Humberto Dellê

**Indução da expressão da molécula indoleamina
2,3-dioxigenase (IDO) como terapia gênica em
transplante experimental de ilhotas pancreáticas**

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

Área de concentração: Nefrologia

Orientadora: Profa. Dra. Irene de Lourdes Noronha

São Paulo
2007

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.2 Transplante de ilhotas pancreáticas.....	2
1.3 Modelo experimental de transplante de ilhotas pancreáticas.....	5
1.4 Imunomodulação para transplante de ilhotas pancreáticas.....	7
1.5 Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO).....	9
 2 OBJETIVOS.....	 14
 3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	 16
3.1 Animais.....	16
3.2 Padronização do isolamento de ilhotas pancreáticas.....	17
3.2.1 Padronização da perfusão e extração do pâncreas.....	17
3.2.2 Padronização da digestão do pâncreas.....	18
3.2.3 Padronização da purificação das ilhotas pancreáticas.....	19
3.2.3.a Gradiente descontínuo de Ficoll.....	20
3.2.3.b Gradiente contínuo de Ficoll.....	21
3.2.3.c Gradiente contínuo de iodixanol.....	21
3.2.3.d Coloração e contagem das ilhotas pancreáticas.....	22
3.2.4 Análise funcional das ilhotas pancreáticas:	
secreção de insulina.....	23
3.2.5 Controle de contaminação.....	24
3.3 Padronização do transplante de ilhotas pancreáticas.....	24
3.3.1 Indução do diabetes.....	24
3.3.2 Coleta das ilhotas após isolamento e cultura.....	25
3.3.3 Microinjeção das ilhotas – Transplante experimental.....	26
3.3.4 Determinação do número mínimo de ilhotas	

para reverter o diabetes.....	26
3.4 Análise da rejeição às ilhotas pancreáticas.....	27
3.4.1 Modelos alogênicos e isogênicos de transplante de ilhotas pancreáticas.....	27
3.4.2 Acompanhamento dos animais transplantados.....	28
3.4.3 Sobrevida das ilhotas pancreáticas.....	29
3.4.4 Análise histológica e de imuno-histoquímica.....	30
3.4.4.a Desparafinização.....	31
3.4.4.b Coloração pelo Tricrômio de Masson.....	31
3.4.4.c Imuno-histoquímica para macrófagos, linfócitos T e insulina.....	32
3.5 Construção do vetor de expressão para a IDO.....	34
3.5.1 Extração de RNA.....	34
3.5.2. RT-PCR para IDO.....	36
3.5.3 Clonagem do cDNA da IDO.....	37
3.5.4 Inserção do cDNA da IDO em vetor de expressão.....	39
3.5.5 Sequenciamento do vetor-IDO.....	40
3.6 Padronização da transfecção de ilhotas pancreáticas com vetor de expressão para IDO.....	41
3.6.1 Lipofecção com vetor de expressão para IDO.....	42
3.6.2 Extração de RNA e RT-PCR para IDO.....	42
3.6.3 Imuno-histoquímica para IDO.....	44
3.6.4 Análise do efeito da IDO sobre a mortalidade das IP.....	45
3.6.5 Análise do efeito da IDO sobre a degradação de triptofano.....	46
3.7 Efeito da expressão da IDO na rejeição às ilhotas alogênicas.....	47
3.8 Análise estatística.....	48
4 RESULTADOS.....	49
4.1 ETAPA I: Padronização do isolamento de ilhotas pancreáticas.....	49
4.1.1 Padronização da perfusão do pâncreas e extração do tecido pancreático.....	49
4.1.2 Padronização da digestão do pâncreas.....	50
4.1.3 Padronização da purificação das ilhotas pancreáticas.....	51

4.1.4 Análise funcional das ilhotas pancreáticas:	
Secreção de insulina.....	54
4.2 ETAPA II: Padronização do transplante de ilhotas pancreáticas	
sob a cápsula renal.....	55
4.2.1 Indução do diabetes e infusão das ilhotas.....	55
4.2.2 Infusão das ilhotas pancreáticas.....	57
4.2.3 Determinação do número mínimo de ilhotas	
pancreáticas para reverter o diabetes.....	57
4.3 ETAPA III: Análise da rejeição às ilhotas pancreáticas.....	60
4.3.1 Sobrevida das ilhotas pancreáticas em 3 tipos	
de transplante.....	60
4.3.1.a Transplante isogênico (Lewis → Lewis).....	60
4.3.1.b Transplante alogênico:	
Sprague-Dawley → Sprague-Dawley.....	61
4.3.1.c Transplante alogênico:	
Sprague-Dawley→Lewis.....	62
4.3.2 Análise histológica e de imuno-histoquímica das	
ilhotas pancreáticas transplantadas.....	64
4.4 ETAPA IV: Construção do vetor de expressão para a IDO.....	67
4.4.1 RT-PCR para IDO.....	67
4.4.2 Clonagem do cDNA da IDO.....	68
4.4.3 Inserção do cDNA da IDO em vetor de expressão.....	69
4.5 ETAPA V: Transfecção do vetor-IDO nas ilhotas pancreáticas.....	70
4.5.1 Expressão de IDO após a transfecção com vetor IDO.....	70
4.5.2 Produção da enzima IDO após a transfecção com	
vetor IDO: análise por imuno-histoquímica.....	72
4.5.3 Efeito da IDO sobre a mortalidade das IP.....	73
4.5.4 Efeito da expressão da IDO sobre a degradação de	
triptofano (estudo “ <i>in vitro</i> ”).....	75
4.6 ETAPA VI: Efeito da expressão da IDO na rejeição às	
ilhotas pancreáticas alogênicas.....	76
4.6.1 Efeito da expressão da IDO sobre a evolução	

ponderal dos animais transplantados.....	76
4.6.2 Efeito da expressão da IDO sobre a glicemia dos animais transplantados.....	77
4.6.3 Efeito da expressão da IDO sobre p perfil insulinêmico dos animais transplantados.....	80
4.6.4 Efeito da expressão da IDO sobre a expressão de insulina nas ilhotas 10 dias pós-transplante.....	82
4.6.5 Efeito da expressão da IDO na sobrevida das ilhotas pancreáticas alogênicas.....	83
5 DISCUSSÃO.....	85
6 RESUMO e CONCLUSÕES.....	101
7 ANEXOS.....	103
7.1 Sequência do RNA mensageiro para a IDO.....	103
7.2 Cromatograma após sequenciamento do vetor-IDO.....	104
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

RESUMO

Dellê H. *Indução da expressão da molécula indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) como terapia gênica em transplante experimental de ilhotas pancreáticas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

O transplante (Tx) de ilhotas pancreáticas (IP) é uma atraente alternativa para o tratamento do diabetes melito tipo 1. No entanto, para evitar a rejeição há necessidade de imunossupressão. Uma nova idéia de tolerância surge a partir do paradoxo imunológico, onde a mãe, imunologicamente competente, não rejeita o embrião durante a gravidez. Uma das hipóteses é que células da placenta expressam a molécula IDO, a qual protege o embrião do ataque imunológico materno. O objetivo do estudo foi analisar o efeito da indução da expressão da IDO em IP em transplante experimental de IP. Para tanto, as seguintes etapas de padronização foram necessárias.

Etapas 1: Padronização da perfusão e digestão do tecido pancreático de rato e determinação do método para a purificação das IP, comparando-se diferentes gradientes de densidade: descontínuo de Ficoll, contínuo de Ficoll e contínuo de iodixanol. Foi demonstrado que o gradiente contínuo de iodixanol fornece maior pureza e maior número de IP íntegras e funcionais.

Etapas 2: Padronização do Tx experimental de IP sob a cápsula renal para avaliação do número mínimo de IP transplantadas para reverter o diabetes induzido por estreptozotocina, definido como glicemia $>300\text{mg/Kg}$. Foram transplantadas entre 200 a 3.000 IP por experimento. A rejeição das IP foi analisada pela sobrevida das IP (permanência da glicemia $<300\text{mg/dL}$), tanto em Tx isogênico (Lewis→Lewis) como em alogênico (Sprague-Dawley→Lewis). Para reverter o diabetes foram necessárias no mínimo 2.500 IP. No transplante entre ratos isogênicos ($n=6$) não houve rejeição das IP. Já no transplante entre animais alogênicos ($n=12$), as IP apresentaram uma curta sobrevida pós-Tx (11 ± 1 dias; $p<0,01$ vs. Tx isogênico). Dez dias

pós-Tx, houve um grande infiltrado de macrófagos e linfócitos T no enxerto alogênico e uma diminuição significativa da expressão de insulina ($p < 0,001$ vs. Tx isogênico). **Etapas 3:** Construção do vetor de expressão para IDO. A partir de RNA extraído de placenta de rata no 10º dia de gestação, foi amplificada a sequência completa do cDNA para IDO, utilizando-se RT-PCR. Em seguida, o cDNA para IDO foi inserido em vetor de expressão (vetor-IDO). **Etapas 4:** Transfecção do vetor-IDO nas IP. O vetor-IDO foi introduzido nas IP através de lipofecção (Lipofectamina 2000), testando-se diferentes concentrações do vetor-IDO (0, 0,5, 1 e 10 ng/ μ L) e diferentes períodos de incubação (1h, 15h e 24h). A expressão de IDO nas IP foi confirmada por RT-PCR e imuno-histoquímica. A incubação com 10 ng/ μ L de vetor-IDO durante 24h foi eficaz para induzir a expressão de IDO nas IP, confirmada a nível de RNAm (RT-PCR) e de proteína (imuno-histoquímica). A eficiência da transfecção em nível funcional foi confirmada pela degradação de triptofano em cultura (dosagem de triptofano por HPLC). **Etapas 5:** Onze transplantes alogênicos (Sprague-Dawley→Lewis) com IP transfectadas com vetor-IDO foram realizados para analisar o efeito da IDO. Três animais foram sacrificados para análise de imuno-histoquímica e 8 animais foram acompanhados por 45 dias. A sobrevivência das IP transfectadas com vetor-IDO foi significativamente maior comparada com a sobrevivência de IP não-transfectadas ($p < 0,01$). O estudo conclui que a expressão da IDO protege as IP aumentando a sobrevivência das IP.

Descritores

1. Transplante de Ilhotas Pancreáticas
2. Rejeição de enxerto
3. Terapia de genes
4. Modelos animais

SUMMARY

Dellê H. *Induction of the indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) molecule expression as gene therapy in experimental transplantation of pancreatic islets* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Transplantation (Tx) of pancreatic islets (PI) is an attractive alternative of treatment for type 1 diabetes *mellitus*. However, continuous immunosuppression is necessary in order to avoid allograft rejection. A new idea of tolerance is based on the immunological paradox, during pregnancy, in that the mother, immunologically competent, does not reject the semi-allogeneic fetus. The hypothesis is that the placenta produces IDO molecules, which protect the embryos against the maternal immunologic attack. The aim of this study was to analyze the effect of the induction of the IDO expression into PI in an experimental model of PI transplantation. The following steps for standardization were necessary. **Step 1:** Besides the standardization of the rat pancreas perfusion and digestion, the best method for purification of the PI was determined, comparing several density gradients: Ficoll discontinuous, Ficoll continuous and iodixanol continuous. The iodixanol continuous gradient was able to provide high purity and a high number of intact and functional PI. **Step 2:** The transplantation of the PI between rats was established determining the minimal number of PI to reverse the diabetes (glycemia > 300mg/dL) induced by streptozotocin. In addition, the rejection was analyzed by PI survival (time with glycemia <300mg/dL) in syngeneic (Lewis→Lewis) and allogeneic (Sprague-Dawley→Lewis) transplantation. To reverse the diabetes at least 2,500 PI were necessary. Transplantation between syngenic rats (n=6) disclosed no rejection of the PI. In the allogeneic transplantation (n=12), the PI had a short survival (11±1 days). Ten days post-Tx, a higher number of macrophages and T lymphocytes were observed in the grafts, accompanied by very low

insulin expression. **Step 3:** The expression vector for IDO was constructed from RNA extracted from rat placenta. RT-PCR was carried out to amplify the IDO cDNA, which was inserted into expression vector (IDO vector). **Step 4:** The IDO vector was introduced into PI through lipofection (Lipofectamine 2000) analyzing several concentrations of the IDO vector (0, 0.5, 1.0 and 10 ng/ μ L) and several periods of incubation (1h, 15h e 24h). The IDO expression in PI was confirmed by RT-PCR and immunohistochemistry. The incubation with 10 ng/ μ L of IDO vector during 24h was efficient to induce IDO expression in PI. The function of the IDO was confirmed by tryptofan degradation in culture (measurement of tryptofan by HPLC). **Step 5:** Eleven allogenic transplants (Sprague-Dawley to Lewis) of PI expressing IDO were performed to analyze the effect of the IDO in the rejection. Eight animals were accompanied for 45 days, whereas three were sacrificed after 10 days for immunohistochemistry analysis. Finally, the survival of the PI expressing IDO was significantly higher than nontransfected PI. The study concludes that the induction of the IDO into PI protects the PI increasing the PI survival.

Descriptors

1. Islets of Langerhans transplantation
2. Graft rejection
3. Gene therapy
4. Animal models

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que o diabetes melito (DM) afete atualmente cerca de 170 milhões de pessoas no mundo e este número deve chegar a 366 milhões em 2030 (Wild et al., 2004). No Brasil, existem mais de 7 milhões de brasileiros diabéticos, o que coloca o país como um dos dez com a maior prevalência da doença (Pimazoni, et al., 1999; Censo IBGE, 2000).

O DM tipo 1 é uma doença crônica que acomete 5 a 10% dos diabéticos. A hiperglicemia no DM tipo 1 é decorrente de uma deficiência sistêmica de insulina, devido à destruição das células β das ilhotas pancreáticas produtoras deste hormônio. A sua etiologia ainda não é clara, porém acredita-se que envolva mecanismos auto-imunes contra as células β , havendo participação de fatores genéticos e ambientais no seu desencadeamento. O DM pode evoluir com diversas complicações clínicas que incluem desde descompensações metabólicas agudas até complicações crônicas graves como retinopatia, nefropatia, neuropatia e vasculopatia (EASD, 1996).

O tratamento convencional do DM tipo 1 consiste na insulinoterapia. Entretanto, a terapêutica insulínica intensiva é considerada incômoda pela maioria dos pacientes devido ao rigor necessário para manter níveis glicêmicos próximos ao da normalidade, além de induzir freqüentes episódios de hipoglicemia grave. Por este motivo requer monitorização

freqüente da glicemia, tornando ainda mais difícil a aderência do paciente ao tratamento.

Terapêuticas alternativas à insulinoterapia que se mostrem mais eficientes para a manutenção da glicemia são de extrema importância. Dentre as alternativas atuais, somente os transplantes de pâncreas (órgão total) ou de ilhotas pancreáticas são capazes de recompor o padrão fisiológico de secreção de insulina e tornar o portador de DM tipo 1 independente das aplicações insulínicas diárias.

1.2 Transplante de ilhotas pancreáticas

O transplante de ilhotas pancreáticas constitui uma forma atraente de transplante para o paciente diabético. Neste tipo de transplante, apenas o tecido endócrino do pâncreas responsável pela produção de insulina é transplantado. A principal vantagem do transplante de ilhotas está no fato de envolver um procedimento cirúrgico relativamente simples. Este tipo de procedimento está associado com uma incidência muito baixa de complicações e uma significativa redução no tempo de hospitalização. Além disso, o transplante de ilhotas pancreáticas oferece a possibilidade de manipulação do tecido pré-transplante, o que pode permitir o uso de estratégias para evitar a rejeição pelo receptor. A manipulação envolve desde o encapsulamento das ilhotas pancreáticas com materiais biocompatíveis até a manipulação genética destas células.

Figura 1. Esquema do transplante de ilhotas pancreáticas realizado entre humanos

A idéia do transplante de ilhotas como uma alternativa para o tratamento do DM tipo 1 tomou impulso a partir de 1967, com o desenvolvimento de técnicas visando o isolamento específico das ilhotas pancreáticas (Lacy et al., 1967) e, em seguida, com a demonstração de que as ilhotas transplantadas eram capazes de reverter o diabetes em roedores (Reckard et al., 1973). No final da década de 70 e também nos anos 80, foram descritos alguns casos de pacientes que permaneceram insulino-independentes após transplante de ilhotas pancreáticas, porém, na maioria das vezes, apenas por poucos dias (London et al., 1994).

A introdução de metodologias automatizadas por Ricordi e colaboradores possibilitou o isolamento de um grande número de ilhotas

viáveis a partir de pâncreas de doadores humanos (Ricordi et al., 1995). Isto permitiu que, em 1990, pela primeira vez, fosse demonstrada a reversão do diabetes por período superior a um ano, após o transplante de ilhotas alogênicas (Tzakis et al., 1990; Ricordi et al., 1992). Estes estudos estimularam vários centros no mundo a iniciar programas de transplante de ilhotas pancreáticas.

Segundo o registro internacional de transplante de ilhotas pancreáticas (*International Islet Transplant Registry*), até 1999 foram registrados 265 procedimentos. No entanto, a sobrevida do enxerto no 1º ano mostrou dados extremamente desapontadores, em média de 8 a 12%. O ano de 2000 representou um marco no transplante de ilhotas, quando Shapiro e colaboradores apresentaram o protocolo de Edmonton com sobrevida de 100% em 1 ano em 7 pacientes portadores de diabetes tipo 1 (Shapiro et al., 2000).

Embora o transplante de ilhotas pancreáticas apresente resultados satisfatórios a partir da melhora da qualidade do isolamento das ilhotas, esta modalidade ainda enfrenta barreiras, principalmente com relação aos resultados a longo prazo (Shapiro et al., 2006). Dentre estas barreiras destaca-se a rejeição das ilhotas transplantadas pelo sistema imune do receptor (Secchi et al., 1997; Calafiori et al., 1997) e o efeito tóxico das drogas imunossupressoras às ilhotas pancreáticas (Shapiro et al., 1998; Shapiro et al., 2002). Além disso, as ilhotas transplantadas em diabéticos podem ser alvo da resposta auto-imune pré-existente nestes pacientes (Eisembarth et al., 1996).

Está cada vez mais claro que uma das principais barreiras para o sucesso absoluto do transplante de ilhotas pancreáticas é a agressão imune contra as ilhotas alogênicas. Neste contexto, a possibilidade de manipular as ilhotas antes do transplante pode ser uma atraente estratégia para evitar a rejeição, principalmente se adicionalmente for possível evitar o uso crônico de drogas imunossupressoras.

1.3 Modelo experimental de transplante de ilhotas pancreáticas

O transplante experimental de ilhotas pancreáticas é realizado em animais diabéticos para avaliar a funcionalidade das ilhotas em normalizar a glicemia. Os animais utilizados podem ser espontaneamente diabéticos, como os camundongos NOD (*non-obese diabetic mice*), ou induzidos através de pancreatectomia ou administração de drogas. Uma das estratégias mais utilizadas para induzir diabetes em roedores é a administração de estreptozotocina, uma droga que agride particularmente as células β das ilhotas pancreáticas, provocando necrose destas células (Yamamoto et al., 1981).

Basicamente, o transplante de ilhotas pancreáticas envolve duas etapas: o isolamento das ilhotas e o implante no receptor.

O isolamento das ilhotas pancreáticas passou a ser realizado com sucesso a partir da utilização de enzimas collagenases, as quais degradam a matriz extracelular do pâncreas, permitindo a separação das ilhotas pancreáticas do tecido acinar (Lacy et al., 1967). Mais recentemente,

métodos avançados de purificação permitiram a formulação de um conjunto de colagenases específicas para pâncreas de rato denominada Liberase RI.

Após o isolamento, as ilhotas pancreáticas devem ser purificadas, ou seja, separadas do tecido acinar. A purificação alcançou um maior êxito a partir da separação das ilhotas pancreáticas através de gradiente de densidade, proporcionado, dentre outros produtos, por polisucrose (Ficoll 400) (Scharp et al., 1973).

O local do implante varia de acordo com o objetivo do estudo. No entanto, seja um estudo endócrino ou imunológico, o implante das ilhotas deve necessariamente controlar a glicemia. A infusão das ilhotas pancreáticas pode ser feita pela veia porta, à semelhança do procedimento em humanos. Para estudos de rejeição, este sítio se faz desapropriado devido à dificuldade em localizar as ilhotas pancreáticas após a infusão. Neste contexto, o espaço sob a cápsula renal (transplante subcapsular) tem sido eleito como o melhor local para o implante das ilhotas pancreáticas em modelos de rejeição, principalmente pela facilidade em encontrar as ilhotas após o transplante e pelo rico aporte sangüíneo fornecido às ilhotas neste local (Yang et al., 1994).

Para que haja rejeição entre ratos, os transplantes devem ser realizados entre animais de diferentes linhagens ou entre animais de linhagem alogênica, ou seja, animais criados pelo método *outbred*. Animais *outbred* são animais originados a partir de cruzamentos entre proles de diferentes matrizes. Já animais criados no método *inbred*, são animais originados a partir de cruzamentos entre irmãos, ou seja, entre animais da

mesma prole. Animais criados no método *inbred* são isogênicos e, portanto, não rejeitam o enxerto.

