

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ANA CAROLINA VALE CAMPOS-LISBÔA

**Ilhotas pancreáticas humanas viáveis para o
transplante através do aumento da massa de células e
do imunisolamento com microcápsulas
biocompatíveis**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mari Cleide Sogayar

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Anna Carla Goldberg

Supervisor: Dr. Thiago Renno dos Mares Guia

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

10/12/2008

(Dez de Dezembro de dois mil e oito)

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANA CAROLINA VALE CAMPOS-LISBÔA

**Ilhotas pancreáticas humanas viáveis para o
transplante através do aumento da massa de células e
do imunisolamento com microcápsulas
biocompatíveis**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mari Cleide Sogayar

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Anna Carla Goldberg

Supervisor: Dr. Thiago Renno dos Mares Guia

São Paulo

2008

Ana Carolina Vale Campos-Lisbôa

Ilhotas pancreáticas humanas viáveis para o transplante através do aumento da massa de células e do imunisolamento com microcápsulas biocompatíveis

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

***“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível,
em breve estarás fazendo o impossível.”***

São Francisco de Assis

“Tudo tem o seu tempo determinado,

e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.

Há tempo de nascer, e tempo de morrer;

tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;

Tempo de matar, e tempo de curar;

tempo de derrubar, e tempo de edificar;

Tempo de chorar, e tempo de rir;

tempo de prantear, e tempo de dançar;

Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras;

tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;

Tempo de buscar, e tempo de perder;

tempo de guardar, e tempo de lançar fora;

Tempo de rasgar, e tempo de coser;

tempo de estar calado, e tempo de falar;

Tempo de amar, e tempo de odiar;

tempo de guerra, e tempo de paz.”

Eclesiástico 3;1-8

*Ao meu amado esposo Marcílio,
companheiro de sonhos e de realizações.*

*Aos meus pais, Márcio e Marisa, e aos meus irmãos,
Márcio Henrique e Marília Gabriela, apoio incondicional,
lutando junto até o último segundo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Márcio e Marisa, pelo amor incondicional e confiança, os quais me fizeram ter forças sempre para levantar a cabeça, sacudir a poeira e seguir em frente. *“O essencial é invisível aos olhos, só se vê bem com o coração” Antoine de Saint-Exupéry.*

Agradeço ao meu esposo Marcílio, por ter sido companheiro de sonhos e já de algumas realizações. Obrigada por acreditar em mim, por acreditar que valia a pena, e por isso, obrigada pela espera. *“(…)que seja infinito enquanto dure” Vinícius de Moraes.*

Obrigada aos meus irmãos e melhores amigos, Marília Gabriela e Márcio Henrique, pelo apoio incondicional. Vocês são para mim o ontem, o hoje e o sempre. Um porto seguro, amo muito vocês. *“Viver e não ter a vergonha de ser feliz” Gonzaguinha.*

Obrigada ao amigo e conselheiro científico Thiago Rennó dos Mares Guia, por me apresentar a ciência, desde os anos da graduação. Agradeço pela confiança e por ter me apresentado e indicado à Prof^a. Dr^a. Mari. Obrigada por ter acompanhado de perto todos os desafios desta tese, por nossas intermináveis conversas científicas quando vimos idéias se transformarem em práticas de sucesso. Por fim, obrigada pela presença amiga. *“A gente não faz amigos, reconhece-os” Vinícius de Moraes.*

Obrigada à orientadora Prof^a. Dr^a. Mari Cleide Sogayar, por ter me aceitado, e confiado a mim o honroso desafio deste projeto. Vivenciamos juntas as três fases de uma nova idéia segundo *Arthur Clark*; *“1- Não pode ser feito; 2- Provavelmente pode ser feito, mas não vai dar certo; 3- Eu sabia, desde o princípio que esta era uma boa idéia!”*. Agradeço por sua paciência, ousou dizer que: você aceitou uma pequena cientista que hoje conclui o trabalho com a certeza de que cresceu, cresceu muito, e claro, está certa de que há muito para crescer.... Sou muito grata também pelas esperas seguidas de carona no alto da noite, pelos lanches nas horas de fome e, não poderia faltar, pelas lágrimas na primeira notícia de reversão de diabetes em nossos animais! *“Felicidade é certeza de que nossa vida não está passando inultimente” Érico Veríssimo.*

A co-orientadora Dr^a. Ana Carla Goldberg obrigada pelo interesse, por ter estado sempre presente oferecendo apoio e discussões importantes sobre os passos do trabalho. Por me acolher em sua casa e também como sua aluna nos momentos necessários, a minha mais sincera gratidão.

A aluna de iniciação científica deste trabalho, Gisella Grazioli, obrigada por ter entrado em minha vida, no biotério, na sala de cultura, nos milhares de tubos de timidina, nas melhores microcápsulas do mundo!!! Você foi meu braço direito e esquerdo. Obrigada por ter me recebido em sua casa e me apresentado a sua linda família, aproveito para agradecer a seus queridos pais, D^a. Teresa e Sr. Giani, pelo carinho e acolhida; e claro, pela jóia que é a Gí! *“Não há no mundo exagero mais belo que a gratidão” La Bruyère.*

Minha querida amiga e colaboradora Patrícia Nagib Loyola, obrigada por ser *“(…)uma amiga mais chegada que irmã” Pb 18:24b*. Pelo apoio nos experimentos de MEV, por ter me acolhido em sua casa, pelas sugestões valiosas. Obrigada por ser assim desse jeito Patrícia Nagib de ser, eu amo você!

Obrigada a doutoranda e amiga querida Ana Lúcia Campanha Rodrigues. Obrigada pelo incentivo desde o mestrado para que eu me juntasse à luta pela cura do diabetes! Por ter entrado em nosso grupo com novas idéias e muita garra. Mas principalmente, obrigada por me acolher em sua vida e em sua casa nestes últimos meses, você tem sido uma irmã para mim nessa *“Selva de Pedra”*. Ah,

gracias pelas madrugadas regadas de filosofias e comédias - melhores do mundo! *“Uma vida não questionada não merece ser vivida” Platão.*

A Leticia Labriola obrigada por todas as idéias “proliferativas” e pela acolhida em sua casa. *Usted es especial!*

Obrigada a todo corpo técnico do laboratório, a Zizi pela dedicação e amável companhia, a Débora, ao Ricardo e a Sandra por tornarem a dinâmica do laboratório mais suave e pelas divertidas conversas que descontraem o ambiente.

Obrigada a secretária do laboratório D^a. Helena sempre disposta a ajudar. Você é um exemplo de persistência e coragem.

Obrigada a todos os colegas de laboratório, aos milhares que estão hoje no lab. e aos milhares que por lá já passaram. A troca de experiência, no ambiente de laboratório, é muito produtiva, e revela o prazer de se fazer ciência por pura e simples paixão, paixão por saber e por aprender. Protocolos estão escritos, uma hora ou outra, todos que desejarem a eles terão acesso, mas as discussões que circundam um experimento são únicas, e o que aprendemos nesses momentos, não está escrito em lugar nenhum. Por isso, colegas do LBCM e UIPH obrigada! *“Pedras no caminho guardo todas, um dia vou construir um castelo” Fernando Pessoa.*

Obrigada em especial às equipes de isolamento de ilhotas humanas. Vocês tornaram possível toda a prova de conceito da Biodritina[®], por isso são peças essenciais de todo este processo. Agradeço a agradável convivência mesmo quando parecia impossível; após 12 horas de trabalho e ainda estávamos dentro da sala limpa em busca de ilhotas humanas... Obrigada pela nobre dedicação ao trabalho. *“Tudo vale a pena quando a alma não é pequena” Fernando Pessoa.*

Obrigada a Dra. Janete Alves, que me ensinou o passo a passo do isolamento de ratos.

Obrigada a Maria Lúcia Gomes e Souza, por ter me cedido todo o material de purificação de alginato e o próprio alginato purificado.

Obrigada a equipe do Dr. Antonello Pileggi do *Diabetes Research Institute* (DRI) de Miami por todas as dicas de experimentos com animais diabéticos. Obrigada ao Dr. Camillo Ricorde e toda a sua equipe de isolamento de ilhotas humanas, também do DRI, por terem me acolhido em sua instituição e me ensinado muito sobre essa tecnologia.

Obrigada a Carol de Guzzi e Renata Ferreira que trabalharam como técnicas do laboratório e me auxiliaram muitas vezes. Rê obrigada pelas valiosas caronas também.

Obrigada ao aluno de iniciação de científica, Daniel Mauro Juste, pelo apoio, durante um ano, no projeto de cápsulas.

Obrigada ao aluno de iniciação científica, Daniel Mariani, por todas as interações, principalmente pela ajuda nos experimentos do Biotério.

Tenho que agradecer de maneira especial também aos encapsulados como um todo: Thiago Rennó dos Mares Guia, Ana Lúcia Campanha Rodrigues, Gisella Grazioli e Daniel Mariani. Vocês trouxeram muita energia positiva para este projeto, obrigada por todo apoio e por serem hoje as mãos que irão dar continuidade a esta história. *“Nós somos aquilo que fazemos repetidamente. A excelência, então, não é um modo de agir, mas um hábito” Aristóteles.*

Obrigada ao técnico César do laboratório do Prof. Dr. Omar El-Seoud do Instituto de Química da USP pelo auxílio nas medidas de viscosidade.

Obrigada ao técnico e amigo querido Jamil da Silva do laboratório Marcos Luiz dos Mares-Guia do prof. Dr. Marcelo Matos Santoro pelo auxílio nas cromatografias de fase reversa.

Obrigada a Prof^a. Dr^a. Helena Nader, do Departamento de Bioquímica da UNIFESP, pela acolhida e colaboração na avaliação da proporção M/G do alginato.

Obrigada a toda a equipe do Biotério FCF-IQ/USP, em especial a Flávia Ong, a Renata Spalutto, ao Wagner e à coordenadora Sylvania Neves, por terem sido sempre tão compreensivas às “intempéries” dos trabalhos lá executados e por sempre, tão prontamente, atenderem às minhas solicitações. Agradeço também por tratarem com a devida seriedade e carinho os animais lá mantidos.

Obrigada à Prof^a. Liana Verinaud, do departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, por ter aceitado a colaboração necessária às análises por MEV e histológicas das microcápsulas. Obrigada a doutoranda Jaci Gameiroa e, mais uma vez, a doutoranda Patrícia Nagib Loyola pelo auxílio necessário a realização destas análises.

Obrigada ao Prof. Dr. Evanguedes Kalapotakis, do ICB/UFMG, pelas amostras de veneno.

