Alexandre Sarubbi Raposo do Amaral

A suplementação com glutathiona-etil-éster durante o isolamento de ilhotas pancreáticas em roedores melhora a viabilidade celular e os resultados do transplante de ilhotas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia
Orientador: Profa. Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Amaral, Alexandre Sarubbi Raposo do

A suplementação com glutathione-etil-éster durante o isolamento de ilhotas pancreáticas em roedores melhora a viabilidade celular e os resultados do transplante de ilhotas / Alexandre Sarubbi Raposo do Amaral. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella.

Descritores: 1.Diabetes mellitus 2.Apoptose 3.Estresse oxidativo
4.Transplante das ilhotas pancreáticas

USP/FM/DBD-169/12

Este estudo foi concebido e desenvolvido no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM 25) do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas de Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Alguns estudos foram realizados no Laboratório de Transplante de Ilhotas do Prof. Dr. A.M. James Shapiro, na Universidade de Alberta, Edmonton, CA.

Este projeto foi desenvolvido com apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Bolsa de Doutorado Direto 08/52894-7 e Auxílio Regular a Pesquisa 08/57945-9.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luiz Antonio e Cristina.

À minha esposa, Isabella.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo o amor que vocês me proporcionam. Obrigado por dedicar suas vidas a nos dar educação, conforto e carinho.

À minha querida esposa Isabella, por me mostrar o verdadeiro amor incondicional. Obrigado pela compreensão, paciência, amizade e companheirismo em todos os dias de nossa vida. Vencer as dificuldades da vida é mais fácil ao seu lado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Lúcia C. Corrêa-Giannella, pelos vastos ensinamentos durante toda a pós-graduação. Obrigado por sua disponibilidade e paciência sempre presentes, em todos os momentos. Tenho certeza que sua amizade me ajudou a superar todos os obstáculos desta tese com mais facilidade.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Ferreira Galvão, por ter me estimulado, ainda durante o curso de medicina, a ter interesse pelo conhecimento científico. Obrigado pela disponibilidade e amizade.

Ao Prof. Dr. A.M. James Shapiro e à Rena Pawlick (University of Alberta, Edmonton, CA), pelo generoso acolhimento, por compartilhar sua vasta experiência com transplante de ilhotas e colaborar com a execução desta tese. O estágio em seu laboratório me possibilitou experiências pessoais e profissionais ímpares.

Ao Prof. Dr. Gordon Weir (Joslin Diabetes Center, Boston, EUA), pelos ensinamentos e sugestões dadas durante meu estágio em seu laboratório, na fase inicial deste projeto.

À Erika Rodrigues e Flávia Costal, pela grande amizade e companheirismo durante nossos dias de trabalho no laboratório.

À Profa. Dra. Marcia Nery, pelos ensinamentos nas discussões sobre Diabetes Mellitus.

Aos meus irmãos, Fábio e Luciana e à minha cunhada Cibeles pelo carinho e amizade de todos os momentos.

Aos meus tios Maria Eugênia e Goffredo e a minha prima Olivia, pelo carinho e incentivo desde os primeiros passos da minha formação.

Aos meus sogros, Roberto e Teresa, meus cunhados Fernanda e Alexander e minha sobrinha Mariana, pelo carinho e apoio de todos os momentos.

À Norisa, pelo auxílio com a burocracia do dia a dia no laboratório.

A toda a minha família, pelo carinho e compreensão com os meus momentos de ausência durante a realização desta tese.

A todos os colegas do LIM 25, que deixaram o dia a dia do laboratório mais acolhedor.

Aos colegas do LIM 37, pela ajuda na manutenção e cuidado com os animais.

A todos com quem tive a oportunidade de trabalhar e aprender durante os anos de realização desta tese.

À Disciplina de Endocrinologia da FMUSP.

À FAPESP.

“All dreams can come true if we have the courage to pursue them.”

Todos os sonhos podem se tornar realidade se tivermos a coragem para perseguí-los.

Walt Disney

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Diabetes mellitus e complicações crônicas	2
1.2. Terapias de Substituição	3
1.2.1. Transplante de pâncreas total	3
1.2.2. Transplante de ilhotas pancreáticas	5
1.3. Dificuldades relacionadas aos transplantes de pâncreas total e de ilhotas	7
1.4. Estresse oxidativo	11
1.5. Estresse oxidativo e transplante	15
2. OBJETIVO	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Animais e materiais	20
3.2. Isolamento de ilhotas pancreáticas	20
3.3. Suplementação da solução de colagenase com glutathione mono etil-éster... ..	22
3.4. Avaliação de espécies reativas de oxigênio	23
3.5. Avaliação da integridade da membrana celular	25
3.6. Avaliação da permeabilidade da membrana mitocondrial	25
3.7. Avaliação da viabilidade das células beta pancreáticas	26

3.8. Detecção de apoptose pela técnica de TUNEL	28
3.9. Avaliação da secreção de insulina estimulada por glicose	30
3.10. Indução de diabetes nos camundongos com estreptozotocina	31
3.11. Transplante de ilhotas em camundongos diabéticos	31
3.12. Teste de tolerância à glicose intraperitoneal	33
3.13. Conteúdo de insulina no enxerto	34
3.14. Análise estatística	34
4. RESULTADOS	37
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÃO	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

150 – enxerto com 150 ilhotas não tratadas

150 GEE – enxerto com 150 ilhotas tratadas com glutathiona-etil-éster

500 – enxerto com 500 ilhotas não tratadas

500 GEE – enxerto com 500 ilhotas tratadas com glutathiona-etil-éster

< menor

> maior

/ dividido

β – beta

γ – gama

μL – microlitro

μm – micrômetro

μM - micromolar

7-AAD - 7-aminoactinomicina-D

ADA - American Diabetes Association

ADP – adenosina difosfato

ATP – adenosina trifosfato

AUC – área sob a curva

$^{\circ}\text{C}$ – grau Celsius

Carboxi- H_2DCFDA - diacetato de 5-6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína

Cis – cisteína

CMRL – meio de cultura *Connaught Medical Research Laboratory*

Cu/Zn – Cobre / Zinco

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol (corante fluorescente para DNA)

DCCT – *Diabetes Control and Complication Trial*

DM – diabetes mellitus

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDIC – *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ERO – espécies reativas de oxigênio

et al. – e outros

FITC - *Fluorescein isothiocyanate*

g – grama

GEE – glutathiona-etil-éster

Gli – glicina

GLP-1 - glucagon-like peptide-1

Glu - glutamato

GMP – good manufacturing practice

GSH – glutathiona

HBSS - solução tamponada de Hanks

H₂O₂ –peróxido de hidrogênio

HO_2^- – hidroxiperoxil

Hoescht 33342 – corante fluorescente

IEq – equivalentes de ilhotas

IL-1 – interleucina 1

IL-2 – interleucina 2

IL-6 – interleucina 6

IPGTT - Teste de tolerância à glicose intraperitoneal

IPTR - International Pancreas Transplant Registry

ITR - International Islet Transplant Registry

C-1 – reagente fluorescente para análise da permeabilidade mitocondrial

kg – kilograma

mg/dL – miligrama por decilitro

mg/mL – miligrama por mililitro

mg/kg – miligrama por kilograma

min - minuto

mL – mililitro

mM – milimolar

mmol – milimol

mmol/L – milimol por litro

Mn – manganês

n – tamanho da amostra

n° - número

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NG – *Newport Green*

ng/mL – nanograma por mililitro

nm – nanômetro

nM – nanomolar

O₂⁻ - ânion superóxido

OH – radical hidroxil

p – significância estatística

PAK – transplante de pâncreas após rim

PBS – tampão fosfato salino

PE 50 – tubo de polietileno de 50 mL

PTA – transplante de pâncreas isolado

rpm – rotações por minuto

SFB – soro fetal bovino

SOD – superóxido desmutase

SPKT – transplante simultâneo pâncreas/rim

SSC - tampão citrato-salino

TdT –desoxinucleotidil transferase terminal

TMRE - tetrametilrodamina-etil-éster

TNF – fator de necrose tumoral

TRITC – tetrametil rodamina isotiocianato

TUNEL - *Terminal deoxynucleotidetransferased UTP nick end labeling*

UKPDS - *United Kingdom Prospective Diabetes Study*

UW – *University of Wisconsin*

RESUMO

RESUMO

AMARAL, ASR. A suplementação com glutathiona-etil-éster durante o isolamento de ilhotas pancreáticas em roedores melhora a viabilidade celular e os resultados do transplante de ilhotas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2012.

As complicações relacionadas ao diabetes mellitus estão intimamente ligadas à hiperglicemia. Os pacientes que evoluem com grande instabilidade metabólica e progressão das complicações microvasculares apesar do tratamento intensivo com insulina são candidatos ao transplante de pâncreas. Neste contexto, o transplante de ilhotas pancreáticas surge como alternativa por ser menos invasivo e menos imunogênico. No entanto, o processo de digestão do pâncreas e isolamento das ilhotas pancreáticas expõe as células endócrinas a diversos estímulos nocivos, que resultam em diminuição da viabilidade das células isoladas e menor chance de sucesso após o transplante. A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e o consumo das defesas anti-oxidantes durante o processo de digestão do pâncreas pode contribuir para a perda da viabilidade das ilhotas isoladas. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da suplementação com glutathiona etil mono-éster (GEE), um éster de melhor biodisponibilidade da glutathiona (um importante anti-oxidante endógeno) nos resultados do isolamento e do transplante de ilhotas pancreáticas em um modelo animal. GEE foi adicionada na concentração de 10 mM na solução de collagenase durante o isolamento das ilhotas de rato. Após o isolamento, foram realizados estudos *in vitro* para avaliar a presença de ERO com o ensaio carboxi- H_2DCFDA e a viabilidade das ilhotas isoladas com os ensaios JC-1 (integridade mitocondrial) e Sytogreen/brometo de etídio (integridade da membrana celular); viabilidade das células beta-pancreáticas por citometria de fluxo para avaliação de necrose e apoptose, TUNEL para a avaliação do índice de apoptose e secreção de insulina estimulada por glicose. Realizamos também estudos *in vivo*, com o transplante das ilhotas na cápsula renal de camundongos diabéticos, seguimento dos animais por 30 dias após o transplante e recuperação do enxerto para análise histológica. Quatro

grupos de animais foram avaliados: 1) Animais transplantados com número suficiente de ilhotas para reverter o diabetes (500) não isoladas com GEE; 2) Animais transplantados com número suficiente de ilhotas (500) isoladas em presença de GEE; 3) Animais transplantados com número insuficiente de ilhotas (150) não isoladas com GEE e 4) Animais transplantados com número insuficiente de ilhotas (150) isoladas em presença de GEE. A suplementação com GEE na concentração de 10 mM durante o isolamento das ilhotas diminuiu a formação de ERO (Controle $57,0 \pm 4,3\%$ *versus* GEE $47,0 \pm 3,9\%$, $p = 0,0034$) e aumentou a viabilidade das ilhotas, conforme demonstrado pelo ensaio Sytogreen/brometo de etídio (Controle $70,6 \pm 3,4\%$ *versus* GEE $83,6 \pm 4,8\%$, $p = 0,0010$) e pela diminuição na porcentagem de células TUNEL-positivas (Controle de $39,2 \pm 5,0\%$ *versus* GEE $29,1 \pm 1,9\%$, $p = 0,042$) no grupo tratado. O estudo de viabilidade por citometria de fluxo também mostrou um número maior de células beta pancreáticas viáveis no grupo tratado (Controle $21,4 \pm 3,4\%$ *versus* GEE $33,7 \pm 3,9\%$, $p = 0,0156$). A manutenção da integridade funcional das ilhotas teve impacto nos resultados dos transplantes, com menor índice de célula TUNEL-positivas (Controle $23,3 \pm 2,6\%$ *versus* GEE $8,3 \pm 0,8\%$, $p < 0,0001$) nos enxertos recuperados após as primeiras 24 horas do transplante e maior porcentagem de animais normoglicêmicos (Controle 30% *versus* GEE 65,2%, $p = 0,004$) após transplante de um número marginal de 150 ilhotas na cápsula renal após seguimento de 30 dias. Em conclusão, estes dados corroboram que a formação de ERO é uma causa relevante de dano celular durante o isolamento de ilhotas pancreáticas e sugerem que o uso do compostos anti-oxidante GEE pode ser uma estratégia para melhorar os resultados dos transplantes de ilhotas.

Descritores: 1. Diabetes mellitus, 2.Apoptose; 3.Estresse oxidativo; 4.Transplante de ilhotas pancreáticas

SUMMARY

SUMMARY

AMARAL, ASR. Glutathione ethyl ester supplementation during pancreatic islet isolation improves viability and transplant outcomes in a murine marginal islet mass model [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2012.

