UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ANA LÚCIA CAMPANHA RODRIGUES

Imunoproteção de Ilhotas Pancreáticas Microencapsuladas em Biomateriais Inovadores e seu Potencial Terapêutico no Diabetes Mellitus Tipo 1

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
02/04/2012

ANA LÚCIA CAMPANHA RODRIGUES

Imunoproteção de Ilhotas Pancreáticas Microencapsuladas em Biomateriais Inovadores e seu Potencial Terapêutico no Diabetes Mellitus Tipo 1

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Mari Cleide Sogayar
Coorientador: Prof. Dr. Thiago Rennó dos Mares Guia

São Paulo
2012

Imunoproteção de ilhotas pancreáticas microencapsuladas em biomateriais inovadores e seu potencial terapêutico no diabetes mellitus tipo 1

ANA LÚCIA CAMPANHA RODRIGUES

Tese de doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica

Aprovada por:

_____

Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar
Orientadora e Presidente

_____

Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista
IQ-USP

_____

Profa. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski
IQ-USP

_____

Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara
ICB-USP

_____

Prof. Dr. Licio Augusto Velloso
FCM-UNICAMP

SÃO PAULO
08 de maio de 2012

Aos meus queridos pais, Lúcia e Liberato, por serem

fontes inesgotáveis de amor, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Prof^{a}. Dr^{a}. Mari Cleide Sogayar, por me receber em seu laboratório, de braços abertos, confiando na minha capacidade de desenvolver uma tese de doutorado. Pelos momentos difíceis, em que busquei apoio, pelas alegrias dos primeiros resultados, pela certeza de que tudo haveria de dar certo e pela oportunidade que me ofereceu de crescer e me tornar uma cientista mais preparada.

Ao meu coorientador, Dr. Thiago Rennó dos Mares Guia, por ter acreditado neste projeto desde o princípio, por todas as conversas amigas e por suas importantes contribuições nesta jornada.

À querida amiga (desde os tempos da UFMG) Ana Carolina Vale Campos Lisbôa, que me passou o legado do microencapsulamento de ilhotas e contribuiu, imensamente, com seus protocolos, suas ideias, sua energia e sua positividade.

À Gisella Grazioli, meu "braço direito" em todos os momentos deste projeto. Pelos infinitos experimentos, finais de semana cuidado dos animais transplantados, divisão de tarefas em momentos absolutamente caóticos, apoio e amizade. Com certeza esta tese também é uma vitória sua.

À Talita Cristina Oliveira, por ter sido a melhor "I.C." que alguém poderia ter, por ter chegado com a energia necessária para ajudar em momentos fundamentais deste projeto, pela maneira profissional com que se adequou ao laboratório, ao biotério, ao dia a dia experimental e, principalmente, por ter acreditado e feito deste também o seu projeto.

À Érika Molina e ao Daniel Mariani, por terem contribuído, com muita boa vontade e dedicação, em diferentes pontos deste trabalho.

A todos os integrantes dos laboratórios LBCM e UIPH, por fazerem do ambiente de trabalho um local divertido, empolgante e frutífero de ideias. Especialmente, agradeço aos colegas de pós-graduação, que sofreram juntos nas vésperas de provas (principalmente da prova de ingresso da pós): Letícia Terra, Aline Maia, Marina Trombetta, Gustavo Belchior, Erik Halcsik, Patrícia Kossugue e Tatiane Maldonado.

Aos pós-doutorandos do laboratório, grandes responsáveis pelos diversos projetos e linhas de pesquisa. Agradeço, principalmente, pela paciência daqueles que sofreram com minhas perguntas infindáveis: Marcos Demasi, Ana Cláudia Carreira e Theri Degaki. Creio que aqui também se enquadram duas "doutorandas-sênior", que sempre me pareceram "pós-docs", Maria Fernanda Forni e Luciana Gomes (agora Dr^{a}!): Muito obrigada!

À equipe de isolamento de ilhotas humanas e, especialmente, aos que atuaram nos últimos dois anos: Marluce Mantovani, Roberta Mourão, Fernando Lojudice, Patrícia Kossugue, Ilana Gabanyi, Letícia Terra e Rosângela Wailemann. Não era fácil passar tantas horas escutando a mesma música no rádio, mas sempre conseguíamos ânimo para ir atrás da preparação de ilhotas perfeita!

À Prof^{a}. Dr^{a}. Letícia Labriola, por todas as conversas, dicas, interações profissionais, apoio e amizade. Que a sua carreira seja iluminada!

Ao apoio técnico do laboratório: Zizi, Débora, Ricardo e Sandra. Sem vocês, com certeza o laboratório não seria tão produtivo. Agradeço imensamente o trabalho e dedicação de todos.

Aos funcionários do Biotério, que sempre zelaram pelos animais e estiveram à disposição para ajudar em todos os procedimentos necessários. Agradeço a chance de ter tido uma equipe tão preparada me auxiliando e animais tão bem cuidados, de acordo com os princípios éticos de experimentação animal. Em especial, um agradecimento à Silvania Neves, Renata Ong e Renata Spalutto, sempre compreensivas e dispostas a ajudar.

Ao Prof. Raul C. Maranhão, do Laboratório de Metabolismo de Lípides do INCOR, por gentilmente disponibilizar meios para realizar a emulsificação de um dos biomateriais utilizados nesta tese.

Ao Prof. Rui Curi, do ICB-USP, por prontamente nos ceder a linhagem de macrófagos utilizada neste trabalho.

Ao Dr. Eduardo Rebelato, pela contribuição valiosa com as dosagens de insulina e por ter tido toda a paciência com meus "milhares" de microtubos "pouco identificados"!

Aos Professores Gordon Weir e Susan Bonner-Weir, do *Joslin Diabetes Center*, por me aceitarem por um curto período de estágio em seu laboratório e por, não só permitirem o meu livre acesso aos projetos, mas estimularem a minha participação em inúmeros experimentos, reuniões e seminários. Foram três meses extremamente significativos!

À Karen Köhler, pelos quase quatro anos que dividimos um apartamento, por ter me ajudado a construir um lar em São Paulo, pela amizade e confidências e, principalmente, por ter aturado minhas manias! Sentirei falta da nossa convivência diária!

A todos que me ajudaram a viver nessa cidade gigantesca, apressada, muitas vezes brutal. Às boas almas que ofereceram inúmeras caronas, "marmitas" e o conforto de uma palavra amiga. Aos piadistas, engraçadinhos, contadores de casos, que animaram meu dia! Vocês foram muito mais do que apenas colegas, foram amigos leais em um período que eu tanto precisei!

E, finalmente, ao grupo de pessoas mais importante da minha vida: minha família. Aos meus pais, Lúcia e Liberato, e irmãos, Marcelo e Maurício, que sempre tiveram palavras de apoio e confiança, sem um pingo de dúvida de que eu conseguiria o que quisesse. Aos tios e primos que me receberam em suas casas, quando eu precisei de abrigo. E foi de todos eles que eu tirei forças, nos momentos em que a minha própria me faltou. Serei eternamente grata a vocês. *"Família é tudo de bom. Mas, às vezes, pode torrar um pouquinho a nossa paciência. Talvez torre a sua. Mas acredite: isso não terá a menor importância. Porque família é de onde a gente veio e para onde a gente sempre volta." (Silmara Franco).*

APOIO FINANCEIRO

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do nosso corpo, e esquecer os caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia, e se não ousarmos fazê-la teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos."

Fernando Teixeira de Andrade

“In science it often happens that scientists say, "You know that's a really good argument; my position is mistaken," and then they would actually change their minds and you never hear that old view from them again. They really do it. It doesn't happen as often as it should, because scientists are human and change is sometimes painful. But it happens every day. I cannot recall the last time something like that happened in politics or religion.”

“We are, each of us, a multitude. Within us is a little universe.”

Carl Sagan

RESUMO

Campanha-Rodrigues, A.L. **Imunoproteção de Ilhotas Pancreáticas Microencapsuladas em Biomateriais Inovadores e seu Potencial Terapêutico no Diabetes Mellitus Tipo 1.** 2012. 106p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O transplante de ilhotas microencapsuladas constitui uma alternativa terapêutica interessante para o Diabetes Mellitus tipo 1, permitindo um melhor controle glicêmico e eliminando a necessidade de imunossupressão. Entretanto, a manutenção a longo prazo da viabilidade das células-β ainda é um desafio. No isolamento, a perda da matriz extracelular e as condições hipóxicas subsequentes afetam decisivamente a sobrevivência e funcionalidade das ilhotas. **Objetivo** Para diminuir o estresse sobre o enxerto, levando a um sucesso prolongado do transplante, propôs-se a adição de perfluorocarbono (PFC) ou laminina (LN), moléculas associadas respectivamente à oxigenação e interações célula-célula, ao biomaterial baseado em alginato, Biodritina, adequado ao encapsulamento celular. **Metodologia** Para testar a estabilidade das formulações PFC-Biodritina e LN-Biodritina, microcápsulas foram submetidas a diferentes estresses (rotacional, osmótico, temperatura e cultura) por 7 e 30 dias. A pureza do biomaterial foi avaliada pela coincubação com macrófagos murinos RAW264.7, por 3, 9 e 24h, quando a ativação dos macrófagos foi observada pela expressão gênica de IL-1β e TNFα. Microcápsulas implantadas i.p. em camundongos foram recuperadas após 7 ou 30 dias, para análises de biocompatibilidade. A expressão de níveis de mRNA (*bax, bad, bcl-2, bcl-XL, xiap, caspase 3, mcp1/ccl2, hsp70, ldh, insulina 1 e 2*), proteínas (Bax, Bcl-XL e Xiap) e a atividade de Caspase3 foram avaliadas em ilhotas microencapsuladas com PFC- e LN-Biodritina, após cultura de 48h em condições de normóxia e hipóxia (<2% O_2). Camundongos diabéticos foram transplantados com ilhotas encapsuladas nas diferentes formulações e os animais foram monitorados pelas variações de massa corporal, glicêmicas e pela funcionalidade do enxerto (TOTGs). As ilhotas foram recuperadas de animais normo ou hiperglicêmicos e uma análise de biocompatibilidade das cápsulas foi realizada, assim como a avaliação funcional das células-β. Após o explante, a glicemia dos animais normoglicêmicos foi monitorada para se atestar a eficiência das ilhotas transplantadas. **Resultados** Microcápsulas de PFC- e LN-Biodritina são tão estáveis e biocompatíveis quanto as de Biodritina. Para ilhotas encapsuladas em ambos os materiais, em normóxia ou hipóxia, observou-se uma modulação gênica que sugere proteção contra apoptose. Adicionalmente, encontrou-se uma diminuição na expressão de genes indicadores de estresse (*mcp1, hsp70*). Uma diminuição nos níveis de mRNA de *ldh* foi vista para PFC-Biodritina, mas o oposto foi encontrado para LN-Biodritina. As diferenças encontradas na expressão proteica sugerem o mesmo padrão anti-apoptótico. Caspase3 não foi modulada por nenhum biomaterial. Nos experimentos de transplante, apenas LN-Biodritina levou reversão prolongada do diabetes, com 60% dos animais normoglicêmicos, 198 dias pós-cirurgia, comparado a 9% do grupo Biodritina. O TOTG demonstrou que camundongos transplantados com ilhotas encapsuladas secretaram mais insulina do que controles, 60 (LN-Biodritina) ou 100 (PFC- e LN-Biodritina) dias pós-cirurgia. O explante restabeleceu a hiperglicemia nos camundongos. Microcápsulas recuperadas de animais hiperglicêmicos apresentavam uma extensa adesão celular. Testes de

secreção de insulina *in vitro* demonstraram que somente ilhotas do grupo normoglicêmico responderam às variações da concentração de glicose. **Conclusão** A adição de moléculas bioativas à Biodritina é capaz de diminuir o estresse em ilhotas isoladas e tem o potencial de melhorar a terapia pelo transplante de ilhotas.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus tipo 1, Microencapsulamento, Transplante de Ilhotas Pancreáticas, Perfluorocarbono, Laminina, Biodritina

ABSTRACT

Campanha-Rodrigues, A.L. **Immunoprotection of Pancreatic Islets Microencapsulated in Inovative Biomaterials and its Therapeutic Potential in Type 1 Diabetes Mellitus.** 2012. 106p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Transplantation of microencapsulated islets represents an attractive therapeutical approach to treat type 1 Diabetes Mellitus, accounting for an improved glycemic control and the abolishment of immunosuppressive therapies. However, maintenance of long-term ß-cell viability remains a major problem. During islet isolation, the loss of extracellular matrix interactions and the hypoxic conditions thereafter dramatically affect ß-cell survival and function. **Objective** To lessen the burden of islet stress and achieve a better outcome in islet transplantation we tested the addition of perfluorocarbon (PFC) or laminin (LN), molecules associated respectively with oxygenation and cell-cell interaction, to Biodritin, an alginate-based material suitable for cell microencapsulation. **Methodology** To test the stability of PFC-Biodritin and LN-Biodritin composites, microcapsules were subjected to different stresses (rotational, osmotic, temperature and culture) for 7 and 30 days. To assess biomaterial purity microcapsules were co-incubated with RAW264.7 murine macrophage cell line for 3, 9 and 24h and macrophage activation was detected through mRNA levels of IL-1β and TNFα. Microcapsules were implanted i.p. in mice and retrieved after 7 or 30 days, for biocompatibility analyses. Gene expression at mRNA (*bax, bad, bcl-2, bcl-XL, xiap, caspase 3, mcp1/ccl2, hsp70, ldh, insulin 1 and 2*) and protein (Bax, Bcl-XL and Xiap) levels, together with Caspase3 activity, were evaluated in islets microencapsulated in PFC- or LN-Biodritin, upon culturing for 48h in normoxic or hypoxic (<2% O_2) conditions. Diabetic mice were transplanted with PFC- or LN-Biodritin microencapsulated islets, followed by assessments of body weight, glycemia and graft function by oral glucose tolerance tests (OGTTs). Microencapsulated islets were retrieved from normoglycemic or hyperglycemic mice and biocompatibility analyses of the beads together with a functional assessment of the graft followed. After graft removal, normoglycemic animals had their glycemias monitored to attest the efficacy of the transplanted islets. **Results** PFC- and LN-Biodritin microcapsules were as stable and biocompatible as Biodritin. For both biomaterials in normoxia and hypoxia a modulation in gene expression was observed in islets associated with a protection against apoptosis. Also, a decreased expression of stress-related genes (*mcp1, hsp70*) was evidenced. *ldh* mRNA levels were down-regulated in PFC-Biodritin microencapsulated islets but up-regulated in the presence of LN. Increased levels of insulin mRNA were observed. The differences seen in protein expression indicated the same anti-apoptotic pattern. Caspase3 activity was not different between groups. Concerning diabetes reversal experiments, only mice transplanted with LN-Biodritin microencapsulated islets presented a better outcome, with 60% remaining euglycemic at 198 days post-surgery, compared with 9% for the Biodritin group. OGTT showed that mice transplanted with encapsulated islets secreted more insulin than normal mice, 60 (LN-Biodritin) or 100 days (PFC- and LN-Biodritina) post-transplant. Hyperglycemia was achieved after the retrieval of microcapsules showing graft efficacy. Retrieved microcapsules revealed an extensive overgrowth in most beads from

hyperglycemic mice. A static glucose stimulated insulin secretion test revealed that only islets from normoglycemic subjects were able to secrete insulin according to glucose concentration. **Conclusion-** The addition of bioactive molecules to Biodritin may lessen the stress of isolated islets and have the potential to improve islet transplantation therapy.

Keywords: Type 1 Diabetes Mellitus, Microencapsulation, Pancreatic Islet Transplantation, Perfluorocarbon, Laminin, Biodritin

SUMÁRIO

1. **Introdução**..... 16
   1.1. Diabetes mellitus tipo 1..... 16
   1.2. Transplante de pâncreas versus transplante de ilhotas pancreáticas..... 17
   1.3. Microencapsulamento de ilhotas pancreáticas..... 19
   1.4. Os desafios do transplante de ilhotas microencapsuladas..... 22
   1.5. Sítios de transplante e estratégias para aumentar a sobrevida do enxerto..... 25
   1.6. Propostas de novas formulações de biomateriais para o microencapsulamento de ilhotas..... 27
      1.6.1. Perfluorocarbonos (PFCs)..... 28
      1.6.2. Lamininas (LNs)..... 28
2. **Objetivos**..... 30
   2.1. Objetivo Geral..... 30
   2.2. Objetivos Específicos..... 30
3. **Materiais e Métodos**..... 32
   3.1. Obtenção das formulações de biomateriais..... 32
   3.2. Indução química do diabetes mellitus em animais..... 33
   3.3. Isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas de ratos..... 33
   3.4. Avaliação da atividade funcional *in vitro* de ilhotas pancreáticas recém isoladas..... 35
   3.5. Cultivo da linhagem de macrófagos RAW264.7..... 36
   3.6. Produção de microcápsulas e microencapsulamento de ilhotas pancreáticas..... 36
   3.7. Ensaios de estabilidade das microcápsulas..... 37
   3.8. Ensaios de biocompatibilidade das microcápsulas..... 38
      3.8.1. Avaliação da biocompatibilidade de cápsulas através da co-incubação com macrófagos..... 38
      3.8.2. Avaliação da biocompatibilidade de cápsulas após o implante em animais 42
   3.9. Ensaios de cultivo de ilhotas microencapsuladas em condições de normóxia e hipóxia..... 43
      3.9.1 Análise da expressão gênica..... 44
      3.9.2. Análise de expressão proteica e ensaio de atividade de Caspase 3..... 45
   3.10. Ensaios de reversão do Diabetes Mellitus por ilhotas microencapsuladas e acompanhamento da eficácia do enxerto..... 47
   3.11. Análise das microcápsulas e das ilhotas pancreáticas recuperadas de animais transplantados..... 48
4. **Resultados**..... 50
   4.1. Formulações de microcápsulas..... 50
   4.2. Avaliação da estabilidade mecânica e térmica das microcápsulas..... 50
   4.3. Avaliação da biocompatibilidade das microcápsulas..... 52
   4.4. Ensaio *in vitro* de funcionalidade de ilhotas pancreáticas isoladas..... 55
   4.5. Expressão gênica, ao nível de RNA e proteínas, de ilhotas microencapsuladas e cultivadas em condições de normóxia e hipóxia..... 56
   4.6. Reversão do Diabetes Mellitus em camundongos através do transplante de ilhotas pancreáticas microencapsuladas..... 59
   4.7. Análise de microcápsulas e ilhotas recuperadas de animais normoglicêmicos e hiperglicêmicos..... 65
5. **Discussão**..... 69

5.1. Estabilidades térmica e mecânica das microcápsulas..... 69
5.2. Biocompatibilidade das microcápsulas..... 71
5.2.1. Ensaio de biocompatibilidade *in vitro*: coincubação de microcápsulas e macrófagos..... 72
5.2.2. Ensaio de biocompatibilidade *in vivo*: implante de microcápsulas na cavidade peritoneal de camundongos Balb/C imunocompetentes..... 73
5.3. Modulação gênica e proteica em ilhotas microencapsuladas cultivadas sob atmosferas de normóxia e hipóxia..... 76
5.4. Reversão do Diabetes Mellitus em camundongos imunocompetentes através do transplante de ilhotas pancreáticas microencapsuladas e análise funcional *in vivo* do enxerto..... 84
5.5. Biocompatibilidade e função de ilhotas microencapsuladas recuperadas de camundongos diabéticos imunocompetentes..... 90
6. **Conclusões**..... 94
7. **Referências Bibliográficas**..... 95
Anexo: Súmula Curricular

1. Introdução

1.1. Diabetes Mellitus tipo 1

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica que afeta cerca de 350 milhões de pessoas em todo o mundo (1), sendo caracterizada por uma regulação inadequada do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, devido à deficiência na produção de insulina ou incapacidade de utilização desse hormônio pelo organismo. Esse distúrbio metabólico está associado ao desenvolvimento de complicações vasculares e neurológicas, que levam a um alto índice de mortalidade prematura, o que colocou esta síndrome em quinto lugar no *ranking* das doenças mais impactantes em 2005 (2-4).

O DM engloba os dois principais tipos de manifestação da síndrome: Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) e Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). O DM1 é causado pela destruição auto-imune das ilhotas pancreáticas, o que leva a uma drástica diminuição da insulina circulante, podendo chegar à total ausência deste hormônio. Esse processo é usualmente observado em pacientes jovens, sendo responsável por 10% dos casos de diabetes relatados. Já o DM2 se caracteriza por resistência das células do organismo à insulina e representa 90% dos casos relatados de DM. Em ambos os casos, a hiperglicemia resultante é um dos sintomas clássicos associados ao estado diabético (2).

A insulina é um hormônio produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans (**Figura 1**), estruturas que correspondem à porção endócrina do tecido pancreático, sendo um fator essencial no metabolismo dos carboidratos e gorduras. Desde sua descoberta por Banting & Best (5), há cerca de 90 anos, a insulina modificou drasticamente a vida de pacientes com DM1. Embora a terapia insulínica, baseada na administração do hormônio a partir de injeções subcutâneas, seja capaz de atrasar ou até mesmo impedir o desenvolvimento de complicações tardias, pacientes denominados “hiperlábeis”, sujeitos a variações de glicemia amplas e

frequentes, continuam a apresentar eventos hipoglicêmicos preocupantes e muitas vezes fatais (6-8). Nesses casos, o transplante de tecido produtor de insulina é uma terapia a se considerar.

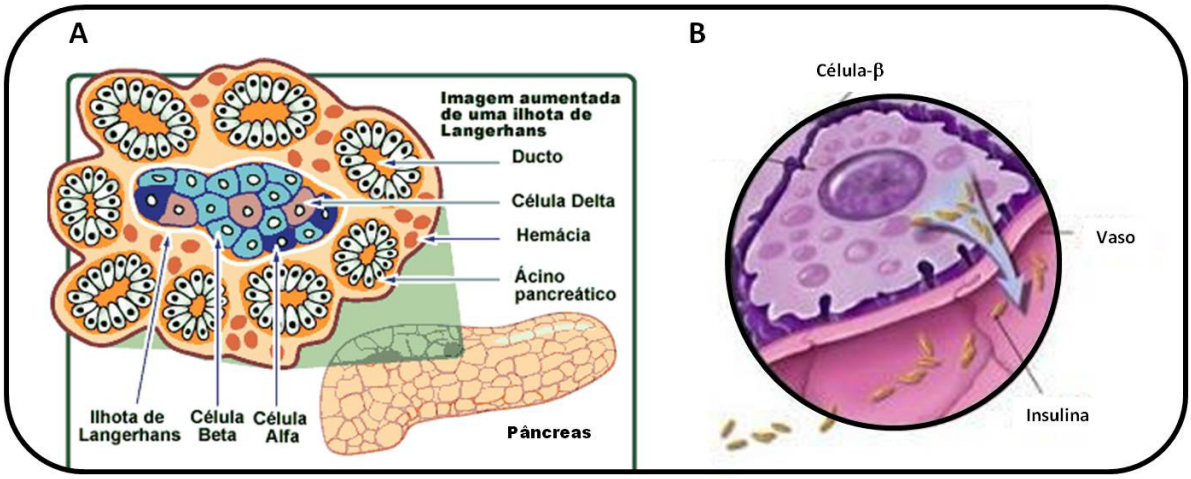


Figura 1: (A) Visão esquemática de uma ilhota de Langerhans e (B) da secreção de insulina por uma célula β pancreática. [Adaptado de Terese Winslow e Lydia Kibiuk, 2001 (http://www.teresewinslow.com)].

1.2. Transplante de pâncreas versus transplante de ilhotas pancreáticas

O transplante de pâncreas órgão total é uma terapia que começou a ser aplicada em pacientes com DM1 em 1966, sendo, a princípio, associado a altas taxas de morbidade e mortalidade (9). Desde então, esse procedimento passou por avanços consideráveis, permitindo que, atualmente, os grandes centros transplantadores consigam a manutenção da homeostase glicêmica a longo prazo, com cerca de 80% dos pacientes transplantados independentes de insulina exógena após um ano da cirurgia (10; 11). O transplante de pâncreas está associado a uma melhora na qualidade de vida (12) e até mesmo à reversão de algumas complicações tardias associadas ao DM1 (13). Apesar das vantagens que a terapia oferece, esta ainda é uma intervenção cirúrgica de grande porte, que requer imunossupressão, sendo indicada a um grupo seleto de pacientes, usualmente àqueles que passaram por um transplante renal e dependem de um bom funcionamento do pâncreas para o sucesso dos tratamentos.

O transplante de ilhotas pancreáticas é uma alternativa interessante ao transplante de pâncreas para pacientes com DM1 hiperlábil. Trata-se de um procedimento tecnicamente mais simples, que apresenta baixa morbidade pela simplicidade cirúrgica e pela eliminação de possíveis complicações associadas à presença das enzimas exócrinas, presentes no transplante de pâncreas órgão total. O fato de ser possível manter as ilhotas em cultura por curtos períodos oferece uma oportunidade ímpar de manipulação imunológica destas células, assim como o condicionamento do paciente, o que facilitaria a indução de tolerância. Por todas estas razões, o transplante de ilhotas é uma estratégia bastante promissora para a correção do DM1 em indivíduos jovens, que ainda não apresentam complicações secundárias (14; 15). Esse procedimento foi inicialmente realizado em 1972, quando Lacy e colaboradores infundiram ilhotas pancreáticas na veia porta de camundongos diabéticos, levando os animais à normoglicemia (16). Em 1990, foi publicado o primeiro transplante de ilhotas em um paciente diabético, que manteve a independência de insulina exógena por 1 mês (17). Devido à baixa qualidade e quantidade das ilhotas isoladas e aos protocolos de imunossupressão pouco efetivos, a aplicação dessa terapia foi bastante limitada na década de 90, não passando de 8% o número de pacientes livres de insulinoterapia, um ano após o transplante (18).

No ano 2000, o grupo de Edmonton anunciou um ensaio clínico no qual sete pacientes com DM1 receberam infusões de ilhotas isoladas a partir de doadores de órgãos, tendo atingido e mantido a independência de insulina exógena por um ano (19). O sucesso associado a este ensaio clínico deve-se às mudanças drásticas que foram realizadas nos protocolos de imunossupressão, na seleção dos pacientes e na qualidade e quantidade das ilhotas recém-isoladas e implantadas. A partir de então, centros de todo o mundo vêm unindo esforços para a melhoria dos protocolos utilizados pelo grupo de Edmonton. A taxa de independência de insulina exógena aumentou para 60%, um ano após o transplante, e dados obtidos pelos diferentes grupos mostram que, mesmo nos pacientes que retornaram à hiperglicemia, mas

possuem uma liberação residual de insulina, mantém-se a melhoria na qualidade de vida, com uma redução significativa no número de episódios hipoglicêmicos e uma potencial redução das complicações tardias do DM1 (20-23).

Apesar das estatísticas sobre o sucesso do transplante de ilhotas ainda diferirem daquelas observadas para o transplante de pâncreas, as publicações da última década mostram que o tratamento através da terapia celular está cada vez mais perto de se tornar uma opção igualmente eficaz (24). Entretanto, independente do tipo de transplante em questão (pâncreas ou ilhotas), os pacientes devem ser submetidos a um regime rigoroso de imunossupressão para permitir a sobrevivência do enxerto.

A imunossupressão está associada a uma série de efeitos colaterais indesejáveis, como náuseas, ulcerações orais, diarréias, constipações, fadiga, anemia, edemas, tumores, acne, feridas cutâneas, hipertensão, dislipidemia e neutropenia, deixando o paciente mais propenso às infecções oportunistas (25; 26). Até mesmo para os agentes imunossupressores mais modernos, utilizados no transplante de ilhotas atualmente, existem relatos de toxicidade e atuação negativa sobre o enxerto (27-31). Nesse contexto, a imunoproteção das ilhotas transplantadas na ausência de drogas imunossupressoras, através de seu encapsulamento, é vista como uma tecnologia extremamente promissora, que foi explorada no presente trabalho.

1.3. Microencapsulamento de ilhotas pancreáticas

A produção de microcápsulas semipermeáveis contendo proteínas ou células, para aplicação biológica, foi inicialmente sugerida na década de 60 (32), introduzindo o termo “bioencapsulamento”. Resumidamente, a membrana semipermeável, que envolve a célula microencapsulada e preserva sua integridade morfológica e funcional, deve ser um obstáculo físico que impeça a entrada de anticorpos e células do sistema imune, no entanto, deve ser permeável à insulina, nutrientes, eletrólitos, oxigênio e glicose (33-37) (**Figura 2A e B**). Cerca de vinte anos após este primeiro relato, essa técnica foi utilizada, com sucesso, no

encapsulamento e transplante de ilhotas pancreáticas em ratos diabéticos, que mantiveram taxas de glicemia normalizadas por várias semanas (38). Desde então, houve um progresso considerável no refinamento dessa tecnologia e uma aplicação crescente do bioencapsulamento em modelos experimentais de DM1, incluindo roedores e primatas não-humanos (39-43), e, até mesmo, em testes clínicos com seres humanos (44-46). O encapsulamento celular também vem sendo utilizado como ferramenta no tratamento experimental de doenças como hemofilia (47-50), câncer (51-54), falência renal (55-57) e deficiência hepática (58; 59).

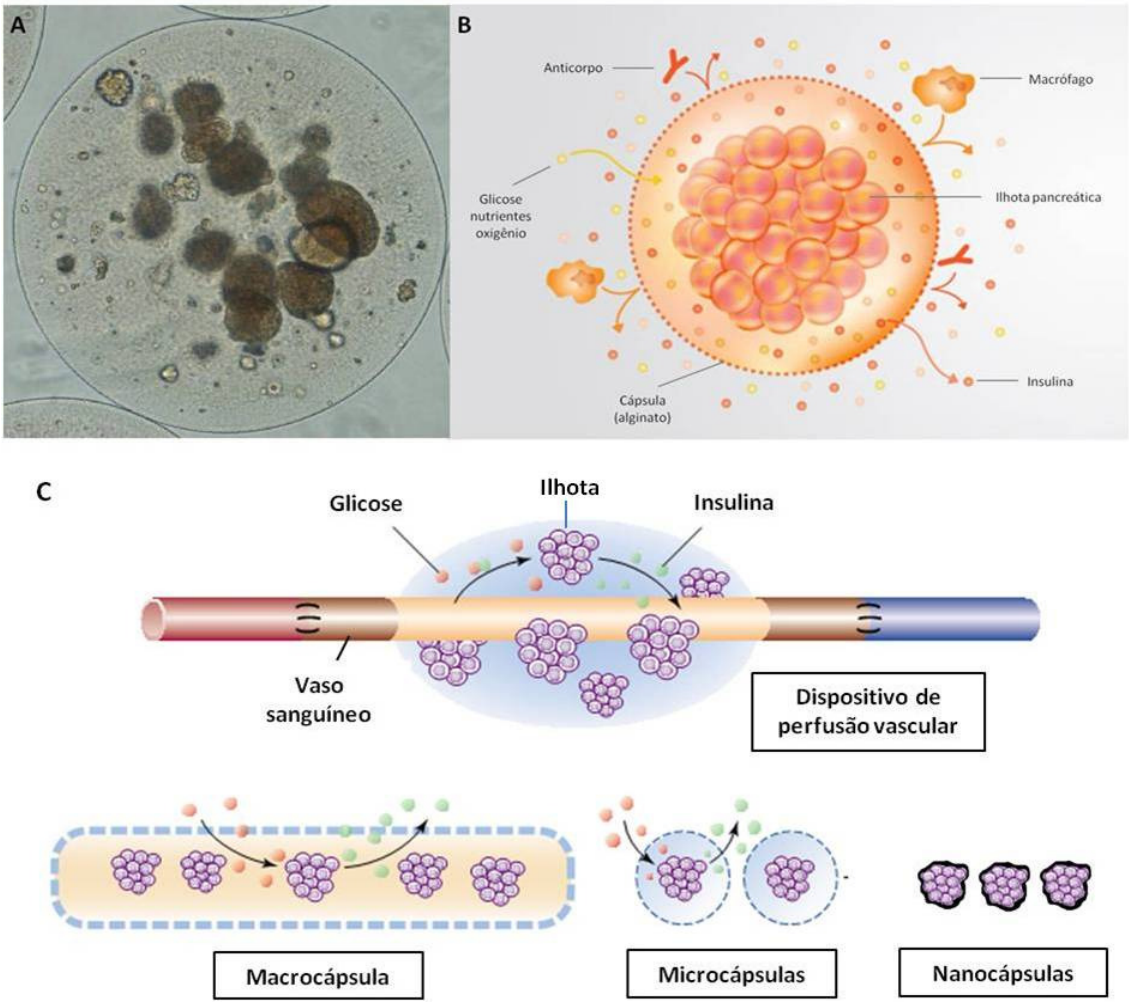


Figura 2: Encapsulamento de ilhotas: (A) Micrografia de uma microcápsula contendo ilhotas pancreáticas. (B) Desenho esquemático representando o funcionamento de uma microcápsula (adaptado de www.cellprotect.com.br). (C) Exemplos de diferentes dispositivos utilizados na imunoproteção de ilhotas [adaptado de De Vos *et al.*, 2002 (60)].