No transplante alogênico, do primeiro ao quarto dia pós-transplante, observa-se um infiltrado inflamatório pequeno na região peri-ilhotas pancreáticas, semelhante ao observado no isotransplante (Steiniger et al., 1990). Estas células são principalmente macrófagos e linfócitos oriundos do peritônio e dos vasos da cápsula renal (Coddington et al., 1998). A partir do quinto dia, inicia-se um intenso infiltrado de células mononucleares formado principalmente por linfócitos. Estas células encontram-se predominantemente na região peri-ilhotas e grande parte destes linfócitos migram a partir dos vasos do parênquima renal (Coddington et al., 1998). O pico máximo de linfócitos é encontrado no sétimo dia e, em torno do nono ao décimo dia, as ilhotas pancreáticas são completamente destruídas e o animal retorna à hiperglicemia (Coddington et al., 1998).

1.4 Imunomodulação para transplante de ilhotas pancreáticas

A imunomodulação em transplante de ilhotas pancreáticas baseia-se em introduzir uma barreira física para isolar as ilhotas transplantadas (encapsulamento com membranas biocompatíveis) ou modificar geneticamente as células transplantadas para evitar a rejeição.

O encapsulamento das ilhotas pancreáticas com membranas bioartificiais tem sido intensivamente investigado, porém esta estratégia ainda enfrenta problemas importantes como a deficiente difusão de

nutrientes pelas membranas, a formação de fibrose peri-capsular e a carência de materiais 100% biocompatíveis (de Groot et al., 2004).

A terapia gênica apresenta-se como uma manobra extremamente interessante para tentar modular a resposta imune local. Os primeiros estudos tiveram início na década de 90, onde pesquisadores demonstraram que ilhotas pancreáticas transgênicas para genes capazes de inibir a atividade de linfócitos-T citotóxicos tinham uma maior sobrevida comparadas com ilhotas normais, após o transplante (Efrat et al., 1995).

Mais adiante, estudos demonstraram que a indução da expressão dos genes IL-12p40 e antagonista da IL-1 protege as ilhotas pancreáticas, aumentando a sobrevida em transplante experimental (Yasuda et al., 1998; Giannoukakis et al., 1999). Além disso, as ilhotas podem ser protegidas através da transfecção de genes anti-apoptóticos, como os genes para as moléculas A20 e Bcl-2 (Grey et al., 1999; Contreras et al., 2001).

Uma outra alternativa é impedir a rejeição através do bloqueio de vias co-ativadoras dos linfócitos T. Estudos demonstraram que ilhotas pancreáticas expressando o CTLA4 Ig, um bloqueador da via co-estimulatória CD28/B7, são protegidas tanto em transplante como em doença auto-imune experimentais (Lew et al., 1996; Uchikoshi et al., 1999).

Os fatores de crescimento também têm contribuído para a proteção das ilhotas pancreáticas em transplantes. A indução da expressão de IGF-1, TGF- β 1, HGF e VEGF aumenta a sobrevida das ilhotas pancreáticas em isotransplante experimental (Giannoukakis et al., 2000, Suarez-Pinzon et al., 2002; Lopez-Talavera et al., 2004; Cheng et al., 2004; Chae et al., 2005).

Embora os genes citados acima demonstrem eficácia em promover proteção às ilhotas pancreáticas no transplante, a busca por outros genes ainda persiste. Neste contexto, a indoleamina 2,3 dioxigenase, uma enzima envolvida no catabolismo do aminoácido triptofano, pode apresentar efeito protetor às ilhotas pancreáticas, através de seu possível efeito em modular a resposta imune localmente.

1.5 Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO)

A hipótese de que a IDO pode ter um efeito imunomodulador decorre de evidências recentes relacionadas à imunologia do aparelho reprodutor feminino: *Por que a mãe, imunologicamente competente, não rejeita o feto durante a gravidez?* Medawar, em 1953, sugeriu que três fatores seriam os possíveis responsáveis pela não rejeição do feto: a separação anatômica entre a mãe e o feto; a imaturidade antigênica do feto; e a tolerância imunológica da mãe durante a gravidez. O terceiro fator foi eleito como verdadeiro, uma vez que o sistema imune materno é incapaz de rejeitar tecidos que expressem antígenos paternos apresentados pelo embrião durante a gravidez (Tafari et al., 1995). Esta tolerância está possivelmente relacionada com a expressão de moléculas especiais no tecido placentário.

A evidência de que a IDO possa ser uma dessas moléculas vem com os estudos experimentais desenvolvidos por Munn e colaboradores que demonstraram que existe um aumento significativo da expressão de IDO em células trofoblásticas e que a administração de metil-triptofano, um inibidor da IDO, causa rejeição do tecido embrionário em camundongos, mediada

por linfócitos T alorreativos (Munn et al, 1998). Em estudo subsequente, o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que macrófagos “*in vitro*” expressando IDO inibem a proliferação de linfócitos T através da depleção de triptofano (Munn et al., 1999).

O mecanismo pelo qual a IDO exerce efeito imunomodulador ainda não foi completamente elucidado, porém a depleção de triptofano pode ser uma explicação, devido ao fato deste aminoácido ser essencial para a síntese de proteínas e, portanto, para a proliferação celular (Munn et al., 1999).

Estudos mais recentes têm demonstrado que o efeito imunomodulador da IDO não se limita apenas à depleção de triptofano, mas também aos metabólitos que são gerados a partir deste aminoácido, mais especificamente os derivados da quinurenina (Figura 2).

Figura 2. Degradação do aminoácido triptofano a partir da ação da IDO

Terness e colaboradores demonstraram que células dendríticas expressando IDO inibem a proliferação de linfócitos T “*in vitro*” e a adição de derivados da quinurerina potencializa este efeito inibitório (Terness et al., 2002). Além de inibir a proliferação, os derivados da quinurenina induzem apoptose em linfócitos T “*in vitro*”, além de suprimirem timócitos alorreativos “*in vivo*” (Fallarino et al., 2002). Estudo utilizando transplante de pele demonstrou que a administração de metabólitos da quinurenina aumenta a sobrevida do enxerto, provavelmente através da supressão de linfócitos T alorreativos (Bauer et al., 2005).

A enzima IDO é predominantemente expressa em órgãos linfóides e placenta (Yoshida et al., 1980; Munn et al., 1998). A expressão da IDO acontece também em outros tecidos e isso sugere que a enzima participe de fenômenos imunológicos específicos. A IDO é expressa em macrófagos ativados (Hu et al., 1995) e isto leva à possibilidade desta enzima participar de mecanismos anti-microbianos. De fato, baixas concentrações de triptofano, aminoácido degradado pela IDO, estão associadas com inibição da proliferação de vírus, protozoários e outros patógenos (Nagineni et al., 1996; Pfefferkorn et al., 1984; Bodaghi et al., 1999; Byrne et al., 1986). Além disso, a diminuição da concentração de triptofano, decorrente do aumento da expressão da IDO, está associada com diminuição da proliferação de células tumorais (de la Maza et al., 1988; Aune et al., 1989).

A enzima IDO tem despertado grande interesse na área de tolerância imunológica, o que fortalece a hipótese de seu efeito imunomodulador. Uma das evidências está no mecanismo de tolerância induzida pela molécula

CTLA 4. A CTLA 4 é expressa nos linfócitos T e compete com a molécula CD28, também expressa nos linfócitos T, pela ligação à molécula B7 nas células apresentadoras de antígenos. A ligação da molécula CD28 com a B7 é necessária como co-estímulo para a ativação do linfócito T. Já a ligação CTLA 4/B7 impede este sinal co-estimulador, amenizando a resposta imune. Estudo com transplante de ilhotas pancreáticas alogênicas entre camundongos demonstrou que as ilhotas são toleradas quando os animais são tratados com CTLA 4 Ig (inibidor da ligação CD28/B7) e esta tolerância é perdida quando há inibição da IDO com metil-triptofano (Grohmann et al., 2002). Este estudo indica a participação da IDO no mecanismo de tolerância.

Em modelo de alotransplante em camundongos o fígado é espontaneamente tolerado, enquanto o coração e outros órgãos são rejeitados (Qian et al., 1994). Estudos sugerem que esta tolerância está relacionada com uma expressão naturalmente elevada de IDO neste órgão (Pan et al., 2000). Para comprovar a funcionalidade da IDO nesta situação, camundongos tratados com o inibidor da IDO, o metil-triptofano, passam a rejeitar o tecido hepático transplantado (Miki et al., 2001).

O papel protetor da IDO em transplante está sendo demonstrado em outras modalidades. A indução da expressão da IDO através de transfecção diminui significativamente a rejeição de pulmão em alotransplante experimental (Swanson et al., 2003; Liu et al., 2006). Além disso, a indução da expressão da IDO em fibroblastos aumenta a sobrevida destas células em xenotransplante (Li et al., 2006). No mesmo contexto, córnea induzida a

expressar IDO tem maior sobrevida em alotransplante comparada com córnea sem expressão de IDO (Beutelspacher et al., 2006).

O papel da IDO em regular a resposta imune foi demonstrado também em modelo experimental de doença auto-imune. Estudo com camundongos espontaneamente diabéticos demonstrou que a indução da expressão da IDO, previamente ao início da doença, aumentou a sobrevida das ilhotas pancreáticas nesta doença auto-imune (Alexander et al., 2002).

Através destes estudos, fica claro que a IDO tem um efeito importante em controlar a resposta imune localmente e conseqüentemente evitar a rejeição em transplante, sem comprometer a imunidade do receptor.

Considerando-se que a agressão imunológica constitui uma importante barreira para o sucesso do transplante de ilhotas pancreáticas, o presente estudo visa analisar o efeito da indução da expressão da IDO em ilhotas pancreáticas alogênicas transplantadas experimentalmente. Para tanto, ilhotas pancreáticas foram isoladas de ratos Sprague-Dawley e transplantadas sob a cápsula renal de ratos Lewis diabéticos induzidos por estreptozotocina. As ilhotas pancreáticas foram transfectadas com o gene da IDO (isolado e clonado a partir de tecido embrionário/placenta) através de lipofecção. O efeito da indução da expressão da IDO foi analisado através da sobrevida das ilhotas pancreáticas (tempo de permanência com glicemia <300 mg/dL).

2 OBJETIVOS

O objetivo principal do presente estudo é analisar o efeito da indução da expressão da molécula IDO (indoleamina 2,3-dioxigenase) em ilhotas pancreáticas alogênicas transplantadas experimentalmente (sob a cápsula renal).

Mais especificamente, os objetivos são:

1) Padronizar o isolamento de ilhotas pancreáticas de rato, determinando:

- a melhor técnica para alcançar a perfusão total do pâncreas com solução de Liberase RI e o tempo de digestão do pâncreas perfundido a 37°C;
- o melhor gradiente de densidade para a purificação das ilhotas pancreáticas;
- a eficácia do isolamento a partir da análise funcional das ilhotas pancreáticas (secreção de insulina frente à alta concentração de glicose);

2) Padronizar o transplante de ilhotas pancreáticas no espaço subcapsular renal, determinando:

- a dose ideal de estreptozotocina para a indução do diabetes;
- o número mínimo de ilhotas pancreáticas transplantadas para reverter o diabetes;
- a sobrevida das ilhotas pancreáticas, através da verificação da glicemia, em transplante isogênico (Lewis para Lewis) e transplante

alogênico (Sprague-Dawley para Sprague-Dawley e Sprague-Dawley para Lewis);

3) Construir o vetor de expressão para IDO, através:

- do isolamento do cDNA para a IDO de tecido embrionário/placenta;
- da clonagem do cDNA para a IDO em bactérias supercompetentes;
- da inserção do cDNA para a IDO em vetor de expressão;

4) Transfectar ilhotas pancreáticas com vetor de expressão para IDO através de lipofecção, determinando:

- a melhor concentração de vetor de expressão para a transfecção, utilizando RT-PCR para IDO;
- o melhor tempo de incubação com o vetor de expressão, utilizando RT-PCR para IDO;
- a eficácia da transfecção em induzir a tradução da molécula IDO, através de imuno-histoquímica para IDO e depleção de triptofano (análise funcional da transfecção);

5) Determinar se a transfecção das ilhotas pancreáticas com vetor de expressão para IDO aumenta a sobrevivência das ilhotas pancreáticas no transplante alogênico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Toda metodologia aplicada no presente estudo foi aprovada pela Comissão Interna de Biossegurança do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPESQ, protocolo 236/05).

Para a realização do presente estudo foram utilizados 90 ratos machos da linhagem Wistar, 224 ratos machos da linhagem Lewis, 3 ratos fêmeas da linhagem Lewis e 107 ratos machos da linhagem Sprague-Dawley. Os ratos da linhagem Wistar foram obtidos de uma colônia mantida pelo biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os ratos da linhagem Lewis foram criados no biotério local do Laboratório de Investigação Médica 16 (Faculdade de Medicina da USP), a partir de matrizes adquiridas comercialmente do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade de Campinas. Já os animais da linhagem Sprague-Dawley foram obtido do biotério do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.2 Padronização do isolamento de ilhotas pancreáticas (IP)

3.2.1 Padronização da perfusão e extração do pâncreas

A padronização da perfusão do órgão *“in situ”* e extração do pâncreas consistiu em determinar 3 fatores importantes: o melhor método para a ligação do ducto biliar comum para alcançar a perfusão total do pâncreas; o volume ideal de solução de Liberase RI a ser perfundido no órgão; e o melhor método para dissecar o pâncreas sem lesar o órgão.

Para esta etapa foram utilizados 40 ratos em jejum da linhagem Wistar.

Os ratos foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de cetamina (35,6 mg/Kg) (Ketamin-S, Cristália) e xilazina (5,7 mg/Kg) (Ronpun, Bayer, Alemanha) e submetidos a laparotomia. Em seguida, os intestinos foram rebatidos para a visualização do ducto biliar comum e a porção distal deste ducto foi bloqueada com pinça de Kelly ou com fio de algodão 4.0 (Ethicon, São Paulo, Brasil). A próxima etapa consistiu na toracotomia para a canulação do ducto hepático comum com escalpe 23G (BD, Minas Gerais, Brasil). Em seguida, foram injetados 5, 7,5 ou 10 mL de solução de Liberase RI (Roche Laboratories, Indiana, EUA) para a perfusão do pâncreas e, ao final da perfusão, o órgão foi dissecado através da manipulação direta do pâncreas ou através da manipulação dos intestinos, da gordura abdominal e do baço. Após a retirada, o pâncreas foi colocado em tubo de polipropileno de 15 mL (Corning, Nova Iorque, EUA).

3.2.2 Padronização da digestão do pâncreas

Esta fase consistiu em determinar o melhor tempo de digestão do tecido pancreático, ou seja, permanência do tecido pancreático em banho maria a 37°C após perfusão com 7,5 mL de solução de Liberase RI.

Foram utilizados pâncreas de 30 ratos machos da linhagem Wistar, perfundidos com 7,5 mL de Liberase RI, após ligação do ducto biliar comum com fio de algodão, e dissecados a partir da manipulação dos intestinos, da gordura abdominal e do baço.

Os pâncreas contidos em tubos de polipropileno de 15 mL foram colocados em banho maria a 37°C e permaneceram por 10, 15, 20 ou 25 minutos. Em seguida, 3 mL de *Q-buffer* (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,4 mM KH₂PO₄, 0,5 mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂ 2H₂O, 8 mM MgSO₄ 7H₂O, 4 mM NaHCO₃, 5 mM C₆H₁₂O₁₆, 3 mM NaHPO₄ 7H₂O, 10% de soro fetal bovino; pH 7,2) foram adicionados aos tubos, os quais foram vigorosamente agitados verticalmente. Em seguida, o homogenato pancreático foi colocado em tubo de polipropileno de 50 mL, o qual foi completado com *Q-Buffer*. O homogenato foi aspirado em seringa de 20 cc (BD, Minas Gerais, Brasil) contendo agulha 18G (BD, Minas Gerais, Brasil) e o conteúdo foi filtrado em filtro com poros de 400 µm de diâmetro. Em seguida, o homogenato pancreático foi centrifugado a 250g (Mistral 2000R, Reino Unido) por 3 minutos a 4°C. O *pellet* foi então re-suspendido em RPMI de lavagem (RPMI com 10% de soro fetal bovino, penicilina 100 µg/mL, estreptomicina 100 µg/mL, heparina 100 u/mL, pH 7,2; todos componentes da Invitrogen, Califórnia, EUA) até um volume de 50 mL e centrifugado a 250g por 3

minutos a 4°C. O *pellet* foi novamente re-suspendido em RPMI de lavagem até um volume de 50 mL e centrifugado a 250g por 3 minutos a 4°C.

O *pellet* foi re-suspendido em 40 mL de RPMI de lavagem e uma amostra de 50µL foi colocada sobre uma lâmina e acrescida de 5 µL de solução de ditizona para coloração e observação sob microscopia óptica com aumento de 40X (microscópio Nikon, Japão).

A solução de ditizona foi preparada da seguinte maneira: 50 mg de ditizona foram dissolvidos em 5 mL de DMSO (Sigma, St. Louis, EUA) e posteriormente diluídos 20 vezes em HBSS. A solução foi então filtrada em filtro de 0,22 µm de diâmetro (Millipore, Massachusetts, EUA).

O melhor tempo de digestão foi determinado pela quantidade de tecido pancreático digerido, pela maior quantidade de IP livres de tecido acinar e pela integridade das IP.

3.2.3 Padronização da purificação das IP

A purificação das IP consiste na separação das IP do tecido acinar através de gradiente de densidade. No presente estudo foram testados 3 diferentes gradientes de densidade: gradiente descontínuo de Ficoll; gradiente contínuo de Ficoll; e gradiente contínuo de iodixanol.

Os gradientes foram realizados após digestão de 20 pâncreas a 37°C por 20 minutos, extraídos de ratos machos da linhagem Wistar. Oito pâncreas foram destinados ao gradiente descontínuo de Ficoll, seis para o gradiente contínuo de Ficoll e seis para o gradiente contínuo de iodixanol.

3.2.3.a Gradiente descontínuo de Ficoll: O gradiente descontínuo de Ficoll foi formado através de 4 soluções de Ficoll (Ficoll PM 400, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) com diferentes densidades: 1,110 g/cm³, 1,096 g/cm³, 1,069 g/cm³ e 1,037 g/cm³. O Ficoll foi dissolvido em *D-buffer* (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,4 mM KH₂PO₄, 0,5 mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂ 2H₂O, 8 mM MgSO₄ 7H₂O, 4 mM NaHCO₃, 5 mM C₆H₁₂O₁₆, 3 mM NaHPO₄ 7H₂O, 25 mM HEPES, pH 7,2) durante 24 horas e as densidades foram confirmadas através de densitometria (densitômetro DMA 35, Cole Palmer, Austria).

Para alcançar a densidade de 1,110 g/cm³ foi necessária uma solução a 34% de Ficoll, enquanto para alcançar as densidades de 1,096 g/cm³, 1,069 g/cm³ e 1,037 g/cm³, foram necessárias soluções a 29,7%, 21,2% e 11,1%, respectivamente.

O *pellet* formado por tecido pancreático (fase de digestão pancreática) foi re-suspendido em 10 mL de Ficoll 1,110 g/cm³. Em seguida, foram adicionados lentamente 10 mL de Ficoll 1,096 g/cm³, 10 mL de Ficoll 1,069 g/cm³ e 5 mL de Ficoll 1,037 g/cm³. O gradiente foi então centrifugado a 400g por 20 minutos em temperatura ambiente e as IP foram coletadas das interfaces entre as soluções de Ficoll 1,096/1,069 e 1,069/1,037. As IP foram colocadas em tubo de 50 mL contendo RPMI de lavagem e centrifugadas a 300g por 3 minutos a 4°C. O *pellet* de IP foi re-suspendido em RPMI de lavagem e novamente centrifugado nas mesmas condições. Esta etapa se repetiu por mais uma vez.

3.2.3.b Gradiente contínuo de Ficoll: O gradiente contínuo de Ficoll foi formado através de 4 soluções de Ficoll com diferentes densidades: 1,125 g/cm³, 1,110 g/cm³, 1,080 g/cm³ e 1,030 g/cm³. O Ficoll foi dissolvido em *D-buffer* conforme descrito anteriormente.

Para alcançar a densidade de 1,125 g/cm³ foi necessária uma solução a 39% de Ficoll, enquanto para alcançar as densidades de 1,110 g/cm³, 1,080 g/cm³ e 1,030 g/cm³, foram necessárias soluções a 34%, 25% e 9%, respectivamente.

O *pellet* formado por tecido pancreático foi re-suspendido em 10 mL de Ficoll 1,125 g/cm³. Em seguida, 10 mL de Ficoll 1,110 g/cm³ e 10 mL de Ficoll 1,080 g/cm³ foram adicionados simultaneamente através de bomba peristáltica (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia), formando um gradiente contínuo. Para finalizar, foram adicionados 5 mL de Ficoll a 1,030 g/cm³. O gradiente foi então centrifugado a 400g por 20 minutos em temperatura ambiente e as IP foram coletadas com os primeiros 10 mL de gradiente. As IP foram colocadas em tubo de 50 mL contendo RPMI de lavagem e centrifugadas a 300g por 3 minutos a 4°C. O *pellet* de IP foi re-suspendido em RPMI de lavagem e novamente centrifugado nas mesmas condições. Esta etapa se repetiu por mais uma vez.