The vascular complications related to Diabetes Mellitus are closely linked to hyperglycemia. Patients who develop metabolic instability and progression of microvascular complications despite intensive insulin therapy are candidates to pancreas transplantation. Pancreatic islet transplant is an alternative approach since it is less immunogenic and minimally invasive. However, the success of pancreatic islet transplantation still faces many challenges, mainly related to cell damage during the islet isolation process and early post-transplant period. The increase in reactive oxygen species (ROS) generation and the consumption of antioxidant defenses might be factors related to these injuries. The aim of the present study was to evaluate whether supplementation with glutathione-ethyl-ester (GEE), a compound with higher bioavailability than glutathione (an important endogenous antioxidant), could improve islet viability and efficacy in a marginal islet transplantation model in rodents. GEE was added to a final concentration of 10 mM in collagenase solution during islet isolation. After isolation, *in vitro* studies were conducted to evaluate the presence of ROS using carboxy-H2DCFDA assay and the viability of isolated islets with JC-1 assay (mitochondrial integrity), Sytogreen/ethidium bromide assay (cellular membrane integrity), fractional beta cell viability assay by flow cytometry, TUNEL assay for apoptosis evaluation and glucose-stimulated insulin secretion. We also performed *in vivo* studies with islet transplantation under the kidney capsule of diabetic mice, 30 days follow-up after transplantation and recovery of the graft for histological analysis. Four experimental groups were evaluated: 1) animals transplanted with 500 islets, a number considered sufficient to promote diabetes reversion, not isolated in presence of GEE; 2) animals transplanted with 500 islets isolated in presence of GEE; 3) animals transplanted with 150 islets, a number considered insufficient to promote diabetes reversion, not isolated in presence of GEE and 4) animals transplanted with 150 islets isolated in presence of GEE. The

addition of GEE at 10 mM concentration during islet isolation was able to decrease ROS content in isolated islets (Control $57.0 \pm 4.3\%$ *versus* GEE $47.0 \pm 3.9\%$, $p = 0.0034$) and increase islet viability, as demonstrated by the Sytogreen/ethidium bromide assay (Control $70.6 \pm 3.4\%$ *versus* GEE $83.6 \pm 4.8\%$, $p = 0.0010$) as well as by the reduction in TUNEL-positive cells (Control $39.2 \pm 5.0\%$ *versus* GEE $29.1 \pm 1.9\%$, $p = 0.042$) in the treated group. The fractional beta-cell viability also showed an improvement in the treated group (Control $21.4 \pm 3.4\%$ *versus* GEE $33.7 \pm 3.9\%$, $p = 0.0156$). The improved cell viability observed *in vitro* was translated into better outcomes *in vivo*, since supplementation of GEE during the isolation process resulted in a significantly lower rate of TUNEL-positive cells (Control $23.3 \pm 2.6\%$ *versus* GEE $8.3 \pm 0.8\%$, $p < 0.0001$) in the islet grafts recovered after 24h of transplantation and in a higher percentage of normoglycemia (Control 30% *versus* GEE 65.2%, $p = 0.004$) after 30 days of follow-up in animals transplanted with the marginal islet mass (150 islets). In conclusion, the current data corroborate that ROS production is a relevant cause of cellular damage during islet isolation and suggest that the use of GEE might be a strategy to improve islet transplantation outcomes.

Keywords: 1.Diabetes mellitus; 2.Apoptosis, 3.Oxidative stress 4. Pancreatic islet transplantation

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellitus e complicações crônicas

O diabetes mellitus (DM) compreende um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de déficits na secreção de insulina, diminuição em sua ação ou ambos ¹.

As complicações relacionadas ao DM estão intimamente ligadas à hiperglicemia. O *Diabetes Control and Complication Trial (DCCT)* demonstrou redução significativa na frequência de complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) no DM tipo 1 submetido ao tratamento intensivo da hiperglicemia². Posteriormente, o seguimento do DCCT denominado *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC)* confirmou o benefício da insulinoterapia intensiva na diminuição do risco de complicações microvasculares e de doença cardiovascular³. Os dados do *United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)* reforçaram as conclusões do DCCT, documentando a diminuição das complicações no DM tipo 2 ^{4,5}.

Logo, nos pacientes que evoluem com falência pancreática e insulinopenia acentuada, o tratamento com insulina exógena deve ser precoce e otimizado. No entanto, nenhuma formulação de insulina exógena disponível hoje é capaz de mimetizar a excursão nictemeral fisiológica deste hormônio, sendo necessárias múltiplas aplicações de insulina exógena com tempos de liberação diferentes.

Apesar dos avanços na terapia com bomba de insulina, a proposta de um substituto mecânico para a ilhota pancreática, auto-sustentado, capaz de interpretar

em tempo real as variações glicêmicas e corrigi-las sem a interferência humana ainda não se concretizou ⁶.

1.2 Terapias de Substituição

Até o momento, as únicas alternativas de retomada da secreção endógena de insulina pela reposição de células β em pacientes diabéticos insulinopênicos são o transplante de pâncreas e o transplante de ilhotas pancreáticas. Ambos os procedimentos esbarram no maior obstáculo para todos os transplantes: a escassez de órgãos ⁷. A grande maioria dos procedimentos com pâncreas ou ilhotas é feita com órgãos de doadores cadáver: em morte encefálica ou, mais recentemente, depois de parada cardíaca ⁸. A busca por novas fontes de células para implante, por diferenciação de células embrionárias ou somáticas, ainda esbarra em problemas éticos e técnicos. Avanços nas técnicas de preservação do órgão, na técnica cirúrgica do transplante, na imunossupressão, no diagnóstico de rejeição e no manejo das complicações pós-procedimento têm levado a progressos significativos na sobrevida geral dos enxertos e dos pacientes ⁹.

1.2.1 Transplante de pâncreas total

Apesar do transplante renal ser o mais comumente realizado em portadores de DM, o transplante simultâneo de pâncreas e rim (SPKT) é o que apresenta melhores resultados de sobrevida, quando comparado ao transplante renal de doador cadáver, sobretudo em pacientes jovens, com resultados de perda do enxerto semelhantes ao transplante de rim isolado com doador vivo ⁹⁻¹¹. O transplante de pâncreas isolado (PTA) tem indicações e resultados limitados em relação ao transplante pâncreas/rim.

A *American Diabetes Association* (ADA) sugere que o transplante de pâncreas isolado seja considerado apenas para pacientes com história de descontrole metabólico (cetoacidose, hiperglicemia ou hipoglicemia) frequente com necessidade de internação e intervenção médica, nos pacientes com limitações clínicas ou emocionais incapacitantes relacionadas à insulinoterapia ou naqueles com falência consistente de todas as possibilidades de tratamento clínico para evitar as complicações da doença ¹².

Segundo dados do *International Pancreas Transplant Registry* (IPTR), entre os anos de 1966 e 2008 mais de 30.000 transplantes de pâncreas foram realizados. Destes, 78% foram SPKT, 17% pâncreas após rim (PAK) e 7% PTA. Entre 2004 e 2008, a sobrevida dos pacientes em 1 ano foi de 95,2% no SPKT, 96,9% no PAK e de 96,4% no PTA. Em relação ao enxerto, 84,9% dos pacientes submetidos ao SPKT, 78,6% ao PAK e 78,9% ao PTA mantiveram sua função após 1 ano ¹³.

Apesar de promover bom controle glicêmico e melhorar a qualidade de vida do receptor, o tecido exócrino do enxerto aumenta a imunogenicidade do transplante e, conseqüentemente, a rejeição. A necessidade de imunossupressão mais acentuada aumenta as chances de efeitos adversos das drogas e da baixa imunidade. Além disto, a drenagem das secreções exócrinas aumenta significativamente a morbidade do pacientes, com complicações como acidose metabólica, cistite e uretrite químicas quando se realiza a drenagem vesical e, nos casos de PTA, dificuldade de monitorização da rejeição quando é realizada a drenagem entérica ⁹.

1.2.2 Transplante de ilhotas pancreáticas

Uma vez que apenas 1 a 1,5% da massa do pâncreas corresponde ao tecido endócrino necessário para o controle do DM e que o tecido exócrino gera grande resposta imunológica, o transplante de ilhotas pancreáticas surge como uma alternativa natural ao transplante de pâncreas. O primeiro relato data de 1893, numa tentativa de xenotransplante com fragmentos de pâncreas de carneiro ¹⁴. Apenas em 1972, Lacy reverteu o DM em ratos, com o transplante de ilhotas pancreáticas ¹⁵. Contudo, os resultados posteriores em tentativas clínicas mostraram-se frustrantes.

Dados do *International Islet Transplant Registry* (ITR) ¹⁶ de 1983 até dezembro de 2000 documentam um total de 493 transplantes realizados em diversos centros do mundo com taxas progressivamente piores de pacientes independentes de insulina após o implante: 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. Com o passar dos anos, a qualidade dos transplantes melhorou. Num total de 237 transplantes realizados entre 1990 e 1999 registrados no ITR, a sobrevida dos receptores em 1 ano foi de 96% e dos enxertos (definido como peptídeo C basal >0,5 ng/mL) foi de 41%. Já a proporção de pacientes livres de insulina em 1 ano foi de apenas 11 %. O transplante de mais de 6.000 equivalentes de ilhotas (IEq) por kg, o isolamento com tempo de isquemia fria menor que 8 horas e a indução de imunossupressão com anticorpos anti-células T levaram a maiores taxas de independência de insulina.

Em 2000, Shapiro et. al. publicaram uma série de 07 pacientes submetidos ao transplante isolado de ilhotas pancreáticas ¹⁷. Os pacientes tinham média de idade de 44 anos (variando de 29 a 54 anos) e média de duração do DM de 35 anos (variando de 18 a 50 anos). Os critérios de inclusão foram: portadores de DM tipo 1 há mais de

5 anos, com peptídeo C < 0,48 ng/mL, com grande descontrole glicêmico apesar de insulinoterapia, hipoglicemias recorrentes com coma ou instabilidade metabólica, nos quais o risco do transplante e da imunossupressão foram considerados menores que o risco determinado pela labilidade do DM. Várias modificações foram introduzidas no protocolo de transplante, das quais as mais importantes foram a indução da imunossupressão com o daclizumabe (anticorpo anti-receptor de IL-2), uso de sirolimus e tacrolimus com a retirada do glicocorticoide, melhora na qualidade da preparação das ilhotas com transplante no fígado imediatamente após o isolamento, além da utilização total de mais de 11.000 equivalentes de ilhotas (IEq)/kg. Seis pacientes precisaram de um segundo implante e um paciente necessitou do terceiro para a normalização da hemoglobina glicada (HbA_{1c}) e independência de insulina exógena diária após seguimento de 11,9 meses (variando entre 4,4 e 14,9 meses). Estas adaptações ficaram conhecidas como protocolo de Edmonton¹⁷. Em 2005, o mesmo grupo publicou uma casuística de 65 pacientes para analisar os resultados de um seguimento de 5 anos, que revelou que 80% dos pacientes apresentavam secreção de peptídeo C, mas somente 10% estavam independentes de insulina¹⁸. Embora esses resultados sejam promissores e demonstrem melhora na instabilidade glicêmica de uma parte significativa dos pacientes, eles deixam evidente a necessidade de se obter melhoras adicionais na preservação da função das ilhotas transplantadas.

Entre setembro de 2003 e outubro de 2005 o estudo GRACIL 2 acompanhou 10 portadores de DM tipo 1 magros, com terapia insulínica intensiva e hipoglicemias graves, sem complicações micro ou macrovasculares diagnosticadas¹⁹. Esses pacientes receberam 11.089 ± 505 IEq/kg, sendo que apenas um pacientes recebeu

5.398 IEq/kg. O protocolo de imunossupressão foi o descrito no protocolo de Edmonton. Após 1 ano, 5 pacientes (50%) não estavam usando insulina, mas apenas 3 (30%) tinham a $HbA_{1C} < 6,5\%$, a glicemia pós-prandial < 180 mg/dL e o índice de amplitude de variação da glicemia < 60 mg/dL sem insulina exógena e com peptídeo C basal $> 0,5$ ng/mL.

Para testar a reprodutibilidade do protocolo de Edmonton, foi organizado pela *Immune Tolerance Network – National Institutes of Health* ²⁰ um estudo envolvendo 9 centros de transplante de ilhotas. A conclusão do estudo confirmou os avanços do protocolo de Edmonton em portadores de DM tipo 1 sem complicações e com controle metabólico instável, mas ressaltou a dificuldade na manutenção da independência de insulina, apesar da melhora das hipoglicemias e da HbA_{1C} .

1.3 Dificuldades relacionadas ao transplante de ilhotas pancreáticas

Além da escassez de órgãos para transplante, o transplante de ilhotas pancreáticas ainda enfrenta desafios maiores, principalmente relacionados com a perda de células durante o processo de isolamento, qualidade das células isoladas, baixa reserva funcional das ilhotas, além das perdas durante e após o implante, relacionadas ao local do enxerto, à apoptose, à alorejeição e à auto-imunidade. As principais estratégias para otimizar o transplante de ilhotas pancreáticas visam melhorar estes aspectos ²¹.

Os danos celulares começam a ocorrer antes da captação do órgão. Critérios de seleção excluem morbididades prévias e definem o melhor doador, evitando a alocação de órgãos inadequados para transplante ²². A morte encefálica está relacionada à

produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF, IL-1 β e IL-6 que induzem morte celular, diminuindo a viabilidade das células e a qualidade do enxerto ²³.

As ilhotas pancreáticas são bastante susceptíveis à isquemia e precisam de ótimo suprimento para a manutenção da viabilidade. A isquemia e a reperfusão causam grande dano ao tecido pancreático, irreversíveis após períodos prolongados ²⁴. Diferentes métodos e soluções de preservação tentam reduzir os efeitos negativos da hipóxia tecidual, sendo o principal deles a hipotermia com infusão intrapancreática da solução de preservação UW (*University of Wisconsin*) contendo glicose, eletrólitos, glutatona, alopurinol, adenosina e outros substratos metabólicos que mantêm a integridade celular. Apesar da solução UW poder preservar o pâncreas por períodos maiores que 24 horas, quanto maior o tempo, pior a qualidade do enxerto. Mais recentemente, o desenvolvimento de novos métodos de preservação de órgãos, como a solução de perfluorcarbono com alta afinidade por oxigênio associada ao UW (método de duas camadas) tem otimizado a preservação do órgão ²⁵.

