MARLUCE DA CUNHA MANTOVANI

**Descelularização pancreática visando à recelularização
como alternativa terapêutica para o Diabetes *mellitus*
tipo I**

São Paulo

2019

MARLUCE DA CUNHA MANTOVANI

**Descelularização pancreática visando à recelularização
como alternativa terapêutica para o Diabetes *mellitus*
tipo I**

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

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Distúrbios Genéticos
de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar
Coorientadora: Profa. Dra. Elia Tamaso Espin
Garcia Caldini

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Mantovani, Marluce da Cunha
Descelularização pancreática visando
recelularização como alternativa terapêutica para o
Diabetes mellitus tipo I / Marluce da Cunha
Mantovani. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo.
Orientadora: Mari Cleide Sogayar.
Coorientadora: Elia Tamaso Espin Garcia Caldini.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 1
2.Pâncreas 3.Matriz extracelular 4.Órgãos
bioartificiais 5.Medicina regenerativa 6.Engenharia
tecidual 7.Pâncreas artificial

USP/FM/DBD-361/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus queridos pais, **Sylvia Helena & Marcílio Antonio**,
meus avós **Elza & Sylvio** (*In memoriam*) e minha
tia/madrinha **Tânia Maria** (*In memoriam*), pelo amor que me
deram com o presente da vida. Meus primeiros mestres e
modelos.

Aos meus irmãos favoritos **Marco Antonio & Mariana**,
presenças essenciais em minha vida.

Ao meu amado **Daniel Kazahaya**, meu constante incentivo e
amparo nas horas mais difíceis da minha vida.

Às minhas filhas caninas **Aya & Mel**, o amor mais puro que já
pude experimentar.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas, amigos e colegas, participaram de alguma forma na elaboração deste trabalho seja diretamente ou mesmo com palavras de incentivo. Me esforço em citar todos neste agradecimento, no entanto, me antecipo as limitações do papel e da ocasião de escrita para expressar a gratidão sentida por essas pessoas, cujo nome, por ventura, não se encontrem impressos no papel. Certamente, estarão timbrados em meu coração após essa jornada. De qualquer forma, a alguns devo minha consideração especial:

A **Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar**, minha mentora e orientadora, que me acolheu em seu grupo de pesquisa, me proporcionando amadurecimento e crescimento tanto científico quanto pessoal inimagináveis por mim. Obrigada pela paciência, pela confiança, pelos conselhos, e por acreditar em mim quando muitas vezes até eu mesma eu duvidei.

A **Profa. Dra. Elia Tamaso Espin Garcia Caldini**, minha co-orientadora, que por meio de uma matéria da pós graduação me apresentou à um universo de imagens “ultracelulares” apaixonantes. Acolhendo-me em seu grupo de pesquisa e proporcionando o aprendizado que faltava durante o doutorado.

A **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)**, pelo suporte financeiro e por permitir a realização do Doutorado dentro do Departamento de Clínica Médica.

Às **Agências de Fomento** em pesquisa nacionais e do estado de São Paulo - **BNDES, CAPES, CNPq, FAPESP, FINEP, MCTI, MS-DECIT**, que de forma direta ou indireta, apoiaram financeiramente a realização desta pesquisa.

Às **Equipes de captação de pâncreas para pesquisa** do complexo Hospital das Clínicas e Faculdade de Medicina da USP, destacados nas pessoas do **Dr. Vinícius Rocha Santos, Dr. Carlos Andrés Rodriguez Pantanalli e Enfa. Juliana**, por contribuírem com suas habilidades, conhecimentos preciosos e boa vontade 24 horas por dia, sete dias por semana, durante todos esses anos, meu muito obrigada!

Aos membros do **LIM59: Adão, Dra. Claudia, Gildasio, Ires, Maria Cecília, Dr. Marcelo, Me. Sueli e Dra. Nilsa**, por auxiliarem, de forma preciosa, com a execução das técnicas histológicas do projeto, pelos dias repletos de amostras infinitas, pelos lanchinhos, conversas e pelas muitas risadas.

A **Profa. Dra. Maria Cecília Salvadori** e ao **Ms. Leonardo Gimenes Sgubin**, do Instituto de Física da USP, pela valiosa conversa e auxílio técnico na execução do ensaio de microscopia eletrônica de varredura.

Ao **Ms. Otávio Mendes Gil**, do Instituto de Química da USP, pela discussão científica e auxílio na execução dos ensaios de espectroscopia.

A **Central Analítica** do Instituto de Química da USP, aqui representada pela **Adriana Matsukuma** e pelo **Wilton Lima**, pela amizade que já perdura 16 anos, pelos cafés, conversas valiosas e auxílios técnicos neste projeto.

A **Equipe técnica do NUCEL: Alan e Renata** pelo trabalho essencial para o funcionamento do grupo e execução dos projetos.

A todos os queridos membros e ex-membros do **grupo NUCEL: Ana Paula Barreto, Bruna Aguiar, Carlos DeOcesano, Fernando Velloso, Lauren Camargo, Luis Pomatay, Luiz Ribeiro, Marcos Demasi, Mariel Alcorde, Mariele Moraes, Michely Reis, Raquel Arminda, Tatiane Maldonado, Túlio Pereira**, e muitos outros.

Ao **Gabriel Ronatty** e a **Tatiane Fonseca**, meus alunos de Pré-iniciação Científica e Iniciação Científica. Juntos crescemos e aprendemos muito, ganhamos alguns prêmios e algumas viagens. Partilhamos alegrias, tristezas, frustrações, e terminamos nossa jornada, com a certeza de que cada um trilharia um novo lindo caminho profissional. Muito obrigada pela oportunidade de passar esse tempo com vocês. Muito obrigada, agora voem e brilhem!

A **Dra. Ana Claudia Carreira** e ao **Marco Lázaro Batista**, por todo apoio emocional e científico essenciais na execução das etapas mais críticas deste trabalho.

As amigas de coração que a USP me presenteou: **Érica Sayuri Nakashima, Miriam Lemos, Zilda Mendonça e Zizi de Mendonça**, pela amizade, pelo apoio e por me ensinarem, tão carinhosamente, a trilhar de forma mais suave o caminho das pedras.

A **Profa. Dra. Talita Carmo** (que orgulho de você!), obrigada pelo apoio incondicional, inspiração e exemplo de generosidade.

A **Camila Leal Lopes**, (ou Leal-Lopes, C.), minha menina prodígio, irmãzinha adotada e companheira de trabalhos (alguns publicados e outros ainda em execução - não vamos desistir! rs). Obrigada pelos bons anos na sua companhia diária (agora virtual).

A **Patrícia Kossugue**, minha companheira de viagens, de choradeiras, de baladas e de isolamentos. Obrigada pela sua amizade e por todo auxílio e incentivo antes, durante e depois deste trabalho.

Aos amigos **Adauto Spindola Junior** e **Thais Ribas**, pela amizade, companheirismo e clareza de idéias absolutamente indispensáveis, principalmente nas etapas finais dessa jornada. Não posso deixar de esquecer de agradecer também pelas sessões de “terapias gastronômicas”. Meu muito obrigada!

Aos amigos **Andrew Douglas, Henrique César e Mariana Araújo Junior**, pela amizade, pelo companheirismo e pelas sessões de gargalhadas mais desestressantes do mundo.

A grande amiga para todas as horas **Erika Marcolino Santos** e meu querido amigo **Douglas Ostie**, obrigada por estarem sempre lá quando eu preciso, vocês são absolutamente indispensáveis na minha vida. É importante mencionar mais um presente que vocês me deram, meu sobrinho canino **Klaus**. O *golden retriever* mais atrapalhado, carismático e amoroso que já conheci.

Aos amigos que a vida me deu de presente e que sempre me acompanham, independentemente da distância: **Tatiana Stefani** (Tati) & **Alex Issamu Kano** (Japa) e seus filhos – **Gabriel** e **Nina**. **Thaísa Meira Sandini** & **Daniel Andregueti (Erê)**. **Luiza Soares Wolbert** (Teda) & **Daniel dos Santos** (Ted) e seus filhos – **Spock**, **Racko** e **Lucky**. Obrigada pelas conversas descontraídas e cheias de verdades nos churrascos da vida! Queridas **Tati** e **Teda**, a presença de vocês em diversos momentos da minha vida foi imprescindível. Meu muito obrigada!

Ao **grupo Concha**, na pessoas de cada uma das minhas queridas irmãzinhas de coração, sempre presentes na minha vida. Cedendo apoio incondicional. Todas lindas, inteligentes, independentes, bem sucedidas e sempre me ensinando. **Ana Cristina Barbosa**: moça das “clarezas de idéias”, dos “ensinamentos” e moça de “palavras para melhorar seu ânimo”. **Erika Molina**: moça do “se arriscar nas loucuras da vida” e moça do “vendo a vida sob um outro aspecto totalmente diferente”. **Maria Fernanda Forni**: moça do “mimo de amor de mãe” e moça de “exaltar nossas qualidades quase sempre esquecidas”. **Marina Trombetta Lima**: moça do “sempre à disposição para todas as suas necessidades, desejos e loucuras”, e também a moça do “vamos dividir esse prato”. **Raquel Santos**: moça da “fotaleza em forma de docura” e moça das “palavras de conforto”. **Rosângela Wailleman**: moça do “melhor abraço do mundo” e do “carinho em forma de palavras”. Vocês enchem minha vida de felicidade e me envolvem com a sensação maravilhosa que tudo isso persistirá por toda eternidade. Meu muito, muito, muito obrigada!

Aos meus amados avós **Elza e Sylvio** (*in memoriam*) e minha tia-mãe **Tânia** (*in memoriam*) pelo incentivo e apoio em todas as etapas da minha vida.

Aos meus amados pais **Sylvia** e **Marcílio** pelo amor, zêlo, paciência e dedicação ilimitados. Vocês serão para sempre meus super heróis.

Aos meus amados irmãos **Marco Antonio** e **Mariana** pela oportunidade de rir e chorar, crescer e melhorar cada dia mais ao lado de vocês. Com vocês eu nunca me sinto sozinha.

As minhas filhas caninas **Aya** e **Mel**. A cada dia que passa mais agradeço mais aos céus por terem colocado essas anjinhas amadas na minha vida, com as quais aprendi o real significado da frase “Não há nenhum psiquiatra no mundo como um cachorro lambendo seu rosto” - *Bern Williams*.

Ao **Daniel**, meu amado amante, marido, melhor amigo, eterno companheiro, noivo apaixonado, parceiro predileto, japonês lindão, minha proteção, minha fortaleza, meu outro eu; você fez o meu mundo ficar mais colorido e, agora, o trilhar da vida tem mais sentido. Você me ajuda a me transformar no melhor que eu posso ser!

A **Deus**, por Sua infinita bondade... pelas chances que temos de aprender, de compartilhar, de viver... tive fé e a minha fé me trouxe até aqui!

“É bem mais difícil julgar a si mesmo que julgar os outros.
Se consegues fazer um bom julgamento de ti, és um
verdadeiro sábio. É preciso exigir de cada um o que cada
um pode dar.”

Antoine de Saint-Exupéry

“Até que o sol não brilhe, acendamos uma vela
na escuridão.”

Confúcio

“Nada é suficientemente bom. Então vamos fazer o que é
certo, dedicar o melhor dos nossos esforços para atingir o
inatingível, desenvolver ao máximo os dons que Deus nos
concedeu, e nunca parar de aprender.”

Ludwig van Beethoven

Normalização Adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Sumário

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. O Diabetes <i>mellitus</i>	02
1.2. O Pâncreas	05
1.3. Classificação do Diabetes <i>mellitus</i>	10
1.4. O Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	10
1.5. Tratamentos do Diabetes <i>mellitus</i> tipo: manejo da hiperglicemia	11
1.6. Medicina Regenerativa e Engenharia Tecidual	14
1.7. A Matriz Extracelular (MEC)	15
1.8. Descelularização de Órgãos	17
1.9. Recelularização	19
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo Geral	22
2.2. Objetivos Específicos	22
3. MATERIAIS e MÉTODOS	24
3.1. Tipo de Estudo	26
3.2. População de Estudo	27
3.3. Aceite de Pâncreas Humanos de Doadores Falecidos	27
3.4. Delineamento Experimental	29
3.5. Canulação e Extração de Pâncreas de Rato	34
3.6. Extração e Canulação de Pâncreas Humano	35
3.7. Descelularização de Pâncreas Murino	36
3.8. Descelularização de Pâncreas Humano	37
3.9. Extração e Quantificação de DNA	37
3.10. Quantificação de Glicosaminoglicanos (GAGs)	38
3.11. Dosagem de Proteínas Totais	39
3.12. Microscopia Óptica – Análises Histológicas	39
3.12.1. Hematoxilina e Eosina (HE)	40
3.12.2. Azul de Alcian (AB)	40
3.12.3. Vermelho de Picrossírius (PSH)	40
3.12.4. Resorcina Fuccina com Oxidação em Oxona (RFO)	41
3.12.5. Azul de Toluidina (AT)	41
3.13. Análises da Ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	42

3.14. Avaliação por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	43
3.15. Espectroscopia.....	43
3.16. Confecção de cortes grossos e finos dos arcabouços humanos descelularizados.....	44
3.17. Macroscopia.....	44
3.18. Microscopia Óptica – Visualização direta de tecidos e células.....	45
3.19. Microscopia de Fluorescência.....	45
3.20. Dosagem de Insulina.....	45
3.21. Dosagem de Lactato Desidrogenase (LDH).....	46
3.22. Isolamento de ilhotas pancreáticas de rato.....	46
3.23. Isolamento de ilhotas pancreáticas humanas.....	47
3.24. Contagem celular de ilhotas.....	49
3.25. Cultivo celular.....	49
3.25.1. <i>Cultura aderente 2D de Ilhotas pancreáticas (células β) murinas</i>	50
3.25.2. <i>Cultura aderente 2D de Ilhotas pancreáticas (células β) humanas</i>	50
3.25.3. <i>Cultura aderente 2D de células de insulinoma murino (MIN6)</i>	50
3.25.4. <i>Células produtoras de insulina (IPCs)</i>	51
3.26. Viabilidade Morfológica.....	51
3.27. Avaliação Microbiológica.....	52
3.28. Avaliação de contaminação por Micoplasma.....	52
3.29. Avaliação Funcional.....	53
3.30. Caracterização celular por imunofenotipagem.....	53
3.31. Cultivo 3D.....	54
3.32. Recelularização dos arcabouços descelularizados.....	55
3.32.1. <i>Arcabouços murinos – órgão inteiro</i>	55
3.32.2. <i>Arcabouços humanos – cortes grossos e cortes finos</i>	55
3.33. Análises Estatísticas.....	56
4. RESULTADOS	57
4.1. Respondendo a Questão Norteadora 1.....	58
4.1.1. <i>Descelularização de pâncreas de rato</i>	58
4.1.2. <i>Quantificação de DNA</i>	60
4.1.3. <i>Análises Histológicas</i>	61
4.1.4. <i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</i>	64
4.1.5. <i>Quantificação de Glicosaminoglicanos (GAGs)</i>	67
4.2. Respondendo a Questão Norteadora 2.....	68
4.2.1. <i>Descelularização de pâncreas de rato</i>	68
4.2.2. <i>Descelularização de pâncreas humano</i>	69
4.2.3. <i>Principais dados clínicos dos doadores dos pâncreas humanos</i>	70

4.2.4. Quantificação de DNA.....	71
4.2.5. Análise histológica de pâncreas humano versus de rato após a descelularização.....	72
4.2.6. Análise da Ultraestrutura por MET.....	76
4.2.7. Avaliação por MEV.....	79
4.2.8. Avaliação por Espectroscopia Raman.....	83
4.3. Respondendo a Questão Norteadora 3.....	84
4.3.1. Análises Histológicas.....	85
4.3.2. Análise da Ultraestrutura por MET.....	88
4.3.3. Dosagem de Proteínas Totais.....	90
4.4. Respondendo a Questão Norteadora 4.....	92
4.4.1. Recelularização de arcabouços murinos.....	92
4.4.2. Recelularização de arcabouços humanos.....	97
5. DISCUSSÃO.....	109
5.1. Escolha do detergente para descelularização de pâncreas.....	111
5.2. Protocolo de descelularização para pâncreas murino e humano.....	113
5.3. Manutenção e armazenamento de arcabouços descelularizados <i>in vitro</i>	117
5.4. Capacidade de recelularização dos arcabouços gerados.....	119
6. CONCLUSÕES.....	124
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	127
8. BIBLIOGRAFIA.....	130
9. ANEXOS.....	142
9.1. ANEXO A - Aprovação pelo Comitê de Ética Uso Animal.....	143
9.2. ANEXO B - Termo de Outorga.....	144
9.3. ANEXO C - Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos.....	146
9.4. ANEXO D - Termo de Doação de Órgãos e Tecidos Doador Falecido.....	150
Apêndice	

LISTA DA ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

°C	grau Celsius
2D	2 dimensões / bidimensional
3D	3 dimensões / tridimensional
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ϵ	Épsilon
μm	Micrômetro(s)
nm	Nanômetro(s)
a.C.	Antes de Cristo
AB	Coloração de Azul de Alcian
ABRITEC	Associação Brasileira de Incentivo à Tecnologia e Ciência
ABTCel	Associação Brasileira de Terapia Celular
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR42J	Linhagem celular de tecido pancreático acinar murino
AT	Coloração de Azul de Toluidina
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CADI	Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos
CEUA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CITR	<i>Collaborative Islet Transplant Registry</i> - Registro Colaborativo de Transplante de Ilhotas
cm^3	Centímetro(s) cúbico
CMRL	Meio de cultura desenvolvido no <i>Connaught Medical Research Laboratories</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO_2	Gás carbônico
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CT-Biotecnologia	Câmara Técnica de Biotecnologia
CT-Saúde	Câmara Técnica de Saúde
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i> - Receptor de quimiocina C-X-C tipo 4
DAG	Diacilglicerol
DECIT	Departamento de Ciências e Tecnologia
dl	Decilitro(s)
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM1A	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 A

DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
DOC	Desoxicolato de Sódio
DTZ	Difeniltiocarbazona
EDS	Energia dispersiva de raio-X
IDDM1	Lócus de suscetibilidade para Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
IDF	<i>International Diabetes Federation</i> – Federação Internacional de Diabetes
IEQs	Índice de Equivalentes de Ilhotas
IFCC	<i>International Federation of Clinical Chemistry</i> - Federação Internacional de Química Clínica
IgG1	Imunoglobulina G1
IMC	Índice de Massa Corpórea
IP3	Inositol 1-4-5-trifosfato
IPCs	<i>Insulin Producing Cells</i> - Células produtoras de insulina
iPSCs	<i>Induced Pluripotent Stem cells</i> – Células tronco Pluripotentes Induzidas
IQ	Instituto de Química
IB-UNICAMP	Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas
ISBN	<i>International Standard Book Number</i> - Sistema Internacional de Identificação de Livros
ISCT	<i>International Society for Cell and Gene Therapy</i> - Sociedade Internacional de Terapia Celular e Genética
ISEF	<i>Internacional Science and Engineering Fair</i> - Feira Internacional de Ciências e Engenharia
ISL1	<i>Insulin gene enhancer protein 1</i> - Proteína estimuladora do gene da insulina 1
FDA	Diacetato de fluoresceína
FDA	
FEBRACE	Feira Brasileira de Ciências e Engenharia
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	Gramas(s)
GAGs	Glicosaminoglicanos
GATA4	Fator de transcrição 4 da família GATA
GLUT2	<i>Glucose Transporter 2</i> – Transportador de Glicose 2
h	Hora(s)
Hb	Hemoglobina
HE	Coloração de Hematoxilina e Eosina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> - Antígeno Leucocitário Humano
HU	Hospital Universitário
Ki67	Antígeno KI-67
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LDH	Lactato desidrogenase
LEM	Laboratório de Espectroscopia Molecular
LIM	Laboratório de Investigação Médica
M	Molaridade
MCTI	Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação
MEC	Matriz Extracelular
mESCs	Células tronco embrionárias murinas
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
min	Minuto(s)
MIN6	<i>Mouse Insulinoma 6</i> - Células de insulinoma murino
mg	Miligrama(s)
ml	Mililitro(s)
mm	Milímetro(s)
mM	Milimolar
MODY	<i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i> - Diabetes juvenil de início tardio
MS	Ministério da Saúde
NES	<i>Nestin expressing</i> – Expressão de Nestina
NGN3	<i>Neurogenin-3</i> – Neurogenina 3
NPTEL	<i>The National Programme on Technology Enhanced Learning</i> - Programa Nacional de Tecnologia Aprimorada de Aprendizagem
NUCEL	Núcleo de Terapia Celular e Molecular
OCT	<i>Optimal Cutting Temperature</i> – Temperatura Ideal de Corte
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBSA	Solução salina tamponada com fosfato
PBSA – AA	Solução salina tamponada com fosfato suplementado com antibiótico e antimicótico
PCR	Parada Cardiorespiratória
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i> - Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDX1	<i>Pancreatic and Duodenal homeobox 1</i> – Homeobox Pancreática e Duodenal 1
PFA	Paraformaldeído
PFC	Perfluorocarbono
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídeo

POP	Procedimento Operacional Padrão
PR	Procedimento Operacional Padrão de Procedimentos
PSH	Coloração de Vermelho de Picrosírius
RFO	Coloração de Resorcina-Fucsina com oxidação em Oxona
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura desenvolvido no <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	RNA ribossomal
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SBTMO	Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea
SCTIE	Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SICI	Sistema de Infusão Contínua de Insulina
SFB	Soro fetal bovino
SPOT	Serviço de Procura de Órgãos e Tecidos
T75	Frascos de cultura celular com 75cm ² de superfície de crescimento celular
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
VEGF-A	<i>Vascular endothelial growth factor A</i> - Fator de crescimento do endotélio vascular A
vs	<i>Versus</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Critérios laboratoriais para diagnóstico de normoglicemia, pré-diabetes e Diabetes <i>mellitus</i>	04
Figura 2 - Estimativa mundial e por região de portadores de Diabetes <i>mellitus</i> adultos.....	04
Figura 3 - O Pâncreas - classificação anatômica e histologia.....	07
Figura 4 - Classificação etiológica do Diabetes <i>mellitus</i>	10
Figura 5 - Principais componentes da matriz extracelular – MEC.....	16
Figura 6 - Desenho Experimental e Fluxograma para questão norteadora 1...	30
Figura 7 - Desenho Experimental e Fluxograma para questão norteadora 2...	31
Figura 8 - Desenho Experimental e Fluxograma para questão norteadora 3...	32
Figura 9 - Desenho Experimental e Fluxograma para questão norteadora 4...	33
Figura 10 - Ensaios de caracterização das células produtoras de insulina.....	34
Figura 11 - Canulação e Extração pancreática murina.....	59
Figura 12 - Descelularização de pâncreas de rato com os diferentes detergentes.....	60
Figura 13 - Avaliação dos diferentes detergentes - Histologia Pancreática – Hematoxilina/Eosina.....	62
Figura 14 - Avaliação dos diferentes detergentes - Histologia Pancreática – Azul de Alcian.....	63
Figura 15 - Avaliação dos diferentes detergentes - Histologia Pancreática – Vermelho de Picrosírius.....	64
Figura 16 - Avaliação dos diferentes detergentes - Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	66
Figura 17 - Descelularização de pâncreas de rato com detergente DOC 4%..	68

Figura 18 - Canulação de pâncreas humano.....	69
Figura 19 - Descelulrização de pâncreas humano.....	70
Figura 20 - Pâncreas de rato vs pâncreas humano - Histologia Pancreática – Hematoxilina/Eosina.....	72
Figura 21 - Pâncreas de rato vs pâncreas humano - Histologia Pancreática – Azul de Alcian.....	73
Figura 22 - Pâncreas de rato vs pâncreas humano - Histologia Pancreática – Azul de Toluidina.....	74
Figura 23 - Pâncreas de rato vs pâncreas humano - Histologia Pancreática – Vermelho de Picrosírius.....	75
Figura 24 - Pâncreas de rato vs pâncreas humano - Histologia Pancreática – Resorcina Fuccina com Oxidação em Oxona.....	76
Figura 25 - Pâncreas de rato vs pâncreas humano - Análise da Ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	78
Figura 26 - Microscopia Eletrônica de Varredura – Pâncreas de rato.....	80
Figura 27 - Microscopia Eletrônica de Varredura – Pâncreas humano.....	81
Figura 28 - Cristais em Arcabouços de Pâncreas humano.....	82
Figura 29 - Mapeamento composicional e semiquantitativo de energia dispersiva de raio-X – EDS.....	82
Figura 30 - Espectroscopia Raman.....	84
Figura 31 - Preservação dos Arcabouços – Histologia Pancreática – Hematoxilina/Eosina.....	86
Figura 32 - Preservação dos Arcabouços – Histologia Pancreática – Azul de Alcian.....	87
Figura 33 - Preservação dos Arcabouços – Histologia Pancreática – Vermelho de Picrosírius.....	88

Figura 34 - Preservação dos Arcabouços – Análise da Ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	89
Figura 35 - Fontes celulares utilizadas para a recelularização de arcabouço murino.....	93
Figura 36 - Viabilidade morfológica ilhotas murinas.....	93
Figura 37 - Testes de avaliação de contaminação por Micoplasma em cultura de ilhotas pancreáticas murinas e humanas.....	94
Figura 38 - Recelularização do arcabouço de pâncreas de rato com células murinas.....	95
Figura 39 - IPCs infundidas no arcabouço murinho durante o processo de recelularização.....	96
Figura 40 - Recelularização dos arcabouços murinos - Histologia Pancreática – Hematoxilina/Eosina.....	96
Figura 41 - Viabilidade morfológica de ilhotas pancreáticas humanas.....	98
Figura 42 - Fonte celular utilizada para a recelularização de arcabouço pancreático humano.....	99
Figura 43 - Imunofenotipagem da cultura primária 2D de ilhotas pancreáticas humanas.....	100
Figura 44 - Recelularização arcabouço e células humanas.....	101
Figura 45 - Recelularização dos arcabouços pancreáticos humanos – Histologia Pancreática – Hematoxilina/Eosina.....	101
Figura 46 - Cultura 3D derivada a partir de cultura primária 2D de ilhotas pancreáticas humanas.....	103
Figura 47 - Culturas 3D derivadas de cultura primária 2D de ilhotas pancreáticas humanas alocadas em arcabouço pancreático humano descelularizado.....	104
Figura 48 - Detalhes das culturas 3D de esferóides derivados a partir de cultura primária 2D de ilhotas pancreáticas humanas alocadas em arcabouço pancreático descelularizado humano.....	105

Figura 49 - Microscopia Eletrônica de Varredura da cultura 3D ilhotas pancreáticas humanas alocadas em arcabouço descelularizado humano.....	106
---	-----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Avaliação dos diferentes detergentes - Quantificação de DNA.....	61
Gráfico 2 - Avaliação dos diferentes detergentes - Quantificação de GAGs..	67
Gráfico 3 - Pâncreas de rato vs pâncreas humano - Quantificação de DNA..	71
Gráfico 4 - Dosagem de Proteínas Totais.....	91
Gráfico 5 - Quantificação de DNA – Arcabouço murino recelularizado.....	97
Gráfico 6 - Avaliação funcional de ilhotas pancreáticas humanas.....	98
Gráfico 7 - Quantificação de DNA – Arcabouço humano recelularizado.....	102
Gráfico 8 - Quantificação de Insulina.....	107
Gráfico 9 - Quantificação de Lactato Desidrogenase - LDH.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados totais de alo-enxertos, doadores e infusões incluídos no 10º Relatório Anual de 2017 do CITR (1999 – 2015).....	14
Tabela 2 - Critérios de exclusão - principais causas de recusa da oferta de pâncreas para isolamento de ilhotas e descclularização de pâncreas.....	29
Tabela 3 - Principais dados clínicos dos doadores dos pâncreas humanos utilizados para a descclularização.....	71
Tabela 4 - Quantificação de proteínas totais no sobrenadante das amostras descclularizadas que foram armazenadas por diferentes períodos de tempo em diferentes meios de preservação.....	91

RESUMO

Mantovani MC. *Descelularização pancreática visando à recelularização como alternativa terapêutica para o Diabetes mellitus tipo 1* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

O Diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1) é uma síndrome causada pela destruição autoimune das células β produtoras de insulina do pâncreas. Nos últimos anos, a Engenharia Tecidual e a Medicina Regenerativa veem sendo amplamente utilizadas para o desenvolvimento de tecidos e órgãos, visando à regeneração de tecidos e até mesmo a geração de novos órgãos. Assim, a utilização deste enfoque para o desenvolvimento de um pâncreas bioartificial, através da combinação de células produtoras de insulina com um arcabouço (*scaffold*) adequado e moléculas biologicamente ativas, constitui uma alternativa extremamente atraente para a terapia do DM1. Visando oferecer soluções concretas para a criação de um pâncreas bioartificial, no presente trabalho, foram estudados quatro tópicos: a) determinação do detergente mais adequado para a descelularização pancreática; b) desenvolvimento de um protocolo de descelularização que permita a descelularização de pâncreas murinos e humanos, mantendo sua arquitetura e ultraestrutura; c) avaliação da melhor forma de manutenção e armazenamento de arcabouços pancreáticos (*scaffolds*) descelularizados; d) avaliação da capacidade de recelularização/repopulação dos arcabouços pancreáticos gerados. Foi desenvolvido um novo protocolo que permite a descelularização tanto de pâncreas de rato (em 31h) quanto de humanos (em 5 dias), remove eficientemente as células e mantém a arquitetura e ultraestrutura dos arcabouços gerados. Ao avaliar os três principais detergentes utilizados em descelularização de órgãos (dodecil sulfato de sódio – SDS, desoxicolado de sódio – DOC e Triton X-100), verificou-se que DOC foi o mais eficiente em nosso protocolo, pois não só removeu as células, mas, também, manteve a ultraestrutura e arquitetura da matriz extracelular remanescente. Para avaliar a melhor condição de armazenamento dos *scaffolds*, foram utilizadas as seguintes condições: tampão fosfato salino (PBSA) mantido à 4°C, tampão fosfato salino suplementado com antibiótico e antimicótico (PBSA-AA) mantido

à 4°C e meio de congelamento de células à -80°C (CRIO). Verificou-se que o armazenamento dos arcabouços pancreáticos descelularizados por um período curto, de até uma semana, pode ser realizado nas três condições avaliadas, porém, para períodos mais prolongados, de até quatro semanas, a condição CRIO é mais adequada, uma vez que apresentou menor perda de proteínas do arcabouço. Estes arcabouços pancreáticos foram testados diante de alguns protocolos de recelularização, mostrando-se passíveis de serem recelularizados. Para um dos protocolos de recelularização, foi desenvolvido um novo modelo de geração de cultura 3D (esferóides) a partir de cultura primária 2D de ilhotas humanas. Verificou-se que os esferóides, interagem com os arcabouços gerados, produzindo insulina e permitindo o controle de número e tipo celular. Assim, ao gerar novas ferramentas promissoras para a descelularização e recelularização pancreática, este trabalho permitiu contribuir para abrir caminhos em direção à geração de um pâncreas bioartificial e possibilitar novos estudos em terapia celular e triagem de novos fármacos para DM1.

Descritores: Diabetes *mellitus* tipo 1; Pâncreas; Matriz extracelular; Órgãos bioartificiais; Medicina regenerativa; Engenharia tecidual; Pâncreas artificial.