Uma variedade de membranas e matrizes já foi utilizada para se produzir estruturas imunoprotetoras com diversas geometrias e propriedades físico-químicas (61; 62), incluindo dispositivos de perfusão vascular, macrocápsulas, microcápsulas e cápsulas de recobrimento de superfície (nanocápsulas) (**Figura 2C**) (37; 63). A necessidade de cirurgia vascular, associada ao risco de trombose, limitou a utilização dos dispositivos de perfusão vascular (64). Embora existam exceções (65; 66), a aplicação clínica de macrocápsulas esbarra no transporte precário de oxigênio e nutrientes para as células encapsuladas (64). As técnicas de encapsulamento por recobrimento de superfície ainda são aplicadas por poucos grupos, mostrando-se, à princípio, um tanto problemáticas, já que estão associadas a um risco maior de resposta imune contra o enxerto, pois a distância entre as ilhotas e o meio externo é grandemente reduzida, permitindo um acesso mais fácil às células pelos elementos do sistema imune. Pouco a pouco, essa técnica vem ganhando mais espaço com o aprimoramento de seus protocolos (36). Entretanto, a vasta maioria dos experimentos de imunoproteção descritos utiliza-se das microcápsulas.

As microcápsulas possuem uma forma esférica e um tamanho que pode variar em torno de 200 a 1000 μm em diâmetro. A distância entre as células microencapsuladas e o meio externo permite uma maior capacidade de difusão, quando comparada à de macrocápsulas, assim como uma melhor estabilidade mecânica (35). O material mais utilizado na fabricação das microcápsulas, com o objetivo de imunoproteção celular, é o alginato de sódio, um componente da parede celular de algas marrons. Formado por cadeias de ácidos gulurônico (G) e manurônico (M), o alginato é capaz de se associar a certos cátions divalentes, como o Ba^{+2} e o Ca^{+2}, formando um hidrogel (67) (**Figura 3**).

O alginato apresenta diversas vantagens quando comparado aos outros materiais disponíveis (quitosana, agarose, poli-(HEMA-MMA), copolímeros de acrilonitrila, polietilenoglicol - PEG, etc). Em primeiro lugar, ele não interfere com a funcionalidade das

ilhotas (68-70), sendo um dos poucos materiais que pode se polimerizar e ser mantido em condições fisiológicas. Adicionalmente, alguns grupos demonstraram que ilhotas pancreáticas conseguem sobreviver melhor durante longos períodos de cultura, quando encapsuladas em malha de alginato (71; 72). Uma explicação plausível seria a de que a matriz tridimensional proveria um suporte para o crescimento das células da ilhota e preveniria a formação de grumos, observada em cultura comum, que afetam a oxigenação e captação de nutrientes. Finalmente, as microcápsulas de alginato se mostraram estáveis *in vivo*, em experimentos com animais e seres humanos (39-46).

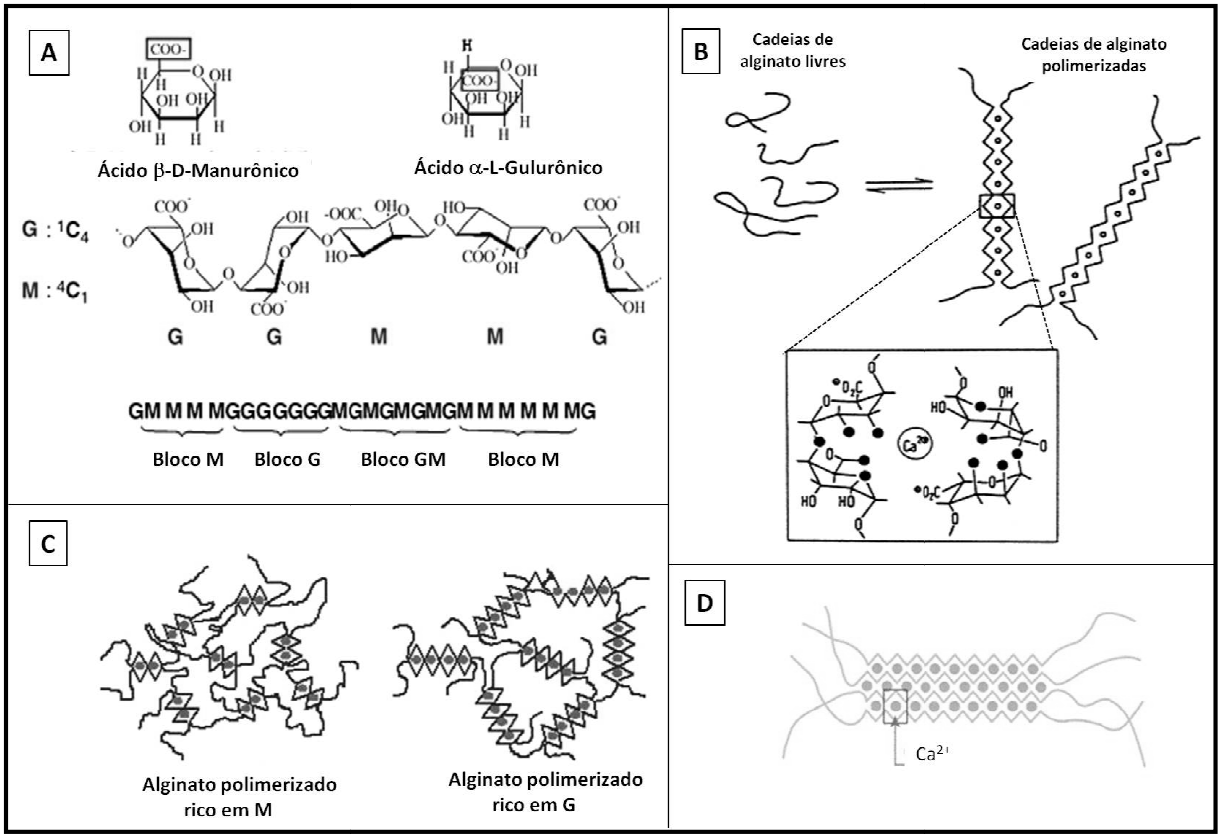


Figura 3: (A) Cadeia linear do alginato, formada por unidades de ácidos β-D-manurônico -M- e α-L-gulurônico -G-, (B) Polimerização das cadeias de alginato, na presença do cátion divalente Ca^{+2}, (C) redes de alginato polimerizado ricas em M e G, (D) polimerização do alginato após exposição prolongada ao íon Ca^{+2} [Adaptado de De Vos *et al.*, 2006 (67)].

1.4. Os desafios do transplante de ilhotas microencapsuladas

A terapia através do transplante de ilhotas pancreáticas microencapsuladas permitiria que os pacientes se vissem livres da terapia imunossupressora. Entretanto, essa estratégia

terapêutica ainda enfrenta uma série de problemas que impedem a sobrevivência e funcionalidade do enxerto. A inflamação resultante do transplante é crítica para a sobrevivência das ilhotas e pode ser mediada pelo biomaterial implantado, pelos procedimentos cirúrgicos necessários para o implante do enxerto ou, ainda, pela liberação de mediadores inflamatórios pelas células encapsuladas (67).

A resposta inflamatória associada aos biomateriais implantados é geralmente descrita como um processo bioquímico dinâmico (73-76), iniciado pela adsorção não-específica de proteínas à superfície do material, seguido pelo recrutamento de neutrófilos e macrófagos e uma subsequente adesão dessas células e também de fibroblastos sobre as microcápsulas (77), num processo descrito como crescimento pericapsular. A intensidade da resposta inflamatória é dependente do sítio de transplante e das propriedades do material, como carga de superfície, porosidade e grau de purificação (73). Por muitos anos, a baixa pureza dos materiais utilizados na imunoproteção celular foi considerada a principal causa de crescimento pericapsular e falha do enxerto (67).

O alginato não-purificado contém altos níveis de polifenóis, proteínas e endotoxinas (78). Polifenóis são conhecidos por sua toxicidade contra células e por poderem favorecer a despolimerização do alginato, enquanto as endotoxinas são potentes estimuladores do sistema imune. Sendo assim, a purificação do alginato é necessária antes deste material poder ser utilizado no microencapsulamento celular. Baseando-se nisto, cientistas do mundo todo focaram seus esforços na melhoria do alginato utilizado em testes pré-clínicos. Uma série de protocolos foram publicados (78-82) e, atualmente, é possível comprar alginatos ultrapuros, com níveis de endotoxina baixíssimos, ideais para testes *in vivo* (Nova Matrix, Drammen, Noruega). Ainda neste contexto, vários grupos passaram a produzir microcápsulas recobertas por uma camada externa de PEG (83; 84) ou de policátions, em particular polilisina (PLL) e poliornitina (PLO) (85-87). Apesar da controvérsia encontrada na literatura sobre o real

benefício dessas substâncias, o grupo liderado pelo Dr. Ricardo Calafiore descreveu excelentes resultados com PLO em microcápsulas, o que abriu oportunidades para a aplicação desta tecnologia em um ensaio clínico (45; 46). Além do foco na biocompatibilidade, a aplicação de múltiplas camadas provê mais resistência e estabilidade às cápsulas. Outros grupos apostaram na utilização de microcápsulas de alginato polimerizadas com Ba^{+2}, já que apresentam uma resistência maior do que as membranas com Ca^{+2}, mais comumente usadas, e, em geral, observou-se uma ótima biocompatibilidade nestes experimentos (88-93).

O procedimento cirúrgico para implante das microcápsulas, apesar de minimamente invasivo, induz uma resposta inflamatória associada ao processo de reconstituição tecidual e cicatrização (73). Em experimentos com animais que só receberam solução salina intraperitoneal (86) ou subcutânea (94), ocorre o recrutamento significativo de neutrófilos, a expressão das citocinas inflamatórias IL-1β e IL-6 e do fator de transcrição NF-κB. Não se sabe exatamente se somente a resposta à cirurgia é capaz de lesar as ilhotas implantadas, porém, como a inflamação é também desencadeada pelas células encapsuladas (67), esse processo não deve ser ignorado.

As ilhotas pancreáticas isoladas tendem a produzir uma variedade de moléculas pró-inflamatórias (95-100). Consequentemente, o transplante de ilhotas não-encapsuladas, na ausência de imunossupressão, está associada a uma grave resposta imune no período inicial pós-transplante. Portanto, não é de surpreender que mecanismos similares estejam presentes quando as ilhotas estão encapsuladas, mesmo não havendo contato célula-célula. Macrófagos co-cultivados com ilhotas pancreáticas microencapsuladas são ativados prontamente e passam a produzir uma série de moléculas inflamatórias, como IL-1β, IL-6, TNFα e MIP-2 (101; 102). No contexto de um transplante celular, a ativação imune causada tanto pelas células implantadas, quanto pelo procedimento cirúrgico e por possíveis fatores imunogênicos

presentes no biomaterial, poderiam levar à falência do enxerto, através de um círculo vicioso (67) (**Figura 4**).

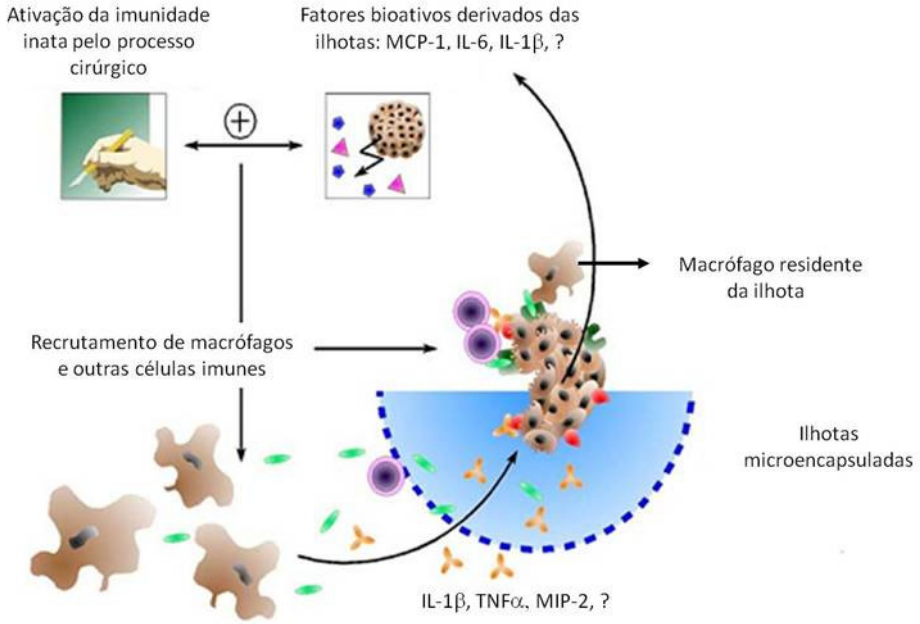


Figura 4: Círculo vicioso de ativação imune: Ilhotas liberam citocinas, que agem em conjunto com as citocinas induzidas pelo procedimento cirúrgico, no recrutamento e ativação de células inflamatórias da vizinhança do enxerto e residentes [adaptado de De Vos *et al.*, 2006 (67)].

1.5. Sítios de transplante e estratégias para aumentar a sobrevida do enxerto

Com o objetivo de se prevenir a morte das ilhotas pancreáticas transplantadas e permitir uma maior duração funcional do enxerto, várias estratégias são utilizadas. Nas seções anteriores, diversos fatores que afetam o sucesso das células implantadas foram apontados. Especificamente, a seleção do tipo de dispositivo utilizado (macrocápsulas, microcápsulas, etc), o biomaterial escolhido (alginato), a biocompatibilidade e estabilidade deste material, a ativação imune decorrente tanto da pureza das formulações de ilhotas encapsuladas, como da cirurgia e da produção de mediadores inflamatórios pelas células em si, são parâmetros importantes para a predição de uma terapia de sucesso. Associado a esses fatores, o sítio de implante desempenha um papel crítico na sobrevivência funcional das ilhotas.

Apesar do local clássico de transplante de ilhotas nuas (não-encapsuladas) ser a veia porta hepática, esse não é um local utilizado para transplantes de ilhotas microencapsuladas, visto que as microcápsulas possuem um tamanho inadequado, uma vez que podem causar embolia. Usualmente, ilhotas encapsuladas são implantadas no sítio intraperitoneal ou, numa escala menor, nos sítios subcutâneo e sob a cápsula renal (103). Em nosso laboratório, os implantes subcutâneos realizados levaram a uma maior agregação do enxerto devido a um crescimento pericapsular intenso (dados não publicados). O transplante de ilhotas microencapsuladas sob a cápsula renal não é possível em camundongos, pelo volume do enxerto. Portanto, em nossos experimentos, assim como da grande maioria dos grupos, o implante das ilhotas microencapsuladas foi realizado no sítio intraperitoneal.

Apesar de ser indicado para enxertos que ocupam um volume maior, o transplante no sítio intraperitoneal está associado a uma perda de ilhotas devido às condições de baixa de oxigênação (hipóxia) encontradas. Ilhotas encapsuladas sofrem de estresse hipóxico crônico e irreversível, já que o oxigênio chega às células implantadas apenas por difusão passiva (34). A hipóxia é mais crítica no centro das ilhotas, onde é comum encontrar-se um coro necrótico (104). Já foi demonstrado que ilhotas encapsuladas respondem à hipóxia com um aumento nos níveis de mRNA da quimiocina MCP-1/CCL2 (96). Apesar deste fator poder ser entendido como um sinal das células na promoção da angiogênese (105), no contexto do transplante, a atividade quimiotática de MCP-1/CCL2 pode contribuir amplamente para a falência do enxerto, por atrair macrófagos e ajudar a estabelecer o círculo vicioso de ativação imune (106). Estratégias para se eliminar ou reduzir o impacto da hipóxia no transplante de ilhotas são essenciais.

Outro fator importante, que atua diretamente na sobrevida de ilhotas isoladas, é a perda de interações com a matriz extracelular (MEC) (104). A interação entre integrinas e MEC afeta a adesão entre as células das ilhotas, assim como a proliferação, diferenciação e

secreção de insulina, isto é, está diretamente relacionada com a viabilidade e funcionalidade celular (107-109). De fato, a secreção de insulina estimulada por glicose é melhorada quando as ilhotas são cultivadas em superfícies tratadas com moléculas da MEC, como o colágeno tipo I ou IV, a laminina e a fibronectina (110-112). Essas descobertas abriram campo para ensaios que envolvam a incorporação de elementos de MEC em biomateriais utilizados para o microencapsulamento de ilhotas pancreáticas.

Baseados nessas premissas, os experimentos aqui descritos visam observar o efeito de substâncias classicamente associadas ao aumento de oxigenação ou de interações com a MEC sobre ilhotas microencapsuladas, com o objetivo de favorecer a viabilidade das células implantadas.

1.6. Propostas de novas formulações de biomateriais para o microencapsulamento de ilhotas

Para os ensaios realizados neste trabalho, utilizou-se, como material-base, a Biodritina, desenvolvida e patenteada pelos pesquisadores Marcos Mares-Guia e Camilo Ricordi, através da empresa BIOMM Inc. (113). A Biodritina é composta de alginato de sódio e sulfato de condroitina, numa formulação validada em diversos experimentos de estabilidade e biocompatibilidade, tendo sido aplicada, com sucesso, em ensaios *in vivo* de reversão do diabetes mellitus experimental em camundongos (114). Foi escolhido um alginato ultrapuro, com 60% de G, e os sulfatos de condroitina 4 e 6, com nível de pureza adequado para testes pré-clínicos. A adição do sulfato de condroitina oferece uma maior estabilidade mecânica às microcápsulas, sendo este um composto não-imunogênico presente na MEC.

A partir do biomaterial Biodritina, duas novas formulações foram desenvolvidas. A primeira se propõe a diminuir o impacto da hipóxia sobre as ilhotas imunoprotegidas, através da adição do perfluorocarbono (PFC), um composto já utilizado na oxigenação tecidual. A

segunda formulação é focada no estresse causado pela perda dos elementos da MEC e visa restabelecer as interações das ilhotas com a laminina (LN).

1.6.1. Perfluorocarbonos (PFCs)

Carreadores artificiais de oxigênio, como os PFCs, têm o potencial de melhorar o transporte deste gás, assim como sequestrar dióxido de carbono. PFCs são hidrocarbonetos nos quais a maioria ou todos os átomos de hidrogênio foram substituídos por átomos de flúor (**Figura 5**). Uma das vantagens únicas desses compostos é a capacidade de dissolver grandes volumes de gases respiratórios, que ocupam "cavidades moleculares" entre as moléculas de PFC, sem o envolvimento de reações químicas. Os PFCs têm sido aplicados em diversos sistemas biomédicos, como na criação de sangue artificial, no transporte de órgãos, na oxigenação sanguínea durante cirurgias, na indução de cicatrização de feridas, na forma de um agente de contraste em imageamento por ultrassom e, ainda, na oxigenação de meios de cultura de plantas, bactérias, fungos e células de inseto e mamífero. A utilização de PFCs é vantajosa, nesses sistemas, devido à sua disponibilidade comercial e por serem facilmente esterilizados, recuperados e reciclados, além de serem substâncias química e biologicamente inertes (115). A aplicação de PFCs em malhas de alginato já foi relatada por alguns grupos, estando, na maioria dos casos, associada a um benefício funcional para as células microencapsuladas (116-119). Entretanto, experimentos *in vivo* de transplante de ilhotas microencapsuladas, na presença de PFC, ainda não haviam sido descritos.

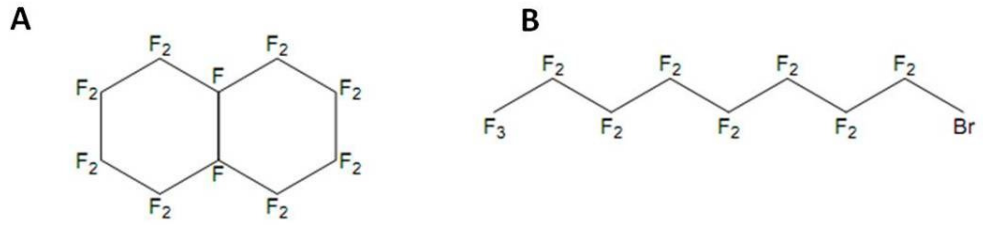


Figura 5: Estruturas químicas de (A) um PFC cíclico, perfluorodecaline, e (B) um PFC linear, perfluoro-octil bromido [adaptado de Lowe *et al.*, 1998 (115)].

1.6.2. Lamininas (LNs)

LNs são moléculas de adesão celular que compreendem uma família de glicoproteínas encontrada predominantemente em membranas basais. Essas moléculas se apresentam na forma de trímeros, consistindo de cadeias α, β e γ, estruturadas de maneira a dar origem a uma série de domínios globulares e cilíndricos (**Figura 6**). LNs interagem entre si, formando arranjos que permanecem em íntima associação com células, através da interação com receptores de superfície (120). LNs são vitais para uma miríade de processos fisiológicos, como o desenvolvimento inicial do embrião, organogênese, construção tecidual e regulação de funções celulares, tais como: adesão, migração, proliferação, diferenciação e morte celular programada (121; 122). Estas funções são mediadas, principalmente, por integrinas, proteínas de membrana celular que atuam como receptores para moléculas da MEC. Experimentos realizados em nosso laboratório demonstraram que a adição de LN ao meio de cultura de ilhotas humanas, contendo o hormônio prolactina, induziu uma maior secreção de insulina frente ao estímulo de glicose (123). Na literatura, podem ser encontrados vários relatos como esse, evidenciando o efeito benéfico da LN e elementos da MEC em culturas de ilhotas, linhagens de células β e pseudoilhotas, inclusive em experimentos *in vitro* de encapsulamento de células em hidrogéis (124-128). Contudo, experimentos envolvendo o microencapsulamento e transplante de ilhotas pancreáticas em biomaterial contendo LN, em animais dizbetizados, ainda não haviam sido descritos.

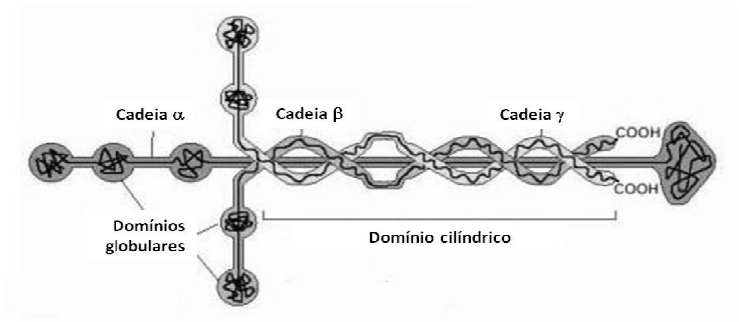


Figura 6: Modelo representativo da estrutura da laminina-111, evidenciando as cadeias α, β e γ e os domínios globulares e cilíndrico.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem, como objetivo geral, a avaliação *in vitro* e *in vivo* de novas formulações de biomateriais, visando o microencapsulamento e transplante de ilhotas pancreáticas para a reversão do diabetes induzido em animais.

2.2. Objetivos Específicos

1. Obter, a partir da Biodritina, biomateriais contendo PFC ou LN, adequados à produção de microcápsulas.
2. Avaliar a estabilidade das microcápsulas obtidas a partir de testes de resistência à temperatura, meio de cultura, rotação e estresse osmótico.
3. Analisar a biocompatibilidade das microcápsulas vazias através de ensaios *in vitro*, pela capacidade de ativação de macrófagos em cultura, e *in vivo*, por implante no sítio i.p. de camundongos.
4. Avaliar o efeito do microencapsulamento com as novas formulações sobre a expressão gênica, ao nível de mRNA e proteína, e a atividade enzimática de ilhotas pancreáticas em cultura, sob condições de normóxia e hipóxia.
5. Observar o resultado do transplante de ilhotas microencapsuladas com os diferentes biomateriais, em camundongos diabéticos, através do acompanhamento da massa corporal e glicemia e de testes orais de tolerância à glicose.
6. Analisar a eficácia do enxerto após a recuperação das ilhotas microencapsuladas transplantadas, através do monitoramento da glicemia dos animais.
7. Avaliar a biocompatibilidade das microcápsulas recuperadas e a atividade funcional das ilhotas em seu interior, através de análises microscópicas e teste de liberação de insulina, respectivamente.

3. Materiais e Métodos

3.1. Obtenção das formulações de biomateriais

O biomaterial Biodritina foi preparado através da mistura de 80% de alginato de cálcio ultrapurificado (PRONOVA UP LGV, Nova Matrix, FMC Biopolymer, Drammen, Noruega) e 20% de sulfato de condroitina (Kin Master, RS, Brasil). Em nossos experimentos, alginato e sulfato de condroitina foram diluídos em NaCl 0,15 M para uma concentração final de 1,2% e 0,325%, respectivamente, e essa solução foi utilizada, também, na preparação da formulação de LN-Biodritina.

Para a produção de PFC-Biodritina, uma solução-estoque de PFC e alginato de cálcio foi previamente preparada, a partir de uma mistura contendo 10% de Perfluorodecaline (Fluoromed APF-140HP, Texas, Estados Unidos) e 90% de uma solução de alginato 1,2% (UP LGV, Nova Matrix, FMC Biopolymer, Drammen, Noruega). Para que esta mistura fosse estável, foi necessário um passo adicional de emulsificação em um processador de fluidos (Microfluidics M-110S, MA, Estados Unidos), na presença dos surfactantes Pluronic F-68 NF Grade Prill Surfactant (1.5%) (BASF, Ludwigshafen, Alemanha) e F-127 NF Grade Prill Surfactant Polox (2%) (BASF, Ludwigshafen, Alemanha), sob pressão constante de 5000 PSI e temperatura em torno de 25° C. A solução final de PFC-Biodritina foi obtida através da mistura de 20% da solução-estoque de PFC-Alginato e 80% de Biodritina.

O biomaterial LN-Biodritina foi preparado através da adição de 10 μg/mL de Laminina 1 (Invitrogen, CA, Estados Unidos) à solução de Biodritina.

Uma solução de alginato comercial (Sigma, A-2033) foi utilizada em alguns experimentos e utilizou-se a concentração 1,2%, em NaCl 0,15 mol/L.

3.2. Indução química do diabetes mellitus em animais

Todos os procedimentos experimentais realizados com animais seguiram protocolos aprovados pela Comissão de Ética em Cuidados e Uso Animal (CECUA), do Instituto de Química da USP. Ratos Wistar e camundongos Balb/C foram mantidos no Biotério Geral do Instituto de Química e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, em gaiolas com livre acesso à comida e água, exceto durante o decorrer de alguns experimentos de curta-duração, nos quais era necessário um período de jejum alimentar, em ambiente com temperatura e luminosidade controladas. Camundongos Balb/C foram tornados diabéticos por injeção intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina (250 mg/Kg) (Sigma, St. Louis, Estados Unidos), a partir da sétima semana de vida, sendo monitorados através da checagem glicêmica, realizada por punção da veia caudal, e pesagem. A freqüência de monitoramento foi diária, na primeira semana, e semanal a partir daí. Os camundongos foram considerados diabéticos quando apresentavam três medidas sequenciais acima de 200 mg/dL. Animais diabetizados recebiam hidratação por injeção subcutânea de Ringer lactato (Laboratório Sanobiol, MG, Brasil), a cada sete dias.

3.3. Isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas de ratos

As ilhotas pancreáticas utilizadas em todos os experimentos foram isoladas de ratos Wistar machos, com massa corporal em torno de 250g. Para tal, os animais foram pré-anestesiados com uma injeção intramuscular de acepromazina (Univet/Vetnil) (2,5 mg/Kg) e, após 5 minutos, anestesiados com uma mistura de cetamina (75 mg/Kg) (Univet/Vetnil) e xilazina (10 mg/Kg) (Coopazine/Coopers). Após tricotomia abdominal e antissepsia com uma solução de povidona iodada (Riodeíne Tópico – Rioquímica), realizou-se uma laparotomia mediana ventral. O ducto pancreático foi identificado, clampeado próximo à sua comunicação com o duodeno e uma cânula foi inserida na sua porção adjacente ao fígado, para que fosse realizada a infusão de 10 mL de uma solução da enzima colagenase (Liberase RI, Roche) na

concentração de 0,17 mg/mL. Em seguida, o animal foi exsanguinado através do corte de vasos mesentéricos e o pâncreas foi cuidadosamente extraído, lavado em solução salina gelada e, após a remoção de linfonodos e excesso de gordura, cortado em pedaços menores e mantido no gelo até o momento da digestão enzimática.

Durante a digestão, os pâncreas foram mantidos em tubos, em banho-Maria, a 37º C, por 20 min. O material digerido foi passado através de uma peneira de 800 μm e lavado em meio RPMI-1640 (LGC Biotecnologia). Após uma breve centrifugação (1 minuto, 100g), o sedimento foi ressuspenso em 10 mL de Ficoll (F2637, Sigma Aldrich) com densidade de 1,110 g/cm^3 e três outras camadas de Ficoll (densidades 1,096, 1,069 e 1,037 g/cm^3) foram cuidadosamente adicionadas para que se formasse um gradiente descontínuo, capaz de induzir a separação das ilhotas do restante do tecido pancreático. Após centrifugação a 453g, por 15 minutos, as ilhotas purificadas podiam ser visualizadas entre as camadas de densidade 1,096 e 1,069 g/cm^3, sendo coletadas com uma pipeta Pasteur. As ilhotas purificadas foram lavadas e cultivadas em meio CMRL 1066 (Mediatech-Cellgro), suplementado com 100 unidades/mL de penicilina, incubadora de 5% de CO_2, a 37º C.

A contagem da quantidade de ilhotas obtidas por isolamento e a avaliação da pureza das mesmas foram realizadas através da coloração por ditizona (Sigma) e observação sob microscópio invertido (Nikon Corporation, Tokyo, Japão). A ditizona possui uma cor vermelha, sendo capaz de se ligar ao zinco, presente nos grânulos de insulina, corando, dessa forma, somente as células β (Figura 7). O número total de ilhotas pôde, então, ser obtido e seus tamanhos aferidos, com a ajuda de uma objetiva acoplada a uma grade de medidas.

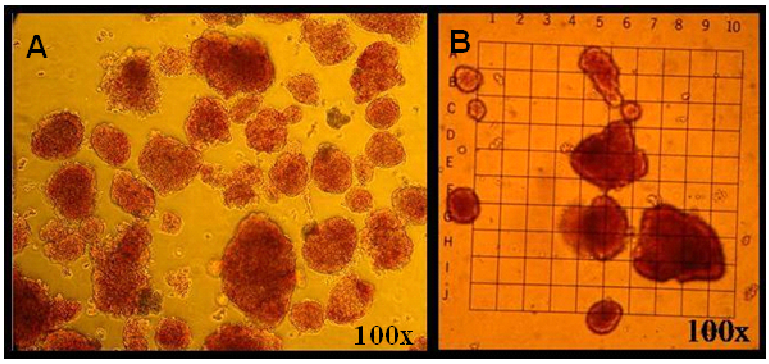


Figura 7: (A) e (B) Ilhotas pancreáticas de rato coradas com ditizona e visualizadas em microscópio invertido no aumento de 100x. Em (B), medida dos tamanhos das ilhotas: cada lado dos quadrados que compõem a grade possui 100 µm.

3.4. Avaliação da atividade funcional *in vitro* de ilhotas pancreáticas recém-isoladas

Ilhotas de rato obtidas a partir de três isolamentos distintos foram submetidas ao teste de secreção de insulina frente ao estímulo de glicose. Para a realização do ensaio, cerca de 1000 ilhotas foram divididas em três poços de uma placa de cultura, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de meio RPMI-1640 sem soro, contendo 2,8 mM de glicose. Após incubação de 1h, a 37º C, em estufa com atmosfera de 5% de CO_2, parte do sobrenadante foi retirado e armazenado a -20º C. Em seguida, o mesmo meio preparado com 20 mM de glicose foi adicionado ao volume existente, a fim de se obter uma concentração de 16,7 mM. Depois de mais 1h de incubação, a 37º C, o sobrenadante também foi guardado a -20º C para análise futura do conteúdo de insulina secretada pelas ilhotas.