3.2.3.c Gradiente contínuo de iodixanol: O gradiente contínuo de iodixanol foi formado através de 4 soluções de iodixanol (Visipaque, Roche Laboratories, Indiana, EUA) com diferentes densidades: 1,125 g/cm³, 1,110 g/cm³, 1,080 g/cm³ e 1,030 g/cm³. O iodixanol foi diluído em *D-buffer* e as

densidades das soluções foram confirmadas também através de densitometria (densitômetro DMA 35, Cole Palmer, Áustria).

Para alcançar a densidade de $1,125 \text{ g/cm}^3$ foi necessária uma solução a 45% de iodixanol, enquanto para alcançar as densidades de $1,110 \text{ g/cm}^3$, $1,080 \text{ g/cm}^3$ e $1,030 \text{ g/cm}^3$, foram necessárias soluções a 40%, 30% e 14%, respectivamente.

O *pellet* formado por tecido pancreático foi re-suspendido em 10 mL de iodixanol $1,125 \text{ g/cm}^3$. Em seguida, 10 mL de iodixanol $1,110 \text{ g/cm}^3$ e 10 mL de iodixanol $1,080 \text{ g/cm}^3$ foram adicionados simultaneamente através de bomba peristáltica (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia), formando um gradiente contínuo. Para finalizar, foram adicionados 5 mL de iodixanol a $1,030 \text{ g/cm}^3$. O gradiente foi então centrifugado a 400g por 20 minutos em temperatura ambiente e as IP foram coletadas juntas com os primeiros 10 mL de gradiente. As IP foram colocadas em tubo de 50 mL contendo RPMI de lavagem e centrifugadas a 300g por 3 minutos a 4°C . O *pellet* de IP foi re-suspendido em RPMI de lavagem e novamente centrifugado nas mesmas condições. Esta etapa se repetiu por mais uma vez.

3.2.3.d Coloração e contagem das IP: O *pellet* de IP recuperado após separação em gradiente de densidade foi re-suspendido em 2 mL de RPMI de lavagem e uma amostra de 50 μL foi colocada na superfície de uma lâmina de vidro para microscópio. Em seguida, foram acrescidos 5 μL de solução de ditizona e, após 10 minutos, as IP $> 150 \mu\text{m}$ de diâmetro foram contadas sob aumento de 40X (microscópio Nikon, Japão).

O grau de pureza também foi verificado, ou seja, a quantidade de tecido acinar presente na amostra de IP. Quando aproximadamente 70-90% das células coravam com ditizona, consideramos como tendo pureza baixa de IP, *score* (+). Quando aproximadamente 90-99% das células coravam com ditizona, consideramos como tendo pureza média de IP, *score* (++) e >99% como pureza alta de IP, *score* (+++).

3.2.4 Análise funcional das IP: secreção de insulina

A análise funcional consistiu em dosar a insulina presente no sobrenadante de IP após estímulo com concentrações baixa e alta de glicose. Foram utilizadas 30 IP de aproximadamente 150 μm de diâmetro divididas em 3 grupos.

Cada grupo de 10 IP, isoladas através de gradiente contínuo de iodixanol, foi colocado em placa de cultura com área de 2 cm^2 (placa de 24 *wells*, TPP, Suíça), contendo 2 mL de solução de Krebs (25 mM Hepes, 114 mM NaCl, 23 mM NaHCO_3 , 5 mM KCl, 2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,9 mM MgCl_2 , 0,1% BSA, pH 7,2) com 2,75 mM de glicose. As IP foram mantidas em incubadora a CO_2 5% (Forma Scientific, Ohio, EUA) durante 45 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi coletado e substituído por 2 mL de solução de Krebs contendo 16,5 mM de glicose. As IP foram novamente incubadas sob 5% de CO_2 por 45 minutos e o sobrenadante foi coletado e substituído por 2 mL de solução de Krebs contendo 2,75 mM de glicose. As IP permaneceram por mais 45 minutos em incubadora e o sobrenadante foi

coletado. As amostras de sobrenadante foram armazenadas a -80°C até a realização da dosagem de insulina por radioimunoensaio (RIA).

Para a realização do RIA foram utilizados kits para dosagem de insulina de rato (Linco Research, Missouri, EUA) e o leitor para radiação gama (Gamma 5500B, Beckman, EUA). As amostras foram diluídas 10 X em solução de Krebs e 50 μL foram utilizados para o RIA. A curva padrão foi feita seguindo-se as orientações sugeridas pelo Kit.

3.2.5 Controle de contaminação

Todas as etapas do isolamento, exceto a extração do pâncreas, foram realizadas em ambiente estéril. Em todas as etapas foram colhidas amostras (100 μL) e incubadas em meio LB Agar para controlar possíveis contaminações. A positividade para contaminação foi determinada pela presença de colônias de bactérias nas placas de LB Agar (Invitrogen, Califórnia, EUA), após 24 horas de incubação a 37°C .

3.3 Padronização do transplante de IP sob a cápsula renal

3.3.1 Indução do diabetes

Duas diferentes doses de estreptozotocina foram testadas para a indução do diabetes: 55 e 65 mg/Kg.

Três ratos Lewis machos foram tornados diabéticos através de uma única injeção endovenosa de estreptozotocina na dose de 55 mg/Kg e três

ratos Lewis foram tornados diabéticos com a dose de 65 mg/Kg. A estreptozotocina (Sigma, St. Louis, EUA) foi dissolvida em tampão citrato (ácido cítrico 5 mM e citrato trissódico hidratado 5 mM, Sigma, St. Louis, EUA) e injetada pela veia caudal.

A confirmação do diabetes foi feita através da verificação da glicemia por fotometria (Accu-Chek Advanage, Roche Laboratories, Alemanha), no período da manhã, após 48 horas da injeção. Apenas os animais que apresentaram glicemia acima de 300 mg/dL foram considerados diabéticos. A partir de então, a glicemia e o peso dos animais foram verificados a cada dois dias.

Devido à mortalidade do grupo que recebeu 65 mg/Kg, outros cinco ratos Lewis machos foram tornados diabéticos com a mesma dose e receberam insulina (2u/rato/dia) a partir de 24h da injeção de estreptozotocina.

3.3.2 Coleta das IP após isolamento e cultura das IP

IP foram incubadas em meio de cultura RPMI (Invitrogen, Califórnia, EUA) sob atmosfera de CO₂ 5% durante 5 dias.

Após incubação, as IP foram centrifugadas a 200g por 3 minutos e aspiradas em capilar de vidro com o auxílio de uma micro-seringa Hamilton (Nevada, EUA). O capilar foi centrifugado a 150g por 1 minuto e o *pellet* de IP foi formado na ponta do capilar de vidro.

3.3.3 Microinjeção das IP – Transplante experimental de IP

Os ratos receptores foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de cetamina (35,6 mg/Kg) (Ketamin-S, Cristália) e xilazina (5,7mg/Kg) (Ronpun, Bayer) e submetidos a lombotomia esquerda. O rim esquerdo foi acessado e um corte de 5 mm foi feito na cápsula renal. O capilar de vidro contendo o *pellet* de IP foi então colocado sob a cápsula renal e as IP foram injetadas com o auxílio de um micro-injetor, construído especificamente para esta finalidade. O micro-injetor consistiu de uma seringa de vidro de 1 mL acoplada a um micrômetro com escala de 0,001mm (Digimess, São Paulo, Brasil).

Após a infusão das IP, a cápsula renal foi cauterizada e a incisão da lombotomia do animal foi suturada com fio de seda 5,0 (Ethicon, São Paulo, Brasil).

3.3.4 Determinação do número mínimo de IP para reverter o diabetes

Para esta fase foram utilizados 151 ratos Lewis machos, dos quais 48 foram ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (55 mg/Kg) (receptores) e os demais foram utilizados como doadores de IP.

Para determinar o número mínimo de IP necessário para reverter o diabetes foram feitos transplantes variando de 200 a 3.000 IP, separadas por gradiente contínuo de Ficoll ou de iodixanol.

Após 24 horas do transplante, a glicemia foi verificada por fotometria (Accu-Chek Advanage, Roche Laboratories, Alemanha).

O sucesso do transplante em reverter o diabetes foi alcançado quando os animais apresentaram redução significativa da glicemia (<200 mg/dL) após 24 horas do transplante.

3.4 Análise da rejeição às IP

A rejeição ao enxerto foi analisada através da sobrevivência das IP e através de análise histológica e de imuno-histoquímica.

3.4.1 Modelos alogênicos e isogênicos de transplante de IP

Foram analisados 3 diferentes tipos de transplante: de ratos Lewis para ratos Lewis (transplante isogênico), de ratos Sprague-Dawley para ratos Sprague-Dawley (transplante alogênico) e de ratos Sprague-Dawley para ratos Lewis (transplante alogênico).

Para os transplantes isogênicos foram utilizados 18 ratos Lewis machos como doadores de IP e 6 ratos Lewis machos como receptores. Para o transplante alogênico (Sprague-Dawley → Sprague-Dawley) foram utilizados 9 ratos Sprague-Dawley machos como doadores de IP e 3 ratos Sprague-Dawley machos como receptores. Finalmente, para o outro tipo de transplante alogênico (Sprague-Dawley → Lewis) foram utilizados 36 ratos Sprague-Dawley machos como doadores de IP e 12 ratos Lewis machos como receptores. Nove ratos Lewis machos diabéticos e 3 ratos Sprague-Dawley machos diabéticos foram utilizados como controle sem transplante.

As IP foram purificadas por gradiente contínuo de iodixanol e mantidas por 1 dia em cultura com meio RPMI contendo apenas 2% de soro fetal bovino e 4 dias com meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 100 µg/mL e estreptomicina 100 µg/mL).

Os ratos receptores foram induzidos diabéticos com estreptozotocina na dose de 55 mg/Kg e receberam 2.500 IP sob a cápsula renal após 3 dias da indução do diabetes.

3.4.2 Acompanhamento dos animais transplantados

Os animais transplantados foram acompanhados durante 45 dias, verificando-se a glicemia e o peso a cada 2 dias. Além disso, foram feitas coletas de sangue para dosar a insulina através de radioimunoensaio (RIA). O *end-point* para o sacrifício durante o período de acompanhamento foi determinado por perda abrupta de massa corporal (perda de >10% em 2 dias).

Para a realização do RIA foram utilizados kits para dosagem de insulina de rato (Linco Research, Missouri, EUA) e o leitor para radiação gama (Gamma 5500B, Beckman, EUA). A curva padrão foi feita seguindo-se as orientações sugeridas pelo Kit. Foram utilizadas amostras colhidas antes da indução do diabetes, antes do transplante, 1 dia pós-transplante e 45 dias pós-transplante ou no dia do *end-point*.

Após 45 dias do transplante, os animais isogênicos transplantados foram submetidos à nefrectomia e foram acompanhados por mais 15 dias para a verificação da glicemia. Para a nefrectomia, os animais foram

anestesiados através de injeção intraperitoneal de cetamina (35,6 mg/Kg) (Ketamin-S, Cristália) e xilazina (5,7mg/Kg) (Ronpun, Bayer) e submetidos a lombotomia esquerda. O rim esquerdo foi acessado e o hilo renal foi amarrado com fio de seda 3,0 (Ethicon, São Paulo, Brasil). O rim foi retirado e o hilo renal permaneceu amarrado. O rim retirado foi seccionado transversalmente, sendo retirada uma fatia de aproximadamente 5 mm de espessura contendo as IP transplantadas. Em seguida, o tecido extraído foi fixado e armazenado.

Para analisar o enxerto 10 dias pós-transplante, quatro ratos Lewis transplantados com 2.500 IP purificadas por gradiente de iodixanol (utilizados na fase de determinação do número mínimo de IP para reverter o diabetes) foram utilizados. Além destes animais, mais 6 transplantes alogênicos (Sprague-Dawley→Lewis) foram realizados para a mesma finalidade. Dez dias pós-transplante, os receptores foram sacrificados através de injeção intraperitoneal de cetamina (70 mg/Kg) (Ketamin-S, Cristália) e xilazina (12 mg/Kg) (Ronpun, Bayer, Alemanha). O rim esquerdo foi acessado através de laparotomia e um fragmento de aproximadamente 5 mm, compreendendo o *pellet* de IP implantado, foi retirado e processado para histologia e imuno-histoquímica.

3.4.3 Sobrevida das IP

A sobrevida das IP pós-transplante foi determinada pelo tempo em que os animais permaneceram com glicemia <300 mg/dL. Mais especificamente, a sobrevida foi determinada pelo tempo entre o transplante e o dia em que

os animais retornaram com uma glicemia >300 mg/dL, a qual deveria permanecer alta por no mínimo mais 3 dias consecutivos.

3.4.4 Análise histológica e de imuno-histoquímica

O fragmento renal contendo as ilhotas pancreáticas alojadas sob a cápsula renal foi previamente lavado em solução fisiológica e permaneceu 45 minutos em solução de Duboscq-Brazil (etanol 53%, formol 10%, ácido acético 7% e ácido pícrico 0,4%). Em seguida, o fragmento foi colocado em caixeta perfurada e mantido em solução de formol 10% em tampão fosfato até a inclusão em blocos de parafina.

O processo de parafinização foi realizado pelo processador automático de tecido “histoquine” (Jung-Histokinette 2000 Leica, Nussloch, Alemanha) e durou cerca de 14 horas. O processo foi iniciado pela desidratação dos tecidos em álcoois com concentrações progressivas (álcool 50%, álcool 70%, álcool 96% (2 banhos), álcool absoluto (2 banhos)), seguida da diafanização, passando os tecidos em uma solução de álcool absoluto + xilol (v/v) e em três banhos de xilol, sendo então imersos em parafina fundida a 60°C. O material parafinado foi incluído em blocos/moldes e permaneceu em temperatura ambiente.

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica, Nussloch, Alemanha) e fragmentos de 3 a 4 µm foram aderidos em lâminas previamente revestidas por gelatina 2% (Sigma Chemical CO, St. Louis, EUA). As lâminas com os cortes permaneceram em estufa a 60°C por 2 horas e em seguida foram armazenadas a 4°C.

Para o preparo da gelatina, 2,5 g de gelatina purificada tipo A (Sigma Chemical CO, St. Louis, EUA) foram adicionados em 500 mL de água destilada a 50°C. Quando esta solução atingiu 30°C, adicionou-se 0,25 g de sulfato de potássio crômico (Sigma Chemical CO, St. Louis, EUA). Em seguida, esta solução foi filtrada. As lâminas foram previamente lavadas em solução de álcool/éter (1:1) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e mergulhadas por aproximadamente 8 segundos na solução de gelatina. Em seguida, foram armazenadas a 4°C.

3.4.4.a Desparafinização: As lâminas passaram por um processo de desparafinização, ou seja, permaneceram 9 minutos em xilol (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 2 vezes. Em seguida, as lâminas foram desidratadas, através de banho em etanol absoluto (2 vezes) (Merck, Darmstadt, Alemanha), etanol 96% e etanol 70%. Para finalizar este processo, as lâminas foram imersas em água destilada e processadas.

3.4.4.b Coloração pelo Tricrômio de Masson: Após desparafinização, as lâminas foram imersas em uma solução de hematoxilina de Harris durante 5 minutos. Em seguida, foram lavadas rapidamente em água corrente, permanecendo no escarlate de Briebrich (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) durante 5 minutos e novamente lavadas. Em seguida, as lâminas foram submersas em diferenciador de Masson durante 5 minutos, seguindo-se para uma solução de anilina a 5%. O próximo procedimento foi a lavagem das lâminas em água acética a 1%, para a fixação da anilina. Em seguida,

as lâminas passaram pelo processo de desidratação e diafanização e foram montadas com meio permanente Permount (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Para preparar o diferenciador de Masson, foram adicionados 5g do ácido fosfomolibdico (QEEL, São Paulo, Brasil) e 5g do ácido fosfotungstico (QEEL, São Paulo, Brasil) em 200 mL de água destilada. A solução foi misturada e filtrada em papel filtro com 6 µm de espessura.

A solução de anilina foi preparada dissolvendo-se 3 g de azul de anilina (QEEL, São Paulo, Brasil) em 100 mL de água destilada acrescido de 2 mL de ácido acético glacial (Merck, Darmstadt, Alemanha). Esta solução corante foi misturada e em seguida filtrada.

3.4.4.c Imuno-histoquímica para macrófagos, linfócitos T e insulina: A identificação de macrófagos foi realizada através de anticorpo monoclonal anti-monócito/macrófago de rato (anti-ED-1) (1:200) (Serotec, Raleigh, EUA) produzido em camundongo. Para a identificação de linfócitos T foi utilizado o anticorpo de camundongo anti-linfócito T de rato (1:100) (Harlan Sera-lab, Belton, Inglaterra). Finalmente, para a identificação de insulina foi utilizado o anticorpo de camundongo anti-insulina (1:100) (Santa Cruz, Califórnia, EUA). Para a marcação destes anticorpos foi utilizado o método estreptavidina-fosfatase alcalina.

Com o objetivo de aumentar a exposição antigênica, após a desparafinização, as lâminas foram imersas em tampão citrato (2,1g de ácido cítrico mono hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha) dissolvidos em água destilada para 1000 mL, pH 6,0) e levadas para o forno micro-ondas

(Sanyo, São Paulo, Brasil) com potência de 2400 watts durante 15 minutos. As lâminas foram então resfriadas em água corrente e lavadas com água destilada para a retirada do tampão citrato, permanecendo posteriormente em TBS.

Para o bloqueio de reação inespecífica, os cortes foram incubados com solução de avidina D (Vector, Burlingame, EUA) durante 15 minutos, sendo posteriormente lavadas com TBS durante 5 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com uma solução de biotina (Vector, Burlingame, EUA) durante 15 minutos e posteriormente lavados com TBS por 5 minutos. Os cortes foram então incubados com soro de cavalo (Vector, Burlingame, EUA), diluído 70 vezes em TBS, durante 30 minutos e, após a retirada do excesso do soro, os cortes foram incubados com anticorpo primário (anti-ED-1, anti-CD3 ou anti-insulina), durante a noite, a 4°C. No dia seguinte, os cortes foram lavados em TBS por 5 minutos e incubados com anticorpo biotinilado anti-camundongo, adsorvido em rato (Vector, Burlingame, EUA), diluído 200 vezes em TBS, durante 45 minutos. Após lavagem com TBS, para completar a reação, os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-fosfatase alcalina (1/50 em TBS) (Dako, Carpinteria, EUA) por 30 minutos, lavados novamente com TBS e destinados à revelação.

Para a revelação, os cortes foram incubados com uma solução contendo substrato para a enzima fosfatase e o corante fast-red (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA), preparada da seguinte maneira: 1 mg de fosfato de naftol AS-MX (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) foram diluídos em 100 µl de dimetilformamida (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Em seguida, a solução foi diluída em 4,9 mL de tampão Tris 0,1 M (pH = 8,2) e 10 µL de levamisol 1 M (Sigma Chemical CO, St Louis, EUA) foram acrescentados. Esta solução ficou armazenada a -20°C e, no momento da revelação, foi misturada com 5 mg do corante fast-red.

A revelação foi realizada sob microscopia em aumento de 100 X e as células positivas apresentaram coloração avermelhada. O tempo de revelação foi de aproximadamente 15 minutos. As lâminas foram contra-coradas com hemalunbre de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 2 minutos e lavadas em água corrente. As lâminas foram então montadas com glicergel (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A porcentagem de tecido positivo foi calculada com o programa Adobe Photoshop CS, onde foi possível selecionar a área total do enxerto e as áreas marcadas, calculando a quantidade de pixels de cada área.

3.5 Construção do vetor de expressão para a IDO

3.5.1 Extração de RNA

Para a obtenção do cDNA da IDO, foi extraído RNA total de tecido embrionário/placenta de ratos Lewis. Para tanto, 3 ratas foram sacrificadas com 5, 10 ou 15 dias de gestação através de injeção intraperitoneal de cetamina (70 mg/Kg) (Ketamin-S, Cristália) e xilazina (12 mg/Kg) (Ronpun,

Bayer, Alemanha). Um embrião/placenta foi congelado em nitrogênio líquido enquanto outro foi fixado para imuno-histoquímica.

Todas as soluções utilizadas para a extração de RNA foram feitas com água purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Milli-Q Element A10 System, Massachusetts, EUA) e tratada com dietilpirocarbonato (Sigma, Sto Louis, EUA). Para cada litro de água Milli-Q foram adicionados 1 mL de dietilpirocarbonato e esta solução permaneceu a 60°C durante a noite. No dia seguinte, a solução foi autoclavada (121°C por 20 minutos).

RNA total foi extraído através do reagente Trizol (Invitrogen, Califórnia, EUA), seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante. Cada 100 mg de tecido foi homogenizado em 1 mL de Trizol através de dispersador de tecidos (IKA – Labortechnik Ultra Turrax T25 Janke & Kunkel, Alemanha). Para cada mL de homogenato foi adicionado 200µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha). A mistura foi novamente homogenizada e mantida por 3 minutos a temperatura ambiente. Após incubação, a mistura foi centrifugada a 12.000g a 4° C por 20 minutos. A fase superior contendo RNA foi transferida para um tubo eppendorf de 2 mL contendo o mesmo volume de isopropanol gelado (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA). As amostras foram centrifugadas a 12.000g durante 10 minutos e o *pellet* de RNA foi re-suspendido com 1mL de etanol 70% (Merck, Darmstadt, Alemanha) e centrifugado novamente a 12.000g por 10 minutos. Este procedimento foi repetido por mais uma vez e, por último, o pellet foi reconstituído com 100µL de água previamente tratada com dietilpirocarbonato (Sigma, Sto Louis, EUA).

