adicionalmente, as complexas redes vasculares e neuronais do pâncreas são destruídas durante o isolamento, o que modifica a comunicação bioquímica entre as células. Dessa forma, o isolamento das ilhotas resulta em estresse oxidativo e inflamatório, ocasionando perda da viabilidade celular e aumento da apoptose (55).

As dificuldades relacionadas ao isolamento das ilhotas aumentaram nos últimos 4 anos porque a enzima colagenase anteriormente utilizada (*Liberase HI<sup>TM</sup>, Roche Pharmaceuticals*) foi retirada do mercado, pois havia o risco de transmissão de encefalopatia espongiiforme, uma vez que durante a sua produção se utilizava um meio de cultura que continha extrato de cérebro bovino (9,56). Novas colagenases estão sendo testadas para a digestão do pâncreas, obtendo resultados encorajadores (dados não publicados).

Baseando-se no que foi discutido acima, vários centros de transplante de ilhotas têm focado suas pesquisas no desenvolvimento destas novas enzimas para digestão, meios de cultura mais apropriados para manter a viabilidade e a função das ilhotas e em mudanças no protocolo de isolamento, para que no futuro seja necessário o enxerto de ilhotas isoladas de apenas um único doador em cada paciente transplantado (8,17).

**Desafios relacionados ao receptor**

O acompanhamento dos pacientes após o transplante deve ser realizado por uma equipe médica treinada em endocrinologia, terapia imunossupressora e prevenção de infecções. O tratamento adequado das complicações pós-transplante minimiza drasticamente a morbidade relacionada ao procedimento (9).

No transplante de ilhotas, assim como no transplante de pâncreas, a persistência ou reaparecimento de autoanticorpos para componentes das ilhotas estão correlacionados a uma piora na evolução e podem ser fatores-chaves na falência do enxerto (57). Características dos pacientes também influenciam o resultado do transplante. Os pacientes mais jovens, com maior HbA1c, com perfil clínico sugestivo de resistência à ação da insulina e valores de lipídios séricos mais elevados na avaliação pré-transplante apresentam maior risco de perda precoce do enxerto (58).

A avaliação da função do enxerto e os efeitos colaterais das drogas imunossupressoras necessitam atenção especial por parte da equipe médica. Estima-se que 50-70% das ilhotas são destruídas no período imediato após o transplante, devido às características únicas do fígado, o qual está exposto a elevados níveis de glicose, lipídeos e toxinas, e também pelo efeito danoso das drogas imunossupressoras sobre a secreção de insulina, viabilidade e proliferação das ilhotas (18,59). Entretanto, após 3 meses, as ilhotas sobreviventes já estão envolvidas em tecido endotelial e uma rede de capilares, como demonstrado em um modelo de primata não-humano (60). A avaliação da função das ilhotas remanescentes após esse período é uma tarefa difícil e, atualmente, não existe uma forma direta de determiná-la (9). As formas indiretas mais utilizadas para avaliação da função das células-β são: a medida do peptídeo-C durante alimentação (*mixed meal test*) (26); a taxa de glicose/peptídeo-C (61) e o escore beta (determinado a partir dos valores de glicose plasmática, HbA1c, dose diária de insulina e secreção de peptídeo-C após estimulação) (62). Mais recentemente, Caumo et al. (63) descreveram o escore de "Função Estimada do Transplante", o qual baseia-se apenas na dose diária de insulina e níveis de HbA1c e pode ser normalizado pelo número de ilhotas infundidas. Entretanto, estas medidas indiretas não são ideais para se avaliar a rejeição do enxerto, uma vez que monitoram a homeostase de glicose, a qual pode ainda estar intacta durante os estágios iniciais de rejeição (28). O desenvolvimento de métodos clínicos não-invasivos para detecção da rejeição do enxerto em uma fase inicial será um passo muito importante para aumentar o sucesso dos transplantes, já que poderá permitir a realização de intervenções mais específicas com o objetivo de prevenir a rejeição do enxerto (28). Métodos radiológicos para se detectar danos às ilhotas antes do surgimento do defeito metabólico têm também sido investigados. Monitoramento por ressonância magnética das ilhotas marcadas com ferro é um método seguro e viável, mas necessita ser otimizado (64).