A concentração de insulina das amostras foi obtida por radioimunoensaio (RIA), após centrifugação a 750g, por 20 min, a 4º C. Este método baseia-se na competição entre a insulina marcada com o radioisótopo ^{125}I (Amersham Biosciences, Inglaterra) e a insulina não-marcada (presente na amostra) por um anticorpo anti-insulina (1:200). Uma curva-padrão foi preparada utilizando-se concentrações conhecidas de insulina não-marcada (0,2; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0; e 8,0 ng/mL). A partir dos resultados da curva padrão, foi possível determinar a concentração de insulina presente nas amostras. O complexo antígeno-anticorpo foi

precipitado pela adsorção do hormônio ao polietilenoglicol (PM 6000), o sobrenadante foi descartado e a dosagem da radiação presente no precipitado foi realizada em um contador gama (Perkin Elmer, MA, Estados Unidos).

3.5. Cultivo da linhagem de macrófagos RAW264.7

A linhagem celular de macrófagos murinos, RAW264.7 (ATCC, *American Type Culture Collection*, TIB-71, Virginia, Estados Unidos) foi mantida em meio de cultura DMEM (LGC Biotecnologia) suplementado com glutamina 2 mM, HEPES (Sigma) 10 mM, piruvato 0,01 mM, 100 μg/mL de estreptomicina (Sigma), 25 μg/mL de ampicilina (USBCorporation, Cleveland, Ohio, EUA), e 10% SFB (Cultilab), à temperatura de 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2. O meio de cultura foi trocado a cada três dias e as culturas foram tripsinizadas, para subcultivo, quando atingiam uma densidade de aproximadamente 90% da densidade de saturação. Os estoques celulares foram mantidos em meio de cultura contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck) a -190°C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

3.6. Produção de microcápsulas e microencapsulamento de ilhotas pancreáticas

Microcápsulas foram obtidas através da extrusão das soluções de Biodritina, PFC-Biodritina e LN-Biodritina por uma agulha, com um fluxo de 19,9 mL/h controlado por uma bomba de seringa (SP 500 JMS do Brasil, Campinas, SP, Brasil). A aplicação de um fluxo de ar modulável (ar comprimido medicinal, Air Products Brasil LTDA) ao redor da agulha faz com que seja possível o controle do tamanho da gota liberada. Nos experimentos aqui descritos, utilizou-se um fluxo de 2,2 L/min. Após o desprendimento da agulha, as gotas caem em uma solução de gelificação (pH 7,2), composta de $BaCl_2$ (20mM) (Merck) e Hepes (20 mM) (Sigma), onde as microcápsulas são formadas pela interação entre o íon Ba^{+2} e as cadeias de alginato (Figura 8). Com o fluxo de ar especificado acima, a maior parte das microcápsulas apresentava diâmetros variando entre 700 e 1000 μm. Após o final desse

processo, as cápsulas permaneciam por mais 5 min na solução de gelificação, quando eram, então, lavadas com NaCl 0,15M. Finalmente, as microcápsulas eram aeradas com uma mistura de ar medicinal filtrada (21% O_2), passo necessário para a oxigenação da formulação contendo PFC.

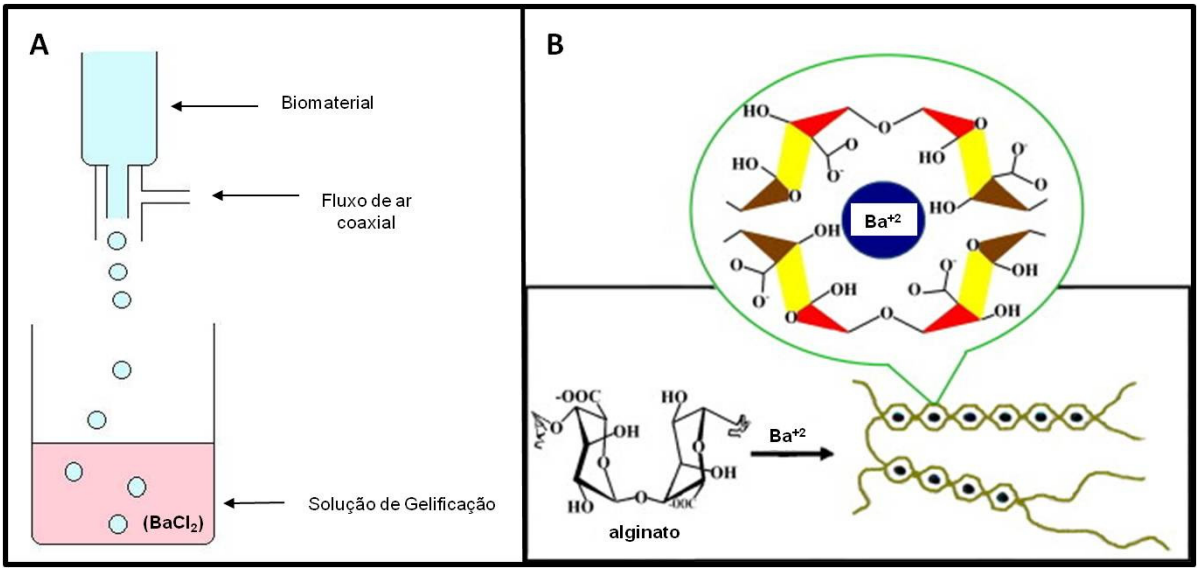


Figura 8: Esquema ilustrativo do processo de produção de microcápsulas. (A) Produção de microcápsulas através do gotejamento em solução contendo íons Ba^{+2}. (B) Interações entre o íon Ba^{+2} e as cadeias de alginato. [Adaptado de Li et al., 2012 (129)].

Para a produção de microcápsulas contendo ilhotas, a suspensão celular foi homogeneizada com as soluções de Biodritina, PFC-Biodritina ou LN-Biodritina testadas, utilizando-se a proporção de 8.000 ilhotas de rato por mL de biomaterial e os mesmos passos descritos acima.

3.7. Ensaios de estabilidade das microcápsulas

Foram realizados cinco testes de estabilidade com as microcápsulas produzidas a partir das formulações de Biodritina, PFC-Biodritina e LN-Biodritina, analisando-se, em todos eles, uma possível variação no diâmetro das cápsulas, assim como o número de estruturas rompidas. Da mesma maneira, antes de se iniciar os diferentes testes, 100 microcápsulas de cada formulação tiveram seu diâmetro determinado em um microscópio de contraste de fase,

utilizando-se essa informação como controle dos experimentos (Tempo 0). Ao final de cada período de tempo experimental, outras 100 cápsulas foram avaliadas.

O primeiro ensaio de estabilidade realizado foi chamado de Teste de "Temperatura". Para a avaliação da estabilidade térmica, 0,5 mL de microcápsulas foram colocadas em tubos de 1,5 mL, contendo uma solução de NaCl 0,15 M e mantidas em termociclador por 1 e 24h a 37º ou 40º C. O segundo ensaio foi denominado Teste de "Cultura", consistindo na manutenção de 0,5 mL de microcápsulas em placas de 6 poços, em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), em estufa com atmosfera de 5% de CO_2, por 30 dias, a 37º C. O terceiro teste foi o "Rotacional", no qual 0,5 mL de microcápsulas foram mantidas em tubos cônicos de 15 mL, em NaCl 0,15 M, sob rotação constante de 150 RPM por 30 dias, a 28º C. O quarto ensaio foi chamado de Teste "Misto", por ser uma mistura dos anteriores, num experimento onde 0,5 mL de microcápsulas, em tubos cônicos de 50 mL, foram desafiadas quanto à temperatura (37º C), rotação (150 RPM) e cultura (RPMI-1640), por até 30 dias. Por fim, 0,5 mL das diferentes cápsulas foram submetidas ao chamado Teste "Explosivo", onde foram incubadas com água destilada, em tubos cônicos de 50 mL, por 30 dias, à temperatura ambiente.

3.8. Ensaios de biocompatibilidade das microcápsulas

Com o objetivo de se avaliar a biocompatibilidade das formulações de biomateriais, dois testes foram propostos.

3.8.1. Avaliação da biocompatibilidade de cápsulas através da co-incubação com macrófagos

O primeiro ensaio de biocompatibilidade se baseou na capacidade de ativação da linhagem RAW264.7 de macrófagos pelas impurezas presentes em materiais. Cem microcápsulas de cada formulação de alginato ultrapuro (Biodritina, PFC-Biodritina e LN-Biodritina) e de um alginato comercial (Sigma, A-2033) foram co-incubadas com 10^6

macrófagos, em meio DMEM suplementado com 10% SFB, em estufa com atmosfera de 5% de CO_2, a 37º C, por até 24h, em triplicatas. Após 3, 9 e 24h de cultivo junto às cápsulas, os macrófagos foram recolhidos, lisados e submetidos a ensaios de RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) para determinar os níveis de expressão gênica das citocinas inflamatórias IL1β e TNFα, conforme detalhado abaixo. Macrófagos tratados com lipopolissacarídeo (LPS) (2 μg/mL) foram usados como controle positivo de ativação e macrófagos não-incubados com cápsulas, e não tratados, foram utilizados como controle negativo.

a. Extração de RNA total

O RNA total dos macrófagos foi obtido utilizando-se o método de extração por Fenol-Clorofórmio (Trizol, Invitrogen), através do seguinte protocolo: 300 μL do reagente Trizol foram adicionados às amostras de macrófagos. Em seguida, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio (Merck) e os microtubos foram agitados vigorosamente num vortex e deixados em repouso por 15 minutos a 4° C. Após centrifugação a 12.000g, por 15 minutos, a 4° C, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e um volume igual de isopropanol de alto grau de pureza (Merck) foi adicionado. As amostras foram deixadas a -20° C por meia hora e os microtubos foram novamente centrifugados a 12.000g, por 15 minutos, a 4° C, e os sobrenadantes foram descartados. Adicionou-se 1 mL de álcool 95% (Merck) e, após agitação em vortex, pôde-se perceber claramente a presença de um precipitado branco. Após uma nova centrifugação a 12.000g, por 15 minutos, a 4° C, o sobrenadante foi descartado e o microtubo foi emborcado em papel de filtro e, cerca de 1 minuto depois, foram adicionados 40 μL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore). A partir de 1 μL do RNA total, estimou-se a concentração através de leitura espectrofotométrica a 260/280 nm, no aparelho ND-1000 – NanoDropR (Wilmington, Delaware, EUA). As amostras foram, então, mantidas a -80° C até o momento de produção das fitas de cDNA.

b. Produção de fitas de cDNA

A partir de 1 µg de RNA total extraído das ilhotas encapsuladas, foram construídas fitas simples de cDNA por transcrição reversa, utilizando-se a enzima Super Script III (Invitrogen). Para tanto, cada amostra de RNA foi submetida a uma reação contendo 0,5 µL de Oligo dT (0,5 µg/µl) (Invitrogen), 0,5 µL de *random primers* (100 ng/µL) (Invitrogen) e 1µL de dNTPs (10 mM) (Invitrogen) para um volume final de 12 µL. As amostras foram incubadas a 75° C, por 10 minutos, para desnaturação das moléculas e, em seguida, foram adicionados 2 µL do tampão de síntese da primeira fita, 2 µL de DTT (0,1 mol/L) (Invitrogen), 0,5 µL de RNase OUT (40 U/µL) (Invitrogen), 1 µL da enzima Super Script III (Invitrogen) e 2,5 µL de água ultrapura para um volume final de 20 µL. A reação foi incubada por 10 minutos, a 25° C, e, em seguida, por 2h a 50° C e 10 minutos a 72° C. Para degradar o RNA, adicionou-se 1 µL de RNase H (5 U/µL) em cada reação, seguida de uma nova incubação a 37°C, por 30 minutos, e 72°C, por 10 minutos, para a inativação da enzima em questão.

c. *Primers* utilizados e teste de eficiência

Os *primers* utilizados nas reações de PCR quantitativo (qPCR), a partir do cDNA produzido, foram construídos utilizando-se o software Primer Express, versão 3.0 (Applied Biosystems, CA, Estados Unidos) e suas sequências estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1: Sequências de *primers* utilizados nos ensaios de co-incubação de microcápsulas e macrófagos RAW264.7

Gene	Sequência *Forward*	Sequência *Reverse*
IL-1β	5'-AGTTGACGGACCCCAAAAGA-3'	5'-GGACAGCCCAGGTCAAAGG-3'
TNFα	5'-CCACGCTCTTCTGTCTACTGAACTT-3'	5'-TGAGAGGGAGGCCATTTGG-3'
Hprt	5´GCTGAAGATTTGGAAAGGTGT 3´	5´ACAGAGGGCCACAATGTGAT 3´

Para o cálculo da eficiência dos *primers*, foram realizadas reações de amplificação contendo *primers* na concentração de 600 nM e, como molde, uma mistura de cDNAs diluídos em série (1:30, 1:60, 1:120, 1:240, 1:480). A análise da regressão linear dos valores de Cts em função do logaritmo da respectiva diluição fornece o coeficiente angular da reta (a, em y=ax+b), que é utilizado para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos *primers*, utilizando-se a fórmula: $Ef = 10^{-(1/coeficiente\ angular)}$

d. Ensaio de qRT-PCR

A partir do cDNA dos macrófagos, realizou-se o ensaio de qRT-PCR para avaliar a expressão dos genes de interesse IL-1β, TNFα e do gene endógeno HPRT, utilizado como controle. Para a quantificação do produto formado durante as reações de qRT-PCR foi utilizado o reagente SYBR Green Dye (Applied Biosystems). Todas as reações de qRT-PCR foram montadas com 3 µL do cDNA sintetizado anteriormente, diluído 30 vezes em tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0), 3 µL do conjunto de *primers* (*Forward* e *Reverse*) e 6 µL do reagente SYBR Green Dye. Os experimentos de qRT-PCR foram realizados no aparelho de Real-Time PCR 7300 da *Applied Biosystems*, seguindo os passos: 1 ciclo de desnaturação inicial de 10 minutos a 95° C e 40 ciclos de amplificação (30 segundos de desnaturação a 95° C e 1 minuto de anelamento e extensão a 60° C).

O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados gerados durante a amplificação foram realizados pelo programa computacional GeneAmp 5700 (Applied Biosystems). Na análise inicial dos dados, estabeleceu-se um valor arbitrário de corte na fase exponencial da amplificação do gene. Assim, foi possível obter o *threshold cycle* (Ct) da amostra, que nada mais é que o número de ciclos necessários para que tal amostra atinja o valor de corte. A especificidade do sinal foi confirmada através da análise das curvas de dissociação do produto amplificado. A partir daí, calculou-se a diferença entre a média dos Cts da amostra de referência (macrófago não-incubado) e das amostras estudadas (macrófagos

incubados com cápsulas de Biodritina, PFC-Biodritina e LN-Biodritina). Essa diferença é chamada de ΔCp e foi obtida tanto para a expressão dos genes-alvos quanto do gene endógeno de referência *hprt*. Esse valor é aplicado à fórmula seguinte (Pfaffl, 2001), que leva em consideração a eficiência apresentada pelos *primers*, para que a razão obtida seja a mais próxima possível da variação real da expressão gênica:

3.8.2. Avaliação da biocompatibilidade de cápsulas após o implante em animais

No segundo ensaio de biocompatibilidade, 200 microcápsulas de cada formulação foram implantadas no sítio intraperitoneal de camundongos Balb/C imunocompetentes, com aproximadamente 8 semanas de vida. Para isto, os animais foram anestesiados com o anestésico inalatório isofluorano (Isoforine, Cristália). Através de uma pequena incisão ventral (<0,5 cm), as microcápsulas de Biodritina, PFC-Biodritina e LN-Biodritina foram inseridas, com a ajuda de um cateter Jelco de calibre 14G. O peritônio e a pele foram suturados com os fios cirúrgicos CATGUT 5.0 e Nylon 6.0, respectivamente. Os animais receberam, ainda, uma injeção subcutânea de acepromazina 0,2% (Acepran, UNIVET), sendo mantidos em uma gaiola aquecida e observados até que já estivessem se movimentando e se alimentando normalmente. As microcápsulas foram recuperadas 7 e 30 dias pós-implante, após os animais serem anestesiados com cetamina e xilazina (como descrito anteriormente) e terem sido submetidos a um lavado peritoneal, com solução de NaCl 0,15 M aquecida a 37º C. Os camundongos foram sacrificados, ao final do procedimento, por "overdose" dos mesmos anestésicos.

A análise de cápsulas escolhidas ao acaso foi comparativa em relação a uma observação pré-implante de 100 microcápsulas. A porcentagem das microcápsulas recuperadas foi obtida e as mesmas foram lavadas com NaCl 0,15 M e observadas ao microscópio de contraste de fase. Além da avaliação dos diâmetros de, pelo menos, 50

cápsulas escolhidas aleatoriamente, a presença de células aderidas à superfície das cápsulas (crescimento pericapsular) foi quantificada de acordo com a classificação da Tabela 2.

Tabela 2: Classificação do crescimento pericapsular encontrado em microcápsulas recuperadas de camundongos Balb/C imunocompetentes

Crescimento pericapsular			
Inexistente (cápsulas limpas)	Moderado (< 25% da área afetada)	Grave (25 a 75% da área afetada)	Extremo (>75% da área afetada)

3.9. Ensaios de cultivo de ilhotas microencapsuladas em condições de normóxia e hipóxia

Para avaliar se as novas formulações de biomateriais, PFC-Biodritina e LN-Biodritina, seriam capazes de modular a expressão gênica e proteica de ilhotas pancreáticas microencapsuladas, um ensaio *in vitro* foi proposto. Como existe uma perda proeminente de ilhotas nos primeiros dias pós-isolamento, optou-se por observar o efeito da adição de PFC ou LN à Biodritina, num experimento de cultura de ilhotas encapsuladas por 48h. Cerca de 2.000 ilhotas microencapsuladas, por condição, foram mantidas a 37º C em meio CMRL 1066 com 10% SFB, em estufa com atmosfera de 5% de CO_2. Em ensaios paralelos, para testar o efeito da oxigenação conferida pelo PFC, ilhotas encapsuladas nas formulações PFC-Biodritina e Biodritina (controle) foram mantidas no mesmo meio de cultura, por 48h, em atmosfera de hipóxia (cerca de 1% de O_2), a 37º C.

Para a realização do ensaio em hipóxia, utilizou-se um aparato que impedia a troca de gases entre a atmosfera da câmara interna e do meio externo (Figura 9). As garrafas de cultura com ilhotas microencapsuladas eram mantidas numa mistura de gases contendo 1% de O_2, 5% de CO_2 e 94% de N_2. A concentração de O_2 era monitorada 3 vezes ao dia com a ajuda de um oxímetro (Modelo DG-400, Instrutherm, São Paulo, Brasil) e, se necessário, a mistura de gases era novamente infundida na câmara.

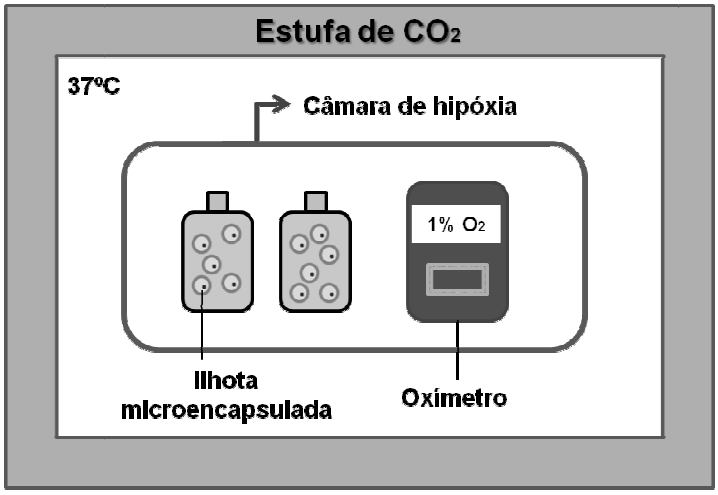


Figura 9: Representação esquemática da câmara de hipóxia utilizada nos experimentos de cultura de ilhotas microencapsuladas em atmosfera de 1% de O_2.

3.9.1. Análise da expressão gênica

Ao final das 48h de cultura, as ilhotas encapsuladas dos ensaios de normóxia e hipóxia foram recolhidas, submetidas à extração de RNA total, seguida da produção de fitas de cDNA e ensaios de qRT-PCR, como descrito anteriormente. Entretanto, os *primers* utilizados (Tabela 3) foram escolhidos para que se pudesse analisar fatores relacionados à apoptose, estresse celular e função das ilhotas. O gene de expressão constitutiva *hprt* foi utilizado como controle endógeno nesses experimentos.

Tabela 3: Sequência de *primers* utilizados nos ensaios de normóxia e hipóxia

Genes	Sequência *Forward*	Sequência *Reverse*
bad	5´-CAGGCAGCCAATAACAGTCA-3'	5´-TCCCTTCATCTTCCTCAGTCC-3'
bax	5´-CAAGAAGCTGAGCGAGTGTC-3'	5´-GAAGTTGCCGTCTGCAAACA-3'
caspase 3	5´-TGGACAGCAGTTACAAAATGGA-3'	5´-GCGAGCTGACATTCCAGTG-3'
bcl-2	5´-ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA-3'	5´-ACAGTTCCACAAAGGCATCC-3'
bcl-xL	5´-CAGACCCAGTGAGTGAGCAG-3'	5´-CCGGTTGCTCTGAGACATTT-3'
xiap	5´-GGCCAGACTATGCCCATTTA-3'	5´-CCACCACAACAAAAGCATTG-3'
hsp70	5´-TTGACAAGAGCATGGCAGTC-3'	5´-AGTTGCCCACTGGATTAACG-3'
mcp-1	5´-AGTGTCCCAAAGAAGCTGTGATC-3'	5´-TGTCCAGGTGGTCCATGGA-3'

ldh	5'-CACATGCCCAACAATGACTC-3'	5'- TAATGGCGGCTCTCACTTCT-3'
insulina I	5´-CCCTAAGTGACCAGCTACAATCATAG-3'	5´-TTTGACAAAAGCCTGGGCAGGCTT-3'
insulina II	5´-CTAAGTGACCAGCTACAGTCGGAA-3'	5´-GGCTCCCAGAGGATGAGCAG-3'
hprt	5´-GCTGAAGATTTGGAAAGGTGT-3'	5´-ACAGAGGGCCACAATGTGAT-3'

3.9.2. Análise de expressão proteica e ensaio de atividade de Caspase 3

A partir dos resultados de modulação da expressão gênica, obtidos pelos ensaios de qRT-PCR, alguns genes associados à apoptose foram escolhidos para testes de *Western Blotting*, visando observar se uma modulação proteica desses fatores ocorria nesse período experimental. Para tal, o cultivo de ilhotas microencapsuladas, mantidas em atmosfera de normóxia e hipóxia, foi repetido.

Após 48h de cultura, as ilhotas pancreáticas foram transferidas para microtubos contendo solução de lise contendo inibidores de protease e de fosfatase (10 mM TRIS pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1% NP-40; 0,1% SDS; 1% desoxicolato; 1 mM Na_3VO_4 ; 25 mM de NaF , *phosphatase inhibitor mix* (Sigma-Aldrich) e *protease inhibitor mix* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), a 4° C e quebradas mecanicamente. As amostras foram, então, centrifugadas a 20.000g por 30 minutos. O sobrenadante, que corresponde ao extrato proteico, foi quantificado pelo método de Bradford (kit Bio Rad, Richmond, CA, Estados Unidos), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) para a curva-padrão, nas concentrações de 2,5 a 10μg/mL. As amostras foram aliquotadas e mantidas no freezer a -80° C até o momento da realização dos ensaios de *Western Blotting*.

Para os experimentos de *Western Blotting*, 100 μg de cada extrato proteico foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). A malha de poliacrilamida variou entre 8 e 12%, dependendo da massa molecular da

proteína que se pretendia analisar, utilizando-se uma tensão de 90 V durante os primeiros 30 minutos e 110 V durante as 2h subsequentes. O padrão proteico utilizado compreendia proteínas de massas moleculares de 5,7 a 170,8 kDa (Bench Mark, Invitrogen). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amershan-Hybond-P PVDF Membrane, GE Healthcare) por transferência úmida, em tampão de transferência (0,3% de Tris p/v, Glicina 1,44% p/v, SDS 0,1% v/v e metanol 20% v/v), sob 300 mA, a 4°C por 2 horas. As membranas foram bloqueadas incubando-as em solução de bloqueio (PBS contendo 5% de leite desnatado em pó ou BSA + 0,1% de Tween 20), a 4°C durante 18h. Após este período, as membranas foram lavadas com PBS contendo 0,1% de Tween 20, por 10 min (3 vezes), e incubadas *overnight* sob agitação, em geladeira, com anticorpo primário para as proteínas de interesse (Bcl-2, Bcl-XL, Bax e Xiap) (Cell Signaling, MA, Estados Unidos). Como controle, as membranas foram incubadas com um anticorpo monoclonal que reconhece a proteína de expressão constitutiva GAPDH (Santa Cruz, Estados Unidos), em solução de PBS + 0,1% Tween 20, na concentração de 1:200. Após esse período de incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes, por 10 minutos cada, com PBS + 0,1% de Tween 20 e, então, incubadas por 1h à temperatura ambiente, com anticorpo secundário apropriado, conjugado à peroxidase (Vector Laboratories, USA). Em seguida, as membranas foram lavadas por 10 minutos (2 vezes) com PBS + 0,1% de Tween 20 e por 10 minutos com PBS e reveladas com o sistema quimioluminescente (kit ECL Plus, GE Healthcare). Entre dois experimentos de Western Blot que utilizaram a mesma membrana de nitrocelulose, foi feita uma fase de remoção dos anticorpos numa solução de *stripping* (SDS 2%; 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 100 mM β-mercaptoetanol), a 60° C, por 30 min. A membrana era lavada por 15 min em PBS, re-incubada com solução de bloqueio para sítios inespecíficos, e, então, incubada com o novo anticorpo primário. Após a revelação, a intensidade das bandas obtidas foi analisada por densitometria utilizando-se o programa ImageQuant (GE LifeSciences) e a expressão

diferencial foi analisada, através da diferença entre os valores das densitometrias dos anticorpos primários específicos e os valores de GAPDH dos mesmos extratos proteicos. Finalmente, os valores de amostras provenientes de ilhotas microencapsuladas nas novas formulações contendo PFC e LN foram comparados ao valor encontrado para Biodritina.

A partir do extrato proteico já quantificado, realizou-se, ainda, a mensuração da atividade de Caspase 3, com o kit Caspase-3 Fluorimetric Assay (BioVision, CA, Estados Unidos), seguindo as especificações do fabricante. Os valores são expressos em relação à Biodritina.

3.10. Ensaios de reversão do Diabetes Mellitus por ilhotas microencapsuladas e acompanhamento da eficácia do enxerto

Nestes experimentos, 750 ilhotas microencapsuladas em Biodritina, PFC-Biodritina ou LN-Biodritina foram infundidas na cavidade peritoneal de camundongos Balb/C imunocompetentes diabetizados, utilizando-se o mesmo protocolo para o implante de cápsulas vazias, descrito no item **3.8.2**. Após o procedimento cirúrgico, a massa corporal e a glicemia foram monitoradas diariamente, na primeira semana, e semanalmente desde então. Os dados foram sempre obtidos na parte da manhã, sem jejum prévio. Durante todo o período que os animais mativeram os implantes, uma solução de Ringer-lactato foi administrada no sítio subcutâneo a cada sete dias. Animais diabetizados, que receberam somente cápsulas de Biodritina vazias (SHAM), e não diabetizados, formaram os grupos controle. Um grupo de animais diabéticos recebeu ilhotas não-encapsuladas para se evidenciar a eficiência do processo de microencapsulamento. Todos os grupos foram monitorados por cerca de 200 dias, quando o enxerto foi retirado. Em alguns casos, camundongos atingiram o óbito antes do fim do período experimental. Os animais eram considerados parte do experimento quando

mantinham a normoglicemia pós-implante por pelo menos 30 dias. Indivíduos que voltaram à hiperglicemia antes do primeiro mês pós-transplante foram retirados do ensaio e sacrificados em câmara de CO_2.

Com o objetivo de se avaliar a função das ilhotas implantadas *in vivo*, foi realizado o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) aos 60 e 100 dias pós-transplante. Para tanto, os camundongos foram mantidos em jejum nas 6 horas anteriores ao teste. Após este período, tiveram sua glicemia monitorada por punção da veia caudal e receberam, por gavagem, uma solução glicosada na dose 6g/Kg. Os animais tiveram suas glicemias mensuradas nos tempos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose. Um grupo de animais não diabetizados serviu como controle do experimento. A maior parte dos dados obtidos é de camundongos normoglicêmicos. Entretanto, aos 100 dias após o transplante, alguns animais se apresentavam hiperglicêmicos, sendo analisados como grupos separados, de acordo com o tipo de microcápsula que receberam.

Para se confirmar a eficiência das ilhotas implantadas na manutenção da normoglicemia nos camundongos, o enxerto foi removido de alguns animais, os mesmos foram mantidos vivos e sua glicemia foi monitorada nos dias subsequentes. A recuperação das microcápsulas foi realizada por lavado peritoneal, como descrito no item **3.8.2.**, entretanto, optou-se pela anestesia inalatória com isofluorano. Exceto para um animal que recebeu ilhotas microencapsuladas com Biodritina e passou pela cirurgia de remoção do enxerto 35 dias pós-transplante, todos os demais indivíduos tiveram as microcápsulas com ilhotas recuperadas após 200 dias.

3.11. Análise das microcápsulas e das ilhotas pancreáticas recuperadas de animais transplantados

As microcápsulas recuperadas, tanto de animais normoglicêmicos quanto hiperglicêmicos, foram analisadas de acordo com o inchaço e crescimento pericapsular apresentados. Após serem lavadas em NaCl 0,15M, as cápsulas foram observadas sob microscópio óptico. Os diâmetros de pelo menos 50 microcápsulas foram determinados e comparados com valores pré-implante. O crescimento pericapsular foi avaliado como "<50%", quando ocupava menos da metade da área da cápsula, ou ">50%", quando as cápsulas apresentavam mais células aderidas.

A função das ilhotas microencapsuladas explantadas foi avaliada *in vitro*, através de um teste estático de secreção de insulina estimulada por glicose, como detalhado no tópico **3.4.**

4. Resultados

4.1. Formulações de microcápsulas

Microcápsulas de Biodritina, PFC-Biodritina e LN-Biodritina foram produzidas conforme especificado nos Materiais e Métodos. As diferentes formulações de biomateriais levaram à confecção de cápsulas similares em diâmetro e morfologia, como observado por microscopia óptica (Figura 10), apesar das microcápsulas de PFC-Biodritina apresentarem uma coloração mais opaca, proveniente dos surfactantes utilizados em sua produção.

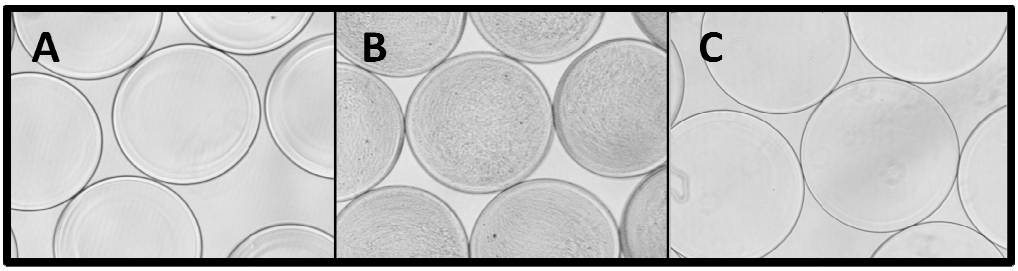


Figura 10: Diferentes formulações de microcápsulas utilizadas neste trabalho – (A) Biodritina, (B) PFC-Biodritina e (C) LN-Biodritina

4.2. Avaliação da estabilidade mecânica e térmica das microcápsulas

Com o intuito de se avaliar se as duas novas formulações de microcápsulas apresentavam uma estabilidade desejável e compatível com aquela observada para Biodritina (114), alguns testes *in vitro* foram propostos. Em ensaios onde as microcápsulas foram incubadas sob diferentes temperaturas (37 ou 40°C), em meio de cultura (RPMI + SFB 5%), sob rotação (150 RPM) ou, ainda, sob a interferência de todos estes fatores (teste "misto"), por períodos de tempo pré-determinados, todas as microcápsulas se mantiveram estáveis, apresentando um diâmetro igual ao inicial (Figura 11 – A, B, C e D). Entretanto, quando as diferentes microcápsulas foram submetidas ao estresse osmótico, ao serem incubadas em água destilada, no teste denominado "explosivo", houve um aumento significativo para todos os grupos, após os 15 minutos iniciais, o que se manteve após 30 dias (Figura 11 – E).