O isolamento das ilhotas pancreáticas é composto por várias fases. Após a retirada do doador, as ilhotas são mantidas em hipotermia com solução de preservação até o início do isolamento. A seguir, uma solução de colagenase é infundida no ducto pancreático para digestão do tecido exócrino e separação das ilhotas. O pâncreas é cortado e colocado numa câmara a 37 °C. Segue-se um período de agitação para que a separação do tecido se dê por digestão enzimática e mecânica. A separação final dos tecidos exócrino e endócrino é feita por gradiente de densidade ^{26,27}.

As funções do pâncreas endócrino estão intimamente relacionadas com sua micro-arquitetura. A interação entre ilhotas, além da microcirculação, da inervação e do contato com o tecido acinar e mesenquimal são essenciais desde a morfogênese embrionária, passando pelo crescimento, diferenciação até a formação de células secretoras maduras ²⁸. O controle do metabolismo da glicose é dependente não somente da integridade das ilhotas, mas da interação entre células beta e não beta dentro da ilhota pancreática e com as células vizinhas ^{29,30}. Por isto, um enorme desafio para a viabilidade e função das ilhotas pancreáticas é o processo de digestão e separação do tecido exócrino que antecede o transplante celular. Durante o processo de isolamento, o trauma mecânico e a exposição à collagenase, endotoxinas e enzimas pancreáticas fragmentam as ilhotas, danificando-as da periferia para o centro, o que resulta em maior lesão das células não-beta, localizadas na periferia ³¹.

A complexa rede vascular e neuronal do pâncreas é destruída, modificando de maneira significativa a comunicação bioquímica entre as células. As mudanças sofridas durante o período de isolamento resultam em um estado pró-inflamatório e de estresse oxidativo, com perda de viabilidade celular e apoptose ³², que se inicia logo após o isolamento e que está intimamente relacionado ao insucesso no transplante de ilhotas ³³.

O sítio de implante também contribui para a perda de viabilidade. Apesar do espaço subcapsular renal ser o sítio mais utilizado em modelos animais, pela facilidade de recuperação do enxerto, o fígado é o local de escolha para o transplante de ilhotas em humanos. Advoga-se que a circulação de sangue portal rico em fatores de crescimento, as ações fisiológicas da insulina e glucagon sobre o metabolismo da glicose no fígado e a facilidade da punção percutânea da veia porta seriam fatores

favoráveis. Por outro lado, a ação direta de drogas e nutrientes sobre as ilhotas antes da primeira passagem hepática e a dificuldade de biópsia posterior seriam pontos negativos do transplante na veia porta ³⁴.

Após a infusão, as ilhotas ficam sujeitas à resposta inflamatória inespecífica pelo contato com o sistema ABO, com ativação do sistema de coagulação e complemento sobre as ilhotas, alorejeição e auto-imunidade. Sem a micro-arquitetura protetora do pâncreas, as células transplantadas são nutridas e oxigenadas somente por difusão, pois a neogênese capilar demora de 7 a 14 dias para se completar. Este ambiente hostil com baixa tensão superficial de oxigênio, metabolismo anaeróbico, formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), presença de citocinas inflamatórias e estresse oxidativo é repleto de estímulos para a perda da viabilidade celular. Nos primeiros dias após o transplante, mesmo quando se mantém um ótimo controle metabólico, o tecido enxertado é exposto a condições bastante desfavoráveis até seu completo remodelamento, com grande disfunção e perda de células ³⁵. Estima-se que apenas 30 % das ilhotas transplantadas permaneçam viáveis em um enxerto estável ³⁶, o que torna necessária a utilização total de 2 a 4 pâncreas ¹⁸ em 2 a 3 infusões para manter um bom controle metabólico.

Várias tentativas de aumentar a viabilidade e diminuir a apoptose das células têm sido propostas, principalmente relacionadas à otimização do isolamento, intervenções farmacológicas, novos protocolos de imunossupressão, entre outros. Em relação às intervenções farmacológicas durante o isolamento e após o transplante, várias estratégias foram testadas, entre elas a utilização de fatores de crescimento ³⁷, de *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) e análogos ^{38,39}, de carreadores de oxigênio ⁴⁰, de compostos para diminuir a resposta inflamatória ⁴¹, de anticoagulantes ⁴² e de drogas

anti-apoptose^{43,44}. Além dessas, a diminuição das ERO têm se mostrado benéfica na preservação das células beta nativas⁴⁵ e transplantadas⁴⁶⁻⁴⁸.

1.4 Estresse oxidativo

A formação de compostos altamente reativos como ânion superóxido (O_2^-), radicais hidroxil (OH) e hidroxiperoxil (HO_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) acontece constantemente como produtos do metabolismo normal, estando envolvidos em funções fisiológicas tais como a cadeia respiratória na mitocôndria, a regulação de sinalização intracelular e o estímulo proliferativo. O aumento na formação de ERO ou, também, a diminuição na capacidade de resposta anti-oxidante da célula denomina-se estresse oxidativo⁴⁹ e está associado à ativação de cascatas de sinalização que culminam em inflamação, aumento de expressão de moléculas de adesão e quimiotaxia de leucócitos, danos ao material genético, disfunção e morte celular por apoptose e necrose.

Um número crescente de evidências tem sugerido que a formação excessiva de ERO seria o mecanismo unificador^{50,51} na patogênese das complicações crônicas⁵² e na evolução do DM na medida em que induz diminuição da transcrição do gene da insulina, disfunção secretória⁵³ e apoptose de células beta⁵⁴. Mais recentemente, as ERO têm sido implicadas no comprometimento da qualidade do isolamento de ilhotas⁴⁶ e na piora dos resultados do transplante de ilhotas pancreáticas⁵⁵. As células beta pancreáticas parecem ser particularmente suscetíveis e vulneráveis ao estresse oxidativo por apresentarem menor capacidade anti-oxidante quando comparadas a outros tipos celulares. Estudos em animais mostraram que a ilhota

pancreática expressa menor atividade dos principais anti-oxidantes endógenos: Cu/Zn superóxido dismutase (SOD), Mn SOD, catalase e glutathiona (GSH) ^{56,57}.

Para minimizar o dano celular e mitocondrial pelas ERO, um sistema anti-oxidante endógeno funcional é essencial. A SOD catalisa a reação de ânions superóxido com hidrogênio, formando H_2O_2 ; a Mn-SOD está ativa na mitocôndria e a Cu/Zn-SOD no citosol das células. As duas maiores defesas contra o H_2O_2 são a GSH, presente no citosol e na mitocôndria, e a catalase, armazenada nos peroxissomos. A GSH é o composto tiol mais importante nos mamíferos. Trata-se de um tripeptídeo constituído pelos aminoácidos glicina, ácido glutâmico e cisteína, que existe na maioria das células em concentrações compreendidas entre 0,1 e 10 mM, estando na sua maior quantidade no fígado. No meio extracelular, a concentração de GSH é bastante reduzida. Ela reage com diversos hidroperóxidos e lipoperóxidos, formando um álcool e GSH oxidada ou dissulfeto de GSH. A seguir, pode ser novamente reduzida com gasto de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) ou pode ser retirada da célula na forma oxidada por um transportador de membrana. No exterior da célula, a enzima γ -glutamyl-transpeptidase quebra a molécula em γ -glutamyl e cisteína-glicina; a enzima dipeptidase separa a glicina da cisteína. Vários transportadores trazem os três peptídeos de volta ao citosol, onde serão unidos: a enzima glutamato-cisteína ligase une o glutamato à cisteína com gasto de ATP e, posteriormente, a enzima glutathionasintase acrescenta a glicina, formando novamente a GSH ⁵⁸. A Figura 1 ilustra o metabolismo da GSH.

A administração oral de GSH resulta em baixa absorção devido à sua hidrólise no intestino e no fígado ⁵⁹. Já a administração parenteral, endovenosa ou intraperitoneal, é efetiva em aumentar as concentrações plasmáticas da GSH ⁶⁰⁻⁶²,

mas não garante grande concentração no citosol, pois o transporte através da membrana é limitado. Quando administrada na forma de mono ou di-éster, a GSH é transportada de maneira mais eficaz para o interior da célula, portanto, essas formas apresentam melhor biodisponibilidade ⁶³⁻⁶⁶.

Diversas síndromes isquêmicas têm sido associadas à diminuição das concentrações celulares de GSH, com melhora dos resultados após tratamento com esse anti-oxidante: isquemia miocárdica⁶⁷, cerebral⁶⁸ e renal ⁶⁹, entre outras. A pancreatite está relacionada à geração de ERO, depleção de GSH e dano tecidual ⁷⁰, com bons resultados sendo obtidos após suplementação de GSH em modelo experimental⁷¹.

Figura 1 – Metabolismo da glutatona e transporte transmembrana do éster de glutatona (GEE). Adaptado de Dickinson D, et al⁵⁸.

1.5 Estresse oxidativo e transplante

A lesão causada pelo processo de isquemia/reperfusão de um órgão é um mecanismo importante de injúria celular no transplante em geral. A ativação de neutrófilos contribui para a lesão de reperfusão, enquanto as lesões por hipóxia são mediadas por EROe por espécies reativas de nitrogênio. A mitocôndria hipóxica ou reoxigenada produz e libera O_2^- e H_2O_2 em excesso ⁷². A suplementação de GSH (3mmol/L de GSH total) na solução de preservação UW tenta minimizar o impacto das ERO no enxerto ⁷³. No entanto, o estresse oxidativo ocorre de maneira sustentada durante todo o processo de isolamento das ilhotas com formação contínua de ERO e consumo dos anti-oxidantes naturais.

Vários modelos de isquemia hepática em animais demonstram depleção tecidual da forma reduzida da GSH e proteção contra o estresse oxidativo e a lesão de reperfusão quando os níveis são recuperados ^{74,75}. As alterações isquêmicas e o dano oxidativo também ocorrem no transplante renal ⁷⁶, cardíaco ⁷⁷ e pancreático ⁷⁸.

Na tentativa de preservar as ilhotas desde o início do isolamento, a infusão intraductal de glutamina durante a digestão de pâncreas humanos de doadores cadáver reduziu o estresse oxidativo e a apoptose das ilhotas, preservando sua função após o transplante ⁴⁷. Em cultura de ilhotas pancreáticas muríneas, a adição de GSH aumentou a resposta secretória e preservou as células ⁷⁹. Em ilhotas humanas de doadores cadáveres diabéticos em cultura, a adição de GSH durante 24 horas diminuiu de forma significativa o estresse oxidativo e aumentou a secreção de insulina induzida por glicose. ⁸⁰.

A infecção de linhagens de células beta com adenovírus contendo o gene codificador da enzima GSH peroxidase protegeu as células em cultura do estresse

oxidativo e aumentou a secreção de insulina ⁸¹. Ainda, a superexpressão da glutamylcisteína ligase, enzima que une o glutamato e a cisteína dentro da célula para reconstituir a GSH, protegeu ilhotas de rato em cultura contra o estresse oxidativo ⁸². No transplante, ilhotas de ratos transgênicos que superexpressam as enzimas SOD e GSH peroxidase são protegidas desde o momento do isolamento, resultando em uma menor porcentagem de perda após o transplante⁸³.

Não encontramos estudos que tivessem avaliado o efeito da administração direta de GSH durante o isolamento de ilhotas e o impacto desta estratégia para melhorar a viabilidade e diminuir a quantidade de ilhotas necessárias para o sucesso do transplante de ilhotas. Optamos pela utilização de um éster da GSH denominado glutathione monoethyl-éster (GEE), por possibilitar mais biodisponibilidade intracelular da GSH ^{66,68}.

OBJETIVO

2. OBJETIVOS

Avaliar o impacto da suplementação de GEE durante o isolamento de ilhotas pancreáticas sobre a viabilidade celular e o resultado do transplante em roedores. Para tanto, serão estudados:

- a repercussão da suplementação de GEE no conteúdo de espécies reativas de oxigênio das ilhotas isoladas;
- a repercussão da suplementação de GEE na viabilidade das ilhotas isoladas;
- o impacto da suplementação de GEE nos resultados do transplante de ilhotas em roedores diabéticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e materiais

Ratos Wistar pesando entre 150 a 200g e camundongos BALB/c machos pesando entre 20 e 25g foram utilizados para o isolamento das ilhotas. Os animais ficaram acomodados em gaiolas com ração e água *ad libitum*, respeitando os princípios éticos para o uso de animais de laboratório estabelecido pela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais, anteriormente denominada Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital da Clínicas da Faculdade de Medicina da USP sob protocolo número 0556/08.

Todos os reagentes foram obtidos da empresa Sigma Aldrich (St. Louis, EUA), exceto quando especificado.