Os níveis plasmáticos dos imunossupressores usados no protocolo de *Edmonton* devem

ser monitorados com cuidado, objetivando-se um balanço entre a prevenção da rejeição do enxerto e a minimização dos efeitos colaterais já mencionados (9). Como tanto o tacrolimus quanto o sirolimus interferem negativamente na função e proliferação das células-β (65-68), a modificação do regime de imunossupressão do protocolo de *Edmonton* deverá trazer efeitos positivos na função e sobrevivência do enxerto.

### IMPLANTAÇÃO DO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS NO HCPA

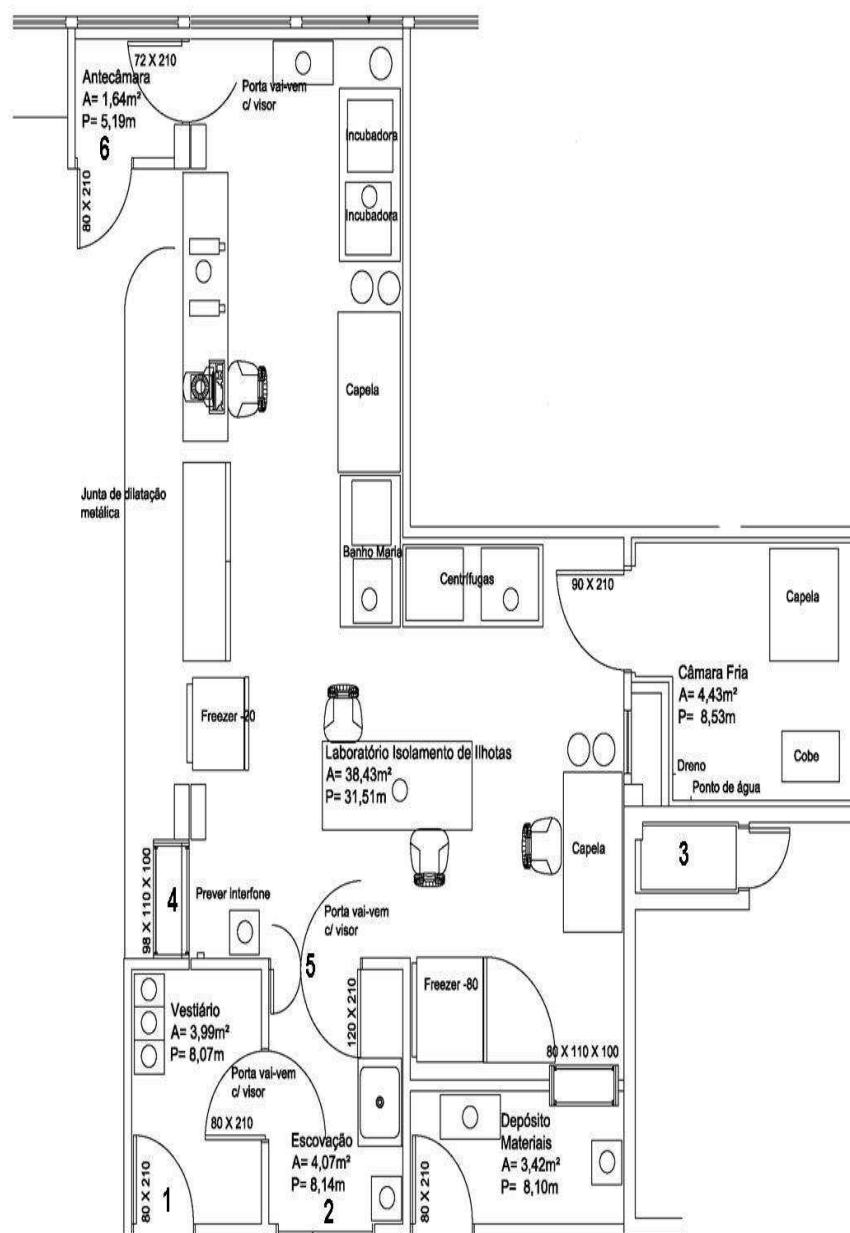
O Laboratório de Biologia das Ilhotas Pancreáticas Humanas (BIPH) foi construído no Serviço de Endocrinologia do HCPA com o objetivo de realizar o isolamento das ilhotas humanas para: 1) desenvolvimento de estudos experimentais visando o aumento da quantidade e qualidade das ilhotas isoladas; 2) realização de estudos relacionados a alterações funcionais das células-β em diferentes situações fisiológicas e patológicas; e 3) futura infusão em pacientes com "DM1 lábil".