ABSTRACT

Mantovani MC. *Pancreatic decellularization aiming at recellularization as an alternative treatment for type I Diabetes mellitus* [thesis]. Sao Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Type 1 Diabetes *mellitus* (T1D) is a syndrome caused by autoimmune destruction of insulin-producing pancreatic β cells. In the past few years, Tissue Engineering and Regenerative Medicine have been widely utilized for development of tissues and organs, aiming at tissues regeneration and even generation of new organs. Therefore, utilization of this approach for development of a bioartificial pancreas by combining insulin-producing cells with an adequate scaffold and bioactive molecules constitutes an extremely attractive alternative for T1D. Aiming at finding concrete solutions for generation of a bioartificial pancreas, in the present study, four topics were explored, namely: a) determination of the most adequate detergent for pancreatic decellularization; b) development of a decellularization protocol to allow decellularization of both murine and human pancreas, maintaining their architecture and ultrastructure; c) determination of the best conditions for maintenance and storage of the decellularized pancreatic scaffolds; d) assessment of the capacity of the decellularized pancreatic scaffolds to be repopulated/recellularized. A new protocol, which allows decellularization of both rat and human pancreas in 31h and 5 days, respectively, which efficiently removes cells and maintains the tissue architecture and ultrastructure, was developed. Evaluation of the main detergents utilized for tissue decellularization (dodecil sodium sulphate – SDS, sodium deoxicolate – DOC and Triton X-100) indicated that DOC was the most efficient in our protocol, since it not only efficiently removed the cells, but, also, maintained the original tissue architecture and ultrastructure in the remaining extracellular matrix of the scaffolds. To assess the best storage conditions for the pancreatic scaffolds, the following conditions were tested: phosphate-buffered saline (PBSA) maintained at 4°C, phosphate-buffered saline supplemented with antibiotic and antimicotic (PBSA-AA) maintained at 4°C and cells freezing medium at -80°C (CRIO). We verified that pancreatic scaffolds may be stored for short periods of

time, of up to a week, under all conditions tested, however, for longer periods of time, of up to four weeks, the CRIO condition is more adequate, since it displayed the lower amount of protein loss from the pancreatic scaffolds. These pancreatic scaffolds were subjected to different recellularization protocols, being amenable to recellularization. In one of these recellularization protocols, we developed a new model for generation of a 3D culture (spheroids) from a 2D human pancreatic islet primary culture. We found that that these spheroids interact with the pancreatic scaffolds, producing insulin and allowing the control of cell type and number. Therefore, upon generating promising new tools for pancreatic decellularization and recellularization, this work contributed by opening new avenues towards generation of a bioartificial pancreas and allowing new studies in cell therapy and drug screening for T1D.

Descriptors: Diabetes *mellitus*, type 1; Pancreas; Extracellular matrix; Bioartificial organs; Regenerative medicine; Tissue engineering, Pancreas artificial.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Diabetes *mellitus*

O Diabetes *mellitus* (DM) compreende um grupo clínico e geneticamente heterogêneo de doenças que apresenta, como característica comum, níveis elevados de glicose no sangue com distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, como consequência da produção ou ação deficiente da insulina pelo organismo, ou ambas. Seus fatores causais, tais como genéticos, biológicos e ambientais, ainda não são completamente conhecidos.¹

As primeiras referências sobre o DM datam, aproximadamente, do ano 1500 a.C., há mais de 3.000 anos, registrados pelos antigos egípcios nos Papiros de Ebers. Nessa mesma época, os indianos relataram que a urina de alguns doentes apresentava sabor adocicado, o que atraía insetos e moscas. Escritos dessas e de outras civilizações antigas (da Ásia Menor, China, Egito e Índia) fazem referência a uma condição caracterizada por sede excessiva (polidipsia), perda de peso, infecções e eliminação de grande quantidade de urina adocicada. A primeira descrição clínica precisa sobre o DM foi realizada no século II pelo grego Aretaeus da Capadócia, o qual também acabou introduzindo o termo Diabetes (do grego, dia= através; betes= passagem) para designar a doença, uma vez que a eliminação excessiva de água recordava-lhe a passagem de água através de um sifão. O adjetivo *mellitus* (do latim, mel) foi acrescentado por Thomas Willis no século XVII, em função do sabor adocicado da urina; que, na verdade, foi uma redescoberta, pois no século VII a.C. o médico indiano Sushruta já mencionava a urina doce, mas este trabalho aparentemente era desconhecido para Willis. Embora a causa do DM ainda fosse desconhecida, esses conhecimentos levaram muitos médicos da época a pesquisarem os órgãos mais afetados pela doença. No início do século XIX, Claude Bernard teorizou que o DM era causado pela quebra do glicogênio estocado no fígado (glicogenólise). No mesmo século, foi demonstrada a correlação do diabetes com o órgão pâncreas, descrito como uma glândula de secreção interna que era importante para a manutenção da homeostase da glicose, de acordo com os experimentos de Oskar Minkowski e Joseph Von

Mering. Já no século XX houve a descoberta da insulina descrita como uma substância capaz de controlar o diabetes, pelos pesquisadores Frederick Banting, Charles Best, James Bertram Collip e John Macleod, resultando na concessão do Prêmio Nobel de Medicina a Banting e MacLeod em 1923.²

Os critérios diagnósticos de DM têm sido debatidos e atualizados ao longo de décadas, mas os critérios atuais da Organização Mundial de Saúde (OMS) postulam que o Diabetes *mellitus* é diagnosticado ao se observar níveis elevados de glicose no sangue³, conforme pode visto de forma resumida na Figura 1.

O DM é uma das maiores emergências globais de Saúde do século XXI, sendo incluído entre as dez principais causas de morte global e, em conjunto com as doenças cardiovasculares, câncer e doenças respiratórias, é considerado responsável por mais de 80% de todas as mortes prematuras.³

Os últimos dados epidemiológicos obtidos no ano de 2017 mostram uma estimativa mundial de 415 milhões de portadores de DM na faixa etária de 20 a 79 anos (adultos), estimando-se que esse número suba 48%, atingindo cerca de 629 milhões de pessoas no ano de 2045 (Figura 2). Neste cenário, o Brasil aparece em quarto lugar para adultos e em terceiro lugar para crianças e adolescentes (idade inferior a 20 anos) portadoras de DM. Além disso, é importante ressaltar que o total de gastos médicos com DM em 2017, apenas em adultos, alcançou o montante de US\$ 727 bilhões, levando à aproximadamente quatro milhões de mortes em indivíduos adultos neste mesmo ano.³

	Glicose em jejum (mg/dL)	Glicose 2 horas após sobrecarga com 75 g de glicose (mg/dL)	Glicose ao acaso	HbA1c (%)	Observações
Normoglicemia	< 100	< 140	–	< 5,7	OMS emprega valor de corte de 110 mg/dL para normalidade da glicose em jejum. ²
Pré-diabetes ou risco aumentado para DM	≥ 100 e < 126*	≥ 140 e < 200#	–	≥ 5,7 e < 6,5	Positividade de qualquer dos parâmetros confirma diagnóstico de pré-diabetes.
Diabetes estabelecido	≥ 126	≥ 200	≥ 200 com sintomas inequívocos de hiperglicemia	≥ 6,5	Positividade de qualquer dos parâmetros confirma diagnóstico de DM. Método de HbA1c deve ser o padronizado. Na ausência de sintomas de hiperglicemia, é necessário confirmar o diagnóstico pela repetição de testes.

OMS: Organização Mundial da Saúde; HbA1c: hemoglobina glicada; DM: diabetes mellitus.

* Categoria também conhecida como glicemia de jejum alterada.

Categoria também conhecida como intolerância oral à glicose.

Figura 1.: Critérios laboratoriais para diagnóstico de normoglicemia, pré-diabetes e Diabetes mellitus. A figura mostra os valores de normalidade para os respectivos exames, bem como os critérios diagnósticos para pré-diabetes e DM mais aceitos e adotados pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Fonte: Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018¹.

Figura 2.: Estimativa mundial e por região de portadores de Diabetes mellitus adultos. A figura mostra os valores estimados mundiais e por região de portadores de DM para os anos de 2017 e estimativas para 2045. Fonte: *International Diabetes Federation* - IDF Diabetes Atlas, 7ª edição³.

1.2. O Pâncreas

O pâncreas humano é um órgão com origem entre a 6ª e a 8ª semana de vida embrionária. Tem origem na endoderme assim como os demais órgãos gastrointestinais. É desenvolvido por meio de duas evaginações (dorsal e ventral), do duodeno primitivo, as quais posteriormente se fundem. A fusão é feita de uma forma mais ou menos completa, assumindo o pâncreas a forma de um órgão único. A evaginação ventral do duodeno primitivo surge de um divertículo hepático, tendo uma relação direta com o canal biliar comum. O canal originário da evaginação ventral origina o canal de Wirsung. O duodeno primitivo no seu crescimento gira para a direita e a evaginação ventral segue esse movimento de rotação também para a direita passando pela face posterior do duodeno, onde se funde com a evaginação dorsal. Isto possibilita a fusão dos canais ventral (Wirsung) e dorsal (Santorini) no nível da cabeça do pâncreas. O esboço ventral origina a porção inferior da cabeça e o *processus uncinatus* do pâncreas; o esboço dorsal origina o corpo e a cauda do pâncreas.⁴

A estrutura anatômica do pâncreas, assim como o canal pancreático e a sua relação com a digestão, foi descrita pelo anatomista Wirsung (1642). O pâncreas humano é um órgão alongado, de cerca de 20 – 25 centímetros de comprimento, 5 centímetros de largura e 1 – 2 centímetros de espessura, pesando cerca de 100 – 150 gramas. Anatomicamente, é dividido em: cabeça, corpo e cauda (Figura 3). A cabeça está situada na curvatura do duodeno, o corpo cruza a linha média do abdômen e a cauda é estendida na direção do baço.^{5,6,7}

O pâncreas humano é envolvido pelo peritônio e por uma cápsula de tecido conjuntivo frouxo ou moderadamente denso, que envia septos para o seu interior, dividindo-o em lóbulos. É uma glândula mista, com uma porção endócrina, composto pelas ilhotas pancreáticas (ou ilhotas de Langerhans), que secretam hormônios para a corrente sanguínea, e uma porção exócrina, composta por células serosas, que produzem enzimas digestivas, as quais são secretadas e liberadas no duodeno.^{5,8}

A porção exócrina consiste de uma glândula acinosa composta serosa. Essa porção produz, além de íons e água, as seguintes enzimas e pró-enzimas digestivas: tripsinogênio, quimiotripsinogênio, carboxipeptidase, ribonuclease, desoxiribonuclease, triacilglicerol lipase, fosfolipase, elastase e amilase. O controle da secreção pancreática é realizado, principalmente, pelos hormônios secretina e colecistoquinina, produzidos por células enteroendócrinas dispostas entre as células epiteliais do duodeno.⁸ As células serosas sintetizam os precursores dessas enzimas digestivas. Essas pró-enzimas são armazenadas em grânulos (os grânulos de zimogênio) na porção apical da célula, sendo liberadas, através de ductos, para o duodeno, onde são ativadas.⁶

Os ductos intercalares iniciam no interior dos ácinos e produzem um líquido seroso alcalino, rico em bicarbonato, que contribui para neutralizar o quimo ácido que chega ao duodeno. Os ductos intercalares continuam como ductos intra-lobulares, e estes confluem no ducto pancreático principal, o qual percorre o pâncreas longitudinalmente e se une ao ducto biliar comum (ou ducto colédoco), desembocando no duodeno.^{5,6}

No pâncreas existem dois ductos principais: o ducto pancreático principal (Wirsung) e o ducto acessório (Santorini). O ducto de Wirsung percorre o corpo e a cauda do pâncreas em uma localização mediana. O ducto de Santorini, em 60% da população, drena diretamente para o duodeno, através de uma papila acessória. Em até 30% dos casos, o ducto de Santorini termina como um canal acessório cego, sem saída para o duodeno, ou não existe.⁴

A porção endócrina é composta pelas ilhotas pancreáticas ou ilhotas de Langerhans, classificadas como epitélio glandular endócrino cordonal. As ilhotas de Langerhans foram descritas, pela primeira vez, pelo seu homônimo – Paulo Langerhans - em 1969, como sendo ilhas de populações mistas de células endócrinas que estão espalhadas no parênquima pancreático. Estudos prévios estimam que o número total de ilhotas em um pâncreas humano seja de 3,2 e 14,8 milhões, com um volume total de ilhotas de 0,5 a 2,0 cm³. A composição e arquitetura celular das ilhotas pancreáticas diferem entre as espécies. As ilhotas humanas são compostas de cerca de 30% de células α -

produtoras de glucagon, 60% de células β - produtoras de insulina, peptídeo C e amilina, sendo o restante, cerca de 10%, de células δ - produtoras de somatostatina, células γ ou PP - produtoras de polipeptídeos pancreáticos, células ϵ - produtoras de grelina e outros tipos celulares de ilhotas que vem sendo descobertos, distribuídas de forma aleatória por toda a ilhota (Figura 3). As ilhotas murinas, amplamente utilizadas na pesquisa biomédica, possuem uma arquitetura diferente com um núcleo de células β circundadas por outros tipos de células endócrinas.^{9,10}

Figura 3.: O Pâncreas - classificação anatômica e histologia. A Figura ilustra a divisão anatômica do pâncreas macroscopicamente em cabeça, corpo e cauda. A Figura também ilustra microscopicamente a distribuição da ilhota de Langerhans no parênquima pancreático exócrino (células acinares) e a composição celular de uma ilhota pancreática. Os hormônios provenientes dos diversos tipos celulares do pâncreas endócrino (células α , β , δ , PP, ϵ e outros tipos celulares) caem diretamente no sistema sanguíneo ilustrados na forma de vasos sanguíneos. Fonte: a autora, utilizando dos moldes disponíveis gratuitamente pelo grupo *Smart Servier Medical Art* disponível em: https://smart.servier.com/smart_image/islet-of-langerhans-2/.

As células α secretam glucagon, que age principalmente sobre os hepatócitos, ativando as enzimas responsáveis pela degradação do glicogênio

em glicose (glicogenólise) e pela síntese de glicose a partir de lipídios e aminoácidos (gliconeogênese).⁶ O glucagon é o contra-hormônio da insulina, sendo um hormônio típico do estado de jejum. Essa regulação concertada pela secreção de glucagon e de insulina é um dos principais mecanismos para a regulação da glicemia, onde a função da resposta contra-reguladora do glucagon garante a prevenção da hipoglicemia, resposta esta que é prejudicada no diabetes melito.⁹

As células β são as mais abundantes e secretam insulina, peptídeo C e amilina. De forma simplificada, a célula beta é capaz de secretar a insulina em resposta à variação da concentração de glicose. A insulina é estocada em forma de grânulos celulares, na concentração de 100mM, complexadas ao Zinco (formando hexômeros), sendo a alta concentração de glicose seu principal secretagogo, embora outros nutrientes, neurotransmissores, incretinas e medicamentos possam induzir a liberação desse hormônio, possibilitando a entrada da glicose nas células, diminuindo os seus níveis no sangue.⁹ Na células β , a glicose leva à ativação de isoformas da fosfolipase C, promovendo a hidrólise de fosfolípides de membrana e gerando inositol 1-4-5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), aumentando a concentração de cálcio no citossol, ativando as proteínas dos grânulos secretórios de insulina, promovendo a ativação do sistema de microtúbulos e microfilamentos, responsável pela translocação desses grânulos para as proximidades da membrana plasmática e consequente exocitose.¹¹ A secreção de insulina estimula a captação da glicose pelas células do corpo, diminuindo, assim, a concentração de glicose no sangue. Quando o nível de glicose no sangue diminui, as células- α secretam glucagon, que estimula a hidrólise do glicogênio do fígado em glicose, aumentando, assim, a concentração de glicose no sangue entre as refeições.⁸

O peptídeo C é produzido durante a síntese da insulina, e, após sua descoberta em 1967, acreditou-se que o peptídeo C poderia exercer efeitos fisiológicos semelhantes aos da insulina, porém nenhuma influência sobre o metabolismo de glicose ou lipídios foi demonstrado, de forma que o peptídeo C foi considerado como um produto residual da síntese de insulina. Porém, na

década de 90 uma série de estudos revelaram que a administração do peptídeo C, em concentrações fisiológicas, resultou em melhorias significativas em modelos animais de diabetes induzida. A informação disponível hoje inclui estudos da interação do peptídeo C com membranas celulares e suas propriedades de sinalização intracelular bem como melhorias na função do rim, de nervos periféricos e do sistema nervoso central em diabéticos.¹²

A amilina é um peptídeo neuroendócrino co-localizado e co-secretado com insulina a partir de células β pancreáticas, modulando a ação da mesma. Anormalidades no dobramento da amilina humana, secreção e ação têm efeitos prejudiciais na função das ilhotas e regulação da glicose, podendo levar à formação de placas amilóides, associadas à disfunção nas células β no diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). Além disso, a amilina humana pode modular a auto-imunidade e a inflamação inata através células T reguladoras e impactar tanto no diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) quanto no DM2.¹⁰

As células δ (ou D) ou representam cerca de 10% da população de células presentes na ilhota e produzem somatostatina, que inibe a secreção exócrina e endócrina do pâncreas e reduz as contrações musculares do tubo digestório e da vesícula biliar. As células δ liberam polipetídeo intestinal vasoativo, que induz a glicogenólise e regula o tônus e a motilidade intestinal.^{6,9}

As células PP (ou F ou γ) representam cerca de 1 a 2% da população de células e sintetizam o polipeptídeo pancreático, o qual inibe as secreções exócrinas do pâncreas e, no estômago, estimula a liberação de enzimas pelas células principais e de ácido clorídrico pelas células parietais. Além disto, inibe a secreção de glucagon em baixa concentração de glicose, sendo que sua principal função parece ser a de um hormônio de saciedade.^{6,9}

As células ϵ representam de 0,5 a 1% da população de células da ilhota e sintetizam grelina, que estimula o apetite por ação no hipotálamo e a liberação de hormônio de crescimento na adenohipófise.^{8,9}

Outros tipos de células de ilhotas foram descritos na literatura, contendo, serotonina (células enterocromafins), gastrina (células G) e grânulos de conteúdo ainda desconhecido e de informações ainda muito escassas.⁹

1.3. Classificação do Diabetes *mellitus*

A classificação atual do DM é baseada em sua etiologia¹³ sendo considerados quatro grupos: Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), Diabetes *mellitus* gestacional e outros tipos de DM,¹ detalhados na Figura 4.

DM tipo 1:	
1	- Tipo 1A: deficiência de insulina por destruição autoimune das células β comprovada por exames laboratoriais; - Tipo 1B: deficiência de insulina de natureza idiopática.
2	DM tipo 2: perda progressiva de secreção insulínica combinada com resistência à insulina
3	DM gestacional: hiperglicemia de graus variados diagnosticada durante a gestação, na ausência de critérios de DM prévio
4	Outros tipos de DM:
	- Monogênicos (MODY); - Diabetes neonatal; - Secundário a endocrinopatias; - Secundário a doenças do pâncreas exócrino; - Secundário a infecções; - Secundário a medicamentos.

DM: diabetes *mellitus*; MODY: Maturity-Onset Diabetes of the Young.

Figura 4.: Classificação etiológica do Diabetes *mellitus*. Fonte: American Diabetes Association, 2017^{1#} apud Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018¹.

1.4. O Diabetes *mellitus* tipo 1

O DM1 é de natureza autoimune, poligênica, sendo decorrente da destruição auto-imune das células β pancreáticas, ocasionando deficiência relativa ou absoluta na produção de insulina. O grau de destruição celular é variável, sendo mais rápido e intenso em crianças e adolescentes ou de instalação mais lenta, em adultos, podendo reter a função residual das células β por até alguns anos após o diagnóstico.¹⁴ O DM1 corresponde a apenas 5 a 10% de todos os casos de DM, afetando igualmente homens e mulheres, sendo mais frequentemente diagnosticado em crianças, adolescentes e, em alguns casos, em adultos jovens.¹ Pode-se ainda subdividir o DM1 em dois tipos assim caracterizados:

^{1#} American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. Diabetes Care. 2017; 40(Suppl 1):S1-131.

a) tipo 1A: presença laboratorial de auto-anticorpos circulantes – positividade de um ou mais auto-anticorpos; descrito como a forma mais frequente de DM1, compreendendo 90% dos casos de DM1 da infância e 5% a 10% daqueles de início na idade adulta, visto que 40% do DM1A ocorre até os 20 anos de idade. Apresenta forte associação com o antígeno leucocitário humano (HLA) locus de suscetibilidade para DM1A denominado IDDM1.¹⁴ Além da predisposição genética, a fisiopatologia do DM1A envolve fatores ambientais, tais como: infecções virais, componentes dietéticos e certas composições da microbiota intestinal que são capazes de desencadear a resposta autoimune.¹

b) tipo 1B ou idiopático: ausência laboratorial de auto-anticorpos circulantes, idiopático e auto-anticorpos não são detectáveis na circulação. O diagnóstico apresenta limitações e pode ser confundido com outras formas de DM diante da negatividade dos auto-anticorpos circulantes, sendo as recomendações terapêuticas as mesmas do DM1A, não havendo evidências de riscos distintos para as complicações crônicas entre os subtipos até o momento.^{1,15}

Os principais sinais e sintomas de portadores do DM1 incluem: polidipsia e boca seca, poliúria, falta de energia, fadiga, polifagia, perda de peso repentina, visão embaçada e suores noturnos.³

Embora o DM1 seja menos comum na população geral, quando comparado ao DM2, a incidência ainda aumenta em cerca de 3% ao ano, particularmente entre as crianças. Cerca de 132.600 crianças e adolescentes abaixo de 20 anos são diagnosticados com DM1 todos os anos, onde o Brasil ocupa o terceiro lugar, com 88.300 casos, precedido apenas pelos Estados Unidos (169.900) e pela Índia (128.500), e, quando não bem manejado, pode levar essas crianças e adolescentes a uma expectativa de vida muito curta.³

1.5. Tratamentos do Diabetes *mellitus* tipo 1: manejo da hiperglicemia

Grande parte das co-morbidades associadas ao DM está diretamente relacionada ao grau de controle metabólico, assim, como o DM1 se caracteriza

por produção insuficiente de insulina, o tratamento medicamentoso depende da reposição desse hormônio, utilizando-se de esquemas e formulações variados e estabelecendo-se “alvos glicêmicos” pré e pós-prandiais a serem alcançados, com o intuito de se atingir o perfil mais próximo possível do fisiológico. Diferentes esquemas terapêuticos podem ser utilizados no tratamento de indivíduos com DM1.¹

As seguintes alternativas terapêuticas estão atualmente disponíveis para o tratamento do DM1: a) insulinoterapia; b) transplante de pâncreas órgão total; c) transplante de ilhotas pancreáticas, ainda considerado experimental, porém já realizado clinicamente em alguns países, sendo capaz de recompor o padrão fisiológico de secreção de insulina e tornar o portador de DM1 independente das aplicações diárias de insulina.

A insulinoterapia em esquema intensivo (*basal-bolus*), seja com múltiplas aplicações de insulina ao dia, seja com sistema de infusão contínua de insulina (SICI), constitui a terapêutica fundamental, devendo ser aliada à terapia nutricional com contagem de carboidratos, automonitorização e prática regular e planejada de atividade física, a fim de complementar o tratamento, cujo objetivo principal é o bom controle metabólico, com o intuito de se adiar as complicações crônicas advindas de mau controle glicêmico e evitar hipoglicemias, principalmente as mais graves, noturnas que podem passar despercebidas.¹

O transplante de pâncreas órgão total foi realizado a primeira vez em 1966 nos Estados Unidos da América sendo, a princípio, associado a altas taxas de morbidade e mortalidade, passando por avanços consideráveis, permitindo que, atualmente, os grandes centros transplantadores consigam a manutenção da homeostase glicêmica a longo prazo,^{16,17} em cerca de 95% (dados americanos) e 83% de sobrevivência desses paciente após um ano do procedimento.¹ Na atualidade, o número de transplantes de pâncreas é estável; em alguns países, inclusive, apresentou redução, que pode ser relacionada com as melhores opções de tratamento (insulinas e bombas), e, contrariamente, o aumento significativo da obesidade e da idade da população,

além da piora da qualidade da manutenção dos potenciais doadores em morte encefálica.¹⁸

O transplante de ilhotas pancreáticas humanas é um método de Terapia Celular considerado como uma boa opção para pacientes portadores de DM1, sendo uma alternativa interessante ao transplante de pâncreas órgão total para pacientes com DM1 instável, hiperlábil, por este procedimento ser tecnicamente mais simples, apresentando baixa morbidade pela simplicidade cirúrgica e pela eliminação de possíveis complicações associadas à porção exócrina do pâncreas, presentes no transplante de pâncreas órgão total.^{19,20}

Em 1972 foi descrita a primeira tentativa de isolar e transplantar ilhotas pancreáticas em ratos.²¹ Em 1977, foi descrito o primeiro transplante de ilhotas pancreáticas em humanos.²² Mas, somente em 2000, com a publicação do Protocolo de Edmonton, é que foi possível atingir independência de insulina em sete pacientes de DM1 que receberam ilhotas de múltiplos doadores e foram tratados com protocolo imunossupressor livre de esteróides.²³ Assim, o isolamento e transplante de ilhotas pancreáticas deixou de ser um procedimento experimental e se tornou um procedimentos clínico, em alguns países do Mundo, incluindo Canadá, Austrália, Reino Unido, Suíça, Itália, França e outros países da Europa; enquanto que em outros, inclusive no Brasil, ainda é considerado como sendo de natureza experimental, com eficácia satisfatória em pacientes de DM1 hiperlábeis, que possuem episódios hipoglicêmicos graves e labilidade glicêmica, não podendo ser estabilizados através das terapias tradicionais. Em 2001, foi criado um Registro Colaborativo de Transplante de Ilhotas - CITR (do inglês, *Collaborative Islet Transplant Registry*) (<http://www.citregistry.org>) criado com o intuito de acelerar, ainda mais, o progresso e promover a segurança no transplante de ilhotas através da coleta, análise e comunicação de dados abrangentes e atuais sobre todos os transplantes de ilhotas realizados na América do Norte e em alguns centros europeus, australianos e asiáticos. Em seu último relatório disponível, 10º Relatório Anual de 2017, este consórcio reporta um total de 2.150 infusões de ilhotas provenientes de 2.619 doadores em 1.086 receptores (transplante alogênico), desde o ano 1999 até 2015, mostrando um aumento de 12% no

número total de procedimentos de infusão de ilhotas comparado com o último relatório de 2016 ²⁴ (Tabela 1).

Porém, apesar de promissora, muito ainda precisa ser feito para se superar algumas dificuldades neste tipo de procedimento, dentre as quais o declínio progressivo na funcionalidade das ilhotas transplantadas,^{25,26} nos levando a acreditar que a adaptação das ilhotas implantadas ao seu novo microambiente pode desempenhar um papel crucial neste contexto.

Tabela 1.: Dados totais de alo-enxertos, doadores e infusões incluídos no 10º Relatório Anual de 2017 do CITR (1999 – 2015).

	Transplante de ilhotas			Ilhotas após Rim			Ilhotas e Rim Simultâneos			Rim após Ilhotas			
	América do Norte	Europa / Ásia / Austrália	Total	América do Norte	Europa / Ásia / Austrália	Total	América do Norte	Europa / Ásia / Austrália	Total	América do Norte	Europa / Ásia / Austrália	Total	Totais Globais
Receptores	504	373	877	79	104	183	1	23	24	2	0	2	1.086
Infusões	1.002	760	1.762	138	196	334	1	48	49	5	0	5	2.150
Doadores	1.081	1.129	2.190	147	225	372	1	51	52	5	0	5	2.619

Fonte: Tabela adaptada da original apresentada no 10º Relatório Anual de 2017 do CITR.²⁴ Disponível em: <http://www.citregistry.org>.

1.6. Medicina Regenerativa e Engenharia Tecidual

O desenvolvimento e aplicação da Medicina Regenerativa e Engenharia Tecidual vem sendo aprimorados nos últimos anos, contando com as mais diversas ferramentas, como: enxertos, materiais, arcabouços, fatores peptídicos de crescimento e diferenciação celular, que controlam a formação dos tecidos e manipulação de fontes celulares.^{27,28} Essa nova área do conhecimento vem facilitado o desenvolvimento de tecidos e órgãos para o tratamento de tecidos injuriados ou degenerados.^{29,30,31} Tem-se observado que a Biologia do Desenvolvimento está começando a abordar não apenas a formação de tecidos, mas a papel específico que as células desempenham em processos regenerativos, integrando descobertas científicas básicas com novos materiais, promovendo a geração de biomateriais inteligentes para reparação tecidual. Do mesmo modo, novas fontes celulares, com maior

atenção para as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs, do inglês *induced pluripotent stem cells*), surgiram, tornando as terapias celulares baseadas em células autólogas uma possibilidade real, indicando que esse é um verdadeiramente um campo translacional, no qual os avanços estão permitindo caminhar para a prática clínica a velocidade cada vez maior.²⁸

A utilização da Medicina Regenerativa e da Engenharia Tecidual para o desenvolvimento de um pâncreas artificial, por meio da combinação apropriada de células com um arcabouço (*scaffold*) adequado e moléculas biologicamente ativas, constitui uma alternativa extremamente atraente para a terapia do DM1.

1.7. A Matriz Extracelular (MEC)

A matriz extracelular (MEC) é o componente não-celular presente em todos os tecidos e órgãos, fornecendo não apenas o suporte físico essencial para os constituintes celulares, mas, também, iniciando importantes estímulos bioquímicos e biomecânicos que são necessários para a morfogênese, diferenciação e homeostase dos tecidos. A MEC é composta essencialmente por água, proteínas e polissacarídeos, porém, cada tecido possui uma MEC com uma composição e topologia únicas, sendo gerada durante o desenvolvimento do próprio tecido através da comunicação entre diversos componentes celulares (células epiteliais, fibroblastos, adipócitos, células endoteliais) e o microambiente celular e proteico em evolução.³²

Estruturalmente, está dividida em membrana basal, uma forma especializada de MEC que separa o tecido epitelial ou endotelial do tecido conectivo; matriz conectiva, que circunda e fornece um arcabouço estrutural às células; e matriz sanguínea, que é o plasma sanguíneo.³³ Participa de vários eventos celulares, tais como adesão, migração, proliferação, diferenciação celular, apoptose, angiogênese e sinalização celular, através do armazenamento de fatores de crescimento, citocinas e outras moléculas de sinalização solúveis.^{32,33}

Os principais componentes da MEC são componentes fibrilares (colágenos fibrilares, laminina, fibronectina, elastina), componentes não-fibrilares (proteoglicanos e glicosaminoglicanos), microfibrilas (colágenos não-fibrilares e microfibrilas associadas à elastina) e enzimas de reciclagem de matriz (metaloproteinases, catepsinas, heparanase)³³ (Figura 5). Em ilhotas pancreáticas, a MEC se distribui nas regiões extra- e intracelulares, associada com a microvasculatura permeável das mesmas, com a presença dos colágenos tipos I, III, IV, VI, com prevalência do colágeno IV, fibronectina, laminina e a presença de vitronectina apenas em tecidos em desenvolvimento e ausente em tecidos maduros.^{34,35}

Figura 5.: Principais componentes da matriz extracelular – MEC. Principais componentes da MEC: componentes fibrilares (colágenos fibrilares, laminina, fibronectina, elastina), componentes não-fibrilares (proteoglicanos e glicosaminoglicanos), microfibrilas (colágenos não-fibrilares e microfibrilas associadas à elastina) e enzimas de reciclagem de matriz (metaloproteinases, catepsinas, heparanase). Fonte: Figura adaptada a partir da figura disponível no site da empresa *The National Programme on Technology Enhanced Learning* (NPTEL), Informações sobre Biotecnologia, Biologia Celular, em seu módulo 1: estrutura e função celular, item 8: matriz extracelular, com fonte primária pertencente ao livro *Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments*, Gerald Karp, 2010. Disponível em: <https://nptel.ac.in/courses/102103012/8em>.