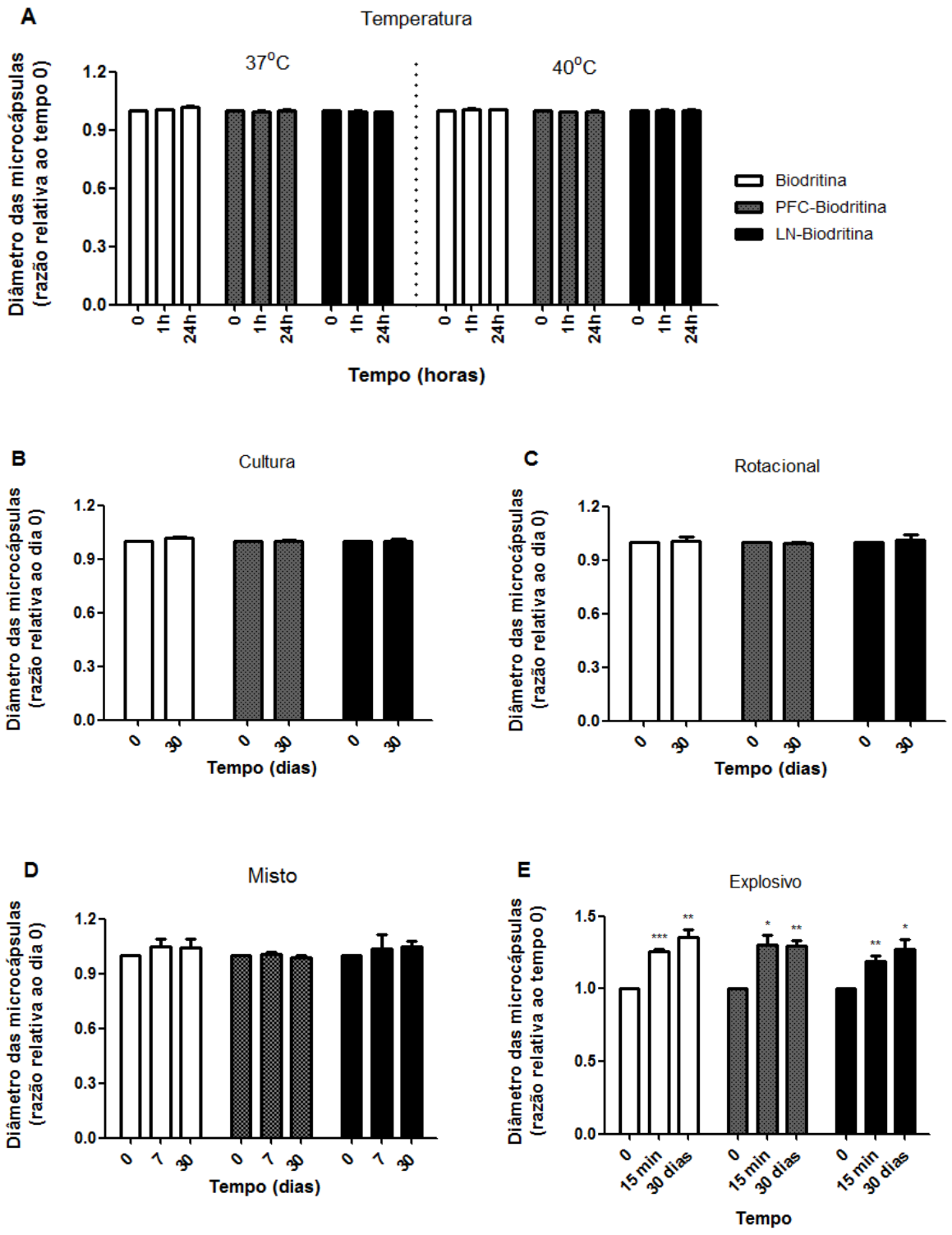


Figura 11: Variação do diâmetro das diferentes microcápsulas submetidas aos seguintes testes (A) Temperatura – incubação de microcápsulas em NaCl a 37 ou 40°C, por por até 24h; (B) Cultura – microcápsulas mantidas em meio de cultura RPMI + 5% SFB, a 37°C, por 30 dias; (C) Rotacional – Microcápsulas em NaCl sob rotação (150 RPM), a 28°C, por 30 dias; (D) Misto – Microcápsulas incubadas em meio RPMI + 5% SFB, a 37°C, sob rotação (150 RPM), por até 30 dias; e (E) Explosivo – microcápsulas mantidas em água destilada por até 30 dias. Os resultados representam triplicatas experimentais ± EPM. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 referentes à medida inicial dos diâmetros (tempo 0).

Para os três grupos, o inchaço das microcápsulas foi similar, entretanto, não foi observado um número relevante de cápsulas rompidas.

4.3. Avaliação da biocompatibilidade das microcápsulas

As diferentes formulações de microcápsulas foram avaliadas quanto à sua biocompatibilidade através de duas estratégias experimentais distintas. O primeiro teste utilizado foi baseado na coincubação de microcápsulas com macrófagos da linhagem RAW264.7 (Figura 12).

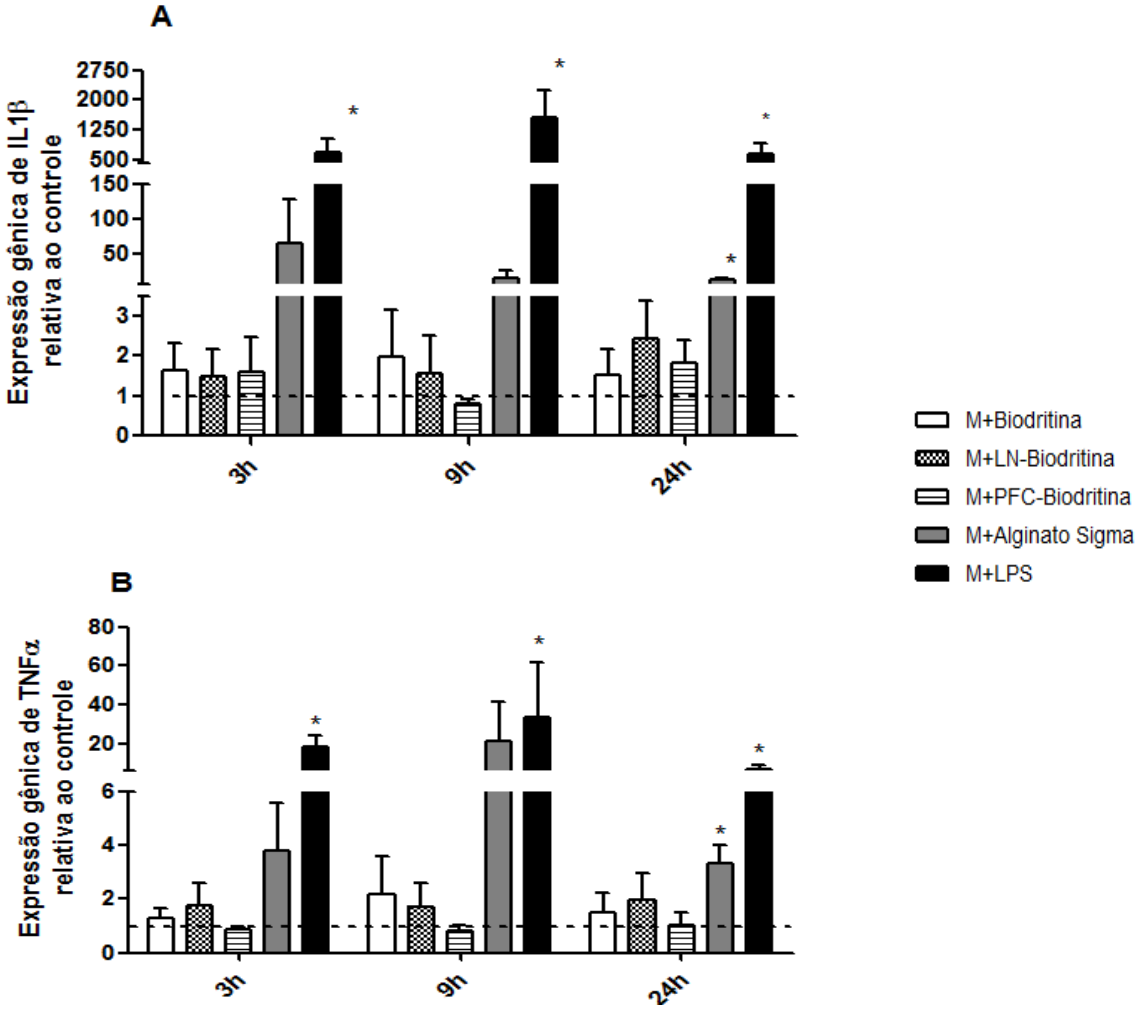


Figura 12: Expressão gênica de (A) *IL1β* e (B) *TNFα* em cultura de macrófagos RAW264.7 (M), co-incubados com microcápsulas de Biodritina, PFC-Biodritina, LN-Biodritina e alginato comercial (SIGMA) por 3, 9 e 24h. LPS foi utilizado como controle positivo. Os dados estão normalizados com relação a macrófagos em cultura não co-incubados com nenhum dos biomateriais utilizados (controle, indicado pela linha tracejada). *Hprt* foi o gene de expressão constitutiva utilizado como referência. Os resultados representam triplicatas experimentais ± EPM. *p<0,05 referente ao controle.

Após períodos de 3, 9 e 24 horas, o RNA total dos macrófagos foi extraído, fitas de cDNA foram obtidas e ensaios de qRT-PCR conduzidos com o intuito de se observar níveis de mRNA das citocinas inflamatórias IL1β e TNFα, indicadoras da ativação dessas células. LPS foi utilizado como controle positivo. Macrófagos em cultura, não incubados com microcápsulas, foram utilizados como controle negativo. Um alginato comercial (SIGMA), que não passa pelo mesmo processo de ultrapurificação do alginato comumente utilizado em nossos experimentos, foi testado. Nenhuma das três formulações de microcápsulas utilizadas estimulou a produção de mRNA de IL1β ou TNFα, nos períodos de tempo de cultura observados. Entretanto, o alginato comercial da SIGMA estimulou a expressão gênica de ambas as citocinas após 24h de cultura.

No segundo teste, após serem implantadas na região intra-peritoneal de camundongos Balb/C, as microcápsulas de Biodritina, PFC-Biodritina e LN-Biodritina foram resgatadas através de lavado peritoneal, 7 e 30 dias pós-implante. O primeiro parâmetro avaliado foi a recuperação das microcápsulas (Figura 13), não havendo diferenças estatísticamente significativas entre a quantidade média (cerca de 85%) obtida para cada grupo.

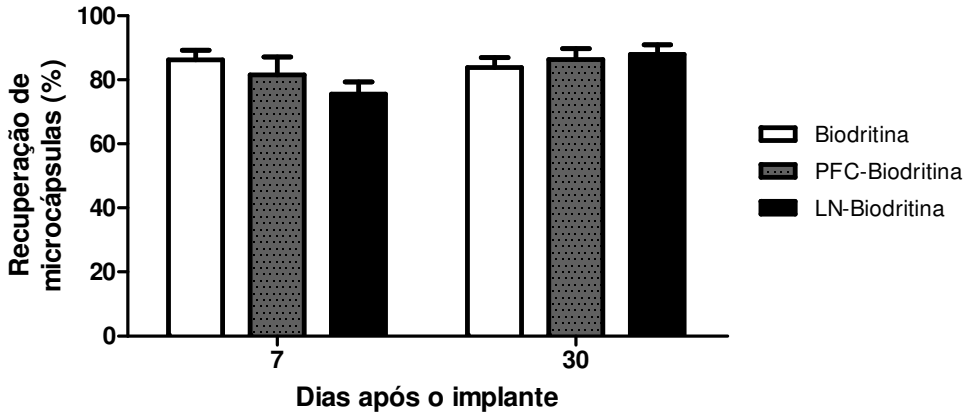


Figura 13: Porcentagem de recuperação das microcápsulas, através de lavado peritoneal, 7 e 30 dias após o implante. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os resultados representam triplicatas experimentais ± EPM.

Em seguida, através de microscopia óptica, analisou-se a abrangência do crescimento pericapsular encontrado (Figura 14).

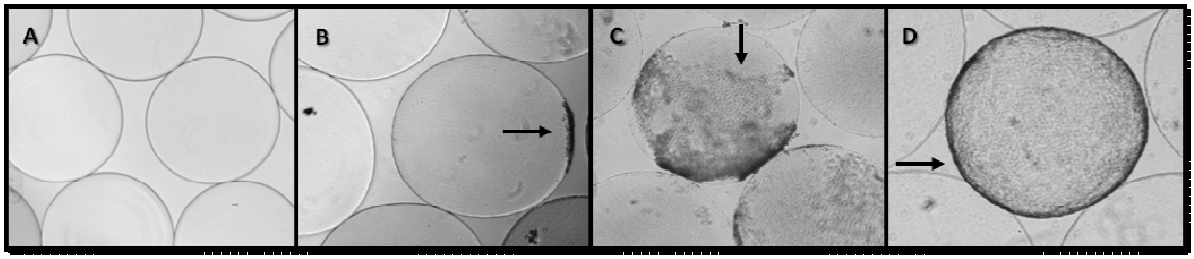


Figura 14: Exemplos de microcápsulas recuperadas para o experimento de biocompatibilidade – (A) limpas, (B) crescimento pericapsular moderado, (C) crescimento pericapsular grave, (D) crescimento pericapsular extremo. As setas indicam locais afetados.

Cerca de 70% das microcápsulas analisadas foram consideradas livres de células aderidas em sua superfície (Figuras 14A e 15A) e em torno de 25 a 30% apresentavam um crescimento pericapsular "moderado", ocupando menos de 25% de sua área (Figuras 14B e 15B). Somente cerca de 5% de todas as microcápsulas analisadas apresentavam um crescimento pericapsular "grave" (entre 25 e 75% da área) (Figura 14C) ou "extremo" (Figura 14D), no qual mais de 75% da área foi atingida.

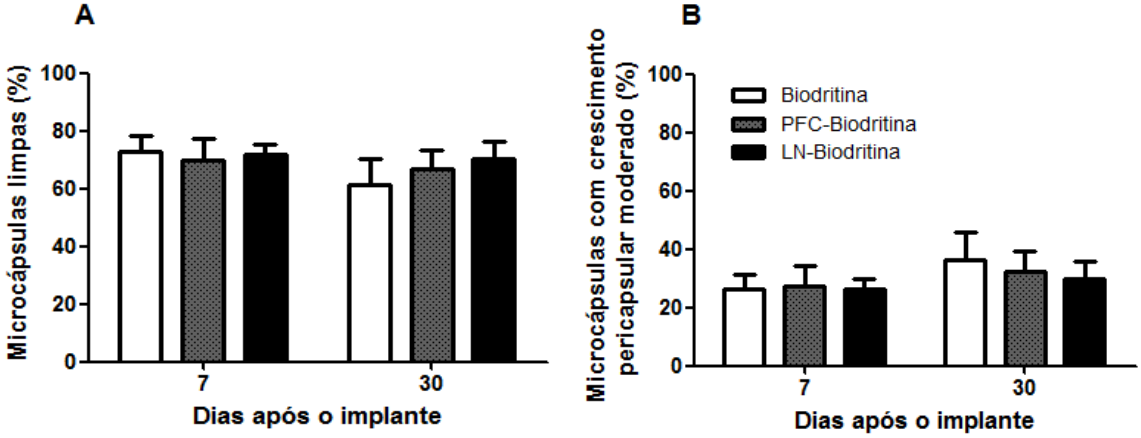


Figura 15: Porcentagem de microcápsulas recuperadas limpas (A) ou apresentando crescimento pericapsular moderado (B), 7 e 30 dias após o implante. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os resultados representam triplicatas experimentais ± EPM

Finalmente, realizou-se a medida dos diâmetros das cápsulas recuperadas e constatou-se que houve um aumento significativo observado para os três grupos, já aos 7 dias pós-implante, que se manteve após 30 dias (Figura 16). O inchaço das microcápsulas representa

um aumento de cerca de 50% no diâmetro das mesmas, não havendo diferença entre os biomateriais testados.

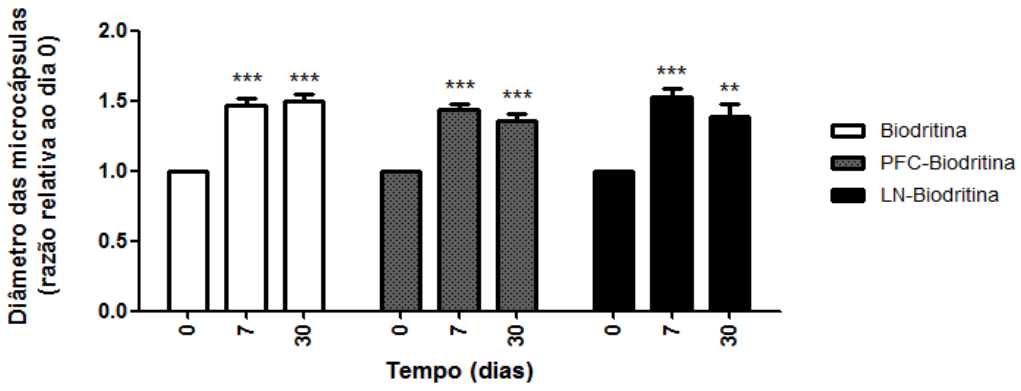


Figura 16: Aumento no diâmetro das microcápsulas recuperadas, 7 e 30 dias após o implante. As três formulações testadas demonstraram resultados similares. Não houve diferença significativa entre os três grupos testados. Os resultados representam triplicatas experimentais ± EPM. **p<0,01, ***p<0,001 referentes à medida inicial dos diâmetros (tempo 0).

4.4. Ensaio *in vitro* de funcionalidade de ilhotas pancreáticas isoladas

Antes de iniciar os experimentos com ilhotas, a função dessas células foi avaliada em experimentos de liberação de insulina frente ao estímulo de glicose. Cerca de 1.000 ilhotas de rato, recém-isoladas, foram incubadas por 1h, em meio RPMI-1640 sem soro, inicialmente em baixa concentração de glicose (2,8 mM) e, logo em seguida, em alta (16,7 mM). A dosagem da insulina liberada no meio de cultura foi feita pelo ensaio de RIA, conforme descrito em Materiais e Métodos, item **3.3.** Foram realizados três experimentos independentes, com preparações de ilhotas não microencapsuladas. Os resultados, apresentados como índice de liberação de insulina (Figura 17), mostram um aumento de, no mínimo, 2x na secreção desse hormônio na presença de uma alta concentração de glicose.

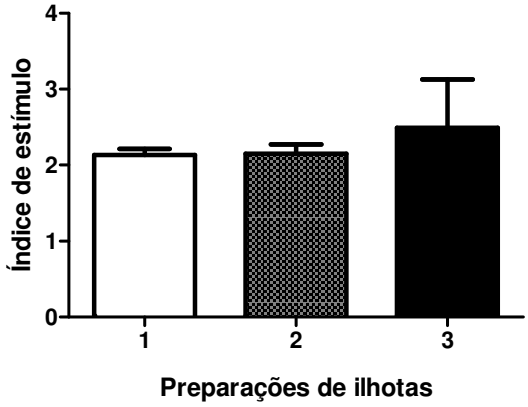


Figura 17: Índice de estímulo de secreção de insulina por ilhotas nuas recém-isoladas após incubação com baixa (2,8 mM) e alta (16,7 mM) concentração de glicose. Cada barra representa a média da triplicata de um experimento independente ± EPM.

4.5. Expressão gênica, ao nível de RNA e proteínas, de ilhotas microencapsuladas e cultivadas em condições de normóxia e hipóxia

Após a avaliação da estabilidade e biocompatibilidade das novas formulações de microcápsulas, experimentos *in vitro* com ilhotas pancreáticas microencapsuladas (Figura 18) foram propostos, com o objetivo de se analisar uma possível modulação da expressão diferencial de genes e proteínas associados à apoptose, estresse e função celular.

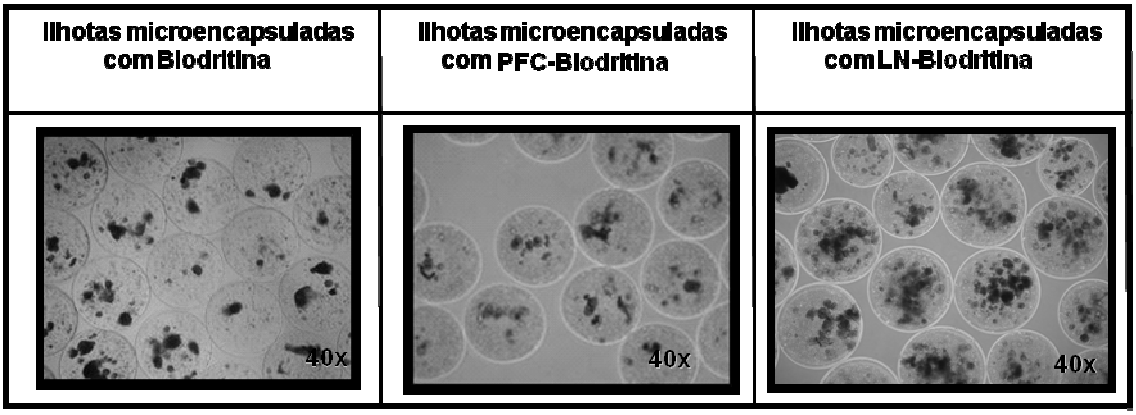


Figura 18: Ilhotas microencapsuladas com diferentes formulações, observadas sob microscópio óptico no aumento de 40x

Os resultados descritos abaixo referem-se a ilhotas pancreáticas encapsuladas mantidas em cultura em condições de normóxia (21% O_2) e hipóxia (1% O_2) nas primeiras 48

horas pós-isolamento destas células. Ensaios de qRT-PCR foram realizados com amostras de ilhotas microencapsuladas com Biodritina, PFC-Biodritina e LN-Biodritina. A expressão de genes relacionados à apoptose (pró-apoptóticos *bad*, *bax* e *caspase3* / antiapoptóticos *bcl2*, *bcl-XL* e *xiap*), estresse (*hsp70*, *mcp1*/*ccl2* e lactato desidrogenase - *ldh*) e função das ilhotas (*insulina I* e *II*) foi analisada (Figura 19).

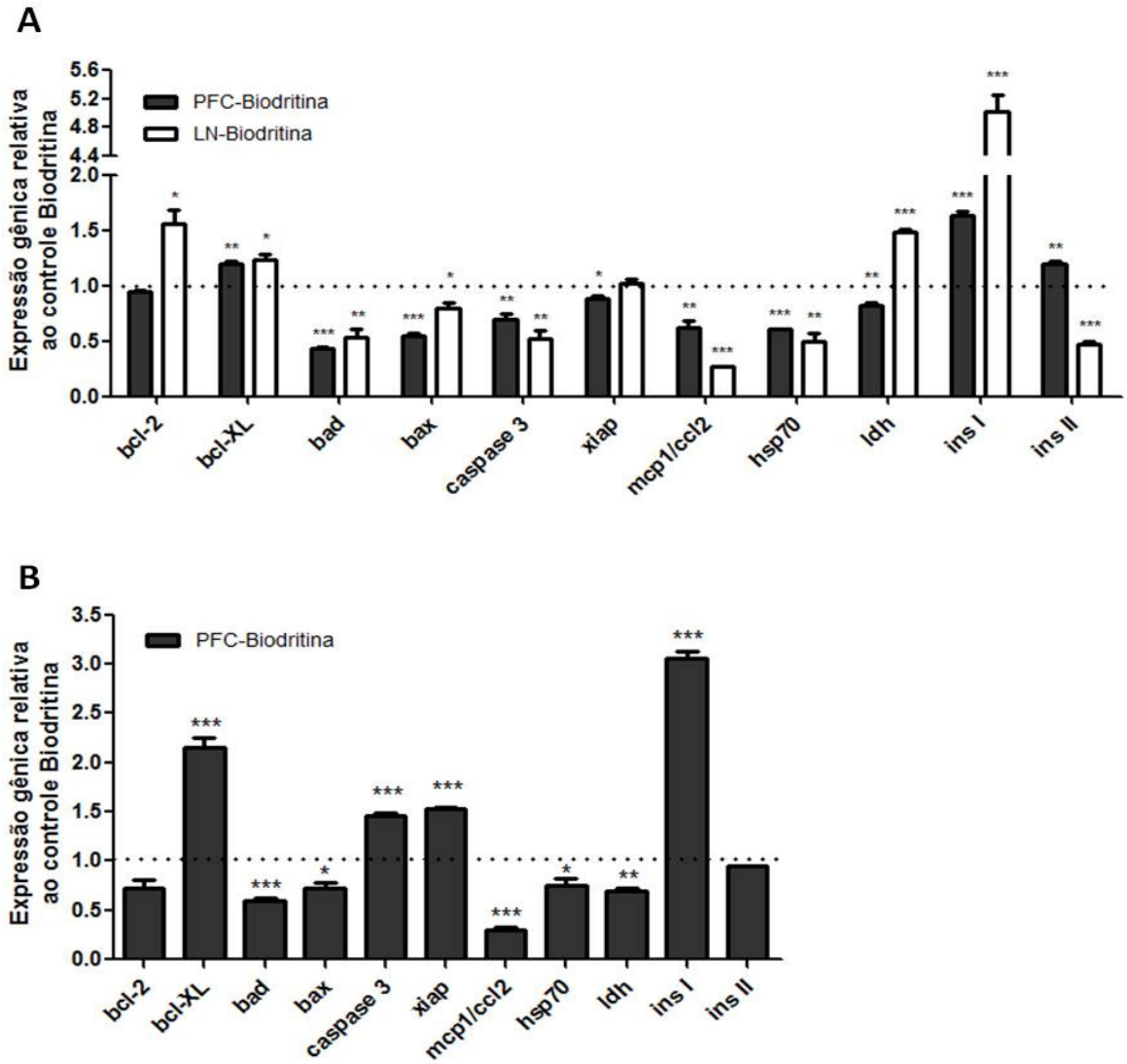


Figura 19: Expressão de genes relacionados à apoptose, estresse e função celular em amostras de ilhotas pancreáticas microencapsuladas com diferentes formulações de biomaterial e mantidas em cultura em (A) normóxia ou (B) hipóxia por 48 horas. Os resultados representam triplicatas experimentais ± EPM. A expressão gênica foi normalizada em relação ao controle Biodritina (linha tracejada). *Hprt* foi o gene de expressão constitutiva utilizado como referência. *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

De maneira geral, na condição de normóxia (Figura 19A), na qual as novas formulações PFC-Biodritina e LN-Biodritina foram testadas frente à Biodritina, pode-se

observar um aumento na expressão de genes antiapoptóticos e de insulinas I e II, assim como uma diminuição na expressão de genes pró-apoptóticos e relacionados a estresse. As duas exceções que fogem a esse padrão são *ldh* e *insulina II*, em ilhotas microencapsuladas com LN-Biodritina.

Já na condição de hipóxia, somente a nova formulação contendo PFC foi comparada à Biodritina, pois a mesma está associada a um aumento na oxigenação das microcápsulas. A Figura 19B mostra resultados similares ao encontrado no ensaio de normóxia, exceto para os níveis de mRNA de *caspase3* e *xiap*, que antagonizam o resultado previamente obtido.

A partir da análise dos resultados de qRT-PCR, três proteínas associadas ao processo de apoptose foram selecionadas para ensaios de Western Blotting: Bax, Bcl-XL e Xiap. Nos ensaios realizados em condição de normóxia, somente ilhotas microencapsuladas com LN-Biodritina foram eficientes na modulação proteica diferencial, induzindo um aumento nos níveis das proteínas antiapoptóticas Bcl-XL e Xiap (Figura 20A).

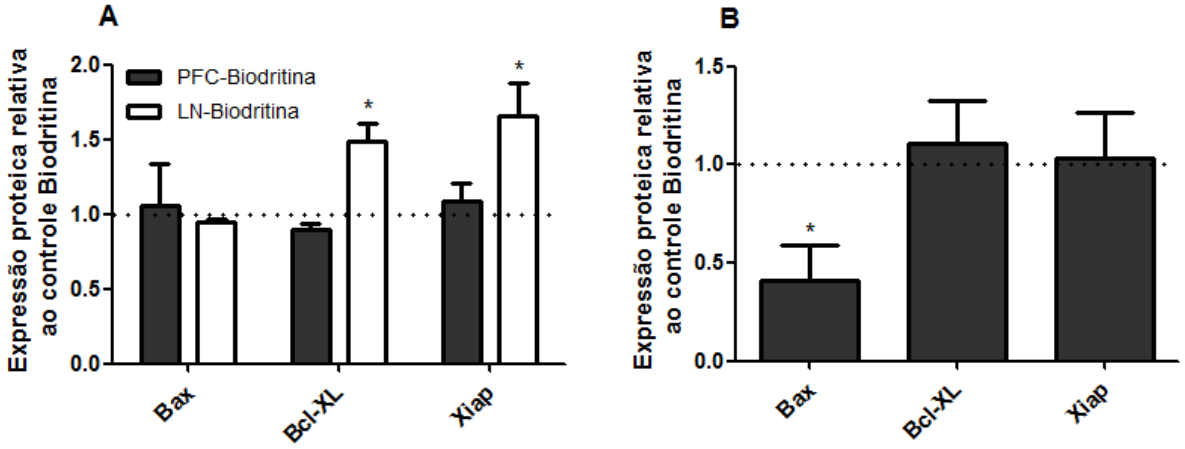


Figura 20: Expressão de proteínas relacionadas ao processo de apoptose em amostras de ilhotas pancreáticas microencapsuladas com diferentes formulações de biomaterial e mantidas em cultura em (A) normóxia ou (B) hipóxia por 48 horas. Os resultados representam triplicatas experimentais ± EPM. A expressão gênica foi normalizada em relação ao controle Biodritina (linha tracejada). GAPDH foi a proteína de expressão constitutiva utilizada como referência. *p<0,05

Em contrapartida, ilhotas encapsuladas com PFC-Biodritina, nos ensaios de hipóxia, apresentaram níveis reduzidos da proteína pró-apoptótica Bax (Figura 20B).

Além disto, a atividade de Caspase 3 foi mensurada, por um ensaio colorimétrico, a partir de uma alíquota das mesmas amostras de extrato proteico de ilhotas microencapsuladas, utilizadas nos ensaios de Western Blotting. A Figura 21 mostra que não houve diferença significativa na atividade de Caspase 3 entre os três grupos testados, tanto nos ensaios de normóxia (Figura 21A) quanto nos de hipóxia (Figura 21B).

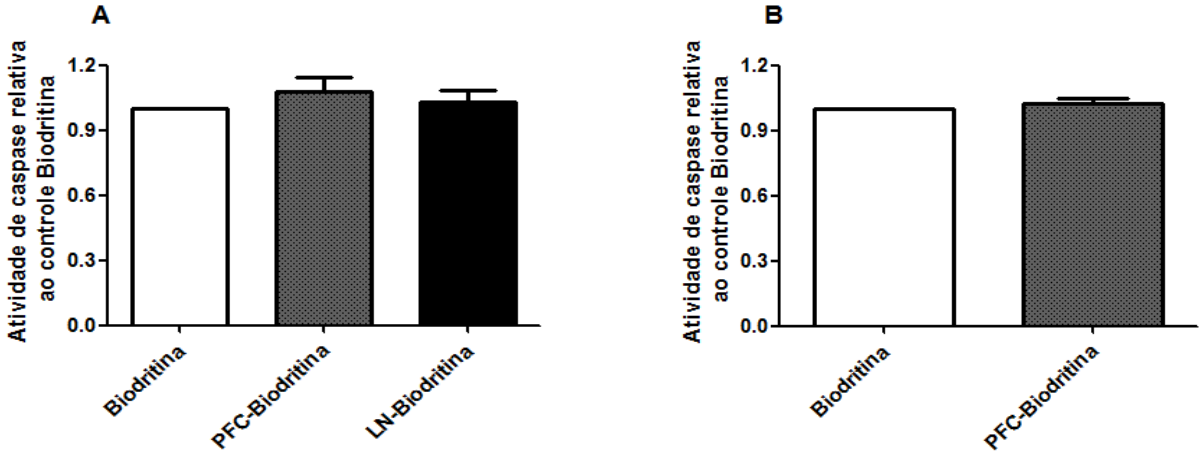


Figura 21: Mensuração da atividade de Caspase 3 em amostras de ilhotas pancreáticas microencapsuladas com diferentes formulações de biomaterial e mantidas em cultura em (A) normóxia ou (B) hipóxia por 48 horas. Os resultados representam triplicatas experimentais ± EPM. Os valores de atividade enzimática foram normalizados em relação ao controle Biodritina.