Obrigada ao Prof. Dr. Carlos Bloch e ao Prof. Dr. Marcelo Bemquerer da EMBRAPA/DF por terem me acolhido em seu laboratório para a colaboração referente à purificação e a caracterização da fração ativa do veneno.

Como não poderia faltar obrigada ao Prof. Dr. Marcos Luis dos Mares Guia *in memoriam*, por ter motivado, mesmo que de maneira passiva, o meu interesse pela ciência. Obrigada por ter obtido e patenteado a Biodritina[®], e obrigada pela orientação que obtive a partir de seus escritos referente ao projeto de microencapsulamento. Para mim foi uma honra assumir um trabalho conduzido e idealizado por tal mente brilhante. *“Não sabendo que era impossível, ele foi lá e fez” Jean Cacteau.*

E por último, e em primeiro lugar, obrigada ao meu querido Deus! Obrigada por me ter como filha tão querida e especial, por colocar em minha vida pessoas tão amáveis e companheiras, por acalmar meu coração em épocas de desespero, por me ensinar que existe apenas uma lei para se bem viver: “amar a Deus sobre todas as coisas e ao próximo como a si mesmo”. “Pois é dando que se recebe”, vamos celebrar juntos mais esta conquista, que eu possa ser sempre “instrumento da vossa paz”. Amém.

APOIOS FINANCEIROS

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

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

FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos

PRP-USP – Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

SUMÁRIO

I.	Índice de Tabelas.....	i
II.	Índice de Figuras.....	ii
III.	Abreviaturas.....	vi
IV.	Resumo.....	ix
V.	Abstract.....	xi
1.	Introdução.....	1
1.1.	Diabetes mellitus tipo 1.....	1
1.2.	O transplante de pâncreas.....	3
1.3.	O transplante de ilhotas pancreáticas.....	3
1.4.	Microencapsulamento de ilhotas.....	6
1.5.	A biocompatibilidade das microcápsulas.....	10
1.6.	A resposta imune no transplante de ilhotas microencapsuladas.....	13
1.7.	Fontes alternativas de células β para o transplante.....	14
1.8.	O veneno do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> e seu efeito sobre a célula β	19
2.	Objetivos.....	22
2.1.	Objetivo Geral.....	22
2.2.	Objetivos Específicos.....	22
3.	Material e Métodos.....	24
3.1.	Ilhotas pancreáticas.....	24
3.1.1.	Isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas humanas.....	24
3.1.2.	Isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas de ratos.....	25
3.1.3.	Contagem e avaliação da pureza e da viabilidade morfológica das ilhotas.....	26
3.2.	Cultura da linhagem celular RINm5F.....	26
3.3.	Microencapsulamento.....	27
3.3.1.	Caracterização do alginato da Sigma purificado (ASP).....	27
3.3.2.	Produção de microcápsulas e microencapsulamento de ilhotas.....	30
3.3.3.	Avaliação das propriedades físico-químicas das microcápsulas.....	31
3.3.4.	Estudo da permeabilidade das microcápsulas a proteínas.....	33
3.3.5.	Avaliação da citotoxicidade das microcápsulas e da atividade metabólica das células RINm5F encapsuladas.....	34
3.3.6.	Avaliação da atividade funcional in vitro de ilhotas pancreáticas humanas microencapsuladas.....	35
3.3.7.	Avaliação da capacidade imunoprotetora, in vitro, das microcápsulas sob o desafio de co-cultivo com macrófagos.....	36
3.3.8.	Avaliação da biocompatibilidade de microcápsulas vazias após o implante em animais.....	40
3.3.9.	Xenotransplante de ilhotas humanas microencapsuladas em camundongos diabéticos.....	41
3.4.	Efeito do veneno do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> (TS) sobre células beta.....	43
3.4.1.	Preparo do veneno do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> (TS).....	43
3.4.2.	Pré-fracionamento do veneno.....	43
3.4.3.	Fracionamento do veneno por HPLC em colunas de fase de reversa C-18.....	44
3.4.4.	Avaliação do potencial proliferativo do veneno de TS e suas frações sobre células beta.....	44
3.4.5.	Avaliação da atividade metabólica das células beta após tratamento com a fração LMW do veneno de TS.....	45
3.4.6.	Avaliação in vitro do efeito da fração ativa do veneno de TS sobre a liberação de insulina por ilhotas pancreáticas humanas.....	46

3.4.7.	Avaliação do efeito do veneno de escorpião sobre a expressão do mRNA de insulina e de PCNA por ilhotas pancreáticas humanas através de PCR quantitativo (qPCR) em aparelho de Real Time.....	46
3.5.	Coleta e análises dos dados.....	47
4.	Resultados.....	48
4.1.	Caracterização do alginato da Sigma purificado (ASP) e análise comparativa com o alginato ultrapurificado (AUP).....	48
4.2.	Obtenção de microcápsulas estáveis.....	51
4.3.	Avaliação das propriedades físico-químicas das microcápsulas.....	52
4.4.	Estudo da permeabilidade das microcápsulas a proteínas.....	57
4.5.	Avaliação da citotoxicidade do biomaterial e da atividade metabólica das células RINm5F microencapsuladas.....	58
4.6.	Avaliação da atividade funcional in vitro de ilhotas pancreáticas microencapsuladas.....	60
4.7.	Avaliação da capacidade imunoprotetora das microcápsulas , in vitro, sob o desafio de co-cultivo com macrófagos.....	60
4.8.	Avaliação da biocompatibilidade de microcápsulas vazias após o implante em animais.....	61
4.9.	Avaliar a habilidade de ilhotas humanas microencapsuladas em reverter a hiperglicemia de camundongos diabéticos em um modelo de xenotransplante.....	67
4.10.	Efeito do veneno do escorpião Tityus serrulatus (TS) sobre células beta.....	73
4.10.1.	Avaliação do ensaio de proliferação com incorporação de timidina tritiada por células RINm5F.....	73
4.10.2.	Avaliação do efeito mitogênico do sobrenadante do veneno centrifugado (SVC) e das frações LMW e HMW sobre a linhagem celular RINm5F.....	74
4.10.3.	Avaliação da atividade metabólica das células beta após tratamento com o SVC por redução do sal tetrazólio (MTT).....	75
4.10.4.	Fracionamento do SVC por HPLC em coluna de fase reversa C-18.....	76
4.10.5.	Avaliação do efeito do veneno de escorpião sobre a secreção de insulina por ilhotas pancreáticas humanas.....	79
4.10.6.	Avaliação do efeito do veneno de escorpião sobre a expressão de insulina e PCNA por ilhotas pancreáticas humanas.....	80
5.	Discussão.....	81
5.1.	Obtenção de microcápsulas funcionais e biocompatíveis.....	81
5.2.	Efeito do veneno do escorpião Tityus serrulatus (TS) sobre células beta pancreáticas.....	104
6.	Conclusões.....	109
7.	Referências bibliográficas.....	111

Anexos

Curriculum vitae

Artigos completos publicados

I. ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:	Testes clínicos de transplante de ilhotas suínas em pacientes portadores de DM1.....	16
Tabela 2:	Avaliação comparativa entre o alginato da SIGMA purificado (ASP), o alginato ultrapurificado Pronova® (AUP) e o alginato ideal segundo Dusseault e col. (2006).	51
Tabela 3:	Análise da expressão de IL-1 β por macrófagos c1o-cultivados com ilhotas nuas e microencapsuladas por qPCR.....	61
Tabela 4:	Manutenção de normoglicemia após o transplante de ilhotas microencapsuladas em animais diabéticos.....	97

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Figura esquemática representando os principais componentes do pâncreas: ácinos, vasos sanguíneos e ilhotas de Langerhans e sua estrutura celular. À direita, desenho esquemático da estrutura tridimensional de um hexâmero de insulina coordenado pelo íon zinco (esfera roxa). Esta é a forma de armazenamento da insulina dentro dos grânulos de secreção das células beta	2
Figura 2:	À esquerda, fotografia de microcápsulas de Biodritina® (alginato + sulfato de condroitina) envolvendo ilhotas de Langerhans humanas. À direita, representação esquemática da função da microcápsula: permitir livre trânsito de nutrientes e metabólitos e impedir a entrada de anticorpos e células do sistema imune.	7
Figura 3:	A – Alga marrom, principal fonte de alginato. B – Estrutura dos monômeros do alginato, M e G. C – Representação da ligação iônica entre o íon cálcio e a carboxila do resíduo G. D – Representação da coordenação de íons divalentes com as carboxilas dos resíduos G nas cadeias de alginato (G-G-G), que resulta na gelificação do material. E – Analogia da figura D com a estrutura de “caixas de ovos”.	9
Figura 4:	Escorpião <i>Tityus serulatus</i>	19
Figura 5:	À direita, processo de confecção de microcápsulas contendo ilhotas. À esquerda, representação esquemática da estrutura da Biodritina® (alginato + sulfato de condroitina), antes e após a gelificação.....	31
Figura 6:	Espectro de fluorescência de amostras de ASN (alginato da SIGMA não purificado), ASP (alginato da SIGMA purificado) e AUP (alginato ultrapurificado).....	49
Figura 7:	Dinâmica de viscosidade dos materiais ASP, AUP, BDTN-ASP e BDTN-AUP.....	49
Figura 8:	A- Cromatografia em papel das amostras ASN e ASP hidrolizadas em três condições diferentes: 0,5; 1,0 e 2,0 N de HCl. A letra G indica ácido gulurônico e M ácido manurônico. B- Valor em porcentagem do conteúdo G/M obtido a partir da densitometria da cromatografia em papel apresentada em (A).....	50
Figura 9:	Avaliação comparativa através de microscopia de fase de microcápsulas vazias produzidas com BDTN, variando-se o tipo de alginato utilizado (ASP ou AUP) e a solução de gelificação (CaCl ₂ 20 ou 100 mM e BaCl ₂ 20 mM), após manutenção em meio de cultura contendo 10% SFB em estufa a 37°C. O tempo pós-cultivo para BDTN-ASP foi de 7 dias e para BDTN-AUP, de 30 dias. Fotomicrografias obtida com aumento de 100X.....	52
Figura 10:	Microcápsulas de Biodritina® após terem sido submetidas ao teste de estresse rotacional (150 rpm) em solução de NaCl (0,15 mol.L ⁻¹). A: Fotomicrografias de microcápsulas de BDTN-Ca e de BDTN-Ba nos tempos 0, 7 e 21 dias do experimento. B: Medidas dos diâmetros das microcápsulas durante o experimento. As análises estatísticas foram realizadas comparando-se microcápsulas do mesmo material nos distintos períodos de tempo. As fotos foram feitas com objetiva graduada, sendo que cada quadrado possui 100 µm de lado. Aumento de 100X. Os pontos representam as médias de triplicatas de dois experimentos independentes ± SEM.....	53
Figura 11:	Microcápsulas de Biodritina® após terem sido submetidas a um estresse osmótico. Fotomicrografias de microcápsulas de BDTN-Ca e de BDTN-Ba nos tempos 0 e 60 minutos e 7 dias. As fotos foram feitas com objetiva graduada, cada quadrado possui 100 µm de lado. Aumento de 40X.....	55
Figura 12:	A- Medidas dos diâmetros das microcápsulas de BDTN-Ba e BDTN-Ca durante o experimento de estresse osmótico. Os pontos representam as médias de triplicatas de dois experimentos independentes ± SEM. B- Porcentagem destas microcápsulas, íntegras e rompidas, após o estresse osmótico por um período de 7 dias. As barras representam as médias de dois experimentos independentes ± SEM nos quais 200 microcápsulas foram avaliadas ao todo.....	55
Figura 13:	Avaliação comparativa da morfologia de microcápsulas vazias produzidas com BDTN-Ca e BDTN-Ba. Observação pré-implante e 4 semanas após terem sido retiradas (pós-implante) da região subcutânea de ratos.....	56