3.2 Isolamento de ilhotas pancreáticas

As ilhotas foram isoladas utilizando protocolos estabelecidos na literatura^{35,84}. Em cada isolamento de ilhotas de camundongo, 10 animais foram utilizados no grupo controle e 10 no grupo tratado. No isolamento de ilhotas de ratos, 05 animais foram utilizados no grupo controle e 05 no grupo tratado. Colagenase tipo V foi dissolvida em solução tamponada de Hanks (HBSS) na concentração de 1,0 mg/mL para camundongos e 0,7 mg/mL para ratos. No grupo tratado, a solução de colagenase foi suplementada com GEE conforme descrito no item 3.3. A indução anestésica foi feita com isoflurano. Após, os animais foram sedados com injeção

intraperitoneal de solução contendo os anestésicos Ketamina (20 mg/ml) e Xilazina (100 mg/mL) sendo que ratos receberam 0,4 ml e camundongos 0,04 ml da solução. Após punção do ducto pancreático, cada pâncreas de camundongo foi distendido com 2,5 mL da solução de collagenase. Em ratos, 10 mL da solução de collagenase foram utilizados na distensão do pâncreas. Procedeu-se à distensão dos pâncreas de maneira alternada entre controles e tratados. Após cada distensão, os pâncreas foram mantidos em solução de HBSS no gelo. Ao final do isolamento, os pâncreas de cada grupo foram colocados em um tubo cônico contendo 25 mL de solução de collagenase.

Os tubos foram mantidos em banho a 37°C por 15 min. para completar a digestão. O tecido foi filtrado em uma rede metálica para retirar a gordura e o material não digerido. Após duas lavagens em HBSS, as ilhotas foram purificadas em gradiente descontínuo.

No isolamento de ilhotas de camundongos, o *pellet* de ilhotas foi homogeneizado com 12,5 mL de Histopaque 1084. Sobre este, 6mL de Histopaque 21% (84 mL de Histopaque diluído em 16 mL de HBSS) foram adicionados cuidadosamente pela parede do tubo para não haver mistura. A seguir, 6mL de HBSS foram adicionados com o mesmo cuidado, para não misturar as densidades. Os tubos foram centrifugados a 2.000rpm por 10 min. (freios da centrifuga desativados nesta etapa). As ilhotas foram coletadas na densidade intermediária. No isolamento de ilhotas de ratos, o *pellet* foi homogeneizado em um volume de 15 mL de Histopaque 1077. Em seguida, 10 mL de meio de cultura foram adicionados lentamente para não misturar com o Histopaque. Após centrifugação por 17 min. a 2.500 rpm, as ilhotas foram recolhidas com pipeta na interface. Tanto para ratos como para camundongos,

foi utilizado um número máximo de 02 pâncreas por tubo durante o gradiente de densidade.

Após duas lavagens para remover o Histopaque das ilhotas coletadas, foi realizada a contagem da ilhotas. Alíquotas de ilhotas foram separadas para cada um dos experimento. Enquanto os ensaios de viabilidade eram realizados, as ilhotas destinadas ao transplante foram colocadas em cultura por curto prazo (1 hora) em meio CMRL-1066 (Mediatech, Manassas, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina (100 mg/L), penicilina (112 kU/L), estreptomicina (112 mg/L) e HEPES (25 mmol/L).

As ilhotas isoladas a partir de pâncreas de ratos foram utilizadas para os experimentos de permeabilidade da membrana mitocondrial (ensaio JC-1) e conteúdo intracelular de ERO (ensaio carboxi-H₂DCFDA), ambos utilizando microscopia de fluorescência e confocal. Em todos os demais experimentos, foram utilizadas ilhotas isoladas de camundongos.

3.3 Suplementação da solução de collagenase com glutathiona-monoetil-éster

Nos experimentos com camundongos e ratos, os pâncreas dos animais do grupo controle foram distendidos e digeridos em solução de collagenase sem GEE. Nos pâncreas do grupo tratado, GEE (Sigma Aldrich) foi pesada e adicionada à solução de collagenase na concentração de 10 mM. A distensão e a digestão do pâncreas do grupo tratado foram realizadas com a solução de collagenase suplementada com GEE.

3.4 Avaliação do conteúdo de espécies reativas de oxigênio

O conteúdo de ERO intracelular foi avaliado pelo corante fluorescente sensível a oxidação diacetato de 5-6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (Molecular Probes, Eugene, EUA). O Carboxi-H₂DCFDA atravessa a membrana celular e é desacetilado por esterases não específicas presentes no citoplasma. Em presença de ERO, a fluoresceína reduzida associada ao marcador é oxidada, emitindo fluorescência verde^{81,85}.

A solução estoque foi preparada adicionando-se 50 µL de DMSO a 275 µg de Carboxi-H₂DCFDA (solução de 10 mM). A solução utilizada no ensaio foi preparada adicionando-se 5,0 µL da solução 10 mM a 2,0 mL de tampão PBS (solução de 25 µM). As ilhotas coradas com Carboxi-H₂DCFDA foram analisadas por microscopia de fluorescência, microscopia confocal e citometria de fluxo.

Para microscopia de fluorescência, alíquotas contendo 100 ilhotas foram centrifugadas a 2.400 rpm por 7 min. em tubo Falcon de 15 mL. Após desprezar o sobrenadante, 200 µL de HBSS foram adicionados, o *pellet* foi cuidadosamente homogeneizado e transferido para um tubo tipo *ependorf*. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e 500 µL de solução 25 µM Carboxi-H₂DCFDA foram adicionadas ao *pellet*. As células foram incubadas a 37°C por 30 min. na estufa a 5% de CO₂. Após este período, as ilhotas foram lavadas três vezes com HBSS e analisadas no microscópio Zeiss Axiovert 200® (Carl Zeiss, Berlim, Alemanha) com filtros para visualização de fluorescência verde (530nm). Os resultados são expressos em intensidade da fluorescência verde.

Para microscopia confocal, alíquotas contendo 100 ilhotas foram centrifugadas a 2.400 rpm por 7 min. em tubo Falcon de 15 mL. Após desprezar o sobrenadante, 200 µL de HBSS foram adicionados ao *pellet*, que foi transferido para um tubo tipo *eppendorf*. Foram adicionados 5 µL da solução 10 mM carboxi-H₂DCFDA aos 200 µL. As ilhotas foram mantidas na geladeira durante a noite. No dia seguinte, foi adicionado 01 µL de Hoechst 33342 para corar os núcleos e 1,5 mL de HBSS foram utilizados para a lavagem (pelo menos duas). O *pellet* foi suspenso em 20 µL de glicerol com PBS, homogeneizado com pipeta e colocado na lâmina. A leitura foi feita imediatamente no microscópio confocal ZEISS LSM 510 Meta/UV localizado nas dependências do Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração (InCor).

Para os experimentos com citometria de fluxo, aproximadamente 100 ilhotas foram dissociadas com 1 mL de Accutase (InnovativeCell Technologies, San Diego, EUA) a 37 ° C. Após 10 min., 1 mL de SFB foi adicionado para interromper o processo. As células foram purificadas em um filtro de 40 µm. Após lavagem com PBS (centrifugação a 280 g durante 3 min.), 500 µL da solução de 25 µM de carboxi-H₂DCFDA foram adicionados e as células foram encubadas no escuro por 30 min. a 37 ° C. Após duas lavagens em PBS para remover o excesso do corante, as células foram analisadas por citometria de fluxo em citômetro BD LSR II (BD Biosciences, San Jose, EUA). Os dados foram analisados com o *software* FCS Express 3 (Software DeNovo, Los Angeles, EUA).

3.5 Avaliação da integridade da membrana celular

A integridade da membrana das ilhotas foi avaliada com a utilização dos corantes SytoGreen (Molecular Probes) e brometo de etídio seguindo métodos previamente estabelecidos ⁸⁶. O SytoGreen cora em verde células com membrana celular intacta e o brometo de etídio cora em vermelho células com membrana celular danificada. A perda da integridade da membrana celular esta ligada à morte celular. Alíquotas de 100 ilhotas foram analisadas sob microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TE300. Dois examinadores diferentes fizeram a contagem. As ilhotas foram classificadas quanto à cor em verde, vermelho e 50% (quando numa mesma ilhota havia as duas cores sem predominância de uma delas). A porcentagem foi calculada segunda a equação: % de viabilidade = $\frac{\text{n}^\circ \text{ de ilhotas verdes} + \text{n}^\circ \text{ de ilhotas 50\%}}{\text{n}^\circ \text{ de ilhotas verdes} + \text{n}^\circ \text{ de ilhotas vermelhas} + (2 \times \text{n}^\circ \text{ de ilhotas 50\%})}$.

3.6 Avaliação da permeabilidade da membrana mitocondrial

A detecção de morte celular pela análise da permeabilidade da membrana mitocondrial foi realizada utilizando-se o *kit MitoProbeJC-1 Assay Kit* (Molecular Probes). A perda do potencial de membrana mitocondrial como marcador do processo de apoptose pode ser detectado pelo marcador fluorescente JC-1 ^{85,87}.

Logo após o isolamento, alíquotas contendo 50 ilhotas foram transferidas para um tubo de 15 mL e centrifugadas a 4.000 rpm por 10 min. O *pellet* foi ressuspensionado em 500 µL de HBSS. Foram adicionados 7 µL do corante JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) . A seguir, as

células foram incubadas a 37°C por 20 min. na estufa a 5% de CO₂. Após diversas lavagens, as ilhotas foram ressuspensas em 200 µL de HBSS e a suspensão de células foi analisada no microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert 200® com filtros para visualização de fluorescência verde (530nm) e vermelha (590 nm). Os resultados foram analisados dividindo-se o valor da intensidade de fluorescência verde pelo valor da intensidade da coloração vermelha, calculados pelo *software* AxioVision nos grupos de ilhotas. A coloração vermelha indica mitocôndrias saudáveis, com potencial de membrana preservado. A coloração verde indica perda do potencial de membrana da mitocôndria.

Para as análises em microscópio confocal, alíquotas contendo 50 ilhotas foram centrifugadas a 2.400 rpm por 7 min. em tubo Falcon de 15 mL. Após desprezar o sobrenadante, o *pellet* foi homogeneizado em 200 µL de HBSS e transferido para um tubo tipo *ependorf*, no qual foram adicionados 7 µL do corante JC-1. As ilhotas foram deixadas na geladeira durante a noite. No dia seguinte, foi adicionado 1 µL de Hoechst 33342 para corar os núcleos e foram realizadas pelo menos duas lavagens com 1,5 mL de HBSS. O *pellet* foi ressuspendido em 20 µL de glicerol com PBS, homogeneizado com pipeta e colocado na lâmina. A leitura foi feita imediatamente no microscópio confocal ZEISS LSM 510 Meta/UV .

3.7 Avaliação da viabilidade das células beta pancreáticas

Seguindo protocolo publicado previamente, avaliamos a viabilidade de células beta pancreáticas por citometria de fluxo utilizando tripla coloração com *Newport Green* (NG), tetrametilrodamina-etil-éster (TMRE) e 7-aminoactinomicina-

D (7-AAD) ⁸⁸. O NG permite diferenciar as células beta pancreáticas baseado no conteúdo de zinco ao mesmo tempo em que o TMRE permite diferenciar células viáveis de células apoptóticas com base na integridade da membrana mitocondrial. O 7-AAD, adicionado ao final da coloração, permite apontar as células mortas, que perderam integridade da membrana celular.

Após o isolamento, as ilhotas foram dissociadas na presença de 1 mL de Accutase a 37 ° C. Após 10 min., 1 mL de SFB foi adicionado para interromper o processo. As células foram filtradas em filtro de 40 µm e lavadas em PBS (centrifugadas a 280g durante 3 min.). O *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de PBS e uma amostra de 12 µL foi transferida para uma placa de hemocítômetro para contagem. Após a contagem, o *pellet* foi ressuspensionado em PBS para uma concentração final de 10×10^6 células/µL e alíquotas de 30 µL foram transferidas para tubos de citometria. Para cada tratamento, obtivemos 5 tubos. Um deles foi deixado sem coloração e os outros tubos receberam coloração conforme descrito a seguir:

1. Adicionado 300 µL de PBS (sem coloração)
2. Adicionado 300 µL de NG 1 µM
3. Adicionado 300 µL de TMRE 100 nM
4. Adicionado 300 µL de PBS (adicionado 7-AAD ao final da incubação)
5. Adicionado 300 µL de solução composta NG/TMRE (1 µM / 100 nM)

Os tubos foram encubados por 45 min. a 37 ° C. Após a lavagem, 300 µL de 7-AAD (solução de 5 µg/mL) foram adicionados aos tubos 4 e 5. Os três corantes foram adquiridos da Invitrogen (Eugene, EUA). Após duas lavagens em PBS para remover o excesso do corante, as células foram analisadas por citometria de fluxo em

citômetro BD LSR II. O Newport Green tem excitação/emissão de fluorescência em 505/535 nm, captada pelo filtro de fluoresceína (FITC). O TMRE tem excitação/emissão de fluorescência em 549/547 nm e o 7-AAD em 550/672 nm. Ao menos 10.000 eventos foram considerados em cada análise. Os dados foram analisados usando o *software FCS Express 3*.

3.8 Detecção de apoptose pela técnica de TUNEL

A técnica denominada TUNEL (*Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling*), foi realizada por meio do ensaio *Dead End Fluorometric TUNEL System* (Promega, Madison, EUA), associado à coloração para núcleos com DAPI (Molecular Probes) ^{43,89}. A apoptose foi quantificada em ilhotas isoladas, em enxertos retirados 24 horas após a realização de transplante e em enxertos retirados 30 dias após o transplante.

As ilhotas foram fixadas em formalina e posteriormente colocadas em bloco de parafina para cortes histológicos. Enxertos de ilhotas foram coletados, deixados em formol e posteriormente, colocados em bloco de parafina para cortes histológicos. Cada lâmina continha dois cortes do tecido, para haver um controle negativo das colorações.