A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro (HITACHI U-2000, Pleasanton, EUA), medindo-se a densidade óptica nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Foi feito o cálculo da concentração de RNA, expresso em µg/mL, a partir da absorbância à 260nm. A leitura de 1 OD corresponde a uma solução pura de RNA em fita-simples na concentração de 40 µg/mL. A leitura a 280 nm foi utilizada para determinar a contaminação das amostras com proteínas. A análise foi feita baseando-se na razão entre as absorbâncias a 260 e 280nm e o valor aceitável foi de 1,7 a 2,0. foi acrescido para cada 100 mg de tecido.

3.5.2 RT-PCR para IDO

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando-se o kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Califórnia, EUA) e todos os reagentes adicionais foram adquiridos da mesma empresa. Cinco microgramas de RNA total contidos em 11 µL de água livre de RNase foram misturados a 1 µL de dNTPs (10 mM) e a 1 µL de oligo (dT) (50 µM). A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e resfriada em gelo. Em seguida, foram adicionados 4 µL de *5X first-strand buffer*, 1 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de inibidor de RNase e 1 µL de SuperScript III. A mistura foi aquecida a 50°C por 60 minutos e a 70°C por 15 minutos. Após a reação, as amostras permaneceram a -20°C.

A reação em cadeia da polimerase foi realizada utilizando-se a enzima *Platinum® Taq DNA polymerase High Fidelity* (Invitrogen, Califórnia, EUA). Os *primers* foram desenhados para amplificar 100% do cDNA da IDO e

foram construídos pela empresa Invitrogen (Califórnia, EUA). Além disso, foram acrescentadas duas seqüências aos *primers*: uma de 6 nucleotídeos no *primer forward*, referente ao sítio para a enzima de restrição Nhe, e uma de 8 nucleotídeos no *primer reverse*, referente ao sítio para a enzima de restrição Pme.

Dois microlitros de cDNA foram acrescidos de 2,5 µL de *Buffer High Fidelity*, 1,5 µL de MgSO₄ (50mM), 1 µL de dNTPs, 1 µL de *primer Forward* (5'-GCTAGCATGCCTCACAGTCAAATATCTCC-3'), 1 µL de *primer reverse* (5'-GTTTAAACCTAAGGCCAACTCAGAAGGG-3') e 0,5 µL de *Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity*. A mesma reação foi submetida a variações de temperatura de anelamento (gradiente 60-66°C). A mistura foi aquecida a 94°C por 3 minutos e submetida a 40 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 60-66°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto (Termociclador PTC-100, MJ Research, Watertown, EUA). Ao término, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%. O resultado esperado foi uma banda de 1224 pb, referente ao cDNA da IDO (Anexo A).

3.5.3 Clonagem do cDNA da IDO

O produto de PCR (referente ao cDNA da IDO) foi clonado através do vetor pGEM-T. A reação para clonagem foi realizada através do kit *pGEM-T Easy Vector Systems* (Promega, Madison, EUA).

Dois microlitros de produto de PCR foram acrescidos de 5 µL de 2x *rapid ligation buffer*, 1 µ de vetor pGEM-T, 1 µL de DNA *ligase* e 1 µL de água. Após uma hora de incubação em temperatura ambiente, 2 µL da

reação de ligação foram adicionados a 50 µL de bactérias super competentes (One Shot® Top 10F', Invitrogen, Califórnia, EUA), as quais permaneceram 20 minutos em gelo. Em seguida, as bactérias foram incubadas a 42°C por 50 segundos e levadas novamente ao gelo. Foram acrescentados 950 µL de meio SOC (Invitrogen, Califórnia, EUA) e as células foram incubadas a 37°C por 2 horas sob agitação constante (150 rpm) (Amerex, Califórnia, EUA). Após incubação, 100 µL de bactérias foram incubados em placas de LB Agar, contendo ampicilina (100 µg/mL, Strides Arcolab, Bangalore, Índia), IPTG (1,5 mM) (Invitrogen, Califórnia, EUA) e X-Gal (80 µg/mL) (Invitrogen, Califórnia, EUA). As placas permaneceram a 37°C durante 24 horas e 10 colônias brancas, resistentes a ampicilina, foram colhidas e incubadas individualmente com 2 mL de meio LB (Invitrogen, Califórnia, EUA) durante 24 horas.

Após incubação, o DNA bacteriano foi extraído através do kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, EUA) e digerido com a enzima de restrição Eco RI (Promega, Madison, EUA). Em seguida, o produto da reação de digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%.

A amostra que apresentou 3 bandas após digestão com EcoRI possuía o cDNA da IDO. O complexo vetor/cDNA possui 3 sítios para a EcoRI: um no vetor, antes do inserto (cDNA); um no vetor depois do inserto; e outro dentro do inserto. A primeira banda, de aproximadamente 3015 pb, é referente ao DNA do vetor pGEM-T e as demais, de aproximadamente 880 e 344 pb, são referentes ao cDNA da IDO.

A bactéria contendo o cDNA da IDO foi replicada em um volume de 100 μ e submetida à extração de DNA a partir do kit *Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, EUA).

3.5.4 Inserção do cDNA da IDO em vetor de expressão

O vetor de expressão utilizado foi o pcDNA 3.1 (Invitrogen, Califórnia, EUA).

O DNA obtido das bactérias (vetor de clonagem + cDNA da IDO) e o vetor de expressão foram digeridos com as enzimas de restrição Pme I (New England Biolabs, Massachusetts, EUA) e Nhe I (Invitrogen, Califórnia, EUA), conforme sugerido nos respectivos protocolos. Após digestão, as amostras de DNA bacteriano foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% e a banda referente ao cDNA da IDO foi eluída do gel através do kit *Wizard SV Gel Clean-up* (Promega, Madison, EUA). Em seguida, foi realizada a reação de ligação do cDNA da IDO com o vetor de expressão pcDNA 3.1, através da ação da enzima *T4 ligase* (Invitrogen, Califórnia, EUA), conforme protocolo do kit.

Dois microlitros da reação de ligação foram adicionados a 50 μ L de bactérias super competentes (One Shot® Top 10F', Invitrogen, Califórnia, EUA), as quais permaneceram 20 minutos em gelo. Em seguida, as bactérias foram incubadas a 42°C por 50 segundos e levadas novamente ao gelo. Foram acrescentados 950 μ L de meio SOC (Invitrogen, Califórnia, EUA) e as células foram incubadas a 37°C por 2 horas sob agitação constante (150 rpm) (Amerex, Califórnia, EUA). Após incubação, 100 μ L de

bactérias foram incubados em placas de LB Agar, contendo ampicilina (100 µg/mL, Strides Arcolab, Bangalore, Índia). As placas permaneceram a 37°C durante 24 horas e 7 colônias foram colhidas e incubadas individualmente com 2 mL de meio LB (Invitrogen, Califórnia, EUA) durante 24 horas. Após incubação, o DNA bacteriano foi extraído através do kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, EUA) e digerido com as enzimas de restrição Pme I e Nhe I, em uma reação, e Bam HI, em outra reação. Em seguida, as amostras digeridas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%.

As bactérias foram então incubadas em grande escala e o DNA bacteriano foi extraído através do kit *Wizard Plus Maxipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, EUA). O vetor de expressão foi linearizado a partir da digestão com a enzima Bgl II (Invitrogen, Califórnia, EUA) e purificado através do kit *Wizard SV Gel Clean-up* (Promega, Madison, EUA).

3.5.5 Sequenciamento do Vetor-IDO

A sequência do inserto IDO foi confirmada através de sequenciamento do inserto contido no vetor pcDNA 3.1 (+).

A reação foi preparada da seguinte maneira: 1 µL de vetor-IDO (0,5 µg) foi acrescido de 6 µL de *5X sequencing buffer* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), 2 µL de primer T7 (Invitrogen, Califórnia, EUA), 2 µL de *BigDye® Terminator* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e água para 20 µL. A reação foi submetida a 35 ciclos de 10 segundos a 96°C, 10 segundos a 50°C e 2 minutos a 60°C, através de termociclador (PTC-100, MJ

Research, Watertown, EUA). Em seguida, foram adicionados 80 µL de isopropanol (Sigma, Sto. Louis, EUA) e, após incubação de 25 minutos em temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada a 13.000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* re-suspendido em 200 µL de etanol 70% e centrifugado a 13.000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* permaneceu a 37°C por 15 minutos para posterior seqüenciamento. No seqüenciamento, o *pellet* foi re-suspendido em tampão de corrida (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e injetado no seqüenciador (ABI Prism 377, Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

A seqüência obtida (Anexo B) foi submetida ao GeneBank (BLAST, nucleotide NCBI) e confirmada como sendo a seqüência para aIDO de rato.

3.6 Padronização da transfecção de IP com vetor para IDO

Nesta fase, todos os estudos “*in vitro*” foram realizados com ilhotas pancreáticas isoladas de 5 ratos Sprague-Dawley e purificadas através de gradiente contínuo de iodixanol.

3.6.1 Lipofecção com vetor de expressão para IDO

Grupos de 10 IP foram incubadas em “wells” de uma placa de 96 (TPP, Trasadinsen, Suíça) contendo 100 μ L de meio RPMI (Invitrogen, Califórnia, EUA).

Doze wells possuíam Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Califórnia, EUA) (4 μ L/mL de meio) sem vetor de expressão, 12 wells possuíam Lipofectamine 2000 mais vetor de expressão na concentração de 0,5 ng/ μ L, 12 wells possuíam Lipofectamine 2000 mais vetor de expressão na concentração de 1 ng/ μ L e 12 wells possuíam Lipofectamine 2000 mais vetor de expressão na concentração de 10 ng/ μ L. As ilhotas pancreáticas permaneceram incubadas por 1 hora, 15 horas ou 24 horas. Ao término destes períodos, 3 wells de cada grupo foram utilizados para extração de RNA e RT-PCR.

3.6.2 Extração de RNA e RT-PCR para IDO

Cada grupo de 10 IP foi homogenizado em 1mL de Trizol (Invitrogen, Califórnia, EUA). Além disso, uma amostra contendo cDNA puro foi utilizada para a extração de RNA como controle negativo da técnica. A técnica de extração de RNA total foi descrita anteriormente.

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando-se o kit SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Califórnia, EUA) e todos os reagentes adicionais foram adquiridos da mesma empresa. Dez nanogramas de RNA total contidos em 11 μ L de água livre de RNase foram misturados a 1 μ L de dNTPs (10 mM) e a 1 μ L de oligo (dT) (50 μ M). A

mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e resfriada em gelo. Em seguida, foram adicionados 4 µL de *5X first-strand buffer*, 1 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de inibidor de RNase e 1 µL de SuperScript III. A mistura foi aquecida a 50°C por 60 minutos e a 70°C por 15 minutos. Após a reação, as amostras permaneceram a -20°C.

A reação em cadeia da polimerase foi realizada utilizando-se a enzima *Platinum® Taq DNA polymerase* (Invitrogen, Califórnia, EUA). Os *primers* utilizados para identificar os cDNAs específicos para IDO e para a beta2-microglobulina foram:

IDO	<i>foward</i>	5'-	
<u>GCTAGCATGCCTCACAGTCAAATATCTCC-3'</u>	e	<i>reverse</i>	(5'-
<u>GTTTAAACCTAAGGCCAACTCAGAAGGG-3'</u>			)
beta2-microglobulina	<i>foward</i>	5'-CTCCCCAAATTCAAGTGTA	CTTCTG-3'
	e	<i>reverse</i>	5'-GAGTGACGTGTTTAACTCTGCAAGC-3'.

Dois microlitros de cDNA ou de vetor puro (controle positivo) foram acrescidos de 2,5 µL de *10X PCR Buffer*, 1,5 µL de MgCl₂ (50mM), 1 µL de dNTPs, 1 µL de *primer Foward*, 1 µL de *primer reverse* e 0,5 µL de *Platinum Taq DNA polymerase*. A mistura foi aquecida a 94°C por 3 minutos e submetida a 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Ao término, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%. Foi adquirida uma imagem do gel (Gene Flash, Syngene, Maryland, EUA) e as bandas foram semiquantificadas por densitometria (ImageMaster, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). O resultado foi expresso em porcentagem da expressão de IDO em relação à expressão de beta2-microglobulina.

3.6.3 Imuno-histoquímica para IDO

Imuno-histoquímica para IDO foi realizada em tecido embrionário/placenta de 10 dias de desenvolvimento e em IP transfectadas ou não com vetor IDO.

O tecido embrionário/placenta foi fixado em Duboscq-Brasil e parafinizado como descrito anteriormente. Ilhotas pancreáticas (aproximadamente 50 ilhotas) foram colocadas sobre uma lâmina de vidro, previamente tratada com L-lisina 2% (Sigma, Sto. Louis, EUA), e fixadas com acetona gelada (Sigma, Sto. Louis, EUA).

Após a desparafinização e a técnica do micro-ondas (apenas para o tecido embrionário/placenta), as lâminas foram bloqueadas com uma solução de peróxido de hidrogênio 3% em metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 30 minutos. Após o bloqueio, as lâminas foram lavadas com água destilada e mantidas em PBS. Em seguida, as lâminas foram incubadas com uma solução de avidina D (Vector, Burlingame, EUA) durante 15 minutos, sendo posteriormente lavadas com PBS durante 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com uma solução de biotina (Vector, Burlingame, EUA) durante 15 minutos e posteriormente lavadas com PBS por 5 minutos. As lâminas foram então incubadas com soro de cavalo (Vector, Burlingame, EUA), diluído 70 vezes em PBS, durante 30 minutos e, após a retirada do excesso do soro, as lâminas foram incubadas com anticorpo anti-IDO (Zymed, São Francisco, EUA), diluída 100 vezes em PBS, durante a noite, a 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo biotinilado anti-camundongo, absorvido em rato

(Vector, Burlingame, EUA) na diluição 1:200 durante 45 minutos. Após lavagem com PBS, as lâminas foram incubadas com o complexo ABC/peroxidase (Dako, Carpinteria, EUA) por 30 minutos, lavadas novamente com PBS e destinadas à revelação.

Para a revelação, as lâminas foram incubadas com uma solução preparada da seguinte maneira: 0,01g de 3-amino-9-etilcarbazol (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram dissolvidos em 2,5 mL de dimetilformamida e, posteriormente, em 47,5 mL de tampão 0,01 M de ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 0,03 M de acetato de sódio (Sigma Chemical CO, St. Louis, EUA), pH 5,0. Por fim, foi acrescido 0,25 mL de peridrol (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 3%.

A revelação foi realizada sob aumento microscópico de 100 vezes e durou aproximadamente 10 minutos. Após, as lâminas foram contra-coradas com o corante verde de metila a 1% (Merck, Darmstadt, Alemanha). As células positivas apresentaram a cor marrom-acastanhada.

3.6.4 Análise do efeito da IDO sobre a mortalidade das IP

IP foram isoladas por gradiente contínuo de iodixanol e incubadas em placas de cultura de 24 *wells* (50 ilhotas/mL/*well*) sob 4 diferentes condições: apenas com meio RPMI; com meio RPMI contendo 4µL/mL de Lipofectamina 2000; com meio RPMI contendo lipofectamina 2000 + vetor IDO; e com meio RPMI contendo lipofectamina 2000 + vetor controle (CAT). As IP permaneceram incubadas por 4 diferentes períodos em incubadora de CO₂: 1, 3, 5 e 10 dias. Foi feita triplicata para cada condição. Após o período

de incubação, as IP foram coradas com azul de Tripán e as células mortas apresentaram coloração azulada. Foram analisadas 10 ilhotas de cada *well*, sendo 3 *wells* para cada uma das 4 condições. A porcentagem de células mortas por ilha pancreática foi calculada com o programa Adobe Photoshop CS, onde foi possível selecionar as células azuis e calcular a quantidade de pixels das células coradas e não-coradas.

3.6.5 Análise do efeito da IDO sobre a degradação de triptofano

A degradação de triptofano foi analisada em cultura de IP através da quantificação deste aminoácido por HPLC (*High-performance liquid chromatography*).

IP (2.500 IP) foram mantidas em incubadora de CO₂ por 24 horas com RMPI (50 mL) (2% soro fetal bovino) contendo Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Califórnia, EUA) (4 µL/mL) ou Lipofectamina 2000 + vetor-IDO (10 ng/mL). Após as 24 horas, o meio de cultura foi trocado e as IP permaneceram em incubadora de CO₂ por 96 horas em RPMI contendo 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 100 µg/mL e estreptomicina 100 µg/mL). Para quantificação de triptofano através de HPLC, uma amostra de 1 mL do meio de cultura foi coletada após 48 horas e outra amostra foi coletada após 96 horas.

As amostras foram preparadas da seguinte maneira: 0,5 mL de amostra foi misturada com 0,5 mL de ácido tricloroacético 10 % por 1 minuto e em seguida a mistura foi centrifugada a 5.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,22 µm de diâmetro (Millipore,

Massachusetts, EUA) e injetado (20 µL) automaticamente no sistema Agilent 1100 do HPLC (Agilent Technologies, Califórnia, EUA). A amostra foi eluída isocraticamente em tampão de acetato de sódio (10mmol/L)/acetonitrila, 96/4, com fluxo constante, por 30 minutos, através de uma pré-coluna de 12,5 X 4,6mm (5µm) (Agilent Eclipse, 820950-926, Agilent Technologies, Califórnia, EUA) e através de uma coluna analítica de 4,6 X 250mm (5µm) (Agilent Hypesil ODS, 7992618-585, Agilent Technologies, Califórnia, EUA). Os picos foram detectados em 280 nm de absorbância ultravioleta e foram integrados por meio do software Chemstation Agilent (G2170AA, Agilent Technologies, Califórnia, EUA). Em seguida, uma curva padrão foi construída com soluções de triptofano (Sigma, Sto. Louis, EUA) nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 mg/L, diluídas em tampão acetato de sódio 10 nmol/L (pH 4,76).

3.7 Efeito da expressão da IDO na rejeição às IP alogênicas

Onze ratos Lewis machos diabéticos foram transplantados com IP alogênicas (isoladas de ratos Sprague-Dawley) transfectadas com Vetor-IDO. Mais detalhadamente, imediatamente após o isolamento, as IP foram mantidas em incubadora de CO₂ 5% (Forma Scientific, Ohio, EUA) com meio RPMI (2% de soro fetal bovino) contendo Vetor-IDO (10 ng/µL) e lipofectamina (4µL/mL), durante 24 horas. Após o período de transfecção, as IP foram mantidas em incubadora de CO₂ 5% por mais 4 dias em RPMI

contendo 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 100 µg/mL e estreptomicina 100 µg/mL).

Três animais foram sacrificados 10 dias pós-transplante para análise de imuno-histoquímica (expressão de insulina e IDO), conforme descrito anteriormente, e os demais animais foram acompanhados por 45 dias, verificando o peso e a glicemia dos animais. Além disso, foram feitas coletas de sangue para dosar a insulina através de radioimunoensaio (RIA). Para tanto, foram utilizados o kit de RIA para insulina de rato (Linco Research, Missouri, EUA) e o leitor para radiação gama (Gamma 5500B, Beckman, EUA). Os cálculos foram seguidos conforme recomendação do fabricante.

3.8 Análise estatística

Todos os resultados estão representados pela média $\pm$ erro padrão.

Para a comparação entre os diferentes grupos foram utilizados os testes ANOVA *One-way* com pós-teste de Newman-Keuls ou t-Student não pareado. Para análise da curva de sobrevida foi utilizado o método Kaplan-Meier seguido do teste Logrank para a comparação entre as curvas.

A significância estatística foi considerada a partir do $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ETAPA I: Padronização do isolamento de ilhotas pancreáticas (IP)

4.1.1 Padronização da perfusão e extração do tecido pancreático

Nesta fase, foram utilizados 40 ratos Wistar machos (ratos: R1-R40).

A maior dificuldade encontrada nesta fase foi localizar e bloquear a extremidade distal do ducto biliar comum para posterior perfusão pancreática. Nos experimentos realizados com pinça de Kelly as perfusões não foram eficientes, pois não houve perfusão total dos pâncreas. Além disso, a pinça provocou lesões na parede do intestino levando ao extravasamento do conteúdo duodenal, contaminando o pâncreas. O problema foi solucionado com a utilização de fio de algodão 4.0 para ligar a extremidade distal do ducto biliar comum, permitindo que 100% do pâncreas fosse perfundido sem haver lesão da parede intestinal.

Outra etapa conquistada foi a canulação do ducto biliar, a qual foi padronizada na região próxima ao hilo hepático, pois é uma região de fácil visualização e o ducto apresenta um calibre maior.

A perfusão do pâncreas com 5 mL de Liberase RI foi insatisfatória, pois houve pouca distensão do tecido pancreático. Já com 7,5 mL, houve distensão de todo o pâncreas. A perfusão com 10 mL foi eficiente para

distender todo o pâncreas, porém não foi diferente da alcançada com 7,5 mL, havendo muita perda da solução para a cavidade abdominal.

Após a perfusão com Liberase RI, um obstáculo importante foi dissecar o pâncreas sem lesar o órgão, sem lesar o duodeno e evitando sangramento, pois o plasma sanguíneo interfere na ação da Liberase RI. Os experimentos com a manipulação direta do pâncreas provocaram muita lesão do órgão. Assim, a dissecação pancreática foi então padronizada sem haver contato direto com o pâncreas. Este órgão foi liberado da cavidade abdominal através da manipulação dos intestinos, da gordura abdominal e do baço. O sangramento foi evitado através da retirada do sangue por indução de hemorragia cardíaca antes da dissecação.