4.6. Reversão do Diabetes Mellitus em camundongos através do transplante de ilhotas pancreáticas microencapsuladas

Com o objetivo de se estabelecer se as novas formulações de microcápsulas, PFC-Biodritina e LN-Biodritina, oferecem maiores benefícios às ilhotas pancreáticas transplantadas, quando comparadas ao biomaterial-base Biodritina, ensaios de reversão do diabetes mellitus foram realizados. Para tal, camundongos Balb/C diabetizados quimicamente foram transplantados com 750 ilhotas microencapsuladas em cada um dos biomateriais de interesse. O grupo de animais diabetizados SHAM recebeu somente cápsulas vazias de Biodritina e foi utilizado como controle negativo. Um grupo de animais recebeu ilhotas não encapsuladas (ilhotas nuas) e foi mantido para que se evidenciasse a eficiência da utilização

do microencapsulamento na proteção do enxerto. Por fim, camundongos não diabetizados foram mantidos para comparação com os demais grupos tratados.

O acompanhamento dos camundongos envolveu tanto a avaliação de sua massa corpórea quanto de sua glicemia. Os animais que receberam ilhotas microencapsuladas conseguiram manter um ganho de peso similar ao do grupo não-diabetizado (Figura 22). Já os animais transplantados com ilhotas nuas apresentaram um ganho de massa corporal equivalente ao grupo SHAM, a partir do dia 20 pós-transplante, e se mantiveram assim até serem sacrificados ou atingirem o óbito. Durante todo o período experimental, não houve diferença de peso entre os animais que receberam os três biomateriais testados.

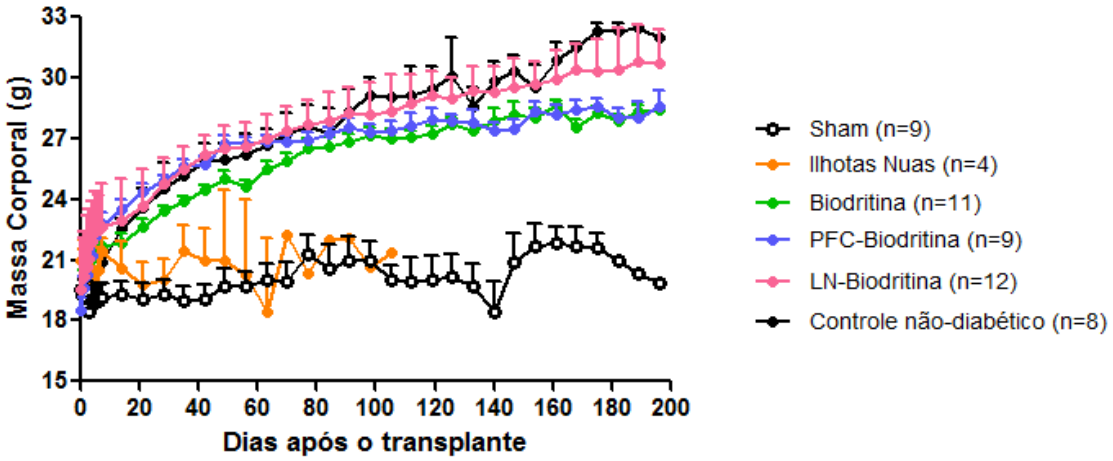


Figura 22: Acompanhamento de ganho de massa corporal em camundongos Balb/C transplantados com ilhotas nuas ou microencapsuladas em Biodritina, PFC-Biodritina e LN-Biodritina, por até 200 dias pós-transplante. O grupo SHAM recebeu cápsulas de Biodritina vazias. Animais não diabetizados foram usados como controles. Cada ponto representa a média do número de animais testados ± EPM.

As análises dos níveis glicêmicos (Figura 23A) mostraram que todos os grupos que receberam transplante de ilhotas pancreáticas microencapsuladas atingiram a normoglicemia nos dias subsequentes à cirurgia, independente do tipo de biomaterial envolvido. Já o grupo transplantado com ilhotas nuas não apresentou variação significativa em seus níveis glicêmicos, mantendo-se similar ao controle SHAM por todo o período experimental. No gráfico da Figura 23A, as diferenças entre os animais que receberam as distintas formulações

de microcápsulas tornam-se visíveis somente por volta de 150 dias pós-transplante, quando é possível afirmar que o biomaterial LN-Biodritina consegue manter o enxerto funcional por um período mais longo que os demais, como observado pelos níveis glicêmicos mais baixos.

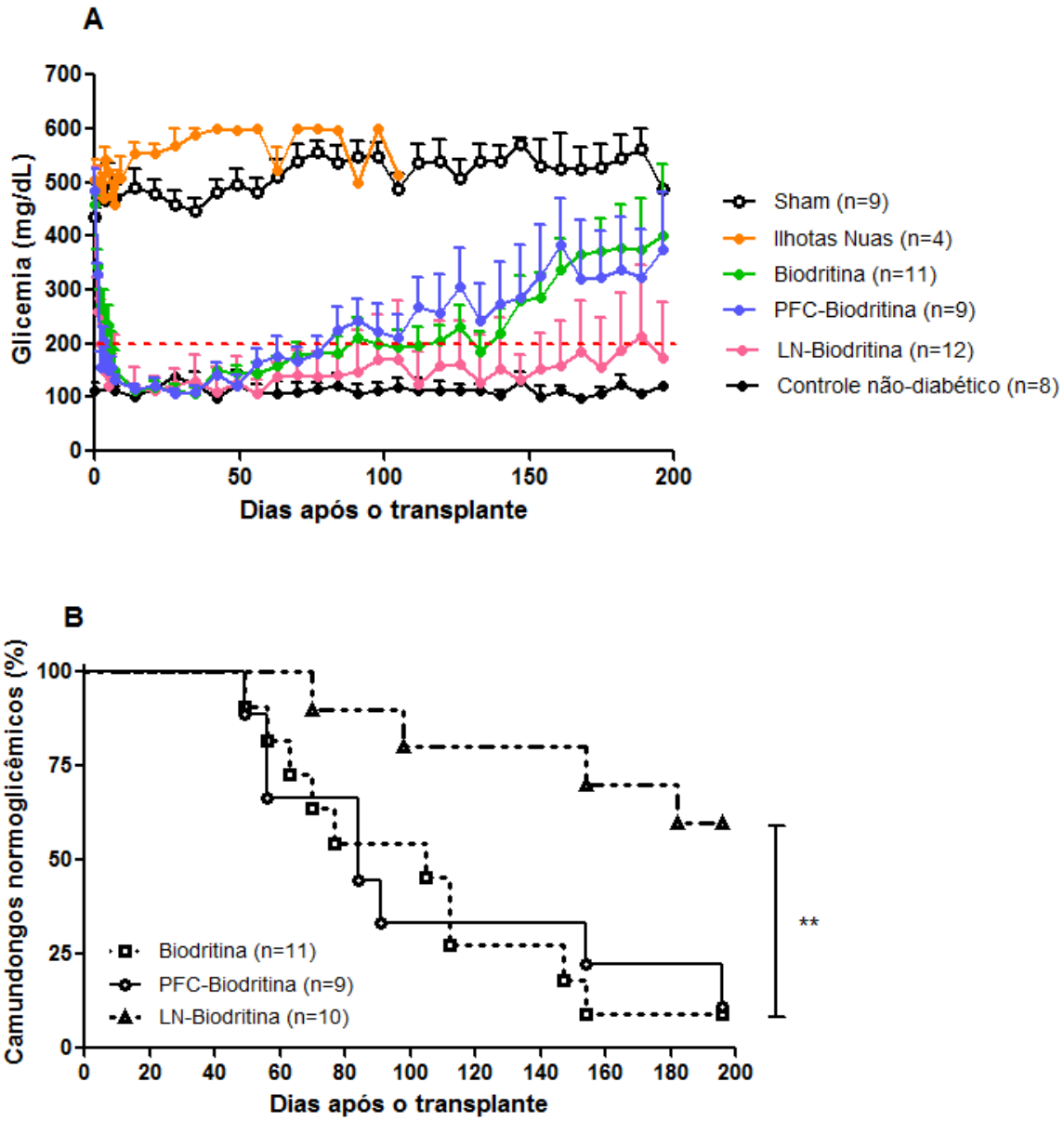


Figura 23: (A) Acompanhamento da glicemia de camundongos Balb/C transplantados ilhotas nuas ou microencapsuladas com Biodritina, PFC-Biodritina e LN-Biodritina, por até 200 dias pós-transplante. O grupo SHAM recebeu cápsulas de Biodritina vazias. Animais não diabetizados foram usados como controles. Cada ponto representa a média de animais testados ± EPM. (B) Quantidade de animais normoglicêmicos ao longo 200 dias pós-transplante. Cada ponto representa a porcentagem de camundongos que apresentavam glicemia abaixo de 200mg/dL. **p<0,01

Na Figura 23B são apresentados somente os dados relativos aos grupos transplantados com ilhotas microencapsuladas nas formulações de interesse, porém, de maneira mais clara, através de um gráfico de Kaplan-Meyer, que, neste caso, avalia a variação na quantidade de animais normoglicêmicos ao longo do tempo. Após 198 dias do transplante, 60% dos camundongos do grupo LN-Biodritina apresentaram níveis glicêmicos desejáveis, frente a somente 11% e 9% dos grupos PFC-Biodritina e Biodritina, respectivamente.

A diferença entre animais normoglicêmicos, transplantados ou controles, e hiperglicêmicos foi visível desde a primeira semana pós-diabetização, como demonstrado na Figura 24.

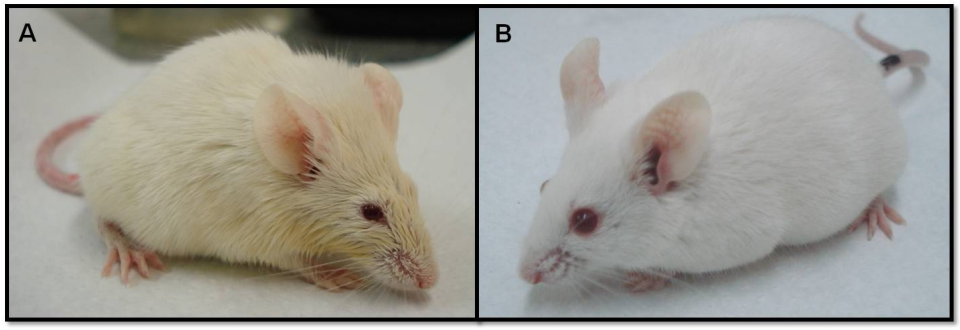


Figura 24: Fotos demonstrativas de camundongos (A) diabético hiperglicêmico e (B) transplantado normoglicêmico.

Durante todo o período dos experimentos de reversão do Diabetes Mellitus, o acompanhamento da glicemia foi essencial para o monitoramento da funcionalidade das ilhotas microencapsuladas transplantadas. Entretanto, para se obter uma análise mais refinada do comportamento funcional do enxerto, foram realizados testes orais de tolerância à glicose (TOTG) em torno de 60 e 100 dias pós-transplante (Figura 25), tanto em animais que receberam ilhotas encapsuladas, quanto nos grupos SHAM e de animais não diabetizados. Não houve diferenças significativas entre os grupos Biodritina, PFC-Biodritina e LN-Biodritina. Contudo, camundongos que receberam ilhotas encapsuladas na formulação contendo LN apresentaram níveis glicêmicos mais baixos que o controle não diabético, nos

dois testes realizados (Figura 25A e B). O grupo PFC-Biodritina apresentou esse mesmo padrão no TOTG realizado 100 dias pós-transplante (Figura 25B).

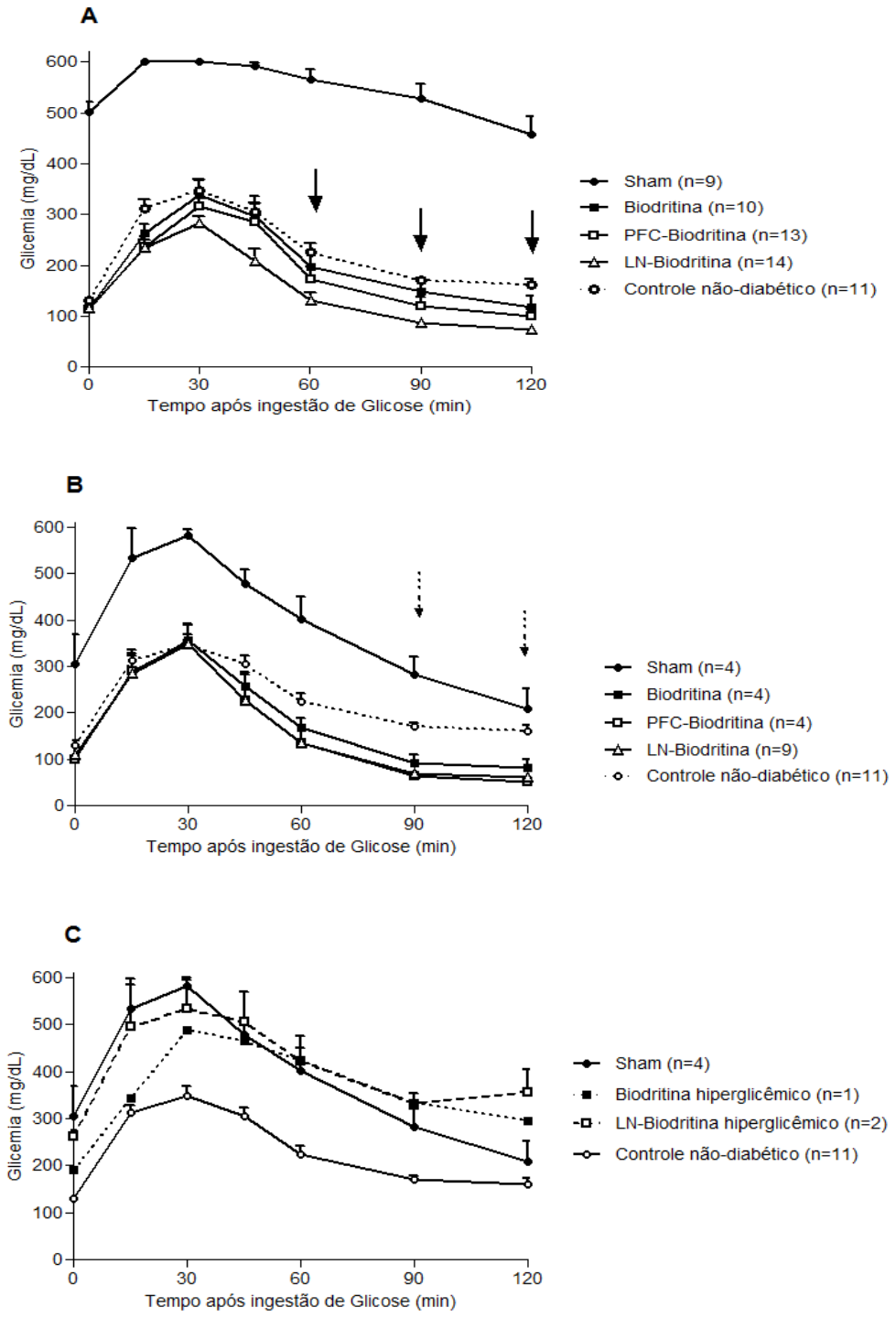
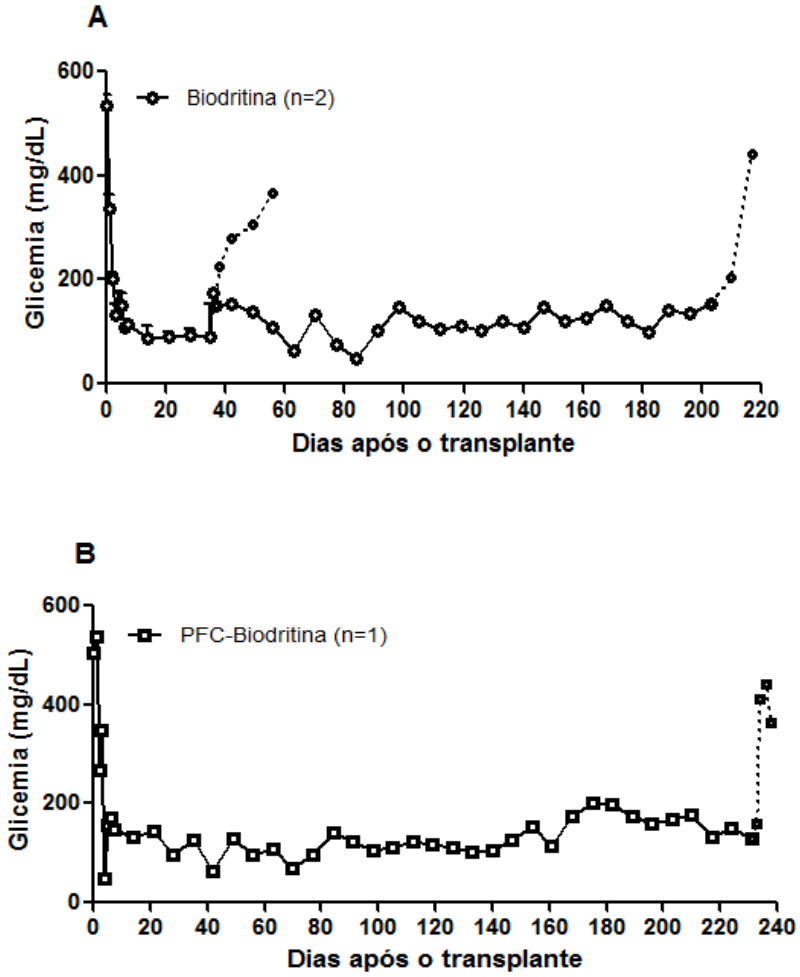


Figura 25: Teste oral de tolerância à glicose realizado em camundongos Balb/C, transplantados com ilhotas microencapsuladas com as formulações de Biodritina, PFC-Biodritina e LN-Biodritina, após (A) 60 e (B e C) 100 dias pós-implante. As setas sólidas indicam os pontos onde o grupo LN-Biodritina foi significativamente diferente do controle não-diabético. As setas tracejadas indicam os pontos onde tanto o grupo LN-Biodritina quanto o PFC-Biodritina diferem do controle não diabetizado. Cada ponto representa a média do número de animais testados ± EPM. Para todas as diferenças citadas, $p<0,05$.

A Figura 25C mostra a variação na glicemia de camundongos transplantados com ilhotas microencapsuladas com Biodritina ou LN-Biodritina, mas que se apresentavam hiperglicêmicos no momento do teste (100 dias pós-transplante). As curvas observadas para ambos os grupos são similares à do controle diabético SHAM.

Para a confirmação de que a normoglicemia apresentada pelos camundongos, pós-transplante, era mantida pelas ilhotas microencapsuladas implantadas e não por uma possível regeneração do pâncreas endócrino, alguns enxertos foram retirados, através de lavado peritoneal, os respectivos animais foram mantidos vivos e sua variação glicêmica acompanhada nas semanas subsequentes. A Figura 26 mostra que, após a retirada das ilhotas microencapsuladas, todos os camundongos voltaram a apresentar hiperglicemia.



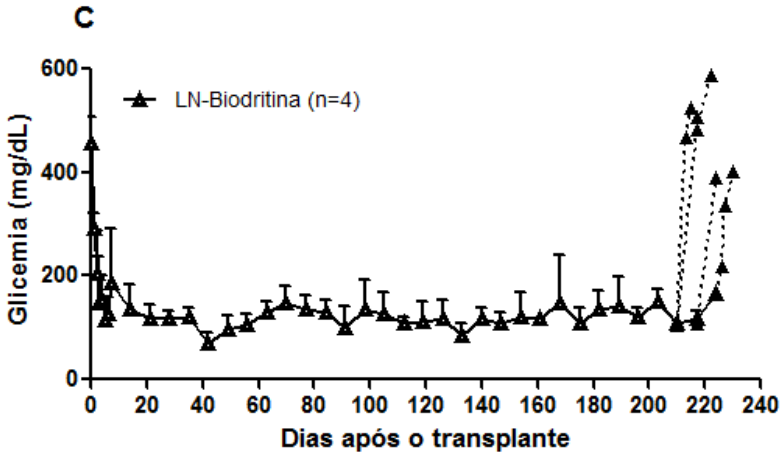


Figura 26: Variação da glicemia de camundongos transplantados com ilhotas microencapsuladas em (A) Biodritina, (B) PFC-Biodritina e (C) LN-Biodritina antes e após a retirada das microcápsulas por lavado peritoneal. A linha tracejada indica a variação dos níveis glicêmicos pós-recuperação do enxerto. Cada ponto representa a média do número de animais testados ± EPM

4.7. Análise de microcápsulas e ilhotas recuperadas de animais normoglicêmicos e hiperglicêmicos

A recuperação do enxerto dos animais transplantados permitiu uma reavaliação das microcápsulas implantadas e das ilhotas nelas contidas. As análises foram realizadas em termos de animais que estavam normoglicêmicos ou hiperglicêmicos, já que a variação encontrada entre os grupos que receberam diferentes formulações de cápsulas era muito grande e o número de animais por grupo, muitas vezes, não permitia análises estatísticas.

A porcentagem de recuperação das microcápsulas está demonstrada na Figura 27 e representa o que foi obtido através do lavado peritoneal. Nos animais normoglicêmicos, realizou-se uma lavagem intraperitoneal mais rápida, tomando-se todo o cuidado no manuseio dos camundongos, já que os mesmos estavam sob anestesia inalatória e deveriam ser mantidos vivos. Já para o grupo hiperglicêmico, o procedimento foi realizado em animais recém-sacrificados, o que permitiu uma ampla laparotomia ventral e um número maior de lavagens. Entretanto, não houve diferença significativa entre os dois grupos. A porcentagem de microcápsulas recuperadas também não difere daquela encontrada para cápsulas vazias,

nos experimentos de biocompatibilidade (Figura 13), após 7 ou 30 dias pós-implante das mesmas.

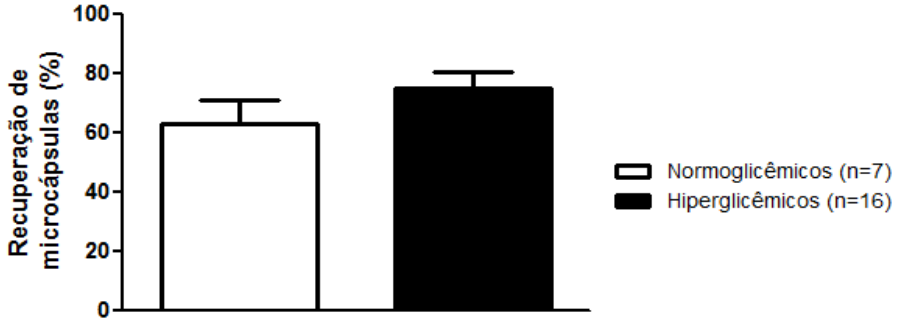


Figura 27: Porcentagem de recuperação das microcápsulas de camundongos Balb/C transplantados, normoglicêmicos e hiperglicêmicos. Não houve diferença significativa entre os grupos. Cada barra representa a média do número de animais avaliados ± EPM

O diâmetro das microcápsulas foi analisado (Figura 28) para se avaliar se ocorreu inchaço *in vivo*, como observado nas microcápsulas dos testes de biocompatibilidade (Figura 16). Contudo, apesar de terem sido encontradas microcápsulas evidentemente maiores, principalmente no grupo normoglicêmico, esse não foi um padrão visto em todos os animais. Sendo assim, na compilação dos dados, não foi encontrada diferença estatística para a medida do diâmetro das cápsulas transplantadas.

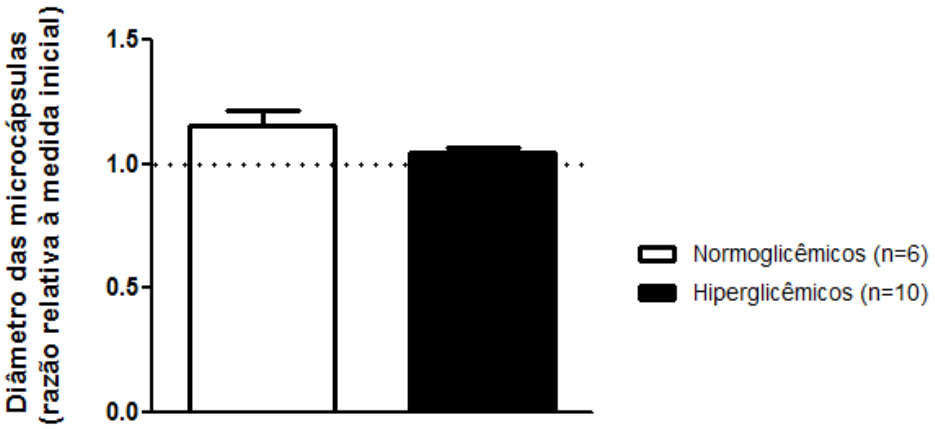


Figura 28: Razão de aumento no diâmetro das microcápsulas recuperadas de camundongos Balb/C transplantados, normoglicêmicos ou hiperglicêmicos. Não houve diferença significativa entre os grupos. Cada barra representa a média do número de animais avaliados ± EPM.

A análise do crescimento pericapsular das microcápsulas recuperadas (Figura 29) mostrou que cerca de 65% das estruturas analisadas, no grupo de animais hiperglicêmicos, apresentava mais da metade da área tomada por células aderidas (>50%). Para o grupo normoglicêmico, a porcentagem ficou em torno de 40%, mostrando que a manutenção de níveis glicêmicos abaixo de 200mg/dL tem influência direta na intensidade do crescimento pericapsular encontrado nas cápsulas enxertadas. Esse padrão difere consideravelmente do encontrado nos experimentos de biocompatibilidade (Figura 15), evidenciando o impacto que as ilhotas encapsuladas e o tempo de transplante desempenham neste processo.

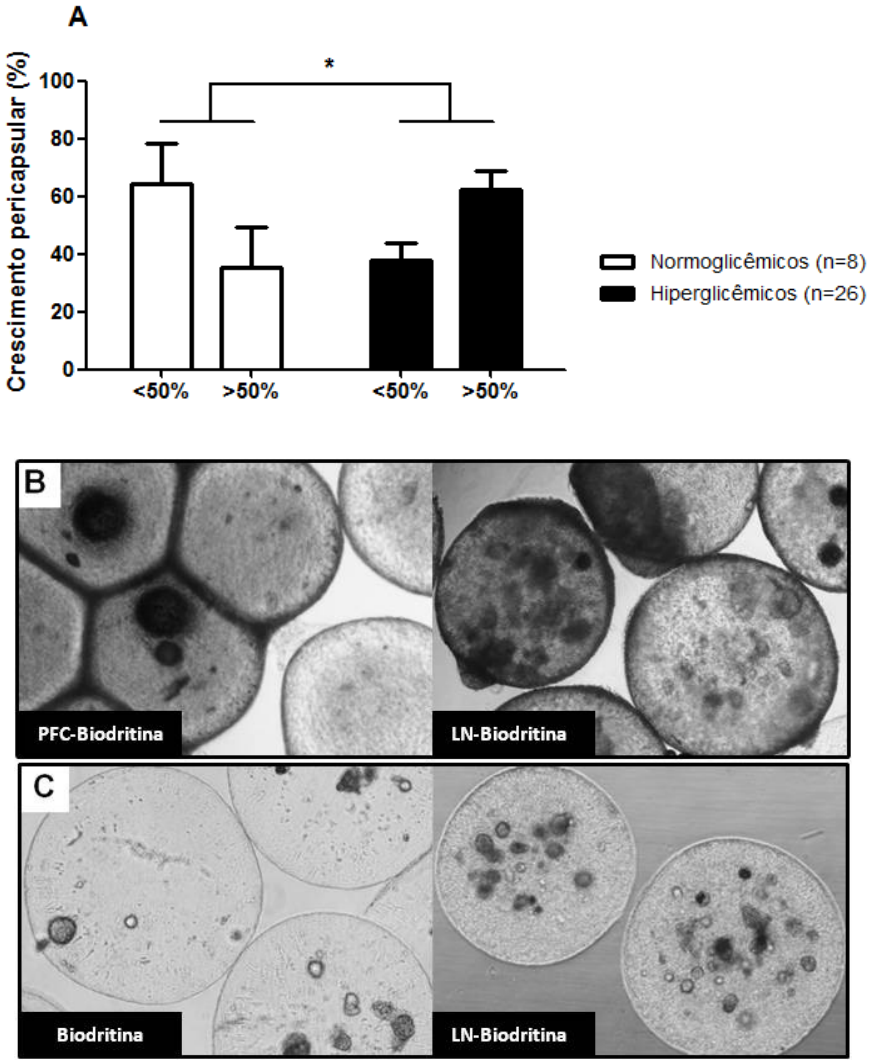


Figura 29: Crescimento pericapsular em microcápsulas recuperadas de camundongos Balb/C transplantados, normoglicêmicos ou hiperglicêmicos. (A) Porcentagem de cápsulas apresentando <50% ou >50% de células aderidas em sua superfície. Cada barra representa a média do número de animais avaliados ± EPM. *p<0,05. Micrografias de cápsulas classificadas como >50% (B) e <50% (C) de acordo com a intensidade do crescimento pericapsular observado.

As ilhotas presentes nas cápsulas recuperadas foram avaliadas quanto à sua funcionalidade, frente ao teste de liberação de insulina em resposta a estímulo de glicose (Figura 30). O índice de liberação de insulina encontrado não foi diferente entre os grupos normoglicêmico e hiperglicêmico. Entretanto, somente ilhotas microencapsuladas obtidas de animais normoglicêmicos apresentaram uma secreção de insulina significativamente aumentada, quando estimuldas com alta concentração de glicose, o que sugere que tais células foram capazes de manter uma resposta funcional mais preservada, quando comparadas ao grupo hiperglicêmico.

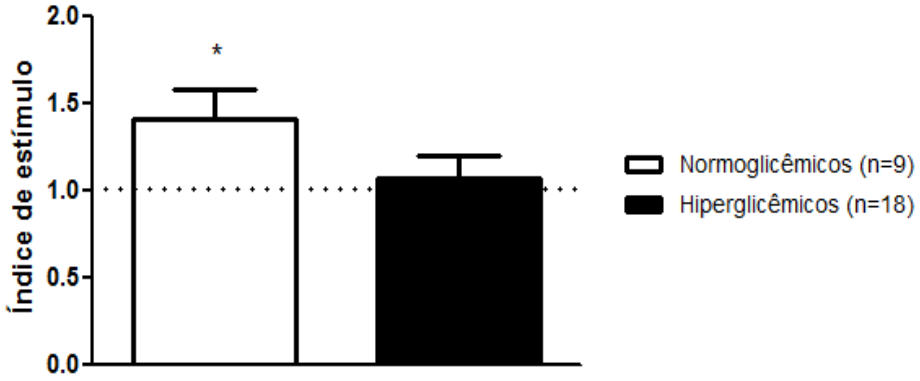


Figura 30: Índice de estímulo de secreção de insulina por ilhotas microencapsuladas recuperadas de camundongos Balb/C transplantados, normoglicêmicos ou hiperglicêmicos, após incubação com baixa (2,8 mM) e alta (16,7 mM) concentração de glicose. Cada barra representa a média do número de animais avaliados ± EPM. *p<0,05 em relação à baixa de glicose (linha pontilhada).

5. Discussão

Apesar da simplicidade do conceito do microencapsulamento celular, o progresso observado, neste campo, nas últimas décadas não atendeu às expectativas. Ilhotas encapsuladas apresentam um desempenho *in vivo* bem inferior aquele desejado, graças a uma biocompatibilidade duvidosa, imunoproteção limitada e comprometimento da viabilidade e função celulares por fatores como hipóxia e perda do suporte da MEC. Nos estudos aqui apresentados, procurou-se diminuir o estresse sobre as ilhotas pancreáticas microencapsuladas, através da utilização de polímeros inovadores (PFC-Biodritina e LN-Biodritina) (**Figura 10**), visando atingir uma maior sobrevivência e funcionalidade destas células e, consequentemente, ampliar o sucesso obtido no transplante.

Conforme mencionado anteriormente, o biomaterial Biodritina já foi objeto de estudo em nosso laboratório, tendo sido o foco de uma tese de Doutorado (114), na qual passou por uma série de ensaios que estabeleceram, entre outros parâmetros, o tipo de alginato ideal, assim como sua concentração (60% G, 1,2% alginato), o íon de polimerização mais adequado (Ba^{+2}), além de comparar a estabilidade, biocompatibilidade e aplicação das microcápsulas de Biodritina com as formulações mais utilizadas na literatura. Trata-se de um material adequado ao transplante experimental de ilhotas e, sendo assim, foi utilizado como base para a geração de novos biomateriais, que possam adicionar vantagens àquelas já conferidas pela Biodritina.