No dia do ensaio, a parafina foi removida das lâminas com duas lavagens por 5 min. em xileno. A seguir, as lâminas foram submetidas a lavagens sucessivas com etanol 100%, 95%, 85%, 70%, 50% e imersas em água bidestilada. As lâminas foram imersas em paraformaldeído 4% por 15 min., lavadas e permeabilizadas com proteinase K (70 µL por seção, por 8 min.). Após nova lavagem em PBS, foi repetida

a fixação com paraformaldeído 4% por 5 min. As seções foram cobertas com soro de cabra a 20% por 15 min. A seguir, 70 µL do anticorpo primário para insulina de porquinho da Índia (1:100) foram adicionados por seção, que foram deixadas em câmara escura por 90 min. Após duas lavagens, 70 µL do anticorpo secundário anti-porquinho da Índia (1:200 com IgG marcada com TRITC) foram adicionados a cada seção e mantidas no escuro por 20 min. As lâminas foram, então, lavadas em PBS e foram adicionados 70 µL do tampão de equilíbrio seguido de incubação por 10 min. Em cada lâmina, foram adicionados 30 µL da solução de TUNEL positivo (com a enzima desoxinucleotidiltransferase terminal - TdT) em uma seção e 30 µL da solução TUNEL negativo (sem a enzima TdT) em outras seção. As lâminas foram mantidas em estufa por 60 min. Ao final, as lâminas foram lavadas em solução 2xtampão citrato-salino por duas vezes para interromper a reação e depois lavadas três vezes em PBS. Uma gota do corante DAPI foi adicionada a cada seção e a seguir foram colocadas as lamínulas. As lâminas foram mantidas em refrigeração a 4°C até o dia seguinte, quando foi feita a análise em microscópio de fluorescência Zeiss com *software* AvioVision 4.6 e câmera AxioCam. Pelo menos três campos foram analisados em cada seção com ampliação de 200x. O número de células TUNEL positivas (verdes) dentro das áreas positivas para insulina (vermelhas – células beta) da seção foram contadas e divididas pelo número total de células (núcleos coram em azul pelo DAPI) dentro desse mesmo campo para determinação da porcentagem de células apoptóticas em cada seção.

3.9 Avaliação da secreção de insulina estimulada por glicose

Após o isolamento de ilhotas de camundongos, três alíquotas contendo 50 ilhotas do grupo controle e 50 ilhotas do grupo de ilhotas isoladas com 10 mM GEE foram mantidas em cultura por 24 horas em meio CMRL (suplementado com 5,6 mM de glicose e SFB a 10%). Cada uma das alíquotas de 50 ilhotas foi colocada em uma rede (Cell Strainer 40 μ M, BD) e posicionada na placa de cultura contendo 6 poços aglomerados, com 6 mL de meio. Nos experimentos de secreção de insulina, não houve suplementação de GEE no período da cultura, apenas durante o isolamento.

Após serem retiradas da cultura, as redes contendo as ilhotas foram colocadas em meio RPMI sem glicose durante 5 min. Esta lavagem foi repetida três vezes. As redes com as ilhotas foram então transferidas para poços aglomerados com 6 mL de meio RPMI contendo 2,8 mM de glicose e incubadas por 1 hora a 37 ° C. A seguir, o meio de cultura foi coletado e as ilhotas foram deixadas precipitando por gravidade por 5 min. O sobrenadante (3 mL) foi coletado e armazenado a -20°C. As redes com as ilhotas foram transferidas para poços contendo 6 mL de meio RPMI a 20 mM de glicose. Após a retirada das ilhotas, o meio também foi coletado e deixado precipitar por gravidade por 5 min., com a coleta e armazenamento do sobrenadante (3 mL) a -20°C.

As concentrações de insulina foram mensuradas utilizando o ensaio ELISA (Alpco Diagnostics, Salem, EUA). Em cada condição experimental, foi calculado o índice de estimulação dividindo-se a concentração de insulina secretada por ilhotas cultivadas em meio contendo 20 mM de glicose pela concentração de insulina secretada por ilhotas cultivadas em meio contendo 2,8 mM de glicose^{84,90}.

3.10 Indução de diabetes nos camundongos com estreptozotocina

A estreptozotocina foi utilizada para induzir DM nos animais. A droga foi diluída em solução tampão de citrato com pH final ácido. A estreptozotocina foi utilizada na dose de 200 mg/kg de peso em dose única intraperitoneal, em volume aproximado de 0,2 mL. Após a injeção, os animais foram mantidos com ração e água *ad libitum*. A glicemia dos animais foi checada com glicosímetro *OneTouch Ultra* (Lifescan/Johnson). Os animais foram considerados diabéticos após duas medidas consecutivas de glicemia $\geq 360\text{mg/dL}$ (20 mmol/L)^{39,91}.

3.11 Transplante de ilhotas em camundongos diabéticos

O transplante foi realizado no animais diabéticos utilizando-se protocolo previamente estabelecido⁸⁴. Antes do transplante, tubos de polietileno PE 50 foram perfundidos com Sigmacote (SigmaAldrich). Ao final do isolamento, fizemos o *handpicking* do número desejado de ilhotas e colocamos em um tubo tipo *eppendorf*. Após precipitar por gravidade, as ilhotas foram aspiradas no tubo de polietileno conectado a uma seringa. A extremidade do tubo foi ocluída com cliques de metal e centrifugado. Uma seringa com embolo de rosca foi conectada ao conjunto após a centrifugação.

O animal foi sedado continuamente com o anestesia inalatória com isoflurano. O pêlo do animal foi raspado e foi feita antisepsia local. O animal foi posicionado em decúbito lateral direito e uma pequena incisão foi feita em um

ângulo de 45° entre as linhas formadas pela coluna lombar e a borda inferior do gradeado costal. Uma leve pressão foi feita no abdome para exteriorizar o rim esquerdo. Uma incisão na cápsula renal foi feita com a ponta de uma agulha. Um pouco de soro fisiológico foi gotejado sobre a incisão. O clipe de metal foi retirado e o tubo de polietileno com o *pellet* de ilhotas próximo a extremidade foi deslizado suavemente sob a cápsula. Lentamente, o êmbolo foi girado para empurrar as ilhotas. Após a retirada do tubo, a cápsula foi gentilmente cauterizada, o subcutâneo foi suturado e a pele foi fechada com cliques metálicos. O animal foi aquecido até acordar e mantido com ração e água *ad libitum*.

Para a avaliação dos resultados do transplante de ilhotas no espaço subcapsular renal após 30 dias, foram utilizados quatro grupos experimentais:

1. Camundongos que receberam 500 ilhotas isoladas na ausência de GEE. O total de 500 ilhotas é suficiente para reverter o estado diabético;
2. Camundongos que receberam 500 ilhotas isoladas na presença de GEE;
3. Camundongos que receberam uma massa marginal de 150 ilhotas isoladas na ausência de GEE. Esse número de 150 ilhotas é insuficiente para reverter o estado diabético e
4. Camundongos que receberam uma massa marginal de 150 ilhotas isoladas na presença de GEE.

Para as avaliações dos enxertos 24 horas após a realização do transplante, foram utilizados dois grupos experimentais:

1. Camundongos que receberam 300 ilhotas isoladas na ausência de GEE e
2. Camundongos que receberam 300 ilhotas isoladas na presença de GEE.

Os animais foram considerados normoglicêmicos com duas medições de glicemia $< 198 \text{ mg/dL}$ (11 mmol/L), em dias diferentes e sem jejum^{39,84,89}.

3.12 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (IPGTT)

Camundongos transplantados foram mantidos em jejum por 16-18 horas. A glicemia e o peso dos animais foram avaliados em jejum. Dextrose 25% foi injetada no peritônio de acordo com o peso dos animais, na dose de 3 mg/kg . Coletas de sangue da veia caudal foram realizadas nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 min. após a injeção para medida da glicemia usando um glicosímetro *OneTouch Ultra* (Lifescan, Milpitas, EUA).

O IPGTT foi realizado apenas 30 dias após a realização do transplante e somente nos animais que alcançaram normoglicemia.

3.13 Conteúdo de insulina no enxerto

Os animais transplantados foram submetidos à nefrectomia. Aqueles animais que estavam normoglicêmicos antes da nefrectomia foram mantidos vivos e a glicemia foi medida no dia seguinte. O aumento da glicemia após a nefrectomia confirmou que o controle metabólico estava sendo mantido pelas ilhotas transplantadas. Os enxertos foram imediatamente armazenados a -80°C até a análise.

Para a medida do conteúdo de insulina no enxerto foi realizada extração em ácido-etanol por homogeneização e rompimento ultrasônico da membrana celular. Foram adicionados 0,5 mL de Azol a cada amostra e realizada a ruptura do tecido em um homogeneizador. O material foi novamente congelado a -80°C , o procedimento foi realizado novamente no dia seguinte e de novo congelado. No terceiro dia, o material foi sonificado por 10 s e armazenado a -80°C por mais um dia. A seguir, os tubos foram centrifugados a 2.000 rpm por 30 min. e o sobrenadante foi coletado, desprezando-se o *pellet*. A concentração de insulina do extrato foi medida usando um ensaio de ELISA (Alpco Diagnostics).

3.14 Análise estatística

O *software* GraphPad Prism (GraphPad, La Jolla, EUA) foi usado para análise estatística. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os gráficos representam a média $\pm$ erro padrão da média, a menos que outra representação esteja indicada. Testes não paramétricos foram utilizados para análise estatística: o teste de Wilcoxon *signed rank* foi utilizado para análises

pareadas e o teste de Mann-Whitney para análises não pareadas. O *Log-rank test* foi utilizado para análise de sobrevida.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Durante o isolamento, as distensões dos pâncreas foram alternadas entre o grupo controle e o tratado. A única diferença entre os grupos foi a suplementação com GEE durante a distensão e a digestão dos pâncreas tratados. Não houve diferenças significantes no número de ilhotas isoladas nos grupos controle e tratados. Obtivemos um rendimento médio de 160 ilhotas por pâncreas de camundongo e 600 ilhotas por pâncreas de rato. As ilhotas isoladas de ratos foram utilizadas nos experimentos com JC-1 e carboxi-H₂DCFDA com microscopia de fluorescência e confocal. Em todos os demais experimentos, foram utilizadas ilhotas isoladas de camundongos. Imediatamente após o isolamento, as ilhotas foram divididas em alíquotas para os estudos *in vitro* e para o transplante.

Uma vez que a GSH é um importante composto anti-oxidante intracelular, o corante fluorescente carboxi-H₂DCFDA foi utilizado para avaliar o conteúdo de ERO nas ilhotas isoladas. Com citometria de fluxo, foram realizados sete experimentos independentes. Houve uma diminuição na porcentagem de células que contém ERO nas ilhotas pancreáticas isoladas com GEE (Figura 2 - Controle $57,0 \pm 4,3\%$ versus GEE $47,0 \pm 3,9\%$, $p = 0,0034$).

Com microscopia de fluorescência, três experimentos independentes foram realizados. Também foi possível observar uma diminuição na presença de ERO no grupo isolado com GEE (Figura 3 - Controle $697 \pm 14,77$ versus GEE $444,75 \pm 8,37$, $p < 0,001$). A Figura 4 mostra imagens representativas da análise com carboxi-H₂DCFDA em microscopia confocal.

O estresse oxidativo está relacionado com a perda da integridade mitocondrial e o desencadeamento da via intrínseca da apoptose⁹². Utilizamos o corante JC-1 para avaliar a integridade da membrana mitocondrial. Os resultados, expressos pela divisão do valor da intensidade de fluorescência verde pelo valor da coloração vermelha, calculados pelo *software* AxioVision estão demonstrados na Figura 5. A coloração verde indica perda do potencial de membrana da mitocôndria. A coloração vermelha indica mitocôndrias saudáveis, com potencial de membrana preservado. Foi possível detectar uma diminuição deste índice nas ilhotas isoladas com GEE, sugerindo uma maior quantidade de mitocôndrias íntegras (Controle $2,01 \pm 0,07$ *versus* GEE $1,02 \pm 0,03$ $p < 0,0001$). A Figura 6 mostra imagens representativas da análise com JC-1 em microscopia confocal.

Figura 2: Porcentagem de células que contém ERO nas ilhotas pancreáticas isoladas. Mensuração realizada por citometria de fluxo após coloração com carboxi-H₂DCFDA em ilhotas isoladas em presença (GEE) ou ausência (Controle) de glutathiona-etil-éster (GEE). n = 7 experimentos independentes. * $p = 0,0034$.

Figura 3 – Intensidade de fluorescência verde para avaliação de espécies reativas de oxigênio em ilhotas isoladas em presença (GEE) ou não (Controle) de glutathiona-etil-éster (GEE) após coloração com carboxi-H₂DCFDA e análise em microscópio de fluorescência. n= 3 experimentos independentes. * $p < 0,001$.

Figura 4—Imagens representativas da microscopia confocal de ilhota isoladas na ausência (Controle, 1A a 1C) ou na presença (GEE) de glutathiona-etil-éster (GEE, 2A a 2C) coradas com carboxi-H₂DCFDA. Marcação dos núcleos com Hoescht 33342 (1A e 2A), marcação das células com carboxi-H₂DCFDA (1B e 2B) e sobreposição das imagens (1C e 2C).