O laboratório de BIPH foi construído em uma área de 63,6 m<sup>2</sup> localizada dentro do Serviço de Endocrinologia (figura 2). A construção do laboratório foi iniciada em 2008 e concluída no final de 2009 e foi baseada nas normas estabelecidas pelas RDCs 134 e 210 da ANVISA (43) e conforme as recomendações da equipe de transplante de ilhotas do *Diabetes Research Institute, University of Miami* (EUA). A maior parte das obras de construção do laboratório foi custeada pelo HCPA (Tabela 1).

**Tabela 1** - Investimento inicial necessário para a implantação do Laboratório de Biologia das Ilhotas Pancreáticas Humanas no Serviço de Endocrinologia – HCPA e realização de 10 isolamentos.

	Valor (R\$)
Instalações <sup>1</sup>	181.410,50
Equipamentos <sup>2</sup>	490.000,00
Reagentes e materiais de consumo descartáveis necessários para 10 isolamentos de ilhotas pancreáticas <sup>3</sup>	305.000,00
Materiais de consumo não-descartáveis <sup>2</sup>	16.500,00
Treinamento dos funcionários no exterior <sup>2</sup>	110.000,00
Bolsas de pesquisa (iniciação científica, apoio técnico e pós-doutorado) <sup>2</sup>	215.904,00
<b>Total</b>	<b>1.318.814,50</b>

1 – Custeado pelo HCPA; 2 – Custeado com verbas de agências nacionais de fomento à pesquisa (CNPq, CAPES e FAPERGS); 3 – Custeados com verbas do FIPE-HCPA e de agências nacionais de fomento à pesquisa (CNPq, CAPES e FAPERGS).



**Figura 2** - Planta do Laboratório de Biologia das Ilhotas Pancreáticas Humanas (BIPH) localizado no Serviço de Endocrinologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre. 1 = Entrada no laboratório pelo vestiário (acesso restrito); 2 = Entrada apenas de equipamentos; 3 = Janela de entrada de materiais e pâncreas; 4 = Janela de saída de matérias e seringa contendo as ilhotas isoladas; 5 = Porta de entrada no laboratório (acesso apenas para pessoal com vestimenta e luvas estéreis); 6 = Antecâmara de saída de pessoal. Capela = cabine de segurança biológica classe AII. COBE = Centrífuga COBE 2991.