5.1. Estabilidades térmica e mecânica das microcápsulas

A estabilidade das cápsulas de alginato e a prevenção da sua ruptura são parâmetros importantes para a função apropriada do transplante de ilhotas microencapsuladas. Diversas variáveis afetam a força mecânica e a durabilidade destas estruturas, como o cátion utilizado no *cross-linking* das cadeias do polímero e a taxa de ácidos manurônico e gulurônico (130; 131). Uma barreira significativa na utilização do alginato para o microencapsulamento celular é o fenômeno do inchaço capsular, que pode, em última instância, levar a desintegração do

polímero e à rápida destruição das células em seu interior. Em cápsulas vazias, este processo está associado ao aumento da higroscopia no interior do material, em parte causado pelos cátions não-quelados. Outro fator que colabora para o inchaço é a troca química que ocorre entre o cátion utilizado na polimerização e o Na^+ presente nas soluções salinas de lavagem e de estocagem das cápsulas, o que acaba por diminuir a interação entre as cadeias de alginato (131-134). Os testes de estabilidade aplicados nesta tese são comumente utilizados para a análise de microcápsulas (130-132; 135-140), englobando alguns parâmetros que poderiam ser encontrados *in vitro* e *in vivo*, como a faixa de temperatura escolhida, o meio de cultura ou salina e o estresse relacionado a choques mecânicos.

A **Figura 11** (A, B, C e D) mostra que não houve variação do tamanho das microcápsulas em experimentos onde as mesmas foram submetidas a diferentes temperaturas, meio de cultura ou salina e estresse rotacional. A quantidade de estruturas rompidas também não foi diferente da inicial. As microcápsulas utilizadas são produzidas a partir de um alginato contendo 60% de G e gelificadas na presença de Ba^{+2}, parâmetros associados à produção de um biomaterial mais estável e menos propenso a rupturas (132; 138). Tradicionalmente, o cátion Ca^{+2} tem sido usado no encapsulamento celular. Entretanto, cápsulas polimerizadas com Ca^{+2} são mais sensíveis a agentes quelantes, como fosfato e citrato, e agentes não-gelificantes, como íons Na^+ e Mg^{+2}, e acabam por apresentar um inchaço pronunciado ao serem submetidas a testes de estabilidade na presença de soluções fisiológicas ou meio de cultura (138). Para aumentar a estabilidade e reduzir a permeabilidade de tais cápsulas, uma camada de policátions é normalmente adicionada (PLL ou PLO). Contudo, apesar dos bons resultados obtidos com PLO, vários estudos mostraram que a adição de PLL é tóxica para as células (86; 141; 142), induzindo o recrutamento de células do sistema imune e um rápido crescimento pericapsular fibrótico. Sendo assim, acreditamos que os bons resultados de

estabilidade obtidos aqui refletem uma escolha adequada do alginato e do íon de polimerização.

Já no teste "Explosivo", no qual cápsulas são mantidas sob estresse osmótico, em água destilada, houve um grande aumento no diâmetro, em torno de 30%, já observado após 15 minutos do ensaio e mantido após 30 dias (**Figura 11E**). Ensaios como este são comuns e tentam mostrar a resistência do biomaterial a um estresse que, na maioria das vezes, leva ao rompimento das estruturas. Quanto maior a absorção de água, menor a interação entre as cadeias de alginato e maior a instabilidade do polímero (131). Entretanto, o inchaço das microcápsulas não se correlacionou com um aumento na porcentagem de quebra das mesmas.

Estes ensaios foram importantes para avaliar a resistência das microcápsulas durante os processos de produção e manipulação, assim como para prever o comportamento das estruturas após o implante. Tais resultados sugerem que as formulações utilizadas apresentam, *in vitro*, uma ótima resistência aos testes de estabilidade, associada a uma elasticidade desejável. A adição de PFC ou LN não alterou o resultado de qualquer um dos experimentos, mostrando que as novas formulações apresentam o mesmo comportamento encontrado para as microcápsulas de Biodritina.

5.2. Biocompatibilidade das microcápsulas

A membrana utilizada no encapsulamento celular deve ser biocompatível e não estimular a ativação imune no organismo receptor ou nas células em seu interior. A biocompatibilidade dos materiais reflete uma série de características que influenciam o sucesso do enxerto (143; 144). Idealmente, as microcápsulas não devem gerar reação tecidual fibrótica, ativar macrófagos ou estimular a liberação de citocinas e agentes citotóxicos (145; 146). Além disto, o biomaterial deve apresentar características de permeabilidade desejáveis e deve ser quimicamente estável e fisicamente durável, para suportar o ambiente *in vivo* (74). Apesar da influência da composição do alginato (proporções de G e M) ter sido bastante

discutida, estudos abrangendo várias composições deste polímero mostraram que o seu grau de pureza é o que realmente importa (147).

5.2.1. Ensaio de biocompatibilidade *in vitro*: coincubação de microcápsulas e macrófagos

Para atestar a biocompatibilidade das microcápsulas utilizadas, um teste de co-incubação de cápsulas vazias e macrófagos, já descrito e validado por Juste e colaboradores, foi utilizado (141). Macrófagos residentes da cavidade peritoneal podem ser facilmente ativados por impurezas presentes nos materiais utilizados para encapsulamento de células, liberando uma variedade de agentes citotóxicos, como citocinas e óxido nítrico (102). Especificamente, a resposta dos macrófagos ocorre num período inicial, logo após o transplante das ilhotas microencapsuladas, e as citocinas inflamatórias liberadas, IL1-β e TNF-α, estão diretamente associadas à apoptose e necrose do enxerto (148; 149). Dessa maneira, este estudo *in vitro* visava observar o efeito tanto da purificação do biomaterial utilizado, como da adição de PFC e LN à Biodritina. Não foram utilizados macrófagos retirados do sítio intraperitoneal, visto que outros relatos demonstraram que tais células são ativadas pelas simples lavagens e manuseio a que são submetidas, gerando uma grande variabilidade nos experimentos (101; 141). Sendo assim, a linhagem RAW264.7 de macrófagos murinos foi escolhida para estes ensaios, por não ser tão reativa durante o cultivo e a manipulação, sendo, porém, capazes de secretar níveis consistentes de citocinas pós-ativação.

A **Figura 12** mostra que nenhuma das formulações testadas, a não ser as microcápsulas de alginato da SIGMA, estimularam a expressão gênica das citocinas IL-1β ou TNF-α. Como este alginato não passa pelo processo de ultrapurificação, comum para os demais polímeros utilizados, este é um efeito direto da presença de impurezas sobre a ativação dos macrófagos. Cápsulas contendo PFC ou LN não induziram uma resposta diferenciada,

quando comparadas ao biomaterial Biodritina, mostrando que tais substâncias não afetam a biocompatibilidade do material testado.

Neste ensaio, foi analisada somente a expressão gênica das citocinas em questão. Sabe-se que podem ocorrer discrepâncias entre os níveis de mRNA transcritos e a real tradução, secreção e atuação das proteínas. Não só o mRNA pode ser degradado, ou mantido em *pools* intracelulares, como a função das proteínas resultantes ainda pode ser regulada, por modificações pós-traducionais ou pela presença de inibidores. Dessa maneira, o teste usado não pretende inferir sobre o impacto que tais citocinas possam exercer, mas é uma maneira de avaliar a ativação dos macrófagos frente aos biomateriais testados. Testes semelhantes já foram utilizados em ensaios contendo microcápsulas vazias ou, ainda, ilhotas microencapsuladas, sendo considerados bons indicadores para uma análise geral do estado do biomaterial que será implantado (101; 102).

5.2.2. Ensaio de biocompatibilidade *in vivo*: implante de microcápsulas na cavidade peritoneal de camundongos Balb/C imunocompetentes

Nossos experimentos de biocompatibilidade *in vivo* visaram avaliar a recuperação de cápsulas, após 7 e 30 dias do implante, assim como o crescimento pericapsular exibido e o inchaço do material (**Figuras 13, 14, 15 e 16**). A porcentagem média de microcápsulas resgatadas através do lavado peritoneal ficou em torno de 85% (**Figura 13**). A maior parte das estruturas estava solta no sítio intraperitoneal, tendo sido facilmente recuperada. Entretanto, uma análise mais cuidadosa dos animais revelou algumas cápsulas presas ao omento e ao fígado, como já observado por outros grupos (79; 90). Na literatura, é possível encontrar experimentos nos quais a recuperação de cápsulas é próxima ou igual a 100%. Porém, em muitos relatos não há uma contagem adequada do número de estruturas implantadas, mas sim do volume de biomaterial inserido (79; 89; 90; 103). Considerando-se que o alginato está propenso ao inchaço, no ambiente *in vivo*, e que a medida de volume é geralmente baseada

em parâmetros visuais, acreditamos que a técnica utilizada por boa parte dos grupos não seja uma análise adequada. Sendo assim, uma comparação direta com nossos resultados não é possível.

Para alguns dos animais utilizados nos ensaio de biocompatibilidade, a análise da cavidade peritoneal, na busca pelas microcápsulas, foi frutífera e todas as estruturas foram encontradas. Entretanto, para outros camundongos, até 10% das cápsulas implantadas não foram recuperadas. Um parâmetro observado durante o manuseio deste biomaterial é a fragilidade do mesmo, pós-ensaios *in vivo*. Devido ao número variável de microcápsulas que se romperam durante as lavagens pré-análises, a avaliação do número de cápsulas quebradas, não pôde ser realizada.

A análise das microcápsulas recuperadas mostrou que cerca de 70% destas estruturas apresentavam-se livres de crescimento pericapsular. Em 25 a 30% foi encontrada uma adesão celular moderada, com menos de 25% da sua área afetada (**Figura 15**). Uma análise de trabalhos publicados por alguns grupos mostra que é possível obter de 80 a 100% de cápsulas limpas em experimentos que variam de poucas semanas até um ano após o implante (41; 79; 88-90). Até mesmo com a Biodritina, em experimentos prévios em nosso laboratório, obteve-se uma porcentagem de 99% de estruturas livres de adesão celular (114). A razão desta mudança observada para a biocompatibilidade da Biodritina ainda não é clara, mas alguns fatores devem ser considerados. A primeira diferença entre as cápsulas de Biodritina do presente trabalho e das já descritas anteriormente é o seu tamanho. As cápsulas obtidas anteriormente variavam em torno de 600 a 700 μm em diâmetro, enquanto as descritas neste trabalho estão em torno de 700 a 1.000 μm. Esta variação ocorre devido ao equipamento utilizado na produção das estruturas, que funciona a partir de um fluxo de ar constante, estando distante da eficiência de controle de um encapsulador eletrônico. Este tipo de equipamento está sujeito a mudanças no fluxo de ar e velocidade de gotejamento do alginato,

sendo ajustado por um parâmetro visual, o que leva a um comprometimento do diâmetro pretendido. Em geral, o tamanho das microcápsulas produzidas pelos grupos citados também é menor do que o utilizado aqui.

O segundo parâmetro que pode ter afetado a biocompatibilidade do biomaterial implantado é o inchaço observado nas microcápsulas, que chegou a um aumento de 50% a mais do diâmetro original (**Figura 16**). Como esta característica não foi observada em testes anteriores com a Biodritina (114), acreditamos que a produção de cápsulas maiores teve uma influência direta neste aspecto. O aumento no diâmetro das cápsulas pode tornar mais difícil a polimerização adequada das cadeias de alginato internas, caso não haja um ajuste no tempo Durante o qual o biomaterial fica em contato com o Ba^{+2}, na solução de gelificação. Como já mencionado, o inchaço das microcápsulas não é desejado, podendo estar relacionado à perda de permeabilidade, permitindo o acesso de anticorpos e outras proteínas do sistema do complemento às ilhotas, e, ainda, à quebra das estruturas (131; 132). É possível que as cápsulas não encontradas, em alguns camundongos, tenham se rompido devido a este fenômeno. O rompimento do biomaterial, levando à formação de pontas e deformidades, pode, por si só, levar ao aumento do crescimento pericapsular (34).

Por fim, o impacto da cirurgia pode ter influenciado na intensidade da adesão celular encontrada (67). Alguns animais apresentavam cápsulas aderidas ao ponto da incisão, sugerindo que a inflamação local pode ter induzido uma resposta ao material presente. O sítio intraperitoneal também pode ter acelerado este processo. Apesar do peritôneo ser o local clássico de transplante de ilhotas microencapsuladas, pois é capaz de abrigar uma quantidade considerável de material, implantado em uma cirurgia simples, este é um sítio preferencial para reações imunológicas (103; 150; 151). Células mesoteliais peritoneais facilitam a ação de mecanismos da imunidade inata e a presença de macrófagos prontamente ativáveis torna a

cavidade peritoneal o local de implante de células encapsuladas mais problemático do que o sítio subcutâneo ou o espaço sob a cápsula renal.

Os resultados obtidos nos testes de biocompatibilidade do presente trabalho indicam que uma modificação nos protocolos de produção de microcápsulas deve ser introduzida. Apesar da Biodritina apresentar uma pureza adequada, é preciso testar a biocompatibilidade de cápsulas menores, comprovadamente mais eficientes (90; 152), assim como a concentração de alginato utilizada na fabricação das mesmas. Atualmente, existe uma tendência de se utilizar uma concentração maior do que aquela adotada nestes experimentos. A avaliação metódica desses parâmetros certamente vai responder várias questões abertas sobre o comportamento capsular observado nestes ensaios.

5.3. Modulação gênica e proteica em ilhotas microencapsuladas cultivadas sob atmosferas de normóxia e hipóxia

Em um pâncreas saudável, o microambiente nativo das ilhotas facilita a função das células β, por maximizar as interações célula-célula e por permitir um contato íntimo com o sangue circulante, graças à angioarquitetura local. Durante o procedimento de isolamento de ilhotas, conexões vasculares e nervosas são interrompidas, assim como a interação ilhota-MEC, e as células são submetidas a uma diversidade de estímulos, em especial o estresse hipóxico, que podem desencadear apoptose e necrose (153-155).

De fato, em modelos murinos, foi determinado que cerca de 65% da massa de ilhotas implantada na circulação hepática morre nas duas primeiras semanas pós-transplante (156). Isto ocorre devido a uma reação inflamatória trombótica, que envolve a ativação dos sistemas de coagulação, do complemento, e o rápido recrutamento de monócitos e granulócitos. Esta reação é principalmente mediada por fatores inflamatórios produzidos pelas próprias ilhotas implantadas, incluindo fator tecidual, IL-1β, MCP1/CCL2, MIF, entre outros (157-161). O microencapsulamento das ilhotas fornece a imunoproteção física ao enxerto, entretanto, as

células encapsuladas continuam a produzir e liberar os fatores inflamatórios, os quais, por sua vez, se encarregam de estabelecer o círculo vicioso de ativação imune (67).

Para ilhotas não encapsuladas, a adição de substâncias imunoprotetoras durante o isolamento, na cultura prévia ao implante e pós-transplante pode combater alguns dos efeitos adversos. O tratamento de ilhotas com antioxidantes (161-163) ou agentes anti-inflamatórios (164-166) é capaz de promover a viabilidade dessas células por reduzir o infiltrado de macrófagos e a produção de citocinas inflamatórias. O inibidor de protease α1-antitripsina inibe a trombina e permite a sobrevivência do enxerto no período pós-implante (167). O quelante de ferro, deferoxamina, é um antioxidante utilizado durante o isolamento de ilhotas, estando associado à promoção da revascularização das células transplantadas (168).

Sendo assim, em nossos experimentos de cultura de ilhotas encapsuladas (**Figura 18**), sob atmosferas de hipóxia e normóxia, foram analisados os efeitos da adição de PFC e LN à Biodritina, sobre a modulação gênica e proteica dessas células, visando a obtenção de ilhotas menos estressadas. Escolheu-se um período de 48h de cultura, pois, normalmente, ilhotas que serão transplantadas não são cultivadas por períodos mais longos. Pelo contrário, o cultivo de ilhotas está associado à perda das suas características morfológicas e funcionais, assim como à diminuição do número de células (169; 170), de forma que optamos por ensaios que pudessem simular um tratamento celular viável. Sob normóxia, foram testadas todas as formulações, entretanto, sob hipóxia, priorizou-se o biomaterial PFC-Biodritina, já que esta formulação se propõe a aumentar a oxigenação no microambiente das cápsulas. Antes da realização dos ensaios com ilhotas pancreáticas, testes de liberação de insulina frente ao estímulo de glicose foram realizados, para que pudéssemos nos assegurar que o processo de isolamento e purificação das ilhotas não afetaria sua funcionalidade (**Figura 17**). Os índices de secreção de insulina obtidos mostram que tais células respondem adequadamente aos estímulos de glicose.

A **Figura 19** mostra a modulação gênica induzida por cada um dos biomateriais testados. O primeiro grupo de genes avaliado é associado à apoptose (*bcl-2*, *bcl-XL*, *bax*, *bad*, *caspase 3* e *Xiap*), já que este processo é responsável por grande parte da morte celular observada em ilhotas recém-transplantadas. O processo apoptótico pode ser desencadeado pelas vias extrínsica ou intrínsica, convergindo para a ativação de cisteíno-proteases da família das Caspases (**Figura 31**) (171; 172). Na via extrínsica, a ativação de "receptores de morte", que incluem Fas e receptores de TNF, facilita o recrutamento e a clivagem de caspases iniciadoras, as quais, por sua vez são ativadas e atuam diretamente nas caspases efetoras, como a caspase 3. Já a via intrínseca (também chamada de mitocondrial ou via regulada por Bcl-2) pode ser iniciada por múltiplos estímulos, incluindo hipóxia, baixa nutricional e espécies reativas de oxigênio (EROs), estando associada à liberação do citocromo C por membros apoptóticos da família Bcl-2 (Bax e Bak), que saem do controle das moléculas antiapoptóticas (ex: Bcl-2 e Bcl-XL), e à ativação das caspases efetoras. Neste contexto, Bad aparece como um ligante capaz de inibir as proteínas antiapoptóticas e favorecer a morte celular programada. Já Xiap é um inibidor potente das caspases efetoras, impedindo, assim, a finalização do processo apoptótico.

Sob atmosfera de normóxia (**Figura 19A**), as formulações contendo PFC e LN modularam a expressão dos genes associados à apoptose de maneira a sugerir uma proteção contra a morte programada. Houve aumento na expressão de genes antiapoptóticos (*bcl-XL* para PFC e LN, *bcl-2* somente para LN) e uma diminuição para os proapoptóticos (*bad* e *bax*). A caspase 3 foi regulada negativamente para ambas as formulações, assim como xiap para o biomaterial PFC-Biodritina. Como a função de Xiap é inibir caspases efetoras e a principal (caspase 3) foi regulada negativamente, este resultado não vai contra a tendência observada.

Estes mesmos genes observados no experimento sob hipóxia (**Figura 19B**), com a formulação PFC-Biodritina, apresentaram resultados muito similares, diferindo somente para *caspase 3* e *xiap*. Nesta condição, a expressão de mRNA de caspase 3 foi positivamente regulada, um parâmetro que parece estar associado aos baixos níveis de oxigênio aos quais as ilhotas foram submetidas. Entretanto, o aumento obtido nos níveis de *xiap* indica que a expressão gênica deste inibidor foi modulada de maneira a acompanhar os níveis de caspase3.

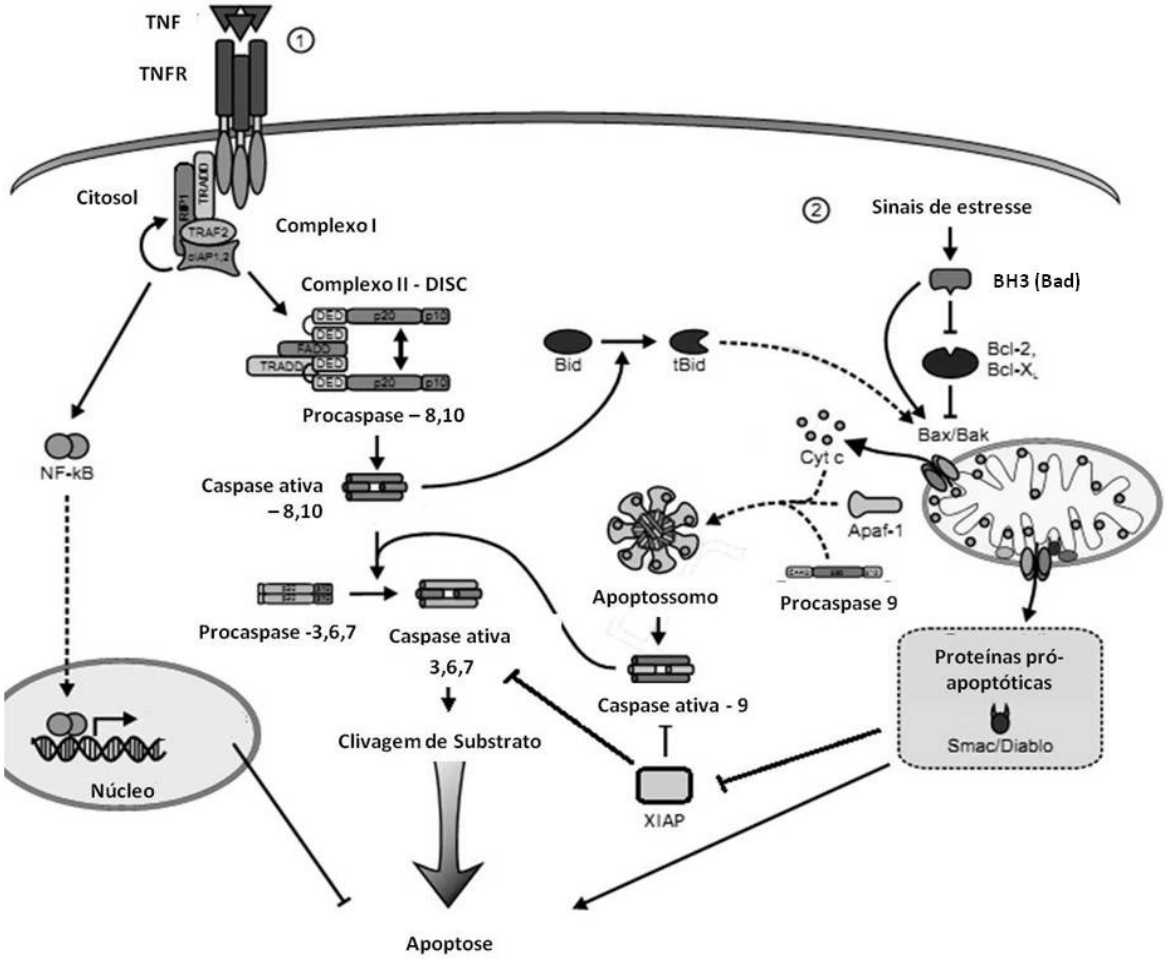


Figura 31: Vias de sinalização de apoptose. (1). Via extrínseca de apoptose, com a ligação a receptores de membrana levando à formação do complexo DISC, no qual a caspase-8 é ativada e inicia a ativação de caspases efetoras. (2). Via intrínseca de apoptose, na qual sinais internos de stress celular levam à ativação de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (Bax e Bak) que são transportados à mitocôndria e levam à formação de poros que permitem a liberação de citocromo C e moléculas pró-apoptóticas. O complexo do apoptossomo é formado e atua sobre a procaspase-9. A caspase-9 ativa a caspases efetora 3 que, por sua vez, efetiva a clivagem se substratos, levando à morte celular. [adaptado de Duprez et al., 2009 (173)].

Uma análise da literatura mostra que os inibidores da via apoptótica intrínseca, Bcl-2 e Bcl-XL, foram eficientes na prevenção da morte de células β *in vitro*, mas, sozinhos, não

obtiveram sucesso *in vivo* (174-176). Em contrapartida, alguns relatos ressaltam o efeito potente de Xiap na inibição da apoptose e na recuperação funcional de ilhotas *in vitro* e, ainda, após o transplante em camundongos diabéticos, nos quais o tempo necessário para atingir a normoglicemia foi diminuído em 7 vezes (177-179). Sendo assim, os primeiros resultados obtidos nos deixaram otimistas, por apresentarem uma resposta com um conjunto de genes que sugere uma maior viabilidade das ilhotas.

Em seguida, genes associados ao estresse celular, *mcp1/ccl2* e *hsp70*, foram focados. MCP1/CCL2 é um membro da família de quimiocinas CC, secretado por vários tipos celulares, tendo como funções mais conhecidas o potente recrutamento e ativação de macrófagos (180). Por conta desta especificidade de atuação, MCP1/CCL2 foi associada à rejeição aguda e crônica de órgãos transplantados (181-183), a danos durante o processo de isquemia e reperfusão (184-186) e à vasculopatia de enxertos (187; 188). Ilhotas humanas isoladas secretam MCP1/CCL2, mesmo na ausência de infecções detectáveis ou de contaminação por endotoxinas (160), e uma secreção aumentada já foi relacionada ao insucesso do transplante de ilhotas em pacientes diabéticos (159; 160).

A família de HSPs (*Heat Shock Proteins*) é regulada positivamente por estresses celulares, como temperatura, hipóxia, isquemia, trombina, fatores de crescimento, glutamato, osmolaridade, metais pesados e citocinas (ex: TNFα e IL-1β) (189-193). Chaperonas HSP70 são ativadas em momentos críticos e mantêm a homeostase das proteínas no citosol, mediando efeitos citoprotetores por permitir o re-enovelamento de proteínas mal estruturadas e desnaturadas (193-196).

Em nossos experimentos, a adição de PFC e LN à Biodritina foi suficiente para diminuir o nível de expressão gênica tanto de *mcp1/ccl2* quanto de *hsp70*, sob atmosferas de normóxia e hipóxia (**Figura 19**). Estes resultados sugerem que as novas formulações de

microcápsulas conseguem prover um ambiente menos estressante para as ilhotas em seu interior, quando comparadas à Biodritina.

A expressão do gene *ldh* foi avaliada, já que a enzima lactato desidrogenase tem um papel fundamental no metabolismo anaeróbio. Ilhotas pancreáticas normalmente apresentam supressão da expressão gênica de *ldh* (197-199). O fato destas células estarem em íntimo contato com a circulação certamente favorece a manutenção do metabolismo aeróbio. Entretanto, a hipóxia relacionada ao processo de isolamento e cultura das ilhotas afeta diretamente a viabilidade das mesmas. Desta maneira, é esperado que a contribuição do metabolismo em anaerobiose seja aumentada. Outras condições de estresse também são capazes de induzir uma maior expressão gênica de *ldh*. Já foi relatado que, no momento de estresse inicial pós-transplante, quando os níveis glicêmicos ainda não se normalizaram, as ilhotas implantadas sofrem com a alta concentração de glicose a que são expostas e, um dos parâmetros observados é o aumento dos níveis de mRNA deste gene (200). Neste contexto, as novas formulações foram testadas para se avaliar uma possível modulação da expressão gênica de *ldh* (**Figura 19**).

Para o biomaterial PFC-Biodritina, tanto em normóxia quanto hipóxia, conforme esperado, houve uma regulação negativa dos níveis de mRNA dessa enzima, sugerindo que o PFC foi capaz de cumprir seu papel de doador de oxigênio, restaurando, pelo menos em parte, o metabolismo aeróbio. Já os resultados com LN-Biodritina mostram que esta formulação induziu um aumento da expressão gênica de *ldh*. Este resultado, apesar de inesperado, frente aos demais resultados de expressão gênica em discussão, pode estar relacionado a uma diminuição dos poros da malha de alginato, visto que a LN utilizada é uma molécula de aproximadamente 850 kDa. Em experimentos anteriores, os poros das microcápsulas de Biodritina gelificadas com Ba^{+2} permitiram a passagem de moléculas com o peso molecular máximo em torno de 70 a 100 kDa (114). Talvez a LN presa à malha de alginato contribuiria

para a diminuição da permeabilidade capsular e, possivelmente, diminuiria o acesso do oxigênio ao seu interior, o que explicaria um aumento da expressão gênica de *ldh* pela indução do metabolismo anaeróbio. Outra hipótese seria de que a laminina proveria uma maior viabiilidade e/ou funcionalidade das ilhotas microencapsuladas, permitindo uma maior detecção de mRNA para *ldh* simplesmente pela presença de um número superior de células sob respiração anaeróbia. Contudo, como não foram realizados ensaios para a avaliação de tamanho dos poros das microcápsulas utilizadas ou da massa de células metabolicamente ativas, tais hipóteses ainda não puderam ser empiricamente testadas.

Por fim, observou-se o nível de mRNA para as insulinas I e II, como forma de se analisar genes relacionados à função principal das ilhotas pancreáticas. Células β de modelos murinos sintetizam duas insulinas diferentes, codificadas por dois genes que apresentam mais de 90% de homologia entre si. Os produtos primários da tradução de proteínas são as preproinsulinas I e II, que diferem por apenas sete aminoácidos. Nas células β, o conteúdo das insulinas é desigual, sendo a taxa de insulina I superior ao de insulina II (201; 202).

A **Figura 19** mostra que os novos biomateriais induziram um aumento na expressão gênica de insulina I, seja em hipóxia ou normóxia. Entretanto, apesar da formulação contendo PFC ter levado a um aumento também dos níveis de mRNA de insulina II, para o biomaterial LN-Biodritina, sob atmosfera de normóxia, observou-se o contrário. Dados da literatura mostram que as células β tendem a responder a um estímulo de biosíntese de insulina, produzindo mais insulina I (201-203). Por outro lado, a insulina II tende a ser depletada após um estímulo contínuo, já que sua produção não acompanha a velocidade de liberação deste hormônio (203). Não sabemos se microcápsulas contendo PFC e LN induzem uma taxa de transcrição diferencial de insulina II entre si, ou se a taxa de tradução dessa proteína é induzida pela presença de LN, diminuindo os *pools* intracelulares de mRNA. Como estas questões não foram analisadas diretamente, é necessário levantar ainda a possibilidade da LN

agir de maneira diferencial, estimulando positivamente a expressão gênica da insulina I enquanto inibe a da insulina II.

Nestes grupos de experimentos realizados, a modulação de genes associados à apoptose, estresse celular e função, observada para os biomateriais PFC-Biodritina e LN-Biodritina, sugere uma proteção importante contra o decaimento da viabilidade e função das ilhotas pancreáticas, em um momento crítico pós-isolamento e pré-transplante, comumente associado à perda de grande parte da massa do enxerto.

Os estudos de modulação gênica representam a quantidade de mRNA transcrito presente nas células, entretanto, nem sempre este parâmetro está associado à expressão ou ativação das proteínas relacionadas. Sendo assim, para que se possa afirmar que as formulações de biomaterial testadas modularam os níveis de uma determinada proteína, é preciso realizar ensaios específicos. A partir da análise da expressão gênica apresentada, foram escolhidos genes associados à apoptose (*bax*, *bcl-XL*, *xiap* e *caspase 3*), que apresentaram uma variação significativa em condições de normóxia e hipóxia, para experimentos de expressão proteica, por Western Blotting, e de ativação enzimática.

A **Figura 20A** mostra que, sob atmosfera de normóxia, apesar de não ter sido observada uma diferença para os níveis da proteína pró-apoptótica Bax, somente as microcápsulas de LN-Biodritina induziram uma modulação proteica nas ilhotas pancreáticas, regulando positivamente os níveis das moléculas anti-apoptóticas Bcl-XL e Xiap. Estes resultados estão de acordo com o observado nos ensaios de qRT-PCR (**Figura 19A**). Para a formulação PFC-Biodritina, a única modulação obtida foi para ensaios realizados em hipóxia (**Figura 20B**), nos quais foi evidenciada uma regulação negativa de Bax. Já para os ensaios de ativação enzimática de caspase 3, a adição de PFC ou LN não afetou os resultados obtidos para Biodritina (**Figura 21**). Em resumo, as variações observadas para os biomateriais PFC-Biodritina e LN-Biodritina indicam uma modulação de proteínas que pode levar à maior

sobrevida das ilhotas microencapsuladas, por desacelerar estímulos pró-apoptóticos. Como já citado, o período escolhido para estes experimentos reflete o tempo de cultura das ilhotas pré-transplante. Talvez as diferenças observadas fossem maiores após um período mais longo de cultivo celular. Entretanto, considerando-se que cerca de 65% da massa do enxerto se perde nos dias subsequentes ao transplante de ilhotas (156), esta pequena variação obtida em nossos experimentos pode ajudar na sobrevivência de uma porcentagem maior de células, evitando a falência precoce do enxerto. Sendo assim, os experimentos seguintes buscaram avaliar o impacto das novas formulações de biomateriais no transplante de ilhotas pancreáticas.