Figura 5 - Relação entre intensidade de fluorescência verde / vermelha (530 nm / 585 nm) em ilhotas isoladas na presença (GEE) ou ausência (Controle) de glutathiona etil-éster (GEE) após coloração com JC-1 e análise no microscópio de fluorescência. n=3 experimentos independentes. * $p < 0,0001$.

Figura 6: Imagens representativas da microscopia confocal de ilhota isolada na ausência (Controle, 1A a 1D) ou presença (GEE, 2A a 2D) de glutathione-etil-éster(GEE)e coradas com JC-1. A fluorescência vermelha (1B e 2B) indica integridade mitocondrial. A fluorescência verde (1A e 2A) indica perda da integridade mitocondrial. Marcação dos núcleos com Hoescht 33342 (1C e 2C). Sobreposição das imagens (1D e 2D).

Buscando uma análise direcionada para as células beta, utilizamos um protocolo de separação das células seguido de tripla coloração e análise por citometria de fluxo. O uso do NG permitiu a identificação das células beta com base em seu conteúdo de zinco. O TMRE liga-se à membrana mitocondrial e as células apoptóticas apresentaram diminuição de coloração por esse composto, enquanto a marcação com 7-AAD evidencia as células mortas, que perderam a integridade da membrana celular. Sete experimentos independentes foram realizados. Um número significativamente maior de células beta viáveis foi observado no grupo isolado em presença de GEE em relação às ilhotas isoladas na ausência de GEE (Figura 7 - Controle $21,4 \pm 3,4\%$ *versus* GEE $33,7 \pm 3,9\%$, $p = 0,0156$).

Figura 7– Viabilidade de células beta analisada por citometria de fluxo. (A) Células coradas apenas com *Newport Green* serviram para a seleção das células beta. O *Newport Green* tem excitação/emissão de fluorescência em 505/535 nm, captada pelo filtro de fluoresceína (FITC). (B) Porcentagem de células beta não apoptóticas e viáveis (*Newport Green* positivas/TMRE negativas/7AAD negativas) isoladas na ausência (Controle) ou presença (GEE) de glutathiona etil-éster (GEE), $n = 7$ experimentos independentes. * $p = 0,0156$. Gráficos representativos de uma análise do grupo controle (C) e do grupo isolado em presença de GEE (D).

A via final comum da morte celular, tanto por necrose como apoptose, é a ruptura da célula pela perda da integridade da membrana. A associação dos corantes *SytoGreen* e brometo de etídio permite avaliar a proporção de células íntegras na amostra. Alíquotas de ilhotas de ambos os grupos foram avaliadas com este método ao final de cada isolamento. Foram realizados 14 experimentos independentes. Observou-se uma proporção maior de células com membrana celular íntegra (fluorescência verde) no grupo isolado em presença de GEE em relação ao grupo controle (Figura 8 - Controle $70,6 \pm 3,4\%$ *versus* GEE $83,6 \pm 4,8\%$, $p = 0,0010$).

Para avaliar o índice de apoptose em cada um dos grupos, foi realizada a análise histológica de apoptose em ilhotas fixadas. A fragmentação de DNA é um marco da via final do processo de apoptose e pode ser avaliada pelo ensaio TUNEL. Ilhotas fixadas foram submetidas à coloração para insulina e TUNEL, tendo sido utilizadas amostras de 12 isolamentos. Um menor índice de apoptose, representado por um número menor de células TUNEL-positivas, foi observado no grupo de ilhotas isoladas em presença de GEE em relação ao grupo controle (Figura 9 - Controle de $39,2 \pm 5,0\%$ *versus* GEE $29,1 \pm 1,9\%$, $p = 0,042$).

Figura 8– Permeabilidade da membrana celular avaliada com a utilização dos corantes *SytoGreen* e brometo de etídio em ilhotas isoladas na ausência (Controle) ou presença (GEE) de glutathiona etil-éster (GEE). n = 14 experimentos independentes. * $p = 0,0010$

Figura 9– Índice de apoptose (colocação TUNEL) em ilhotas pancreáticas isoladas na ausência (Controle) ou presença (GEE) de glutathiona etil-éster (GEE). n = 12 experimentos independentes. * $p=0,042$

Em cinco diferentes isolamentos, alíquotas de ilhotas de ambos os grupos foram colocadas em cultura por 24 horas. A seguir, o teste secreção de insulina estimulada por glicose foi realizado e o sobrenadante foi congelado para realização da mensuração das concentrações de insulina por ELISA. A diferença no índice de estimulação nas ilhotas isoladas em presença de GEE em relação às ilhotas do grupo controle não alcançou significância estatística (Figura 10 - Controle $3,2 \pm 0,5$ *versus* GEE $4,1 \pm 0,8$ $p = 0,57$).

Figura 10 – Índice de estimulação de secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas isoladas na ausência (Controle) ou presença (GEE) de glutathiona etil-éster (GEE). $n = 5$ experimentos independentes. $p = 0,57$

Para os estudos *in vivo*, as ilhotas isoladas foram transplantadas na cápsula renal de camundongos diabéticos. Um total de 500 ilhotas, suficiente para reverter a hiperglicemia e uma massa marginal de 150 ilhotas, insuficiente para reverter a hiperglicemia na maioria dos casos, foram transplantados. Um total de sete camundongos foram transplantados com 500 ilhotas (Grupo 500), sete camundongos foram transplantados com 500 ilhotas tratadas com GEE (Grupo 500 GEE), 23 camundongos foram transplantados com 150 ilhotas isoladas em presença de GEE (Grupo 150 GEE) e 20 camundongos foram transplantados com 150 ilhotas isoladas na ausência de GEE (Grupo 150).

Conforme demonstrado na Figura 11, quando receberam 500 ilhotas, todos os animais atingiram a normoglicemia e não houve diferenças estatísticas na evolução da glicemia entre os grupos que receberam 500 ilhotas isoladas na presença ou ausência de GEE.

Houve uma diferença estatisticamente significativa na porcentagem de animais atingindo normoglicemia quando transplantados com uma massa marginal de ilhotas isoladas em presença de GEE em comparação aos animais que receberam uma massa marginal de ilhotas não isoladas na presença de GEE (Figura 12 - Controle 30% *versus* GEE 65,2%, $p = 0,004$).

Figura 11– Representação gráfica da evolução do controle glicêmico durante 30 dias após o transplante de um número suficiente (500) ou marginal (150) de ilhotas isoladas na presença ou ausência de GEE. Glicemia média $\pm$ erro padrão da média.

Figura 12 – Porcentagem de camundongos que atingiram a normoglicemia ao longo de 30 dias após o transplante de número suficiente (500) ou marginal (150) de ilhotas isoladas na presença ou ausência de GEE. $p = 0,004$.

Para avaliar o índice de apoptose no período precoce após o transplante, 300 ilhotas foram transplantadas na cápsula renal de 24 camundongos diabéticos (12 camundongos para o grupo controle e outros 12 para o grupo que recebeu ilhotas isoladas na presença de GEE). Os enxertos foram removidos após 24 horas e submetidos a coloração com TUNEL. Foi possível observar uma menor percentagem de células em apoptose nos enxertos do grupo que recebeu ilhotas isoladas em presença de GEE em comparação ao grupo controle (Figura 13- Controle $23,3 \pm 2,6\%$ versus GEE $8,3 \pm 0,8\%$, $p < 0,0001$).

Figura 13– Porcentagem de células TUNEL-positivas (apoptóticas) em enxertos removidos 24horas após o transplante de ilhotas isoladas na ausência (Controle) ou presença (GEE) de glutathione etil-éster (GEE). n= 6 experimentos independentes. * $p < 0,0001$.

Após 30 dias de seguimento, os animais que permaneceram normoglicêmicos foram submetidos ao teste de tolerância à glicose intraperitoneal (IPGTT). Os animais que permaneceram diabéticos durante os 30 dias não foram testados. Apesar da tendência à diminuição na área sob a curva (AUC) do IPGTT nos animais transplantados com ilhotas isoladas em presença de GEE, essa diferença não alcançou significância estatística (Figura 14B: 500GEE = 1.246 ± 267 ; 500 = 1.606 ± 205 ; 150GEE = 1.379 ± 116 ; 150 = 1.580 ± 216 ; $p=0,13$ (500GEE versus 500); $p=0,63$ (150GEE versus 150).

A

B

Figura 14– Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (IPGTT) realizado após 30 dias de seguimento nos animais normoglicêmicos que receberam 150 ilhotas isoladas em presença (150 GEE, n=13) ou não (150, n=6) de glutatona etil-éster (GEE) e nos

animais que receberam 500 ilhotas isoladas em presença (500 GEE, n=7) ou não (500, n=7) de GEE. (A) Glicemia capilar $\pm$ média do erro padrão. (B) Área sob a curva de glicemia. $p=0,13$ para 500GEE versus 500; $p= 0,63$ para 150GEE versus 150.

Ao final do seguimento de 30 dias, os animais que haviam recebido 150 ilhotas e estavam normoglicêmicos (n=15 no grupo que recebeu ilhotas isoladas em presença de GEE e n=06 no grupo que recebeu ilhotas isoladas na ausência de GEE) foram submetidos à nefrectomia para retirada do enxerto e mantidos vivos por 24 horas. Observou-se elevação da glicemia capilar após a nefrectomia em todos os animais, demonstrando que o enxerto era o responsável pela manutenção do controle metabólico normal. A análise histológica dos enxertos de 30 dias demonstrou baixa percentagem de células TUNEL-positivas em todos os grupos, não havendo diferenças estatisticamente significantes entre os grupos 150 e 150 GEE (Figura 15 – 2,5% no grupo 150 versus 2,0% no grupo 150 GEE, $p = 0,89$).

Também não foi possível demonstrar diferença estatisticamente significativa no conteúdo de insulina dos enxertos (Figura 16– 1.688 ± 449 ng/mL no grupo 150 versus 2.594 ± 741 ng/mL no grupo 150 GEE, $p = 0,77$).

Figura 15 – Porcentagem de células TUNEL-positivas (apoptóticas) em enxertos marginais de ilhotas isoladas em presença (150 GEE) ou ausência (150) de glutathione etil-éster (GEE) e recuperados após 30 dias do transplante. $p=0,89$. $n= 06$ enxertos do grupo 150 GEE e 03 do grupo 150.

Figura 16– Conteúdo de insulina em enxertos marginais de ilhotas isoladas em presença (150 GEE, n= 9) ou ausência (150, n=3) de glutathiona etil-éster (GEE) recuperados após 30 dias do transplante. $p=0,77$

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Até o presente momento, o transplante bem sucedido de pâncreas e de ilhotas pancreáticas são as únicas alternativas concretas para reestabelecer a secreção de insulina endógena no portador de DM tipo 1. O Protocolo de Edmonton introduziu mudanças importantes no transplante de ilhotas que resultaram em uma taxa de sucesso em cinco anos (definida como independência de insulina) semelhante àquela observada no transplante de pâncreas (aproximadamente 50%) naqueles centros que acumularam grande experiência na realização desse procedimento ²¹. Apesar desses avanços, os resultados do transplante de ilhotas ainda permanecem inferiores àqueles obtidos com o transplante de pâncreas em centros menos experientes quando o sucesso é definido como independência de insulina, o que evidencia a necessidade de melhorias na preservação da função das ilhotas pancreáticas desde o momento do isolamento. Deve-se ressaltar, entretanto, que uma porcentagem substancial de pacientes que não alcança independência insulínica mantém função do enxerto (evidenciada pela positividade do peptídeo C plasmático) e se beneficia do transplante por apresentar melhora do controle metabólico (refletida por uma HbA_{1C} abaixo de 7%,) e redução dos episódios de hipoglicemias graves ²¹.

Embora muitos fatores, como o local de implantação do enxerto, resposta inflamatória, rejeição e auto-imunidade possam desempenhar um papel na diminuição de função do enxerto em longo prazo, estudos têm demonstrado que as perdas ocorrem desde os primeiros momentos do processo de isolamento ^{35,93}. A infusão de enzimas para digerir o tecido exócrino é um passo fundamental na purificação das ilhotas, mas também pode comprometer a integridade e viabilidade

de ilhotas. Trauma mecânico, mudanças de temperatura e osmolaridade e diminuição nas concentrações de oxigênio também ocorrem durante o isolamento e são fatores de estresse que contribuem para a perda de viabilidade das ilhotas após o isolamento²⁷. O estresse oxidativo gerado neste ambiente hostil de digestão do pâncreas contribui para a perda de viabilidade das ilhotas isoladas⁹⁴.

Com o objetivo de testar estratégias para melhorar os resultados do isolamento de ilhotas pancreáticas, este estudo avaliou se a suplementação com GSH na forma de um mono-éster de maior biodisponibilidade intracelular teria função protetora sobre a viabilidade celular durante o isolamento das ilhotas e, conseqüentemente, sobre os resultados do transplante em um modelo animal.

Embora a técnica de isolamento de ilhotas pancreáticas em ratos já estivesse em utilização no laboratório no início deste estudo, encontramos dificuldades para otimizar o processo de isolamento e lidar com as contaminações das ilhotas isoladas. Pudemos observar que a utilização de Ficoll durante o gradiente de densidade, embora proporcionasse um bom rendimento, aumentava as chances de contaminação. A utilização do Histopaque possibilitou melhores resultados e menores chances de contaminação.