Figura 14:	Fotomicrografias de microcápsulas de Biodritina® após terem sido submetidas a um estresse térmico, 37°C e 40°C. Microcápsulas de BDTN-Ca e de BDTN-Ba foram analisadas após 1 e 24 horas de experimento. Aumento de 40X.....	57
Figura 15:	Dosagem de proteínas dos sobrenadantes dos meios de cultura de células RINm5F microencapsuladas em BDTN-Ba, ALG-Ba, BDTN-Ca e ALG-Ca cultivadas por 15 dias em meio de cultura sem soro.....	58
Figura 16:	Eletroforese desnaturante do sobrenadante do meio de cultura de células RINm5F microencapsuladas em ALG-Ca (AC), ALG-Ba (AB), BDTN-Ca (BC) e BDTN-Ba (BB), cultivadas por 15 dias em meio de cultura sem soro.....	58
Figura 17:	A- Cinética da atividade metabólica das células RINm5F microencapsuladas em BDTN-Ba, BDTN-Ca, ALG-Ba, ALG-Ca, * p<0,05 e **p<0,001 (One-way ANOVA com Tukey post test). Os pontos representam as médias de triplicatas de dois experimentos independentes ± SEM. B- Fotomicrografia representativa para os quatro tipos de microcápsulas contendo células RINm5F após 7 dias de cultivo. Aumento de 40X.....	59
Figura 18:	A- Ensaio de secreção de insulina por ilhotas nuas e microencapsuladas com BDTN-Ba durante incubação com baixa (2,8 mM) e alta (20 mM) concentração de glicose. Cada barra representa o valor médio de três valores de índice de estímulo calculado ± SEM. B- Valor médio dos índices de secreção de insulina de ilhotas isoladas de seis pâncreas.....	60
Figura 19:	Avaliação comparativa, ao microscópio de contraste de fase, de microcápsulas vazias de BDTN-Ba ou ASN-Ba 30 dias após o implante em camundongo Balb/c.....	62
Figura 20:	Microcápsulas vazias de BDTN-Ba ou ASN-Ba extraídas 7 e 30 dias após implante em camundongo Balb/c. Corte histológico corado com azul de toluidina, aumento de 40x..	63
Figura 21:	Micrografias obtidas em MEV de microcápsulas de BDTN-Ba antes e após o implante de 7 e 30 dias na região intraperitoneal de camundongos Balb/c. Aumento de 100X e 5.000X. As setas indicam a presença de estruturas semelhantes à fibrina.....	64
Figura 22:	Micrografias obtidas em MEV de microcápsulas de ASN-Ba antes e após o implante de 7 e 30 dias na região intraperitoneal de camundongos Balb/c. Aumento de 200X e 5.000X. As setas indicam a presença de estruturas semelhantes à fibrina.....	65
Figura 23:	Micrografias obtidas em MEV de microcápsulas de ALG-Ba, ALG-Ca, BDTN-Ba e BDTN-Ca produzidas com o alginato AUP. Aumento de 200X e 5.000X.....	66
Figura 24:	Ilhotas de Langerhans isoladas de pâncreas humano coradas com ditizona. A: ilhotas nuas - aumento de 100X; B: ilhotas humanas microencapsuladas em BDTN-Ba, aumento de 100X, grade com quadrados de 100 µm de lado.....	67
Figura 25:	Glicemia (A) e massa corpórea (B) de camundongos Balb/c, diabéticos, após transplante de 3.000 IEQ de ilhotas humanas purificadas do pâncreas P18/06. Ilhotas microencapsuladas em BDTN-Ba (quadrados vermelhos) e ilhotas nuas (triângulos azuis). Os pontos representam as médias ± SEM.....	68
Figura 26:	Avaliação ao microscópio óptico de microcápsulas vazias ou contendo ilhotas explantadas de animais diabéticos. Aumento de 40X e 100X, grade com quadrados com 100 µm de lado. Aumento de 100X. A seta indica uma microcápsula com crescimento pericapsular abundante.....	68
Figura 27:	Glicemia e medidas de massa corpórea de camundongos Balb-c, diabéticos, após xenotransplante de ilhotas humanas purificadas dos pâncreas P17/06 (A), P05/07 (B) e P08/07 (C). Ilhotas microencapsuladas com BDTN-Ba (quadrados vermelhos). Ilhotas nuas (triângulos azuis). Os pontos representam as médias ± SEM.....	70
Figura 28:	Teste oral de tolerância à glicose realizado em animais controle (círculos pretos) e em animais diabéticos, transplantados com ilhotas microencapsuladas (quadrados vermelhos) e ilhotas nuas (triângulos azuis), isoladas dos pâncreas P05/07 (A) e P08/07 (B). Os pontos representam as médias ± SEM.	71

Figura 29:	A. Fotos representativas correspondentes à avaliação da porcentagem de adesão celular sobre a superfície de microcápsulas explantadas. As fotos foram obtidas em microscópio de contraste de fase e em microscópio de fluorescência após coloração live/dead. Aumento de 100X. B. Avaliação comparativa entre a concentração de células presentes no lavado peritoneal no dia do explante de microcápsulas de animais agrupados da seguinte maneira: glicemia inferior a 200 mg.dL ⁻¹ , glicemia superior a 200 mg.dL ⁻¹ e controle (não diabéticos). Estes valores representam a média dos três experimentos de avaliação in vivo da função de ilhotas microencapsuladas com BDTN-Ba em animais diabéticos.....	72
Figura 30:	Ensaio de incorporação de timidina tritiada por células RINm5F tratadas com SFB (A) ou com glicose (B). Atribuiu-se um valor arbitrário de 1 à média das cintilações por minuto (cpm) das amostras tratadas com 0,5% de SFB. Os gráficos ilustram os resultados de dois experimentos independentes. Cada concentração foi testada em octuplicata. Barra - erro padrão (SEM).....	74
Figura 31:	Ensaio de incorporação de timidina tritiada por células RINm5F tratadas com concentrações crescentes de SVC. Atribuiu-se um valor arbitrário de 1 à média das CPM do controle mantido em 0,5% SFB. Resultados de quatro experimentos independentes. Cada concentração foi testada em sextuplicata. Barra - erro padrão (SEM)	74
Figura 32:	Ensaio de incorporação de timidina tritiada por células RINm5F tratadas com frações do veneno com massa molecular <10 kDa e > 10 kDa. Fração <10kDa = LMW e fração >10kDa = HMW. Atribuiu-se um valor arbitrário de 1 à média das CPM do controle mantido em 0,5% SFB. Resultados de dois experimentos independentes. Cada concentração foi testada em octuplicata. Barra - erro padrão (SEM).....	75
Figura 33:	Ensaio de MTT com células RINm5f tratadas com o SVC. Atribuiu-se um valor arbitrário de 1 à média das absorvâncias do controle mantido em 0,5% SFB. Resultados de dois experimentos independentes, sendo que cada concentração foi testada em sextuplicata. Barra - erro padrão (SEM).....	75
Figura 34:	Perfil cromatográfico do SVC (lote 1) do veneno do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> após cromatografia de fase reversa, C-18, em HPLC. Os números apresentados acima de cada pico representam o tempo de retenção e logo acima destes, os números de identificação para cada pico testado.....	76
Figura 35:	Ensaio de incorporação de timidina tritiada por células RINm5F: A. tratadas com as frações do lote 1 do veneno TS após fracionamento em coluna de fase reversa - RP1, resultado de três experimentos independentes. Cada concentração foi testada em quadruplicata; B. tratadas com a fração 9 da RP1, resultado de cinco experimentos independentes. Cada concentração foi testada em sextuplicata. Atribuiu-se um valor arbitrário de 1 à média das cpm do controle mantido em 0,5% SFB. Barra - erro padrão (SEM).....	77
Figura 36:	A. Perfil cromatográfico da fração LMW do veneno do escorpião TS após cromatografia de fase reversa, RP2. Os números apresentados acima de cada pico representam os tempos de retenção em minutos, seguidos pelas identificações de cada pico (1 a 9). B. Perfis cromatográficos sobrepostos da fração LMW (linha contínua) e da fração HMW (linha pontilhada) após cromatografia de fase reversa, RP2. A seta indica a fração com atividade proliferativa do veneno, “fração 6”	78
Figura 37:	Ensaio de incorporação de timidina tritiada por células RINm5F tratadas com a fração 6 da RP2, resultado de três experimentos independentes. Cada concentração foi testada em sextuplicata. Atribuiu-se um valor arbitrário de 1 à média das CPM do controle mantido em 0,5% SFB. Barra - erro padrão da média (SEM).....	79
Figura 38:	Índice de secreção de insulina de ilhotas humanas tratadas ou não com a fração ativa do veneno <i>T. serrulatus</i> (“fração 9” – RP1). Resultado de dois experimentos independentes. Cada concentração foi testada em triplicata. Barra - erro padrão da média (SEM).....	79