O laboratório de BIPH está de acordo com os padrões estabelecidos para salas cirúrgicas com respeito à pressão positiva interna, uso de ar-condicionado com sistema de filtração HEPA (*high efficiency particulated air*) e acesso restrito. O controle ambiental mantém o vestiário em Classe 100.000 (até 100.000 partículas de 0,5 micron ou maiores por  $m^3$  de ar) e todo o restante da área interna em Classe 10.000. Além do vestiário para vestimenta do macacão estéril, o laboratório inclui a área de escovação das mãos, a área interna para isolamento e cultura

das ilhotas, um depósito para reagentes, uma câmara-fria e uma antecâmara de saída do laboratório. Todo o mobiliário do laboratório é feito de inox para facilitar a limpeza e impedir a contaminação por microorganismos. A área externa do laboratório, no Serviço de Endocrinologia, apresenta um Laboratório de Biologia Molecular e Celular, uma sala de lavagem de vidrarias com autoclave e uma sala de CQ das ilhotas isoladas, a qual contém um microscópio de fluorescência e uma leitora de microplacas de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*).



Os seguintes equipamentos foram adquiridos para o início das atividades do Laboratório de BIPH: 3 capelas de fluxo laminar classe IIA, 2 incubadoras para cultura de células, 2 centrifugas refrigeradas, 1 lavadora automática de células (COBE 2991), 2 balanças analíticas, 1 bomba à vácuo, 2 bombas peristálticas, 1 freezer -80°C, 1 freezer -20°C, 1 refrigerador tipo banco de sangue, 1 microscópio de fluorescência invertido para CQ, 1 microscópio de contraste de fase, 1 microscópio tipo lupa, 1 sonda de temperatura para monitoramento da temperatura de digestão, 2 Câmaras de Ricordi (*Biorep Technologies*, Flórida, EUA), 1 *gradient maker*, 1 leitora de microplacas de ELISA, 1 lavadora de microplacas e 1 contêiner de nitrogênio líquido para congelamento de células. Uma descrição detalhada de todos os equipamentos, reagentes e materiais de consumo necessários para o isolamento das ilhotas já foi relatada por outros autores (20,39,69). O gasto inicial com a compra de equipamentos e reagentes está descrito na Tabela 1.

O projeto para implantação do laboratório e realização dos primeiros isolamentos foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HCPA e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) em 2008. Os pâncreas utilizados serão provenientes de duas fontes. A primeira será constituída de pâncreas de doadores de órgãos em ME e disponibilizada pela Central de Transplantes do Estado do Rio Grande do Sul. Somente serão empregados os pâncreas não utilizados para transplante convencional duplo de rim-pâncreas ou transplante de pâncreas isolado. A segunda fonte será formada por tecido pancreático proveniente de pancreatectomias terapêuticas parciais ou totais. O primeiro isolamento foi realizado em novembro de 2010. Estima-se a realização de pelo menos 10 isolamentos bem sucedidos e com CQ adequado para que possamos submeter um novo projeto para a realização do transplante em pacientes com "DM1 lábil".

O núcleo da equipe de isolamento de ilhotas é formado por uma médica endocrinologista e por uma bióloga, ambas contratadas pelo HCPA e que realizaram treinamento por um ano em centros de referência no exterior. A médica recebeu treinamento no *Diabetes Research Institute da University of Miami* (Flórida, EUA) sobre isolamento de ilhotas humanas e monitoramento e tratamento dos pacientes transplantados. A bióloga recebeu treinamento no *Laboratory of Experimental Medicine da Free University of Brussels* (Bruxelas, Bélgica) sobre isolamento de ilhotas de ratos e estudos da função das células- $\beta$ . A equipe de isolamento é auxiliada por alunos de iniciação científica, por um bolsista de apoio técnico e um aluno de pós-doutorado, os quais recebem bolsas disponibilizadas por agências nacionais de fomento à pesquisa (tabela 1).

A equipe envolvida no isolamento de ilhotas é chefiada pelo Prof. Dr. Jorge Luiz Gross, idealizador do projeto e responsável pela aquisição de verbas para implantação do Laboratório de BIPH, e é supervisionada pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Mirela Jobim de Azevedo, Chefe do Serviço de Endocrinologia.

A equipe cirúrgica responsável pela retirada dos órgãos é formada por 2 médicos contratados da Equipe de Transplante de Fígado do HCPA (órgãos de doadores em ME) e 1 médico contratado da equipe de Cirurgia das Vias Biliares e Pâncreas do HCPA (órgãos provenientes de pancreatectomias totais ou parciais).