Além de estabelecer o método para ligação do ducto biliar comum, o volume de Liberase RI para a perfusão e a dissecação do pâncreas, o sucesso da etapa também foi confirmado pelo tempo gasto para realizar todo procedimento, que passou de 30 minutos nos primeiros experimentos, para 10 minutos.

4.1.2 Padronização da digestão do pâncreas

Para esta fase, 30 ratos Wistar machos foram utilizados (R41-R70) Dez minutos foi o tempo mínimo de digestão pancreática a 37°C. Neste período, grande parte do pâncreas permaneceu íntegra (aproximadamente 50%), ou seja, não houve digestão completa, oferecendo poucas IP livres. Já com 15 minutos, mais tecido pancreático foi digerido (aproximadamente 70%), oferecendo um pouco mais de IP livres. Com 20 minutos de digestão, muito

tecido pancreático foi digerido (aproximadamente 95%) e um número grande de IP livres e íntegras foi adquirido. Resultado semelhante foi encontrado com 25 minutos de digestão, porém as IP apresentaram menor integridade.

4.1.3 Padronização da purificação das IP

A padronização da purificação das IP consistiu em testar o melhor gradiente de densidade para separar as IP do tecido acinar: gradiente descontínuo de Ficoll (8 pâncreas testados), gradiente contínuo de Ficoll (6 pâncreas testados) e gradiente contínuo de iodixanol (6 pâncreas testados). Desta maneira, para esta fase, foram utilizados 20 ratos Wistar machos (R71-R90)

O gradiente descontínuo de Ficoll foi eficiente em fornecer IP em 5 das 8 amostras pancreáticas submetidas. No entanto, as amostras apresentaram-se extremamente impuras, ou seja, havia muito tecido acinar nas amostras de IP. Uma das principais causas foi a instabilidade da densidade das soluções de Ficoll, o que fez com que parte do tecido acinar migrasse para as interfaces 1,096/1,069 e 1,069/1,037. Além disso, o insucesso total da purificação se deu em 3 das 8 amostras pancreáticas submetidas, devido à migração de quase 70% do tecido acinar para a interface 1,096/1,069, impossibilitando a recuperação das IP. O problema foi solucionado a partir do gradiente contínuo de Ficoll, pois por mais instável que fossem as soluções de Ficoll, esta técnica ofereceu maior pureza das IP.

Uma técnica mais satisfatória ainda foi o gradiente contínuo de iodixanol. Este tipo de gradiente ofereceu IP com alta pureza (Figura 4) e

uma alta porcentagem de sucesso na separação das IP (Tabela 1). Além disso, o gradiente contínuo de iodixanol ofereceu um número significativamente maior de IP em comparação com o gradiente contínuo de Ficoll (751 ± 16 IP por gradiente contínuo de iodixanol vs. 464 ± 19 IP por gradiente contínuo de Ficoll; $p < 0,001$) (Figura 3).

Tabela 1 - Análise comparativa entre os 2 diferentes gradientes contínuos de densidade. Score (+) quando 70-90% do tecido recuperado corou com ditizona, score (++) quando 90-99% corou com ditizona e score (+++) quando >99% do tecido recuperado corou com ditizona. Score (-) significou insucesso na obtenção das IP, devido à grande quantidade de tecido acinar

Pâncreas nº	Rato	Gradiente contínuo de Ficoll	Gradiente contínuo de iodixanol
1	R79	++	
2	R80	+	
3	R81	+	
4	R82	+	
5	R83	-	
6	R84	-	
7	R85		+++
8	R86		+++
9	R87		+++
10	R88		+++
11	R89		++
12	R90		++

Figura 3 - Rendimento de IP isoladas através de gradiente contínuo de Ficoll (ratos R79-R84) ou iodixanol (ratos R85-R90)

Figura 4 - IP coradas com ditizona. Isolamento realizado através de gradiente contínuo de iodixanol, fornecendo IP íntegras e livres de tecido acinar

4.1.4 Análise funcional das IP: Secreção de insulina

A análise funcional consistiu em quantificar por radioimunoensaio a insulina no sobrenadante de IP após incubação com baixa (2,75 mM) e alta (16,5 mM) concentrações de glicose. Os resultados foram obtidos a partir de 3 grupos compostos por 10 IP purificadas por gradiente contínuo de iodixanol.

Os resultados estão representados na figura 5.

Figura 5. Secreção de insulina frente às diferentes concentrações de glicose. Dosagem de insulina por radioimunoensaio no sobrenadante de IP isoladas através gradiente contínuo de iodixanol

4.2 ETAPA II: Padronização do transplante de IP sob a cápsula renal

4.2.1 Indução do diabetes

A dose de estreptozotocina (ETZ) de 65 mg/Kg foi eficiente para induzir diabetes, porém os animais tornaram-se completamente dependentes de insulina exógena, pois a mortalidade dos animais que não receberam insulina foi de 100% nos primeiros 5 dias (Figura 6).

Figura 6. Sobrevida dos animais que receberam 65 mg/Kg (n=3, R91-R93) ou 55 mg/Kg (n=3, R94-R96) de ETZ

A administração de 2U de insulina NPH foi suficiente para manter vivos os animais que receberam estreptozotocina na dose de 65 mg/Kg (Figura 7). No entanto, a glicemia dos animais mostrou-se extremamente variável (Figura 7), demonstrando a necessidade da adaptação da dose de insulina para cada animal, mesmo possuindo massas corpóreas semelhantes (322 ± 5 g).

Figura 7. Glicemia dos animais diabéticos induzidos com 65 mg/Kg de ETZ e tratados com insulina 2U/rato/dia (n=5, R97-R101)

A dose de estreptozotocina de 55 mg/Kg foi suficiente para induzir o diabetes, mantendo os animais com glicemia acima de 300 mg/dL e independentes de insulina exógena (Figura 8). Com a dose de 55 mg/Kg, os animais permaneceram com hiperglicemia por mais de 2 meses (Figura 8).

Figura 8. Glicemia dos animais diabéticos induzidos com 55 mg/Kg de ETZ (n=3, R94-R96)

4.2.2 Infusão das IP

Todos os animais diabéticos submetidos ao transplante sobreviveram (apresentados adiante). Durante o procedimento, o principal problema enfrentado foi o acesso ao espaço subcapsular. Foi possível perceber que a introdução do capilar de vidro provocou sangramento nos primeiros 3 transplantes realizados com 200 IP, fazendo com que as IP ficassem sob uma massa de coágulo. A partir destes transplantes, um cuidado maior foi adotado, havendo ausência de hemorragia durante o implante das IP.

Figura 9. (A) Transplante de IP sob a cápsula renal. Infusão das IP. (B e C) *Pellet* formado por IP na cavidade subcapsular renal

4.2.3 Determinação do número mínimo de IP para reverter o diabetes

Trinta transplantes foram realizados com IP isoladas através de gradiente contínuo de Ficoll, variando de 200 a 3.000 IP transplantadas sob a casula renal (Tabela 2). As IP foram isoladas de 63 ratos Lewis (R102-R164).

De todos os transplantes, os únicos que reverteram o diabetes foram os realizados com 3.000 IP (Tabela 2).

Tabela 2 - Transplante de IP isoladas por gradiente contínuo de Ficoll. Determinação do número mínimo de IP para reverter o diabetes

Rato	Peso (g)	Glicemia pré-Tx (mg/dl)	nº IP	Glicemia pós-Tx (mg/dl)
R165	260	338	200	310
R166	265	326	200	301
R167	268	301	200	320
R168	265	448	200	393
R169	300	321	200	168
Média±EP	272±7	347±26	200	298±36

R170	250	305	500	310
R171	285	330	500	340
R172	309	349	500	300
Média±EP	281±17	328±13	500	317±12

R173	345	530	1.000	166
R174	305	340	1.000	277
R175	275	371	1.000	372
R176	265	387	1.000	410
R177	275	479	1.000	445
R178	250	453	1.000	485
Média±EP	286±14	310±78	1.000	359±48

R179	325	454	1.500	500
R180	280	391	1.500	394
R181	317	397	1.500	384
R182	327	319	1.500	305
Média±EP	312±11	315±80	1.500	361±24

R183	285	381	2.000	360
R184	285	562	2.000	470
R185	325	314	2.000	421
R186	270	458	2.000	389
R187	337	367	2.000	372
Média±EP	300±13	416±43	2.000	402±20

R188	280	379	2.500	476
R189	293	389	2.500	213
R190	284	417	2.500	462
Média±EP	286±4	362±38	2.500	384±85

R191	315	350	3.000	70
R192	305	301	3.000	69
R193	294	324	3.000	110
R194	260	301	3.000	109
Média±EP	294±12	319±12	3.000	90±12

Os mesmos procedimentos foram realizados utilizando-se gradiente contínuo de iodixanol para o isolamento das IP. Foram realizados 18 transplantes variando de 200 a 2.500 IP (Tabela 3), isoladas de 40 ratos Lewis machos (R195-R234).

Apenas os animais que receberam 2.500 IP isoladas por gradiente contínuo de iodixanol reverteram o diabetes (Tabela 3).

Tabela 3 - Transplante de IP isoladas por gradiente contínuo de iodixanol. Determinação do número mínimo de IP para reverter o diabetes

Rato	Peso (g)	Glicemia pré-Tx (mg/dl)	nº IP	Glicemia pós-Tx (mg/dl)
R235	280	358	200	368
R236	280	305	200	326
R237	285	302	200	308
Média±EP	282±2	322±18	200	334±18
R238	260	348	1.000	422
R239	270	500	1.000	396
R240	260	479	1.000	343
Média±EP	263±3	442±48	1.000	387±23
R241	305	327	1.500	331
R242	280	323	1.500	369
R243	290	325	1.500	354
Média±EP	292±7	325±1	1.500	351±11
R244	270	346	2.000	409
R245	265	320	2.000	378
R246	280	330	2.000	325
R247	275	305	2.000	280
R248	260	337	2.000	303
Média±EP	270±4	328±7	2.000	339±24
R249	306	314	2.500	103
R250	305	305	2.500	121
R251	310	355	2.500	83
R252	305	398	2.500	132
Média±EP	307±1	343±21	2.500	107±9

4.3 ETAPA III: Análise da rejeição às IP

4.3.1 Sobrevida das IP em 3 diferentes tipos de transplante

4.3.1.a Transplante isogênico (*Lewis* → *Lewis*)

Os animais diabéticos da linhagem Lewis que não receberam IP (R253-R261) permaneceram diabéticos de maneira definitiva e estável durante semanas (Figura 10). Já os ratos Lewis diabéticos que receberam 2.500 IP isoladas por gradiente contínuo de iodoxanol (isoladas de 18 ratos Lewis doadores, R262-279) reverteram o diabetes apresentando normoglicemia permanentemente (ratos R280-R285) (Figura 10). A nefrectomia demonstra que a manutenção da glicemia se deu graças às IP transplantadas.

Figura 10. Glicemia dos animais diabéticos isogênicos não transplantados (DM, R253-R261) e transplantados (Tx-ISO, R280-R285) com IP isogênicas. Os animais do grupo Tx-ISO foram nefrectomizados (NEFRE) após 45 dias do transplante

4.3.1.b Transplante alogênico: Sprague-Dawley → Sprague-Dawley

Os animais diabéticos da linhagem Sprague-Dawley que não receberam IP permaneceram com hiperglicemia (R286-R288) (Figura 11). Já os ratos Sprague-Dawley diabéticos que receberam 2.500 IP, isoladas de ratos Sprague-Dawley (R289-R297), reverteram o diabetes apresentando normoglicemia (Tabela 4 e Figura 11). No entanto, a normoglicemia se manteve por tempo limitado (Tabela 4 e Figura 11).

A análise histológica (que será apresentada mais adiante) comprovou a presença de rejeição aguda ao enxerto.

Tabela 4 - Tempo de sobrevida das IP pós-transplante entre ratos alogênicos (Sprague-Dawley → Sprague-Dawley)

Rato	Peso no Tx (g)	Glicemia pré-Tx (mg/dL)	Nº IP	Glicemia pós-Tx (mg/dL)	Sobrevida das IP (Dias)
R286	300	310	0	305	n.a.
R287	305	335	0	320	n.a.
R288	307	362	0	360	n.a.
Média±EP	304±2	336±15	0	328±16	n.a.

R298	315	350	2.500	70	17
R299	305	301	2.500	69	25
R300	294	324	2.500	110	21
Média±EP	312±8	325±14	2.500	83±14	21±2

n.a. = não aplicável

Figura 11. Glicemia dos animais diabéticos não transplantados (DM, R286-R288) e transplantados (Tx-ALO, Sprague-Dawley → Sprague-Dawley, R298-R300) com IP alogênicas

4.3.1.c Transplante alogênico: Sprague-Dawley → Lewis

Os animais Lewis diabéticos que não receberam IP permaneceram hiperglicêmicos, enquanto que os animais Lewis (R337-R348) que receberam IP de ratos Sprague-Dawley (R301-R336) reverteram o diabetes (Tabela 5). No entanto, o tempo de normoglicemia foi limitado (Figura 12), devido à reduzida sobrevida das IP (Tabela 5).

Tabela 5 - Sobrevida das IP pós-transplante entre ratos aloígenos (Sprague-Dawley → Lewis), determinada pelo retorno da glicemia >300 mg/dL

Rato	Peso no Tx (g)	Glicemia pré-Tx (mg/dL)	Nº IP	Glicemia pós-Tx (mg/dL)	Sobrevida das IP (Dias)
R253	310	398	0	390	n.a.
R254	305	420	0	425	n.a.
R255	300	301	0	301	n.a.
R256	305	389	0	436	n.a.
R257	305	450	0	455	n.a.
R258	285	334	0	328	n.a.
R259	290	374	0	325	n.a.
R260	280	447	0	345	n.a.
R261	290	398	0	362	n.a.
Média±EP	297±14	390±16	0	374±18	n.a.

R337	305	365	2.500	122	11
R338	299	364	2.500	109	7
R339	265	404	2.500	101	11
R340	298	402	2.500	152	9
R341	285	437	2.500	125	11
R342	280	465	2.500	151	7
R343	285	337	2.500	105	13
R344	270	303	2.500	135	11
R345	280	349	2.500	115	11
R346	280	362	2.500	110	11
R347	298	410	2.500	115	13
R348	280	459	2.500	123	13
Média±EP	285±4	388±14	2.500	122±5	11±1

n.a. = não aplicável

Figura 12. Glicemia dos animais diabéticos não transplantados (DM, R253-R261) e transplantados (Tx-ALO, Sprague-Dawley → Lewis, R337-R348) com IP alogênicas

4.3.2 Análise histológica e de imuno-histoquímica das IP transplantadas

Para confirmar que o tempo de sobrevida das IP alogênicas foi determinado pela rejeição ao aloenxeto, foram analisados 3 componentes importantes da rejeição: fibrose, número de macrófagos e número de linfócitos-T na região do implante. Além disso, a expressão de insulina também foi analisada para comprovar a presença de IP sob a cápsula renal.

Para esta análise, foram realizados mais 6 transplantes alogênicos, utilizando-se 18 doadores Sprague-Dawley (R349-R366) e 6 receptores Lewis (R367-R372). Dez dias pós-transplante alogênico, foi constatado um

grande percentual de fibrose na região do implante (Figura 13). Além da fibrose, um grande número de macrófagos e de linfócitos-T foi encontrado na mesma região (Figura 13).

Figura 13. Fotos de tecido renal 10 dias pós-transplante alógeno de IP. **A**, **C** e **E**, menor aumento, e **B**, **D** e **F**, maior aumento. (**A** e **B**) Tecido renal corado com Tricrômio de Masson, (**C** e **D**) imuno-histoquímica para macrófago e (**E** e **F**) imuno-histoquímica para linfócitos T. Asterisco representa área do parênquima renal, sinal cruz representa área de fibrose peri-implante, seta aponta macrófagos peri-implante e cabeça de seta aponta linfócitos T peri-implante

A presença de insulina no enxerto também foi analisada através de imuno-histoquímica (Figura 14). No transplante isogênico (Lewis → Lewis), grande porcentagem do enxerto apresentou marcação para insulina 10 dias pós-transplante ($20,3 \pm 4,6\%$) (Figura 15). Diferentemente do transplante isogênico, no transplante alogênico (Sprague-Dawley → Lewis) muito pouca insulina foi encontrada no enxerto 10 dias pós-transplante (Figura 15).

Figura 14. Imuno-histoquímica para insulina em tecido renal 10 dias pós-transplante de IP isogênicas. A região do asterisco (*) compreende o parênquima renal abaixo do implante de IP. A coloração em vermelho indica a presença de insulina nas IP (seta). (A) menor aumento e (B) maior aumento

Figura 15. Expressão de insulina em IP 10 dias pós-transplante subcapsular renal. Porcentagem do enxerto positivo para insulina. Transplantes isogênicos (R249-252) e alogênicos (R367-R372)

4.4 ETAPA IV: Construção do vetor de expressão para a IDO

4.4.1 RT-PCR para IDO

RNA total foi extraído de tecido embrionário/placenta de ratas Lewis com 5, 10 e 15 dias de gestação (ratos: R373-R375). Houve sucesso nesta etapa, pois os RNAs apresentaram-se íntegros e com uma relação entre as densidades ópticas a 260nm/280 nm acima de 1.8.

Todas as ratas, com 5, 10 e 15 dias de gestação, apresentaram expressão de IDO, confirmada por RT-PCR (Figura 16).

Figura 16. Foto de gel de agarose 1%. Linha 1: *ladder* 100/100 pb; linhas 2, 3 e 4, produto de PCR para IDO em 5, 10 e 15 dias de gestação, respectivamente

4.4.2 Clonagem do cDNA da IDO

A inserção do cDNA, adquirido pela técnica de RT-PCR, em vetor de clonagem foi realizada com sucesso. A confirmação se deu através da digestão do vetor de clonagem com a enzima de restrição Eco RI, pois este vetor possui 2 sítios para a enzima Eco RI (Figura 17), liberando assim o cDNA de 1224 pb. O cDNA liberado apresentou 2 fragmentos (344 pb e 880 pb) após digestão com Eco RI, por também possuir um sítio específico para esta enzima. Das dez colônias isoladas, uma continha o cDNA da IDO (Figura 18).

Figura 17. Mapa do vetor de clonagem pGEM-T. Setas indicam o sítio de corte da enzima Eco RI

Figura 18. Foto do gel de agarose 1%:
Linha 1, ladder 100/100 pb;
Linhas 2-10, pGEM das colônias isoladas sem digestão;
Linhas 11-18, pGEM digerido com Eco RI das colônias isoladas;
Linha 14, presença de cDNA para IDO (fragmentos de 344 pb e 880 pb após digestão)

4.4.3 Inserção do cDNA da IDO em vetor de expressão

Após digestão do vetor de clonagem pGEM, o cDNA (1224 pb) foi inserido no vetor de expressão pcDNA 3.1 (Figura 19A). Bactérias foram selecionadas pela resistência a ampicilina e as que continham o pcDNA 3.1 mais o cDNA da IDO (vetor IDO) foram identificadas através da digestão dos respectivos DNAs com as enzimas Pme I e Nhe I. Das sete colônias isoladas, 4 continham o vetor IDO. A Figura 8B demonstra uma amostra contendo o vetor IDO após digestão com Pme I e Nhe I. Além disso, a amostra foi digerida com a enzima Bam HI para comprovar o cDNA da IDO, o qual possui 2 sítios para essa enzima (Figura 19B). Finalmente, o vetor IDO foi linearizado com a enzima Bgl II (Figura 19C) para futura transfecção.

Figura 19. (A) Mapa do vetor de expressão pcDNA 3.1.

(B) Imagem do gel de agarose 1%: linha 1, *ladder* 100/100 pb; linha 2, vetor sem digestão; linha 3, vetor digerido com Pme I e Nhe I; e linha 4, vetor digerido com Bam HI. **(C)** Imagem de gel de agarose 1%: linha 1, *ladder* 100/100 pb; linha 2, vetor digerido com Bgl II

4.5 ETAPA V: Transfecção do vetor IDO nas IP

Para esta etapa, foram realizados experimentos com IP isoladas de 5 ratos Sprague-Dawley machos (R376-380).

4.5.1 Expressão de IDO após a transfecção com vetor IDO

A transfecção da IDO nas IP foi feita utilizando-se o método da lipofecção. IP incubadas durante 1 hora com lipofectamina + vetor IDO nas concentrações 0,5, 1,0 e 10 ng/μl não apresentaram expressão para a IDO. No entanto, após 15 horas de incubação, nas mesmas condições, as IP passaram a expressar IDO de maneira proporcional à quantidade de vetor IDO (Figura 20). Embora haja expressão de IDO após 15 horas de incubação, a expressão máxima se deu após 24 horas de incubação nas concentrações de 1 e 10 ng/μl (Figura 20).

Figura 20. (A) Foto de gel de agarose 1% demonstrando os produtos de RT-PCR para β_2 -microglobulina e IDO. RT-PCR de IP transfectadas com vetor IDO em diferentes concentrações (0, 0,5, 1,0 e 10 ng/μL) e em diferentes períodos de incubação (1h, 15h e 24h).