Figura 39:	Efeito da fração ativa do veneno sobre a expressão do RNA mensageiro de insulina em células beta de ilhotas pancreáticas humanas após incubação por 48 horas. Avaliação quantitativa da expressão por qPCR, gene constitutivo HPRT. Resultado de dois experimentos independentes, um com a “fração 9” e outro com a “fração 6”, cada concentração foi testada em duplicata. Barra - erro padrão (SEM).....	80
Figura 40:	Efeito da fração ativa do veneno sobre a expressão do RNA mensageiro de PCNA em células beta de ilhotas pancreáticas humanas após incubação por 48 horas. Avaliação quantitativa da expressão por qPCR, gene constitutivo HPRT. Resultado de dois experimentos independentes, um com a “fração 9” e outro com a “fração 6”, cada concentração foi testada em duplicata. Barra - erro padrão (SEM).....	80
Figura 41:	Figura retirada do artigo de Thanos et al. (2006). Análise por MEV de microcápsulas vazias implantadas na região intraperitoneal. de camundongos. As abreviações correspondem ao tipo de alginato utilizado na confecção das microcápsulas: VPMG – vendor-purified medium G, VPLG – vendor-purified low G, pKel – purified Keltone LVCR (ISP Corporation, USA), pFlu – purified Fluka (Sigma-Aldrich), pMan – purified Manucol (ISP Corporation, USA).....	93
Figura 42:	O ciclo vicioso de ativação do sistema imune pode ser iniciado após a cirurgia em resposta ao corpo estranho implantado (microcápsula). Células da ilhota microencapsulada são ativadas e liberam também mediadores inflamatórios, fechando o ciclo. (Adaptação de Wilson <i>et al.</i> , 2007).....	103
Figura 43:	Alterações da capacidade proliferativa da célula β durante a embriogênese, a fase neonatal e na vida adulta. (Adaptação de (Dhawan, Georgia et al., 2007)).....	105

III. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM	-micromolar
%	-porcentagem
AFU	-Arbitrary Fluorescence Unit (unidades arbitrárias de fluorescência)
ALG-Ba	-Microcápsula de alginato gelificada em cloreto de bário
ALG-Ca	-Microcápsula de alginato gelificada em cloreto de cálcio
ALG-PLL-ALG-Ca	-Microcápsula feita com alginato-PLL-alginato gelificadas em cloreto de bário
APC	-Célula Apresentadora de Antígenos
ASN	-Alginato da SIGMA não purificado
ASN-Ba	-Microcápsula de alginato da SIGMA não purificado gelificada em cloreto de bário
ASP	-Alginato da SIGMA purificado
ATCC	-American Type Culture Collection
AUP	-Alginato Ultrapurificado Pronova UP LVG®
BaCl₂	-Cloreto de bário
BDTN	-Biodritina®
BDTN-ASP	-Microcápsula de biodritina contendo alginato da SIGMA purificado
BDTN-AUP	-Microcápsula de biodritina contendo alginato ultrapurificado Pronova UP LVG®
BDTN-Ba	-Microcápsula de Biodritina® gelificada em cloreto de bário
BDTN-Ca	-Microcápsula de Biodritina® gelificadas em cloreto de cálcio
BSA	-Bovine Serum Albumin (albumina bovina sérica)
CaCl₂	-Cloreto de cálcio
cDNA	-complementary DNA (DNA complementar)
cm	-centímetro
CO₂	-Dióxido de carbono
CONEP	-Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
CP	-Cavidade Peritoneal
cpm	-Cintilações por minuto
cPs	-centiPascal – unidade padrão de pressão e tensão
Ct	-Cycle Threshold (número de ciclos da PCR que uma amostra atinge um valor de corte arbitrário nos ensaios de qRT-PCR)
Da	-Dalton
DM	-Miabetes Mellitus
DM1	-Diabetes Mellitus insulino-dependente ou tipo 1
DM2	-Diabetes Mellitus não insulino-dependente ou tipo 2
DMSO	-Dimetilsulfóxido
DNA	-Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
dNTP	-Desóxinucleotídeo
DTT	-Ditiotreitol
EDTA	-Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético).
EGF	-Epidermal Growth Factor (fator de crescimento epidermal)
ESR	-Espaço Subcapsular Renal
EU	-Endotoxin Unit (unidade de equivalente de endotoxina)
EUA	Estados Unidos da América
FDA	-Food and Drug Administration
FDP	-Fibrin Degradation Products (Produtos de degradação de fibrina)
g	-grama
G	-Ácido 1,4-α-L-gulurônicos
G/C	-Relação de ácido 1,4-α-L-gulurônicos e ácido 1,4-β-D-manurônico em uma molécula de alginato
GAG	-Glicosaminoglicano
GC	- relação entre as bases guanina e citosina presentes na molécula de RNA ou DNA
HCl	Ácido clorídrico
HMW	-Fração do veneno contendo moléculas acima 10 kDa
HPLC	-High Performance/Pressure Liquide Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

HPRT	-Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase (Hipoxantina Fosforribosil Transferase)
IEQ	-Eslets Equivalents – normaliza o tamanho das ilhotas para 150 µm
IFN-γ	-Interferon gama
IgG	-Imunoglobulina G
IXA	-International Xenotransplantation Association
kDa	-Quilodalton
kg	-quilograma
L	-Litro
LMW	-Fração do veneno contendo moléculas abaixo 10 kDa
M	-Ácido 1,4-β-D-manurônico
MEV	-Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	-miligrama
MHC	-Major Complexo f Histocompatibility (Complexo de Histocompatibilidade Principal)
mL	-mililitro
mM	-milimolar
mm	-milímetro
mRNA	-RNA mensageiro
MTT	-3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
N	-Normal: razão entre o número de equivalente de soluto dissolvidos e o volume de solução em litros
Na₂SO₄	-Sulfato de sódio
NaCl	-Cloreto de sódio
NUCEL	-Núcleo de Terapia Celular e Molecular
°C	-Graus Celsius
OPAS	-Organização Pan-Americana da Saúde
OPOs	-Organizações de Procura de Órgãos
pb	-Pares de base
PBSA	-Phosphate Buffered Saline without Calcium and Magnesium, pH 7,2 (Solução salina sem Cálcio e Magnésio, pH 7,2)
PCNA	-Proliferating Cell Nuclear Antigen (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular)
PCR	-Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
PEG	-Polietilenoglicol
PERV	-Porcine Endogenous Retroviral (Retrovírus Endógenos de Porcos)
PLL	-Poli-L-lisina
PMCG	-Poli-metil-co-guanidina
qPCR	-PCR quantitativo em tempo real
RNA	-Ribonucleic Acid (ácido ribonucleico)
rpm	-Revoluções por minuto
RS	-Região Subcutânea
SDS	-Sódio Dodecil Sulfato
SDS-PAGE	-Gel de poliacrilamida com SDS
SFB	-Soro Fetal Bovino
SVC	-Sobrenadante do Veneno Centrifugado
TE	-Solução tampão Tris-HCl 10 mmol.L ⁻¹ ; EDTA 1 mmol.L ⁻¹ , pH 8,0
TFA	-Ácido Trifluoracético
Tm	-Melting Temperature (Temperatura de desanelamento)
TNF-α	-Tumor Necrosis Factor alfa (Fator de Necrose Tumoral alfa)
TOTG	-Teste Oral de Tolerância à Glicose
TS	-Escorpião Tityus serrulatus
TsTX-V	-Tityustoxina cinco
U	-Unidade de atividade enzimática
UFMG	-Universidade Federal de Minas Gerais
UNICAMP	-Universidade Estadual de Campinas
USP	-Universidade de São Paulo
V	-Volt - Unidade de tensão elétrica
VEGF	-Vascular Endothelial Growth Factor (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)
VPLG	-Vendor-Purified Low G (Alginato Comercial Purificado, baixo conteúdo de G)
VPMG	-Vendor-Purified Medium G (Alginato Comercial Purificado, médio conteúdo de G)
WHO	-World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

nm	-nanômetro
nM	-nanomolar
μCi	-microCurie
μg	-micrograma
μL	-microlitro
μm	-micrometro
IL-10	-Interleucina dez
IL-6	-Interleucina seis
GLP-1	-Glucagon-like peptide-1 (peptídeo semelhante ao glucagon 1)
IL-1β	-Interleucina um beta
IL-1α	-Interleucina um alfa
MCP-1	-Monocyte Chemotactic Protein-1 (Proteína Quimiotática de Monócitos 1)
PDX-1	-Pancreatic and Duodenal Homeobox 1
36B4	-Fosfoproteína ribossomal ácida

IV. RESUMO

Campos-Lisbôa, A.C.V. Ilhotas pancreáticas humanas viáveis para o transplante através do aumento da massa de células e do imunisolamento com microcápsulas biocompatíveis. **2008. Número de páginas do trabalho (121p). Tese - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.**

O transplante de ilhotas pancreáticas humanas representa uma estratégia promissora para a cura do diabetes mellitus tipo 1 (DM1), mas a aplicação a todos os pacientes diabéticos ainda é impraticável devido à limitada disponibilidade de ilhotas ou células β e à necessidade de utilização de drogas imunossupressoras pelo paciente transplantado.

O tratamento com imunossupressores após o transplante de ilhotas pode ser abolido quando se realiza o microencapsulamento das ilhotas pancreáticas. Neste trabalho investigou-se um novo biomaterial, Biodritina[®] (alginato/sulfato de condroitina) adequado ao microencapsulamento que gelifica na presença de íons de cálcio ou bário. A biocompatibilidade das microcápsulas tem sido avaliada segundo o grau de pureza do alginato utilizado na sua confecção. Amostras de alginato comercial purificado foram analisadas, comprovando-se a presença de impurezas (polifenóis, endotoxinas, proteínas) em níveis elevados, que impedem sua aplicação clínica. Optou-se, portanto pela utilização do alginato comercial ultrapurificado nos experimentos descritos neste trabalho. Das formulações de biomateriais avaliadas, as microcápsulas de bário-Biodritina apresentaram o melhor desempenho em testes de estabilidade físico-química. Estas microcápsulas mantiveram sua morfologia e estabilidade estrutural após permanecerem 30 dias na cavidade peritoneal de camundongos, conforme demonstrado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Análises histológicas mostraram que microcápsulas de bário-Biodritina explantadas, não possuíam adesão celular em sua superfície. Estudos de permeabilidade demonstraram que o tamanho médio dos poros das microcápsulas de bário-Biodritina permite passagem de proteínas de até 70 kDa, enquanto os poros daquelas de cálcio-Biodritina comportam proteínas de até 100 kDa. Experimentos de co-

cultivo de macrófagos peritoneais com ilhotas de rato microencapsuladas demonstraram uma capacidade imunoprotetora maior das microcápsulas de bário-Biodritina em relação às de cálcio-Biodritina, sendo que as primeiras não ativaram os macrófagos. A manutenção da viabilidade e função de ilhotas humanas microencapsuladas com bário-Biodritina foi confirmada através de ensaio funcional *in vitro*, no qual ilhotas microencapsuladas apresentaram níveis de secreção de insulina idênticos aos de ilhotas nuas. A prova de conceito do biomaterial foi realizada através do implante de ilhotas humanas microencapsuladas em bário-Biodritina em camundongos com DM1 induzido por estreptozotocina. A hiperglicemia desses animais foi corrigida pelo implante por um período superior a 60 dias, durante os quais o teste oral de tolerância à glicose mostrou-se normal, demonstrando completa funcionalidade e eficiência das ilhotas microencapsuladas com bário-Biodritina.