## PERSPECTIVAS

O transplante de ilhotas pancreáticas, com a utilização dos protocolos disponíveis atualmente, mostrou-se efetivo para o tratamento de pacientes com "DM lábil". No entanto, o objetivo de garantir aos pacientes a independência de insulina a longo prazo não foi alcançado até o momento (8,9,21,23). Os melhores resultados do transplante de ilhotas dependem do aperfeiçoamento de vários aspectos do procedimento e esforços neste sentido têm sido realizados em vários centros. Os principais aspectos em estudo baseiam-se no: 1) aumento da disponibilidade de ilhotas a serem implantadas, focalizando-se na obtenção de um maior número de doadores, utilização de doadores com maior IMC, utilização de ilhotas de doadores vivos, multiplicação das ilhotas em cultura e ilhotas geradas a partir de células-tronco; 2) proteção das ilhotas implantadas através da utilização de protocolos de imunossupressão menos tóxicos, local alternativo para o implante das células que não o fígado, captação de células-tronco do próprio paciente para evitar rejeição, proteção das ilhotas ao ataque imunológico, uso de drogas com mecanismo protetor da célula- $\beta$  [ex: agonista do *glucagon like peptide-1* (GLP-1)-exenatida] e "reprogramação do sistema imune" do hospedeiro através de infusão das ilhotas logo após a realização de quimioterapia e transplante de medula óssea (8,9,28).

## CONCLUSÕES

O transplante de ilhotas pancreáticas deve ser considerado como um tratamento capaz de diminuir a ocorrência de hipoglicemias graves e melhorar o controle glicêmico em alguns pacientes diabéticos selecionados. Entretanto, o procedimento na sua forma atual, ainda considerado como pesquisa, não é indicado para todos os pacientes com DM1. Dessa forma, esforços têm sido feitos para melhorar as diversas etapas do isolamento, do transplante de ilhotas e do seguimento dos pacientes após o transplante para

que esse procedimento possa ser incorporado na prática clínica.

A implantação de um laboratório de isolamento de ilhotas é um processo complexo e demorado e que necessita de investimento alto. O Laboratório de BIPH do Serviço de Endocrinologia do HCPA espera fornecer ilhotas humanas para pesquisa e, futuramente, se tornar um centro de referência de transplantes de ilhotas e pesquisa da função das células- $\beta$  no Brasil.

### Agradecimentos

Este estudo foi parcialmente financiado por fundos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### REFERÊNCIAS

- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2010; 33 (Suppl 1): S62-9.
- Kobayashi N. The current status of islet transplantation and its perspectives. *Rev Diabet Stud*. 2008; 5: 136-43.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993; 329: 977-86.
- Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. 2006; 29 (Suppl 1): S4-42.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Hypoglycemia in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes*. 1997; 46: 271-86.
- Shalitin S, Phillip M. Hypoglycemia in type 1 diabetes: a still unresolved problem in the era of insulin analogs and pump therapy. *Diabetes Care*. 2008; 31 (Suppl 2): S121-4.
- Ryan EA, Shandro T, Green K, Paty BW, Senior PA, Bigam D, et al. Assessment of the severity of hypoglycemia and glycemic lability in type 1 diabetic subjects undergoing islet transplantation. *Diabetes*. 2004; 53: 955-62.
- Ichii H, Ricordi C. Current status of islet cell transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2009; 16: 101-12.
- Leitão CB, Tharaanis T, Cuer P, Pileggi A, Baidol DA, Ricordi C, et al. Restoration of hypoglycemia awareness after islet transplantation. *Diabetes Care*. 2008;31:2113-5.
- Gruessner RW, Sutherland DE, Kandaswamy R, Gruessner AC. Over 500 solitary pancreas transplants in nonuremic patients with brittle diabetes mellitus. *Transplantation*. 2008; 85: 42-7.
- Vardanyan M, Parkin E, Grusessner C, Rodriguez Rilo HL. Pancreas vs. islet transplantation: a call on the future. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010; 15: 124-30.
- Williams P. Notes on diabetes treated with extract and by grafts of sheep's pancreas. *Br Med J*. 1894; 2: 1303-4.
- Lacy PE, Walker MM, Fink CJ. Perfusion of isolated rat islets in vitro. Participation of the microtubular system in the biphasic release of insulin. *Diabetes*. 1972;21:987-98.
- Najarian JS, Sutherland DE, Baumgartner D, Burke B, Rynasiewicz JJ, Matas AJ, et al. Total or near total pancreatectomy and islet autotransplantation for treatment of chronic pancreatitis. *Ann Surg*. 1980;192:526-42.
- Pyzdrowski KL, Kendall DM, Halter JB, Nakhleh RE, Sutherland DE, Robertson RP. Preserved insulin secretion and insulin independence in recipients of islet autografts. *N Engl J Med*. 1992;327:220-6.
- Robertson RP, Lanz KJ, Sutherland DE, Kendall DM. Prevention of diabetes for up to 13 years by autoislet transplantation after pancreatectomy for chronic pancreatitis. *Diabetes*. 2001;50:47-50.
- Merani S, Shapiro AM. Current status of pancreatic islet transplantation. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110:611-25.
- Robertson RP. Islet transplantation as a treatment for diabetes - a work in progress. *N Engl J Med*. 2004;350:694-705.
- Brendel MD, Hering BJ, Schultz AO, Bretzel RG. International Islet Transplant Registry Newsletter 9. Giessen: University Hospital Giessen. 2009: 1-20. Available from: URL [www.citregistry.org](http://www.citregistry.org).
- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 2000;343:230-8.
- Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*. 2005;54:2060-9.
- Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med*. 2006;355:1318-30.
- Robertson RP. Islet transplantation a decade later and strategies for filling a half-full glass. *Diabetes*. 2010;59:1285-91.
- Alejandro R, Barton FB, Hering BJ, Wease S. Collaborative Islet Transplant Registry Investigators. 2008 Update from the Collaborative Islet Transplant Registry. *Transplantation*. 2008;86:1783-8.
- Eliaschewitz FG, Aita CA, Genzini T, Noronha IL, Lojdice FH, Labriola L, et al. First Brazilian pan-