(B) Gráfico demonstrando a relação entre a expressão de IDO/ β_2 -microglobulina em IP transfectadas com vetor IDO em diferentes concentrações (0, 0,5, 1,0 e 10 ng/μL) e em diferentes períodos de incubação (1h, 15h e 24h)

4.5.2 Produção da enzima IDO após a transfecção com vetor IDO: análise por imuno-histoquímica

Imuno-histoquímica para IDO foi realizada para confirmar a eficiência da transfecção em induzir a tradução do vetor IDO na proteína IDO.

A utilização desta técnica de imuno-histoquímica identificou a presença de IDO em tecido embrionário/placenta após 10 dias de gestação (rato R374) (Figura 21A).

Figura 21. Imuno-histoquímica para IDO em tecido embrionário/placenta com 10 dias de desenvolvimento. **(A)** Controle negativo do método. **(B)** A positividade é demonstrada pela presença de células de cor marrom, correspondendo aos sinciotrofoblastos

A transfecção das IP com vetor IDO na concentração de 10 ng/ μ l durante 24 horas foi eficiente em induzir a síntese da enzima IDO nestas células (Figura 22).

Figura 22. Imuno-histoquímica para IDO em IP não transfectadas (**A**) e em IP transfectadas com vetor IDO (**B** e **C**). (**A**) Imuno-histoquímica utilizando-se anticorpo anti-IDO resultou negativa em IP não transfectadas com vetor IDO. (**B**) Em IP transfectadas com vetor IDO foi detectada a positividade para a enzima IDO através da reação de imuno-histoquímica. (**C**) Controle negativo do método com omissão do Ac anti-IDO em IP transfectadas

4.5.3 Efeito da IDO sobre a mortalidade das IP

A mortalidade das IP foi analisada através de coloração com azul de Tripan. As células mortas apresentam coloração azulada (Figura 23).

Figura 23. Mortalidade das IP não-transfectadas após 10 dias de cultura. Células mortas coram com azul de Tripan, apresentando coloração azulada (seta)

IP não-transfectadas (Controle), ou seja, incubadas apenas com meio RPMI, apresentaram uma baixa porcentagem de células mortas após 1 dia de cultura e esta mortalidade aumentou após 3, 5 e 10 dias de cultura, porém sem diferença significativa ($p < 0,066$) (Figura 24). A presença de lipofectamina, a transfecção com IDO e a transfecção com CAT (gene controle) não influenciaram a mortalidade das IP (Figura 24).

Figura 24. Mortalidade das IP transfectadas e não-transfectadas após 4 períodos diferentes de cultura (1, 3, 5 e 10 dias). Ilhotas pancreáticas (50 ilhotas/mL/well,) foram incubados sob 4 diferentes condições: **Controle**, apenas meio RPMI; **Lipo**, meio RPMI contendo lipofectamina 2000; **Lipo+IDO**, meio contendo lipofectamina 2000 mais vetor IDO; e **Lipo+CAT**, meio contendo Lipofectamina 2000 mais vetor CAT (gene inespecífico, controle). Ao final de cada período, 10 ilhotas pancreáticas de cada well (3 wells para cada condição) foram analisadas quanto à porcentagem de células mortas (coradas com azul de Tripan). Não houve diferença significativa entre os diferentes grupos

4.5.4 Efeito da expressão da IDO sobre a degradação de triptofano (estudo “*in vitro*”)

A degradação de triptofano foi analisada para verificar a funcionalidade da enzima IDO após a indução da sua expressão em IP.

IP transfectadas com vetor IDO degradaram significativamente mais triptofano após 48 horas comparadas com IP sem transfecção ($2,73 \pm 0,03$ ng/ μ L no grupo LIPO+IDO vs. $2,95 \pm 0,04$ ng/ μ L no grupo LIPO; $p < 0,05$) (Figura 25). Após 96 horas o efeito foi acentuado, ou seja, houve maior degradação de triptofano pelas IP, onde as transfectadas com vetor IDO degradaram significativamente mais triptofano comparadas com IP não-transfectadas ($1,04 \pm 0,30$ ng/ μ L no grupo LIPO+IDO vs. $2,22 \pm 0,32$ ng/ μ L no grupo LIPO; $p < 0,05$) (Figura 25).

Figura 25. Quantificação de triptofano por HPLC no sobrenadante de IP previamente incubadas com lipofectamina (LIPO) ou previamente transfectadas com vetor IDO (LIPO+IDO). Como controle, a dosagem de triptofano foi realizada no meio de cultura RPMI sem ilhotas pancreáticas

4.6 ETAPA VI: Efeito da expressão da IDO na rejeição às IP alogênicas

4.6.1 Efeito da expressão da IDO sobre a evolução ponderal dos animais transplantados

A tabela 6 apresenta a evolução ponderal dos animais diabéticos transplantados e não-transplantados com IP.

Animais diabéticos (DM, sem transplante) apresentaram uma redução significativa da massa corporal ao longo do período de acompanhamento. Já os animais diabéticos transplantados com IP isogênicas (ISO Tx), apresentaram uma redução da massa até o dia do transplante (Pré-Tx) e, após o transplante, tiveram um ganho significativo de massa corporal ao longo dos 45 dias (Pós-Tx).

Os animais transplantados com IP alogênica (ALO Tx) perderam massa ao longo dos 45 dias de forma semelhante aos animais diabéticos sem transplante de IP. Já os animais transplantados com IP alogênicas expressando IDO (ALO+IDO Tx), ganharam massa significativamente ao longo dos 45 dias pós-transplante.

Tabela 6 – Evolução ponderal dos animais durante o protocolo experimental

Grupos	Ratos	Normal (Pré-DM) (g)	Pré-Tx (g)	Pós-Tx (45 dias) (g)
DM (sem Tx)	R253-R261	297±14	279±17 ^a	244±28 ^{a,b}
ISO Tx	R280-R285	302±4	283±7 ^a	340±7 ^{a,b}
ALO Tx	R337-R348	304±5	285±4 ^a	256±6 ^{a,b}
ALO+IDO Tx	R405-R412	285±3	265±3 ^a	310±6 ^{a,b}

^a p<0,05 vs. Normal

^b p<0,05 vs. Pré-Tx

4.6.2 Efeito da expressão da IDO sobre a glicemia dos animais transplantados

Para esta fase, foram realizados 8 transplantes alogênicos com IP transfectadas com o vetor-IDO. Foram utilizados 24 ratos Sprague-Dawley como doadores de IP (R381-R404) e 8 ratos Lewis como receptores (R405-R412).

A Figura 27A mostra a evolução da glicemia dos animais diabéticos não-transplantados com IP ao longo dos 45 dias.

Os animais transplantados com IP isogênicas (Lewis→Lewis; ratos R280-R285) reverteram o diabetes 24 horas pós-transplante e permaneceram normoglicêmicos ao longo dos 45 dias (Figura 27B). Já os animais transplantados com IP alogênicas (Sprague-Dawley→Lewis; ratos R337-R348) reverteram o diabetes 24 horas pós-transplante, porém a glicemia voltou a subir gradativamente, alcançando valores >300 mg/dL

após aproximadamente 11 dias (Figura 27C). Estes animais do grupo ALO Tx mantiveram glicemia >300 mg/dL ao longo do período de acompanhamento, embora muitos deles tenham alcançado o “*end-point*”, antes do 45º dia (Figura 27C).

Já os animais transplantados com IP alogênicas transfectadas com o gene da IDO reverteram o diabetes 24 horas pós-transplante (Figuras 27D e 28) e apresentaram um perfil glicêmico diferente dos animais transplantados com IP isogênicas e IP alogênicas não-transfectadas ao longo do período de acompanhamento. Dos 8 animais transplantados, 4 animais apresentaram aumento progressivo da glicemia após a reversão do diabetes, porém a glicemia manteve-se <300 mg/dL. Este efeito não determinou a sobrevivência das IP, uma vez que a glicemia permaneceu em níveis <300 mg/dL ao longo dos 45 dias (Figuras 27D e 28). Um outro animal transplantado com IP transfectadas com vetor-IDO reverteu o diabetes após o transplante e permaneceu com glicemia em níveis próximos de 100 mg/dL ao longo dos 45 dias. Os três animais restantes apresentaram aumento progressivo da glicemia, alcançando valores >300 mg/dL, e permaneceram hiperglicêmicos. Estes animais tiveram um comportamento semelhante aos animais do grupo ALO Tx. Estes animais foram transplantados no último experimento do estudo e é possível ter havido alguma variação técnica que tenha impedido a transfecção das ilhotas com o gene da IDO. Além disso, uma possibilidade pode ter sido uma contaminação da cultura, comprometendo o transplante, uma vez que o laboratório de cultura de células sofrera contaminação por fungos na mesma época.

Figura 27. Glicemia individual de cada grupo experimental ao longo dos 45 dias de acompanhamento. (A) Grupo DM, animais diabéticos não-transplantados. (B) Grupo ISO Tx, animais diabéticos transplantados com IP isogênicas. (C) Grupo ALO Tx, animais diabéticos transplantados com IP alogênicas. (D) Grupo ALO+IDO Tx, animais diabéticos transplantados com IP alogênicas transfectadas com vetor-IDO. (†) Animais que foram sacrificados

Figura 28. Média das glicemias de cada grupo experimental ao longo dos 45 dias de acompanhamento

4.6.3 Efeito da expressão da IDO sobre o perfil insulinêmico dos animais transplantados

A tabela 7 apresenta o perfil insulinêmico dos animais diabéticos transplantados e não-transplantados com IP.

A partir do valor normal da insulinemia para ratos (entre 0,5-2,0 ng/mL) podemos observar que os animais utilizados para formar os diferentes grupos experimentais apresentaram insulinemia normal antes de iniciar o protocolo (2ª coluna da Tabela 7). A análise estatística comparando as glicemias dos animais normais (Pré-DM) entre os diferentes grupos não foi estatisticamente diferente.

Após a injeção de estreptozotocina, todos os animais tornaram-se diabéticos, apresentando uma redução da insulinemia de aproximadamente 90% (coluna Pré-Tx da Tabela 7). Como esperado, os animais transplantados com IP apresentaram, 1 dia pós-transplante, normalização da insulinemia (coluna Pós-Tx da Tabela 7).

Após 45 dias, os animais do grupo DM (diabéticos não-transplantados), continuaram a apresentar insulinemia significativamente reduzida (2ª linha da última coluna da Tabela 7) ($p < 0,01$). Já os animais transplantados com IP isogênicas (grupo ISO Tx), apresentaram insulinemia normal 45 dias pós-transplante (3ª linha da última coluna da Tabela 7). Diferente dos animais do grupo ISO Tx, os animais transplantados com IP alogênicas (grupo ALO Tx) apresentaram insulinemia reduzida, semelhante aos animais do grupo DM (4ª linha da última coluna da Tabela 7). Já os animais transplantados com IP alogênicas transfectadas com vetor IDO (grupo ALO+IDO Tx) apresentaram níveis baixos de insulina sérica 45 dias pós-transplante, porém os níveis foram superiores aos encontrados nos animais do grupo ALO Tx no mesmo período ($p < 0,01$).

Tabela 7 – Insulinemia dos animais durante o protocolo experimental

Grupos	Ratos	Normal (Pré-DM) ng/mL	Pré-Tx ng/mL	Pós-Tx (1 dia) ng/mL	Pós-Tx (45 dias) ng/mL
DM (sem Tx)	R253-R261	0,91±0,16	0,11±0,02 ^a	0,10±0,01 ^a	0,05±0,03 ^a
ISO Tx	R280-R285	0,54±0,29	0,05±0,04 ^a	0,54±0,09 ^b	0,55±0,13 ^b
ALO Tx	R337-R348	0,97±0,26	0,10±0,03 ^a	1,10±0,28 ^b	0,14±0,02 ^{a,c}
ALO+IDO Tx	R405-R412	0,66±0,06	0,11±0,04 ^a	0,64±0,05 ^b	0,33±0,04 ^{a,b,c}

^a p<0,05 vs. Normal

^b p<0,05 vs. Pré-Tx

^c p<0,05 vs. Pós-Tx (1 dia)

4.6.4 Efeito da expressão da IDO sobre a expressão de insulina nas IP 10 dias pós-transplante

Os animais transplantados com IP isogênicas (grupo ISO Tx, ratos R249-R252) apresentaram marcante expressão de insulina 10 dias pós-transplante, detectada através de imuno-histoquímica (Figura 29A). Os mesmos animais não apresentaram expressão significativa de IDO (Figura 29B). Já os animais transplantados com IP alogênicas (grupo ALO Tx, ratos R367-R372) apresentaram muito pouca expressão de insulina 10 dias pós-transplante (Figura 29C) e também não apresentaram expressão significativa de IDO (Figura 29D). Já os animais transplantados com IP alogênicas transfectadas com vetor IDO (ALO+IDO Tx) apresentaram

expressão para insulina 10 dias pós-transplante e uma marcante expressão de IDO no mesmo período (Figura 29F).

Figura 29. Imuno-histoquímica para insulina e para IDO em IP (setas) 10 dias pós-transplante. Todos os enxertos apresentaram positividade para insulina (A, C e E). Apenas IP transfectadas com o vetor IDO (ALO+IDO Tx) apresentaram positividade para IDO (F)

4.6.5 Efeito da expressão da IDO na sobrevida das IP alogênicas

A sobrevida das IP foi determinada pelo período entre o transplante e o dia em que os animais atingiram glicemia >300 mg/dL, permanecendo com hiperglicemia por mais 3 dias consecutivos.

Os animais submetidos ao isotransplante (Lewis→Lewis; ratos R280-R285) não apresentaram rejeitar às IP (Figura 30). Já os animais transplantados com IP alogênicas (Sprague-Dawley→Lewis; ratos R337-R348) rejeitaram o enxerto em poucos dias (11 ± 1 dias), com falência total do enxerto.

Cinco dos 8 animais transplantados com IP alogênicas (Sprague-Dawley→Lewis; ratos R405-R409) transfectadas com vetor IDO mantiveram glicemia <300 mg/dL durante os 45 dias. Os outros 3 animais apresentaram uma sobrevida das IP de 7, 11 e 13 dias respectivamente (Figura 30).

Figura 30. Sobrevida das IP em isotransplante (ISO Tx, R277-R282), alotransplante (ALO Tx, R337-R348) e alotransplante com IP transfectadas com vetor-IDO (ALO+IDO Tx, R405-R412)

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo principal analisar o efeito da indução da expressão da molécula IDO em ilhotas pancreáticas alogênicas transplantadas experimentalmente. Mais especificamente, utilizar a terapia gênica para induzir a expressão da IDO com o intuito de proteger as ilhotas transplantadas permitindo longa sobrevida das mesmas.

Para alcançar o objetivo principal, foram necessários diversos experimentos para padronizar as técnicas de isolamento e transplante de ilhotas pancreáticas entre ratos e também desenvolver metodologias mais sofisticadas de biologia molecular para a obtenção e construção de DNA específico para a IDO.

A primeira etapa do estudo consistiu na padronização do isolamento de ilhotas pancreáticas de ratos para a utilização em transplante experimental. Diferente dos estudos “*in vitro*”, que geralmente necessitam de pequeno número de ilhotas, cada transplante experimental de ilhotas pancreáticas entre ratos exige um grande número de ilhotas, pois o procedimento deve necessariamente reverter o diabetes. Desta maneira, é importante que a técnica de isolamento tenha um ótimo rendimento, fornecendo grande número de ilhotas íntegras e funcionais. Nesta fase, diversos detalhes técnicos foram padronizados para a obtenção do maior número possível de ilhotas íntegras e viáveis por rato. Além da padronização das técnicas que precedem a perfusão do pâncreas com Liberase, ou seja, o bloqueio do ducto biliar comum com fio de algodão e a canulação do ducto próximo ao

hilo hepático, o estudo analisou o melhor volume de solução de Liberase a ser perfundido no pâncreas e o tempo de permanência do pâncreas perfundido a 37°C para digestão. O estudo determinou que o volume de 7,5 mL foi eficaz para perfundir todo o pâncreas e a permanência de 20 minutos a 37°C foi ideal para digerir o pâncreas liberando as ilhotas sem comprometer sua integridade.

Dentre os experimentos realizados nesta fase, merecem destaques os experimentos para a purificação das ilhotas pancreáticas, ou seja, a separação das ilhotas do tecido acinar. A purificação de ilhotas de ratos e de humanos, após digestão enzimática do pâncreas, é comumente realizada através de gradiente de densidade formado por Ficoll (Scharp et al., 1973; al-Abdullah et al., 1990; Morini et al., 2006; Ricordi et al., 1989; Eckhard et al., 2004; Dufrane et al., 2005).

Diversos grupos de pesquisa trabalham com isolamento de ilhotas pancreáticas e alguns deles adotam o método de purificação por gradiente contínuo de densidade ao invés do clássico gradiente descontínuo (Brandhorst et al., 1995; van Suylichem et al., 1990; Barnett et al., 2004). Inicialmente, foram testados dois tipos de gradientes de Ficoll: o gradiente descontínuo e o gradiente contínuo. Os resultados demonstraram que o gradiente descontínuo de Ficoll oferece um grande número de insucessos na obtenção das ilhotas pancreáticas, uma vez que as ilhotas não são completamente separadas do tecido acinar. Isto aconteceu provavelmente por ser um gradiente com poucas variações de densidade, o que evita uma separação gradual do tecido digerido. Já o gradiente contínuo de Ficoll

ofereceu maior sucesso na obtenção de ilhotas pancreáticas livres de tecido acinar, provavelmente por oferecer um maior grau de variação de densidade, tornando a separação mais sensível.

No entanto, por mais que o Ficoll seja amplamente utilizado (Scharp et al., 1973; al-Abdullah et al., 1990; Morini et al., 2006; Ricordi et al., 1989; Eckhard et al., 2004; Dufrane et al., 2005), a manipulação do Ficoll para a formação das soluções requeridas no gradiente exige cuidados especiais, principalmente devido à alta viscosidade deste produto, o que dificulta sua esterilização, além das soluções manterem suas densidades extremamente instáveis. Neste contexto, para o desenvolvimento do presente projeto houve a necessidade de adquirir um outro produto que substituísse o Ficoll na construção de gradientes de densidade. Assim, o presente estudo analisou a eficiência do iodixanol para a purificação de ilhotas pancreáticas de ratos, uma vez que estudos recentes haviam utilizado este produto, com sucesso, para o isolamento de ilhotas suínas (van der Burg et al., 1998; van der Burg et al., 2003). Os resultados demonstraram que o iodixanol é superior ao Ficoll na purificação das ilhotas pancreáticas de ratos, oferecendo maior número de ilhotas por rato e com maior grau de pureza (Dellê et al., 2007). Além disso, vale ressaltar que o iodixanol é utilizado como contraste radiológico, o que confere maior segurança na sua utilização, uma vez que o mesmo é usado clinicamente em humanos. Especialmente no Brasil, o iodixanol é adquirido com o nome comercial de Visipaque® (contraste radiológico), sendo mais favorável financeiramente, além de ser fornecido já na forma estéril.

Os resultados de viabilidade funcional das ilhotas pancreáticas, ou seja, a capacidade de secreção de insulina frente à alta concentração de glicose, demonstraram que as ilhotas pancreáticas purificadas através de gradiente contínuo de iodixanol não são comprometidas pelo iodixanol, ou seja, apresentaram viabilidade preservada (Dellê et al., 2007).

Após a padronização do isolamento de ilhotas pancreáticas de ratos, o próximo passo foi padronizar o transplante de ilhotas pancreáticas sob a cápsula renal de ratos diabéticos.

Para a indução de diabetes foi utilizado o modelo de injeção endovenosa de estreptozotocina (Junod et al., 1969). O presente estudo considerou importante estabelecer uma dose de estreptozotocina que tornasse os animais diabéticos sem que houvesse dependência de insulina exógena, a qual prejudicaria a análise funcional futura do enxerto.

Junod e colaboradores, logo no início da descrição do modelo de diabetes induzido por estreptozotocina, demonstraram que o diabetes pode ser induzido variando a dose de 25 a 100 mg/Kg (Junod et al., 1969). No entanto, a gravidade do distúrbio metabólico é proporcional à dose da droga e as doses de 55 e 65 mg/Kg não diferem significativamente quanto a eficiência de manter o animal hiperglicêmico e hipoinsulinêmico (Junod et al., 1969). Atualmente, as doses mais utilizadas para induzir diabetes para posterior transplante de ilhotas pancreáticas são 55 e 65 mg/Kg e a utilização de insulina exógena depende do protocolo experimental do estudo a fim de alcançar objetivos específicos (MacGregor et al., 2005; Lopez-Talavera AF et al., 2004; Sakai et al., 2006; Kin et al., 2004).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a dose de 55 mg/Kg de estreptozotocina é suficiente para manter os animais hiperglicêmicos, sem haver dependência de insulina exógena, diferentemente da dose de 65 mg/Kg. Provavelmente, a dose de 55 mg/dL não é “fulminante”, fazendo com que as células remanescentes mantenham uma concentração mínima de insulina para manter os animais vivos. De fato, os resultados demonstraram que a insulinemia de animais diabéticos (não transplantados) induzidos com estreptozotocina na dose de 55 mg/Kg, após 45 dias, é significativamente menor do que animais normais, porém se faz presente.