Partindo de observações de que animais inoculados com a peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* apresentam nesidioblastose, foi realizado o fracionamento do veneno por HPLC de fase reversa e 24 frações obtidas foram submetidas a ensaios de proliferação celular através da incorporação de ³H-timidina em células de insulinoma de rato RINm5F. Uma dessas frações foi capaz de induzir a proliferação das células RINm5F e quando aplicada a ilhotas humanas isoladas, elevou o índice de secreção de insulina e induziu um aumento da expressão dos mRNAs de insulina e PCNA.

Portanto, demonstrou-se que o biomaterial bário-Biodritina possui as características necessárias para microencapsular células/ilhotas com eficiência e que a “fração ativa” do veneno do escorpião *T. serrulatus* induz proliferação de células RINm5F e melhora a secreção de insulina de ilhotas humanas.

Palavras-chave: Diabetes mellitus tipo 1; Microencapsulamento de ilhotas; Veneno de escorpião; Transplante de ilhotas; Proliferação de células beta; Ilhotas pancreáticas de Langerhans.

V. ABSTRACT

Campos-Lisbôa, A.C.V. Obtention of human pancreatic islets for transplantation through an increase in cell mass and an immunoisolation with biocompatible microcapsules. **2008. Número de páginas do trabalho (121p). PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.**

Islet transplantation has been proposed as a promising therapeutic strategy for the cure of type 1 diabetes mellitus (DM), however, its application to all diabetic patients is still not possible due to the limited source of islets or β cells and to the need of an immunosuppressive treatment of the recipient to avoid graft rejection.

The use of immunosuppressors may be abolished when pancreatic islets are microencapsulated prior to transplantation. Here, we investigated the use of a new biomaterial suitable for cell microencapsulation, namely, Biodritin[®], composed of alginate and chondroitin sulphate, which is capable of gelation in the presence of barium or calcium ions. Microcapsules biocompatibility has been evaluated according to the purity of the alginate used in its production. Samples of purified commercial alginate were analyzed, but the high levels of contaminants (proteins, endotoxins and polyphenols) detected prevented its use in clinical applications. On the other hand, also commercially available ultrapure alginate fulfills the requirements for this application, therefore, this biomaterial was chosen for our experiments. Among the different biomaterial formulations evaluated, barium-Biodritin microcapsules displayed the best performance in the physico-chemical tests. Scanning electronic microscopy revealed that barium-Biodritin microcapsules maintained their morphology and structural stability after being implanted for 30 days in the peritoneal cavity of mice. No cellular adhesion was detected on the surface of explanted barium-Biodritin microcapsules by histological analysis. Permeability studies determined the medium pore size of barium-Biodritin microcapsules, which allows proteins of up to 70 kDa to pass through the biomaterial, while calcium-Biodritin pores accommodate proteins of up to 100 kDa. Co-culture of

peritoneal macrophages with microencapsulated rat islets, revealed a superior immunoprotective capacity of barium-Biodritin microcapsules, which were capable of protecting the islets with no macrophage activation. Microencapsulated and naked human islets presented identical insulin secretion levels upon stimulation with glucose *in vitro*, confirming that barium-Biodritin microencapsulation maintains the function and viability of human islets. Proof-of-concept experiments in which barium-Biodritin microencapsulated human islets were implanted into chemically-induced diabetic mice, showed that these animals maintained normal blood glucose levels for more than 60 days, during which oral glucose tolerance tests were normal, demonstrating the complete functionality and efficiency of barium-Biodritin microencapsulated human islets.

From the observation that animals inoculated with the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* presented nesidioblastosis, we decided to fractionate the venom to isolate the active principle. The venom was fractionated by reversed phase HPLC and 24 fractions were obtained and submitted to cellular proliferation assays, in which rat insulinoma RINm5F cells evaluated for ³H-timidina incorporation. One of these fractions was capable of inducing cell proliferation and was also applied to isolated human islets. Treated islets presented a higher insulin secretion index and an increase in insulin and PCNA mRNA expression.

In conclusion, we demonstrated that the barium-Biodritin biomaterial possesses all characteristics required for efficient cell/islet microencapsulation and that the active fraction of *Tityus serrulatus* venom induces the proliferation of RINm5F cells and improves insulin secretion in human islets.

Keywords: Type 1 Diabetes mellitus; Islet microencapsulation; Islet transplantation, Scorpion venom; Beta cell proliferation; Pancreatic islets of Langerhans.

1. Introdução

1.1. Diabetes mellitus tipo 1

Desde a primeira descrição clínica da doença, no século I d.C., o diabetes mellitus (DM) motivou sábios e cientistas por todo o Mundo a buscar um tratamento para esta enfermidade. Passados dezenove séculos, Leonard Thompson tornou-se o primeiro paciente diabético do tipo 1 a receber uma injeção de insulina, apresentando uma drástica melhora clínica e representando um marco na história da Medicina (Mathias and Brendel, 2008). Ainda no século XX, dois prêmios Nobel foram concedidos aos cientistas responsáveis por esse grande avanço: Frederick Banting e John Macleod, que receberam o Prêmio Nobel de Medicina de 1923 pela descoberta da insulina como o agente terapêutico para o diabetes. Frederick Sanger recebeu o Prêmio Nobel de Química de 1958, em reconhecimento ao seu trabalho no qual seqüenciou totalmente a insulina, ampliando os horizontes para o tratamento do DM com o advento da tecnologia do DNA recombinante (Mathias and Brendel, 2008).

Entende-se por DM um distúrbio crônico caracterizado por um comprometimento do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, bem como pelo desenvolvimento tardio de complicações vasculares e neuropáticas. Esta síndrome metabólica está diretamente relacionada a uma deficiência absoluta ou relativa de insulina. A insulina ocupa uma posição única entre os hormônios que controlam o metabolismo de carboidratos em animais, sendo essencial para o controle do nível de glicose no sangue. A insulina (do latim *insula*, ilha) é produzida nas células β das ilhotas de Langerhans presentes no pâncreas. As ilhotas de Langerhans representam aproximadamente 1 a 2% da massa total do pâncreas humano, sendo compostas, principalmente, por cinco tipos celulares: células β (produtoras de insulina), células α (produtoras de glucagon), células δ (produtoras de somatostatina), células PP (produtoras de polipeptídeo pancreático) e células ϵ (produtoras de grelina) (**Figura 1**).

Do ponto de vista clínico, a maioria dos pacientes diabéticos é classificada em dois grupos: diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003). O DM1 ocorre secundariamente à destruição auto-imune das células β produtoras de insulina. Classicamente, manifesta-se na infância e adolescência e cursa com deficiência completa de insulina. O DM2 representa uma constelação heterogênea de doenças nas quais a resistência periférica à insulina coexiste com a diminuição da secreção de insulina (Bennett and Plum, 1997).

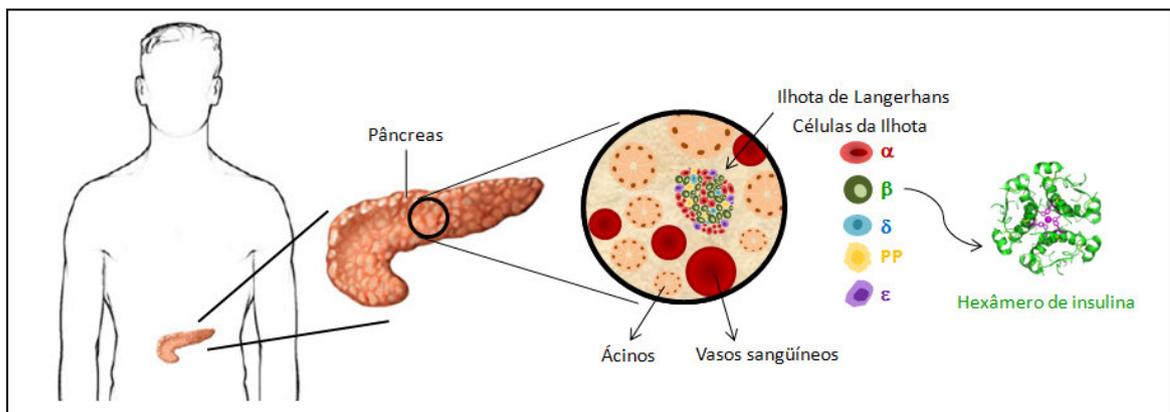


Figura 1: Figura esquemática representando os principais componentes do pâncreas: ácidos, vasos sanguíneos e ilhotas de Langerhans e sua estrutura celular. À direita, desenho esquemático da estrutura tridimensional de um hexâmero de insulina coordenado pelo íon zinco (esfera roxa). Esta é a forma de armazenamento da insulina dentro dos grânulos de secreção das células beta.

No Mundo, o DM acomete cerca de 250 milhões de pessoas, destes 10% correspondem ao DM1 (WHO, 2007). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes, a prevalência de DM1 e DM2 na população brasileira entre 30 e 69 anos, é de 7,6% (OPAS, 2007). O Brasil está classificado como um dos dez países com a maior prevalência da doença, juntamente com a Índia, China, EUA, Indonésia, Rússia, Japão, Paquistão e Itália (WHO, 2007). Os gastos públicos diretos e indiretos para o tratamento do DM representam entre 5 a 15% dos gastos totais com doenças em saúde no Mundo (Merani and Shapiro, 2006).

O tratamento do DM envolve mudanças no estilo de vida e intervenções farmacológicas com insulina (DM1 e alguns DM2) ou agentes hipoglicemiantes (DM2). Na seqüência deste texto será enfatizado o tratamento para DM1, que é o foco desta Tese. Existem inúmeras apresentações comerciais de insulina que diferem, principalmente, nas suas propriedades farmacodinâmicas e

farmacocinéticas. O tratamento intensivo com insulina raramente restabelece a homeostasia da glicemia para os níveis observados em indivíduos não diabéticos. Além disso, sabe-se que as conhecidas complicações secundárias do diabetes, como nefropatia, retinopatia, neuropatia e problemas cardiovasculares, estão diretamente relacionadas com os desequilíbrios dos níveis glicêmicos nos pacientes. Atualmente, com o avanço das técnicas de transplante e cultivo celular, muitos trabalhos vêm sendo direcionados para o transplante de tecido produtor de insulina. Assim, torna-se possível acreditar que a cura para a doença está na reposição da massa de células β , aliada ao controle da autoimunidade, causadora do DM1.