Durante o processamento do tecido pancreático para isolamento das ilhotas pancreáticas para o transplante, existe uma etapa de digestão mecânica

e enzimática do órgão (pâncreas), com collagenases e proteases, processo que além de permitir a liberação das ilhotas pancreáticas do tecido exócrino leva muitos danos aos componentes da MEC que circunda as ilhotas e interconectam as células endócrinas, afetando a função das ilhotas pancreáticas, que entram em diferentes processos de morte como necrose e apoptose, principalmente *anoikis*, uma forma de morte celular programada que ocorre quando células dependentes de ancoragem são desassociadas da MEC circundante.³⁶ A restauração da MEC pode reduzir a morte celular e aumentar a sobrevivência dos enxertos de ilhotas pancreáticas isoladas. A introdução dessas ilhotas em uma nova MEC pode aumentar a sobrevivência e funcionalidade dos enxertos de ilhotas pancreáticas isoladas, uma vez que estudos já demonstraram que a MEC regula a sobrevivência, secreção de insulina e proliferação, além de ajudar na preservação e restauração da morfologia das ilhotas esféricas.³⁵

1.8. Descelularização de Órgãos

Órgãos e tecidos são compostos de uma MEC de composição única, microestruturas com propriedades biomecânicas, que mantém sinais distintos nas células residentes.³⁷ Um esqueleto (*scaffold*) de material adequado e moléculas biologicamente ativas - *scaffolds* tridimensionais (3D) - desempenham um papel crítico na Medicina Regenerativa e Engenharia Tecidual. Idealmente, o *scaffold* fornece um nicho microambiental igual ou semelhante à matriz extracelular nativa, quando possui células semeadas.³⁸ A MEC influencia a mitogênese celular, a quimiotaxia e a diferenciação celular direta, induzindo a remodelação construtiva do tecido.^{39,40,41,42,43,44} É provável que a ultraestrutura tridimensional, a topologia da superfície e a composição da matriz extracelular contribuam para estes efeitos.⁴⁵ Diversos materiais sintéticos e naturais tem sido explorados com o objetivo de restaurar a perda de sinais críticos entre ilhotas nativas e seu ambiente de MEC após o isolamento das ilhotas pancreáticas. Entretanto, a maioria dos trabalhos descritos utiliza estes *scaffolds* “engenheirados” com a adição de uma única

proteína de MEC purificada, o que não é suficiente para mimetizar completamente a composição e ultraestrutura da MEC pancreática.^{46,47}

Matrizes acelulares de órgãos inteiros provêm um *scaffold* atraente que pode ser repopulado com células de diferentes tipos para a geração de um órgão ou tecido engenheirado. Esse órgão ou tecido é semelhante ao original, incluindo sua arquitetura tridimensional e preservando o conjunto espacial de componentes da MEC, da rede vascular e de suas propriedades biomecânicas.

O conceito de descelularização por perfusão de órgãos inteiros, foi proposto, recentemente, para a geração de *scaffolds* nativos de MEC a partir de órgãos complexos, como, por exemplo, o coração^{48,49}, o fígado⁵⁰, o pulmão⁴⁷, o rim⁵¹, o intestino⁵² e, mais recentemente, o pâncreas.^{53,54,55} Válvulas cardíacas, vasos sanguíneos, pele, nervos, músculo esquelético, tendões, ligamentos, submucosa intestinal, bexiga e fígado também têm sido estudados para aplicações em Engenharia Tecidual e Medicina Regenerativa.³⁸

Recentemente, diversos trabalhos têm descrito sistemas de MEC reconstituída promovendo a sobrevivência e função de ilhotas isoladas e das células β -pancreáticas.^{56,57} MECs naturais, derivadas de tecidos nativos e órgãos, podem proporcionar estes efeitos provendo um *scaffold* fisiologicamente relevante, que recapitula o complexo microambiente existente *in vivo*.

Alguns trabalhos têm mostrado aumento da funcionalidade de ilhotas pancreáticas quando estas são cultivadas em matrizes descelularizadas, derivadas de submucosa de intestino curto⁵⁸ e de partes do pâncreas⁵³. Trabalhos utilizando partes de pâncreas descelularizados bidimensionais (2D) revelaram benefícios dessa estratégia para suportar e manter o funcionamento das ilhotas.^{53,59}

A importância do *scaffold* 3D é bastante reconhecida por representar melhor o complexo microambiente *in vivo*, sendo importante para a regulação do comportamento celular.⁶⁰ O objetivo principal de um protocolo de descelularização é remover eficientemente todo o material celular e nuclear, sem causar alteração na composição, atividade biológica e integridade

mecânica da MEC. Os melhores agentes para descelularização de tecidos e órgãos vão depender de alguns fatores, incluindo a celularidade do tecido, densidade, conteúdo lipídico e espessura. É necessário que se entenda que todo agente e método de descelularização poderá alterar a composição da matriz extracelular e causar algum grau de ruptura em sua ultraestrutura.⁶¹

Os métodos de descelularização envolvem uma combinação de tratamentos físicos e químicos. Os tratamentos físicos podem incluir agitação ou sonicação, ação ou pressão mecânica ou congelamento e descongelamento. Estes métodos rompem a membrana celular e liberam os conteúdos celulares. Tratamentos enzimáticos - como tripsina - e tratamentos químicos, como o uso de soluções iônicas e detergentes, rompem a membrana celular e ligações responsáveis pelas conexões intra e extracelular.⁶¹

Para a descelularização pancreática, a literatura relata diferentes protocolos empregando basicamente três tipos de detergentes e/ou mistura entre eles: dodecil sulfato de sódio – SDS^{62,63,64,65}, desoxicolado de sódio – DOC^{59,66,67,68} e Triton X-100^{53,54,55,62,63,65,66,69,70,71,72,73,74,75,76}. Dessa forma, os métodos disponíveis na literatura variam muito entre os autores, e, até o momento, não foi descrito um padrão-ouro para descelularização pancreática. Além disso, não foi relatado protocolo algum que permita a descelularização de pâncreas de diferentes espécies, nem protocolos para a manutenção desse arcabouço *in vitro* até o momento de sua utilização.

1.9. Recelularização

Goh e colaboradores⁵⁴ foram os pioneiros em propor a recelularização de pâncreas inteiro, gerando um *scaffold* 3D a partir de órgão (pâncreas) inteiro descelularizado de camundongo, através da técnica de perfusão-descelularização, utilizando esse biomaterial/*scaffold* 3D como suporte do tecido pancreático engenheirado para a regeneração do órgão. Este pâncreas foi reconstituído com duas linhagens celulares: AR42J linhagem acinar murina e MIN-6 de células β endócrinas provenientes de um insulinoma murino,

conseguindo manter a arquitetura 3D, a vasculatura e os canais ductais, com aumento na produção de insulina⁵⁴, entretanto, a recelularização do *scaffold* 3D proveniente de órgãos inteiros ainda precisa ser cuidadosamente analisada.

Para a recelularização visando um tratamento do DM1 há a necessidade de células produtoras de insulina, as quais podem ser provenientes das mais diversas fontes: ilhotas pancreáticas isoladas de pâncreas de doadores cadáveres⁵⁵, expansão *in vitro* de células β pancreáticas⁷⁷, células tronco como fonte de células produtoras de insulina (células tronco embrionárias⁷⁸, células tronco adultas⁷⁹, precursoras pancreáticas⁸⁰, células tronco mesenquimais e hematopoiéticas⁸¹), transdiferenciação e reprogramação direta⁸² e células iPSCs⁸³.

Com base no que foi exposto, está claro que existe uma grande expectativa mundial em relação ao tratamento do DM1; entretanto, inúmeros desafios para a otimização dos métodos de descelularização e reconstituição pancreática ainda existem e precisam ser enfrentados. Esforços de equipes médicas e laboratoriais promoveram um grande avanço desta metodologia nos últimos anos, com a busca por soluções se concentrado, entre outros tópicos, em tentativas de mimetizar o microambiente pancreático. No âmbito da Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa a Bioengenharia de pâncreas seria uma alternativa terapêutica potencial para o tratamento do DM1.

Neste trabalho foram estudados quatro tópicos, visando oferecer soluções para a criação de um pâncreas bioartificial: a) escolha de um detergente mais adequado ao processo de descelularização de pâncreas; b) desenvolvimento de um protocolo de descelularização que permita a descelularização de órgãos murinos e humanos; c) escolha da melhor forma de manutenção e armazenamento de arcabouços descelularizados *in vitro*; d) análise da capacidade de recelularização desses arcabouços gerados.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver um arcabouço (*scaffold*) pancreático descelularizado, com preservação da matriz extracelular, visando sua reconstituição através da adição de células β com o intuito de gerar um pâncreas “bioengenheirado” para a reversão do Diabetes *mellitus* do tipo 1.

2.2. Objetivos Específicos

Os Objetivos Específicos são:

1. Descelularizar pâncreas murinos utilizando um protocolo novo, adaptado a partir da literatura, padronizando as técnicas de: a) canulação, b) isolamento, c) perfusão, e d) descelularização utilizando um protocolo detergente-enzimático.
2. Analisar os pâncreas murinos descelularizados quanto à histologia, presença de ácido desoxiribonucleico (DNA), proteínas, glicosaminoglicanos de matriz extracelular e ausência dos diversos tipos celulares, por meio de: 1) Microscopia Óptica, utilizando as colorações - Hematoxilina e Eosina (HE), - Azul de Alcian (AB), - Resorcina-Fucsina com oxidação em Oxona (RFO), - Vermelho de Picrossírius (PSH) e - Azul de Toluidina (AT); 2) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET); e, 3) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
3. Avaliar o grau de preservação das matrizes descelularizadas murinas ao longo do tempo.
4. Isolar, cultivar e caracterizar as frações pancreáticas de ilhotas murinas.
5. Recelularizar a matriz pancreática murina com cultura primária de células β isoladas a partir de pâncreas murinos.

6. Analisar os pâncreas murinos recelularizados quanto à histologia e conteúdo de DNA.
7. Captar pâncreas de doadores de órgãos humanos.
8. Descelularizar pâncreas humanos obtidos de doadores com morte encefálica utilizando um protocolo novo adaptado da literatura padronizando as técnicas de: a) captação, b) canulação, c) perfusão, e d) descelularização utilizando um protocolo detergente-enzimático.
9. Analisar os pâncreas humanos descelularizados quanto à histologia e à presença de proteínas e glicosaminoglicanos de matriz extracelular e ausência dos diversos tipos celulares, por meio de: 1) Microscopia Óptica, utilizando as colorações - Hematoxilina e Eosina (HE), - Azul de Alcian (AB), - Resorcina-Fucsina com oxidação em Oxona (RFO), - Vermelho de Picrossírius (PSH) e - Azul de Toluidina (AT); 2) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET); e, 3) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
10. Isolar, cultivar e caracterizar as frações pancreáticas de ilhotas humanas.
11. Recelularizar a matriz pancreática humana com células de cultura primária de células beta pancreáticas isoladas a partir de pâncreas humanos.
12. Analisar os pâncreas humanos recelularizados quanto à histologia e conteúdo de DNA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL - <http://www.usp.br/nucel>) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), dentro do Programa de Ciências Médicas, na área de concentração de Distúrbios Genéticos, do Desenvolvimento e do Metabolismo.

O presente protocolo de pesquisa envolveu o uso de animais (ratos - *Rattus norvegicus*) e seres humanos, por esse motivo foi submetido tanto ao Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) quanto ao Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos (CEP).

Dessa forma, o protocolo de pesquisa foi submetido e aprovado pelo CEUA da FMUSP (protocolo número 117/15) em reunião de 15 de julho de 2015 (Anexo A).

Quanto a submissão ao CEP, o presente estudo, como sendo parte integrante de um projeto de pesquisa maior, aprovado e fomentado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Edital número 47/2013 - Novas Terapias Portadoras de Futuro, uma parceria entre Ministério de Ciência Tecnologia e Inovação – MCTI / CNPq / Câmara Técnica de Saúde - CT-Saúde / Câmara Técnica de Biotecnologia - CT-Biotecnologia / Ministério da Saúde – MS / Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos – SCTIE / Departamento de Ciências e Tecnologia – DECIT; intitulado Descelularização e reconstrução de pâncreas visando transplante e reversão do Diabetes *mellitus* do tipo I (Processo número: 457601/2013-2) (Anexo B), foi submetido dentro deste contexto à Plataforma Brasil (<http://plataformabrasil.saude.gov.br/>) e aprovado pelo CEP-FMUSP, sob o número de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 47887115.6.0000.0065, e número do Parecer: 2.695.463 (Anexo C), sem necessidade de apreciação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

3.1. Tipo de Estudo

Estudo de pesquisa aplicada (quanto à finalidade), pesquisa experimental (quanto à natureza), pesquisa exploratória (quanto aos objetivos), pesquisa de laboratório (quanto aos procedimentos técnicos), utilizando diferentes técnicas de abordagens qualitativas e quantitativas, e de maneira prospectiva (quanto ao desenvolvimento no tempo)⁸⁴, conduzido essencialmente no NUCEL – FMUSP, contando ainda com:

- os experimentos histológicos e de microscopia eletrônica de transmissão, que foram realizados no Laboratório de Investigação Médica - LIM59 – FMUSP;
- os experimentos de secagem em ponto crítico e recobrimento com ouro das amostras, para microscopia eletrônica de varredura, que foram conduzidos no laboratório aos cuidados da Profa. Dra. Maria Cecília Barbosa da Silveira Salvadori no Instituto de Física da USP, com as imagens sendo adquiridas na Central Analítica do Instituto de Química (IQ) da USP e no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da USP;
- alguns experimentos cujas imagens foram adquiridas por Microscopia Confocal, para os quais o imageamento foi realizado no Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem - CADi, em nome da Dra. Rosi Eli Grassi Rici, da FMVZ da USP;
- os experimentos de espectroscopia, que foram realizados no Laboratório de Espectroscopia Molecular (LEM) do Instituto de Química (IQ) da USP;
- os cortes grossos e finos dos arcabouços descelularizados, que foram realizados no criostato do laboratório aos cuidados da Profa. Dra. Bettina Malnic do Instituto de Química (IQ) da USP;
- as dosagens de insulina e lactato desidrogenase (LDH), com utilização de kits diagnósticos clínicos humanos, que foram realizados no Laboratório Clínico do Hospital Universitário (HU) da USP.

3.2. População de Estudo

O presente trabalho foi desenvolvido com base em: 1) experimentação animal, envolvendo o uso ratos Wistar, que são uma linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus*, desenvolvida no Instituto Wistar na Filadélfia (http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=rato&id_ani=17&caract=sim), do sexo masculino, pesando aproximadamente 300-500 gramas; 2) experimentação com órgãos humanos (pâncreas) de doadores falecidos com morte encefálica declarada, ofertados pela Central de Transplantes do Estado de São Paulo, previamente recusados pelas equipes de transplante clínico de pâncreas e autorizados para doação para pesquisa pelas famílias, aceitos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão estipulados por nosso grupo.

3.3. Aceite de Pâncreas Humanos de Doadores Falecidos

Os pâncreas humanos ofertados pela Central de Transplantes do Estado de São Paulo foram provenientes de doadores falecidos com morte encefálica declarada, em presença de batimentos cardíacos, que foram previamente recusados pelas equipes de transplante clínico de pâncreas e autorizados para doação para pesquisa pelas famílias, com dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme exposto no Parecer do CEP-FMUSP (Anexo C), ao invés disso, possuindo Termo de Doação de Órgãos e Tecidos Doador Falecido (Anexo D).

O fluxograma de doação de pâncreas humanos para pesquisa é descrito abaixo, (adaptado à partir das informações da Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo):

- O Hospital notifica a Central de Transplantes sobre um paciente apresentando morte encefálica (doador);
- A Central de Transplantes repassa a notificação para o Serviço de Procura de Órgãos e Tecidos (SPOT);
- O SPOT contata o Hospital e viabiliza o doador;

- O SPOT informa a Central de Transplantes se o doador é viável;
- O SPOT encaminha para o Laboratório de Histocompatibilidade o material para realização de tipagem do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) e *crossmatch*;
- A Central de Transplantes emite a lista de receptores e encaminha para o Laboratório de Imunogenética (apenas para o Rim, Pâncreas e Pâncreas conjugado Rim);
- O Laboratório de Imunogenética realiza tipagem de HLA, *crossmatch* e informa para a Central de Transplantes;
- A Central de Transplantes, com a lista definitiva dos receptores para cada órgão, liga para as Equipes de Transplante de Pâncreas e oferta o órgão.

Dessa forma, após a recusa de todas as equipes de transplante de pâncreas, e após a família ter preenchido e assinado o Termo de Doação de Órgãos e Tecidos - Doador Falecido no campo de autorização para “Transplante e Pesquisa”, a Central de Transplantes entra em contato com nosso grupo para realizar a oferta de pâncreas para pesquisa.

O aceite, por nosso grupo, da oferta de pâncreas humano ofertado pela Central de Transplante, seguiu alguns critérios de exclusão estabelecidos pelo próprio grupo, com base em critérios de grupos internacionais e na literatura científica atual.

Os critérios de exclusão de pâncreas para isolamento de ilhotas de Langerhans foi estabelecido em nosso laboratório, constando do nosso Procedimento Operacional Padrão (POP) Procedimentos (PR) 01.02 – Seleção do Doador, atualizado em 2017 (Tabela 2). Já os critérios de exclusão de pâncreas para descélularização foram adaptados, por nós, a partir dos critérios de exclusão para isolamento de ilhotas, sendo um pouco mais abrangentes (Tabela 2).

Dessa forma, os pâncreas humanos de pacientes com morte cerebral declarada são removidos, de acordo com as normas brasileiras e com o Comitê de Ética Institucional local e enviados para o laboratório do NUCEL- FMUSP, para a realização das pesquisas.

Tabela 2: Critérios de exclusão - principais causas de recusa da oferta de pâncreas para isolamento de ilhotas e descelularização de pâncreas.

	Isolamento Ilhotas	Descelularização Pâncreas
Dados do Doador		
IMC*	< 24	-
Idade	< 18 ou > 60 anos	< 18 anos
Etilismo	sim	sim
Uso de Drogas	sim	sim
Presença de tumor	sim	sim
Diabetes	sim	sim
Exames Laboratoriais		
Infecção	Sistêmica ou não localizada	Sistêmica ou não localizada
Glicemia	> 200 mg/dL	> 270 mg/dL
Amilase	> 400 mg/dL	> 400 mg/dL
Hemoglobina (Hb)	< 6,0 g/dL	-
Soropositividade para doença atual: Toxoplasmose, Rubéola, Sífilis, Citomegalovírus, Hepatite B, Hepatite C e/ou HIV**	sim	sim
Condições do Doador		
Dias de UTI***	> 9 dias	-
PCR****	> 10 minutos	-
Uso de insulina	sim	-
Outros		
Aspecto macroscópico não satisfatório	sim	sim

* IMC: Índice de Massa Corpórea, **HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana, *** UTI: Unidade de Tratamento Intensivo, ****PCR: Parada Cardiorespiratória.

3.4. Delineamento Experimental

Para perseguir os objetivos propostos neste projeto, os experimentos foram organizados de forma a responder as seguintes questões norteadoras: 1) Visando a criação de arcabouços biológicos (*bioscaffolds*) de forma adequada para a geração de um pâncreas bioartificial, qual seria o detergente mais eficiente, dentre os três principais já utilizados em descelularização de órgãos (Dodecil sulfato de sódio – SDS, Desoxicolado de Sódio – DOC e Triton X-100)?; 2) A metodologia aqui desenvolvida de descelularização de pâncreas murino pode ser extrapolada e aplicada na descelularização de pâncreas

humano?; 3) Visando à recelularização desses arcabouços biológicos (*bioscaffolds*) de forma adequada para a geração de um pâncreas bioartificial, seria possível a criação de um Banco de Matriz Pancreática Descelularizada e qual seria a melhor condição a ser empregada?; 4) As matrizes pancreáticas descelularizadas murinas e humanas originadas com nosso protocolo são capazes de serem recelularizadas?

O desenho experimental e fluxograma de cada grupo de experimentos que visam responder as questões norteadoras do projeto estão descritos nas Figuras 6, 7, 8, 9 e 10.

Figura 6.: Desenho Experimental e Fluxograma para a questão norteadora No. 1. Número experimental de 12 ratos Wistar machos, alocados em quatro grupos: um grupo Controle (pâncreas nativo) e três grupos experimentais, nos quais os pâncreas foram descelularizados, utilizando-se detergentes diferentes: a) 4% DOC (desoxicolato de sódio), b) 1% Triton X-100, c) 1% SDS (dodecil sulfato de sódio). As amostras de cada grupo foram coletadas e enviadas para as diversas análises. DNA: ácido desoxirribonucleico. GAGs: glicosaminoglicanos. Fonte: a autora.

Figura 7.: Desenho Experimental e Fluxograma para a questão norteadora No. 2. Número experimental de seis ratos Wistar machos e seis pâncreas humanos provenientes de doadores falecidos com morte encefálica declarada, divididos em quatro grupos: dois grupos Controles: pâncreas nativo de rato e pâncreas nativo humano; e dois grupos Experimentais: pâncreas descelularizados de rato e pâncreas descelularizados humanos. Fonte: a autora.

Figura 8.: Desenho Experimental e Fluxograma para a questão norteadora No. 3. Número experimental de 12 ratos Wistar machos, divididos em quatro grupos: um grupo Controle (pâncreas nativo) e três grupos experimentais, onde amostras de matrizes descellularizadas foram acondicionadas para preservação em: a) PBSA à 4°C: tampão fosfato salino, mantidas à 4°C; b) PBSA-AA 4°C: tampão fosfato salino suplementado com antibiótico e antimicótico, mantidas à 4°C, e c) CRIO -80°C: meio de criopreservação, contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 10% de soro fetal bovino (SFB), mantidas à -80°C. As amostras de cada condição foram coletadas nos períodos de tempo: zero, 1, 2, 4, 8, 12 e 16 semanas. 4% DOC: desoxicolato de sódio 4%. Fonte: a autora.

Figura 9.: Desenho Experimental e Fluxograma para a questão norteadora No. 4. Pâncreas de ratos Wistar machos e pâncreas humanos provenientes de doadores falecidos com morte encefálica declarada foram processados de forma independente para fornecer arcabouços/matrizes de pâncreas descelularizado. Uma vez de posse destes, os mesmos foram utilizados como um todo ou em partes, sendo adicionadas aos mesmos células produtoras de insulina das mais diversas fontes, visando à recelularização. MIN6: células de linhagem celular murina de tecido endócrino, produtoras de insulina. IPCs: células produtoras de insulina, do inglês *insulin producing cells*. 2D: cultura celular bidimensional. 3D: cultura celular tridimensional. * Ver Figura 10 para mais detalhes sobre os ensaios de caracterização das células produtoras de insulina. Fonte: a autora.

Figura 10.: Ensaios de caracterização das células produtoras de insulina. As células produtoras de insulina foram avaliadas e caracterizadas antes de serem utilizadas na recelularização dos arca-bouços de matriz pancreática descelularizadas, sob os mais diferentes aspectos, elencados acima. MIN6: células de linhagem celular murina de tecido endócrino, produtoras de insulina. IPCs: células produtoras de insulina, do inglês *insulin producing cells*. A classificação como Previamente Caracterizadas indica que esses tipos celulares foram previamente caracterizados e doados para utilização neste projeto. Fonte: a autora.

3.5. Canulação e Extração de Pâncreas de Rato

Para a realização deste projeto de descelularização pancreática, foram utilizados um total de trinta e três ($n=30$) pâncreas de ratos Wistar machos, inclusos no protocolo de pesquisa autorizado pelo CEUA-FMUSP (Anexo A), conforme mencionado anteriormente.

Os animais foram mantidos em gaiolas e com livre acesso à comida e água no Biotério de Experimentação Animal do NUCEL-FMUSP, em ambiente

de temperatura e luminosidade controladas. Os animais foram eutanasiados com overdose de anestésico (Tiopental – 45-55mg/Kg do animal) via intraperitoneal, e, em seguida, foi realizada antisepsia com solução de povidona iodada e tricotomia abdominal, seguida de laparotomia mediana ventral. A técnica de canulação e extração pancreática foi padronizada em nosso laboratório. O pâncreas de cada animal foi exposto e o ducto pancreático e o ramo da veia porta, (que se torna veia esplênica quando alcança os limites do tecido pancreático) foram evidenciados e canulados. Após a canulação, o pâncreas foi retirado em bloco, juntamente com o baço e parte do intestino ligado ao pâncreas, e transferido para uma placa de Petri contendo solução tampão fosfato salino (PBSA), e mantido à 4°C até o momento do processamento.

3.6. Extração e Canulação de Pâncreas Humano

Para a realização deste projeto, foram utilizados um total de seis (n=6) pâncreas humanos aceitos visando à descelularização, incluídos no protocolo de pesquisa autorizado pelo CEP-FMUSP (Anexo C), conforme mencionado anteriormente.

Após o aceite do pâncreas, a equipe do NUCEL-FMUSP se desloca para o local (hospital) em horário marcado pela SPOT responsável pelo doador, onde as retiradas dos múltiplos órgãos foram realizadas em salas cirúrgicas completas, incluindo todo material e pessoal de apoio (enfermagem, instrumentação e anestesista), por se tratar de um procedimento cirúrgico complexo e especializado. O procedimento completo de retirada dos órgãos tem duração de várias horas (em torno de 6h) obedecendo a ordem de retirada dos órgãos, baseado nas características de cada um, dentre os principais órgãos doados, seguindo cronologicamente a ordem: coração, pulmão, fígado, pâncreas, intestino e rim. Antes da retirada do pâncreas da cavidade abdominal, foi montado um campo estéril para manuseio e preparo desses órgãos, contendo: solução de povidona iodada, antibióticos, antimicóticos e

solução de preservação de órgãos para manter a esterilidade e funcionalidade dos mesmos.

Diferente da captação de pâncreas órgão total para transplante, não ocorre a retirada do duodeno juntamente com o pâncreas, então, não se utiliza grampeadores lineares, porém, exige a dissecação da cabeça do pâncreas e o seu descolamento do duodeno, processo delicado que pode facilmente produzir lesões na cápsula do órgão, independentemente da habilidade do cirurgião.

Já no campo estéril, os pâncreas foram dissecados, retirando-se todas as estruturas não-pancreáticas como tecido gorduroso, vasos sanguíneos e ductos, sempre procurando respeitar e manter a integridade da cápsula pancreática. Os órgãos foram então acondicionados em gelo e maleta térmica com temperatura controlada e transportados até o laboratório de acordo com POPs previamente bem estabelecidos, para processamento.

Ao chegarem ao laboratório NUCEL-FMUSP, os pâncreas humanos foram alocados em cabines de fluxo laminar, proporcionando um ambiente estéril e permitindo a manipulação de forma segura de materiais biológicos e estéreis. Após a retirada da porção da cabeça, os pâncreas humanos foram canulados com cateteres sanguíneos de tamanho adequado ao calibre do vaso, através do ducto pancreático ou ducto de Wirsung, artéria esplênica e veia esplênica. Após a canulação, os pâncreas foram imediatamente submetidos ao protocolo de descélularização.

3.7. Descélularização de Pâncreas Murino

Os pâncreas murinos, retirados em bloco com o baço e porção ligada ao intestino, foram removidos e alocados em cabines de fluxo laminar, também conhecida como cabines de segurança biológica, proporcionando um ambiente estéril e permitindo a manipulação de forma segura de materiais biológicos ou estéreis, no qual o protocolo de descélularização foi realizado. Este protocolo

envolveu o uso de bomba peristáltica a 0,6mL por minuto, com perfusão contínua de água tipo I (ultra-pura), solução de detergente-enzimática (com variação do detergente - 1% Dodecil sulfato de sódio – 1% SDS ou 4% Desoxicolado de Sódio – DOC 4% ou 1% Triton X-100; e utilizando como solução enzimática DNase-I - 2000kU) e água tipo I novamente, somando um total aproximado de 31h. Após esse processo de perfusão, tecidos conectivos e gordura foram removidos. Os arcabouços gerados através da descclularização foram imediatamente utilizados e/ou mantidos sob diferentes condições de armazenamento: a) PBSA 4°C: tampão fosfato salino, mantidos à 4°C; b) PBSA-AA 4°C: tampão fosfato salino suplementado com antibiótico e antimicótico, mantidos à 4°C e, c) CRIO -80°C: meio de criopreservação, contendo meio de cultura desenvolvido no *Roswell Park Memorial Institute* - RPMI 1640 suplementado com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 10% de soro fetal bovino (SFB), mantidos à -80°C.

3.8. Descclularização de Pâncreas Humano

O protocolo de descclularização de pâncreas humanos previamente limpos e canulados envolveu o uso de bomba peristáltica a 1,5mL por minuto, com perfusão contínua de água tipo I (ultra-pura), solução de detergente-enzimática (Desoxicolado de Sódio (DOC) - 4% e DNase-I - 2000kU) e água tipo I novamente, por um período total aproximado de 5 a 7 dias. Os arcabouços gerados através da descclularização foram imediatamente utilizados e/ou mantidos em PBSA-AA à 4°C até o momento de uso.

3.9. Extração e Quantificação de DNA

O DNA genômico das amostras foi obtido a partir de macerados do tecido pancreático nativo ou do arcabouço descclularizado, utilizando-se nitrogênio líquido e gral de porcelana, com auxílio de um pistilo. As amostras

foram depositadas em tubos de 1,5mL e pesadas em balança semi-analítica, de forma que todas as alíquotas geradas possuíssem o mesmo peso (0,017g).

Para a extração e purificação do DNA genômico, foi utilizado o Kit Illustra™ Tissue & Cells genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante. O método baseia-se no uso de uma solução de lise em combinação com proteinase K e agentes caotrópicos para liberação do DNA genômico, desnaturando os componentes proteicos e promovendo a ligação seletiva do DNA a uma coluna de sílica. A partir de 1,5µL de cada uma das amostras, foram estimadas as concentrações de DNA, através de leitura espectrofotométrica a 260/280nm, no espectrofotômetro NanoDrop-1000 (NanoDrop Technologies).

3.10. Quantificação de Glicosaminoglicanos (GAGs)

Os glicosaminoglicanos (GAGs) das amostras foram obtidos através de macerados dos tecidos pancreáticos nativos ou dos arcabouços descelularizados em nitrogênio líquido utilizando-se gral de porcelana, com auxílio de um pistilo. As amostras foram depositadas em tubos de 1,5mL e pesadas em balança semi-analítica, de forma que todas as alíquotas geradas possuíssem o mesmo peso (0,017g).

Os GAGs foram extraídos e purificados utilizando-se o Kit Blyscan – Sulfated Glycosaminoglycan Assay (Biocolor), de acordo com especificações do fabricante. O ensaio é baseado em um método quantitativo de ligação de corante para a análise de proteoglicanos sulfatados e glicosaminoglicanos.

As concentrações dos GAGs foram estimadas através de leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 656nm, utilizando-se o espectrofotômetro SpectraMax® Paradigm®.

3.11. Dosagem de Proteínas Totais

As dosagens de proteínas totais presentes nas amostras foram obtidas através de macerados dos tecidos pancreáticos nativos ou dos arcabouços descelularizados em nitrogênio líquido utilizando-se gral de porcelana, com auxílio de um pistilo. As amostras foram depositadas em tubos de 1,5mL e pesadas em balança semi-analítica, de forma que todas as alíquotas geradas possuísem o mesmo peso (0,017g).

As dosagens de proteínas totais foram realizadas utilizando-se o Kit Bio-Rad *Protein Assay*, com uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA), de acordo com as especificações do fabricante. O ensaio é baseado no método de Bradford, com base na mudança da cor vermelha para azul quando o corante azul brilhante de Coomassie G-250 reage com as proteínas presentes na amostra.

As concentrações das proteínas totais foram estimadas através de leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 595nm utilizando-se o espectrofotômetro SpectraMax® Paradigm®.

3.12. Microscopia Óptica - Análises Histológicas

As biópsias coletadas para as análises histológicas por microscopia óptica foram fixadas em solução de paraformaldeído 4%, por, no mínimo, de 24h e mantidas em álcool 70%. Após fixação, as biópsias foram desidratadas através de incubações em álcool de concentrações crescentes (álcool 70%, 96% e 100%). Após a desidratação, as amostras foram diafanizadas em xilol e posteriormente emblocadas em parafina. Cortes histológicos com espessura de 4 a 5 micrômetros foram obtidos em micrótomo e depositados em lâminas silanizadas.

3.12.1. *Hematoxilina e Eosina (HE)*

Os cortes histológicos foram desparafinizados e hidratados, corados com Hematoxilina de Harris por 1min e 30seg, lavados em água corrente por 2min e então corados com Eosina por 12seg e posteriormente lavados em água corrente, desidratados em banhos com concentrações crescentes de álcool (70 a 100%) e diafanizados em xilol. As lâminas foram montadas com cola histológica e lamínula e mantidas à temperatura ambiente até a avaliação em microscópio óptico Optiphot-2 Nikon, utilizando-se câmera Nikon Digital Sight DS-U1 e programa NIS Elements Nikon®.

3.12.2. *Azul de Alcian (AB)*

Os cortes foram desparafinizados e hidratados, colocados em solução aquosa de ácido acético 3% (pH 2,5) durante 3min e, então, incubados na solução corante de azul de Alcian, por 2h. Retirando o excesso do corante, os cortes foram lavados novamente com ácido acético 3% durante 3min lavados em água corrente, desidratados em banhos com concentrações crescentes de álcool (70 a 100%) e diafanizados em xilol. As lâminas foram montadas com cola histológica e lamínula e mantidas à temperatura ambiente até a avaliação em microscópio óptico Optiphot-2 Nikon, utilizando-se câmera Nikon Digital Sight DS-U1 e programa NIS Elements Nikon®.