Uma vez definido o modelo de indução de diabetes, o próximo passo foi estabelecer o número mínimo de ilhotas pancreáticas a serem transplantadas para reverter o diabetes induzido por estreptozotocina.

Estudos com ilhotas pancreáticas purificadas por gradientes de densidade e transplantadas sob a cápsula renal utilizam de 2.000 a 3.000 ilhotas pancreáticas para reverter o diabetes induzido por estreptozotocina (Kin et al., 2003; Coddington et al., 1998; Rayat et al., 1997; Mendola et al., 1994; Leow et al., 1995).

Os resultados do presente estudo demonstraram que para reverter o diabetes houve a necessidade de transplantar no mínimo 3.000 ilhotas pancreáticas purificadas por gradiente contínuo de Ficoll (em torno de doadores) ou 2.500 ilhotas purificadas por gradiente contínuo de iodixanol (3 doadores) sob a cápsula renal. O motivo pelo qual há necessidade de um número maior de ilhotas purificadas por gradiente de Ficoll para reverter o

diabetes, comparadas com ilhotas purificadas por iodixanol, não ficou claro. Uma hipótese seria a pureza das ilhotas pancreáticas, a qual é maior na purificação com iodixanol. É provável que uma purificação mais eficiente remova mais tecido acinar, deixando livres as ilhotas pancreáticas. Isto pode ser importante para que haja melhor adaptação das ilhotas no espaço subcapsular renal, com menor processo inflamatório local, melhorando a função endócrina destas células. Esta hipótese é sustentada pelo fato de que quando as ilhotas são separadas do tecido acinar por *hand-picking*, manualmente, há necessidade de um número menor de ilhotas, variando de 1.000 a 1.500 ilhotas (Saudek et al., 1995; Ar'Rajab et al., 1994; Ar'Rajab et al., 1990; Rajab et al., 1989). O método de *hand-picking* é interessante, porém requer um grande número de pesquisadores para a separação, uma vez que é um procedimento demorado.

Vale a pena ressaltar que um pâncreas de rato normal tem aproximadamente 3.000 ilhotas pancreáticas, o que justifica a necessidade de um número semelhante (2.500 por gradiente de iodixanol) para reverter o diabetes induzido por uma dose de estreptozotocina “não-fulminante”.

A partir dos transplantes realizados foi possível constatar que, como esperado, ratos Lewis que receberam ilhotas pancreáticas de ratos Lewis não rejeitaram as ilhotas, apresentando normoglicemia permanentemente pós-transplante. Isso se deve ao fato de serem ratos isogênicos, ou seja, geneticamente idênticos, criados no método *inbred*.

Em contraste, ratos Sprague-Dawley que receberam ilhotas pancreáticas de ratos Sprague-Dawley rejeitaram as ilhotas em

aproximadamente 23 dias. A provável explicação é que, embora sejam da mesma linhagem, são criados no método *outbred*, cruzamento entre animais de matrizes diferentes, mantendo heterogeneidade genética. Mais agressiva ainda foi a rejeição das ilhotas transplantadas entre animais de linhagens diferentes (aproximadamente 11 dias, de Sprague-Dawley para Lewis). Provavelmente este processo é decorrente da diversidade da histocompatibilidade genética existente entre diferentes linhagens, contando ainda como uma delas sendo *outbred* (Sprague-Dawley). Estes dados corroboram com a literatura (Steiniger et al., 1990; Coddington et al., 1998).

Além da sobrevivência das ilhotas, analisada pela glicemia, dados de histologia e de imuno-histoquímica revelaram a presença de fibrose e de grande número de células inflamatórias (macrófagos e linfócitos T) na região peri-ilhotas, o que caracteriza uma agressão imunológica-inflamatória. Utilizando-se técnicas de imuno-histoquímica, foi possível verificar também que 10 dias pós-transplante não havia expressão significativa para insulina no transplante alogênico, enquanto que no enxerto isogênico houve intensa marcação para insulina. Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura (Coddington et al., 1998).

Uma etapa fundamental do estudo foi a construção do vetor IDO para a indução da expressão da enzima IDO.

O primeiro passo foi a obtenção do cDNA específico para a IDO. Dentre os tecidos que sabidamente expressam IDO, está a placenta (Kamimura et al., 1991). No presente estudo, foi isolado RNA total de tecido placentário de ratas com 5, 10 e 15 dias de gestação. Em seguida, foi

realizado RT-PCR para a IDO através de *primers* específicos. Estes *primers* foram construídos para amplificarem a sequência completa do cDNA da IDO, além de apresentarem sítios específicos para as enzimas de restrição Pme I e Nhe I. Estes sítios foram escolhidos, pois são sítios presentes no vetor de expressão, ou seja, possibilitam o “encaixe” específico do cDNA da IDO com o vetor de expressão pcDNA 3.1. Antes da inserção do cDNA da IDO no vetor de expressão, o cDNA foi subclonado em vetor pGEM, apenas para a obtenção de um grande número de cópias, possibilitando posterior “corte” com as enzimas Pme I e Nhe I.

Conforme esperado, a análise por RT-PCR demonstrou que há expressão de IDO nas amostras de placenta dos 3 períodos de gestação das ratas, compreendendo grande parte do ciclo gestacional (23 dias), assim como descrito para camundongos (Munn et al., 1998).

O vetor de expressão utilizado foi o pcDNA 3.1 (+) e foi escolhido especialmente por conter o promotor do citomegalovírus (CMV), o que garante a expressão contínua do inserto.

Além do promotor do CMV, o vetor pcDNA 3.1 (+) possui os genes que conferem resistência aos antibióticos ampicilina e neomicina. A resistência à ampicilina foi importante para selecionar as bactérias que possuíam o vetor pcDNA3.1 (+) com o inserto IDO. Já a resistência à neomicina é importante para selecionar células eucariontes que obrigatoriamente foram transfectadas com o vetor, pois a neomicina, adicionada no meio de cultura, induz a morte de células não-transfectadas (Southern e Berg, 1982). Infelizmente esta abordagem não pôde ser utilizada no presente estudo, pois

não é possível separar ilhotas mortas pela neomicina das ilhotas íntegras protegidas pela transfecção. Assim, não foi utilizada a neomicina para a seleção das ilhotas pancreáticas.

Ilhotas pancreáticas podem ser transfectadas através de vetores virais. Os adenovírus são vetores eficazes principalmente por induzirem a expressão de moléculas específicas em células que apresentam limitada atividade mitótica (Csete et al., 1995). No entanto, induzem forte reação imunológica quando utilizados “*in vivo*” (Yang et al., 1996). Uma alternativa promissora para a transfecção de ilhotas pancreáticas são os herpesvírus (Liu et al., 1996), porém este tipo de vetor induz efeitos citotóxicos (Johnson et al., 1992). Além da citotoxicidade, uma limitação importante é que estes vetores dependem de proteínas virais para a invasão celular, o que induz uma forte resposta imunológica (Yang et. al., 1996). Tendo em vista que o objetivo do estudo foi analisar uma alternativa para diminuir a rejeição às células transplantadas, a presença de proteínas virais nestas células poderia promover um agravamento da agressão imunológica, comprometendo os resultados do estudo.

Existem diversas maneiras não-virais para introduzir o vetor de expressão nas células eucariontes. Devido ao fato da ilhota pancreática ser um conjunto formado por diversas células, a metodologia para introduzir o inserto deve ser criteriosa.

A eletroporação, uma técnica que aumenta a permeabilidade da membrana plasmática através de estímulos elétricos, permite a entrada do vetor nas células das ilhotas pancreáticas, porém não permite que grande

quantidade do DNA exógeno incorpore no DNA genômico das células-alvo (Berggren et al., 1989). Outra desvantagem da eletroporação é a necessidade da dissociação das ilhotas, o que resulta em morte das células isoladas (Berggren et al., 1989). Já a utilização de moléculas lipossômicas (lipofecção) permite a introdução do vetor sem causar toxicidade e exerce efeito também em ilhotas íntegras (Saldeen et al., 1996; Saldeen et al., 2000; Suarez-Pinzon et al., 2002). A desvantagem da lipofecção talvez seja a transfecção preferencialmente das células superficiais, uma vez que a expressão máxima da ilhota se dá a partir da sua dissociação (Saldeen et al., 1996). Tão simples quanto a lipofecção, é a utilização de fosfato de cálcio para aumentar a permeabilidade da membrana plasmática, porém esta técnica é menos eficiente do que a lipofecção, tratando-se especificamente de ilhotas (Saldeen et al., 1996). Outra possibilidade para a transfecção é o disparo do DNA como projétil contra as células das ilhotas, porém uma limitação para este método é a transfecção apenas das células superficiais das ilhotas (Gainer et al., 1996).

O presente estudo utilizou a lipofecção para introduzir o vetor IDO nas células das ilhotas pancreáticas, mais especificamente utilizando-se a molécula lipofectamina.

O protocolo da lipofectamina sugere a concentração ideal de vetor para a transfecção, além do tempo de incubação. No entanto, o protocolo fornecido foi determinado para células em cultura e não para ilhotas pancreáticas. Assim, para determinar a concentração de vetor IDO ideal para induzir a expressão da IDO em ilhotas pancreáticas, foram testadas

diferentes concentrações do vetor e diferentes períodos de incubação. Os resultados de RT-PCR demonstraram que ilhotas não incubadas com vetor não expressaram IDO e a concentração de 0,5 ng/ μ L de vetor induziu pouca expressão de IDO. Apenas as concentrações de 1 e 10 ng/ μ L induziram significativamente a expressão de IDO no período de 24 horas e não houve diferença entre estas 2 concentrações. Portanto, como o objetivo foi alcançar e garantir a expressão máxima de IDO, foi definida a concentração de 10 ng/ μ L por 24 horas para os experimentos subsequentes.

Um ponto de crucial importância é a avaliação da eficiência da transfecção do gene em questão nas ilhotas pancreáticas. Além da confirmação da indução da expressão da IDO, ao nível do RNA mensageiro, é fundamental analisar se a transfecção promoveu a síntese da proteína IDO. Para responder esta pergunta, foram realizados experimentos de imuno-histoquímica para IDO em ilhotas transfectadas. Os resultados confirmaram a presença da enzima em ilhotas pancreáticas após a transfecção.

Finalmente, além de induzir a expressão da IDO em ilhotas pancreáticas, o presente estudo avaliou a funcionalidade da IDO produzida pelas ilhotas pancreáticas. Para este objetivo, foram realizados estudos de cultura de ilhotas pancreáticas transfectadas e não transfectadas com vetor-IDO, analisando a concentração do aminoácido triptofano no meio de cultura. A quantificação de triptofano por HPLC em meio de cultura revelou que houve maior depleção de triptofano no meio de cultura de ilhotas transfectadas com o vetor-IDO. Isto comprova que a transfecção foi eficiente

para induzir a expressão da IDO e a enzima possui atividade nas ilhotas pancreáticas.

Os resultados obtidos no presente estudo referentes à indução da expressão da IDO em ilhotas pancreáticas são semelhantes aos resultados do estudo de Alexander e colaboradores (Alexander et al., 2002). Estes pesquisadores utilizaram vetor de adenovírus para a indução da IDO em ilhotas pancreáticas de camundongos e a enzima funcionou degradando triptofano em cultura (Alexander et al., 2002).

Um questionamento importante surgiu quanto a um possível efeito tóxico da IDO em ilhotas pancreáticas, uma vez que a expressão da enzima não foi constatada por RT-PCR em ilhotas normais (não-transfectadas). Para responder esta pergunta, foi analisada a mortalidade das ilhotas transfectadas e não-transfectadas, através da coloração com azul de Tripán. Os resultados demonstraram que a indução da expressão de IDO não tem efeito tóxico às ilhotas pancreáticas. Além disso, ilhotas pancreáticas transfectadas com vetor-IDO são capazes de reverter o diabetes após o transplante, semelhantemente às ilhotas não transfectadas, ou seja, isso indica que a IDO não interfere na função das células-beta.

Resultados interessantes foram obtidos quanto ao efeito “*in vivo*” da IDO no modelo experimental de transplante de ilhotas pancreáticas.

Com relação à evolução ponderal, enquanto os animais diabéticos sem tratamento ou submetidos ao transplante com ilhotas alogênicas não-transfectadas apresentaram perda significativa de massa corporal, os animais do grupo ALO+IDO Tx mantiveram a massa corporal semelhante

aos animais do grupo ISO Tx. Isso pode ser explicado pela melhora do distúrbio metabólico pós-transplante nos grupos ISO Tx e ALO+IDO Tx ao longo do período de acompanhamento.

Com relação à evolução dos níveis de glicemia pós-transplante, os animais que receberam ilhotas pancreáticas isogênicas reverteram o diabetes após o transplante e permaneceram com glicemia normal, por volta de 100 mg/dL, durante todo período de acompanhamento. A manutenção da glicemia em valores normais de forma permanente se deve ao sucesso do transplante e ao fato das ilhotas não terem sido rejeitadas. Em contraste, os 12 animais transplantados com ilhotas alogênicas não-transfectadas com o gene da IDO apresentaram reversão do diabetes imediatamente após o transplante, porém houve um aumento gradativo da glicemia, a qual atingiu níveis >300 mg/dL em torno do 11º dia pós-transplante. Esta hiperglicemia manteve-se permanentemente >300 mg/dL ao longo do período de acompanhamento, refletindo falência do enxerto de ilhotas pancreáticas. Por outro lado, os animais do grupo ALO+IDO Tx, ao receberem ilhotas alogênicas transfectadas com o gene IDO, também reverteram o diabetes prontamente após o transplante, porém apresentaram um comportamento dos níveis de glicemia no pós-transplante diferente dos 2 grupos comentados acima.

Logo após a reversão do diabetes pós-transplante, houve um progressivo aumento da glicemia, que se manteve, no entanto, em níveis <<300 mg/dL. A monitorização da glicemia neste grupo mostrou um curioso comportamento, no qual, mais tardiamente foi detectado um pico isolado de

hiperglicemia, que de forma surpreendente normalizou espontaneamente nos dias subseqüentes, mantendo a glicemia <300 mg/dL durante o período de acompanhamento. A explicação para este comportamento da glicemia pós-transplante nos animais ALO+IDO Tx não está clara. No entanto, o fato dos animais diabéticos transplantados com ilhotas pancreáticas alogênicas expressando IDO terem mantido níveis de glicemia em valores considerados dentro da faixa de normalidade, sugere fortemente que a expressão de IDO teve participação efetiva na sobrevida das ilhotas pancreáticas.

Cabe ressaltar um comportamento diferente da evolução pós-transplante no último experimento com 2 animais do grupo ALO+IDO, que evoluíram de forma idêntica ao transplante alogênico. É possível ter havido alguma variação técnica que tenha impedido a transfecção das ilhotas com o vetor IDO. Além disso, uma possibilidade pode ter sido uma contaminação da cultura, comprometendo o transplante, uma vez que o laboratório de cultura de células sofrera contaminação por fungos na mesma época. Esta questão deverá ser esclarecida em breve com o aumento do número de casos neste grupo.

Com relação à insulinemia, os animais diabéticos sem tratamento mantiveram níveis extremamente baixos de insulinemia ao término do período de acompanhamento, o que corrobora com os achados de hiperglicemia neste grupo. A insulinemia dos animais transplantados com ilhotas pancreáticas isogênicas manteve-se em níveis normais ao término do período de acompanhamento, acompanhando a glicemia em níveis normais.

Este efeito provavelmente é um reflexo do controle fisiológico mantido pelas ilhotas transplantadas. Em contraste, os animais transplantados com ilhotas alogênicas não-transfectadas com o gene da IDO apresentaram níveis extremamente baixos de insulina sérica ao término do período de acompanhamento, confirmando a falência funcional das ilhotas. Já os animais do grupo ALO+IDO Tx apresentaram níveis significativamente mais elevados do que os animais do grupo ALO Tx, refletindo secreção de insulina no grupo transplantado com ilhotas pancreáticas alogênicas transfectadas com IDO. Estes resultados corroboram com os achados de glicemia que mostraram-se <300 mg/dL durante o período de acompanhamento.

O objetivo mais importante do estudo foi saber se a expressão da IDO foi eficaz em promover o aumento da sobrevida das ilhotas pancreáticas transplantadas em situação alogênica. Considerando todos os animais do grupo ALO+IDO Tx, os resultados demonstraram que ilhotas transfectadas com vetor-IDO apresentam sobrevida significativamente maior do que ilhotas não-transfectadas.

A partir dos resultados inicialmente obtidos, pudemos observar que animais transplantados com ilhotas pancreáticas alogênicas (não-transfectadas) rejeitam as ilhotas em aproximadamente 11 dias. Assim, uma pergunta importante é se durante este período ainda há expressão de IDO no enxerto após o transplante de ilhotas transfectadas com vetor-IDO. Este questionamento foi esclarecido a partir dos animais do grupo ALO+IDO Tx que foram sacrificados com 10 dias pós-transplante, pois estes animais

apresentaram positividade para IDO no enxerto, detectada por imuno-histoquímica.

Os resultados do presente estudo demonstram que a indução da expressão da IDO em ilhotas pancreáticas protege as ilhotas contra a rejeição em modelo experimental de transplante alogênico. Os mecanismos pelos quais a IDO protege as ilhotas pancreáticas ainda não foram elucidados neste estudo, porém trabalhos publicados anteriormente sugerem que a atividade da IDO local leva à deficiência de triptofano no micro-ambiente, inibindo a proliferação de linfócitos T (Munn et al., 1999). Além disso, os catabólitos (produtos da quinurenina) formados pela degradação do triptofano podem exercer, no micro-ambiente, imunossupressão local por induzir neutralização mitótica e apoptose em linfócitos T (Terness et al., 2002; Bauer et al., 2005; Fallarino et al., 2002).

Os resultados do presente estudo reforçam a hipótese do efeito protetor da IDO em transplante de órgãos, especificamente em transplante de ilhotas pancreáticas. Os resultados da indução da IDO descritos recentemente em transplantes de outros órgãos e tecidos, como transplante de pulmão e de pele (Swanson et al., 2003; Liu et al., 2006), não apenas estão em concordância com os resultados do presente estudo como também abrem caminho para uma nova via de compreensão dos mecanismos de rejeição e tolerância imunológica, podendo eventualmente ser utilizada como futura ferramenta terapêutica.

6 RESUMO e CONCLUSÕES

1. A digestão pancreática para o isolamento de ilhotas pancreáticas é mais eficiente quando o pâncreas é perfundido com 7,5 mL de solução de Liberase e é mantido por 20 minutos a 37°C;
2. As ilhotas pancreáticas são purificadas com mais eficiência através de gradiente contínuo de iodixanol, ao invés de gradiente descontínuo ou contínuo de Ficoll;
3. A dose de 55 mg/Kg de estreptozotocina é suficiente para induzir diabetes em ratos sem que haja a necessidade de insulina exógena;
4. O número mínimo de ilhotas pancreáticas transplantadas sob a cápsula renal para reverter o diabetes em ratos induzido por estreptozotocina é de 3.000 ilhotas, purificadas por gradiente contínuo de Ficoll, ou 2.500 ilhotas, purificadas por gradiente contínuo de iodixanol;
5. Ratos diabéticos que recebem ilhotas pancreáticas isogênicas reverterem o diabetes e não rejeitam as ilhotas, permanecendo com normoglicemia;
6. Ratos diabéticos que recebem ilhotas pancreáticas alogênicas, de ratos da mesma linhagem *outbred*, reverterem o diabetes, mas rejeitam as ilhotas em aproximadamente 23 dias;
7. Ratos diabéticos que recebem ilhotas pancreáticas alogênicas, de ratos de linhagem diferente, reverterem o diabetes, mas rejeitam as ilhotas em aproximadamente 11 dias;
8. Ratas expressam IDO em tecido embrionário/placenta em 5, 10 e 15 dias de gestação;
9. É possível isolar o cDNA para a IDO em tecido embrionário/placenta para inserção no vetor de expressão pcDNA 3.1;
10. É possível induzir a expressão de IDO (RNA mensageiro e proteína) em ilhotas pancreáticas, introduzindo o vetor de expressão para a IDO através de lipofecção;

11. Ilhotas pancreáticas expressando IDO degradam mais rapidamente o aminoácido triptofano em cultura comparadas com ilhotas não-transfectadas;
12. Animais transplantados com ilhotas expressando IDO mantém um melhor controle metabólico, mantendo a glicemia e a insulinemia próximas de níveis normais;
13. A indução da expressão da IDO em ilhotas pancreáticas protege as ilhotas em modelo experimental de transplante, aumentando a sobrevida das ilhotas.

CONCLUSÕES

- 1) Gradiente contínuo de iodixanol é mais eficiente do que gradiente contínuo de Ficoll para isolar ilhotas pancreáticas de ratos;
- 2) A expressão de IDO pode ser induzida em ilhotas pancreáticas de ratos através de vetor não-viral introduzido por lipofecção;
- 3) A indução da expressão da IDO em ilhotas pancreáticas alogênicas protege as ilhotas em transplante experimental, aumentando a sobrevida do enxerto.

Anexo A. Seqüência do RNA mensageiro para a IDO de rato

[AF312699](#). *Rattus norvegicus*...[gi:11119234]

LOCUS AF312699 1224 bp mRNA linear ROD 07-NOV-2000
DEFINITION *Rattus norvegicus* indoleamine 2,3-dioxygenase (Ido) mRNA, complete cds.