2. O transplante de pâncreas

Os primeiros transplantes de pâncreas, órgão total, em pacientes DM1 foram realizados por Kelly e Lilleheie em 1966. No entanto, os resultados não foram promissores: menos de 3% dos transplantes apresentaram sucesso dentro do período de um ano, tendo sido observada uma taxa de mortalidade de 60% (Lillehei et al., 1969a; Lillehei et al., 1969b). As altas doses de esteróides utilizadas na terapia imunossupressora foram apontadas como a causa principal do insucesso. Contudo, foi dado início à batalha em busca da cura do DM1 e o transplante do órgão total apresentou avanços consideráveis, principalmente quando associado ao transplante renal. Somente no ano de 1995, 7.505 transplantes pancreáticos foram realizados, apresentando taxas de 78% de sobrevida do enxerto e 92% de sobrevida do paciente (Sutherland et al., 2001). Nos grandes centros, a maioria dos pacientes transplantados alcança a independência de insulina por muitos anos. Infelizmente, devido à necessidade de imunossupressão prolongada, o transplante de pâncreas é priorizado para um grupo seletivo de pacientes, sobretudo para aquele previamente transplantado com rim. Nestes pacientes a homeostasia propiciada pelo pâncreas pode ser crucial na manutenção da funcionalidade renal.

3. O transplante de ilhotas pancreáticas

Uma alternativa estratégica ao transplante de pâncreas órgão total foi idealizada e realizada por Paul Eston Lacy em 1972, onde apenas as ilhotas de Langerhans, separadas da parte exócrina do

pâncreas, foram infundidas na veia porta de roedores diabéticos, revertendo a hiperglicemia desses animais (Ballinger and Lacy, 1972). Em 1990, David Scharp e colaboradores obtiveram como resultado um mês de reversão de diabetes num paciente portador de DM1 transplantado com ilhotas humanas. Entretanto, limitações técnicas nos procedimentos de isolamento de ilhotas e nos protocolos de imunossupressão impediram a ampla aplicação deste tratamento (Scharp et al., 1990). Entre os anos 1990 e 2000, 450 pacientes portadores de DM1 receberam transplante de ilhotas humanas e apenas 8% destes ficaram livres de insulina (Merani and Shapiro, 2006). Até que, no ano 2000, as esperanças nesta tecnologia foram reavivadas pelo grupo de pesquisadores da Universidade de Alberta, Edmonton, liderado pelo Dr. James Shapiro. Este grupo apresentou um estudo onde sete pacientes DM1 transplantados com ilhotas humanas permaneceram insulino-independentes por um ano (Shapiro et al., 2000). O sucesso foi alcançado graças à aplicação de um conjunto de diretrizes experimentais conhecido como o *Protocolo de Edmonton*, que incluía: a) um regime de imunossupressão livre de esteróides, b) a seleção de pacientes DM1 com mais higidez (não possuíam falhas renais, nem oscilações consideráveis nos níveis glicêmicos), c) isolamento de ilhotas na ausência de proteínas xenogênicas¹ e d) infusão de uma quantidade considerável de massa de células β (mínimo de 10.000 IEQ² por quilograma de massa corpórea foi administrado por paciente em duas ou mais infusões) (Shapiro et al., 2000). Após o *Protocolo de Edmonton*, uma quantidade exponencial de testes clínicos com transplantes de ilhotas aconteceu por todo o Mundo, mas dentro de um período de cinco anos, apenas 10% dos pacientes transplantados permaneceram livres de insulina (Ryan et al., 2005).

Entretanto, a independência de insulina exógena pode ser o último objetivo destes pacientes transplantados. O restabelecimento dos níveis de peptídeo-C³, liberado pelas células β , e a redução

¹ Xenogênico: entre indivíduos de espécies diferentes.

² IEQ: da sigla em inglês *islets equivalents* – unidade que normaliza as ilhotas para o tamanho de 150 μm .

³ Peptídeo-C: peptídeo liberado quando a pró-insulina é clivada em insulina, é armazenado nos grânulos de secreção das células β . É eliminado na corrente sanguínea em quantidades eqüimolares às da insulina.

do nível de hemoglobina glicada⁴, apresentaram efeitos benéficos nos pacientes transplantados, mesmo com necessidade de administração de insulina exógena. Já foi demonstrado que o peptídeo-C possui efeito biológico em pacientes diabéticos, relacionado com melhorias na microcirculação, permeabilidade vascular, atividade da Na⁺K⁺ATPase e condutividade nervosa (Ballinger and Lacy, 1972; Fiorina et al., 2003; Ido et al., 1997; Steiner and Rubenstein, 1997; Wahren et al., 1994).

Ao confrontar os tratamentos, o transplante de ilhotas apresenta-se aparentemente vantajoso frente ao transplante de pâncreas órgão total, pelas seguintes razões: a) consiste em uma menor massa de tecido implantado, implicando numa cirurgia menos invasiva, com um risco de complicações vinte vezes menor em relação ao transplante órgão total (Sutherland, 2003); e b) permite recorrer a um banco de tecidos. Em contrapartida, o transplante de pâncreas órgão total propicia um melhor ambiente para a regeneração das células β , apresentando resultados com maior tempo de sobrevida do enxerto. Porém, ambas as estratégias permanecem distantes de se tornar o tratamento padrão para pacientes DM1 devido à limitada fonte de órgãos transplantáveis e à necessidade do uso de imunossupressores.

A imunossupressão geralmente cursa com efeitos colaterais indesejáveis como náuseas, ulcerações orais, diarreia, constipação, fadiga, anemia, edema, tumor, acne, hipertensão, dislipidemia e neutropenia, predispondo o paciente a infecções oportunistas (Taylor et al., 2005). Além disso, estudos recentes demonstraram que alguns imunossupressores, adotados tanto pelo *Protocolo de Edmonton* quanto em cirurgias de pâncreas órgão total, apresentam efeitos deletérios sobre as células β das ilhotas de Langerhans e sobre a função renal (Laugharne et al., 2007; Maffi et al., 2007). Portanto, o uso de imunossupressores nos tratamentos com transplante órgão total ou com ilhotas fica restrito àqueles pacientes com complicações severas do DM1, como o diabetes

⁴Hemoglobina glicada (ou “glicosilada”): é dosada em pacientes diabéticos e representa a porcentagem de hemoglobina que reagiu e se ligou à glicose no sangue e, por isso, permite registrar os níveis de glicemia que o paciente apresentou durante os últimos dois ou três meses.

hiperlábil⁵ (Nielsen et al., 2002; Tattersall, 1977). Outro possível candidato ao transplante é o paciente que já recebeu um transplante renal e por isso se encontra sob um protocolo de imunossupressão (Robertson et al., 2000). Além disso, o uso de imunossupressores também é desfavorecido pelo seu elevado custo. Como alternativa ao uso destas drogas, esta Tese se apóia na tecnologia do microencapsulamento de ilhotas buscando melhorias necessárias ao sucesso desta aplicação.

1.4. Microencapsulamento de ilhotas

Na busca da imunoproteção de células transplantadas, em 1964, Chang propôs a idéia de envolver estas células com membranas ultrafinas de polímeros, o que introduziu na literatura científica os termos “células artificiais” e bioencapsulamento (Chang, 1964). O bioencapsulamento consiste numa barreira imunoprotetora para as células. O princípio metodológico visa revestir a ilhota (ou célula) com uma membrana artificial, semipermeável, que preserve sua integridade morfológica e funcional (Calafiore and Basta, 1995). A membrana deve ser um obstáculo físico que impeça a entrada de anticorpos, linfócitos e outras células do sistema imune. Entretanto, deve ser permeável à insulina e a substâncias de baixo peso molecular, como nutrientes, eletrólitos, oxigênio e glicose (Calafiore, 1997; Lanza et al., 1993; Lanza et al., 1991; Lanza et al., 1995) (**Figura 2**).

Em 1980, Lim e Sun aplicaram esta técnica para encapsular ilhotas de Langerhans. Passados vinte e quatro anos, Korbitt e colaboradores (2004), conseguiram, pela primeira vez, reverter o DM1 em ratos após o implante de ilhotas pancreáticas humanas, sem o uso de imunossupressão (Korbitt et al., 2004). A normoglicemia foi sustentada por várias semanas. Desde então, foi intensificada a busca de conhecimentos científicos e tecnológicos necessários ao desenvolvimento desta metodologia.

Existem três principais maneiras de realizar o encapsulamento: sistema de manobra vascular, macroencapsulamento e microencapsulamento (Mullen et al., 2000). No primeiro, as células ficam

⁵ Diabetes hiperlábil: indivíduo diabético que pela frequência/intensidade dos episódios de hipo/hiperglicemia, se vê impedido de ter um ritmo de vida no qual possa desempenhar as atividades normais do cotidiano, independentemente da causa da hiperlabilidade (Tattersall, 1997).

muito próximas da circulação sanguínea, facilitando a troca de metabólitos. No entanto, o alto risco de trombose, associado ao alto risco do procedimento cirúrgico, não permitiram sua aplicação em seres humanos (Maki et al., 1996). O macroencapsulamento consiste em envolver o enxerto em macrodispositivos em forma de fibras, folhas ou esferas. Os resultados destes dispositivos implantados demonstram forte associação com fibrose, além de limitar a difusão de nutrientes, oxigênio e eletrólitos ao tecido implantado, levando à necrose dos mesmos (Suzuki et al., 1998; Uludag et al., 2000). Já no microencapsulamento, a forma esférica e o pequeno tamanho do dispositivo oferecem uma razão superfície/volume e uma capacidade de difusão, ótimas, quando comparadas com os parâmetros correspondentes nas macrocápsulas. Outra vantagem sobre os demais dispositivos é que, se uma microcápsula for danificada, isto não implicará na perda de todo o implante, uma vez que existem várias microcápsulas contendo as células de interesse.

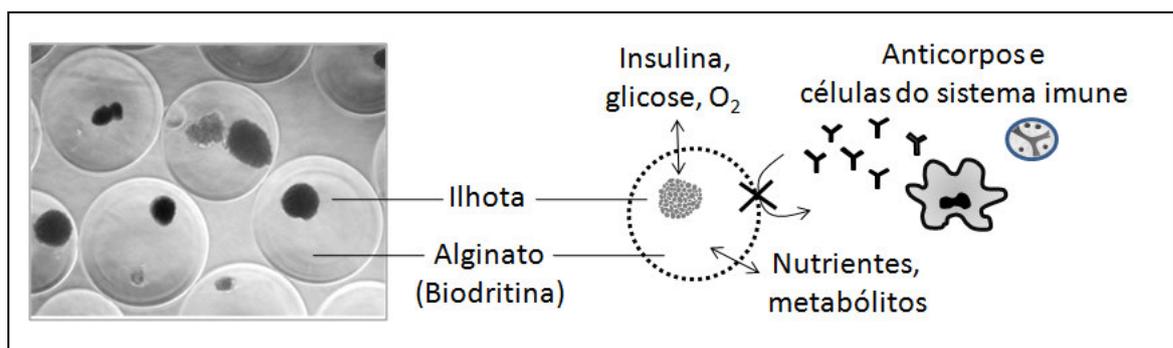


Figura 2: À esquerda, fotografia de microcápsulas de Biodritina® (alginato + sulfato de condroitina) envolvendo ilhotas de Langerhans humanas. À direita, representação esquemática da função da microcápsula: permitir livre trânsito de nutrientes e metabólitos e impedir a entrada de anticorpos e células do sistema imune.