- creatic islet transplantation in a patient with type 1 diabetes mellitus. *Transplant Proc.* 2004;36:1117-8.
26. Froud T, Ricordi C, Baidal DA, Hafiz MM, Ponte G, Cure P, et al. Islet transplantation in type 1 diabetes mellitus using cultured islets and steroid-free immunosuppression: Miami experience. *Am J Transplant.* 2005;5:2037-46.
  27. Poggioli R, Faradji RN, Ponte G, Betancourt A, Messinger S, Baidal DA, et al. Quality of life after islet transplantation. *Am J Transplant.* 2006;6:371-8.
  28. Córrea-Giannella ML, Amaral ASR. Pancreatic islet transplantation. *Diabetol Metab Syndrome.* 2009;1:1-7.
  29. Robertson RP, Davis C, Larsen J, Stratta R, Sutherland DE. Pancreas and islet transplantation in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2006;29:935.
  30. Ricordi C, Strom TB. Clinical islet transplantation: advances and immunological challenges. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:259-68.
  31. Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, Yonekawa, T et al. Insulin independence after living-donor distal pancreatectomy and islet allotransplantation. *Lancet.* 2005;365:1642-4.
  32. Oberholzer J, Mathe Z, Bucher P, Triponez F, Bosco D, Fournier B, et al. Islet autotransplantation after left pancreatectomy for non-enucleabe insulinoma. *Am J Transplant.* 2003;3:1302-7.
  33. Ricordi C, Lacy PE, Scharp DW. Automated islet isolation from human pancreas. *Diabetes.* 1989;38 (Suppl 1):140-2.
  34. Kin T, Senior P, O'Gorman D, Richer B, Salam A, Shapiro A. Risk factors for islet loss during culture prior to transplantation. *Transpl Int.* 2008;21:1029-35.
  35. Isolation: Part II: purification and culture of human islets. *J Vis Exp.* 2009; 26: 27.
  36. Linetsky E, Ricordi C. Regulatory challenges in manufacturing of pancreatic islets. *Transplant Proc.* 2008;40:424-6.
  37. Yamamoto T, Horiguchi A., Ito M., Nagata H., Ricordi C., Miakawa S. Quality control for clinical islet transplantation: organ procurement and preservation, the islet processing facility, isolation, and potency tests. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2009;16:131-6.
  38. Barnett MJ, McGhee-Wilson D, Shapiro AM, Lakey JR. Variation in human islet viability based on different membrane integrity stains. *Cell Transplant.* 2004;13:481-8.
  39. Sotta ED, Madalozzo TM, Percegon L, Pereira J, Bignelli A, et al. Establishing an islet transplantation program in a developing country. *Transplant Proc.* 2004;36:1700-3.
  40. Kaddis JS, Olack BJ. Human pancreatic islets and diabetes research. *JAMA.* 2009;301:1580-7.
  41. Guignard PA. Cost analysis of human islet transplantation for the treatment of type 1 diabetes in the Swiss-French Consortium GRAGIL. *Diabetes Care.* 2004;27:895-900.
  42. Wonnacott K. Update on regulatory issues in pancreatic islet transplantation. *Am J Ther.* 2005;12:600-4.
  43. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 210 – Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Available from: URL [http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/resolucao210\\_04\\_08\\_03.pdf](http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/resolucao210_04_08_03.pdf).
  44. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. Available from: URL <http://www.abto.org.br>. Último acesso em 07 de dezembro de 2010.
  45. Contreras J, Eckstein C, Smyth C, Sellers M, Vilatoba M, Bilbao G, et al. Brain death significantly reduces isolated pancreatic islet yields and functionality in vitro and in vivo after transplantation in rats. *Diabetes.* 2003;52:2935-42.
  46. Tsujimura T, Kuroda Y, Churchill T, Avila J, Kin T, Shapiro AM, et al. Short-term storage of the ischemically damaged human pancreas by the two-lawyer method prior to islet isolation. *Cell Transplant.* 2004;13:67-73.
  47. Ricordi C, Fraker C, Szust J, Al-Abdullah I, Poggioli R, Kerlew T, et al. Improved human islet isolation outcome from marginal donors following addition of oxygenated perfluorocarbon to the cold-storage solution. *Transplantation.* 2003;75:1524-7.
  48. Caballero-Corbalan J, Eich T, Lundgren T, Foss A, Felldin M, Kallen R, et al. No beneficial effect of two-layer storage compared with UW-storage on human isolation and transplantation. *Transplantation.* 2007; 84: 864-9.
  49. Qin H, Matsumoto S, Klintmalm GB, De Vol EB. A meta-analysis for comparison of the two-layer and University of Wisconsin pancreata preservation methods in isle transplantation. *Cell Transplant.* 2010; Nov 19: Epub ahead of print. Available from: URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Qin+H+2010+and+pancreata>.
  50. O'Gorman D, Kin T, Murdoch T, Richer B, McGhee-Wilson D, Ryan EA, et al. The standardization of pancreatic donors for islet isolations. *Transplantation.* 2005;80:801-6.
  51. Sakuma, Y. Ricordi C, Miki A, Yamamoto T, Pileggi A, Khan A, et al. Factors that affect human islet isolation. *Transplant Proc.* 2008;40:343-5.
  52. Ponte GM, Pileggi A, Messinger S, Alejandro A, Ichii H, Baidol DA, et al. Toward maximizing the success rates of human islet isolation: influence of donor and isolation factors. *Cell Transplant.* 2007;16:595-607.