3.12.3. *Vermelho de Picrosírius (PSH)*

Os cortes foram desparafinizados e hidratados, corados com Picrosírius por 1hora e posteriormente lavados em água corrente por 3min, corados com Hematoxilina de Harris por 1min e 30seg e então lavados em água corrente por 2min. Após estas etapas, os cortes passaram por processo de desidratação em banhos com concentrações crescentes de álcool (70 a 100%) e diafanização através de passagens em xilol. As lâminas foram montadas com cola histológica e lamínula e mantidas à temperatura ambiente até a avaliação em microscópio óptico Optiphot-2 Nikon. As lâminas foram observadas tanto em

Microscopia de Campo Claro quanto em Microscopia de Polarização, utilizando-se um filtro polarizante, para avaliação das fibras de colágeno (material biorrefringente). Para documentação, foram utilizados a câmera Nikon Digital Sight DS-U1 e o programa NIS Elements Nikon®.

3.12.4. Resorcina Fuccina com Oxidação em Oxona (RFO)

Os cortes foram desparafinizados e hidratados antes do processo de oxidação. As lâminas foram secas e incubadas em 10% oxona por 40min, lavadas em água corrente por 5min e colocadas em banhos de álcool 70% e 95%. Após esta etapa, foi efetuada a coloração em Resorcina Fuccina por 1h. As amostras foram mergulhadas em água para retirar o excesso do corante e, em seguida, diferenciadas em álcool 70% por 8min. Após estas etapas, os cortes passaram por processo de desidratação em banhos com concentrações crescentes de álcool (70 a 100%) e diafanização através de passagens em xilol. As lâminas foram montadas com cola histológica e lamínula e mantidas à temperatura ambiente até a avaliação em microscópio óptico Optiphot-2 Nikon, utilizando-se câmera Nikon Digital Sight DS-U1 e programa NIS Elements Nikon®.

3.12.5. Azul de Toluidina (AT)

Os cortes foram desparafinizados e hidratados, corados com azul de Toluidina por 1h e, posteriormente, lavados em água corrente por 2min, desidratados em banhos com concentrações crescentes de álcool (70 a 100%) e diafanizados através de passagens em xilol. As lâminas foram montadas com cola histológica e lamínula e mantidas à temperatura ambiente até a avaliação em microscópio óptico Optiphot-2 Nikon, utilizando-se câmera Nikon Digital Sight DS-U1 e programa NIS Elements Nikon®.

3.13. Análises da Ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Biópsias de 3 a 5mm de comprimento, 1 mm de largura e 1 mm de espessura foram coletadas para as análises da ultraestrutura através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), fixadas em solução de glutaraldeído a 2% em tampão salino fosfato (PBS) 0,15M, pH 7,2 e 0,1% de ácido tânico, sendo mantidas à 4°C por 2h. Após esse período, as amostras foram acondicionadas em soro fisiológico glicosado 5%, e encaminhadas ao LIM-59 FMUSP, onde sofreram lavagens em soro fisiológico glicosado 5%, incubação em tetróxido de ósmio à 4°C, seguido de lavagens em soro fisiológico glicosado 5% e incubação em acetato de uranila à 4°C *overnight*. Para o emblocamento em resina, o material foi previamente desidratado em banhos de concentração crescente de acetona (30%, 70%, 95% e 100%), lavado em solução de óxido de propileno e incubado por 3h em solução de óxido de propileno e resina em proporções iguais, à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram incubadas em resina pura à 37°C por 1h e inclusas em moldes de inclusão em resina pura mantidas à 60°C por 72h. Os blocos foram mantidos à temperatura ambiente até o momento da realização dos cortes semi-finos e ultrafinos.

Cortes semi-finos de 300 nanômetros de espessura foram obtidos em micrótomo (Leica®), colocados em lâminas de vidro e corados em solução de azul de metileno 1% por um min à temperatura ambiente e lavados em água destilada. Um campo de cada amostra foi selecionado através de observação sob microscópio óptico para efetivação do corte ultrafino. Os cortes ultrafinos foram feitos com espessura de 70 nanômetros em micrótomo (Leica®) e montados em tela de cobre. A marcação foi realizada por adição de uma gota de solução de citrato de chumbo sobre os cortes, incubação por 1min, lavagem em água destilada e secagem em papel de filtro.

As imagens geradas foram capturadas através de microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM.1010 Electron Microscope).

3.14. Avaliação por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As biópsias coletadas para as análises da ultraestrutura por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% em PBS 0,1M (pH 7,4) por 1h. As amostras foram lavadas três vezes em PBS 0,1M, durante 15min cada. Em seguida, as amostras foram incubadas em tetróxido de ósmio 1% a 4°C durante uma hora, seguido de lavagens em PBS durante 15min cada. As amostras foram então desidratadas em concentrações crescentes de álcool (50%, 70%, 95% e 100%) previamente filtrados (filtros de 0,22 µm). As amostras foram então secas em aparelho de ponto crítico (K850 Critical Point Dryer, Quorum Technologies Ltd) contendo gás carbônico, coletadas em fita adesiva condutora de cobre (3M) e recobertas com ouro no aparelho Desk II Sputter Coater (Denton Vacuum) em 180seg de exposição.

As imagens de análise por MEV foram realizadas nos aparelhos: MEV FESEM JEOL JSM-7401F (Scanning microscope, JEOL) – Central Analítica do IQ USP e microscópio eletrônico de varredura LEO 435VP (CADI) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

3.15. Espectroscopia

As amostras humanas e de rato coletadas após a descelularização para as análises espectroscópicas foram utilizadas diretamente após seu armazenamento em PBSA-AA à 4°C, duas secções de tecido de aproximadamente 0,3g de peso úmido de cada amostra foram submetidas a análise por espectroscopia vibracional fundamentada no espalhamento de luz – Espectroscopia Raman, para isso foi utilizado o equipamento FT-Raman MultiRAM (Bruker), com excitação no infravermelho próximo (1064 nm), realizado no Laboratório de Espectroscopia Molecular LEM do IQ USP. As análises gráficas foram realizadas com o uso do software Origin 2018 64Bit (OriginLab).

3.16. Confecção de cortes grossos e finos dos arcabouços humanos descelularizados

Algumas amostras de arcabouços humanos descelularizados foram utilizadas para a obtenção de cortes grossos e finos para estabelecimento da técnica de recelularização.

Para os cortes grossos, a partir do material mantido em PBSA-AA à 4°C, foram obtidos cortes de aproximadamente 5mm de comprimento, 3mm largura e 1mm de espessura com bisturi descartável lâmina nº23. Os cortes foram colocados em placa de Petri de 35mm de diâmetro e mantidos em PBSA-AA à 4°C até o momento do uso.

Para os cortes finos, a partir do material mantido em PBSA-AA à 4°C, amostras de aproximadamente 1mm de comprimento, 1mm largura e 1mm de espessura foram incluídas em OCT (*Optimal Cutting Temperature* – Tissue Plus, Fisher HealthCare, Houston, CA) e congeladas à -80°C até o momento do uso. As amostras foram transportadas em gelo seco até o local do equipamento para cortes congelados. Para a obtenção dos cortes, foi utilizado o equipamento Criostato (Microm GmbH) do laboratório que está aos cuidados da Profa. Dra. Bettina Malnic do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP. O criostato foi mantido a uma temperatura de -23°C para a obtenção dos cortes histológicos de 25µm, 50µm e 90µm. Os cortes foram coletados em lamínulas e colocados em poços isolados de placas de cultura não-aderente de 24 poços e mantidos em PBSA-AA à 4°C até o momento do uso.

3.17. Macroscopia

As amostras de arcabouços de rato e humanos, descelularizados e recelularizados, foram submetidas à avaliação macroscópica de forma qualitativa, observando-se a coloração, integridade e outros aspectos pertinentes. Esses resultados foram fotografados para ilustração, corroborando outros resultados obtidos.

3.18. Microscopia Óptica – Visualização direta de tecidos e células

Algumas amostras de arcabouços de rato e humanos, descelularizados e recelularizados, além de culturas de células, foram submetidas à avaliação microscópica óptica em microscópio invertido (Nikon Corporation) sem coloração prévia. Os resultados foram fotografados para ilustração, corroborando outros resultados obtidos.

3.19. Microscopia de Fluorescência

Algumas amostras de arcabouços humanos recelularizados e cultivos celulares foram submetidas à avaliação microscópica por fluorescência em microscópio invertido (EVOS FL Fluorescence Microscope - AMG, ThermoFisher Scientific) e os resultados foram fotografados utilizando-se o software Micron (EVOS) Imaging Software.

3.20. Dosagem de Insulina

A dosagem de insulina presente nos sobrenadantes das culturas de células humanas foi realizada por meio do Kit de reagentes para a determinação quantitativa de insulina (Elecsys Insulin, Roche®), de acordo com especificações do fabricante, utilizando-se o equipamento automatizado Cobas E 601® (Roche®).

O método consiste em um imunoensaio que utiliza a técnica de sanduíche. A amostra é incubada com um anticorpo monoclonal biotilado específico anti-insulina e um anticorpo monoclonal específico anti-insulina marcado com complexo de rutênio, formando um complexo sanduíche. Após a incorporação das micropartículas revestidas de estreptavidina o complexo formado liga-se à fase sólida pela interação da biotina e da estreptavidina. A mistura de reação é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eletrodo. A aplicação de uma corrente elétrica ao eletrodo induz uma emissão quimioluminescente que é

medida por um fotomultiplicador. Os resultados são determinados com base numa curva de calibração gerada especificamente pelo analisador.

3.21. Dosagem de Lactato Desidrogenase (LDH)

A dosagem de lactato desidrogenase (LDH) dos sobrenadantes das culturas de células humanas foi realizada por meio do Kit de reagentes para a determinação quantitativa da atividade da lactato desidrogenase (Kit Lactate dehydrogenase acc. IFCC ver.2, Roche[®]), de acordo com especificações do fabricante, utilizando-se o equipamento automatizado Cobas E 601[®] (Roche[®]).

O método consiste em um método enzimático, onde a LDH catalisa a conversão de L-lactato em piruvato, ocorrendo redução do dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidada (NAD⁺) para a forma reduzida (NADH) durante o processo. A taxa inicial de formação de NADH é diretamente proporcional à atividade catalítica da LDH obtida pela determinação do aumento da absorbância a 340nm (λ secundário: 659nm). Este método está em conformidade com as recomendações da IFCC (Federação Internacional de Química Clínica, do inglês *International Federation of Clinical Chemistry*).

3.22. Isolamento de ilhotas pancreáticas de rato

Para o isolamento de ilhotas pancreáticas foram utilizados um total de três (n=3) pâncreas de ratos Wistar machos, inclusos no protocolo de pesquisa autorizado pelo CEUA FMUSP (Anexo A), conforme mencionado anteriormente.

Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do NUCEL FMUSP, em ambiente com temperatura e luminosidade controladas, em gaiolas e com livre acesso à comida e água. Os animais foram eutanasiados através de overdose de anestésico (Tiopental – 45-55mg/Kg do animal) via intraperitoneal, e, em seguida, foi realizada antissepsia com solução de

povidona iodada e tricotomia abdominal, seguida de laparotomia mediana ventral. Assim, o pâncreas de cada animal foi exposto e o ducto pancreático foi então clampeado próximo à sua comunicação com o duodeno e uma cânula foi inserida na sua porção adjacente ao fígado. Com o auxílio da cânula, 10mL de solução 0,17mg/mL da enzima colagenase (Liberase RI, Roche) foram infundidos no pâncreas do animal. Em seguida, o animal foi exsanguinado através do corte de vasos mesentéricos e o pâncreas foi cuidadosamente extraído, lavado em PBSA a 4°C e, após a remoção de excesso de gordura e tecido não pancreático, foi cortado em pedaços menores e mantido em gelo até o momento da digestão enzimática.

A digestão enzimática destes pâncreas foi realizada em tubos cônicos, com temperatura controlada por banho-maria a 37°C, por 20min. O material digerido foi processado pela passagem através de uma malha de 800µm e lavado em meio de cultura RPMI 1640. O material recuperado foi centrifugado por 1min a 1.000 RPM, o sedimento foi homogeneizado em 10mL de Ficoll (Sigma Aldrich) com densidade de 1,110 g/cm³ e um gradiente descontínuo de densidade foi formado pela adição de três outras camadas de Ficoll (densidades 1,096, 1,069 e 1,037 g/cm³), de forma a induzir a separação das ilhotas do restante do tecido pancreático. Após centrifugação por 15min a 2.000 RPM, as ilhotas purificadas foram visualizadas entre as camadas de densidades 1,096 e 1,069 g/cm³ e coletadas.

As ilhotas pancreáticas isoladas foram mantidas em cultura em meio CMRL 1066, contendo 5,6mM de glucose, 10% SFB, 1mM de glutamina e 0,2% ciprofloxacina, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ à 37°C, até a realização de todos os controles de qualidade e antes de serem colocadas em cultura aderente.

3.23. Isolamento de ilhotas pancreáticas humanas

Para o isolamento de ilhotas pancreáticas humanas, foi utilizado um (n=1) pâncreas humano aceito para isolamento de ilhotas, incluídos no

protocolo de pesquisa autorizado pelo CEP-FMUSP (Anexo C), conforme mencionado anteriormente.

O isolamento de ilhotas pancreáticas humanas foi realizado segundo método descrito por Linetsky e colaboradores⁸⁵, sendo um procedimento longo, de cerca de 12 a 15 horas de duração, e altamente especializado. Neste processo, o pâncreas do paciente com morte cerebral declarada foi removido pelos cirurgiões e enviado para o NUCEL, sendo transportado em meio específico, que consiste de uma mistura de perfluorocarbono - PFC (FluoroMed, L.P.) e solução de preservação de Belzer (Bristol-Myers Squibb). O pâncreas foi fragmentado em duas partes: a porção da cabeça e da cauda pancreática, onde o ducto pancreático de Wirsung foi canulado em cada extremidade para que fosse infundida uma mistura enzimática de collagenase e protease neutra (Collagenase & Neutral Protease SERVA Electrophoresis) a frio e as ilhotas se dissociassem do tecido acinar. Após a perfusão da mistura enzimática, as duas porções pancreáticas foram fragmentadas em porções menores, as quais foram colocadas na câmara de digestão (câmara de Ricordi) contendo a mesma mistura enzimática, mas, dessa vez, a 37°C, e mantido sob agitação até a digestão adequada do tecido pancreático de tal forma que as ilhotas se separem do tecido exócrino pancreático. Para isso, durante a etapa de digestão, amostras do material digerido foram retiradas e coradas com difeniltiocarbazona (DTZ), que cora os grânulos de insulina das células beta pancreáticas. A digestão foi interrompida quando mais de 50% das ilhotas estavam livres do tecido acinar. O material obtido a partir desta digestão foi submetido à um processo de centrifugação em gradiente contínuo de Ficoll (Biochrom AG) (densidades 1,100 a 1,077 g/cm³), utilizando-se o processador de células COBE® 2991 (Caridian BCT), possibilitando, assim, a obtenção de ilhotas purificadas.

As ilhotas pancreáticas isoladas foram mantidas em cultura em meio CMRL-1066, contendo 5,6mM de glicose e 0,5% de albumina humana, 1mM de glutamina e 0,2% ciprofloxacina, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ à 37°C, até a realização de todos os testes de controle de qualidade e antes de serem colocadas em cultura aderente.

3.24. Contagem celular de ilhotas

Através da coloração com difeniltiocarbazona (DTZ, Sigma-Aldrich) e observação sob microscópio invertido (Nikon Corporation), foi realizada a contagem da quantidade de ilhotas obtidas por procedimento e avaliação da pureza. DTZ é um corante que se coordena aos íons zinco necessários para a formação de hexâmeros de insulina dentro das células β , marcando, portanto, as células β insulina-positivas em vermelho, sendo utilizado para determinar o número de ilhotas e inferir a pureza de preparações de ilhotas pancreáticas humanas.⁸⁶ Dessa forma, o número total de ilhotas pode, então, ser obtido e seus tamanhos aferidos, com a ajuda de uma objetiva acoplada à uma rede micrométrica. As ilhotas pancreáticas de rato, de tamanho bastante homogêneo, tiveram seus resultados expressos em número de ilhotas, enquanto as ilhotas humanas, cujos diâmetros variam de 50 a 2.000 micra, foram contadas através de um método que normaliza o tamanho das ilhotas para 150 μ m, cuja unidade é denominada Índice de Equivalentes de Ilhotas (IEQ).⁸⁷

3.25. Cultivo celular

Todas as células usadas neste trabalho foram cultivadas em frascos plásticos adequados para o cultivo celular experimental. O pH e a temperatura foram mantidos na faixa fisiológica através da incubação em estufa à 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂.

Os estoques celulares foram congelados, de forma geral, em meio de cultura em RPMI 1460 ou CMRL-1066 contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 20% SFB ou 20% albumina humana e mantidos em reservatórios contendo nitrogênio líquido.

3.25.1. Cultura aderente 2D de Ilhotas pancreáticas (células β) murinas

3.000 ilhotas de ratos foram colocadas e mantidas em cultura aderente em frascos T75 para cultura celular (frascos de superfície de crescimento celular de 75 cm²) em meio de cultura CMRL 1066, contendo 5,6mM de glucose, SFB 10%, 1mM de glutamina e 0,2% ciprofloxacina, em atmosfera úmida e 5% de CO₂ à 37°C. O meio foi trocado a cada dois dias e, ao atingirem cerca de 80% de confluência, as células foram transferidas, na proporção de 1:2, para novos frascos de cultura celular. Além disso, ao atingirem a fase exponencial, as células foram congeladas em 90% SFB e 10% DMSO.

3.25.2. Cultura aderente 2D de Ilhotas pancreáticas (células β) humanas

3.000 IEQs (equivalentes de 3.000 ilhotas de tamanho aproximado de 150µm) foram colocadas e mantidas em cultura aderente em frascos de cultura celular T75, contendo meio de cultura CMRL 1066, suplementado com 5,6mM de glucose, SFB 10%, 1mM de glutamina e 0,2% ciprofloxacina, em atmosfera úmida de 5% de CO₂ à 37°C. O meio foi trocado a cada dois dias e, quando atingiram cerca de 80% de confluência foram transferidas na proporção de 1:2 para novos frascos de cultura celular. Além disso, também após atingirem a fase exponencial, as células foram congeladas em 90% SFB e 10% DMSO.

3.25.3. Cultura aderente 2D de células de insulinoma murino (MIN6)

A linhagem celular MIN6 (*mouse insulinoma 6*) de insulinoma murino, foi gentilmente cedida para o nosso laboratório NUCEL pelo Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (IB-UNICAMP). Estas células, já previamente caracterizadas, foram cultivadas em RPMI 1460 suplementado com 10% SFB, 50µg/ml de ampicilina e 50µg/ml de estreptomicina, incubadas à 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂. O meio foi trocado a cada dois dias e, quando atingiram cerca de 80% de

confluência foram transferidas na proporção de 1:6 para novos frascos de cultura celular. Além disso, após atingirem a fase exponencial, as células foram congeladas em meio contendo 70% RPMI 1460, 20% SFB e 10% DMSO.

3.25.4. Células produtoras de insulina (IPCs)

A geração de células produtoras de insulina (IPCs) a partir da diferenciação de células-tronco embrionárias murinas (mESCs) foi realizada em nosso laboratório por outros integrantes do grupo (Dr. Fernando Henrique Lojudice, Dra. Patrícia Mayumi Kossugue e Dr. Fernando Janczur Velloso), participantes do projeto maior do qual essa Tese de Doutorado faz parte, conforme descrito anteriormente. No presente trabalho, já recebemos as células IPCs produzidas a partir de mESCs, conforme previamente descrito Lumelsky e colaboradores⁸⁸, as quais foram imediatamente utilizadas no protocolo de recelularização descrito nessa seção.

3.26. Viabilidade Morfológica

Para avaliação da viabilidade morfológica foram utilizados os corantes diacetato de fluoresceína (FDA) e o iodeto de propídio (PI) para marcação celular. O FDA é um éster não polar, que atravessa a membrana celular, sendo hidrolizado por esterases intracelulares, gerando fluoresceína livre. A fluoresceína permanece nas células que possuem a membrana plasmática intacta, podendo ser evidenciada em condições apropriadas de excitação (460 - 490nm) e emissão (520nm). O FDA funciona como um marcador de células viáveis que aparecem em verde brilhante. O PI funciona como um marcador que não consegue penetrar através da membrana das células vivas, mas, sim, em células mortas ou células não viáveis, uma vez que atravessa a membrana celular e se liga aos ácidos nucleicos, causando uma fluorescência alaranjada brilhante, podendo ser evidenciada em condições apropriadas de excitação máxima (510 - 550nm) e emissão (590nm).

Para isso, foram utilizadas células cujos sobrenadantes foram descartados e as mesmas foram ressuspensas em 480µL de PBSA. Foram adicionados, nessa ordem, 10µL de PI (0,5 mg/mL) e 10 µL de FDA (19,9 µg/mL). As amostras foram transferidas para uma lâmina e cobertas com lamínula ou mantidas em placas de cultura e então observadas ao microscópio de fluorescência, fotografadas e contadas, sendo que os resultados foram expressos em porcentagem, com a contagem de FDA e PI positivas sendo cumulativas, totalizando 100%.

3.27. Avaliação Microbiológica

As avaliações microbiológicas para eventual contaminação foram realizadas utilizando-se o meio de cultura celular, por Método Direto / Inoculação Direta em Meio Líquido e Meio Sólido, conforme descrito pela Farmacopéia Brasileira⁸⁹, em meio Luria-Bertani (LB) líquido, sob agitação de 250 RPM, à 37°C por 48h. Após incubação, os meios foram analisados quanto à turbidez e conferidos sob microscopia óptica quanto à presença ou ausência de contaminação. Em placas de LB-ágar à temperatura ambiente (22°C) por 15 dias, analisando-se as placas quanto à presença ou ausência de contaminantes.

3.28. Avaliação de contaminação por Micoplasma

O teste para Micoplasma foi realizado com o intuito de detectar, sob o ponto de vista de controle de qualidade microbiológico, a eventual presença do contaminante Micoplasma nas preparações de ilhotas pancreáticas.

O teste foi previamente descrito por Uemori e colaboradores⁹⁰, com o seguinte racional: as sequências gênicas do ácido ribonucleico (RNA) ribossomal (rRNA) em procariotos, incluindo Micoplasma, são altamente conservadas.

O teste de detecção de Micoplasma baseia-se na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida pela técnica de Nested-PCR, no qual, ao

invés de se usar uma amostra primária para fazer a PCR, utiliza-se o produto de uma PCR anterior com um par de *primers* internos ao par utilizado na primeira reação. Assim, esse sistema de detecção garante não só a sensibilidade, como, também, a especificidade da reação. Além disso, esse sistema permite a detecção das seguintes espécies de *Micoplasma*: *M. fermentans*, *M. hyorhinitis*, *M. arginini*, *M. orale*, *M. salivarium*, *M. hominis*, *M. pulmonis*, *M. arthritidis*, *M. neurolyticum*, *M. hyopneumoniae*, *M. capricolum* e uma espécie de *Ureaplasma* (*U. urealyticum*). Não detecta *M. pneumoniae*.

3.29. Avaliação Funcional

Com esse teste avaliou-se a secreção de insulina na presença de concentrações baixa, média e alta de glicose, para determinar o Índice de Resposta à Glicose, pós-isolamento de ilhotas pancreáticas humanas. Para a realização deste teste, cerca de 1.200 IEQs foram coletadas e incubadas em placa de Petri à 37°C, na presença de meios de cultura contendo 2,8mM (baixa) e 16,7mM (alta) glicose. Durante essas etapas de incubação, os sobrenadantes foram recolhidos para realização da dosagem de insulina liberada. Ao final, as células foram lisadas e o sobrenadante foi recolhido e mantido a -80 °C até o momento da dosagem de insulina.

3.30. Caracterização celular por imunofenotipagem

As ilhotas humanas isoladas são caracterizadas por imunofenotipagem, sendo, primeiramente, submetidas à digestão com a enzima Accutase (Sigma Aldrich) a fim de dissociar as células presentes na estrutura tridimensional. A subpopulação de células beta foi então enriquecida através da incubação da suspensão celular com o marcador fluorescente NewPort Green 1%, separação celular por fluorescência através de citometria de fluxo (*fluorescent activated cell sorting*) e mantidas em cultura aderente. Posteriormente, as culturas primárias estabelecidas foram caracterizadas através da imunofenotipagem de suas proteínas por citometria de fluxo. Para tanto, as células foram removidas da placa utilizando-se a enzima Tryple, fixadas com paraformaldeído (PFA) 4%

por 1h a temperatura ambiente. As células foram então bloqueadas com solução 5% BSA, 0,01% Triton-X100 e incubadas por 12-16h com os anticorpos primários contra: marcadores de células β (insulina, peptídeo C, amilina, GLUT2 – do inglês *glucose transporter 2*, PDX1 – do inglês *pancreatic and duodenal homeobox 1*, ISL1 – do inglês *insulin gene enhancer protein*), marcadores de células imaturas/progenitoras (NGN3 – do inglês *neurogenin-3*, NES – do inglês *nestin expressing*, fator de crescimento GATA4, CXCR4 - do inglês *C-X-C chemokine receptor type 4*) e outros hormônios (glucagon e polipeptídeo pancreático). Após lavagem, as células foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários acoplados a fluoróforos. Como controle negativo, foram utilizados controles isotípicos de IgG1 acoplados aos mesmos fluoróforos. A marcação celular foi avaliada em citômetro FACS Aria II (BD Biosciences).

3.31. Cultivo 3D

As culturas celulares 3D das células provenientes de cultura aderente primária de ilhotas pancreáticas humanas foram realizadas com base na cultura magnética 3D, utilizando-se o Kit NanoShuttle™-PL (Greiner Bio-One), de acordo com as especificações do fabricante. De forma resumida, as células de cultura aderente foram soltas da placa e, uma vez em suspensão, as células foram impregnadas, por meio de centrifugação, com o reagente NanoShuttle™-PL, que consiste em ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina. Conforme descrito pelo fabricante, esse reagente permanece fixado à membrana celular por até oito dias, momento no qual ela será liberada na cultura 3D, sendo biocompatível, não tendo efeitos sobre o metabolismo, a proliferação celular e não causando estresse inflamatório.

Após a ligação das partículas, as células foram colocadas em placas de cultura não aderente com uma base magnética, acessório magnético do kit, que centraliza as células e viabiliza sua maior interação para a formação da estrutura 3D, em meio de cultura CMRL 1066, suplementado com 5,6mM de glucose, 10% SFB, 1mM de glutamina e 0,2% ciprofloxacina, em atmosfera

úmida de 5% CO₂ à 37°C. O meio de cultura foi trocado a cada três dias até a geração de clusters. Os clusters da cultura 3D foram então utilizados a fresco e/ou fixados em alguns ensaios de caracterização, ou, ainda, para a recelularização dos arcabouços de matriz extracelular descelularizadas humanas.

3.32. Recelularização dos arcabouços descelularizados

3.32.1. Arcabouços murinos – órgão inteiro

Para a recelularização de pâncreas murino descelularizado (órgão inteiro), foram utilizadas 30×10^6 células de cultura primária de células β -pancreáticas murinas ou células MIN6 ou, ainda, $1,5 \times 10^6$ IPCs, diluídos em 3mL de meio de cultivo CMRL 1066, suplementado com 5,6mM de glucose, 10% SFB, 1mM glutamina e 0,2% ciprofloxacina. As células foram introduzidas no pâncreas descelularizado através de perfusão retrógrada pela veia esplênica em três passos, num volume de 1mL cada, com 20min de intervalo. O arcabouço pancreático que recebeu as células foi imerso e cultivado em meio de cultura CMRL 1066, suplementado com 5,6mM de glucose, 10% SFB, 1mM de glutamina e 0,2% ciprofloxacina até 11 dias. O órgão permaneceu canulado pela veia esplênica e pelo ducto pancreático para permitir a perfusão do meio de cultura todos os dias. Os arcabouços recelularizados foram cultivados sob condições estáticas à 37°C em atmosfera de 5% CO₂.

3.32.2. Arcabouços humanos – cortes grossos e cortes finos

Para a recelularização do arcabouço de pâncreas humano, foram utilizados ao invés do arcabouço do órgão inteiro, os cortes grossos e finos descritos anteriormente. A estes cortes foram adicionadas células provenientes de cultura aderente (1×10^6) ou esferóides 3D ($0,5 \times 10^4$, 1×10^4 , $2,5 \times 10^4$ ou 5×10^4) de ilhotas pancreáticas expandidas *in vitro*. As células foram gotejadas nos cortes alocados em placas de cultura em três passos, num volume de 1mL cada, com 20min de intervalo. Os cortes contendo as células foram cultivados

em meio de cultura CMRL 1066, suplementado com 5,6mM de glucose, 10% SFB, 1mM de glutamina e 0,2% ciprofloxacina por até 16 dias. Os arcabouços recelularizados foram cultivados sob condições estáticas à 37°C em atmosfera úmida e 5% CO₂.

3.33. Análises Estatísticas

Todos os dados numéricos obtidos foram submetidos à análise estatística com o auxílio do programa Prism v4.02 (GraphPad). Para análise de medidas que apresentaram distribuição paramétrica, foram utilizadas análise de variância unidirecional (*one-way ANOVA*), seguida do teste *pos-hoc* de Tukey. Para análise de medidas que apresentaram distribuição não paramétrica, foram utilizadas a análise de variância unidirecional (*one-way ANOVA*), seguida do teste *pos-hoc* de Kruskal-Wallis.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os resultados foram organizados de forma a responder às questões norteadoras propostas na Introdução desta Tese.

4.1. Respondendo a Questão Norteadora 1

Visando a criação de arcabouços biológicos (*bioscaffolds*) de forma adequada para a geração de um pâncreas bioartificial, qual seria o detergente mais eficiente, dentre os três principais já utilizados em descclularização de órgãos (Dodecil sulfato de sódio – SDS, Desoxicolado de Sódio – DOC e Triton X-100)?

Para responder esse questionamento foi avaliada a literatura disponível na época (2015) para a descclularização de órgãos inteiros. Esta avaliação levou em conta as características do órgão (pâncreas), os detergentes mais utilizados e eficientes para a descclularização de outros órgãos. Foram selecionados três detergentes: dodecil sulfato de sódio (SDS), desoxicolado de sódio (DOC) e Triton X-100.⁶¹

4.1.1. Descclularização de pâncreas de rato

Para avaliar o melhor detergente para a descclularização de pâncreas, nosso grupo desenvolveu um protocolo baseado na descrição de descclularização de intestino⁵², disponível na literatura, variando-se os detergentes, mas mantendo as demais condições.

Assim, a técnica de extração, canulação e descclularização de pâncreas de rato foi padronizada pelo nosso grupo. O pâncreas de cada animal foi exposto e o ducto pancreático e o ramo da veia porta, (que se torna veia esplênica quando alcança os limites do tecido pancreático) foram evidenciados e canulados, respectivamente. Após a canulação, o pâncreas foi retirado em bloco, juntamente com o baço e parte do intestino ligado ao pâncreas, e

transferido para uma placa de Petri contendo solução salina tamponada com fosfato (PBSA), e mantido à 4°C até o momento do processamento (Figura 11).

Figura 11.: Canulação e extração pancreática murina. O pâncreas de cada animal foi exposto e o ducto pancreático e o ramo da veia porta, (que se torna veia esplênica quando alcança os limites do tecido pancreático) foram evidenciados e canulados, respectivamente. Após a canulação, o pâncreas foi retirado em bloco, juntamente com o baço e parte do intestino ligado ao pâncreas. Foi transferido para uma placa de Petri contendo solução salina tamponada com fosfato (PBSA) e mantido à 4°C até o momento do processamento. A seta vermelha indica canulação do ramo da veia porta; a seta azul indica canulação do ducto pancreático e a área tracejada em vermelho indica o pâncreas. Fonte: a autora.

Conforme mencionado anteriormente, a descelularização dos pâncreas foi realizada utilizando como base um protocolo previamente descrito na literatura⁵² para descelularização de intestino que utiliza perfusão retrógrada através das vias acima mencionadas além de solução detergente-enzimática (com variação do detergente: 1% SDS ou 4% DOC 4% ou 1% Triton X-100; e, ainda, uma solução enzimática de desoxirribonuclease - DNase-I - 2000kU), por um período de 31h.