5.4. Reversão do Diabetes Mellitus em camundongos imunocompetentes através do transplante de ilhotas pancreáticas microencapsuladas e análise funcional *in vivo* do enxerto

Desde a primeira aplicação de membranas semipermeáveis para o transplante de ilhotas pancreáticas, em 1980 (38), um número crescente de relatos demonstra a aplicabilidade desta técnica. Entretanto, o que se encontra na literatura são informações extremamente variáveis, muitas vezes divergentes, o que torna a compilação de dados um trabalho de paciência, visto que, em muitos trabalhos, não se mencionam características importantes dos biomateriais utilizados, assim como detalhes técnicos que permitiriam a reprodutibilidade dos resultados. Existe uma grande discussão a respeito do tipo de alginato que seria mais adequado, alguns grupos explicitamente preferindo polímeros com alta concentração de M ou G, enquanto outros chamam a atenção para fatores como viscosidade, íon utilizado na polimerização e presença de uma camada externa de policátions ou não. Da mesma maneira, ainda existe muita discussão a respeito do número adequado de ilhotas para o transplante, do tamanho ideal das microcápsulas utilizadas, de qual seria o melhor sítio de implante, das diferentes espécies ou linhagens de animais utilizados como receptores e as vantagens de cada uma, da necessidade de um pré-condicionamento tanto do enxerto quanto

do receptor, das moléculas marcadoras que predizem sucesso ou falência da terapia, entre tantas outras variáveis. Apesar de toda a divergência existente nos resultados obtidos com biomateriais, por diferentes grupos, certas características foram se consolidando como sendo desejáveis para biomateriais e ilhotas utilizados em transplantes.

A Biodritina foi primeiramente formulada de maneira a possuir características de estabilidade e biocompatibilidade adequadas para o microencapsulamento celular, baseada nas informações mais sólidas de intituições reconhecidas pelo seu trabalho em ciências de materiais e biologia celular. Como já mencionado, a Biodritina já foi validada como um biomaterial adequado ao transplante experimental de ilhotas pancreáticas humanas em camundongos diabéticos imunocompetentes (114). Nesses experimentos, observou-se que os animais diabetizados conseguiam manter a normoglicemia por, pelo menos, dois meses, quando o enxerto foi recuperado para análises e os camundongos voltaram à hiperglicemia. Nos experimentos de transplante do presente trabalho, os novos biomateriais obtidos a partir da adição de PFC e LN à Biodritina foram avaliados quanto a possíveis benefícios que pudessem prover às ilhotas microencapsuladas.

A **Figura 22** mostra que a variação na massa corporal dos animais estudados refletiu o tratamento designado para cada grupo. Animais diabetizados, mas que receberam ilhotas microencapsuladas em qualquer das formulações, mantiveram um ganho de peso similar ao de camundongos não-diabéticos. Entretanto, o grupo que recebeu o implante de ilhotas nuas manteve um peso semelhante aquele do grupo SHAM. Esse resultado demonstra, indiretamente, a funcionalidade do enxerto através do ganho de massa corpórea. Se comparado aos dados obtidos na **Figura 23A**, pode-se observar que a quantidade de ilhotas transplantadas (n=750) nem ao menos foi eficiente na diminuição dos níveis glicêmicos, quando não encapsuladas. Contudo, a glicemia dos animais que receberam implantes encapsulados atingiu níveis fisiológicos logo nos dias seguintes à cirurgia. Uma possível

variação na funcionalidade das ilhotas microencapsuladas com as diferentes formulações de biomaterial só foi evidenciada em torno de 150 dias pós-implante, quando o grupo LN-Biodritina se destacou dos demais, por manter níveis glicêmicos mais baixos, estatisticamente diferente dos demais grupos. Animais do grupo PFC-Biodritina apresentaram resultados virtualmente indistintos do controle Biodritina durante todo o decorrer do ensaio.

O número de ilhotas utilizadas nestes transplantes foi baseado em experimentos anteriores a esta tese, nos quais se observou que o implante de 750 ilhotas era eficiente na normalização dos níveis glicêmicos de camundongos Balb/C, enquanto a utilização de 500 ilhotas somente levava a uma diminuição temporária da glicemia, porém insuficiente para atingir níveis fisiológicos (dados não publicados). Apesar da imensa variação encontrada na literatura, para a quantidade de ilhotas utilizadas em implantes, este número se enquadra na faixa testada pela maioria, sendo até mesmo menor do que o utilizado em boa parte dos relatos mais comuns de transplante xenogênicos, de rato para camundongo ou de porco para camundongo (**Tabela 4**).

A vantagem conferida pelas microcápsulas contendo LN, utilizadas no encapsulamento de ilhotas, ficou evidente quando os mesmos dados foram analisados pela porcentagem de animais normoglicêmicos ao longo do tempo (**Figura 23B**). Nesta análise, a superioridade de desempenho do grupo LN-Biodritina foi constatada após 198 dias da cirurgia, quando 60% dos camundongos deste grupo (n=6) ainda mantinham níveis glicêmicos fisiológicos frente a cerca de 10% dos demais (n=1). A glicemia dos animais estudados era refletida claramente pelo estado físico dos mesmos, como pode ser observado na **Figura 24**, onde um camundongo diabético não-tratado (SHAM), 120 dias após o início dos experimentos é comparado a um Balb/C normoglicêmico, que recebeu ilhotas microencapsuladas com LN-Biodritina, após 200 dias do transplante.

O tempo de duração da normoglicemia dos animais variou bastante, para todos os grupos. O primeiro evento de falha dos enxertos ocorreu por volta de 50 dias pós-transplante, para os grupos Biodritina e PFC-Biodritina, e 70 dias para o grupo LN-Biodritina (**Figura 23B**). O tempo máximo de glicemia avaliado foi de 238 dias pós-cirurgia, para um camundongo transplantado com ilhotas encapsuladas em LN-Biodritina (dado não demonstrado). Entretanto, como o enxerto foi recuperado deste e dos outros animais normoglicêmicos em tempos diferentes, após 200 dias de experimento, para análises subsequentes, acreditamos que a reversão do diabetes poderia ter sido mantida por um período mais longo. Uma análise de outros trabalhos com xenotransplante mostra que o tempo de normoglicemia encontrado em nossos ensaios se enquadra com os da maioria (**Tabela 4**).

Tabela 4: Manutenção de normoglicemia após o xenotransplante de ilhotas microencapsuladas em animais diabéticos

Doador	Receptor	Tipo de microcápsula	Número de ilhotas implantadas	Normoglicemia [dias][a]	Referência
Rato Lewis	Camundongo NOD	APA	1.800-2.000	10	Weber, 1990 (204)
Rato Wistar	Camundongo Balb/c	APA	900-1.000	220	Lum, 1992 (205)
Rato SD	Camundongo Balb/c	Agarose	500	79	Tun, 1996 (206)
Rato SD	Camundongo C57BL/6	ALG-PMCG	1.000	20-300	Wang, 1997 (207)
Rato SD	Camundongo NOD	ALG-PMCG	1.000	40-180	Wang, 1997 (207)
Rato SD	Camundongo Balb/c	ALG-Ba	1.800	90-270	Schneider, 2005 (43)
Rato SD	Camundongo Balb/c	ALG-Ba	125 IEQ	56	O'Sullivan, 2010 (92)
Porco	Camundongo B6AF1	ALG-Ba	10.000	140[b]	Omer, 2003 (90)
Porco	Camundongo NOD	ALG-Ba	5.000 IEQ	42-184	Duvivier-Kali, 2004 (91)
Porco	Camundongo NOD	APA	11.341 ± 3.293 IEQ	13	Safley, 2005 (208)
Porco	Camundongo C57BL/6	ALG-Ba ALG-Ca	2.000	100	Kobayashi, 2005 (209)
Porco	Camundongo NOD	ALG-PLO	500 IEQ	112	Elliott, 2005 (210)
Porco	Camundongo C57BL/6	ALG-Ca	2.000	100	Kobayashi, 2006 (211)
Porco	Camundongo NOD	APA	9.000 IEQ	56	Safley, 2008 (41)

APA: alginato/polilisina/alginato. PMCG: poli-metil-co-guanidina. ALG-Ba: alginato polimerizado com Ba^{+2} / ALG-Ca: alginato polimerizado com Ca^{+2} / ALG-PLO: alginato/poliornitina/alginato
[a] tempo de normoglicemia médio; [b] o estudo foi interrompido neste dia.
[Adaptado de Campos-Lisbôa, 2008 (114)]

Os resultados obtidos mostram um claro benefício da adição de LN ao biomaterial Biodritina. Aparentemente, as ilhotas implantadas conseguem ter uma sobrevida maior, talvez pela manutenção de um microambiente que permita uma diminuição de estímulos de estresse

celular e morte, associados a uma funcionalidade melhorada e a um aumento na massa de células enxertadas viáveis. Como não sabemos se a LN permanece na malha do polímero por todo o tempo experimental, se é perdida na cultura pré-implante ou após o transplante, podemos somente afirmar que a adição desse elemento da MEC induz a proteção do enxerto.

Com relação ao biomaterial PFC-Biodritina, a modulação gênica e proteica encontrada aparentemente não foi suficiente para induzir um efeito nos ensaios *in vivo*. Talvez a oxigenação conferida por estas microcápsulas ocorra somente no período inicial, não sendo suficiente para gerar benefícios frente ao ambiente encontrado no sítio intraperitoneal. Entretanto, a variação das concentrações de PFC e de oxigênio pode ser testada em ensaios futuros. O protocolo para a produção da mistura de alginato-PFC nos foi fornecido pela equipe do Prof. Marcos Mares Guia, do Diabetes Research Institute, centro de pesquisa afiliado à Universidade de Miami, e modificado de maneira a permitir a produção de microcápsulas estáveis. Entretanto, uma análise da literatura mostra que as concentrações de PFC utilizadas em biopolímeros, atualmente, têm variado de 10 a 70% (116-119), enquanto nosso protocolo admite somente 2%. Quando iniciamos os ensaios com cápsulas de PFC, ainda não existiam estudos publicados sobre a concentração efetiva desta substância em células encapsuladas.

Durante os ensaios de reversão do diabetes mellitus, a função das ilhotas microencapsuladas foi acompanhada *in vivo*, em dois momentos após o transplante, utilizando-se o teste de TOTG. Ensaios como este permitem avaliar com maior precisão a funcionalidade das ilhotas enxertadas (43; 91; 212), em um ambiente completamente diferente do *in vitro*, pois as mesmas se encontram no sítio de implante, sujeitas às variações fisiológicas locais, incluindo a modulação nos níveis glicêmicos que levarão à resposta secretória de insulina.

A **Figura 25** mostra que, após 60 ou 100 dias da cirurgia, os animais que receberam ilhotas encapsuladas apresentaram uma secreção de insulina igual ou maior do que aquela observada para camundongos controle não-diabetizados. Ao contrário do que já foi encontrado por De Vos e colaboradores (213), não foi visto um atraso na resposta secretória das ilhotas. Nestes relatos, a secreção de insulina tardia foi, teoricamente, causada tanto pela localização i.p. do enxerto, que não favoreceria uma rápida resposta como a encontrada no ambiente altamente vascularizado de um pâncreas nativo, quanto por influência da microcápsula, que impediria uma difusão rápida de moléculas, tornando mais lenta a obtenção da informação referente ao estado glicêmico. Em nossos ensaios observamos que, apesar de não haver diferença alguma na resposta dos animais transplantados com ilhotas microencapsuladas em quaisquer formulações, o grupo LN-Biodritina levou a uma diminuição estatisticamente significativa da glicemia, quando comparado aos animais não-diabéticos (**Figuras 25A e B**). Após 100 dias do transplante, este padrão também foi encontrado para o grupo PFC-Biodritina (**Figura 25B**). Esses resultados mostram, indiretamente, que o encapsulamento de ilhotas com as novas formulações não induz um atraso na resposta funcional dessas células e que a adição de PFC e LN levam à secreção de uma maior quantidade de insulina, seja por um estímulo da resposta das ilhotas aos altos níveis de glicose no sangue ou pela viabilidade de um maior número de células enxertadas. Entretanto, a tendência observada na diminuição de glicemia após 120 minutos de experimento, para animais que receberam ilhotas em Biodritina, quando comparados aos camundongos não-diabéticos, apoia a hipótese de que o sítio de implante i.p. e a presença da microcápsula podem dificultar o controle fino da secreção de insulina, levando a uma liberação prolongada desse hormônio (213; 214).

Na **Figura 25C** foram analisadas as respostas de secreção de insulina em animais que se apresentavam hiperglicêmicos no momento do ensaio. A variação da glicemia nestes camundongos, como esperado, não difere dos controles diabéticos SHAM.

Por fim, para a comprovação de que os animais transplantados com ilhotas microencapsuladas permaneciam normoglicêmicos, devido à insulina secretada pelo enxerto e não por uma possível regeneração das células β pancreáticas, utilizou-se uma intervenção amplamente empregada na literatura (43; 79; 89; 91; 212), na qual as células foram recuperadas de alguns camundongos e os mesmos foram mantidos vivos e monitorados (**Figura 26**). O restabelecimento da hiperglicemia, nos dias subsequentes, revelou que a reversão do diabetes observada era proveniente da atuação funcional das ilhotas implantadas.

5.5. Biocompatibilidade e função de ilhotas microencapsuladas recuperadas de camundongos diabéticos imunocompetentes

As ilhotas pancreáticas transplantadas foram recuperadas de animais que voltaram à hiperglicemia, após a falha do enxerto, e de camundongos ainda normoglicêmicos, para que pudessem ser avaliadas por parâmetros de biocompatibilidade e função celular. Em um primeiro momento tentou-se observar possíveis diferenças entre as formulações que apresentavam PFC ou LN, em relação à Biodritina. Entretanto, como houve uma grande variação dos resultados entre as amostras biológicas, para um mesmo tipo de cápsula, e o número de explantes não foi ideal, nem ao menos para se observar tendências entre os biomateriais testados, uma análise confiável desses dados ficou comprometida. Sendo assim, as amostras foram agrupadas de acordo com o estado glicêmico do animal, no momento da retirada do enxerto.

O primeiro parâmetro observado foi a porcentagem de cápsulas recuperadas através do lavado peritoneal (**Figura 27**). Esperava-se que o número de cápsulas obtidas do grupo

hiperglicêmico fosse maior, simplesmente pela técnica de retirada do enxerto destes animais, que permitia uma ampla abertura abdominal, já que os camundongos eram sacrificados antes do procedimento. Já para o grupo normoglicêmico, como os animais eram mantidos vivos para o acompanhamento da glicemia, foram realizadas poucas lavagens em um período curto de tempo. Contudo, não houve diferença entre os grupos, devido à grande variabilidade do número de estruturas recuperadas. A porcentagem de microcápsulas recuperadas está de acordo com a encontrada para cápsulas de alginato polimerizadas em Ba^{+2}, contendo ilhotas, por Omer e colaboradores (90). Entretanto, como já mencionado, este relato e outros da literatura levam em conta o volume de microcápsulas antes e depois do implante, o que pode gerar uma mensuração pouco confiável.

Com relação ao diâmetro das microcápsulas, não foi observado um inchaço das estruturas (**Figura 28**). Este dado é bastante interessante, visto que, no experimento de biocompatibilidade de microcápsulas vazias (**Figura 16**), obteve-se um aumento diametral de cerca de 50%. Como o inchaço é um problema que afeta diretamente a permeabilidade do biomaterial, assim como sua estabilidade, estes dados mostram que a presença das ilhotas pancreáticas, de alguma forma, impede este processo. Houve, contudo, uma tendência de aumento nas cápsulas do grupo normoglicêmico, que também apresentava microcápsulas mais limpas. Da mesma maneira, observou-se que a maior parte das cápsulas menores apresentava um extenso crescimento pericapsular e eram mais encontradas no grupo hiperglicêmico. Porém, como em ambos os grupos havia cápsulas apresentando diferentes níveis de adesão celular (**Figura 29**), acreditamos que a variabilidade dos resultados não permitiu observar uma possível diferença no inchaço das estruturas.

O crescimento pericapsular foi encontrado em todas as cápsulas analisadas. Devido à intensidade dessa resposta, neste ensaio, o crescimento pericapsular foi analisado como abrangendo menos ou mais de 50% da área da microcápsula (**Figura 29**). Baseado nesta

classificação, os grupos normo e hiperglicêmicos apresentaram resultados já esperados, indicando que a adesão celular está relacionada à falência do enxerto e, consequentemente, a níveis glicêmicos altos. Este resultado está próximo daquele encontrado para experimentos similares com cápsulas de Biodritina (em torno de 600 μm de diâmetro), realizados anteriormente em nosso laboratório, quando cerca de 70% das estruturas apresentavam pouco ou nenhum crescimento pericapsular (114). De maneira semelhante, a diferença entre cápsulas de animais normo e hiperglicêmicos foi parecida à de nossos ensaios, também se apresentando contrária, com cerca de 70% de cápsulas obtidas de animais que retornaram ao estado diabético demonstrando uma grave adesão celular. Resultados de outros grupos, apesar de usualmente mostrarem um número maior de cápsulas contendo pouco ou nenhum crescimento pericapsular (90; 91; 212), indicam um aumento do número de células aderidas na superfície do biomaterial, quando ilhotas estão presentes no interior dos polímeros (41; 67; 90). Essa tendência é esperada, já que a simples liberação de antígenos pelas células microencapsuladas, assim como citocinas inflamatórias, dá início a um processo descrito anteriormente como círculo vicioso de ativação imune.

Infelizmente, não foi possível a avaliação de estruturas rompidas, pois, como ressaltado para os experimentos de biocompatibilidade de microcápsulas vazias, o biomaterial explantado se quebrava com facilidade, durante a lavagem pré-análises. Como previamente mencionado, cápsulas menores (abaixo de 700 μm) estão associadas a uma maior biocompatibilidade, quando comparadas a cápsulas “regulares” (acima de 700 μm), tendo sido relatados experimentos em que a quebra das estruturas e o crescimento pericapsular foi grandemente induzido pelo tamanho das microcápsulas (90; 152). O fato das nossas cápsulas apresentarem um diâmetro que varia entre 700 – 1000 μm pode ter impactado decisivamente a biocompatibilidade observada nestes ensaios.

Finalmente, as ilhotas microencapsuladas de ambos os grupos foram submetidas à análise funcional (**Figura 30**), através de um teste estático de secreção de insulina, frente ao estímulo de glicose. Apesar de não haver diferença estatística no índice de secreção de insulina entre os grupos estudados, somente as ilhotas de animais ainda normoglicêmicos apresentaram uma liberação de insulina significativa, se comparada à secreção basal. Resultados similares foram encontrados em experimentos anteriores com ilhotas microencapsuladas em Biodritina (114), seguindo o padrão observado nos ensaios de Duvivier-Kali e colaboradores (91). Estes dados mostram que, mesmo com todo o processo de crescimento pericapsular, após meses implantadas no sítio i.p., as ilhotas pancreáticas ainda foram capazes de responder ao estímulo de glicose, se não adequadamente, pelo menos ressaltando a diferença que mantinha o grupo normoglicêmico livre do diabetes mellitus.

Apesar dos resultados que compõem esta tese abrirem novos questionamentos e ideias, comuns a um trabalho de ciência translacional, os dados já obtidos mostram a viabilidade do melhoramento de um biomaterial adequado ao transplante celular. O sucesso encontrado nos ensaios de reversão do diabetes mellitus, ponto-chave deste trabalho, motiva a busca por estratégias que possam aumentar ainda mais a sobrevida do enxerto, tornando o microencapsulamento de ilhotas uma opção cada vez mais viável e atrativa para o tratamento de pacientes diabéticos tipo 1. Baseado nestes resultados, um depósito de patente envolvendo a utilização do material LN-Biodritina para o encapsulamento celular já foi realizado.

Esta ideia de imunoproteção já vem sendo focada por empresas ao redor do mundo, como pela *LCT-Living Cell Technologies (http://www.lctglobal.com)*, que oferece ilhotas de porco microencapsuladas, em um produto chamado *Diabecell*®, que já passou por ensaios clínicos de fases I e II e acredita-se que possa estar disponível, como um novo tratamento, em breve. A empresa *Beta-O_2 Technologies (http://www.beta-o2.com)* foca na oxigenação das ilhotas em um dispositivo subcutâneo e cita resultados promissores em modelo murino. Já a

empresa *VitaCyte (http://www.viacyte.com)* desenvolveu um protocolo de obtenção de células produtoras de insulina a partir de células-tronco embrionárias humanas e tem relatado sucesso na produção deste hormônio *in vivo*, em camundongos. Como já mencionado anteriormente, a utilização de membranas semipermeáveis, seja para o encapsulamento de células ou de fármacos, é uma ferramenta poderosa no tratamento experimental e clínico de diversas doenças, como Hemofilia, Câncer, Parkinson, Huntington, entre outras. Sendo assim, acreditamos que os resultados aqui apresentados estão de acordo com os buscados e obtidos pelos diferentes centros de pesquisa e empresas e podem contribuir de maneira significativa para a melhoria da tecnologia de microencapsulamento celular e tratamento do diabetes mellitus tipo 1.

6. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que:

a) a adição de PFC e LN ao biomaterial Biodritina é capaz de modular o microambiente de ilhotas pancreáticas microencapsuladas.

b) os novos biopolímeros obtidos, PFC-Biodritina e LN-Biodritina, apresentam a mesma estabilidade e biocompatibilidade da Biodritina, entretanto, são capazes de induzir uma modulação gênica, proteica e funcional que deve proporcionar uma maior viabilidade dessas células.

c) somente as ilhotas em microcápsulas contendo LN estão associadas ao principal efeito observado, sendo responsáveis pela manutenção da normoglicemia em animais diabetizados por um tempo estatisticamente superior ao dos camundongos controle.

d) a adição de moléculas bioativas a polímeros adequados ao encapsulamento é uma estratégia viável, com todo o potencial de melhoramento da terapia celular para o tratamento do diabetes mellitus tipo 1.

7. Referências Bibliográficas

1. World Health Organization Diabetes Fact Sheet N312. In *Media Centre*, 2011
2. LeRoith D, Olefsky JM, Taylor SI: *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*. 2003
3. Roglic G, Unwin N: Mortality attributable to diabetes: estimates for the year 2010. Diabetes Res Clin Pract 2010;87:15-19
4. Roglic G, Unwin N, Bennett PH, Mathers C, Tuomilehto J, Nag S, Connolly V, King H: The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. Diabetes Care 2005;28:2130-2135
5. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA: Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. Can Med Assoc J 1922;12:141-146
6. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. N Engl J Med 1993;329:977-986
7. Adverse events and their association with treatment regimens in the diabetes control and complications trial. Diabetes Care 1995;18:1415-1427
8. Hypoglycemia in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Diabetes 1997;46:271-286
9. Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, Idezuki Y, Goetz FC: Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. Surgery 1967;61:827-837
10. Sutherland DE, Gruessner RW, Gruessner AC: Pancreas transplantation for treatment of diabetes mellitus. World J Surg 2001;25:487-496
11. White SA, Shaw JA, Sutherland DE: Pancreas transplantation. Lancet 2009;373:1808-1817
12. Gross CR, Limwattananon C, Matthees BJ: Quality of life after pancreas transplantation: a review. Clin Transplant 1998;12:351-361
13. Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DE, Goetz FC, Mauer M: Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. N Engl J Med 1998;339:69-75
14. Nanji SA, Shapiro AM: Advances in pancreatic islet transplantation in humans. Diabetes Obes Metab 2006;8:15-25
15. Shapiro AM, Nanji SA, Lakey JR: Clinical islet transplant: current and future directions towards tolerance. Immunol Rev 2003;196:219-236
16. Ballinger WF, Lacy PE: Transplantation of intact pancreatic islets in rats. Surgery 1972;72:175-186
17. Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, McCullough CS, Weide LG, Falqui L, Marchetti P, Gingerich RL, Jaffe AS, Cryer PE, et al.: Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patient. Diabetes 1990;39:515-518
18. Merani S, Shapiro AM: Current status of pancreatic islet transplantation. Clin Sci (Lond) 2006;110:611-625
19. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt 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;343:230-238
20. Fiorina P, Shapiro AM, Ricordi C, Secchi A: The clinical impact of islet transplantation. Am J Transplant 2008;8:1990-1997
21. Cravedi P, van der Meer IM, Cattaneo S, Ruggenenti P, Remuzzi G: Successes and disappointments with clinical islet transplantation. Adv Exp Med Biol 2010;654:749-769

22. Ryan EA, Lakey JR, Paty BW, Imes S, Korbutt GS, Kneteman NM, Bigam D, Rajotte RV, Shapiro AM: Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. Diabetes 2002;51:2148-2157
23. 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, Korbutt 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;355:1318-1330
24. Shapiro AM: State of the art of clinical islet transplantation and novel protocols of immunosuppression. Curr Diab Rep 2011;11:345-354
25. Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA: Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. Crit Rev Oncol Hematol 2005;56:23-46
26. Taylor AL, Marcus R, Bradley JA: Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after solid organ transplantation. Crit Rev Oncol Hematol 2005;56:155-167
27. Cantaluppi V, Biancone L, Romanazzi GM, Figliolini F, Beltramo S, Ninniri MS, Galimi F, Romagnoli R, Franchello A, Salizzoni M, Perin PC, Ricordi C, Segoloni GP, Camussi G: Antiangiogenic and immunomodulatory effects of rapamycin on islet endothelium: relevance for islet transplantation. Am J Transplant 2006;6:2601-2611
28. Laugharne M, Cross S, Richards S, Dawson C, Ilchyshyn L, Saleem M, Mathieson P, Smith R: Sirolimus toxicity and vascular endothelial growth factor release from islet and renal cell lines. Transplantation 2007;83:1635-1638
29. Maffi P, Bertuzzi F, De Taddeo F, Magistretti P, Nano R, Fiorina P, Caumo A, Pozzi P, Socci C, Venturini M, del Maschio A, Secchi A: Kidney function after islet transplant alone in type 1 diabetes: impact of immunosuppressive therapy on progression of diabetic nephropathy. Diabetes Care 2007;30:1150-1155
30. Zhang N, Su D, Qu S, Tse T, Bottino R, Balamurugan AN, Xu J, Bromberg JS, Dong HH: Sirolimus is associated with reduced islet engraftment and impaired beta-cell function. Diabetes 2006;55:2429-2436
31. Desai NM, Goss JA, Deng S, Wolf BA, Markmann E, Palanjian M, Shock AP, Feliciano S, Brunicardi FC, Barker CF, Naji A, Markmann JF: Elevated portal vein drug levels of sirolimus and tacrolimus in islet transplant recipients: local immunosuppression or islet toxicity? Transplantation 2003;76:1623-1625
32. Chang TM: Semipermeable Microcapsules. Science 1964;146:524-525
33. Calafiore R: Perspectives in pancreatic and islet cell transplantation for the therapy of IDDM. Diabetes Care 1997;20:889-896
34. de Groot M, Schuurs TA, van Schilfgaarde R: Causes of limited survival of microencapsulated pancreatic islet grafts. J Surg Res 2004;121:141-150
35. Basta G, Calafiore R: Immunoisolation of pancreatic islet grafts with no recipient's immunosuppression: actual and future perspectives. Curr Diab Rep 2011;11:384-391
36. Teramura Y, Iwata H: Bioartificial pancreas microencapsulation and conformal coating of islet of Langerhans. Adv Drug Deliv Rev 2010;62:827-840
37. Wilson JT, Chaikof EL: Challenges and emerging technologies in the immunoisolation of cells and tissues. Adv Drug Deliv Rev 2008;60:124-145
38. Lim F, Sun AM: Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. Science 1980;210:908-910
39. Dufrane D, Gianello P: Pig islet xenotransplantation into non-human primate model. Transplantation 2008;86:753-760

40. Dufrane D, Goebbels RM, Saliez A, Guiot Y, Gianello P: Six-month survival of microencapsulated pig islets and alginate biocompatibility in primates: proof of concept. Transplantation 2006;81:1345-1353
41. Safley SA, Cui H, Cauffiel S, Tucker-Burden C, Weber CJ: Biocompatibility and immune acceptance of adult porcine islets transplanted intraperitoneally in diabetic NOD mice in calcium alginate poly-L-lysine microcapsules versus barium alginate microcapsules without poly-L-lysine. J Diabetes Sci Technol 2008;2:760-767
42. Kobayashi T, Arefanian H, Harb G, Tredget EB, Rajotte RV, Korbutt GS, Rayat GR: Prolonged survival of microencapsulated neonatal porcine islet xenografts in immune-competent mice without antirejection therapy. Cell Transplant 2008;17:1243-1256
43. Schneider S, Feilen PJ, Brunnenmeier F, Minnemann T, Zimmermann H, Zimmermann U, Weber MM: Long-term graft function of adult rat and human islets encapsulated in novel alginate-based microcapsules after transplantation in immunocompetent diabetic mice. Diabetes 2005;54:687-693
44. Soon-Shiong P, Heintz RE, Merideth N, Yao QX, Yao Z, Zheng T, Murphy M, Moloney MK, Schmehl M, Harris M, et al.: Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. Lancet 1994;343:950-951
45. Calafiore R, Basta G, Luca G, Lemmi A, Montanucci MP, Calabrese G, Racanicchi L, Mancuso F, Brunetti P: Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes: first two cases. Diabetes Care 2006;29:137-138
46. Basta G, Montanucci P, Luca G, Boselli C, Noya G, Barbaro B, Qi M, Kinzer KP, Oberholzer J, Calafiore R: Long-term metabolic and immunological follow-up of nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes treated with microencapsulated islet allografts: four cases. Diabetes Care 2011;34:2406-2409
47. Hortelano G, Al-Hendy A, Ofosu FA, Chang PL: Delivery of human factor IX in mice by encapsulated recombinant myoblasts: a novel approach towards allogeneic gene therapy of hemophilia B. Blood 1996;87:5095-5103
48. Liu HW, Ofosu FA, Chang PL: Expression of human factor IX by microencapsulated recombinant fibroblasts. Hum Gene Ther 1993;4:291-301
49. Wen J, Vargas AG, Ofosu FA, Hortelano G: Sustained and therapeutic levels of human factor IX in hemophilia B mice implanted with microcapsules: key role of encapsulated cells. J Gene Med 2006;8:362-369
50. Wen J, Xu N, Li A, Bourgeois J, Ofosu FA, Hortelano G: Encapsulated human primary myoblasts deliver functional hFIX in hemophilic mice. J Gene Med 2007;9:1002-1010
51. Xu W, Liu L, Charles IG: Microencapsulated iNOS-expressing cells cause tumor suppression in mice. FASEB J 2002;16:213-215
52. Lohr M, Hoffmeyer A, Kroger J, Freund M, Hain J, Holle A, Karle P, Knofel WT, Liebe S, Muller P, Nizze H, Renner M, Saller RM, Wagner T, Hauenstein K, Gunzburg WH, Salmons B: Microencapsulated cell-mediated treatment of inoperable pancreatic carcinoma. Lancet 2001;357:1591-1592
53. Goren A, Gilert A, Meyron-Holtz E, Melamed D, Machluf M: Alginate encapsulated cells secreting Fas-ligand reduce lymphoma carcinogenicity. Cancer Sci 2012;103:116-124
54. Hao S, Su L, Guo X, Moyana T, Xiang J: A novel approach to tumor suppression using microencapsulated engineered J558/TNF-alpha cells. Exp Oncol 2005;27:56-60
55. Prakash S, Chang TM: Microencapsulated genetically engineered live E. coli DH5 cells administered orally to maintain normal plasma urea level in uremic rats. Nat Med 1996;2:883-887
56. Cieslinski DA, David Humes H: Tissue engineering of a bioartificial kidney. Biotechnol Bioeng 1994;43:678-681