A análise conjunta dos resultados obtidos neste estudo demonstrou que a produção de ERO é evidente ao final do processo de isolamento das ilhotas e que ela pode ser diminuída pela digestão do pâncreas com colagenase suplementada com GEE. Este achado corrobora estudos anteriores, que demonstraram a presença de ERO durante o isolamento de ilhotas⁹⁴ e o impacto positivo do uso de anti-oxidantes durante o processo de isolamento. Ávila et al. observaram que a infusão intraductal de

glutamina, um dos peptídeos precursores da GSH, durante a digestão de pâncreas humanos de doadores cadáver foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e a apoptose celular ⁴⁷. Bottino et al. também demonstraram o benefício do composto anti-oxidante MnTDE durante o isolamento de ilhotas humanas ⁴⁶.

A mitocôndria é um grande sítio celular de consumo de oxigênio e produção de ERO. Embora sua produção esteja envolvida em processos fisiológicos, a mitocôndria é particularmente vulnerável as ERO por seu DNA não ser protegido por histonas. A função mitocondrial é bastante sensível ao dano oxidativo, o que pode induzir uma diminuição na síntese de ATP e alterações de permeabilidade da membrana mitocondrial que levam à morte celular ⁹⁵.

A integridade da mitocôndria é fundamental na homeostase celular. Esta organela exerce um papel central na fisiologia celular em geral. Nas células beta pancreáticas, ela age como um sensor metabólico, pois participa da secreção de insulina: o aumento no cálcio no citosol, necessário para a exocitose de vesículas contendo insulina, depende do ATP produzido ⁹⁶.

Neste estudo, a suplementação de GEE foi capaz de preservar a integridade da membrana das mitocôndrias nas ilhotas, conforme avaliado pelo ensaio JC-1. A utilização da tripla coloração com NG /TMRE /7AAD com análise por citometria de fluxo permitiu a identificação da subpopulação de células beta, uma vez que o NG liga-se às moléculas de zinco de insulina. O TMRE emite fluorescência quando a membrana mitocondrial está íntegra e o 7-AAD marca as células mortas, que perderam a integridade da membrana celular ⁸⁸. Assim, pudemos observar um aumento na proporção de mitocôndrias com potencial de membrana preservado nas

células beta de ilhotas isoladas na presença de GEE, refletindo maior viabilidade celular.

A via extrínseca de apoptose depende da ligação de moléculas, como citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 e interferon - γ que ativam a família de receptores de morte na membrana celular, aumentando atividade da caspase 8. A via mitocondrial da apoptose, também chamada de intrínseca, é estimulada por dano ao DNA, privação nutricional, hipóxia e estresse oxidativo. Quando ativada, proteínas pró-apoptóticas inativam proteínas anti-apoptóticas e formam poros na membrana mitocondrial, facilitando a liberação de citocromo c no citosol⁹⁷. O excesso de citocromo c liga-se a pró-caspase 9 e Apaf-1, formando o apoptossomo, que ativa a caspase 3, levando à fragmentação do DNA, condensação da cromatina, desarranjo no citoesqueleto e desintegração da célula^{54,92,98,99}.

Os resultados do presente trabalho sugerem que a diminuição de ERO nas ilhotas isoladas em presença de GEE não somente garantiu a integridade das mitocôndrias como também levou à diminuição do índice de apoptose das ilhotas, demonstrada pelos ensaios de TUNEL, que analisa a fragmentação do DNA e pela coloração por *SytoGreen*, que demonstra a manutenção da integridade da membrana celular. A Figura 17 ilustra este raciocínio.

Figura 17—A ilustração à esquerda, adaptada de Emamaullee JA. e Shapiro AMJ ⁹², descreve de maneira didática as vias intrínseca e extrínseca da apoptose. As caixas de texto no centro e a direita descrevem os ensaios utilizados neste estudo e os resultados encontrados com a suplementação de GEE.

Estratégias para bloquear a apoptose das células das ilhotas durante o período de transplante parecem preservar a massa de células viáveis, diminuindo a quantidade de ilhotas necessárias para atingir a normoglicemia^{43,100}. No entanto, mesmo com a interrupção da apoptose, o estresse oxidativo pode acontecer. Lee et al. observaram, em células de adenocarcinoma humano, que o uso de GSH reduz a formação de ERO e a apoptose naquelas células. No entanto, o uso de uma droga bloqueadora de caspase pode diminuir a apoptose, mas não diminui a formação de ERO¹⁰¹.

Embora a avaliação da secreção de insulina estimulada por glicose *in vitro* não tenha demonstrado diferenças estatisticamente significantes entre os grupos isolados em presença ou ausência de GEE, os estudos *in vivo* confirmaram que a diminuição da apoptose observada nas ilhotas isoladas com GEE foi acompanhada pela manutenção da integridade funcional da ilhotas e consequente melhora nos resultados dos transplantes realizados com número marginal de ilhotas.

O modelo de transplante com número marginal de ilhotas é frequentemente utilizado na avaliação de intervenções que têm o objetivo de melhorar a qualidade do isolamento das ilhotas pancreáticas e, assim, os resultados do transplante. O número de 150 ilhotas como uma massa marginal já é bem estabelecido quando o transplante é realizado em camundongos^{89,102}. Os efeitos benéficos da presente intervenção com GEE sobre a viabilidade das ilhotas pancreáticas foram documentados tanto pelo maior número de animais que receberam 150 ilhotas isoladas em presença de GEE que alcançaram normoglicemia em relação ao grupo que recebeu 150 ilhotas não expostas a GEE quanto pela diminuição do índice de apoptose nos enxertos recuperados 24 horas após o transplante das ilhotas.

Não foi possível documentar diferenças significantes no índice de apoptose e no conteúdo de insulina nos enxertos recuperados 30 dias após o transplante entre os animais normoglicêmicos que receberam ilhotas expostas ou não a GEE. Esse achado sugere que nos animais que se mantiveram normoglicêmicos apesar de terem recebido ilhotas de pior qualidade (não expostas a GEE), as ilhotas que sobreviveram ao período crítico inicial (primeiros dias pós-implante) encontraram condições propícias a sua sobrevivência, o que também se refletiu na capacidade secretória da célula beta, evidenciada pela resposta ao teste de tolerância à glicose intraperitoneal.

Em conjunto, estes dados indicam que a produção de ERO é uma causa relevante de dano celular durante o isolamento das ilhotas pancreáticas. O uso de GEE durante o isolamento com a finalidade de proteger as ilhotas do estresse oxidativo gerado durante o processo mostrou-se uma abordagem eficiente neste modelo de transplante de ilhotas marginais em roedores. Até onde temos conhecimento, este foi o primeiro estudo que avaliou o impacto da suplementação deste éster de GSH durante o isolamento de ilhotas e sua repercussão nos resultados do transplante de ilhotas em animais.

Os achados deste estudo podem ser rapidamente transportados para estudos clínicos. A adição de GEE na solução de collagenase não interfere na eficiência da collagenase e tem potencial de otimizar o processo de isolamento e transplante de ilhotas humanas. As potenciais barreiras para esta transposição seriam a necessidade de um reagente feito sob critérios farmacêuticos para uso em seres humanos (GMP) e o relativo aumento inicial dos custos do isolamento das ilhotas, que já são bastante altos. No entanto, com a perspectiva de melhora da viabilidade das ilhotas isoladas e

potencial diminuição da necessidade de novos transplantes, essa elevação do custo poderia ser compensada.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A suplementação com GEE durante o isolamento de ilhotas pancreáticas é capaz de diminuir a formação de espécies reativas de oxigênio e o índice de apoptose celular, melhorando assim o resultado do transplante de ilhotas em roedores diabéticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Weir GC, Bonner-Weir S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 3:S16-21.
2. 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;977-986.
3. Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Disease in Patients with Type 1 Diabetes. *N Engl J Med*. 2005;2643-2653.
4. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *The Lancet*. 1998;837-853.
5. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35):prospective observational study. *BMJ*. 2000;405-411.
6. Aye T, Block J, Buckingham B. Toward closing the loop: an update on insulin pumps and continuous glucose monitoring systems. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(3):609-24.
7. Wight C, Cohen B. Organ shortages: maximising the donor potential. *Br Med Bull*. 1997;53(4):817-28.
8. Zhao M, Muiesan P, Amiel S, Srinivasan P, Asare-Anane H, Fairbanks L, Persaud S, Jones P, Jones J, Ashraf S and others. Human islets derived from donors after cardiac death are fully biofunctional. *Am J Transplant*. 2007;7(10):2318-25.

9. LARSEN JL. Pancreas Transplantation: Indications and Consequences. *Endocrine Reviews*. 2004;919–946.
10. Reddy K, Stablein D, Taranto S, Stratta R, Johnston T, Waid T, McKeown J, Lucas B, Ranjan D. Long-term survival following simultaneous kidney-pancreas transplantation versus kidney transplantation alone in patients with type 1 diabetes mellitus and renal failure. *Am J Kidney Dis*. 2003;41(2):464-70.
11. Ojo A, Meier-Kriesche H, Hanson J, Leichtman A, Magee J, Cibrik D, Wolfe R, Port F, Agodoa L, Kaufman D and others. The impact of simultaneous pancreas-kidney transplantation on long-term patient survival. *Transplantation*. 2001;71(1):82-90.
12. Robertson R, Davis C, Larsen J, Stratta R, Sutherland D. Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. *Diabetes Care*. 2000;23(1):112-6.
13. Gruessner AC, Sutherland DE, Gruessner RW. Pancreas transplantation in the United States: a review. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15(1):93-101.
14. Senior P, Shapiro AMJ. Islet Transplants for Diabetes: The Edmonton Protocol. In: Halberstadt C, Emerich D, editors. *Cellular Transplantation: from Laboratory to Clinic*. London 2007. p 69 - 85.
15. Lacy P, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*. 1967;16(1):35-9.
16. Brendel MD, Hering BJ, Schultz AO, Bretzel RG. International Islet Transplant Registry Newsletter 9. Volume 8. Giessen: University Hospital Giessen; 2001. p 1-20.

17. Shapiro A, Lakey J, Ryan E, Korbitt G, Toth E, Warnock G, Kneteman N, Rajotte R. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 2000;343(4):230-8.
18. Ryan E, Lakey J, Paty B, Imes S, Korbitt G, Kneteman N, Bigam D, Rajotte R, Shapiro A. Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes.* 2002;51(7):2148-57.
19. Badet L, Benhamou P, Wojtuszczyk A, Baertschiger R, Milliat-Guittard L, Kessler L, Penfornis A, Thivolet C, Renard E, Bosco D and others. Expectations and strategies regarding islet transplantation: metabolic data from the GRAGIL 2 trial. *Transplantation.* 2007;84(1):89-96.
20. Shapiro A, Ricordi C, Hering B, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson R, Secchi A, Brendel M, Berney T, Brennan D and others. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med.* 2006;355(13):1318-30.
21. Shapiro AM. State of the art of clinical islet transplantation and novel protocols of immunosuppression. *Curr Diab Rep.* 2011;11(5):345-54.
22. O'Gorman D, Kin T, Murdoch T, Richer B, McGhee-Wilson D, Ryan E, Shapiro J, Lakey J. The standardization of pancreatic donors for islet isolations. *Transplantation.* 2005;80(6):801-6.
23. Contreras J, Eckstein C, Smyth C, Sellers M, Vilatoba M, Bilbao G, Rahemtulla F, Young C, Thompson J, Chaudry I and others. Brain death significantly reduces isolated pancreatic islet yields and functionality in vitro and in vivo after transplantation in rats. *Diabetes.* 2003;52(12):2935-42.

24. Dionne K, Colton C, Yarmush M. Effect of hypoxia on insulin secretion by isolated rat and canine islets of Langerhans. *Diabetes*. 1993;42(1):12-21.
25. Tsujimura T, Kuroda Y, Churchill T, Avila J, Kin T, Shapiro A, Lakey J. Short-term storage of the ischemically damaged human pancreas by the two-layer method prior to islet isolation. *Cell Transplant*. 2004;13(1):67-73.
26. Kin T, Shapiro AM. Surgical aspects of human islet isolation. *Islets*. 2010;2(5):265-73.
27. Kin T. Islet isolation for clinical transplantation. In: Islam S, editor. *The islets of Langerhans*. 1^o ed. Netherlands: Springer; 2010. p 791-798.
28. Edlund H. Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet*. 2002;3(7):524-32.
29. Pipeleers D, in't Veld P, Maes E, Van De Winkel M. Glucose-induced insulin release depends on functional cooperation between islet cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(23):7322-5.
30. Hopcroft D, Mason D, Scott R. Structure-function relationships in pancreatic islets: support for intraislet modulation of insulin secretion. *Endocrinology*. 1985;117(5):2073-80.
31. Norfleet W, Pagliara A, Haymond M, Matschinsky F. Comparison of alpha- and beta-cell secretory responses in islets isolated with collagenase and in the isolated perfused pancreas of rats. *Diabetes*. 1975;24(11):961-70.
32. Rosenberg L, Wang R, Paraskevas S, Maysinger D. Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death. *Surgery*. 1999;126(2):393-8.