Ao avaliar macroscopicamente os pâncreas descelularizados com os diferentes detergentes, o SDS 1% se mostrou ser o agente mais agressivo para a matriz extracelular pancreática, evidenciado pela perda de arquitetura do arcabouço característico durante o tempo de exposição ao detergente. Por outro lado, não foi evidenciada perda de arquitetura ao se utilizar o Triton 1%.

Porém, o mesmo se mostrou ineficiente na completa remoção do conteúdo celular. Por outro lado, a aplicação de DOC 4% apresentou, a princípio, o melhor resultado, pois se mostrou eficiente na remoção celular, mantendo a arquitetura macroscópica do arcabouço (Figura 12).

Figura 12.: Descelularização de pâncreas de rato com os diferentes detergentes. A) Pâncreas nativo antes de ser submetido ao processo de descelularização. B) Pâncreas descelularizado com o detergente Triton X-100 na concentração 1%. C) Pâncreas descelularizado com o detergente SDS 1%. D) Pâncreas descelularizado com o detergente DOC 4%. A seta indica o pâncreas. Fonte: a autora.

4.1.2. Quantificação de DNA

Para comparar a eficiência dos diferentes detergentes para a remoção celular, foi realizada a quantificação de DNA genômico total nas amostras. Conforme mostra o Gráfico 1, a quantidade de DNA remanescente nos pâncreas submetidos aos protocolos de descelularização foram inferiores à quantidade de DNA presente no tecido nativo, sendo: tecido nativo $40,01 \pm 13,97$ ng/mg, Triton 1% $3,72 \pm 0,59$ ng/mg, SDS 1% $3,02 \pm 1,23$ ng/mg e DOC 4% $0,97 \pm 0,15$ ng/mg, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os diferentes detergentes.

Gráfico 1.: Avaliação dos diferentes detergentes - Quantificação de DNA. Quantificação DNA Genômico das amostras de pâncreas nativo, e pâncreas descelularizado com os três tipos de detergentes Triton X-100 1%, SDS 1% e DOC 4%. (n=3). Fonte: a autora.

4.1.3. Análises Histológicas

Para comparar a eficiência da remoção celular e manutenção da arquitetura do tecido ao nível microscópico, foram realizadas análises histológicas nas amostras, utilizando-se as colorações de Hematoxilina e Eosina, Azul de Alcian e Vermelho de Picrosírius.

Por meio da coloração de Hematoxilina e Eosina, foi possível observar que o tecido descelularizado pelo Triton 1% manteve a arquitetura da matriz extracelular, porém, ainda foram observadas células remanescentes. No tecido descelularizado pelo SDS 1% não foram observadas células remanescentes, contudo, a matriz extracelular não se manteve íntegra e não foi possível visualizar a marcação da coloração em outras regiões que não em regiões próximas aos vasos sanguíneos e ductos. Por outro lado, no tecido descelularizado pelo DOC 4% não foram observadas células remanescentes e a arquitetura nativa da matriz extracelular foi mantida íntegra (Figura 13).

A coloração de Azul de Alcian foi utilizada para visualização de proteoglicanos e GAGs, uma vez que os mesmos já foram descritos como tendo papel importante para a etapa de recelularização⁵⁴. Foi possível observar proteoglicanos e GAGs remanescentes em todos os arcabouços descelularizados, entretanto, os arcabouços resultantes do tratamento com SDS 1% apresentaram pouquíssima marcação (Figura 14).

Por meio da coloração de Vermelho de Picrosírius foi possível visualizar que todos os tecidos descelularizados mantiveram o arcabouço de colágeno, todavia, foi observada aparente ruptura das fibras de colágeno em diversos campos dos arcabouços resultantes do tratamento com SDS 1% (Figura 15).

Figura 13.: Avaliação dos diferentes detergentes - Histologia Pancreática – Hematoxilina/Eosina. A) Pâncreas de Rato Nativo. B) Pâncreas de Rato Descelularizado com Triton 1%. C) Pâncreas de Rato Descelularizado com SDS 1%. D) Pâncreas de Rato Descelularizado com DOC 4%. A seta vermelha indica uma ilhota pancreática e a seta azul indica a presença de vaso sanguíneo. A barra indica 100µm. Fonte: a autora.

Figura 14.: Avaliação dos diferentes detergentes - Histologia Pancreática – Azul de Alcian. A) Pâncreas de Rato Nativo. B) Pâncreas de Rato Descelularizado com Triton 1%. C) Pâncreas de Rato Descelularizado com SDS 1%. D) Pâncreas de Rato Descelularizado com DOC 4%. A barra indica 100µm. Fonte: a autora.

Figura 15.: Avaliação dos diferentes detergentes - Histologia Pancreática – Vermelho de Picrosírius. A) Pâncreas de Rato Nativo. B) Pâncreas de Rato Descelularizado com Triton 1%. C) Pâncreas de Rato Descelularizado com SDS 1%. D) Pâncreas de Rato Descelularizado com DOC 4%. As Setas Vermelhas indicam ilhotas pancreáticas. As Setas Azuis indicam vasos sanguíneos. A barra indica 100µm. Fonte: a autora.

4.1.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi utilizada para realizar uma comparação da ultraestrutura dos arcabouços decelularizados.

Foi possível visualizar que o tecido decelularizado pelo Triton 1% manteve a arquitetura da matriz extracelular, mantendo fibras e fibrilas de colágeno, proteoglicanos e GAGs, porém, ainda foram observadas restos celulares junto ao arcabouço. No tecido decelularizado pelo SDS 1% foi observada grande perda da arquitetura característica do tecido, com quebras nas fibras e fibrilas de colágeno e espaços com ausência dos mesmos, não

sendo possível visualizar proteoglicanos e GAGs nas amostras analisadas. Por outro lado, nos tecidos pancreáticos descelularizados utilizando-se o DOC 4% não foram observadas células remanescentes e a ultraestrutura do tecido foi mantida, com a presença de fibras/fibrilas de colágeno, proteoglicanos e GAGs (Figura 16).

Figura 16.: Avaliação dos diferentes detergentes - Microscopia Eletrônica de Transmissão. A) Tecido Pancreático Nativo com detalhes indicando: Sex - Secreção Exócrina. A - Ácinos. B) Tecido Nativo com detalhes indicando: GI - Grânulo de Insulina. C - Colágeno. C) Tecido Nativo com detalhes indicando: A – Ácinos. A seta azul indica o ducto pancreático. D) Tecido Nativo com detalhes indicando: I - Ihota pancreática. A seta vermelha indica uma célula de vaso sanguíneo. E) Pâncreas de Rato Descelularizado com Triton 1%. Asterisco indica a presença de restos celulares. F) Pâncreas de Rato Descelularizado com SDS 1%. G) Pâncreas de Rato

Descelularizado com DOC 4%. A seta vermelha indica proteoglicanos e GAGs. A seta azul indica fibras/fibrilas de colágeno. A barra indica 2µm Fonte: a autora.

4.1.5. Quantificação de Glicosaminoglicanos (GAGs)

Conforme já mencionado anteriormente, a manutenção dos glicosaminoglicanos - GAGs nos arcabouços descclularizados desempenha um papel importante para a etapa de recelularização⁵⁴. Foi realizado um ensaio quantitativo para medir a presença dos GAGs remanescentes nos tecidos submetidos aos protocolos de descclularização. Os resultados apresentados no Gráfico 2 mostram que os arcabouços descclularizados com Triton 1% resultaram em $1,29 \pm 0,16$ µg/0,017g de GAGs remanescentes; com SDS 1% resultaram em $2,81 \pm 2,15$ µg/0,017g de GAGs remanescentes; e com DOC 4% resultaram em $1,54 \pm 0,82$ µg/0,017g de GAGs remanescentes, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre os detergentes (Gráfico 2).

Gráfico 2.: Avaliação dos diferentes detergentes - Quantificação de GAGs. Quantificação GAGs das amostras de pâncreas descclularizados com os três tipos de detergentes Triton 1%, SDS 1% e DOC 4% (n=3). Fonte: a autora.

4.2. Respondendo a Questão Norteadora 2

A metodologia aqui desenvolvida de descelularização de pâncreas murino pode ser extrapolada e aplicada na descelularização de pâncreas humano?

Para responder esse questionamento, foram descelularizados pâncreas de rato (n=6) e pâncreas humanos (n=6) utilizando-se o mesmo protocolo com o incremento, apenas, de um maior período de tempo na lavagem final em água dos arcabouços humanos gerados, sendo coletadas amostras para avaliação e comparação dos resultados obtidos.

4.2.1. Descelularização de pâncreas de rato

A descelularização dos pâncreas foi padronizada e realizada com DOC 4%, detergente escolhido como sendo o mais eficiente em nosso protocolo de descelularização, conforme descrito no item anterior. Dessa forma, os pâncreas de rato foram descelularizados por meio de perfusão retrógrada, através das vias acima mencionadas, utilizando-se solução detergente-enzimática de DOC 4% e DNase-I (2000kU), por um período de 31 horas (Figura 17).

Figura 17.: Descelularização de pâncreas de rato com detergente DOC 4%. A) Pâncreas de rato com tecido nativo. A seta azul indica o pâncreas com sua arquitetura difusa. **B)** Pâncreas de rato descelularizado (arcabouço). A seta indica o pâncreas com a manutenção da rede vascular e aparente remoção celular. Fonte: a autora.

4.2.2. Descelularização de pâncreas humano

A técnica de extração, limpeza e canulação pancreática humana foi padronizada pelo nosso grupo, procedimento este que é detalhado na seção de Materiais e Métodos. Os pâncreas humanos foram canulados com cateteres sanguíneos de tamanho adequado ao calibre do vaso através do ducto pancreático (ou ducto de Wirsung), artéria esplênica e veia esplênica. Após a canulação, os pâncreas foram imediatamente submetidos ao protocolo de descelularização (Figura 18).

Figura 18.: Canulação de pâncreas humano. A) Pâncreas humano após extração e limpeza. Área tracejada em vermelho indica a retirada da região da cabeça do pâncreas antes da canulação. B) Pâncreas humano canulado com cateteres sanguíneos de tamanho adequado ao calibre do vaso, através do ducto pancreático (ou ducto de Wirsung), artéria esplênica e veia esplênica, após a retirada da cabeça do pâncreas, indicados pelas setas. Fonte: a autora.

A descelularização dos pâncreas humanos foi padronizada e realizada por meio de perfusão retrógrada, através das vias acima mencionadas,

utilizando-se solução detergente-enzimática de DOC 4% e DNase-I - 2000kU, e lavagem final em água tipo I por um período total aproximado de 5 dias (Figura 19).

Figura 19.: Descelularização de pâncreas humano. A) Pâncreas humano antes do processo de descelularização. B) Pâncreas humano descelularizado (arcabouço), visualização esbranquiçada e esponjosa externa do arcabouço. B) Pâncreas humano descelularizado (arcabouço), visualização esbranquiçada e esponjosa externa interna do arcabouço. Fonte: a autora.

4.2.3. Principais dados clínicos dos doadores dos pâncreas humanos

Os principais dados clínicos dos doadores de pâncreas humanos foram compilados na Tabela 3, indicando que: 2/3 dos pâncreas doados eram de pacientes do sexo feminino; a idade média dos doadores foi de 52 anos $\pm$ 9; a média do IMC foi de 27,3 $\pm$ 1,8; a glicemia média encontrada foi de 196mg/dl $\pm$ 72; e da hemoglobina 10,8g/dl $\pm$ 1,4.

Tabela 3: Principais dados clínicos dos doadores dos pâncreas humanos utilizados para a descelularização.

Pâncreas	Sexo	Idade (anos)	Glicemia (mg/dl)	Hemoglobina (g/dl)	IMC *
PH1	M	55	134	13,4	28,9
PH2	F	57	123	9,2	29,4
PH3	F	61	361	11,4	24,7
PH4	F	56	187	9,0	26,4
PH5	F	52	183	11,5	29,4
PH6	M	30	186	10,5	25,4

* IMC: Índice de Massa Corpórea,

4.2.4. Quantificação de DNA

Para comparar a eficiência da remoção celular foi realizada a quantificação de DNA genômico total nas amostras. As quantidades de DNA remanescentes observadas nos tecidos pancreáticos submetidos aos protocolos de descelularização foram inferiores à quantidade de DNA presente no tecido nativo, sendo: a) para pâncreas de rato, tecido nativo $1.561,3 \pm 217,5$ ng/mg e arcabouço descelularizado $15,09 \pm 6,9$ ng/mg ($p < 0,0001$); e b) para pâncreas humanos, tecido nativo $1.238,8 \pm 342,8$ ng/mg ($p < 0,0001$) e arcabouço descelularizado $39,38 \pm 17,6$ ng/mg. Demonstrando uma remoção de aproximadamente 99% e 97% de DNA dos pâncreas de rato e humanos, respectivamente (Gráfico 3).

Gráfico 3.: Pâncreas de rato vs pâncreas humano - Quantificação de DNA. Quantificação DNA Genômico das amostras de pâncreas nativo, e pâncreas descelularizado. A) Pâncreas de rato. B) Pâncreas humano. (n=06). Fonte: a autora.

4.2.5. Análise histológica de pâncreas humano versus de rato após a descelularização

Para realizar uma comparação da eficiência de remoção celular e manutenção da arquitetura do tecido ao nível microscópico, foram realizadas análises histológicas das amostras, utilizando-se as colorações de Hematoxilina e Eosina – HE, Azul de Alcian, Azul de Toluidina, Vermelho de Picrosírius e Resorcina Fuccina com oxidação em Oxona.

Por meio da coloração de HE foi possível observar, de forma qualitativa, que os tecidos descelularizados, tanto de rato quanto de humano, não apresentaram células remanescentes e a arquitetura nativa da matriz extracelular foi mantida íntegra (Figura 20).

Figura 20.: Pâncreas de rato vs pâncreas humano - Histologia Pancreática – Hematoxilina/Eosina. A) Pâncreas de Rato Nativo; figura já apresentada anteriormente nessa tese como Figura 18 - letra A, como ilustração do tecido pancreático murino nativo. B) Pâncreas de Rato Descelularizado. C) Pâncreas Humano Nativo. B) Pâncreas Humano Descelularizado. A seta vermelha indica ilhota pancreática e a seta preta indica vaso sanguíneo. A barra indica 100µm. Fonte: a autora.

As colorações de Azul de Alcian e de Azul de Toluidina foram utilizadas para visualização de proteoglicanos e GAGs. Foi possível observar, de forma qualitativa, os proteoglicanos e GAGs remanescentes em todos os arcabouços descelularizados, tanto de rato quanto de humano (Figuras 21 e 22).

Figura 21.: Pâncreas de rato vs pâncreas humano - Histologia Pancreática – Azul de Alcian. A) Pâncreas de Rato Nativo; figura já apresentada anteriormente nessa tese como Figura 19 - letra A, como ilustração do tecido pancreático murino nativo. B) Pâncreas de Rato Descelularizado. C) Pâncreas Humano Nativo. D) Pâncreas Humano Descelularizado. A barra indica 100µm. Fonte: a autora.

Por meio da coloração de Vermelho de Picrosírius foi possível visualizar que todos os tecidos descelularizados, tanto de rato quanto de humano, mantiveram o arcabouço de colágeno, conservando tanto fibras finas como intermediárias e grossas. Conforme observado, de forma qualitativa, sob luz branca e luz polarizada (Figura 23).

Figura 22.: Pâncreas de rato vs pâncreas humano - Histologia Pancreática – Azul de Toluidina. A) Pâncreas de Rato Nativo. B) Pâncreas de Rato Descelularizado. C) Pâncreas Humano Nativo. D) Pâncreas Humano Descelularizado. A seta vermelha indica ilhota pancreática e a seta preta indica vaso sanguíneo. A barra indica 100µm. Fonte: a autora.

Figura 23.: Pâncreas de rato vs pâncreas humano - Histologia Pancreática – Vermelho de Picrosírius. A) Pâncreas de Rato Nativo – luz branca. B) Pâncreas de Rato Descelularizado – luz branca. C) Pâncreas de Rato Nativo – luz polarizada. D) Pâncreas de Rato Descelularizado – luz polarizada. E) Pâncreas Humano Nativo – luz branca. F) Pâncreas Humano Descelularizado – luz branca. G) Pâncreas Humano Nativo – luz polarizada. H) Pâncreas Humano Descelularizado – luz polarizada. A barra indica 100µm. Fonte: a autora.

Por meio da coloração de Resorcina Fuccina, com Oxidação em Oxona, foi possível visualizar a manutenção da presença de fibras elásticas nos tecidos humanos após a decelularização, porém, estas não foram observadas nos arcabouços murinos remanescentes (Figura 24).

Figura 24.: Pâncreas de rato vs pâncreas humano - Histologia Pancreática – Resorcina Fuccina, com Oxidação em Oxona. A) Pâncreas de Rato Nativo. B) Pâncreas de Rato Descelularizado. C) Pâncreas Humano Nativo. B) Pâncreas Humano Descelularizado. Os asteriscos indicam marcação para fibras elásticas. A barra indica 100µm. Fonte: a autora.

4.2.6. Análise da Ultraestrutura por MET

A ultraestrutura da matriz descelularizada, tanto murina quanto humana, foi avaliada por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), observando-se de forma qualitativa a eficiência do processo de descelularização do nosso protocolo e a possibilidade de extrapolação da tecnologia desenvolvida para pâncreas humanos.

No tecido nativo, tanto murino quanto humano, foi possível visualizar núcleos celulares de células de ilhotas pancreáticas, assim como grânulos de insulina e secreções exócrinas, fibras e fibrilas de colágeno e presença de proteoglicanos e GAGs. Em todas as amostras de arcabouços descelularizados

não foram observadas células ou restos celulares, apresentando somente fibras/fibrilas de colágeno, proteoglicanos e GAGs (Figura 25).

Figura 25.: Pâncreas de rato vs pâncreas humano - Análise da Ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Transmissão. A) Pâncreas de Rato Nativo; figura já apresentada anteriormente nessa tese como Figura 16 - letra C e Figura 21 - letra A,

para ilustração do tecido nativo. A barra indica 1 μ m. B) Pâncreas de Rato Descelularizado. A barra indica 0,5 μ m. C) Pâncreas Humano. A barra indica 2 μ m. D) Pâncreas Humano Descelularizado. A barra indica 2 μ m. E) Detalhe do arcabouço descelularizado de rato indicando os feixes de colágeno e os proteoglicanos e glicosaminoglicanos de matriz. A barra indica 0,5 μ m. F) Detalhe do arcabouço descelularizado humano indicando os feixes de colágeno e os proteoglicanos e glicosaminoglicanos de matriz. A barra indica 1 μ m. Seta azul indica os proteoglicanos e glicosaminoglicanos de matriz e a seta vermelha indica os feixes de colágeno. GI - Grânulo de Insulina. I – Ilhota pancreática. * Feixes de colágeno em corte transversal. Fonte: a autora.

4.2.7. Avaliação por MEV

A superfície das amostras nativa e descelularizada de pâncreas de rato e humano foi avaliada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) observando-se, de forma qualitativa, a eficiência do processo de descelularização do nosso protocolo e a manutenção da arquitetura dos arcabouços.

No tecido nativo, tanto murino quanto humano, foi possível visualizar núcleos celulares de células de ilhotas pancreáticas, assim como grânulos de insulina e secreções exócrinas, fibras e fibrilas de colágeno e a presença de proteoglicanos e GAGs. Nos arcabouços descelularizados, novamente, em todas as amostras, não foram observadas células ou restos celulares, apresentando apenas feixes de colágeno (Figuras 26 e 27).

Interessantemente, foi observada a presença de cristais em certas regiões de algumas amostras de pâncreas humanos após o processo de descelularização (Figuras 28). Esses cristais foram avaliados no momento de aquisição das imagens de MEV, por meio da coleta dos raios X característicos, que é empregada para se estudar composição elementar através do mapeamento composicional e semiquantitativo - EDS, demonstrando uma provável composição química compatível com um composto orgânico (presença de carbono e oxigênio) (Figura 29).

Figura 26.: Microscopia Eletrônica de Varredura – Pâncreas de rato. A) Pâncreas de Rato Nativo. A barra indica 100µm. B) Pâncreas de Rato Nativo. A barra indica 100µm. C) Pâncreas de Rato Descelularizado. A barra indica 10µm. D) Pâncreas de Rato Descelularizado. A barra indica 10µm. Fonte: a autora.

Figura 27.: Microscopia Eletrônica de Varredura – Pâncreas humano. A) Pâncreas Humano Nativo. A barra indica 100µm. B) Pâncreas Humano Nativo. A barra indica 100µm. C) Pâncreas Humano Descelularizado, feixes grossos de colágeno. A barra indica 10µm. D) Pâncreas Humano Descelularizado, feixes grossos de colágeno. A barra indica 10µm. E) Pâncreas Humano Descelularizado, feixes finos de colágeno. A barra indica 10µm. F) Pâncreas Humano Descelularizado, feixes finos de colágeno. A barra indica 1µm. Fonte: a autora.

Figura 28.: Cristais em Arcabouços de Pâncreas humano. A figura mostra uma imagem representativa da presença de cristais em certas regiões de algumas amostras de pâncreas humanos após o processo de descélularização. A seta branca indica cristais de positados no arcabouço descélularizado. A barra indica 10µm. Fonte: a autora.

Figura 29.: Mapeamento composicional e semiquantitativo de energia dispersiva de raio X – EDS. A figura mostra a avaliação realizada no momento de aquisição das imagens de MEV, por meio da coleta dos raios X característicos, para avaliar a composição elementar através do mapeamento composicional e semiquantitativo - EDS, demonstrando uma provável composição química compatível com um composto orgânico pela presença de carbono e oxigênio. A barra indica 10µm. Fonte: a autora.

4.2.8. Avaliação por Espectroscopia Raman

Os arcabouços de pâncreas descelularizados foram analisados através da Espectroscopia Raman, como mais uma ferramenta para avaliar a eficiência do processo de descelularização do nosso protocolo e a manutenção dos arcabouços após a descelularização.

Os resultados obtidos, nos arcabouços descelularizados, tanto humano quanto murino, indicam a presença de picos previamente descritos na literatura^{91,92}, sendo: colágeno (deslocamentos em 855, 939, 1300 e 1660), elastina e lipídios (deslocamentos em 1660) e aminoácidos em proteínas (deslocamentos em 2963). Ademais, foi possível observar a presença de picos (deslocamentos em 1010, 1156 e 1559), anteriormente relatados na literatura^{93,94}, como sendo correspondentes a algum composto orgânico que esteja presente na matriz, além das proteínas estruturais esperadas após o processo de descelularização. Esses achados foram encontrados em arcabouços humanos, e, em menor intensidade, nos arcabouços murinos (Figura 30).

Figura 30.: Espectroscopia Raman. A figura mostra a presença de picos característicos de matriz extracelular, sendo: colágeno (deslocamentos em 855, 939, 1300 e 1660), elastina e lipídios (deslocamentos em 1660) e aminoácidos em proteínas (deslocamentos em 2963). Além disso, foi observar a presença de picos (deslocamentos em 1010, 1156 e 1559) correspondentes a algum composto orgânico presente na matriz, além das proteínas estruturais esperadas, após o processo de descélularização. As setas e números em vermelho correspondem aos deslocamentos do composto orgânico e aqueles em azul referem-se aos componentes característicos de matriz extracelular. Fonte: a autora.

4.3. Respondendo a Questão Norteadora 3

Visando à recelularização desses arcabouços biológicos (*bioscaffolds*) de forma adequada para a geração de um pâncreas bioartificial, seria possível a criação de um Banco de Matriz Pancreática Descelularizada e qual seria a melhor condição a ser empregada para tanto?

Para responder esse questionamento, avaliou-se a literatura da época para descobrir as principais formas de armazenamento de órgãos descelularizados até seu momento de uso, sendo verificado o uso de solução salina tamponada com fosfato (PBSA) e mantidos à 4°C e PBSA

suplementado com antibiótico e antimicótico (PBSA-AA) mantidos à 4°C^{52, 53, 54, 59}, porém sem indicação de tempo máximo de armazenamento ou maiores caracterizações de como esse arcabouços se comportam nesses meios.

Foi realizada a descelularização de pâncreas de rato (n=12) utilizando nosso protocolo, conforme descrito no item anterior. Os arcabouços gerados através da descelularização foram imediatamente separados em amostras e mantidos sob diferentes condições de armazenamento para avaliação periódica, conforme descrito de forma detalhada, em Materiais e Métodos: a) PBSA 4°C; b) PBSA-AA 4°C; e c) CRIO -80°C: meio de criopreservação, RPMI 1640 suplementado com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 10% de soro fetal bovino (SFB), mantidos à -80°C.

4.3.1. Análises Histológicas

Para realizar uma comparação ao nível microscópico da manutenção da arquitetura dos arcabouços desde o tempo zero até 16 semanas nas diferentes maneiras de armazenamento, foram realizadas análises histológicas nas amostras utilizando-se as colorações de Hematoxilina e Eosina – HE, Azul de Alcian e Vermelho de Picrosírius.

A coloração de Hematoxilina e Eosina - HE permitiu avaliar de forma qualitativa a eficiência do processo de descelularização do protocolo bem como a arquitetura dos arcabouços nos diferentes períodos de tempos e formas de armazenamento testados. No tecido descelularizado observou-se ausência de células e manutenção da arquitetura nativa da matriz extracelular pancreática até o final do período avaliado de 16 semanas de armazenamento, em todas as condições analisadas (Figura 31).

Figura 31.: Preservação dos Arcabouços - Histologia Pancreática – Hematoxilina/Eosina. A) Pâncreas de Rato Nativo. A Seta Vermelha indica uma ilhotas pancreática e a seta azul indica um vaso sanguíneo. B) Pâncreas de Rato Descelularizado no tempo zero. C) Campos representativos das amostras avaliadas nas diferentes condições de armazenamento e diferentes períodos de tempo. PBSA: tampão fosfato salino. PBSA-AA: tampão fosfato salino suplementado com antibiótico e antimicótico. CRIO: meio de criopreservação. A barra indica 100µm. Fonte: a autora.

A coloração de Azul de Alcian foi utilizada para avaliar, de forma qualitativa, a presença de proteoglicanos e GAGs resmanescentes, sendo possível observar uma perda gradativa na coloração das amostras com o passar do tempo, em todos os meios de preservação avaliados, sendo menos acentuada no meio de criopreservação (Figura 32).

Figura 32.: Preservação dos Arcabouços - Histologia Pancreática – Azul de Alcian. A) Pâncreas de Rato Nativo. B) Pâncreas de Rato Descelularizado tempo zero. C) Campos representativos das amostras avaliadas nas diferentes condições de armazenamento e diferentes períodos de tempo. PBSA: tampão fosfato salino. PBSA-AA: tampão fosfato salino suplementado com antibiótico e antimicótico. CRIO: meio de criopreservação. A barra indica 100µm. Fonte: a autora.

Por meio da coloração de Vermelho de Picrosírius, foi avaliada, de forma qualitativa, a manutenção do arcabouço de colágeno, sendo observado que todos os tecidos descclularizados mantiveram esse arcabouço de colágeno e, ainda, que essas fibras/fibrilas de colágeno, aparentemente, são mantidas no arcabouço descclularizado de forma íntegra até o final do período avaliado, ou seja, 16 semanas de armazenamento, em todas as condições avaliadas (Figura 33).

Figura 33.: Preservação dos Arcabouços - Histologia Pancreática – Vermelho de Picrosírius. A) Pâncreas de Rato Nativo. B) Pâncreas de Rato Descelularizado tempo zero. C) Campos representativos das amostras avaliadas nas diferentes condições de armazenamento e em diferentes períodos de tempo. PBSA: tampão fosfato salino. PBSA-AA: tampão fosfato salino suplementado com antibiótico e antimicótico. CRIO: meio de criopreservação. A barra indica 100µm. Fonte: a autora.

4.2.2. Análise da Ultraestrutura por MET

A ultraestrutura da matriz descelularizada foi avaliada por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) observando-se, de forma qualitativa, a eficiência do processo de descelularização e a manutenção da arquitetura dos arcabouços nos diferentes períodos de tempo e nas diferentes formas de armazenamento testados.

No tecido nativo foi possível visualizar núcleos celulares de células de ilhotas pancreáticas, assim como grânulos de insulina, secreções exócrinas,

fibras e fibrilas de colágeno, presença de proteoglicanos e GAGs. Nos arcabouços descelularizados de todas as amostras não foram observados células ou restos celulares, apresentando somente fibras/fibrilas de colágeno, proteoglicanos e GAGs. A avaliação das fibras/fibrilas de colágeno demonstrou que, aparentemente, elas são mantidas no arcabouço descelularizado até o final do período analisado, em todos os meios de preservação. Quanto à presença de proteoglicanos e GAGs, eles apareceram ligados a fibrilas de colágeno, sendo possível observar uma perda gradativa nas semanas posteriores em todos os meios de preservação avaliados, mas sendo essa perda menos acentuada no meio de criopreservação (Figura 34).

Figura 34.: Preservação dos Arcabouços - Análise da Ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Transmissão. A) Pâncreas de Rato Nativo; figura já apresentada anteriormente nessa tese como Figura 16 - letra C, para ilustração do tecido nativo. A seta azul indica os proteoglicanos e glicosaminoglicanos de matriz. A seta vermelha indica as fibras/fibrilas de colágeno. GI - Grânulo de Insulina. B) Pâncreas de Rato Descelularizado tempo zero. PBSA: tampão fosfato salino. PBSA-AA: tampão fosfato salino suplementado com antibiótico e antimicótico. CRIO: meio de

criopreservação. A seta azul indica os proteoglicanos e glicosaminoglicanos de matriz a seta vermelha indica as fibras/fibrilas de colágeno. Fonte: a autora.

4.2.3. Dosagem de Proteínas Totais

A dosagem das proteínas totais nos sobrenadantes mostrou que, gradativamente, todas as amostras apresentaram proteínas no sobrenadante de forma tempo dependente. As amostras mantidas PBSA apresentaram perda de proteínas de aproximadamente 24,26µg/mL ($\pm 0,015$) na 2ª semana, com uma perda mais expressiva a partir da 4ª semana de aproximadamente 64,9 µg/mL ($\pm 1,830$) e, ao final da 16ª semana um valor de 112,91 µg/mL ($\pm 3,630$) de proteínas totais no meio. As amostras mantidas PBSA-AA apresentaram perda de proteínas de aproximadamente 27,04µg/mL ($\pm 5,708$) já na 1ª semana, com uma perda mais expressiva a partir da 2ª semana de aproximadamente 73,37 µg/mL ($\pm 9,873$) e ao final da 16ª semana um valor de 124,47 µg/mL ($\pm 0,040$). As amostras mantidas em CRIO apresentaram perda de proteínas de aproximadamente 7,04µg/mL ($\pm 0,427$) na 2ª semana, apresentando uma perda mais expressiva a partir da 8ª semana de aproximadamente 74,48 µg/mL ($\pm 1,813$), e ao final da 16ª semana um valor de 93,88 µg/mL ($\pm 0,514$). Ao comparar os diferentes meios de manutenção dos arcabouços nos mesmos períodos de tempo, foi possível observar diferença entre eles logo na segunda semana (PBSA / PBSA-AA, **** = $p < 0,0001$, PBSA-AA / CRIO, **** = $p < 0,0001$) e na quarta semana (PBSA / CRIO, *** = $p < 0,001$, PBSA-AA / CRIO, **** = $p < 0,0001$). Após a quarta semana todas as condições apresentam quantidades similares de proteínas no sobrenadante, porém, ainda existe diferença estatisticamente significativa entre os meios PBSA-AA e CRIO (8 semanas ** = $p < 0,01$, 12 semanas, *** = $p < 0,001$, e 16 semanas * = $p < 0,05$) (Gráfico 4 e Tabela 4).

Gráfico 4.: Dosagem de Proteínas Totais. Quantificação de Proteínas totais no sobrenadante das amostras desculturizadas que foram armazenadas por diferentes períodos de tempo em diferentes meios de preservação, através do Método de Bradford. T0: tempo zero, T1H: 1 hora, T1SEM: 1 semana, T2SEM: 2 semanas, T4SEM: 4 semanas, T8SEM: 8 semanas, T12SEM: 12 semanas, T16SEM: 16 semanas. O asterisco representa a diferença estatística entre os mesmos períodos de tempo e nas diferentes condições de manutenção dos arcabouços. * PBSA / PBSA-AA, * PBSA / CRIO, * PBSA-AA / CRIO. (Two-way ANOVA. **** = $p < 0,0001$, *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$) (n=03). Fonte: a autora.