Os materiais utilizados para o microencapsulamento apresentam variações quanto à sua composição. Dois tipos principais de materiais já foram estudados: polímeros termoplásticos e polímeros de hidrogel.

Dentre os polímeros termoplásticos estudados estão os poli(hidroximetil-acrilato-metil metacrilato)(HEMA-MMA), copolímeros de acrilonitrila (AN69) e polietilenoglicol (PEG). Estes polímeros apresentam vantagens quanto à estabilidade da cápsula após o implante. No entanto, o uso de solventes orgânicos, necessários para a sua solubilização, interfere na função celular (de Vos et al., 2002a).

Já os hidrogéis apresentam vantagens para o microencapsulamento celular. A confecção de microcápsulas com estes materiais pode ser realizada em condições fisiológicas. Além disso, esses materiais possuem duas características desejáveis à biocompatibilidade de uma membrana: a hidrofília e a maleabilidade. A característica hidrofílica faz com que a tensão superficial entre os fluidos e os tecidos adjacentes seja mínima, reduzindo a adsorção de proteínas e adesão celular, indesejáveis ao microencapsulamento por restringirem a difusão de oxigênio e nutrientes. Já a maleabilidade dos hidrogéis amortiza os eventos de irritação mecânica aos tecidos adjacentes (de Vos et al., 2002a). Dentre os hidrogéis estudados, como alginato, quitosana e agarose, o material que melhor se enquadra aos padrões necessários a um biomaterial ideal é o alginato.

O alginato detém as maiores vantagens, uma vez que: a) não interfere com a função das ilhotas (de Haan et al., 2003), b) a confecção das cápsulas ocorre em condições fisiológicas (temperatura ambiente, pH fisiológico e soluções isotônicas) e c) permanece estável por anos em pequenos e grandes animais, incluindo o ser humano (Soon-Shiong et al., 1994). O alginato é um polissacarídeo encontrado tanto na matriz intercelular de algas marrons quanto recobrimo, extracelularmente, algumas espécies de bactérias (Moe et al., 1995). Os alginatos são polímeros lineares não-ramificados que contêm os resíduos de ácido 1,4- β -D-manurônico (M) e ácido 1,4- α -L-gulurônicos (G). Esses resíduos estão ligados em blocos de homopolímeros de M (M-M-M), homopolímeros de G (G-G-G) e heteropolímeros MG, podendo ser alternados (M-G-M-G) ou não. A proporção e a distribuição desses dois monômeros diferem segundo a fonte do alginato e determinam importantes propriedades físico-químicas para sua aplicação (**Figuras 3-A e 3-B**).

As clássicas microcápsulas de alginato são preparadas pela extrusão da mistura de células suspensas em uma solução de alginato de sódio através de um gerador de gotas. Microgotas são coletadas em uma solução de íons divalentes, como cálcio ou bário, se tornando microesferas de gel contendo células em seu interior.

A escolha pelo íon mais adequado está atrelada à composição do alginato em estudo, segundo a proporção M:G. Os íons divalentes estabelecem ligações iônicas com as carboxilas presentes nos

blocos G (homopolímeros G-G-G) e nos blocos alternados MG (MG-MG ou MG-GG) levando à formação de estruturas denominadas “caixas de ovos” (Donati et al., 2005)(Figuras 3-C, -D e -E). O íon cálcio está freqüentemente associado ao uso de policátions para a confecção de uma membrana imunoprotetora estável. Já os íons bário estabelecem ligações iônicas mais fortes do que os íons cálcio e, por isso, as cápsulas confeccionadas com bário são mais resistentes e dispensam o uso de policátions (de Vos et al., 2006; Thu et al., 1996b; Zimmermann et al., 2005).

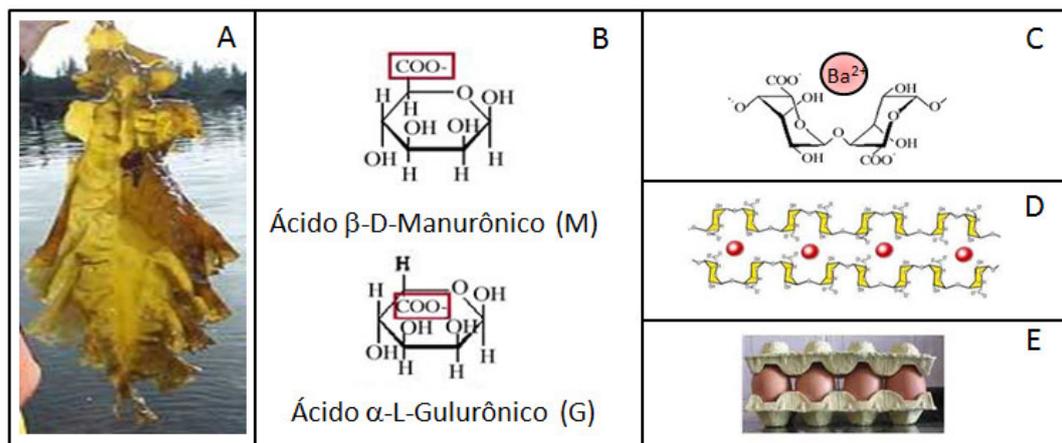


Figura 3: A – Alga marrom, principal fonte de alginato. B – Estrutura dos monômeros do alginato, M e G. C – Representação da ligação iônica entre o íon bário e a carboxila do resíduo G. D – Representação da coordenação de íons divalentes com as carboxilas dos resíduos G nas cadeias de alginato (G-G-G), que resulta na gelificação do material. E – Analogia da figura D com a estrutura de “caixas de ovos”.

As cápsulas de alginato gelificadas com íons cálcio necessitam de um revestimento com policátions (poli-L-lisina, poli-L-ornitina, dentre outros) para adquirirem porosidade e estabilidade mecânica ideais ao implante (de Vos et al., 2006). No entanto, esses policátions precisam ser recobertos com alginato, pois a exposição dos seus resíduos leva à adesão de células inflamatórias na superfície da cápsula (Clayton et al., 1991; King et al., 2001). Estudos recentes nos quais as propriedades físico-químicas das cápsulas foram avaliadas com mais detalhes (Espectroscopia Roto-eletrônica de Raios-X – XPS, Espectroscopia Infravermelha de Transformada de Fourier – FT-IR, Microscopia Confocal e Imagem de ToF-SIMS) demonstraram que a cobertura com alginato sobre os policátions não é eficiente, deixando expostos resíduos positivos na sua superfície (de Vos et al., 2002b; Strand et al., 2003; Tam et al., 2005; van Hoogmoed et al., 2003). Estes achados trouxeram implicações muito sérias sobre a biocompatibilidade destas cápsulas, comprometendo a sobrevida

do implante e apontando para o uso do íon bário para obtenção de microcápsulas estáveis e biocompatíveis.

Nesta Tese, foi avaliado o biomaterial denominado Biodritina[®], desenvolvido na década de 90 pelo brasileiro Prof. Dr. Marcos Mares Guia e patenteado pela empresa *Biommm Inc.* (sede em Miami, EUA) (Mares-Guia and Ricordi, 1997). A Biodritina[®] é um heteropolissacarídeo composto por alginato e sulfato de condroitina⁶, o que associa a porosidade desejável e a estabilidade mecânica à biocompatibilidade, tanto do alginato, como do sulfato de condroitina. Os sulfatos de condroitina utilizados na formulação da Biodritina[®] foram os sulfatos de condroitina -4 e -6. A justificativa desta escolha está amparada nas suas conhecidas características de biocompatibilidade: distribuição ubíqua nos tecidos animais (componente da matriz extracelular); por não ser imunogênico e por sua aparente inabilidade em se ligar a receptores ou tipos celulares conhecidos (Mares-Guia and Ricordi, 1997). O desenvolvimento da Biodritina[®] como um biomaterial aplicável à terapia celular vem ocorrendo através da parceria entre o Núcleo de Terapia Celular e Molecular – NUCEL, situado no Instituto de Química da USP, o *Diabetes Research Institute* da Faculdade de Medicina da Universidade de Miami (EUA) e as empresas Biommm Inc. (EUA) e CellProtect Biotechnology (Brasil).

1.5. A biocompatibilidade das microcápsulas

“A biocompatibilidade é freqüentemente definida como a habilidade funcional de um biomaterial frente à resposta do receptor para uma aplicação específica” (Williams, 1987). Essa definição é facilmente compreensível quando se consideram dispositivos artificiais como próteses de quadril, joelhos e implantes dentários. Entretanto, passa a ser uma definição um tanto complicada quando aplicada a sistemas bioartificiais que envolvem tecnologia de imunisolamento. Em dispositivos de imunisolamento não existe apenas a interação entre o biomaterial e o tecido adjacente externo (ambiente do receptor), mas também entre o biomaterial e o tecido do doador, no interior da cápsula. Apesar desse último aspecto não ser coberto pela definição clássica, deve-se

⁶ Sulfato de Condroitina: é um importante componente estrutural de cartilagens e provê grande parte da sua resistência e compressão. É um glicosaminoglicano (GAG) sulfatado composto por cadeias alternadas dos açúcares sulfatados, N-acetilgalactosamina e ácido glucurônico.

considerar que a verdadeira biocompatibilidade para esta aplicação (imunisolamento) implica em se obter uma sobrevida prolongada do tecido implantado (de Vos et al., 2006).

A biocompatibilidade da microcápsula é definida por três propriedades: composição do alginato, pureza do alginato e integridade da microcápsula. Escolhido o alginato com alto conteúdo de G e os íons bário para sua confecção, a biocompatibilidade da microcápsula permanece comprometida se o material em uso contiver impurezas. Por ser extraído de algas marinhas marrons, o alginato contém alto conteúdo de impurezas, como endotoxinas, polifenóis e proteínas. Vários protocolos para a eliminação destas impurezas já foram testados ao longo dos últimos anos (Dusseault et al., 2005). A maioria deles não alcançou sucesso, permanecendo a observação de resposta inflamatória ao material implantado (de Vos et al., 2002b). Dada a necessidade da criação de uma central produtora de alginato de alta qualidade, em 2004, a empresa *NovaMatrix/FMC* colocou no mercado um alginato ultrapurificado (Pronova®) atendendo às exigências necessárias para o grau clínico (<https://www.novamatrix.biz>).