33. Paraskevas S, Maysinger D, Wang R, Duguid T, Rosenberg L. Cell loss in isolated human islets occurs by apoptosis. *Pancreas*. 2000;20(3):270-6.
34. Merani S, Toso C, Emamaullee J, Shapiro AM. Optimal implantation site for pancreatic islet transplantation. *Br J Surg*. 2008;95(12):1449-61.
35. Davalli A, Scaglia L, Zangen D, Hollister J, Bonner-Weir S, Weir G. Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period. Dynamic changes in structure and function. *Diabetes*. 1996;45(9):1161-7.
36. Shapiro A, Ryan E, Lakey J. Diabetes. Islet cell transplantation. *Lancet*. 2001;358 Suppl:S21.
37. Olsson R, Maxhuni A, Carlsson P. Revascularization of transplanted pancreatic islets following culture with stimulators of angiogenesis. *Transplantation*. 2006;82(3):340-7.
38. King A, Lock J, Xu G, Bonner-Weir S, Weir G. Islet transplantation outcomes in mice are better with fresh islets and exendin-4 treatment. *Diabetologia*. 2005;48(10):2074-9.
39. Merani S, Truong W, Emamaullee JA, Toso C, Knudsen LB, Shapiro AM. Liraglutide, a long-acting human glucagon-like peptide 1 analog, improves glucose homeostasis in marginal mass islet transplantation in mice. *Endocrinology*. 2008;149(9):4322-8.
40. Avila J, Wang Y, Barbaro B, Gangemi A, Qi M, Kuechle J, Doubleday N, Doubleday M, Churchill T, Salehi P and others. Improved outcomes in islet isolation and transplantation by the use of a novel hemoglobin-based O₂ carrier. *Am J Transplant*. 2006;6(12):2861-70.

41. Contreras J, Eckstein C, Smyth C, Bilbao G, Vilatoba M, Ringland S, Young C, Thompson J, Fernández J, Griffin J and others. Activated protein C preserves functional islet mass after intraportal transplantation: a novel link between endothelial cell activation, thrombosis, inflammation, and islet cell death. *Diabetes*. 2004;53(11):2804-14.
42. Cabric S, Sanchez J, Lundgren T, Foss A, Felldin M, Källen R, Salmela K, Tibell A, Tufveson G, Larsson R and others. Islet surface heparinization prevents the instant blood-mediated inflammatory reaction in islet transplantation. *Diabetes*. 2007;56(8):2008-15.
43. Emamaullee J, Stanton L, Schur C, Shapiro A. Caspase inhibitor therapy enhances marginal mass islet graft survival and preserves long-term function in islet transplantation. *Diabetes*. 2007;56(5):1289-98.
44. Emamaullee JA, Davis J, Pawlick R, Toso C, Merani S, Cai SX, Tseng B, Shapiro AM. Caspase inhibitor therapy synergizes with costimulation blockade to promote indefinite islet allograft survival. *Diabetes*. 2010;59(6):1469-77.
45. Fridlyand L, Philipson L. Oxidative reactive species in cell injury: Mechanisms in diabetes mellitus and therapeutic approaches. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1066:136-51.
46. Bottino R, Balamurugan A, Tse H, Thirunavukkarasu C, Ge X, Profozich J, Milton M, Ziegenfuss A, Trucco M, Piganelli J. Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes*. 2004;53(10):2559-68.

47. Avila J, Barbaro B, Gangemi A, Romagnoli T, Kuechle J, Hansen M, Shapiro J, Testa G, Sankary H, Benedetti E and others. Intra-ductal glutamine administration reduces oxidative injury during human pancreatic islet isolation. *Am J Transplant.* 2005;5(12):2830-7.
48. Sklavos MM, Bertera S, Tse HM, Bottino R, He J, Beilke JN, Coulombe MG, Gill RG, Crapo JD, Trucco M and others. Redox modulation protects islets from transplant-related injury. *Diabetes.* 2010;59(7):1731-8.
49. Cutler R, Plummer J, Chowdhury K, Heward C. Oxidative stress profiling: part II. Theory, technology, and practice. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1055:136-58.
50. Evans J, Goldfine I, Maddux B, Grodsky G. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002;23(5):599-622.
51. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;54(6):1615-25.
52. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414(6865):813-20.
53. Kajimoto Y, Kaneto H. Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1011:168-76.
54. Lee S, Pervaiz S. Apoptosis in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(3):497-504.
55. Pileggi A, Ricordi C, Alessiani M, Inverardi L. Factors influencing Islet of Langerhans graft function and monitoring. *Clin Chim Acta.* 2001;310(1):3-16.

56. Grankvist K, Marklund S, Täljedal I. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J*. 1981;199(2):393-8.
57. Robertson R, Harmon J, Tran P, Poitout V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 1:S119-24.
58. Dickinson D, Forman H. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;973:488-504.
59. Witschi A, Reddy S, Stofer B, Lauterburg B. The systemic availability of oral glutathione. *Eur J Clin Pharmacol*. 1992;43(6):667-9.
60. Aebi S, Assereto R, Lauterburg B. High-dose intravenous glutathione in man. Pharmacokinetics and effects on cyst(e)ine in plasma and urine. *Eur J Clin Invest*. 1991;21(1):103-10.
61. Ammon H, Melien M, Verspohl E. Pharmacokinetics of intravenously administered glutathione in the rat. *J Pharm Pharmacol*. 1986;38(10):721-5.
62. Schumacher C, Sicart M, Khadari-Essalouh L, Robbe Y. Glutathione uptake after intraperitoneal administration and glutathione radiopharmacology after rectal administration, in mice. *Farmaco*. 2001;56(3):175-80.
63. Puri R, Meister A. Transport of glutathione, as gamma-glutamylcysteinylglycyl ester, into liver and kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80(17):5258-60.
64. Teicher BA, Crawford JM, Holden SA, Lin Y, Cathcart KN, Luchette CA, Flatow J. Glutathione monoethyl ester can selectively protect liver from high dose BCNU or cyclophosphamide. *Cancer*. 1988;62(7):1275-81.

65. Levy E, Anderson M, Meister A. Transport of glutathione diethyl ester into human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(19):9171-5.
66. Anderson ME, Powrie F, Puri RN, Meister A. Glutathione monoethyl ester: preparation, uptake by tissues, and conversion to glutathione. *Arch Biochem Biophys*. 1985;239(2):538-48.
67. Blaustein A, Deneke S, Stolz R, Baxter D, Healey N, Fanburg B. Myocardial glutathione depletion impairs recovery after short periods of ischemia. *Circulation*. 1989;80(5):1449-57.
68. Anderson M, Nilsson M, Eriksson P, Sims N. Glutathione monoethyl ester provides neuroprotection in a rat model of stroke. *Neurosci Lett*. 2004;354(2):163-5.
69. Paller M. Renal work, glutathione and susceptibility to free radical-mediated postischemic injury. *Kidney Int*. 1988;33(4):843-9.
70. Verlaan M, Roelofs H, van-Schaik A, Wanten G, Jansen J, Peters W, Drenth J. Assessment of oxidative stress in chronic pancreatitis patients. *World J Gastroenterol*. 2006;12(35):5705-10.
71. Neuschwander-Tetri B, Ferrell L, Sukhabote R, Grendell J. Glutathione monoethyl ester ameliorates caerulein-induced pancreatitis in the mouse. *J Clin Invest*. 1992;89(1):109-16.
72. Li C, Jackson R. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282(2):C227-41.
73. Hubert T, Gmyr V, Arnalsteen L, Jany T, Triponez F, Caiazzo R, Vandewalle B, Vantyghem M, Kerr-Conte J, Pattou F. Influence of preservation solution on human islet isolation outcome. *Transplantation*. 2007;83(3):270-6.

74. Schauer R, Gerbes A, Vonier D, Meissner H, Michl P, Leiderer R, Schildberg F, Messmer K, Bilzer M. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. *Ann Surg.* 2004;239(2):220-31.
75. Grattagliano I, Vendemiale G, Lauterburg B. Reperfusion injury of the liver: role of mitochondria and protection by glutathione ester. *J Surg Res.* 1999;86(1):2-8.
76. Perico N, Cattaneo D, Sayegh M, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet.* 2004;364(9447):1814-27.
77. Schimke I, Schikora M, Meyer R, Dübel H, Modersohn D, Kleber F, Baumann G. Oxidative stress in the human heart is associated with changes in the antioxidative defense as shown after heart transplantation. *Mol Cell Biochem.* 2000;204(1-2):89-96.
78. Mayer H, Schmidt J, Thies J, Ryschich E, Gebhard M, Herfarth C, Klar E. Characterization and reduction of ischemia/reperfusion injury after experimental pancreas transplantation. *J Gastrointest Surg.* 1999;3(2):162-6.
79. Littman E, Opara E, Akwari O. Glutathione-mediated preservation and enhancement of isolated perfused islet function. *J Surg Res.* 1995;59(6):694-8.
80. Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, Masini M, Bugliani M, Sbrana S, Torri S, Pollera M, Boggi U, Mosca F and others. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes.* 2005;54(3):727-35.
81. Tanaka Y, Tran P, Harmon J, Robertson R. A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic beta cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(19):12363-8.

82. Tran P, Parker S, LeRoy E, Franklin C, Kavanagh T, Zhang T, Zhou H, Vliet P, Oseid E, Harmon J and others. Adenoviral overexpression of the glutamylcysteine ligase catalytic subunit protects pancreatic islets against oxidative stress. *J Biol Chem.* 2004;279(52):53988-93.
83. Mysore T, Shinkel T, Collins J, Salvaris E, Fisicaro N, Murray-Segal L, Johnson L, Lepore D, Walters S, Stokes R and others. Overexpression of glutathione peroxidase with two isoforms of superoxide dismutase protects mouse islets from oxidative injury and improves islet graft function. *Diabetes.* 2005;54(7):2109-16.
84. McCall MD, Maciver AH, Pawlick R, Edgar R, Shapiro AM. Histopaque provides optimal mouse islet purification kinetics: Comparison study with Ficoll, iodixanol and dextran. *Islets.* 2011;3(4):144-9.
85. Barbu A, Welsh N, Saldeen J. Cytokine-induced apoptosis and necrosis are preceded by disruption of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in pancreatic RINm5F cells: prevention by Bcl-2. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;190(1-2):75-82.
86. Barnett MJ, McGhee-Wilson D, Shapiro AM, Lakey JR. Variation in human islet viability based on different membrane integrity stains. *Cell Transplant.* 2004;13(5):481-8.
87. Chang I, Cho N, Kim S, Kim J, Kim E, Woo J, Nam J, Kim S, Lee M. Role of calcium in pancreatic islet cell death by IFN-gamma/TNF-alpha. *J Immunol.* 2004;172(11):7008-14.
88. Ichii H, Inverardi L, Pileggi A, Molano RD, Cabrera O, Caicedo A, Messinger S, Kuroda Y, Berggren PO, Ricordi C. A novel method for the

assessment of cellular composition and beta-cell viability in human islet preparations. *Am J Transplant.* 2005;5(7):1635-45.

89. McCall M, Toso C, Emamaullee J, Pawlick R, Edgar R, Davis J, Maciver A, Kin T, Arch R, Shapiro AM. The caspase inhibitor IDN-6556 (PF3491390) improves marginal mass engraftment after islet transplantation in mice. *Surgery.* 2011;150(1):48-55.
90. Emamaullee JA, Davis J, Pawlick R, Toso C, Merani S, Cai SX, Tseng B, Shapiro AM. The caspase selective inhibitor EP1013 augments human islet graft function and longevity in marginal mass islet transplantation in mice. *Diabetes.* 2008;57(6):1556-66.
91. Toso C, McCall M, Emamaullee J, Merani S, Davis J, Edgar R, Pawlick R, Kin T, Knudsen LB, Shapiro AM. Liraglutide, a long-acting human glucagon-like peptide 1 analogue, improves human islet survival in culture. *Transpl Int.* 2010;23(3):259-65.
92. Emamaullee J, Shapiro A. Interventional strategies to prevent beta-cell apoptosis in islet transplantation. *Diabetes.* 2006;55(7):1907-14.
93. Eich T, Eriksson O, Sundin A, Estrada S, Brandhorst D, Brandhorst H, Langstrom B, Nilsson B, Korsgren O, Lundgren T. Positron emission tomography: a real-time tool to quantify early islet engraftment in a preclinical large animal model. *Transplantation.* 2007;84(7):893-8.
94. Stiegler P, Stadlbauer V, Hackl F, Schaffellner S, Iberer F, Greilberger J, Strunk D, Zelzer S, Lackner C, Tscheliessnigg K. Prevention of oxidative stress in porcine islet isolation. *J Artif Organs.* 2010;13(1):38-47.

95. Maechler P, Wollheim C. Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature*. 2001;414(6865):807-12.
96. Wiederkehr A, Wollheim C. Minireview: implication of mitochondria in insulin secretion and action. *Endocrinology*. 2006;147(6):2643-9.
97. Kroemer G, Reed J. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*. 2000;6(5):513-9.
98. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
99. Lakhani S, Masud A, Kuida K, Porter GJ, Booth C, Mehal W, Inayat I, Flavell R. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*. 2006;311(5762):847-51.
100. Rivas-Carrillo J, Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Noguchi H, Okitsu T, Chen Y, Yuasa T, Tanaka K, Narushima M, Miki A and others. Cell-permeable pentapeptide V5 inhibits apoptosis and enhances insulin secretion, allowing experimental single-donor islet transplantation in mice. *Diabetes*. 2007;56(5):1259-67.
101. Lee MW, Park SC, Yang YG, Yim SO, Chae HS, Bach JH, Lee HJ, Kim KY, Lee WB, Kim SS. The involvement of reactive oxygen species (ROS) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase in TRAIL/Apo2L-induced apoptosis. *FEBS Lett*. 2002;512(1-3):313-8.
102. McCall MD, Pawlick R, Shapiro AM. Resveratrol fails to improve marginal mass engraftment of transplanted islets of Langerhans in mice. *Islets*. 2011;3(5):241-5.