Tabela 4: Quantificação de proteínas totais no sobrenadante das amostras desculturizadas que foram armazenadas por diferentes períodos de tempo em diferentes meios de preservação.

	PBSA ($\mu\text{g/mL}$)	PBSA-AA ($\mu\text{g/mL}$)	CRIO ($\mu\text{g/mL}$)
T0	6,91 $\pm$ 0,616	7,10 $\pm$ 1,330	0
T1H	7,06 $\pm$ 0,396	11,12 $\pm$ 1,926	0
T1SEM	18,16 $\pm$ 0,092	27,04 $\pm$ 5,708	6,73 $\pm$ 1,023
T2SEM	24,26 $\pm$ 0,015 *	73,37 $\pm$ 9,873 *	7,04 $\pm$ 0,427 *
T4SEM	64,90 $\pm$ 1,830 *	77,08 $\pm$ 4,977 *	21,23 $\pm$ 0,977 *
T8SEM	92,58 $\pm$ 4,977	111,50 $\pm$ 0260 *	74,48 $\pm$ 1,813 *
T12SEM	112,00 $\pm$ 5,063 *	91,07 $\pm$ 0,035	77,65 $\pm$ 21,772 *
T16SEM	112,91 $\pm$ 3,630	124,47 $\pm$ 0,040 *	93,88 $\pm$ 0,514 *

Legenda: T0: tempo zero, T1H: 1 hora, T1SEM: 1 semana, T2SEM: 2 semanas, T4SEM: 4 semanas, T8SEM: 8 semanas, T12SEM: 12 semanas, T16SEM: 16 semanas. O asterisco representa a diferença estatística entre os mesmos períodos de tempo e nas diferentes condições de manutenção dos arcabouços. * PBSA / PBSA-AA, * PBSA / CRIO, * PBSA-AA / CRIO. (Two-way ANOVA. **** = $p < 0,0001$, *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$) (n=03). Fonte: a autora.

4.4. Respondendo a Questão Norteadora 4

As matrizes pancreáticas descelularizadas murinas e humanas originadas por meio do nosso protocolo podem ser recelularizadas?

Para responder esse questionamento, foram testadas diversas estratégias aqui descritas para a recelularização dos arcabouços murinos e humanos gerados por descelularização.

4.4.1. Recelularização de arcabouços murinos

Para a recelularização dos arcabouços murinos gerados por descelularização, foram testadas estratégias de recelularização independentes partindo-se de três fontes distintas de células produtoras de insulina, sendo elas: a) MIN6: células produtoras de insulina derivadas de linhagem celular murina de tecido pancreático endócrino; b) cultura primária de ilhotas pancreáticas murinas isoladas; e c) células IPCs: células murinas produtoras de insulina, do inglês *insulin producing cells*, produzidas a partir da diferenciação de células tronco embrionárias murinas (mESCs) (Figura 35).

As células MIN6 e IPCs foram previamente caracterizadas e doadas, conforme descrito em Materiais e Métodos, para utilização neste estudo. As células de cultura primária de ilhotas pancreáticas murinas isoladas para o desenvolvimento deste estudo foram caracterizadas antes de serem utilizadas na recelularização, quanto a: contagem celular, viabilidade morfológica, avaliação microbiológica e avaliação de contaminação por micoplasma.

Após o processo de isolamento das ilhotas pancreáticas murinas foi possível obter 3.000 ilhotas com viabilidade celular de cerca de 70% (Figura 36). Após colocação dessas ilhotas pancreáticas murinas em cultura aderente 2D, imediatamente antes da sua utilização no protocolo de recelularização, foram realizados os testes de avaliação de contaminação microbiológica, com resultado negativo, e teste de contaminação por micoplasma, também com resultado negativo (Figura 37).

Figura 35.: Fontes celulares utilizadas para a recelularização de arcabouço murino. A) Cultura primária de ilhotas pancreáticas murinas isoladas. Aumento 10X. B) MIN6: células produtoras de insulina de linhagem celular murina derivadas a partir de tecido pancreático endócrino. A barra indica 400µm. Figuras C, D e E foram gentilmente cedidas pela Dra. Patrícia Mayumi Kossugue; C) células IPCs: células murinas produtoras de insulina, do inglês *insulin producing cells*, produzidas a partir da diferenciação de células tronco embrionárias murinas (mESCs). Aumento 40X. Fonte: Figuras A e B - a autora, Figuras C, D e E foram gentilmente cedidas pela Dra. Patrícia Mayumi Kossugue, retiradas da sua Tese de Doutorado⁹⁵ (parte da Figura 12, página 72).

Figura 36.: Viabilidade morfológica ilhotas murinas. Avaliação da viabilidade morfológica foram utilizados os corantes diacetato de fluoresceína (FDA) e o iodeto de propídio (PI) para marcação celular. O FDA funciona como um marcador de células viáveis que aparecem em verde brilhante. O PI funciona como um marcador de células

mortas ou células não viáveis que aparece em vermelho/alaranjado brilhante. A imagem mostra uma ilhota representativa. Aumento 20X. Fonte: a autora.

Figura 37.: Teste de avaliação de contaminação por Micoplasma em cultura de ilhotas pancreáticas murinas e humanas. A imagem mostra a realização do teste previamente descrito na literatura⁹⁰, para a detecção de contaminação por Micoplasma, por meio da técnica de Nested-PCR. Fonte: a autora.

De posse das células murinas e dos arcabouços descelularizados, iniciamos as diversas estratégias de recelularização. Os arcabouços de órgão (pâncreas) inteiro murino foram recelularizados via perfusão através do ramo da veia porta (que se torna veia esplênica quando alcança os limites do tecido pancreático), previamente canulado durante o processo de descelularização, utilizando-se 3×10^7 células MIN6 (n=1), ou 3×10^7 células de cultura primária de ilhotas pancreáticas murinas isoladas (n=1), ou, ainda, $1,5 \times 10^6$ IPCs (n=1). As células foram divididas e infundidas em três etapas, com vinte minutos de intervalo entre cada infusão, juntamente com o meio de cultura apropriado para cada tipo celular.

Os arcabouços recelularizados foram acompanhados sendo possível observar que, após 7 dias em cultura, a coloração do arcabouço se modificou, adquirindo uma coloração mais característica de tecido pancreático nativo (tonalidade amarelada) do que de matriz extracelular (tonalidade transparente / esbranquiçada). Essa característica foi intensificada em até 11 dias em cultura (Figura 38), quando o arcabouço recelularizado foi retirado da cultura para realização dos testes de avaliação da recelularização.

Figura 38.: Recelularização do arcabouço de pâncreas de rato com células murinas. Imagem representativa do arcabouço murino recelularizado. A) Tempo zero após a infusão de células. B) Arcabouço recelularizado após 7 dias em cultura. C) Arcabouço recelularizado após 11 dias em cultura. Fonte: a autora.

Aproveitando a arquitetura difusa e delgada do arcabouço pancreático e a organização 3D das IPCs, durante o período de cultivo também foi possível acompanhar por avaliação microscópica a permanência dessas células no arcabouço durante todo o período de cultura (Figura 39).

Amostras dos arcabouços murinos recelularizados foram analisados quanto à histologia por meio da coloração de Hematoxilina e Eosina, sendo possível visualizar campos com a presença de células ligadas ao arcabouço após recelularização com as células MIN6 (Figura 40).

Figura 39.: IPCs infundidas no arcabouço murino durante o processo de recelularização. A) Imagem macroscópica do arcabouço de pâncreas murino recelularizado com células IPCs. B) Imagem microscópica do arcabouço de pâncreas murino descelularizado visualizado ao microscópio invertido de fase antes da infusão das células. Aumento 10X. C) Imagem ao microscópio invertido de fase do arcabouço de pâncreas murino recelularizado através da infusão de células IPCs. IPCs: células murinas produtoras de insulina, do inglês *insulin producing cells*. Os asteriscos em vermelho indicam as IPCs aglomeradas no arcabouço. Aumento 10X. Fonte: a autora.

Figura 40.: Recelularização dos arcabouços murinos – Histologia Pancreática - Hematoxilina/Eosina. A) Pâncreas de Rato Nativo. Aumento 4X. B) Pâncreas de Rato Descelularizado. Aumento 20X. C) Arcabouço murino recelularizado com células MIN6. Aumento 10X. As setas indicam as células incorporadas ao arcabouço. MIN6: células de linhagem celular murina de tecido endócrino produtoras de insulina. Fonte: a autora.

Em contrapartida, todas as amostras dos arcabouços murinos recelularizados foram avaliadas quanto ao conteúdo de DNA, obtendo-se valores superiores àqueles observados para o arcabouço descelularizado, sendo: arcabouço descelularizado $39,1 \pm 29,3$ ng/mg (n=03), arcabouço recelularizado com células MIN6 164,5ng/mg (n=1), com células de cultura primária de ilhotas pancreáticas murinas isoladas 144,7ng/mg (n=1), e com células IPCs 70,6ng/mg (n=1) (Gráfico 5).

Gráfico 5.: Quantificação de DNA - Arcabouço murino recelularizado. Quantificação de DNA Genômico das amostras de pâncreas murino descelularizados (n=3) e recelularizados com: MIN6 (n=1), células de cultura primária de ilhotas pancreáticas murinas isoladas (n=1), ou células IPCs (n=1). MIN6: células de linhagem celular murina de tecido endócrino, produtoras de insulina. IPCs: células murinas produtoras de insulina, do inglês *insulin producing cells*, Fonte: a autora.

4.4.2. Recelularização de arcabouços humanos

Para a recelularização dos arcabouços humanos gerados por descelularização, foram testadas estratégias de recelularização independentes, partindo-se de cortes grossos e cortes finos e, também, de cultura primária 2D e 3D de ilhotas pancreáticas humanas.

Antes de serem utilizadas na recelularização, células de cultura primária de ilhotas pancreáticas humanas isoladas para o desenvolvimento deste estudo foram caracterizadas quanto à: contagem celular, viabilidade morfológica, avaliação microbiológica, avaliação de contaminação por Micoplasma, imunofenotipagem e funcionalidade.

As ilhotas pancreáticas humanas foram obtidas a partir de um doador (identificado como P0115) do sexo feminino, de 49 anos e IMC 29,3, glicemia 164mg/dl e hemoglobina 14,3g/dl, possibilitando a obtenção de 34.217 IEQs, com viabilidade celular de cerca de 80% (Figura 41). Além disso, a capacidade dessas ilhotas secretarem insulina em resposta ao estímulo de glicose foi

avaliada por meio de incubação destas ilhotas em meio contendo diferentes concentrações de glicose. O nível de secreção de insulina foi determinado na presença de baixa concentração de glicose (2,8mM) como sendo de $7,55 \pm 0,06$ mg/L, e em alta concentração de glicose (16,7mM) como sendo $91,88 \pm 2,22$ mg/L. Portanto, a relação dos valores obtidos em alta *versus* baixa concentração de glicose foi de $12,17 \pm 0,20$ (n=3) (Gráfico 6).

Figura 41.: Viabilidade morfológica de ilhotas pancreáticas humanas. Para avaliação da viabilidade morfológica foram utilizados os corantes diacetato de fluoresceína (FDA) e o iodeto de propídio (PI) para marcação celular. O FDA funciona como um marcador de células viáveis que aparecem em verde brilhante. O PI funciona como um marcador de células mortas ou células não viáveis, que aparecem em vermelho/alaranjado brilhante. A imagem mostra uma ilhota representativa. Aumento 20X. Fonte: a autora.

Gráfico 6.: Avaliação funcional de ilhotas pancreáticas humanas. Níveis de insulina (mg/L) secretada pelas ilhotas pancreáticas humanas após o estímulo com diferentes concentrações de glicose. (One-way ANOVA. * = $p < 0,0001$. n = 3) Fonte: a autora.

Após o estabelecimento da cultura primária 2D de ilhotas pancreáticas humanas (Figura 42), imediatamente antes da sua utilização no protocolo de recelularização e estabelecimento do cultivo 3D, foram realizados os testes de avaliação de contaminação microbiológica, com resultado negativo e teste de contaminação por micoplasma, também com resultado negativo (Figura 37).

A imunofenotipagem da cultura primária foi realizada através da técnica de citometria de fluxo. Como mostra a Figura 43, foi possível verificar nestas células a expressão de insulina (através de coloração com Newport Green) em 53,05% das células, peptídeo C – 60,94%, amilina – 26,56%, GLUT2 – do inglês *glucose transporter 2* – 53,55%, PDX1 – do inglês *pancreatic and duodenal homeobox 1* – 50,33%, e ISL1 – do inglês *insulin gene enhancer protein* – 48,13%. Foi possível observar, também, a presença de marcadores de células imaturas/progenitoras por meio da presença dos marcadores NGN3 – do inglês *neurogenin-3* – 54,82%, NES – do inglês *nestin expressing* – 54,44%, fator de crescimento GATA4 – 54,89%, CXCR4 – do inglês *C-X-C chemokine receptor type 4* – 65,42%. Além disso, também verificamos a presença de outros hormônios como o glucagon – 53,00% e o polipeptídeo pancreático (PP) – 57,71% (Figura 43).

Figura 42.: Fonte celular utilizada para a recelularização de arcabouço pancreático humano. Cultura primária de ilhotas pancreáticas humanas. Aumento 10X. Fonte: a autora.

De posse da cultura primária 2D de ilhotas humanas devidamente caracterizadas e dos arcabouços humanos descelularizados, iniciamos as

estratégias de recelularização. Fatias grossas do arcabouço humano foram recelularizados via gotejamento de 1×10^6 células na superfície dos cortes (n=2). A suspensão celular foi dividida e as células foram infundidas em três etapas, com vinte minutos de intervalo entre cada infusão, juntamente com seu meio de cultivo apropriado.

Os arcabouços recelularizados foram acompanhados, não sendo possível observar modificação alguma na coloração do arcabouço mantido em cultura por até 11 dias (Figura 44), quando o arcabouço recelularizado foi retirado da cultura para realização dos testes de avaliação da recelularização.

Figura 43.: Imunofenotipagem da cultura primária 2D de ilhotas pancreáticas humanas. A) Marcação para Insulina – 53,05%, B) Marcação para Peptídeo C – 60,94%, C) Marcação para Amilina – 26,56%, D) Marcação para GLUT2 – 53,55%, E) Marcação para PDX1 – 50,33%, F) Marcação para NGN3 – 54,82%, G) Marcação para ISL1 – 48,13%, H) Marcação para NES – 54,44%, I) Marcação para GATA4 – 54,89%, J) Marcação para CXCR4 – 65,42%, L) Marcação para Glucagon – 53,00% e M) Marcação para Polipeptídeo pancreático (PP) – 57,71%. Fonte: a autora.

Figura 44.: Recelularização arcabouço e células humanas. Imagem de arcabouço humano recelularizado. A) Tempo zero após a infusão de células provenientes de cultura primária 2D de ilhotas pancreáticas humanas. B) Arcabouço recelularizado após 11 dias em cultura. Fonte: a autora.

Amostras dos arcabouços humanos recelularizados foram analisados quanto à histologia por meio da coloração de Hematoxilina e Eosina, sendo possível visualizar campos com a presença de células ligadas ao arcabouço pancreático humano (Figura 45).

Figura 45.: Recelularização dos arcabouços pancreáticos humanos – Histologia Pancreática - Hematoxilina/Eosina. A) Pâncreas Humano Nativo. Aumento 10X. B) Pâncreas Humano Descelularizado. Aumento 10X. C) Arcabouço Pancreático Humano Recelularizado com células de cultura primária 2D de ilhotas pancreáticas humanas. Aumento 20X. As setas indicam as células incorporadas ao arcabouço. Fonte: a autora.

Por outro lado, quando foi avaliado o conteúdo de DNA, os valores obtidos para os arcabouços recelularizados foram similares àqueles do arcabouço descelularizado, ou seja, $45,7 \pm 1,3$ ng/mg (n=2) *versus* $41,1 \pm 5,9$ ng/mg (n=02), respectivamente (Gráfico 7).

Gráfico 7.: Quantificação de DNA - Arcabouço humano recelularizado. Quantificação de DNA Genômico das amostras de pâncreas humano descelularizados e recelularizados com células de cultura primária 2D de ilhotas pancreáticas humanas. (n=2). Fonte: a autora.

A cultura primária 2D de ilhotas pancreáticas humanas, previamente caracterizadas, foram utilizadas, também, para a geração de uma cultura 3D visando sua utilização na recelularização dos arcabouços pancreáticos humanos descelularizados.

Conforme detalhado em Materiais e Métodos, os agregados 3D foram gerados a partir de culturas primárias aderentes 2D de ilhotas pancreáticas humanas, como descrito em Materiais e Métodos, utilizando-se diferentes quantidades de células ($0,5 \times 10^4$, 1×10^4 , $2,5 \times 10^4$, 5×10^4), plaqueadas numa placa de cultura não aderente a qual foi colocada no topo de uma base magnética por 18h. Este período de incubação promoveu maior interação entre as células e permitiu a formação de estruturas 3D em suspensão. Após 2h na base magnética, as células mantidas em todas as condições testadas se auto-organizaram em esferas, tornando-se mais compactas após 18h (Figura 46). Após a remoção da base magnética as estruturas esferóides 3D formadas em todas as condições testadas permaneceram estáveis por um período adicional de quatro dias (Figura 46).

Figura 46.: Cultura 3D derivada a partir de cultura primária 2D de ilhotas pancreáticas humanas. Após a impregnação das células com o reagente magnético, diferentes números de células ($0,5 \times 10^4$, 1×10^4 , $2,5 \times 10^4$, 5×10^4) foram plaqueadas em placas não-aderentes. A figura mostra a organização das culturas 3D derivadas de ilhotas pancreáticas primárias humanas observadas em dois estágios diferentes: primeiramente com uma base magnética em tempos zero, 2h e 18h e, posteriormente, sem a base magnética por mais 24h e 72h. A barra indica $1000\mu\text{m}$. Fonte: a autora.

A fim de avaliar a interação entre as culturas primárias 3D derivadas de ilhotas pancreáticas humanas e a arcabouço descelularizado, os esferóides originados foram colocados sobre fatias finas de diferentes espessuras (25, 50 e $90\mu\text{m}$) do arcabouço pancreático humano descelularizado.

Os resultados, mostrados nas Figuras 47 e 48, indicam que: a) na ausência de arcabouço (Controle), os esferóides derivados do menor número de células ($0,5 \times 10^4$) somente se fixam à superfície do plástico no 6º dia após o plaqueamento, enquanto os esferóides maiores ($2,5 \times 10^4$ células) não se ligam à superfície plástica; b) na presença do arcabouço, os esferóides menores ($0,5 \times 10^4$ e 1×10^4 células) se ligam à matriz descelularizada nos primeiros dias após o plaqueamento (dias 1 a 3), começam a proliferar entre o 3º e o 6º dia e tendem a se enovelar com o arcabouço; c) aglomerados/esferóides maiores

(originados a partir de $2,5 \times 10^4$ e 1×10^4 células) apresentaram associação tardia com o arcabouço, o mesmo ocorrendo com o enovelamento; não sendo observada proliferação celular do lado externo dos esferóides.

Figura 47.: Culturas 3D derivadas de cultura primária 2D de ilhotas pancreáticas humanas alocadas em arcabouço pancreático humano descelularizado. Células agrupadas em cultura 3D, geradas a partir de diferentes números de células, foram colocadas em fatias do arcabouço pancreático humano ($0,5 \times 10^4$ células em fatias de 25 μm e 50 μm ; 1×10^4 células em fatias de 50 μm e 90 μm ; $2,5 \times 10^4$ células em fatias de 50 μm e 90 μm ; e 5×10^4 células em fatias de 50 μm e 90 μm) e observadas em tempos zero, 1, 3, 6, 9, 13 e 16 dias. As setas pretas indicam associação do esferóide com o arcabouço. O asterisco indica proliferação celular. As setas brancas indicam o enovelamento do esferóide com o arcabouço. A barra indica 1000 μm . Fonte: a autora.

Figura 48.: Detalhes das culturas 3D de esferóides derivados a partir de cultura primária 2D de ilhotas pancreáticas humanas alocadas em arcabouço pancreático descelularizado humano. Essas imagens foram retiradas do painel completo mostrado na Figura 47 para ilustrar aspectos específicos da interação entre os esferóides celulares e o arcabouço pancreático no dia 3. A figura indica: esferóides derivados a partir do menor número de células ($0,5 \times 10^4$) na ausência de arcabouço (Controle) e esferóides maiores ($2,5 \times 10^4$ células) na ausência de arcabouço (Controle); esferóides menores ($0,5 \times 10^4$ e 1×10^4 células) na presença do arcabouço; e esferóides maiores ($2,5 \times 10^4$ e 1×10^4) na presença do arcabouço. A seta preta indica associação do esferóide com o arcabouço. Os asteriscos indicam proliferação celular. A barra indica 1000µm. Fonte: a autora.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV), realizada no 16º dia, confirmou a associação dos esferóides com o arcabouço e a proliferação celular resultante desta interação. A Figura 49A mostra um aspecto

representativo de pequenos esferóides (derivados a partir de 1×10^4 células) com proliferação celular visível e interação com a rede da matriz extracelular do arcabouço. A Figura 49B mostra um aspecto representativo de esferóides maiores (derivados a partir de 5×10^4 células) sem proliferação celular externa visível, porém com associação com o arcabouço (Figura 49).

Figura 49.: Microscopia Eletrônica de Varredura da cultura 3D ilhotas pancreáticas humanas alocadas em arcabouço descclularizado humano. A avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou as estruturas nanofibrosas do arcabouço descclularizado humano e sua interação com os esferóides celulares. A Figura 49A mostra um aspecto representativo de pequenos esferóides (derivados a partir de 1×10^4 células⁴) com proliferação celular visível. A Figura 49B mostra um aspecto representativo de um esferóide grande (derivado a partir de 5×10^4) sem proliferação celular externa visível ao esferóide, porém evidenciando interação com o arcabouço. Barra de escala da Figura 49A: 10µm e da Figura 49B: 3µm. Fonte: a autora.

Insulina e lactato desidrogenase (LDH) foram detectadas no sobrenadante do meio de cultura no 16º dia após o início do cultivo dos esferóides sobre os arcabouços. Os resultados, apresentados no Gráfico 8, mostram que não há diferença estatisticamente significativa nos níveis de insulina liberada para o meio de cultura entre as culturas 3D derivadas de ilhotas pancreáticas humanas na presença do arcabouço ou isoladas (Gráfico 8).

O Gráfico 9 indica que não há diferença estatisticamente significativa nos níveis de LDH liberado para o meio de cultura quando comparados com aqueles das culturas 3D derivadas de culturas primárias de ilhotas pancreáticas humanas na presença do arcabouço ou isoladas, entretanto, esferóides maiores (derivados a partir de $2,5 \times 10^4$ e 5×10^4 células) apresentaram valores de LDH superiores àqueles de esferóides menores (derivados a partir de $0,5 \times 10^4$ e 1×10^4 células) (Gráfico 9).

Gráfico 8.: Quantificação de Insulina. Este ensaio foi realizado utilizando-se o meio de cultura coletado no 16º dia após o cultivo dos esferóides sobre o arcabouço pancreático humano. A) Esferóide $0,5 \times 10^4$ (Controle - representativo de pequeno esferóide), B) Esferóide $0,5 \times 10^4$ em arcabouço de $25 \mu\text{m}$, C) Esferóide $0,5 \times 10^4$ em arcabouço de $50 \mu\text{m}$, D) Esferóide $1,0 \times 10^4$ em arcabouço de $50 \mu\text{m}$, E) Esferóide $0,5 \times 10^4$ em arcabouço de $90 \mu\text{m}$, F) Esferóide $2,5 \times 10^4$ (Controle - representativo de esferóide grande), G) Esferóide $0,5 \times 10^4$ em arcabouço de $50 \mu\text{m}$, H) Esferóide $2,5 \times 10^4$ em arcabouço de $90 \mu\text{m}$, I) Esferóide 5×10^4 em arcabouço de $50 \mu\text{m}$, e J) Esferóide 5×10^4 em arcabouço de $90 \mu\text{m}$. Os dados são apresentados como o valor médio $\pm$ erro padrão da média, em triplicata. Fonte: a autora.

Gráfico 9.: Quantificação de Lactato Desidrogenase - LDH. Este ensaio foi realizado utilizando-se o meio de cultura coletado no 16º dia após o cultivo dos esferóides em arcabouço. A) Esferóide $0,5 \times 10^4$ (Controle - representativo de pequeno esferóide), B) Esferóide $0,5 \times 10^4$ em arcabouço de $25\mu\text{m}$, C) Esferóide $0,5 \times 10^4$ em arcabouço de $50\mu\text{m}$, D) Esferóide $1,0 \times 10^4$ em arcabouço de $50\mu\text{m}$, E) Esferóide $0,5 \times 10^4$ em arcabouço de $90\mu\text{m}$, F) Esferóide $2,5 \times 10^4$ (Controle - representativo de esferóide grande), G) Esferóide $0,5 \times 10^4$ em arcabouço de $50\mu\text{m}$, H) Esferóide $2,5 \times 10^4$ em arcabouço de $90\mu\text{m}$, I) Esferóide 5×10^4 em arcabouço de $50\mu\text{m}$, e J) Esferóide 5×10^4 em arcabouço de $90\mu\text{m}$. Os dados são apresentados como o valor médio $\pm$ erro padrão da média, em triplicata. Fonte: a autora.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Embora o transplante de pâncreas órgão inteiro tenha sido melhorado permitindo manter a qualidade de vida e sobrevida dos pacientes, infelizmente, apenas um pequeno grupo de pacientes se beneficia desse procedimento devido à escassez de órgãos. Isto pode ser verificado, por exemplo, quando constata-se o número de 2.851 óbitos de pacientes que aguardavam tal procedimento na fila de transplante de órgãos em 2018, no Brasil. Acrescenta-se a este dado outros 30.684 pacientes que ingressaram na lista de espera para transplante de órgãos no mesmo período.⁹⁷ Opções alternativas de tratamento são urgentes e necessárias para resolver o problema da escassez de órgãos.

Nesse contexto, o desenvolvimento de tecidos e órgãos para o tratamento de tecidos injuriados ou degenerados, no âmbito da Engenharia Tecidual e Medicina Regenerativa, vem sendo aprimorado nos últimos anos^{29,30,31} e conta com as mais diversas ferramentas que controlam a formação dos tecidos e permitem manipular as fontes celulares.^{27,28} A utilização destas ferramentas para o desenvolvimento de um pâncreas bioartificial, por meio da combinação apropriada de células produtoras de insulina com um arcabouço (*scaffold*) adequado e moléculas biologicamente ativas, constitui uma alternativa extremamente atraente para a terapia do DM1.

Idealmente, o arcabouço adequado fornece um nicho microambiental igual ou semelhante à matriz extracelular nativa, quando possui células semeadas.³⁸ Dessa forma, matrizes acelulares de órgãos inteiros fornecem um *scaffold* (arcabouço) atraente, que pode ser repopulado com células de diferentes tipos para a geração de um órgão ou tecido engenheirado.

No presente trabalho foram estudados quatro tópicos visando oferecer soluções para a criação de um pâncreas bioartificial: a) escolha do detergente mais adequado para o processo de descclularização de pâncreas; b) desenho de um protocolo de descclularização que permita a descclularização de pâncreas murinos e humanos; c) avaliação da melhor forma de manutenção e

armazenamento de arcabouços descelularizados *in vitro*; d) avaliação da capacidade de recelularização dos arcabouços pancreáticos gerados.

5.1. Escolha do detergente para descelularização de pâncreas

Os tratamentos para descelularização de órgãos podem ser Físicos (temperatura, força, pressão, eletroporação), Químicos (ácidos e bases, soluções hipotônicas/hipertônicas, solventes e detergentes) e Biológicos (enzimas e agentes quelantes) ou, até mesmo, uma combinação dos mesmos com o intuito de realizar uma descelularização efetiva, sendo, a escolha, baseada na celularidade, densidade, conteúdo lipídico e espessura do tecido/órgão escolhido.³¹

Para a descelularização de pâncreas existiam apenas três artigos disponíveis na literatura mundial quando o presente estudo foi iniciado, sendo, o primeiro destes, sobre descelularização de fatias de pâncreas murino⁵⁹, e os outros dois artigos sobre descelularização de pâncreas órgão inteiro, de origem murina⁵⁴ e porcina⁵³. Os autores utilizavam detergentes diferentes, ou uma combinação deles (SDS⁵⁴, DOC⁵⁹ e Triton X-100^{53,54}), em protocolos preliminares distintos.

Não havendo um consenso na literatura, optou-se por padronizar um protocolo em nosso laboratório e escolher o detergente mais adequado para a descelularização pancreática de órgão inteiro. Os experimentos foram iniciados com pâncreas de rato com o intuito de extrapolar a metodologia para pâncreas humanos.

Toda a metodologia para a descelularização foi padronizada a partir do protocolo de canulação e extração pancreática murina (Figura 11), até o protocolo de perfusão retrógrada das vias canuladas. Com uso deste protocolo obteve-se o arcabouço murino descelularizado após um período de 31h, um intervalo de tempo considerável e que se destaca quando comparado com o período descrito anteriormente para pâncreas murino (144 horas)⁵⁴ e porcino (168 horas)⁵³.

Já é descrito na literatura que uma variável que pode afetar as propriedades mecânicas de um arcabouço descelularizado é a duração da exposição a agentes de descelularização, conforme demonstrado por um protocolo estabelecido para descelularizar o tecido traqueal, o qual envolveu ciclos repetidos de DOC e DNase, evidenciando profundas mudanças estruturais entre os ciclos 18 e 22, tornando o arcabouço descelularizado inadequado devido à alterações mecânicas.⁹⁶

Em nosso protocolo, apesar de todos os detergentes resultarem em algum conteúdo remanescente de DNA, em quantidade compatível com o residual aceitável descrito na literatura para tecidos descelularizados⁶¹ (Gráfico 1), após avaliação macroscópica e microscópica dos arcabouços gerados, foi observado que SDS 1% mostrou ser o agente mais agressivo para a matriz extracelular pancreática, evidenciado pela perda de arquitetura do arcabouço característico, com aparente ruptura das fibras de colágeno e pouca marcação para proteoglicanos e GAGs. Utilizando-se Triton 1%, observou-se a manutenção da arquitetura do arcabouço, porém, o mesmo se mostrou ineficiente na total remoção celular, sendo observadas células e restos celulares. Por fim, utilizando-se DOC 4%, foi possível observar remoção celular eficiente e manutenção da arquitetura e estrutura do arcabouço pancreático (Figuras 12, 13, 14, 15 e 16).

Na literatura existem relatos conflitantes sobre os efeitos de SDS e Triton X-100 sobre as propriedades de vários tecidos decelularizados, mesmo em tecidos bastante semelhantes, incluindo ruptura de fibras de colágeno, maior remoção de GAGs e efeitos no comportamento viscoelástico dos arcabouços.⁶¹

De forma inesperada, porém, sem diferença estatística, a quantificação de GAGs evidenciou o valor mais elevado de manutenção de GAGs nas amostras tratadas com SDS 1%, o que não era esperado, quando comparado com os achados histológicos e de ultraestrutura. Portanto, acredita-se que esses valores são passíveis de algum erro amostral ou metodológico da técnica, devendo-se repetir esta análise numa próxima oportunidade.

Com base no conjunto de resultados aqui obtidos decidiu-se continuar com o detergente DOC 4% nas próximas etapas do estudo.

Um notícia relevante, e que tem certa coincidência temporal, é que esse detergente foi recentemente aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos para uso em humanos em aplicação/injeção estética, para tratamento de gordura submentoniana (popularmente conhecida como papada), pela empresa Kythera Biopharmaceuticals Inc. – Protocolo n° 206333(https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2015/206333Orig1s000TOC.cfm). Essa aprovação abre precedentes, facilitando uma possível futura aplicação de DOC para a geração de arcabouços humanos descelularizados com o intuito de gerar um pâncreas bioartificial.