53. Lakey JR, Warnock GL, Rajotte RV, Suarez-Alamazor ME, Ao Z, Shapiro AM. Variables in organ donors that affect the recovery of human islets of Langerhans. *Transplantation* .1996;61:1047-53.
54. Rosenberg L, Wang R, Paraskevas S, Maysinger D. Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death. *Surgery*.1999;126:393-8.
55. Paraskevas S, Maysinger D, Wang R, Duguid T, Rosenberg L. Cell loss in isolated human islets occurs by apoptosis. *Pancreas*. 2000;20:270-6.
56. Linetsky E, Bottino R, Lehmann R, Alejandro R, Inverardi L, Ricordi C. Improved human islet isolation using a new enzyme blend, liberase. *Diabetes*. 1997;46:1120-3.
57. Huurman B, Hilbrands R, Pinkse G, Gillard P, Duinkerken G, Linde P van de, et al. Cellular islet autoimmunity associates with clinical outcome of islet cell transplantation. *Plos One*. 2008;3:e2435.
58. Shapiro AM, Lakey J, Ryan E, Baker S, Bourne W, Dinyari P, et al. 2007 update on allogeneic islet transplantation from the Collaborative Islet Transplant Registry (CITR). *Cell Transplant*. 2009;18:753-67.
59. Shapiro A, Ryan E, Lakey J. *Diabetes*. Islet cell transplantation. *Lancet*. 2001;358:S21.
60. Hirshberg B, Mog S, Patterson N, Leconte J, Harlan D. Histopathological study of intrahepatic islets transplanted in the nonhuman primate model using Edmonton protocol immunosuppression. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:5424-9.
61. Faradji RN, Monroy K, Messinger S, Pileggi A, Froud T, Baidal DA, et al. Simple measures to monitor beta-cell mass and assess islet graft dysfunction. *Am J Transplant*. 2007;7:303-8.
62. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Lakey JR, Brigan D, Shapiro AM. Beta-score: an assessment of beta-cell function after islet transplantation. *Diabetes Care*. 2005;28:343-7.
63. Caumo A, Maffi P, Nano R, Bertuzzi F, Luzi L, Secchi A, et al. Transplant estimated function: a simple index to evaluate beta-cell secretion after islet transplantation. *Diabetes Care*. 2008;31:301-5.
64. Toso C, Valle J, Morel P, Ris F, Demuylder-Mischler S, Lepetit-Coiffe M, et al. Clinical magnetic resonance imaging of pancreatic islet grafts after iron nanoparticle labeling. *Am J Transplant*. 2008;8:701-6.
65. Bell E, Cao X, Moibi JA, Greene SR, Young R, Frucco M, et al. Rapamycin has a deleterious effect on MIN-6 cells and rat and human islets. *Diabetes*. 2003;52:2731-9.
66. Zhang N, Su D, Qu S, Tse T, Bottino R, Balamurugan AN, et al. Sirolimus is associated with reduced islet engraftment and impaired beta-cell function. *Diabetes*. 2006;55:2429-36.
67. Zahr E, Molano RD, Pileggi A, Ichii H, Jose SS, Bocca N, et al. Rapamycin impairs in vivo proliferation of islet beta-cells. *Transplantation*. 2007;84:1576-83.
68. Paty BW, Harmon JS, Marsh CL, Robertson RP. Inhibitory effects of immunosuppressive drugs on insulin secretion from HIT-T15 cells and Wistar rat islets. *Transplantation*. 2002;73:353-7.
69. Bianconi L, Ricordi C. Pancreatic islet transplantation: an update. *Cell Transplant*. 2002. 11: 309.

Recebido: 17/11/2010

Aceito: 15/12/2010