ACCESSION AF312699

VERSION AF312699.1 GI:11119234

REFERENCE 1 (bases 1 to 1224)

AUTHORS Miki,T., Stella,A., Robbins,P.D., Valdivia,L.A. and Gambotto,A.

TITLE Cloning of Rat indoleamine 2,3-dioxygenase mRNA

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1224)

AUTHORS Miki,T., Stella,A., Robbins,P.D., Valdivia,L.A. and Gambotto,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (11-OCT-2000) Surgery, University of Pittsburgh, 200 Lothrop, Pittsburgh, PA 15213, USA

ORIGIN

```
1 atgcctcaca gtcaaatatc tctgcagaa ggctctagaa ggatcctga agaataccac
61 atagatgaag atgtgggctt tgctctacca catccactgg aggagctgcc tgatacgtac
121 agaccttgga tccttggtgc tagaaatctg cctaagctga ttgagaatgg gaagctccga
181 gaagaagtgc agaagctgcc cacactgcgc accgaagaac tgaggggaca caggttacag
241 cgcttgccac atttggccct ggggtacatc accatggcgt atgtgtggaa ccgaggggat
301 gatgatattc gaaaggtgct gccccgcaat ctgcccgttc cctactgcga gctctcggag
361 aagctggggc tgctcccat tctgtcttac gcagactgcg tctggcaaaa ctggaagaaa
421 aaggacccca atgggcccat gacatacgag aacatggaca ttctgtctc gtttcttggt
481 ggggactgcg ataaaggctt ctctctggtc tctctaattg tggaaatcgc agcttctcct
541 gcaatcaaag caattcctac tgtatccagt gcagtagagc atcaagaccc gaaagcactg
601 gagaaggcac tgttagtat agctgccagt ctggagaaag ccaaggaaat ttttaagagg
661 atgcgtgact tcgtggatcc agacacctt ttccacgttc ttcgcatata ttgtctggt
721 tgaaggggca accctaagct gccggagggt ctgctgtacg agggcgtctg ggacaccccc
781 aaaaaattt cagggggcag tgcaggccag agcagcatct ttcagagtct tgatgtcctt
841 ctgggaataa agcatgacgt tggtaagga tctgtgcag aattcctcca ggaaatgaga
901 gagtacatgc ctccagccca ccggaacttc ctctctcct tagagtcagc tccccagtc
961 ctgtagtttg tcattttaag acgcaatgaa gacttgaagg aggctataa tgagtgtgtg
1021 aatggcctgg tctccctcag aatgtccac ctctcgatag tagatactta cattgtgaag
1081 ccttcgaagc agaagcccat ggggtggccac aagtcagaag agccctcaaa cacggaaaaa
1141 agaggggactg ggggtactga cgtcatgaat ttctgagga gttgtgaaaga tacaaccaag
1201 aaagcccttc tgagtggcc tttag
```


Anexo B. Cromatograma da sequência obtida do vetor-IDO, após sequenciamento com *primer* T7. A sequência foi editada em cromatograma pelo programa de computador BioLign versão 3.2

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

al-Abdullah IH, Kumar MS, Abouna GM. Preservation of the functional integrity of islets for transplantation: Ficoll versus dextran gradients for purification. *Transplant Proc.* 1990;22:2046-7.

Alexander AM, Crawford M, Bertera S, Rudert W, Takikawa O, Robbins PD, Trucco M. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes. *Diabetes.* 2002;51:356-65.

Ar'Rajab A, Ahren B, Alumets J, Logdberg L, Bengmark S. Islet transplantation to the renal subcapsular space improves late complications in streptozotocin-diabetic rats. *Eur Surg Res.* 1990;22:270-8.

Ar'Rajab A, Dawidson IJ, Harris RB, Sentementes JT. Effect of the number of islets on the outcome after transplantation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Horm Metab Res.* 1994;26:355-9.

Aune TM, Pogue SL. Inhibition of tumor cell growth by interferon-gamma is mediated by two distinct mechanisms dependent upon oxygen tension: induction of tryptophan degradation and depletion of intracellular nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest.* 1989;84:863-75.

Barnett MJ, McGhee-Wilson D, Shapiro AM, Lakey JR. Variation in human islet viability based on different membrane integrity stains. *Cell Transplant.* 2004;13:481-8.

Bauer TM, Jiga LP, Chuang JJ, Randazzo M, Opelz G, Terness P. Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo. *Transpl Int.* 2005;18:95-100.

Berggren PO, Hallberg A, Welsh N, Arkhammar P, Nilsson T, Welsh M. Transfection of insulin-producing cells with a transforming c-Ha-ras oncogene stimulates phospholipase C activity. *Biochem J.* 1989;259:701-7.

Beutelspacher SC, Pillai R, Watson MP, Tan PH, Tsang J, McClure MO, George AJ, Larkin DF. Function of indoleamine 2,3-dioxygenase in corneal allograft rejection and prolongation of allograft survival by over-expression. *Eur J Immunol.* 2006;36:690-700.

Bodaghi B, Goureau O, Zipeto D, Laurent L, Virelizier JL, Michelson S. Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. *J Immunol.* 1999;162:957-64.

Brandhorst D, Brandhorst H, Hering BJ, Federlin K, Bretzel RG. Islet isolation from the pancreas of large mammals and humans: 10 years of experience. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1995;103 Suppl 2:3-14.

Byrne GI, Lehmann LK, Landry GJ. Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. *Infect Immun*. 1986;53:347-51.

Calafiore R. Perspectives in pancreatic and islet cell transplantation for the therapy of IDDM. *Diabetes-Care*. 1997;20:889-96.

Cheng K, Fraga D, Zhang C, Kotb M, Gaber AO, Guntaka RV, Mahato RI. Adenovirus-based vascular endothelial growth factor gene delivery to human pancreatic islets. *Gene Ther*. 2004;11:1105-16.

Coddington DA, Yang H, Rowden G, Colp P, Issekutz TB, Wright JR Jr. Islet allograft rejection in rats: a time course study characterizing adhesion molecule expression, MHC expression, and infiltrate immunophenotypes. *Cell Transplant*. 1998;7:285-97.

Rayat GR, Korbitt GS, Elliott JF, Rajotte RV. Survival and function of syngeneic rat islet grafts placed within the thymus versus under the kidney capsule. *Cell Transplant*. 1997;6:597-602.

Mendola JF, Goity C, Fernandez-Alvarez J, Saenz A, Benarroch G, Fernandez-Cruz L, Gomis R. Immunocytochemical study of pancreatic islet revascularization in islet isograft. Effect of hyperglycemia of the recipient and of in vitro culture of islets. *Transplantation*. 1994;57:725-30.

Contreras JL, Bilbao G, Smyth C, Eckhoff DE, Xiang XL, Jenkins S, Cartner S, Curiel DT, Thomas FT, Thomas JM. Gene transfer of the Bcl-2 gene confers cytoprotection to isolated adult porcine pancreatic islets exposed to xenoreactive antibodies and complement. *Surgery*. 2001;130:166-74.

Csete ME, Benhamou PY, Drazan KE, Wu L, McIntee DF, Afra R, Mullen Y, Busuttil RW, Shaked A. Efficient gene transfer to pancreatic islets mediated by adenoviral vectors. *Transplantation*. 1995;59:263-8.

de Groot M, Schuurs TA, van Schilfgaarde R. Causes of limited survival of microencapsulated pancreatic islet grafts. *J Surg Res*. 2004;121:141-50.

de la Maza LM, Peterson EM. Dependence of the in vitro antiproliferative activity of recombinant human gamma-interferon on the concentration of tryptophan in culture media. *Cancer Res*. 1988;48:346-50.

Delle H, Saito MH, Yoshimoto PM, Noronha IL. The use of iodixanol for the purification of rat pancreatic islets. *Transplant Proc*. 2007;39:467-9.

Dufrane D, Goebbels RM, Guiot Y, Squifflet JP, Henquin JC, Gianello P. A simple method using a polymethylpenten chamber for isolation of human pancreatic islets. *Pancreas*. 2005;30:e51-9.

EASD – European association for the study of diabetes: Dimension of Diabetes Research. *Diabetologia*. 1996;39:S5-11.

Eckhard M, Brandhorst D, Brandhorst H, Brendel MD, Bretzel RG. Optimization in osmolality and range of density of a continuous ficoll-sodium-diatrizoate gradient for isopycnic purification of isolated human islets. *Transplant Proc*. 2004;36:2849-54.

Efrat S, Fejer G, Brownlee M, Horwitz MS. Prolonged survival of pancreatic islet allografts mediated by adenovirus immunoregulatory transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:6947-51.

Eisenbarth GS, Stegall M. Islet and pancreatic transplantation- autoimmunity and alloimmunity (editorial). *N Engl J Med*. 1996;335:888-90.

Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ*. 2002;9:1069-77.

Gainer AL, Korbitt GS, Rajotte RV, Warnock GL, Elliott JF. Successful biolistic transformation of mouse pancreatic islets while preserving cellular function. *Transplantation*. 1996;61:1567-71.

Giannoukakis N, Mi Z, Rudert WA, Gambotto A, Trucco M, Robbins P. Prevention of beta cell dysfunction and apoptosis activation in human islets by adenoviral gene transfer of the insulin-like growth factor I. *Gene Ther*. 2000;7:2015-22.

Giannoukakis N, Rudert WA, Ghivizzani SC, Gambotto A, Ricordi C, Trucco M, Robbins PD. Adenoviral gene transfer of the interleukin-1 receptor antagonist protein to human islets prevents IL-1beta-induced beta-cell impairment and activation of islet cell apoptosis in vitro. *Diabetes*. 1999;48:1730-6.

Grey ST, Arvelo MB, Hasenkamp W, Bach FH, Ferran C. A20 inhibits cytokine-induced apoptosis and nuclear factor kappaB-dependent gene activation in islets. *J Exp Med*. 1999;190:1135-46.

Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Puccetti P. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol*. 2002;3:1097-101.

Hu B, Hissong BD, Carlin JM. Interleukin-1 enhances indoleamine 2,3-dioxygenase activity by increasing specific mRNA expression in human mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res.* 1995;15:617-24.

Johnson PA, Miyanohara A, Levine F, Cahill T, Friedmann T. Cytotoxicity of a replication-defective mutant of herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 1992;66:2952-65.

Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest.* 1969;48:2129-39.

Kamimura S, Eguchi K, Yonezawa M, Sekiba K. Localization and developmental change of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the human placenta. *Acta Med Okayama.* 1991;45:135-9.

Kin T, Korbitt GS, Rajotte RV. Survival and metabolic function of syngeneic rat islet grafts transplanted in the omental pouch. *Am J Transplant.* 2003;3:281-5.

Kin T, Rajotte RV, Korbitt GS. Reassessment of the vascularization of renal subcapsular islet grafts. *Pancreas.* 2004;29:e59-63.

Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes.* 1967;16:35-9.

Leow CK, Gray DW, Morris PJ. The long-term metabolic function of intraportal and renal subcapsular islet isografts and the effect on glomerular basement membrane thickness in rats. *Diabetologia.* 1995;38:1014-24.

Lew AM, Brady JL, Silva A, Coligan JE, Georgiou HM. Secretion of CTLA4Ig by an SV40 T antigen-transformed islet cell line inhibits graft rejection against the neoantigen. *Transplantation.* 1996;62:83-9.

Li Y, Tredget EE, Ghaffari A, Lin X, Kilani RT, Ghahary A. Local expression of indoleamine 2,3-dioxygenase protects engraftment of xenogeneic skin substitute. *J Invest Dermatol.* 2006;126:128-36.

Liu H, Liu L, Fletcher BS, Visner GA. Novel action of indoleamine 2,3-dioxygenase attenuating acute lung allograft injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:566-72.

Liu Y, Rabinovitch A, Suarez-Pinzon W, Mukherjee B, Brownlee M, Edelstein D, Federoff HJ. Expression of the bcl-2 gene from a defective HSV-1 amplicon vector protects pancreatic beta-cells from apoptosis. *Hum Gene Ther.* 1996;7:1719-26.

London NJM, Robertson GSM, Chadwick DR, Johnson PRV, James RFL, Bell PRF: Human pancreatic islet isolation and transplantation. *Clin Transplantation*. 1994;8:421-59.

Lopez-Talavera JC, Garcia-Ocana A, Sipula I, Takane KK, Cozar-Castellano I, Stewart AF. Hepatocyte growth factor gene therapy for pancreatic islets in diabetes: reducing the minimal islet transplant mass required in a glucocorticoid-free rat model of allogeneic portal vein islet transplantation. *Endocrinology*. 2004;145:467-74.

MacGregor RR, Williams SJ, Tong PY, Kover K, Moore WV, Stehno-Bittel L. Small rat islets are superior to large islets in in vitro function and in transplantation outcomes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290:E771-9.

Miki T, Sun H, Lee Y, Tandin A, Kovscek AM, Subbotin V, Fung JJ, Valdivia LA. Blockade of tryptophan catabolism prevents spontaneous tolerogenicity of liver allografts. *Transplant Proc*. 2001;33:129-30.

Morini S, Braun M, Onori P, Cicalese L, Elias G, Gaudio E, Rastellini C. Morphological changes of isolated rat pancreatic islets: a structural, ultrastructural and morphometric study. *J Anat*. 2006;209:381-92.

Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*. 1999;189:1363-72.

Munn, D.H.; Zhou, M.; Attwood, J.T.; bondarev, I.; Conway, S.J.; Marshall, B.; Brown, C.; Mellor, A.L. Prevention of Allogeneic Fetal Rejection by Tryptophan Catabolism. *Science*. 1998;281:1191-3.

Nagineni CN, Pardhasaradhi K, Martins MC, Detrick B, Hooks JJ. Mechanisms of interferon-induced inhibition of Toxoplasma gondii replication in human retinal pigment epithelial cells. *Infect Immun*. 1996;64:4188-96.

Pan TL, Lin CL, Chen CL, Lin YC, Gojo S, Lee TH, Wang YH, Lord R, Lai CY, Tsu LW, Tseng HP, Wu ML, Iwashita Y, Kitano S, Chiang KC, Hashimoto T, Sugiyama A, Goto S. Identification of the indoleamine 2,3-dioxygenase nucleotide sequence in a rat liver transplant model. *Transpl Immunol*. 2000;8:189-94.

Pfefferkorn ER. Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984;81:908-12.

Pimazoni N, Costa e Forti A, Chacra AR, Pedrosa H, Gross JL, Marcondes JAM, Franco LJ, Lima LP, Fonseca RMC, Bosch R. Proposta básica para a assistência a o paciente diabético no município. Sociedade Brasileira de

Diabetes e Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, 1999. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/imprensa/estatisticas/index.php>

Qian S, Demetris AJ, Murase N, Rao AS, Fung JJ, Starzl TE. Murine liver allograft transplantation: tolerance and donor cell chimerism. *Hepatology*. 1994;19:916-24.

Rajab AA, Ahren B, Bengmark S. Islet transplantation to the renal subcapsular space in streptozotocin-diabetic rats: short-term effects on glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes Res Clin Pract*. 1989;18:197-204.

Reckard CR, Ziegler MM, Barcker CF. Physiological and immunological consequences of transplanting isolated pancreatic islets. *Surgery*. 1973;74:91-9.

Ricordi C, Lacy PE, Scharp DW. Automated islet isolation from human pancreas. *Diabetes*. 1989;38:140-2.

Ricordi C, Rastellini C: Automated method for pancreatic islets separation. In: RICORDI, C: Methods in cell transplantation. Austin, RG Landes Company. 1995:433-8.

Ricordi C, Tzakis AG, Carrol PB, Zeng YJ, Rilo HL, Alejandro R, Shapiro A, Fung JJ, Demetris AJ, Mintz DH, et al. Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. *Transplantation*. 1992;53:407-14.

Sakai T, Li S, Tanioka Y, Goto T, Tanaka T, Matsumoto I, Tsujimura T, Fujino Y, Suzuki Y, Kuroda Y. Intraperitoneal injection of oxygenated perfluorochemical improves the outcome of intraportal islet transplantation in a rat model. *Transplant Proc*. 2006;38:3289-92.

Saldeen J, Curiel DT, Eizirik DL, Andersson A, Strandell E, Buschard K, Welsh N. Efficient gene transfer to dispersed human pancreatic islet cells in vitro using adenovirus-polylysine/DNA complexes or polycationic liposomes. *Diabetes*. 1996;45:1197-203.

Saldeen J, Sandler S, Bendtzen K, Welsh N. Liposome-mediated transfer of IL-1 receptor antagonist gene to dispersed islet cells does not prevent recurrence of disease in syngeneically transplanted NOD mice. *Cytokine*. 2000;12:405-8.

Saudek F, Kazdova L, Nozickova M, Vrana A, Cihalova E, Ruzbarsky V. The effect of combination therapy with cyclosporine A and hydrocortisone on glucose metabolism in diabetic rats following pancreatic islet transplantation. *Physiol Res*. 1995;44:79-86.

Scharp DW, Kemp CB, Knight MJ, Ballinger WF, Lacy PE. The use of ficoll in the preparation of viable islets of langerhans from the rat pancreas. *Transplantation*. 1973;16:686-9.

Secchi A, Di Carlo V, Pozza G: Pancreas and islet transplantation: Current progress, problems and perspectives. *Horm Metab Res*. 1997;29:1-8.

Shapiro AM, Geng Hao E, Lakey JR, Finegood DT, Rajotte RV, Kneteman NM. Defining optimal immunosuppression for islet transplantation based on reduced diabetogenicity in canine islet autografts. *Transplantation*. 2002;74:1522-8.

Shapiro AM, Hao E, Lakey JR, Finegood D, Rajotte RV, Kneteman NM. Diabetogenic synergism in canine islet autografts from cyclosporine and steroids in combination. *Transplant Proc*. 1998;30:527.

Shapiro AM, Lakey JRT, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 2000;343:230-8.

Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, Secchi A, Brendel MD, Berney T, Brennan DC, Cagliero E, Alejandro R, Ryan EA, DiMercurio B, Morel P, Polonsky KS, Reems JA, Bretzel RG, Bertuzzi F, Froud T, Kandaswamy R, Sutherland DE, Eisenbarth G, Segal M, Preiksaitis J, Korbitt GS, Barton FB, Viviano L, Seyfert-Margolis V, Bluestone J, Lakey JR. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med*. 2006;355:1318-30.

Southern PJ, Berg P. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet*. 1982;1:327-41.

Steiniger B, Hiller WF, Klempnauer J. Identical pattern of acute rejection after isolated islet and vascularized whole-pancreas transplantation in the rat. *Am J Pathol*. 1990;137:93-102.

Suarez-Pinzon WL, Marcoux Y, Ghahary A, Rabinovitch A. Gene transfection and expression of transforming growth factor-beta1 in nonobese diabetic mouse islets protects beta-cells in syngeneic islet grafts from autoimmune destruction. *Cell Transplant*. 2002;11:519-28.

Swanson KA, Zheng Y, Heidler KM, Mizobuchi T, Wilkes DS. CD11c+ cells modulate pulmonary immune responses by production of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;30:311-8.
Tafari A, Alferink J, Moller P, Hammerling GJ, Arnold B. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science*. 1995;270:630-3.

Terness P, Bauer TM, Rose L, Duffer C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med*. 2002;196:447-57.

The Diabetes control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993;329:977-86.

Tzakis AG, Ricordi C, Alejandro R, Zeng Y, Fung JJ, Todo S, Demetris AJ, Mintz DH, Starzl TE. Pancreatic islet transplantation after upper abdominal exenteration and liver replacement. *Lancet*. 1990;336:402-5.

Uchikoshi F, Yang ZD, Rostami S, Yokoi Y, Capocci P, Barker CF, Naji A. Prevention of autoimmune recurrence and rejection by adenovirus-mediated CTLA4lg gene transfer to the pancreatic graft in BB rat. *Diabetes*. 1999;48:652-7.

van der Burg MP, Basir I, Bouwman E. No porcine islet loss during density gradient purification in a novel iodixanol in University of Wisconsin solution. *Transplant Proc*. 1998;30:362-3.

van der Burg MP, Graham JM. Iodixanol density gradient preparation in university of wisconsin solution for porcine islet purification. *Scientific World Journal*. 2003;3:1154-9.

van Suylichem PT, Wolters GH, van Schilfgaarde R. The efficacy of density gradients for islet purification: a comparison of seven density gradients. *Transpl Int*. 1990;3:156-61.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27:1047-53.

Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*. 1981;294:284-6.

Yang H, Yu W, Wan X, al-Abdullah I, Wright JR Jr. Recyclable islet isografts: a biological insulin pump to facilitate surgery in diabetic rats. *Cell Transplant*. 1994;3:107-11.

Yang Y, Su Q, Wilson JM. Role of viral antigens in destructive cellular immune responses to adenovirus vector-transduced cells in mouse lungs. *J Virol*. 1996;70:7209-12.

Yasuda H, Nagata M, Arisawa K, Yoshida R, Fujihira K, Okamoto N, Moriyama H, Miki M, Saito I, Hamada H, Yokono K, Kasuga M. Local expression of immunoregulatory IL-12p40 gene prolonged syngeneic islet graft survival in diabetic NOD mice. *J Clin Invest*. 1998;102:1807-14.

Yoshida R, Nukiwa T, Watanabe Y, Fujiwara M, Hirata F, Hayaishi O. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the small intestine and the epididymis of mice. *Arch Biochem Biophys*. 1980;203:343-51.