5.2. Protocolo de descelularização para pâncreas murino e humano

Tanto o transplante de pâncreas órgão inteiro como o transplante de ilhotas são considerados terapias alternativas à insulino terapia exógena.¹ Apesar de o avanço nos estudos sobre isolamento de ilhotas pancreáticas, a partir de órgãos (pâncreas) de doador falecido ou sobre a diferenciação de células-tronco embrionárias em células produtoras de insulina, a utilização de um arcabouço de MEC pode reduzir a morte celular e aumentar a sobrevivência dos enxertos de ilhotas pancreáticas isoladas e sua funcionalidade. Isso também contribui para regular a sobrevivência e secreção de insulina, a proliferação celular, além de auxiliar na preservação e restauração da morfologia das ilhotas esféricas.^{35,36}

No Brasil, durante o ano de 2018, a doação de órgãos alcançou a cifra de 17,0 órgãos doadores efetivos por milhão (pmp), sendo que o número real de doadores em potencial é de 51,9 pmp⁹⁷, portanto, por diversos motivos, muitos órgãos são descartados, entre os quais os pâncreas, que poderiam ser aproveitados para serem utilizados no processo de descelularização e no desenvolvimento de pâncreas bioartificiais.

Para a descélularização de pâncreas humanos órgão inteiro não existiam trabalhos disponíveis na literatura mundial quando o presente estudo foi iniciado, tendo o primeiro artigo sido publicado no final do ano de 2016⁵⁵.

A seleção do doador de pâncreas para descélularização se baseou em critérios de inclusão de pâncreas adotados por nosso grupo, para o isolamento de ilhotas, sendo um pouco mais flexíveis e abrangentes, conforme descrito detalhadamente na seção de Materiais e Métodos. Com isso, os pâncreas descartados para o isolamento de ilhotas puderam ser utilizados para a descélularização. Um exemplo seria a glicemia média desses doadores utilizados em descélularização, de 196mg/dl $\pm$ 72 (Tabela 3), que foram recusados para isolamento de ilhotas por terem medidas próximas a 200 mg/dl. A idade dos doadores de pâncreas para esta pesquisa pertencendo ao grupo de porcentagem mais alta 35% de doação (50-64 anos), corroborando o perfil dos doadores brasileiros de órgãos⁹⁷. Já quanto ao sexo, o resultado obtido de 2/3 serem do sexo feminino foram contrários ao descrito para doação de órgão inteiro para transplante, onde foi observado que apenas 40% eram do sexo feminino⁹⁷.

A metodologia de descélularização de pâncreas humano foi totalmente padronizada pelo nosso grupo, desde o estabelecimento de critérios para a seleção do doador, extração pancreática, preparo do órgão e canulação (Figura 18), até o protocolo de perfusão retrógrada das vias canuladas, obtendo-se o arcabouço humano descélularizado após um período de cinco dias (Figura 19). O protocolo de descélularização empregado na descélularização dos pâncreas humanos foi o mesmo utilizado na descélularização dos pâncreas de rato, apenas adotando maior tempo de lavagem final em água (cinco dias), com amostras sendo coletadas para avaliação e comparação dos resultados obtidos entre os arcabouços murinos e humanos.

As primeiras tentativas de canulação e posterior perfusão do pâncreas humano, para descélularização, foram realizadas através de duas vias (ducto pancreático ou ducto de Wirsung e artéria esplênica). As avaliações indicaram a presença de DNA e de células remanescentes (dados não mostrados)

principalmente na região da cabeça do pâncreas. Essa região da cabeça conta com a presença do ducto pancreático, porém é majoritariamente irrigada por outra artéria (artéria mesentérica superior). Devido ao fato de que essa região, na grande maioria das vezes, é lesionada durante o processo de ressecção do pâncreas, com perfuração da cápsula pancreática local, optou-se pela retirada da porção da cabeça do órgão, e, ainda, realizar a canulação por meio de três vias (ducto pancreático, artéria esplênica e veia esplênica). Essa padronização possibilitou melhores resultados e a padronização do protocolo de descelularização de pâncreas humano. Peloso e colaboradores⁵⁵ realizaram a canulação e posterior perfusão através do ducto pancreático, artéria mesentérica superior e artéria esplênica, obtendo um arcabouço com aspecto macroscópico diferente do pâncreas nativo. Os nossos arcabouços pancreáticos humanos por nós gerados mantiveram um aspecto macroscópico mais esponjoso e esbranquiçado, enquanto a figura macroscópica disponível no artigo do grupo de Peloso e colaboradores⁵⁵ mostra uma mudança de coloração para um amarelo palha. Apesar disso, suas avaliações histológicas, de ultraestrutura e de conteúdo de DNA se mostraram similares aos nossos.

Nosso protocolo se mostrou eficiente na remoção celular, a julgar pela quantificação de DNA genômico residual nas amostras murinas e humanas (Gráfico 3), cujo valor é compatível com aquele descrito na literatura para tecidos descelularizados (< 50 ng/mg de DNA remanescente)⁶¹.

Com as análises histológicas, foi possível verificar que os arcabouços gerados, tanto de rato quanto de humano, não apresentaram células remanescentes, sendo a arquitetura nativa da matriz extracelular integralmente mantida (Figura 20), evidenciando fibras de colágeno, dos tipos grossas, intermediárias e finas, conforme observado, de forma qualitativa, sob luz branca e luz polarizada (Figura 23). Foi observada, também, a presença de proteoglicanos e GAGs na matriz remanescente (Figuras 21 e 22), resultados que foram confirmados pela avaliação da ultraestrutura em microscopia de transmissão e varredura (Figuras 25, 26 e 27). Por outro lado, as fibras elásticas foram encontradas apenas nos tecidos pancreáticos humanos após a descelularização e não nos tecidos murinos (Figura 24).

Foi observada a presença de cristais em certas regiões de algumas amostras de pâncreas humanos após o processo de descélularização (Figura 28). Esses cristais mostraram uma provável composição química compatível com um composto orgânico (presença de carbono e oxigênio) (Figura 29). Essas amostras foram armazenadas em PBSA-AA à 4°C, até o preparo para as análises de MEV.

Recentemente Tint e colaboradores⁹⁸ descreveram o uso da espectroscopia para avaliação do processo de descélularização, uma vez que os métodos atuais de monitoramento do processo de descélularização, que incluem histologia, microscopia eletrônica e ensaios bioquímicos, requerem a utilização e inutilização do arcabouço gerado. Moléculas diferentes possuem características espectroscópicas únicas e padrões de absorbância, que podem ser analisados para determinar a composição molecular. Dessa forma, utilizamos a Espectroscopia Raman como mais uma forma de avaliar os arcabouços de pâncreas murinos e humanos descélularizados. Para se evitar o fenômeno de fluorescência dos biocompostos possivelmente presentes na nossas amostras, foi escolhida a excitação em 1064nm para obtenção dos espectros. As análises (Figura 30) mostraram a presença de picos característicos de colágeno, elastina, lipídios e aminoácidos em proteínas, previamente já descritos na literatura^{91,92}, corroborando nossos resultados anteriores. Vale salientar que os dados observados na literatura são espectros obtidos utilizando excitação em 785nm⁹¹, mostrando a semelhança entre os resultados obtidos com a excitação em 1064nm, embora novos experimentos sejam necessários neste comprimento de onda específico para a obtenção de picos mais resolvidos e de maior intensidade.

Interessantemente, foi possível observar a presença de picos (deslocamentos em 1010, 1156 e 1559), em arcabouços humanos, e, em menor intensidade, nos arcabouços murinos (Figura 30). Essas amostras também foram armazenadas em PBSA-AA à 4°C, até o preparo para as análises.

O PBSA-AA consiste no tampão fosfato salino suplementado com antibiótico e antimicótico, possuindo como antimicótico a anfoterecina B. Gagós

e colaboradores⁹³ e Miyaoka e colaboradores⁹⁴ relataram a presença desses mesmos picos característicos em anfoterecina B. Acredita-se que devido à baixa temperatura do armazenamento (4°C), um provável processo de cristalização ocorreu, permitindo a deposição/formação de cristais de anfoterecina B em algumas regiões de superfície dos arcabouços. Assim, esses cristais seriam os mesmos observados na imagem obtida por MEV (Figura 32). Vale salientar que os dados observados na literatura são espectros obtidos utilizando excitação em 514, 532 e 785nm^{93,94}, mostrando a semelhança entre os resultados obtidos com a excitação em 1064nm, embora novos experimentos sejam necessários neste comprimento de onda específico para a obtenção de picos mais resolvidos e com maior intensidade.

Dessa forma, pâncreas murinos e humanos podem ser descelularizados de forma eficaz utilizando o protocolo desenvolvido neste estudo.

5.3. Manutenção e armazenamento de arcabouços descelularizados *in vitro*

Visando à recelularização de arcabouços biológicos para a geração de um pâncreas bioartificial de forma efetiva, seria interessante estabelecer um Banco de Matriz Pancreática Descelularizada. Assim, quando as células e as moléculas biologicamente ativas estivessem prontas para serem utilizadas, poder-se-ia recorrer a este Banco para a utilização do arcabouço. Para tanto, era necessário saber quanto tempo e qual a melhor maneira de manter esse arcabouço até o momento de sua utilização.

Para responder esse questionamento, a literatura da época foi avaliada para descobrir as principais formas de armazenamento de órgãos descelularizados até o momento de seu uso. Foi possível constatar o uso de tampão fosfato salino (PBSA), sendo mantido à 4°C e tampão fosfato salino suplementado com antibiótico e antimicótico (PBSA-AA) mantido à 4°C^{52,53,54,59} sem indicação alguma sobre o período de tempo máximo de armazenamento ou maiores caracterizações sobre como esses arcabouços se comportam nesses meios. Além do PBSA à 4°C e PBSA-AA à 4°C, o meio de

congelamento de células, contendo RPMI e DMSO à -80°C (CRIO) também foi selecionado para avaliação por ser um candidato interessante, uma vez que à essa temperatura diversas amostras biológicas são mantidas de forma viável por maior período de tempo. Por outro lado, já foi relatado que alguns tecidos mantidos à baixa temperatura poderia levar à quebras no arcabouço da matriz⁶¹, o que talvez possa ser evitado pela adição do criopreservante DMSO.

Dessa forma, os pâncreas murinos foram descelularizados conforme estabelecido previamente neste estudo, e os arcabouços foram mantidos nas três condições de armazenamento acima citadas e as amostras foram avaliadas periodicamente durante até 16 semanas.

Por meio de análise histológica, observou-se a ausência de células e a manutenção da arquitetura nativa da matriz extracelular pancreática até o final do período de armazenamento avaliado, de 16 semanas, em todas as condições, bem como manteve a rede de colágeno (Figuras 31 e 33). Porém, quanto à presença de proteoglicanos e GAGs remanescentes, foi possível observar uma perda gradativa na coloração, ao longo das semanas, em todos os meios de preservação avaliados, sendo menos acentuada no meio de criopreservação (Figura 32), o que foi confirmado através de avaliação da ultraestrutura das amostras (Figura 34).

A dosagem de proteínas totais no sobrenadante (Gráfico 4 e Tabela 4) desses meios também corrobora esses resultados, possibilitando uma avaliação quantitativa da possível liberação gradativa desses proteoglicanos e GAGs no meio de preservação, de forma tempo dependente, sendo menos acentuado na condição CRIO, seguido por PBSA e PBSA-AA.

Assim, os arcabouços provenientes de pâncreas descelularizados murinos podem ser estocadas por até uma semana, independente do meio de preservação utilizado. Alguns pesquisadores reportam o uso de arcabouços descelularizados mantidos em PBSA e PBSA-AA até o momento do uso^{52,53,54,59}, mas não indicam o período de tempo utilizado. Nossos achados indicam que a condição denominada CRIO foi a mais eficaz na manutenção das características das matrizes descelularizadas de pâncreas murino,

apresentando valores inferiores a 25µg/mL de proteínas dispersas no sobrenadante em até quatro semanas. Valores menores do que 25µg/mL de proteínas foram observados apenas pelo período de até uma semana em PBSA-AA e duas semanas em PBSA (Gráfico 4 e Tabela 4).

A manutenção dos proteoglicanos e GAGs nos arcabouços descelularizados desempenham um papel importante para a etapa de recelularização^{54,61}, portanto, armazenamento por períodos muito prolongados podem interferir diretamente na recelularização dos arcabouços.

Com base nos resultados atuais, a criação de um Banco de Matriz Pancreática Descelularizada seria mais factível utilizando-se a condição CRIO à -80°C, que garante a manutenção das características estruturais por até quatro semanas. Futuramente, deverá ser testada a adição do criopreservante DMSO, que poderá permitir estender ainda mais o período de preservação estrutural dos arcabouços pancreáticos.

5.4. Capacidade de recelularização dos arcabouços gerados

Uma vez que um arcabouço pancreático satisfatório tenha sido produzido, a recelularização é necessária para se obter um produto funcional para implantação em animais (e pacientes) diabéticos. Os princípios da recelularização incluem a obtenção de uma fonte adequada de células, a semeadura celular no arcabouço e, finalmente, a cultura específica do esferóide. As técnicas de semeadura celular são em grande parte órgão-específicas, nas quais a perfusão via vasculatura é comum a todos os órgãos, mas as vias não vasculares (exemplo: vias aéreas no pulmão, uréteres no rim) mostraram bons resultados. Alternativamente, a recelularização via injeção celular direta no parênquima do tecido também é possível. O uso de múltiplas vias de perfusão e taxa de perfusão celular são alguns itens que têm se mostrado promissores, melhorando a concentração e difusão celular sobre o arcabouço.^{61,99,100,101}

Na recelularização de arcabouços de pâncreas inteiros, Goh e colaboradores⁵⁴ foram os pioneiros em propor a recelularização pancreática por meio de perfusão retrógrada, utilizando duas linhagens celulares: AR42J acinar, através do ducto pancreático, e MIN6 de células β endócrinas provenientes de um insulinoma murino, através da veia esplênica.

Ao iniciar os experimentos de recelularização, utilizando os arcabouços murinos gerados e o princípio de perfusão retrógrada, três fontes de células produtoras de insulina (MIN6, cultura primária de ilhotas pancreáticas murinas isoladas e células IPCs), previamente caracterizadas, foram testadas em diferentes experimentos.

Nos experimentos realizados com as células MIN6 e cultura primária de ilhotas pancreáticas murinas isoladas, foi possível observar a modificação da coloração do arcabouço após sete dias em cultura, partindo de uma tonalidade transparente/esbranquiçada (dia zero da recelularização) para uma tonalidade amarelada (mais característica de tecido pancreático), a qual foi intensificada gradativamente até 11 dias (Figura 38). Já na recelularização com as células IPCs, não foi possível observar essa modificação na coloração do arcabouço, porém, aproveitando a arquitetura difusa e delgada do arcabouço pancreático murino e a organização 3D das IPCs, durante o período de cultivo foi possível acompanhar, através de avaliação microscópica, a permanência dessas células no arcabouço durante todo o período de cultura (Figura 39). Provavelmente, o inóculo celular de células IPCs ($1,5 \times 10^6$ IPCs contra 3×10^7 células MIN6, ou 3×10^7 células de cultura primária de ilhotas pancreáticas murinas isoladas), foi insuficiente para causar a modificação macroscópica na coloração do arcabouço.

Apesar de todas as amostras dos arcabouços murinos recelularizados avaliadas quanto ao conteúdo de DNA, aparentemente, apresentarem valores superiores aos observados no arcabouço descelularizado (Gráfico 5), na análise histológica, só foi possível visualizar campos com a presença de células ligadas ao arcabouço na recelularização com as células MIN6.

Partindo para os experimentos com os arcabouços humanos gerados, testou-se a recelularização via injeção celular direta no parênquima do tecido, partindo de cortes grossos e cortes finos e cultura primária 2D e 3D de ilhotas pancreáticas humanas.

As ilhotas pancreáticas humanas foram isoladas de um único doador do sexo feminino, de 49 anos, tendo sido caracterizadas antes de serem utilizadas na recelularização. Dentre os testes realizados, vale ressaltar aquele de avaliação funcional, o qual mostrou a capacidade dessas ilhotas secretarem insulina em resposta ao estímulo de glicose (Gráfico 6), e a imunofenotipagem, com positividade para os marcadores de células β : insulina, peptídeo C, amilina, GLUT2, PDX1, ISL1, além de marcadores de células imaturas/progenitoras NGN3, NES, GATA4, CXCR4, e de marcadores de células α : glucagon e células PP: polipeptídeo pancreático (Figura 43). Essa heterogeneidade celular encontrada pode ser muito interessante, uma vez que já foi relatado que culturas primárias de ilhotas pancreáticas cultivadas aderidas à microcarregadores e cultivadas em suspensão, possuem aumento da proporção de células não- β e níveis mais baixos de morte celular. Este fato pode estar relacionado com a funcionalidade sustentada dessas culturas, apoiando a noção, que é amplamente aceita, de que quanto mais os estímulos fisiológicos e o microambiente das células β são mimetizados, melhores são os resultados na proliferação celular e na função secretora.⁷⁷

Apesar de não ter sido possível visualizar a modificação da coloração do arcabouço pancreático humano recelularizado com células IPCs durante até 11 dias em cultura (Figura 44), as amostras destes arcabouços recelularizados foram avaliadas quanto ao conteúdo de DNA, apresentando valores levemente superiores àqueles observados para o arcabouço descelularizado (Gráfico 7). Na histologia, foi possível visualizar campos com a presença de células ligadas ao arcabouço (Figura 45). A escassez de células revela que o inóculo celular escolhido ($1,0 \times 10^6$) foi insuficiente. Aliás, a fonte de células continua sendo o maior desafio na recelularização, uma vez que nenhum estudo publicado anteriormente produziu massa celular relevante em relação ao modelo⁹⁹.

Essa mesma cultura primária 2D de ilhotas humanas caracterizadas foi utilizada para a geração de uma cultura 3D, que também foi utilizada na recelularização dos arcabouços humanos descelularizados.

A geração de cultura 3D derivada de cultura primária 2D de ilhotas pancreáticas humanas foi realizada utilizando-se um reagente magnético por um período de tempo notável (apenas 18h), ocorrendo formação completa de estruturas esferóides 3D (Figura 46). Ao testar diferentes quantidades de células ($0,5 \times 10^4$, 1×10^4 , $2,5 \times 10^4$ e 5×10^4) colocadas em fatias finas do arcabouço de diferentes espessuras (25, 50 e $90 \mu\text{m}$), foi observado que pequenos aglomerados (provenientes de $0,5 \times 10^4$ e 1×10^4 células) tenderam a se associar mais rapidamente ao arcabouço e apresentar visível proliferação celular nas regiões mais externas dos esferóides (Figuras 47, 48 e 49). Por outro lado, aglomerados maiores (provenientes de $2,5 \times 10^4$ e 5×10^4 células) mostraram uma associação tardia ao arcabouço, não apresentando proliferação celular visível nas margens externas dos esferóides (Figuras 47, 48 e 49).

Para avaliar a funcionalidade das células β , o sobrenadante do meio de cultura foi coletado no 16º dia de cultura, tendo sido observado que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de insulina liberada para o meio quando se comparou os esferóides alocados nas fatias de arcabouço ou diretamente sobre a superfície da placa de plástico da cultura (Gráfico 8).

A citotoxicidade foi avaliada através de ensaios de LDH nos sobrenadantes do meio de cultura no 16º dia de cultura, também mostrando que não haver diferença estatisticamente significativa no níveis de LDH entre os esferóides alocados nas fatias de arcabouço ou diretamente sobre o plástico da placa de cultura (Gráfico 9). No entanto, os resultados mostram que esferóides maiores apresentaram valores de LDH ligeiramente maiores, quando comparados aos esferóides pequenos, o que pode ser atribuído ao fato de um maior número de células presentes nesses esferóides, indicando um aumento na renovação celular ou aumento da morte celular por menor oxigenação dentro dessa organização 3D.

Os resultados aqui mostrados demonstram que os arcabouços gerados neste estudo são passíveis de serem recelularizados, abrindo novas perspectivas para a geração de um pâncreas bioartificial e teste de fármacos para DM1.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Apesar de ainda estarem em estágios iniciais, os processos de Descelularização e Recelularização tornaram-se abordagens experimentais extremamente atraentes nos últimos anos. A utilização dessas técnicas para o desenvolvimento de um pâncreas bioartificial, por meio da combinação apropriada de células produtoras de insulina, com um arcabouço (*scaffold*) pancreático adequado e moléculas biologicamente ativas, constitui-se numa alternativa extremamente promissora para a terapia do DM1.

Neste trabalho, foi desenvolvido um novo protocolo que se mostrou eficaz e reprodutivo, capaz de permitir a descelularização de pâncreas tanto de rato quanto de humanos, de forma a retirar as células e o material genético enquanto mantém a arquitetura e ultraestrutura dos arcabouços gerados, sendo passíveis de serem recelularizados.

Além disso, determinou-se que, dentro das condições estudadas e dos parâmetros avaliados, o detergente mais eficiente para descelularização de pâncreas (testado em pâncreas murinos por perfusão de órgão inteiro), é o desoxicolato de sódio a 4% (DOC 4%), que remove eficientemente as células e o material genético, além de manter a arquitetura e ultraestrutura da matriz extracelular remanescente.

Determinou-se, também, que para a criação de um Banco de Matriz Pancreática Descelularizada, a melhor condição dentre aquelas estudadas, é a manutenção dos arcabouços em meio CRIO à -80°C por até quatro semanas. Verificou-se, ainda, que os arcabouços pancreáticos descelularizados de rato podem ser estocados por um período de até uma semana, sem prejuízos, em qualquer uma das três condições avaliadas.

Foi também estabelecido um novo protocolo de geração de esferóides em cultura 3D a partir de cultura primária 2D de ilhotas humanas, os quais, ao serem colocados nos arcabouços descelularizados de pâncreas humanos interagem com os mesmos, produzindo insulina, permitindo o controle do

número de células e dos tipos celulares, Portanto, foi possível demonstrar, pela primeira vez, um modelo que consiste na associação de esferóides 3D obtidos a partir de células β pancreáticas humanas com fatias de arcabouços descelularizados, abrindo novos caminhos para a triagem de drogas para DM e a geração de protocolos alternativos de terapia celular.

Portanto, este trabalho contribuiu para propor melhorias e gerar novas ferramentas para descelularização e recelularização pancreática, abrindo caminhos em direção à geração de um pâncreas bioartificial e possibilitando novos estudos em terapia celular e triagem de novos fármacos para o DM1.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como perspectivas do presente trabalho, quanto à descelularização pancreática, deverão ser realizadas medidas quantitativas da avaliação histológica e da ultraestrutura, aqui apresentadas, para melhor caracterização dos arcabouços descelularizados de pâncreas murinos e humanos, além da quantificação dos GAGs remanescentes nos arcabouços com uso de kit específico, nas amostras coletadas durante este estudo. Além disso, já está em andamento a avaliação comparativa, por espectrometria de massa, da composição dos arcabouços murinos e humanos, com o intuito de fornecer informações relevantes e comparativas ainda inexistentes na literatura atual.

Na recelularização pancreática, para melhor avaliação do novo modelo de cultura 3D derivada a partir de cultura primária 2D de ilhotas pancreáticas humanas, já está sendo realizado um novo ensaio de avaliação funcional através da secreção de insulina em resposta à glicose, uma vez que não encontramos diferença estatisticamente significativa no ensaio de dosagem de insulina no sobrenadante. Paralelamente, está sendo realizado um ensaio de imunofluorescência com marcadores específicos para detecção de amilase (células acinares), células β (peptídeo C) e ki67 (proliferação celular).

O presente trabalho incitou diversos questionamentos, que podem ser utilizados para a realização de trabalhos futuros. Um estudo interessante seria avaliar outras formas de manutenção/armazenamento dos arcabouços gerados *in vitro*, visando à criação de um Banco de Matriz Pancreática Descelularizada, o qual poderá permitir estender ainda mais o período de preservação estrutural dos arcabouços pancreáticos. Este é um trabalho de suma importância, que, atualmente, vem sendo negligenciado na literatura disponível.

Outro estudo pertinente seria avaliar outros protocolos de recelularização utilizando diferentes tipos celulares, incluindo células produtoras de insulina, as diferentes células constituintes da ilhota pancreática e células endoteliais, com o intuito de mimetizar o microambiente habitual das

células β . Nesse estudo, os modelos de cultivo 2D e 3D também poderiam ser explorados.

Ademais, um outro estudo poderia avaliar outros protocolos de recelularização utilizando fatores de crescimento, tais como: o fator de crescimento do endotélio vascular A - VEGF-A (do inglês, *Vascular endothelial growth factor A*) e o fator de crescimento derivado de plaquetas - PDGF (do inglês, *Platelet-Derived Growth Factor*), que podem contribuir significativamente para a Engenharia Tecidual, induzindo a formação de vasos e a proliferação de determinados tipos celulares para a geração de um pâncreas bioartificial.

Todos estes estudos propostos estariam visando um cenário translacional clínico futuro, no qual órgãos alogênicos ou até mesmo xenogênicos, de escala humana (suíno por exemplo), poderiam ser utilizados para descelularização, seguido de recelularização com células do próprio paciente (IPSCs) isoladas, diferenciadas e expandidas para popular órgãos específicos. Após a recelularização e maturação deste órgão bioartificial, o enxerto personalizado seria implantado sem a necessidade de imunossupressão a longo prazo.

8. BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

1. Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. 2017; 11-26, 142-146, 376-383.
2. Karamanou, M. Protogerou, A., Tsoucalas, G., Androutsos, G., Poulakou-Rebelakou, E. Milestones in the history of diabetes mellitus: The main contributors. *World Journal of Diabetes*. 2016; 7(1): 1–7.
3. International Diabetes Federation (IDF). *Diabetes Atlas 8ed* 2017. 2017; 14-24, 40-80.
4. Bento A., Baptista, H., Oliveira, F. Malformações congênitas do pâncreas: um caso clínico. *Rev. Assoc. Med. Bras*. 2013; 59(1): 35-39.
5. Ross, M.H., Pawlina, W. *Histologia: texto e atlas, em correlação com Biologia celular e molecular*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2012. 657-661-663, 674-675.
6. Gartner, L.P., Hiatt, J.L. *Tratado de Histologia em cores*. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2007. 424-425, 427-428.
7. Geneser, F. *Histologia: com bases moleculares*. 3.ed. Buenos Aires: Médica Panamericana / Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003. 404.
8. Junqueira, L.C., Carneiro, J. *Histologia Básica: texto e atlas*. 12º ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan. 2013. 399-401, 433.
9. Da Silva Xavier, G. The Cells of the Islets of Langerhans. *J. Clin. Med*. 2018; (7), 54.
10. Zhang, X.X., Pan, Y.H., Huang, Y.M., Zhao, H.L. Neuroendocrine hormone amylin in diabetes. *World J Diabetes*. 2016; 7(9): 189-197.
11. Haber, E.P., Curi, R., Carvalho, C.R.O., Carpinelli, A.R. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2001; 45(3): 219-227.
12. Wahren, J., Kallas, A. and Sima, A.A.F. The Clinical Potential of C-Peptide Replacement in Type 1 Diabetes John Wahren. *Diabetes*. 2012; 61(4): 761-772.

-
13. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997;20:1183–1197.
 14. Silva, M. E. R. da, Mory, D., Davini, E. Marcadores genéticos e auto-imunes do diabetes melito tipo 1: da teoria para a prática. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008; 52(2): 166-180.
 15. Chiang, J.L., Kirkman, M.S., Laffel, L.M., Peters, A.L. Type 1 Diabetes Sourcebook Authors. Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2014; 37(7):2034-54.
 16. Humar, A., Kandaswamy, R., Granger, D., Gruessner, R.W., Gruessner, A.C., Sutherland, D.E. Decreased surgical risks of pancreas transplantation in the modern era. *Ann Surg*. 2000; 231(2):269-75.
 17. Larsen. J.L. Pancreas transplantation: indications and consequences. *Endocr Rev*. 2004; 25(6):919-46.
 18. Dean, P.G., Kukla, A., Stegall, M.D., Kudva, Y.C. Pancreas transplantation. *BMJ*. 2017; 357:j1321.
 19. Nanji, S.A., Shapiro, A.M. Advances in pancreatic islet transplantation in humans. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2006; 8: 15-25.
 20. Ryan, E.A., Lakey, J.R., Rajotte, R.V., Korbitt, G.S., Kin, T., Imes S., et al. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* 2001; 50: 710-9.
 21. Ballinger, W. F., Lacy, P.E. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery*. 1972; 72(2):175–186.
 - 22 - Najarian, J.S., Sutherland D.E., Matas, A.J., Steffes, M.W., Simmons, R.L., Goetz, F.C. Human islet transplantation: a preliminary report. *Transplantation Proceedings*. 1977; 9(1): 233–236.
 23. Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Ryan, E.A., Korbitt, G.S., Toth, E., Warnock, G.L., *et al*. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *The New England Journal of Medicine*. 2000; 343(4): 230– 238.
 24. Collaborative Islet Transplant Registry (CITR). Collaborative Islet Transplant Registry 10º Anual Report – 2017. 2017. (<http://www.citregistry.org>)

-
25. Rother, K.I., Harlan, D.M. Challenges facing islet transplantation for the treatment for type 1 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 2004; 114: 877-883.
26. Ryan, E.A., Paty, B.W., Senior, P.A., Bigam, D., Alfadhli, E., Kneteman, N.M., *et al.* Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes.* 2005 54: 2060-2069.
27. Stoltz, J.F., Decot, V., Huseltein, C., He, X., Zhang, L., Magdalou, J., *et al.* Introduction to regenerative medicine and tissue engineering. *Biomed Mater Eng.* 2012; 22(1-3):3-16.
28. Fisher, M.B. e Mauck, R.L. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Recent Innovations and the Transition to Translation. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013; 19(1):1-13.
29. Langer, R. e Vacanti, J.P. Tissue engineering. *Science.* 1993; 260(5110):920-926.
30. Griffith, L.G. e Naughton, G. Tissue engineering: current challenges and expanding opportunities. *Science.* 2002; 295(5557): 1009-1023.
31. Orlando, G., Baptista, P., Birchall, M., De Coppi, P., Farney, A., Guimaraes-Souza, N.K., *et al.* Regenerative medicine as applied to solid organ transplantation: current status and future challenges. *Transpl Int.* 2010; 24(3):223-255.
32. Frantz, C., Stewart, K.M., Weaver, V.M. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 24):4195-200.
33. Souza, R.S., Pinhal, M. A. S. Interações em processos biológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde.* 2011; 36(1): 48-54.
34. Van Deijnen, J.H., Hulstaert, C.E., Wolters, G.H., Van Schilfgaarde, R. Significance of the peri-insular extracellular matrix for islet isolation from the pancreas of rat, dog, pig, and man. *Cell and Tissue Research.* 1992; 267(1): 139–146.
35. Stendahl, J.C., Kaufman, D.B., Stupp, S.I. Extracellular matrix in pancreatic islets: relevance to scaffold design and transplantation. *Cell Transplant.* 2009;18(1):1-12.