57. Koo J, Chang TM: Secretion of erythropoietin from microencapsulated rat kidney cells: preliminary results. Int J Artif Organs 1993;16:557-560
58. Wong H, Chang TM: Bioartificial liver: implanted artificial cells microencapsulated living hepatocytes increases survival of liver failure rats. Int J Artif Organs 1986;9:335-336
59. Chang Liu Z, Chang TM: Coencapsulation of hepatocytes and bone marrow cells: in vitro and in vivo studies. Biotechnol Annu Rev 2006;12:137-151
60. de Vos P, Marchetti P: Encapsulation of pancreatic islets for transplantation in diabetes: the untouchable islets. Trends Mol Med 2002;8:363-366
61. Orive G, Pedraz JL: Highlights and trends in cell encapsulation. Adv Exp Med Biol 2010;670:1-4
62. Li RH: Materials for immunoisolated cell transplantation. Adv Drug Deliv Rev 1998;33:87-109
63. Lanza RP, Hayes JL, Chick WL: Encapsulated cell technology. Nat Biotechnol 1996;14:1107-1111
64. Chaikof EL: Engineering and material considerations in islet cell transplantation. Annu Rev Biomed Eng 1999;1:103-127
65. Tibell A, Rafael E, Wennberg L, Nordenstrom J, Bergstrom M, Geller RL, Loudovaris T, Johnson RC, Brauker JH, Neuenfeldt S, Wernerson A: Survival of macroencapsulated allogeneic parathyroid tissue one year after transplantation in nonimmunosuppressed humans. Cell Transplant 2001;10:591-599
66. Leoni L, Desai TA: Micromachined biocapsules for cell-based sensing and delivery. Adv Drug Deliv Rev 2004;56:211-229
67. de Vos P, Faas MM, Strand B, Calafiore R: Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. Biomaterials 2006;27:5603-5617
68. Fritschy WM, Wolters GH, van Schilfgaarde R: Effect of alginate-polylysine-alginate microencapsulation on in vitro insulin release from rat pancreatic islets. Diabetes 1991;40:37-43
69. King A, Sandler S, Andersson A, Hellerstrom C, Kulseng B, Skjak-Braek G: Glucose metabolism in vitro of cultured and transplanted mouse pancreatic islets microencapsulated by means of a high-voltage electrostatic field. Diabetes Care 1999;22 Suppl 2:B121-126
70. de Haan BJ, Faas MM, de Vos P: Factors influencing insulin secretion from encapsulated islets. Cell Transplant 2003;12:617-625
71. Sandler S, Andersson A, Eizirik DL, Hellerstrom C, Espevik T, Kulseng B, Thu B, Pipeleers DG, Skjak-Braek G: Assessment of insulin secretion in vitro from microencapsulated fetal porcine islet-like cell clusters and rat, mouse, and human pancreatic islets. Transplantation 1997;63:1712-1718
72. Korbutt GS, Mallett AG, Ao Z, Flashner M, Rajotte RV: Improved survival of microencapsulated islets during in vitro culture and enhanced metabolic function following transplantation. Diabetologia 2004;47:1810-1818
73. Mikos AG, McIntire LV, Anderson JM, Babensee JE: Host response to tissue engineered devices. Adv Drug Deliv Rev 1998;33:111-139
74. Rihova B: Immunocompatibility and biocompatibility of cell delivery systems. Adv Drug Deliv Rev 2000;42:65-80
75. Tang L, Hu W: Molecular determinants of biocompatibility. Expert Rev Med Devices 2005;2:493-500
76. Ziats NP, Miller KM, Anderson JM: In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials. Biomaterials 1988;9:5-13
77. Anderson JM: Inflammatory response to implants. ASAIO Trans 1988;34:101-107

78. Skjak-Braek G, Murano E, Paoletti S: Alginate as immobilization material. II: Determination of polyphenol contaminants by fluorescence spectroscopy, and evaluation of methods for their removal. Biotechnol Bioeng 1989;33:90-94
79. De Vos P, De Haan BJ, Wolters GH, Strubbe JH, Van Schilfgaarde R: Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets. Diabetologia 1997;40:262-270
80. Klock G, Frank H, Houben R, Zekorn T, Horcher A, Siebers U, Wohrle M, Federlin K, Zimmermann U: Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation. Appl Microbiol Biotechnol 1994;40:638-643
81. Zimmermann U, Thurmer F, Jork A, Weber M, Mimietz S, Hillgartner M, Brunnenmeier F, Zimmermann H, Westphal I, Fuhr G, Noth U, Haase A, Steinert A, Hendrich C: A novel class of amitogenic alginate microcapsules for long-term immunoisolated transplantation. Ann N Y Acad Sci 2001;944:199-215
82. Dusseault J, Tam SK, Menard M, Polizu S, Jourdan G, Yahia L, Halle JP: Evaluation of alginate purification methods: effect on polyphenol, endotoxin, and protein contamination. J Biomed Mater Res A 2006;76:243-251
83. Sawhney AS, Hubbell JA: Poly(ethylene oxide)-graft-poly(L-lysine) copolymers to enhance the biocompatibility of poly(L-lysine)-alginate microcapsule membranes. Biomaterials 1992;13:863-870
84. La Flamme KE, Popat KC, Leoni L, Markiewicz E, La Tempa TJ, Roman BB, Grimes CA, Desai TA: Biocompatibility of nanoporous alumina membranes for immunoisolation. Biomaterials 2007;28:2638-2645
85. de Vos P, van Hoogmoed CG, de Haan BJ, Busscher HJ: Tissue responses against immunoisolating alginate-PLL capsules in the immediate posttransplant period. J Biomed Mater Res 2002;62:430-437
86. Robitaille R, Dusseault J, Henley N, Desbiens K, Labrecque N, Halle JP: Inflammatory response to peritoneal implantation of alginate-poly-L-lysine microcapsules. Biomaterials 2005;26:4119-4127
87. Calafiore R, Basta G, Luca G, Calvitti M, Calabrese G, Racanicchi L, Macchiarulo G, Mancuso F, Guido L, Brunetti P: Grafts of microencapsulated pancreatic islet cells for the therapy of diabetes mellitus in non-immunosuppressed animals. Biotechnol Appl Biochem 2004;39:159-164
88. De Vos P, De Haan B, Van Schilfgaarde R: Effect of the alginate composition on the biocompatibility of alginate-polylysine microcapsules. Biomaterials 1997;18:273-278
89. Duvivier-Kali VF, Omer A, Parent RJ, O'Neil JJ, Weir GC: Complete protection of islets against allorejection and autoimmunity by a simple barium-alginate membrane. Diabetes 2001;50:1698-1705
90. Omer A, Duvivier-Kali V, Fernandes J, Tchipashvili V, Colton CK, Weir GC: Long-term normoglycemia in rats receiving transplants with encapsulated islets. Transplantation 2005;79:52-58
91. Duvivier-Kali VF, Omer A, Lopez-Avalos MD, O'Neil JJ, Weir GC: Survival of microencapsulated adult pig islets in mice in spite of an antibody response. Am J Transplant 2004;4:1991-2000
92. O'Sullivan ES, Johnson AS, Omer A, Hollister-Lock J, Bonner-Weir S, Colton CK, Weir GC: Rat islet cell aggregates are superior to islets for transplantation in microcapsules. Diabetologia 2010;53:937-945
93. Campos-Lisboa AC, Mares-Guia TR, Grazioli G, Goldberg AC, Sogayar MC: Biodritin microencapsulated human islets of Langerhans and their potential for type 1 diabetes mellitus therapy. Transplant Proc 2008;40:433-435

94. Roth DJ, Jansen ED, Powers AC, Wang TG: A novel method of monitoring response to islet transplantation: bioluminescent imaging of an NF-kB transgenic mouse model. Transplantation 2006;81:1185-1190
95. Linn T, Schmitz J, Hauck-Schmalenberger I, Lai Y, Bretzel RG, Brandhorst H, Brandhorst D: Ischaemia is linked to inflammation and induction of angiogenesis in pancreatic islets. Clin Exp Immunol 2006;144:179-187
96. de Groot M, Schuurs TA, Keizer PP, Fekken S, Leuvenink HG, van Schilfgaarde R: Response of encapsulated rat pancreatic islets to hypoxia. Cell Transplant 2003;12:867-875
97. Gysemans CA, Waer M, Valckx D, Laureys JM, Mihkalsky D, Bouillon R, Mathieu C: Early graft failure of xenogeneic islets in NOD mice is accompanied by high levels of interleukin-1 and low levels of transforming growth factor-beta mRNA in the grafts. Diabetes 2000;49:1992-1997
98. Ozasa T, Newton MR, Dallman MJ, Shimizu S, Gray DW, Morris PJ: Cytokine gene expression in pancreatic islet grafts in the rat. Transplantation 1997;64:1152-1159
99. Johansson U, Olsson A, Gabrielsson S, Nilsson B, Korsgren O: Inflammatory mediators expressed in human islets of Langerhans: implications for islet transplantation. Biochem Biophys Res Commun 2003;308:474-479
100. Ehrnfelt C, Kumagai-Braesch M, Uzunel M, Holgersson J: Adult porcine islets produce MCP-1 and recruit human monocytes in vitro. Xenotransplantation 2004;11:184-194
101. de Vos P, Smedema I, van Goor H, Moes H, van Zanten J, Netters S, de Leij LF, de Haan A, de Haan BJ: Association between macrophage activation and function of micro-encapsulated rat islets. Diabetologia 2003;46:666-673
102. Basta G, Sarchielli P, Luca G, Racanicchi L, Nastruzzi C, Guido L, Mancuso F, Macchiarulo G, Calabrese G, Brunetti P, Calafiore R: Optimized parameters for microencapsulation of pancreatic islet cells: an in vitro study clueing on islet graft immunoprotection in type 1 diabetes mellitus. Transpl Immunol 2004;13:289-296
103. Dufrane D, Steenberghe M, Goebbels RM, Saliez A, Guiot Y, Gianello P: The influence of implantation site on the biocompatibility and survival of alginate encapsulated pig islets in rats. Biomaterials 2006;27:3201-3208
104. Beck J, Angus R, Madsen B, Britt D, Vernon B, Nguyen KT: Islet encapsulation: strategies to enhance islet cell functions. Tissue Eng 2007;13:589-599
105. Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ: Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. Blood 2000;96:34-40
106. Paule MF, McColl SR, Simeonovic CJ: Murine chemokine gene expression in rejecting pig proislet xenografts. Transplant Proc 2000;32:1062
107. Cirulli V, Beattie GM, Klier G, Ellisman M, Ricordi C, Quaranta V, Frasier F, Ishii JK, Hayek A, Salomon DR: Expression and function of alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) integrins in the developing pancreas: roles in the adhesion and migration of putative endocrine progenitor cells. J Cell Biol 2000;150:1445-1460
108. Kantengwa S, Baetens D, Sadoul K, Buck CA, Halban PA, Rouiller DG: Identification and characterization of alpha 3 beta 1 integrin on primary and transformed rat islet cells. Exp Cell Res 1997;237:394-402
109. Ris F, Hammar E, Bosco D, Pilloud C, Maedler K, Donath MY, Oberholzer J, Zeender E, Morel P, Rouiller D, Halban PA: Impact of integrin-matrix matching and inhibition of apoptosis on the survival of purified human beta-cells in vitro. Diabetologia 2002;45:841-850
110. Hori Y, Gu X, Xie X, Kim SK: Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells. PLoS Med 2005;2:e103
111. Hammar EB, Irminger JC, Rickenbach K, Parnaud G, Ribaux P, Bosco D, Rouiller DG, Halban PA: Activation of NF-kappaB by extracellular matrix is involved in spreading and

glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic beta cells. J Biol Chem 2005;280:30630-30637
112. Nagata N, Gu Y, Hori H, Balamurugan AN, Touma M, Kawakami Y, Wang W, Baba TT, Satake A, Nozawa M, Tabata Y, Inoue K: Evaluation of insulin secretion of isolated rat islets cultured in extracellular matrix. Cell Transplant 2001;10:447-451
113. Mares-Guia M, Ricordi C: Novel hetero-polysaccharide conjugates, novel S-INP polysaccharide gels and methods of making and using the same. In *In the United States patent and trademark office application for letters patent* USA, 1997
114. Campos-Lisboa ACV: Ilhotas pancreáticas humanas viáveis para o transplante através do aumento de massa de células e do imunoisolamento com microcápsulas biocompatíveis. In *Departamento de Bioquímica* São Paulo, Universidade de São Paulo, 2008, p. 121
115. Lowe KC, Davey MR, Power JB: Perfluorochemicals: their applications and benefits to cell culture. Trends Biotechnol 1998;16:272-277
116. Khattak SF, Chin KS, Bhatia SR, Roberts SC: Enhancing oxygen tension and cellular function in alginate cell encapsulation devices through the use of perfluorocarbons. Biotechnol Bioeng 2007;96:156-166
117. Goh F, Gross JD, Simpson NE, Sambanis A: Limited beneficial effects of perfluorocarbon emulsions on encapsulated cells in culture: experimental and modeling studies. J Biotechnol 2010;150:232-239
118. Johnson AS, O'Sullivan E, D'Aoust LN, Omer A, Bonner-Weir S, Fisher RJ, Weir GC, Colton CK: Quantitative assessment of islets of Langerhans encapsulated in alginate. Tissue Eng Part C Methods 2011;17:435-449
119. Chin K, Khattak SF, Bhatia SR, Roberts SC: Hydrogel-perfluorocarbon composite scaffold promotes oxygen transport to immobilized cells. Biotechnol Prog 2008;24:358-366
120. Durbeej M: Laminins. Cell Tissue Res 2010;339:259-268
121. Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM: Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. Physiol Rev 2005;85:979-1000
122. Colognato H, Yurchenco PD: Form and function: the laminin family of heterotrimers. Dev Dyn 2000;218:213-234
123. Labriola L, Montor WR, Krogh K, Lojudice FH, Genzini T, Goldberg AC, Eliaschewitz FG, Sogayar MC: Beneficial effects of prolactin and laminin on human pancreatic islet-cell cultures. Mol Cell Endocrinol 2007;263:120-133
124. Armanet M, Wojtusciszyn A, Morel P, Parnaud G, Rousselle P, Sinigaglia C, Berney T, Bosco D: Regulated laminin-332 expression in human islets of Langerhans. FASEB J 2009;23:4046-4055
125. Johansson A, Lau J, Sandberg M, Borg LA, Magnusson PU, Carlsson PO: Endothelial cell signalling supports pancreatic beta cell function in the rat. Diabetologia 2009;52:2385-2394
126. Maillard E, Sencier MC, Langlois A, Bietiger W, Krafft M, Pinget M, Sigrist S: Extracellular matrix proteins involved in pseudoislets formation. Islets 2009;1:232-241
127. Weber LM, Anseth KS: Hydrogel encapsulation environments functionalized with extracellular matrix interactions increase islet insulin secretion. Matrix Biol 2008;27:667-673
128. Banerjee M, Virtanen I, Palgi J, Korsgren O, Otonkoski T: Proliferation and plasticity of human beta cells on physiologically occurring laminin isoforms. Mol Cell Endocrinol 2012;
129. Li W, Zhang X-x, Wang X-c, Tang G-y, Shi H-f: Fabrication and morphological characterization of microencapsulated phase change materials (MicroPCMs) and macrocapsules containing MicroPCMs for thermal energy storage. Energy 2012;38:249-254
130. Thu B, Bruheim P, Espevik T, Smidsrod O, Soon-Shiong P, Skjak-Braek G: Alginate polycation microcapsules. I. Interaction between alginate and polycation. Biomaterials 1996;17:1031-1040

131. Thu B, Bruheim P, Espevik T, Smidsrod O, Soon-Shiong P, Skjak-Braek G: Alginate polycation microcapsules. II. Some functional properties. Biomaterials 1996;17:1069-1079
132. Darrabie MD, Kendall WF, Opara EC: Effect of alginate composition and gelling cation on microbead swelling. J Microencapsul 2006;23:613-621
133. Darrabie M, Freeman BK, Kendall WF, Jr., Hobbs HA, Opara EC: Durability of sodium sulfate-treated polylysine-alginate microcapsules. J Biomed Mater Res 2001;54:396-399
134. Hobbs HA, Kendall WF, Jr., Darrabie M, Opara EC: Prevention of morphological changes in alginate microcapsules for islet xenotransplantation. J Investig Med 2001;49:572-575
135. Darrabie MD, Kendall WF, Jr., Opara EC: Characteristics of Poly-L-Ornithine-coated alginate microcapsules. Biomaterials 2005;26:6846-6852
136. Breguet V, Gugerli R, Pernetti M, von Stockar U, Marison IW: Formation of microcapsules from polyelectrolyte and covalent interactions. Langmuir 2005;21:9764-9772
137. Li HB, Jiang H, Wang CY, Duan CM, Ye Y, Su XP, Kong QX, Wu JF, Guo XM: Comparison of two types of alginate microcapsules on stability and biocompatibility in vitro and in vivo. Biomed Mater 2006;1:42-47
138. Morch YA, Donati I, Strand BL, Skjak-Braek G: Effect of Ca2+, Ba2+, and Sr2+ on alginate microbeads. Biomacromolecules 2006;7:1471-1480
139. Moya ML, Morley M, Khanna O, Opara EC, Brey EM: Stability of alginate microbead properties in vitro. J Mater Sci Mater Med 2012;
140. Zimmermann H, Wahlisch F, Baier C, Westhoff M, Reuss R, Zimmermann D, Behringer M, Ehrhart F, Katsen-Globa A, Giese C, Marx U, Sukhorukov VL, Vasquez JA, Jakob P, Shirley SG, Zimmermann U: Physical and biological properties of barium cross-linked alginate membranes. Biomaterials 2007;28:1327-1345
141. Juste S, Lessard M, Henley N, Menard M, Halle JP: Effect of poly-L-lysine coating on macrophage activation by alginate-based microcapsules: assessment using a new in vitro method. J Biomed Mater Res A 2005;72:389-398
142. Strand BL, Ryan TL, In't Veld P, Kulseng B, Rokstad AM, Skjak-Brek G, Espevik T: Poly-L-Lysine induces fibrosis on alginate microcapsules via the induction of cytokines. Cell Transplant 2001;10:263-275
143. Rihova B, Riha I: Immunological problems of polymer-bound drugs. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1985;1:311-374
144. Klinkmann H, Falkenhagen D: Biocompatibility--a system approach. Adv Exp Med Biol 1989;260:39-52
145. Gin H, Dupuy B, Bonnemaison-Bourignon D, Bordenave L, Bareille R, Latapie MJ, Baquey C, Bezian JH, Ducassou D: Biocompatibility of polyacrylamide microcapsules implanted in peritoneal cavity or spleen of the rat. Effect on various inflammatory reactions in vitro. Biomater Artif Cells Artif Organs 1990;18:25-42
146. Miller KM, Anderson JM: Human monocyte/macrophage activation and interleukin 1 generation by biomedical polymers. J Biomed Mater Res 1988;22:713-731
147. Orive G, Ponce S, Hernandez RM, Gascon AR, Igartua M, Pedraz JL: Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. Biomaterials 2002;23:3825-3831
148. Saldeen J: Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common Bcl-2-inhibitable pathway in rat insulin-producing cells. Endocrinology 2000;141:2003-2010
149. Ferlito M, Romanenko OG, Ashton S, Squadrito F, Halushka PV, Cook JA: Effect of cross-tolerance between endotoxin and TNF-alpha or IL-1beta on cellular signaling and mediator production. J Leukoc Biol 2001;70:821-829
150. Thanos CG, Bintz BE, Emerich DF: Stability of alginate-polyornithine microcapsules is profoundly dependent on the site of transplantation. J Biomed Mater Res A 2007;81:1-11

151. Hall JC, Heel KA, Papadimitriou JM, Platell C: The pathobiology of peritonitis. Gastroenterology 1998;114:185-196
152. Robitaille R, Pariseau JF, Leblond FA, Lamoureux M, Lepage Y, Halle JP: Studies on small (<350 microm) alginate-poly-L-lysine microcapsules. III. Biocompatibility Of smaller versus standard microcapsules. J Biomed Mater Res 1999;44:116-120
153. Rosenberg L, Wang R, Paraskevas S, Maysinger D: Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death. Surgery 1999;126:393-398
154. Lau J, Henriksnas J, Svensson J, Carlsson PO: Oxygenation of islets and its role in transplantation. Curr Opin Organ Transplant 2009;14:688-693
155. Cantley J, Grey ST, Maxwell PH, Withers DJ: The hypoxia response pathway and beta-cell function. Diabetes Obes Metab 2010;12 Suppl 2:159-167
156. Biarnes M, Montolio M, Nacher V, Raurell M, Soler J, Montanya E: Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. Diabetes 2002;51:66-72
157. Johansson H, Lukinius A, Moberg L, Lundgren T, Berne C, Foss A, Felldin M, Kallen R, Salmela K, Tibell A, Tufveson G, Ekdahl KN, Elgue G, Korsgren O, Nilsson B: Tissue factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation. Diabetes 2005;54:1755-1762
158. Moberg L, Johansson H, Lukinius A, Berne C, Foss A, Kallen R, Ostraat O, Salmela K, Tibell A, Tufveson G, Elgue G, Nilsson Ekdahl K, Korsgren O, Nilsson B: Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation. Lancet 2002;360:2039-2045
159. Bertuzzi F, Marzorati S, Maffi P, Piemonti L, Melzi R, de Taddeo F, Valtolina V, D'Angelo A, di Carlo V, Bonifacio E, Secchi A: Tissue factor and CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 released by human islets affect islet engraftment in type 1 diabetic recipients. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:5724-5728
160. Piemonti L, Leone BE, Nano R, Saccani A, Monti P, Maffi P, Bianchi G, Sica A, Peri G, Melzi R, Aldrighetti L, Secchi A, Di Carlo V, Allavena P, Bertuzzi F: Human pancreatic islets produce and secrete MCP-1/CCL2: relevance in human islet transplantation. Diabetes 2002;51:55-65
161. Bottino R, Balamurugan AN, Tse H, Thirunavukkarasu C, Ge X, Profozich J, Milton M, Ziegenfuss A, Trucco M, Piganelli JD: Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. Diabetes 2004;53:2559-2568
162. Pileggi A, Molano RD, Berney T, Cattan P, Vizzardelli C, Oliver R, Fraker C, Ricordi C, Pastori RL, Bach FH, Inverardi L: Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. Diabetes 2001;50:1983-1991
163. Pileggi A, Molano RD, Berney T, Ichii H, San Jose S, Zahr E, Poggioli R, Linetsky E, Ricordi C, Inverardi L: Prolonged allogeneic islet graft survival by protoporphyrins. Cell Transplant 2005;14:85-96
164. Marzorati S, Antonioli B, Nano R, Maffi P, Piemonti L, Giliola C, Secchi A, Lakey JR, Bertuzzi F: Culture medium modulates proinflammatory conditions of human pancreatic islets before transplantation. Am J Transplant 2006;6:2791-2795
165. Riachy R, Vandewalle B, Belaich S, Kerr-Conte J, Gmyr V, Zerimech F, d'Herbomez M, Lefebvre J, Pattou F: Beneficial effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on cytokine-treated human pancreatic islets. J Endocrinol 2001;169:161-168
166. Yang Z, Chen M, Ellett JD, Carter JD, Brayman KL, Nadler JL: Inflammatory blockade improves human pancreatic islet function and viability. Am J Transplant 2005;5:475-483
167. Lewis EC, Shapiro L, Bowers OJ, Dinarello CA: Alpha1-antitrypsin monotherapy prolongs islet allograft survival in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:12153-12158

168. Langlois A, Bietiger W, Mandes K, Maillard E, Belcourt A, Pinget M, Kessler L, Sigrist S: Overexpression of vascular endothelial growth factor in vitro using deferoxamine: a new drug to increase islet vascularization during transplantation. Transplant Proc 2008;40:473-476
169. Ilieva A, Yuan S, Wang RN, Agapitos D, Hill DJ, Rosenberg L: Pancreatic islet cell survival following islet isolation: the role of cellular interactions in the pancreas. J Endocrinol 1999;161:357-364
170. Kin T, Senior P, O'Gorman D, Richer B, Salam A, Shapiro AM: Risk factors for islet loss during culture prior to transplantation. Transpl Int 2008;21:1029-1035
171. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR: The machinery of programmed cell death. Pharmacol Ther 2001;92:57-70
172. Thomas HE, Biden TJ: Bad news for beta-cell apoptosis. Diabetes 2009;58:1725-1727
173. Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P: Major cell death pathways at a glance. Microbes Infect 2009;11:1050-1062
174. Dupraz P, Rinsch C, Pralong WF, Rolland E, Zufferey R, Trono D, Thorens B: Lentivirus-mediated Bcl-2 expression in betaTC-tet cells improves resistance to hypoxia and cytokine-induced apoptosis while preserving in vitro and in vivo control of insulin secretion. Gene Ther 1999;6:1160-1169
175. Cattan P, Rottembourg D, Cottet S, Tardivel I, Dupraz P, Thorens B, Boitard C, Carel JC: Destruction of conditional insulinoma cell lines in NOD mice: a role for autoimmunity. Diabetologia 2003;46:504-510
176. Klein D, Ribeiro MM, Mendoza V, Jayaraman S, Kenyon NS, Pileggi A, Molano RD, Inverardi L, Ricordi C, Pastori RL: Delivery of Bcl-XL or its BH4 domain by protein transduction inhibits apoptosis in human islets. Biochem Biophys Res Commun 2004;323:473-478
177. Emamaullee J, Liston P, Korneluk RG, Shapiro AM, Elliott JF: XIAP overexpression in islet beta-cells enhances engraftment and minimizes hypoxia-reperfusion injury. Am J Transplant 2005;5:1297-1305
178. Emamaullee JA, Rajotte RV, Liston P, Korneluk RG, Lakey JR, Shapiro AM, Elliott JF: XIAP overexpression in human islets prevents early posttransplant apoptosis and reduces the islet mass needed to treat diabetes. Diabetes 2005;54:2541-2548
179. Emamaullee JA, Shapiro AM: Interventional strategies to prevent beta-cell apoptosis in islet transplantation. Diabetes 2006;55:1907-1914
180. Melzi R, Mercalli A, Sordi V, Cantarelli E, Nano R, Maffi P, Sitia G, Guidotti LG, Secchi A, Bonifacio E, Piemonti L: Role of CCL2/MCP-1 in islet transplantation. Cell Transplant 2010;19:1031-1046
181. Carvalho-Gaspar M, Billing JS, Spriewald BM, Wood KJ: Chemokine gene expression during allograft rejection: comparison of two quantitative PCR techniques. J Immunol Methods 2005;301:41-52
182. Lee I, Wang L, Wells AD, Ye Q, Han R, Dorf ME, Kuziel WA, Rollins BJ, Chen L, Hancock WW: Blocking the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 chemokine pathway induces permanent survival of islet allografts through a programmed death-1 ligand-1-dependent mechanism. J Immunol 2003;171:6929-6935
183. Ruster M, Sperschneider H, Funfstuck R, Stein G, Grone HJ: Differential expression of beta-chemokines MCP-1 and RANTES and their receptors CCR1, CCR2, CCR5 in acute rejection and chronic allograft nephropathy of human renal allografts. Clin Nephrol 2004;61:30-39
184. Celie JW, Rutjes NW, Keuning ED, Soininen R, Heljasvaara R, Pihlajaniemi T, Drager AM, Zweegman S, Kessler FL, Beelen RH, Florquin S, Aten J, van den Born J: Subendothelial heparan sulfate proteoglycans become major L-selectin and monocyte

chemoattractant protein-1 ligands upon renal ischemia/reperfusion. Am J Pathol 2007;170:1865-1878
185. Chen P, Shibata M, Zidovetzki R, Fisher M, Zlokovic BV, Hofman FM: Endothelin-1 and monocyte chemoattractant protein-1 modulation in ischemia and human brain-derived endothelial cell cultures. J Neuroimmunol 2001;116:62-73
186. Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Tilney NL: Prevention of late renal changes after initial ischemia/reperfusion injury by blocking early selectin binding. Transplantation 1997;64:1520-1525
187. Saiura A, Sata M, Hiasa K, Kitamoto S, Washida M, Egashira K, Nagai R, Makuuchi M: Antimonocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates graft vasculopathy. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:1886-1890
188. Yin R, Zhu J, Shao H, Cheng X, Feng X, Li Z, Jing H: Inhibition of chemokine receptor CCR2 and CCR5 expression contributes to simvastatin-induced attenuation of cardiac allograft vasculopathy. J Heart Lung Transplant 2007;26:485-493
189. Satoh J, Kim SU: Cytokines and growth factors induce HSP27 phosphorylation in human astrocytes. J Neuropathol Exp Neurol 1995;54:504-512
190. Radloff M, Delling M, Gercken G: Protein phosphorylation in alveolar macrophages after stimulation with heavy metal-coated silica particles. Toxicol Lett 1998;96-97:69-75
191. Smoyer WE, Ransom R, Harris RC, Welsh MJ, Lutsch G, Benndorf R: Ischemic acute renal failure induces differential expression of small heat shock proteins. J Am Soc Nephrol 2000;11:211-221
192. Brophy CM, Woodrum D, Dickinson M, Beall A: Thrombin activates MAPKAP2 kinase in vascular smooth muscle. J Vasc Surg 1998;27:963-969
193. Lai Y, Chen C, Linn T: Innate immunity and heat shock response in islet transplantation. Clin Exp Immunol 2009;157:1-8
194. Chien V, Aitken JF, Zhang S, Buchanan CM, Hickey A, Brittain T, Cooper GJ, Loomes KM: The chaperone proteins HSP70, HSP40/DnaJ and GRP78/BiP suppress misfolding and formation of beta-sheet-containing aggregates by human amylin: a potential role for defective chaperone biology in Type 2 diabetes. Biochem J 2010;432:113-121
195. Multhoff G: Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. Methods 2007;43:229-237
196. Saluja A, Dudeja V: Heat shock proteins in pancreatic diseases. J Gastroenterol Hepatol 2008;23 Suppl 1:S42-45
197. Pullen TJ, Khan AM, Barton G, Butcher SA, Sun G, Rutter GA: Identification of genes selectively disallowed in the pancreatic islet. Islets 2010;2:89-95
198. Laybutt DR, Sharma A, Sgroi DC, Gaudet J, Bonner-Weir S, Weir GC: Genetic regulation of metabolic pathways in beta-cells disrupted by hyperglycemia. J Biol Chem 2002;277:10912-10921
199. Jonas JC, Sharma A, Hasenkamp W, Ilkova H, Patane G, Laybutt R, Bonner-Weir S, Weir GC: Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. J Biol Chem 1999;274:14112-14121
200. Laybutt DR, Hawkins YC, Lock J, Lebet J, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC: Influence of diabetes on the loss of beta cell differentiation after islet transplantation in rats. Diabetologia 2007;50:2117-2125
201. Kakita K, Giddings S, Permutt MA: Biosynthesis of rat insulins I and II: evidence for differential expression of the two genes. Proc Natl Acad Sci U S A 1982;79:2803-2807
202. Gishizky ML, Grodsky GM: Differential kinetics of rat insulin I and II processing in rat islets of Langerhans. FEBS Lett 1987;223:227-231

203. Ling Z, Heimberg H, Foriers A, Schuit F, Pipeleers D: Differential expression of rat insulin I and II messenger ribonucleic acid after prolonged exposure of islet beta-cells to elevated glucose levels. Endocrinology 1998;139:491-495
204. Weber CJ, Zabinsi S, Koschitzky T, Rajotte R, Wicker L, Peterson L, D'Agati V, Reemtsma K: Microencapsulated dog and rat islet xenografts into streptozotocin-diabetic and NOD mice. Horm Metab Res Suppl 1990;25:219-226
205. Lum ZP, Krestow M, Tai IT, Vacek I, Sun AM: Xenografts of rat islets into diabetic mice. An evaluation of new smaller capsules. Transplantation 1992;53:1180-1183
206. Tun T, Inoue K, Hayashi H, Aung T, Gu YJ, Doi R, Kaji H, Echigo Y, Wang WJ, Setoyama H, Imamura M, Maetani S, Morikawa N, Iwata H, Ikada Y: A newly developed three-layer agarose microcapsule for a promising biohybrid artificial pancreas: rat to mouse xenotransplantation. Cell Transplant 1996;5:S59-63
207. Wang T, Lacik I, Brissova M, Anilkumar AV, Prokop A, Hunkeler D, Green R, Shahrokhi K, Powers AC: An encapsulation system for the immunoisolation of pancreatic islets. Nat Biotechnol 1997;15:358-362
208. Safley SA, Kapp LM, Tucker-Burden C, Hering B, Kapp JA, Weber CJ: Inhibition of cellular immune responses to encapsulated porcine islet xenografts by simultaneous blockade of two different costimulatory pathways. Transplantation 2005;79:409-418
209. Kobayashi T, Harb G, Rayat GR: Prolonged survival of microencapsulated neonatal porcine islets in mice treated with a combination of anti-CD154 and anti-LFA-1 monoclonal antibodies. Transplantation 2005;80:821-827
210. Elliott RB, Escobar L, Calafiore R, Basta G, Garkavenko O, Vasconcellos A, Bambra C: Transplantation of micro- and macroencapsulated piglet islets into mice and monkeys. Transplant Proc 2005;37:466-469
211. Kobayashi T, Harb G, Rajotte RV, Korbutt GS, Mallett AG, Arefanian H, Mok D, Rayat GR: Immune mechanisms associated with the rejection of encapsulated neonatal porcine islet xenografts. Xenotransplantation 2006;13:547-559
212. Omer A, Duvivier-Kali VF, Trivedi N, Wilmot K, Bonner-Weir S, Weir GC: Survival and maturation of microencapsulated porcine neonatal pancreatic cell clusters transplanted into immunocompetent diabetic mice. Diabetes 2003;52:69-75
213. De Vos P, Vegter D, De Haan BJ, Strubbe JH, Bruggink JE, Van Schilfgaarde R: Kinetics of intraperitoneally infused insulin in rats. Functional implications for the bioartificial pancreas. Diabetes 1996;45:1102-1107
214. de Vos P, Vegter D, Strubbe JH, de Haan BJ, van Schilfgaarde R: Impaired glucose tolerance in recipients of an intraperitoneally implanted microencapsulated islet allograft is caused by the slow diffusion of insulin through the peritoneal membrane. Transplant Proc 1997;29:756-757