-
36. Llacua, L. A., Faas, M. M., de Vos, P. Extracellular matrix molecules and their potential contribution to the function of transplanted pancreatic islets. *Diabetologia*. 2018; 61(6):1261-1272.
- 37 - Brown, B. N., Barnes, C. A., Kasick, R.T., Michel, R., Gilbert, T.W., Beer-Stolz, D., *et al.* Surface characterization of extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*. 2010; 31(3):428-465.
38. Gilbert, T.W., Sellaro, T.L., Badylak, S.F. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006; 27(19):3675-3686.
39. Barkan, D., Green, J.E., Chambers, A.F. Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur J Cancer*. 2010; 46(7):1181-1189.
40. Allen, R.A., Seltz, L.M., Jiang, H., Kasick, R.T., Sellaro, T.L., Badylak, S.F., *et al.* Adrenal extracellular matrix scaffolds support adrenocortical cell proliferation and function in vitro. *Tissue Eng Part A*. 2010; 16(11):3363-74.
41. Cortiella, J., Niles, J., Cantu, A., Brettler, A., Pham, A., Vargas, G., *et al.* Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation. *Tissue Eng Part A*. 2010; 16(8):2565-80.
42. Sellaro, T.L., Ranade, A., Faulk, D.M., McCabe, G.P., Dorko, K., Badylak, S.F., *et al.* Maintenance of human hepatocyte function in vitro by liver-derived extracellular matrix gels. *Tissue Eng Part A*. 2010; 16(3):1075-82.
43. Cheng, N.C., Estes, B.T., Awad, H.A., Guilak, F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells by a porous scaffold derived from native articular cartilage extracellular matrix. *Tissue Eng Part A*. 2009; 15(2):231-41.
44. Stern, M.M., Myers, R.L., Hammam, N., Stern, K.A., Eberli, D., Kritchevsky, S.B., *et al.* The influence of extracellular matrix derived from skeletal muscle tissue on the proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells ex vivo. *Biomaterials*. 2009; 30(12):2393-9

-
45. Valentin, J.E., Turner, N.J., Gilbert, T.W., Badylak, S.F. Functional skeletal muscle formation with a biologic scaffold. *Biomaterials*. 2010; 31(29):7475-84.
46. Chen, C., Chai, J., Singh, L., Kuo, C.Y., Jin, L., Feng, T., *et al*. Characterization of an in vitro differentiation assay for pancreatic-like cell development from murine embryonic stem cells: detailed gene expression analysis. *Assay Drug Dev Technol*. 2011; 9(4): 403-19.
47. Candiello, J., Cole, G.J., Halfter, W. Age-dependent changes in the structure, composition and biophysical properties of a human basement membrane. *Matrix Biol*. 2010; 29(5): 402-10.
- 48 - Remlinger, N. T., P. D. Wearden, Gilbert TW. Procedure for decellularization of porcine heart by retrograde coronary perfusion. *J Vis Exp*. 2012; 6(70): e50059.
49. Burgess, S.N., Harding, S.A., Melton, I.C., Lever, N.A., Swain, A.H., Shi, B., *et al*. An unmet need for implantable cardioverter-defibrillators in New Zealand. *Europace*. 2011; 13(9): 1299-303.
50. Uygun, B.E., Soto-Gutierrez, A., Yagi, H., Izamis, M.L., Guzzardi, M.A., Shulman, C., *et al*. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med*. 2010; 16(7): 814-20.
51. Sullivan, D.C., Mirmalek-Sani, S.H., Deegan, D.B., Baptista, P.M., Aboushwareb, T., Atala, A., *et al*. Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. *Biomaterials*. 2012; 33(31): 7756-64.
52. Totonelli, G., Maghsoudlou, P., Garriboli, M., Riegler, J., Orlando, G., Burns, A.J., *et al*. A rat decellularized small bowel scaffold that preserves villus-crypt architecture for intestinal regeneration. *Biomaterials*. 2006; 33(12): 3401-10.
53. Mirmalek-Sani, S.H.; Orlando G., Orlando, G., McQuilling, J.P., Pareta, R., Mack, D.L., Salvatori, M., *et al*. Porcine Pancreas Extracellular Matrix as a

Platform for Endocrine Pâncreas Bioengineering. *Biomaterials*. 2013; 34(22): 5488-95.

54. Goh, S. K., Bertera, S., Olsen, P., Candiello, J.E., Halfter, W., Uechi, G., *et al.* Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials*. 2013; 34(28): 6760-72.

55. Peloso, A., Urbani, L., Cravedi, P., Katari, R., Maghsoudlou, P., Fallas, M.E., *et al.* The Human Pancreas as a Source of Protolerogenic Extracellular Matrix Scaffold for a New-generation Bioartificial Endocrine Pancreas. *Ann Surg*. 2016; 264(1):169-79.

56. Weber, L.M., Hayda, K.N., Anseth, K.S. Cell–Matrix Interactions Improve β -Cell Survival and Insulin Secretion in Three-Dimensional Culture. *Tissue Engineering. Part A*. 2008; 14(12): 1959–1968.

57. Cheng, J.Y.C., Raghunath, M., Whitelock, J., Poole-Warren, L. Matrix components and scaffolds for sustained islet function. *Tissue Engineering. Part B*. 2011; 17(4): 235–247.

58. Tian, X.H., Xue, W.J., Pang, X.L., Teng, Y., Tian, P.X., Feng, X.S. Effect of small intestinal submucosa on islet recovery and function in vitro culture. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2005; 4(4): 524-9.

59. De Carlo, E., Baiguera, S., Conconi, M.T., Vigolo, S., Grandi, C., Lora, S., *et al.* Pancreatic acellular matrix supports islet survival and function in a synthetic tubular device: in vitro and in vivo studies. *Int J Mol Med*. 2010; 25(2): 195-202.

60. Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R., Yamada, K.M. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*. 2001; 294(5547):1708-12.

61. Scarritt, M.E., Pashos, N.C., Bunnell, B.A. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015; 3:43.

62. Napierala, H., Hillebrandt, K.H., Haep, N., Tang, P., Tintemann, M., Gassner, J. Engineering an endocrine Neo-Pancreas by repopulation of a

decellularized rat pancreas with islets of Langerhans. *Sci Rep.* 2017; 2(7): 41777.

63. Hashemi, J., Pasalar, P., Soleimani, M., Khorramirouz, R., Fendereski, K., Enderami, S.E., *et al.* Application of a novel bioreactor for in vivo engineering of pancreas tissue. *J Cell Physiol.* 2018;233(5): 3805-3816.

64. Guruswamy Damodaran, R., Vermette, P. Decellularized pancreas as a native extracellular matrix scaffold for pancreatic islet seeding and culture. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018; 12(5):1230-1237.

65. Hashemi, J., Pasalar, P., Soleimani, M., Arefian, E., Khorramirouz, R., Akbarzadeh, A., *et al.* Decellularized Pancreas Matrix Scaffolds for Tissue Engineering Using Ductal or Arterial Catheterization. *Cells Tissues Organs.* 2018; 205(2): 72-84.

66. Elebring, E., Kuna, V.K., Kvarnström, N., Sumitran-Holgersson, S. Cold-perfusion decellularization of whole-organ porcine pancreas supports human fetal pancreatic cell attachment and expression of endocrine and exocrine markers. *J Tissue Eng.* 2017 30; 8:2041731417738145.

67. Sackett, S.D., Tremmel, D.M., Ma, F., Feeney, A.K., Maguire, R.M., Brown, M.E., *et al.* Extracellular matrix scaffold and hydrogel derived from decellularized and delipidized human pancreas. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 10452.

68. Wang, X., Li, Y.G., Du, Y., Zhu, J.Y., Li, Z. The Research of Acellular Pancreatic Bioscaffold as a Natural 3-Dimensional Platform In Vitro. *Pancreas.* 2018; 47(8):1040-1049.

69. Sionov, R.V., Finesilver, G., Sapozhnikov, L., Soroker, A., Zlotkin-Rivkin, E., Saad, Y., *et al* Beta Cells Secrete Significant and Regulated Levels of Insulin for Long Periods when Seeded onto Acellular Micro-Scaffolds. *Tissue Eng Part A.* 2015; 21(21-22): 2691-702.

70. Wu, D., Wan, J., Huang, Y., Guo, Y., Xu, T., Zhu, M., *et al.* 3D Culture of MIN-6 Cells on Decellularized Pancreatic Scaffold: In Vitro and In Vivo Study. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:432645.

-
71. Katsuki, Y., Yagi, H., Okitsu, T., Kitago, M., Tajima, K., Kadota, Y., *et al.* Endocrine pancreas engineered using porcine islets and partial pancreatic scaffolds. *Pancreatology*. 2016; 16(5): 922-30.
72. Wan, J., Huang, Y., Zhou, P., Guo, Y., Wu, C., Zhu, S., *et al.* Culture of iPSCs Derived Pancreatic β -Like Cells In Vitro Using Decellularized Pancreatic Scaffolds: A Preliminary Trial. *Biomed Res Int*. 2017; 2017:4276928.
73. Chaimov, D., Baruch, L., Krishtul, S., Meivar-Levy, I., Ferber, S., Machluf, M. *et al.* Innovative encapsulation platform based on pancreatic extracellular matrix achieve substantial insulin delivery. *J Control Release*. 2017;257: 91-101.
74. Xu, L., Guo, Y., Huang, Y., Xiong, Y., Xu, Y., Li, X., *et al.* Constructing heparin-modified pancreatic decellularized scaffold to improve its re-endothelialization. *J Biomater Appl*. 2018; 32(8): 1063-1070.
75. Yu, H., Chen, Y., Kong, H., He, Q., Sun, H., Bhugul, P.A., *et al.* The rat pancreatic body tail as a source of a novel extracellular matrix scaffold for endocrine pancreas bioengineering. *J Biol Eng*. 2018; 12: 6.
76. Guo, Y., Wu, C., Xu, L., Xu, Y., Xiaohong, L., Hui, Z., *et al.* Vascularization of pancreatic decellularized scaffold with endothelial progenitor cells. *J Artif Organs*. 2018; 21(2): 230-237.
77. Mantovani, M.C., da Conceição, M.M., Ferreira, A.J., Labriola, L., Santos, P.B., Tonso, A., *et al.* Immobilization of primary cultures of insulin-releasing human pancreatic cells. *Islets*. 2009; 1(3): 224–231.
78. Raikwar, S.P., Zavazava, N. Insulin producing cells derived from embryonic stem cells: are we there yet? *J Cell Physiol*. 2009; 218(2): 256-63.
- 79 – Voltarelli, J.C., Couri, C.E.B., Rodrigues, M.C., Moraes, D.A., Stracieri, A.B.P.L., Pieroni, F. *et al.* Terapia celular no diabetes mellitus. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2009; 31(Suppl 1): 149-156.
80. Bonner-Weir, S., Sharma, A. Pancreatic stem cells. *J Pathol*. 2002; 197(4): 519-26.

-
81. Voltarelli, J.C, Couri, C.E., Stracieri, A.B., Oliveira, M.C., Moraes, D.A., Pieroni, F., *et al.* Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell. JAMA. 2007; 297(14): 1568-76.
82. Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., Melton, D.A. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. Nature, v. 455, n. 7213, p. 627–632, 2 out. 2008.
83. Maehr, R., Chen, S., Snitow, M., Ludwig, T., Yagasaki, L., Goland, R., *et al.* Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106(37): 15768-73.
84. Fontelles, M.J., Simoes, M.G., Farias, S.H., Fontelles, R.G.S. Metodologia da Pesquisa Científica: Diretrizes para a Elaboração de um Protocolo de Pesquisa. Rev Par Medicina. 2009; 23(3): 1-8.
85. Linetsky, E., Bottino, R., Lehman, R., Alejandro, R., Inverardi, L., Ricordi, C. Improved human Islet Isolation Using a New Enzyme Blend, Liberase. Diabetes. 1997; 46(7): 1120-1123.
86. Ricordi, C., Gray, D.W., Hering, B.J., Kaufman, D.B., Warnock, G.L., Kneteman, N.M., *et al.* Islet isolation assessment in man and large animals. Acta Diabetologica Latina. 1990; 27(3): 185–195.
87. Mahler, R., Franke, F.E., Hering, B.J., Brandhorst, D., Brandhorst, H., Brendel, M.D., *et al.* Evidence for a significant correlation of donor pancreas morphology and the yield of isolated purified human islets. J Mol Med. 1999; 77(1): 87–89.
88. Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R., McKay, R. Differentiation of Embryonic Stem Cells to Insulin-Secreting Structures Similar to Pancreatic Islets. Science. 2001; 292(5520): 1389–1394.
89. Farmacopéia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu; 1988-1996.
90. Uemori, T., Asada, K., Kato, I., Harasawa, R. Amplification of the 16S-23S Spacer Region in rRNA Operons of Mycoplasmas by the Polymerase Chain Reaction. System. Appl. Microbiol. 1992; 15(2): 181-186.

-
91. Pandya, A.K., Serhatkulu, G.K., Cao, A., Kast, R.E., Dai, H., Rabah, R., Poulik, J., Banerjee, S., Naik, R., Adsay, V., Auner, G.W., Klein, M.D., Thakur, J.S., Sarkar, F.H. Evaluation of pancreatic cancer with Raman spectroscopy in a mouse model. *Pancreas*. 2008; 36(2):e1-8.
92. Howell, N.K., Arteaga, G., Nakai, S., Li-Chan, E.C. Raman spectral analysis in the C-H stretching region of proteins and amino acids for investigation of hydrophobic interactions. *J Agric Food Chem*. 1999; 47(3):924-33.
93. Gagoś, M., Arczewska, M., Gruszecki, W.I. Raman spectroscopic study of aggregation process of antibiotic amphotericin B induced by H⁺, Na⁺, and K⁺ ions. *J Phys Chem B*. 2011; 115(17):5032-6.
94. Miyaoka, R., Hosokawa, M., Ando, M., Mori, T., Hamaguchi, H.O., Takeyama, H. In situ detection of antibiotic amphotericin B produced in *Streptomyces nodosus* using Raman microspectroscopy. *Mar Drugs*; 2014; 13;12(5):2827-39.
95. Kossugue, P.M. Diferenciação de células-tronco embrionárias murinas (mECs) em células produtoras de insulina (IPCs) e caracterização funcional do gene Purkinje cell protein 4 (Pcp-4) neste processo. São Paulo. Instituto de Química da Universidade de São Paulo – Departamento de Bioquímica. 112p. 2013.
96. Conconi, M.T., De Coppi, P., Di Liddo, R., Vigolo, S., Zanon, G.F., Parnigotto, P.P., et al. Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells. *Transpl Int*. 2005; 18 (6): 727e34.
97. RBT (Registro Brasileiro de Transplantes). Transplante CEd (2018) Veículo Oficial da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. In. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. Ano XXIV nº4 – Janeiro/Dezembro 2018.
98. Tint, D., Stabler, C.T., Hanifi, A., Yousefi, F., Linkov, G., Hy, K., Soliman, A.M.S., Pleshko, N. Spectroscopic Analysis of Human Tracheal Tissue during Decellularization. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2019; Feb;160(2): 302-309. Epub 2018 Oct 16.

99. Hillebrandt, K.H., Everwien, H., Haep, N., Keshi, E., Pratschke, J., Sauer I.M. Strategies based on organ decellularization and recellularization. *Transpl Int.* 2019; Jun;32(6):571-585.
100. Welman, T., Michel, S., Segaren, N., Shanmugarajah, K. Bioengineering for Organ Transplantation: Progress and Challenges. *Bioengineered.* 2015; 6(5):257-61. Epub 2015 Aug 11.
101. Robertson, M.J., Dries-Devlin, J.L., Kren, S.M., Burchfield, J.S., Taylor, D.A. Optimizing recellularization of whole decellularized heart extracellular matrix. *PLoS One.* 2014; 9: e90406.

9. ANEXOS

9. ANEXOS

9.1. Anexo A - Aprovação pelo Comitê de Ética Uso Animal. CEUA FMUSP nº 117/15.

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “**Decelularização e reconstrução de pâncreas visando transplante e reversão do Diabetes**” protocolo nº **117/15** sob a responsabilidade de **Mari Cleide Sogayar e Marluce da Cunha Mantovani**, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 15.07.2015

Vigência do Projeto	Agosto/2017
Espécie/linhagem	rato
Nº de animais	48
Peso/Idade	300-450 grs
Sexo	macho
Origem	Biotério do ICB

CEUA-FMUSP, 15 de Julho de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

9.2. Anexo B – Termo de Outorga.

Termo de Outorga do projeto **Descelularização e reconstrução de pâncreas visando transplante e reversão do *Diabetes mellitus* Tipo I** (Processo número: 457601/2013-2), aprovado no Edital número 47/2013 - Novas Terapias Portadoras de Futuro, MCTI/CNPq/CT-Saúde/CT-Biotecnologia/MS/SCTIE/DECIT.

0398048674272332

TERCEIRO TERMO ADITIVO AO TERMO DE CONCESSÃO E ACEITAÇÃO DE APOIO FINANCEIRO A PROJETO ASSINADO ELETRONICAMENTE PELO BENEFICIÁRIO EM 14/01/2014

CONCEDENTE:**NOME:**

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO

CNPJ/ME:

33.654.831/0001-36

BENEFICIÁRIO:

Nome: Mari Cleide Sogayar

CPF Nº: 276.972.908-04

1. OBJETO:

Constitui o objeto do presente Termo Aditivo, a prorrogação da vigência do Termo de Concessão e Aceitação, até 31/07/2018, para dar continuidade ao projeto identificado abaixo.

1.1. TÍTULO DO PROJETO/PLANO DE TRABALHO

Decelularização e reconstrução de pâncreas visando transplante e reversão do Diabetes mellitus Tipo I

1.2. IDENTIFICAÇÃO DO PROCESSO

Número do processo: 457601/2013-2

Edital/Chamada: Chamada Nº 47/2013 MCTI/CNPq/CT-Saúde/CT-Biotecnologia/MS/SCTIE/DECIT - Novas Terapias Portadoras de Futuro

1.3 VALOR GLOBAL DA CONCESSÃO

VALOR DA CONCESSÃO(TERMO DE CONCESSÃO): R\$ 1.171.800,00

VALOR ADICIONAL(TERCEIRO TERMO ADITIVO): R\$ 0,00

VALOR GLOBAL DA CONCESSÃO: R\$ 1.171.800,00

1.4 VALOR DA CONCESSÃO ADICIONAL**2. DA RATIFICAÇÃO**

Ficam ratificadas as demais cláusulas e/ou condições do Termo de Concessão e Aceitação de Apoio Financeiro a Projeto, ora aditado, no que não colidirem com as do presente instrumento.

3. DA PUBLICAÇÃO

A publicação resumida do presente Termo na imprensa oficial é condição indispensável para sua eficácia, devendo ser providenciada pelo CNPq até o quinto dia útil do mês seguinte ao de sua assinatura, para ocorrer no prazo de vinte dias daquela data.

A ausência de publicação no prazo estabelecido importa em cessação dos efeitos do presente instrumento e responsabilização de quem lhe deu causa.

4. ACEITE:

Ao enviá-lo ao CNPq, o BENEFICIÁRIO declara que leu e aceitou integralmente os termos deste documento.

Aditivo de contrato registrado eletronicamente por meio da internet junto ao CNPq, pelo agente receptor 10.0.2.22(srv258.cnpq.br) , mediante uso de senha pessoal do Beneficiário em 29/08/2017, originário do número IP 200.130.33.73(200.130.33.73) e número de controle 1998503719985037:1939595175-2168965703.

Para visualizar este documento novamente ou o PDF assinado digitalmente, acesse: <http://efomento.cnpq.br/efomento/termo?numeroAcesso=0398048674272332>.

9.3. Anexo C - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos. Aprovação do Projeto (CAAE: 47887115.6.0000.0065) pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP FMUSP) via Plataforma Brasil - Parecer Consubstanciado nº 2.695.463.

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Decelularização e reconstrução de pâncreas visando transplante e reversão do Diabetes mellitus Tipo I.

Pesquisador: Mari Cleide Sogayar

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 47887115.6.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.695.463

Apresentação do Projeto:

No presente estudo, propõe-se aplicar os princípios de decelularização de órgãos ao pâncreas, visando à preservação de sua matriz extracelular (MEC) e rede vascular, seguido de reconstituição do tecido pancreático com células produtoras de insulina (IPCs) e células acinares, na presença de fatores peptídicos de crescimento e diferenciação (VEGF-A e PDGF-BB), tendo, como meta final, o transplante do pâncreas reconstituído e a reversão do Diabetes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Desenvolver um pâncreas “engenheirado” através da preparação de um scaffold pancreático decelularizado, com preservação da matriz extracelular (MEC), e reconstituição através da adição de células e acinares, e de fatores peptídicos de crescimento, visando obter maior massa de células com alta viabilidade, para o transplante em animais diabetizados e, no futuro, em pacientes diabéticos tipo 1 grave (hiperlábil).

Objetivo Secundário:

O projeto será desenvolvido primeiro em modelo animal e depois com pâncreas humanos, utilizando-se células do tecido pancreático endócrino e exócrino humano, além de suplementos representados por biofármacos recombinantes humanos (VEGF-A e PDGF-BB) gerados por nosso

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 2.695.463

grupo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não se aplica - pesquisa em laboratório, utilizando órgãos de ratos e humanos (doados pela família de pacientes com morte encefálica declarada).

Benefícios:

Não se aplica - pesquisa em laboratório, utilizando órgãos de ratos e humanos (doados pela família de pacientes com morte encefálica).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Detalhamento do processo de captação de órgãos humanos

Todo os documentos referentes ao projeto de pesquisa aprovado utilizando pâncreas humanos serão enviados à Central de Transplante para devida ciência e providências. O fluxograma de doação de pâncreas humanos para pesquisa é descrito abaixo, (adaptado à partir das informações da Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo):

- a. O Hospital notifica a Central de Transplantes sobre um paciente com morte encefálica (doador);
- b. A Central de Transplantes repassa a notificação para a SPOT (Organização de Procura de Órgão);
- c. A SPOT contacta o Hospital e viabiliza o doador;
- d. A SPOT informa a Central de Transplantes se o doador é viável;
- e. A SPOT encaminha material para realização do HLA - Antígeno Leucocitário Humano e para "crossmatch" para o Laboratório de Histocompatibilidade;
- f. A Central de Transplantes emite a lista de receptores e encaminha para o Laboratório de Imunogenética (apenas para o Rim, Pâncreas e Pâncreas conjugado Rim);
- g. O Laboratório de Imunogenética realiza tipagem HLA e "crossmatch" e informa para a Central de Transplantes;
- h. A Central de Transplantes com a lista definitiva dos receptores para cada órgão, liga para as Equipes de Transplante de Pâncreas e ofertam o órgão;
- i. Se TODAS as equipes de transplante de pâncreas RECUSAREM o órgão e, se a família ASSINOU a autorização para doação do órgão para TRANSPLANTE E PESQUISA, a Central de Transplantes liga para o nosso grupo de pesquisa para realizar a oferta de pâncreas para pesquisa.

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 2.695.463

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- O projeto foi aprovado pela COMISSAO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 15.07.2015 - Postado em 02/05/18 junto com outros documentos em Resposta ao CEPFM

- Foram postados: TERMO DE DOAÇÃO DE ÓRGÃOS E TECIDOS DOADOR FALECIDO
Brochura do investigador

Recomendações:

Postar carta de anuência da Central de Transplantes do Estado de São Paulo

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_512836.pdf	03/05/2018 10:49:39		Aceito
Outros	Resposta_CEPFM.pdf	02/05/2018 18:57:10	Marluce da Cunha Mantovani	Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto do projeto de pesquisa Marluce da Cunha Mantovani.pdf	20/07/2015 10:38:38		Aceito
Outros	Decel-Termo de Concessao.pdf	10/06/2015 14:38:11		Aceito
Outros	Informações Sobre o Doador de Múltiplos Órgãos.pdf	07/05/2015 16:35:57		Aceito
Outros	termo_de_doacao_-doador_falecido.pdf	07/05/2015 16:30:44		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Proj Decelularizac-a-o-Edital-CNPq-47-2013-Sogayar-CONEP.doc	07/05/2015 16:14:22		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 2.695.463

SAO PAULO, 06 de Junho de 2018

Assinado por:
Antonio de Padua Mansur
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

9.4. Anexo D – Termo de Doação de Órgãos e Tecidos Doador Falecido.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

SISTEMA ESTADUAL DE TRANSPLANTES

Home Page: <http://www.saude.sp.gov.br> e-mail: ctrans@saude.sp.gov.br

TERMO DE DOAÇÃO DE ÓRGÃOS E TECIDOS DOADOR FALECIDO

Eu, _____
grau de parentesco com o falecido: _____, natural de _____
Estado de _____, RG nº. _____
residente a _____
cidade: _____, Estado: _____, CEP: _____
respeitando as Leis nº. 9.434/97 e nº. 10.211/01 autorizo a doação de órgãos e/ou tecidos de
_____ nascido (a) em ____/____/____, natural de _____
Estado de _____, RG nº. _____
residente a _____
cidade: _____, Estado: _____, CEP: _____

Autorizo a doação dos órgãos (coração, pulmões, fígado, rins, pâncreas, intestino) e dos tecidos (córneas, ósteo-tendinoso, pele, vasos, válvulas cardíacas).

1- Para finalidades terapêuticas e científicas (transplante e pesquisa):

Assinatura do responsável legal

2-Para finalidades terapêuticas (uso exclusivo para transplante):

Assinatura do Responsável Legal

Observação:

TESTEMUNHAS

1. Nome: _____
RG nº: _____ Telefone: _____
Endereço: _____
Assinatura: _____

2. Nome: _____
RG nº: _____ Telefone: _____
Endereço: _____
Assinatura: _____

_____, ____ de _____ de _____.

Profissional responsável pela entrevista familiar (carimbo, assinatura e registro profissional)

APÊNDICE

DADOS DA AUTORA / PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DO DOUTORAMENTO

A) Dados Pessoais

Nome: Marluce da Cunha Mantovani

Data de nascimento: 06 de agosto de 1980

Naturalidade: São Vicente, São Paulo

CV lattes - CNPq: <http://lattes.cnpq.br/4012863214487776>

MyResearcherID (ISI): <http://www.researcherid.com/rid/K-9445-2014>

ORCID iD: 0000-0001-8502-3970

B) Listagem da Produção Científica - durante o período do doutoramento

B.1. Capítulos de Livro:

B.1.1. “Perspectivas do uso de ilhotas pancreáticas, células-tronco e arcabouços biológicos como alternativas terapêuticas para o Diabetes mellitus tipo I”. Camila Leal-Lopes, Marluce C. Mantovani, Patricia M. Kossugue, Fernando H. Lojudice & Mari C. Sogayar. In: **Neuroimunomodulação: Interações Imunoendócrinas na saúde e na doença.** A ser publicado pela Editora FIOCRUZ/RJ, previsão setembro/outubro de 2019.

B.1.2. “Biossegurança em Centros de Tecnologia Celular”. Mantovani, M.C., Lojudice, F.H., Sogayar, M.C. In: **Manual de Biossegurança - 3ª edição.** 3ª ed. São Paulo: Manole, 2017 Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso, ISBN: 9788520447819. (2017)

B.2. Trabalhos apresentados em Congressos Nacionais e Internacionais:

B.2.1. MANTOVANI, M.C., Damaceno-Rodrigues, N.R., Caldini, E.G. & Sogayar, M.C. **Decellularized Pancreas Bioscaffold generation aiming at Type 1 Diabetes Therapy – from rats to humans.** X Congresso da ABTCel, 16 a 18 de Outubro / 2018, São Paulo – SP. *Apresentado na forma de pôster.*

B.2.2. MANTOVANI, M.C., Damaceno-Rodrigues, N.R., Caldini, E.G. & Sogayar, M.C. **Decelularized Pancreatic Extracellular Matrices for Future Banking and Tissue Engineering.** XIX Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular. No período de 18 - 21 de Julho de 2018, São Paulo, São Paulo – Brasil. *Apresentado na forma de pôster.*

B.2.3. Santos, G.R.T., MANTOVANI, M.C & Sogayar, M.C. **Evaluation of the most efficient detergent for pancreatic decellularization aiming at the development of a bioartificial pancreas for type 1 diabetes treatment.** Feira Mundial de Ciência e Tecnologia 68° *Intel Internacional Science and Engineering Fair* - INTEL ISEF 2017. No período de 14 - 20 de Maio de 2017, Los Angeles, Califórnia – Estados Unidos da América. *Apresentado na forma de apresentação oral.*

B.2.4. Santos, G.R.T., Sogayar, M.C., MANTOVANI, M.C. **Avaliação do Detergente mais eficiente para descélularização pancreática visando a criação de um pâncreas bioartificial para o tratamento do Diabetes Tipo 1.** 15 Feira Brasileira de Ciências e Engenharia – FEBRACE. No período de 20 - 24 de Março de 2017, São Paulo, São Paulo - Brasil. *Apresentado na forma de pôster. *Trabalho PREMIADO.*

B.2.5. MANTOVANI, M.C., Pantanali, C., Calil, I.L., Fonseca, T.V., Santos, V.R., Corrêa-Giannella, M.L.C. & Sogayar, M.C. **New Procurement Protocol for human pancreas aimed at the generation of decellularized pancreatic scaffolds.** 10th Brazilian Congress of Stem Cells and Cell Therapy and 1st Meeting of the SBTMO, ABTCel and ISCT. No período de 24 - 27 de Agosto de 2016, Fortaleza, Ceará – Brasil. *Apresentado na forma de apresentação oral.*

B.2.6. MANTOVANI, M.C., Fonseca, T.V., Corrêa-Giannella, M.L.C. & Sogayar, M.C. **Descélularização de Pâncreas Murino e Avaliação da Degradação do Arcabouço de Matriz Extracelular ao Longo do Tempo.** 10th Brazilian Congress of Stem Cells and Cell Therapy and 1st Meeting of the SBTMO, ABTCel and ISCT. No período de 24 - 27 de Agosto de 2016, Fortaleza, Ceará – Brasil. *Apresentado na forma de pôster.*

B.2.7. MANTOVANI, M.C., Fonseca, T.V., Corrêa-Giannella, M.L.C. & Sogayar, M.C. **Avaliação do Grau de Preservação da Matriz Extracelular Descélularizada de Pâncreas Murino ao Longo do Tempo.** 12° Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo. No período de 04 - 06 de Agosto de 2016, São Paulo, São Paulo – Brasil. *Apresentado na forma de pôster. *Trabalho PREMIADO.*

B.3. Prêmios:

B.3.1. Premiação do nosso trabalho intitulado: “**Avaliação do detergente mais eficiente para descélularização pancreática visando à criação de um pâncreas bioartificial para o tratamento do Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)**”, realizado pelo aluno de Ensino Médio Gabriel Ronatty Tavares Santos

(aluno do pré-iniciação científica) sob orientação da Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar e coorientação **Marluce da Cunha Mantovani**. Foram um total de quatro premiações na 15ª Feira Brasileira de Ciências e Engenharia (FEBRACE 2017 - www.febrace.org.br) realizada de 21 a 23 de março de 2017 na Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

- 2º Lugar na Categoria Ciências da Saúde FEBRACE;
- Prêmio “Destaque Incentivo à Tecnologia e Ciência” - ABRITEC – Associação Brasileira de Incentivo à Tecnologia e Ciência;
- Prêmio Credencial para evento InfoMatrix Brasil;
- Prêmio Intel ISEF - *Internacional Science and Engineering Fair* – credencial para feira nos Estados Unidos 2017.

Uma das premiações foi o convite para fazer parte da delegação brasileira e representamos internacionalmente o Brasil e o nosso laboratório no 68º INTEL ISEF 2017, em Los Angeles, Califórnia, EUA , de 14 à 15 de maio de 2017.

B.3.2. Premiação do nosso trabalho intitulado: “**Avaliação do Grau de Preservação da Matriz Extracelular Descelularizada de Pâncreas Murino ao Longo do Tempo.**”, realizado pela aluna de Iniciação Científica Tatiane Fonseca sob orientação **Marluce da Cunha Mantovani**.

- Prêmio de Melhor Trabalho do 12º Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo, realizado na data de 04 à 06 de Agosto de 2016, São Paulo, São Paulo – Brasil.

B.3.3. Segundo lugar em um concurso mundial de Fotos Científicas de Células, realizado por uma empresa privada (StemCell Technologies). A foto e o texto submetido encontra-se abaixo (Figura A).

Image by: Marluce Mantovani, University of Sao Paulo

"Pancreas may be decellularized and the extracellular matrix (ECM) can be used for a bioengineered artificial pancreas development. During our quality control tests evaluation to create a decellularization protocol, using scanning electron microscopy (SEM), we noticed that a single cell remained in the Wistar rat pancreas ECM after the whole process, a symbol of persistence in the face of adversity!"

Figura A.: Foto e texto premiados no concurso Internacional de Fotos Científicas de Células.

B.4. Entrevista / Divulgação Científica:

B.4.1. Entrevista para o Jornal da USP, matéria por Ane Cristina publicada em 31 de maio de 2018. “**Pesquisadora da USP é a única brasileira em**

concurso de imagens científicas". A matéria na íntegra pode ser vista no link: <https://jornal.usp.br/ciencias/ciencias-biologicas/pesquisadora-da-usp-e-unica-brasileira-em-concurso-de-imagens-cientificas/>

B.5. Artigos

B.5.1. Mantovani, Marluce da Cunha, Carreira-Oliveira, Ana Claudia, Elia Garcia Caldini, Mari Cleide Sogayar. Human primary pancreatic islets–derived 3D-culture associated with decellularized pancreatic bioscaffold for diabetes disease in vitro modeling, drug screening and treatment. *Cells*, submetido.

B.5.2. Leal-Lopes, Camila**, Mantovani, Marluce da Cunha****, Sogayar, Mari Cleide. Advanced Therapy Medicinal Products in type I diabetes mellitus: technological and regulatory challenges. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*. 2018; 6(1), 41-55. Disponível em: <https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/1056>**

**** Esses autores contribuíram igualmente para a primeira autoria deste artigo.**