Já a biocompatibilidade relacionada à integridade da microcápsula é dependente de suas propriedades físico-químicas. A produção de microcápsulas irregulares ou com baixa estabilidade física e osmótica pode provocar uma reação inflamatória fatal para as células presentes em seu interior. Qualquer deformidade na superfície da cápsula, independente do conteúdo celular, ocasiona seu reconhecimento pelas células de defesa e fibroblastos do receptor. A adesão destas células à superfície das cápsulas altera a sua permeabilidade a nutrientes e oxigênio. Além disso, as células de defesa podem liberar fatores humorais pró-inflamatórios, menores que anticorpos, como as citocinas, aptas a atravessar a membrana da cápsula e danificar as células em seu interior (de Groot et al., 2004).

Em contrapartida, uma vez implantadas, as cápsulas estão sujeitas a estresses físicos como, por exemplo, a compressão e a estresses osmóticos, pela eventual troca de íons sódio por cálcio ou bário. Esses estresses podem levar à ruptura das microcápsulas e conseqüente exposição de antígenos, e ao ingresso de moléculas mediadoras da reação imunológica (de Vos et al., 2002c). Por

isso, as microcápsulas implantadas devem apresentar ausência de deformidades em sua superfície e apresentar uma estrutura resistente aos eventuais estresses relacionados anteriormente.

Hoje, o microencapsulamento celular é visto como uma tecnologia promissora, não apenas no tratamento de DM1, mas também de outras doenças, incluindo anemias (Koo and Chang, 1993), nanismo (Chang et al., 1993), hemofilia B (Hortelano et al., 1996; Liu et al., 1993), nefropatias (Cieslinski and David Humes, 1994; Prakash and Chang, 1996), hepatopatias (Wong and Chang, 1986), insuficiências hipofisária (Aebischer et al., 1986) e do sistema nervoso central (Aebischer et al., 1994), além de outras enfermidades, como câncer (Xu et al., 2002). No entanto, essa tecnologia vem sendo testada com limitado sucesso em estudos clínicos pilotos em pacientes sem imunossupressão no tratamento de DM1 (Calafiore et al., 2006; Elliott et al., 2007; Soon-Shiong et al., 1994) e hipoparatiroidismo (Hasse et al., 1997). É válido lembrar que os testes clínicos com ilhotas microencapsuladas em pacientes portadores de DM1 tiveram seu início quando o conhecimento da estrutura das microcápsulas e suas propriedades relacionadas à biocompatibilidade eram ainda insuficientes. Por isso, os procedimentos utilizados não foram ideais, incluindo o uso microcápsulas de alginato revestidas com policátions e íons cálcio para gelificação. Os resultados desses testes clínicos, publicados em 2006, são promissores; porém, claramente evidenciam a necessidade de aprimoração da técnica. Os pacientes apresentaram um enxerto de ilhotas microencapsuladas funcional por aproximadamente um ano, com níveis detectáveis de peptídeo-C na corrente sanguínea, antes indetectáveis. Além disso, o consumo de insulina exógena declinou progressivamente, assim como o nível de hemoglobina glicada (Calafiore et al., 2006). Três grandes empresas também já iniciaram testes clínicos com ilhotas humanas encapsuladas em pacientes diabéticos: a ReNeuron, a Living Cell Technologies e a Novocell. No entanto, a informação disponível encontra-se apenas em *press-releases* das empresas, que informam que os testes clínicos foram bem-sucedidos (<http://www.reneuron.com>, <http://www.lctglobal.com> e <http://www.novocell.com>).

A ciência e a tecnologia por trás do microencapsulamento envolvem o desafio de convergir várias áreas do conhecimento, dentre elas: Medicina, Biologia Celular, Bioquímica, Imunologia,

Farmacologia, Química Orgânica, Físico-química, Ciência dos Materiais e Nanotecnologia. Aparentemente, a harmonia entre estas ciências, capaz de identificar e solucionar os principais entraves relacionados a esta tecnologia, teve seu início no começo deste século. Pode-se observar na literatura o surgimento de novos conceitos que têm originado importantes avanços no conhecimento básico do imunisolamento e nos fatores que determinam seu sucesso ou seu fracasso.

1.6. A resposta imune no transplante de ilhotas microencapsuladas

Conforme mencionado anteriormente, o DM1 resulta da destruição auto-imune das células β nas ilhotas pancreáticas. Essa destruição também é observada nas ilhotas transplantadas e representa uma importante causa da perda da função do enxerto, tanto de ilhotas não encapsuladas, como de pâncreas órgão total (Titus et al., 2000). Do ponto de vista do microencapsulamento, as cápsulas não só oferecem uma barreira física, impedindo a ativação do sistema imune dependente do contato célula-célula, como também, impedem a entrada de anticorpos provindos da auto-imunidade do DM1. Entretanto, deve-se chamar a atenção para reações imunes inevitáveis, relacionadas ao implante, às quais as cápsulas podem ser susceptíveis. Essas reações essencialmente envolvem a ativação não específica do sistema imune após os procedimentos cirúrgicos do transplante. Em decorrência destes procedimentos diversos mediadores inflamatórios são liberados, gerando aumento da quimiotaxia de leucócitos e conseqüente liberação de fatores bioativos tóxicos para as células implantadas (Tang and Eaton, 1999). Estes fatores são citocinas pró-inflamatórias como interleucina- 1β (IL- 1β) (Bendtzen et al., 1986), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interferon γ (IFN- γ) (Campbell et al., 1988). A resposta inflamatória evolui a seguir de acordo com a natureza do que foi implantado. No caso de ilhotas não encapsuladas inicia-se um processo de rejeição imune-mediado envolvendo vias diretas e indiretas de apresentação de antígenos⁷. Na via direta, as células apresentadoras de antígenos⁸ (APC), presentes nas ilhotas transplantadas, migram para os linfonodos do receptor e ativam células T neste sítio por apresentarem os antígenos do implante. As

⁷ Antígeno: é toda partícula ou molécula capaz de iniciar uma resposta imune, a qual começa pelo reconhecimento pelos linfócitos e cumula com a produção de um anticorpo específico.

⁸ Célula apresentadora de antígenos (APC): células que apresentam antígenos aos linfócitos T.

células T ativadas retornam à região do implante e o destroem (Sutton et al., 1989). Na via indireta, células dendríticas do próprio receptor migram para a região do implante e fagocitam peptídeos e proteínas do tecido doado, incluindo antígenos específicos das células β do doador. Estas células migram até os linfonodos, onde ativam linfócitos T, os quais, da mesma forma, retornam para destruir o implante (Hegre et al., 1984a; Hegre et al., 1984b).

Em se tratando de ilhotas microencapsuladas os eventos de migração de APC do implante para os linfonodos são barrados pela membrana da cápsula. Já o efeito da resposta imune via apresentação indireta de antígenos vem ganhando atenção nos últimos anos (Orive et al., 2006). Ao fagocitarem os antígenos, alogeneicos ou xenogeneicos, provindos do tecido encapsulado, as células APC iniciam a resposta imune via ativação de linfócitos B com produção de anticorpos tecido-específicos (Lanza and Chick, 1997a; Lanza and Chick, 1997b; Lanza and Chick, 1997c). A produção desses anticorpos não é considerada deletéria uma vez que a cápsula apresenta uma barreira física que impede a entrada dos mesmos. Em contrapartida, associada à produção de anticorpos está também a produção de citocinas com efeitos deletérios para o tecido transplantado. Não obstante, as citocinas são consideradas o calcanhar de *Achilles* das microcápsulas, por possuírem massa molecular entre 5 a 80 kDa e, portanto, serem permeáveis à microcápsula. Felizmente, esforços combinados têm mostrado que o efeito final das citocinas liberadas é dependente da combinação da presença de diferentes tipos de citocinas e das suas respectivas concentrações (de Groot et al., 2001; de Vos et al., 2004; King et al., 2000). Além disso, nos casos de xenotransplante foi evidenciado que as ilhotas xenogênicas possuem receptores de menor afinidade às citocinas (Piro et al., 2001).

1.7. Fontes alternativas de células β para o transplante

A obtenção de uma massa de células β adequada à demanda do transplante de ilhotas pancreáticas em pacientes DM1 representa um dos objetivos centrais na busca da cura desta doença, ao lado do desenvolvimento de uma tecnologia de microencapsulamento funcional. Contudo, como mencionado anteriormente, o número de doadores de órgãos é severamente limitado. Em vista disto, atualmente, existem duas linhas principais de pesquisas que buscam obter uma massa

adequada de células β transplantáveis: a utilização de ilhotas suínas e a expansão *in vitro* de células β isoladas de pâncreas humanos.

O uso de fontes alternativas, como ilhotas pancreáticas suínas, tem provocado um importante debate científico, social e ético. Até o momento há o relato de quatro testes clínicos em pacientes portadores de DM1 nos quais foram realizados transplantes de ilhotas suínas (**Tabela 1**) (Elliott et al., 2000; Groth et al., 1994; Valdes-Gonzalez et al., 2005; Wang et al., 2005). Além disso, existem duas comunicações verbais de testes clínicos em larga escala acontecendo na China e na Rússia (Rood and Cooper, 2006). Todos estes testes tiveram seu início antes do Comitê de Ética da Associação Internacional de Xenotransplante (IXA) publicar seus princípios acerca deste procedimento em humanos. Além disso, a eficácia do transplante de ilhotas suínas em primatas não-humanos, teste pré-clínico cientificamente e eticamente imprescindível antes da realização de testes em seres humanos, não foi ainda confirmada para longos períodos de sobrevivência do implante. Dada a possibilidade de transferência de microorganismos do porco para o paciente e, talvez para a comunidade como um todo, os testes clínicos envolvendo xenotransplante só deveriam ser autorizados pelas agências regulatórias após a existência de evidências claras de sucesso em modelos pré-clínicos em primatas não-humanos. Os agentes conhecidos, passíveis de transferência, são principalmente os retrovírus endógenos de porcos (PERV), mas também outros vírus, como citomegalovírus e vírus linfotrófico do herpes (Gunzburg and Salmons, 2000; Rood and Cooper, 2006). Felizmente, nos testes clínicos apresentados não houve eventos de infecção por PERV. No entanto, a morte das ilhotas implantadas após um período do implante pode ter levado também à destruição dos possíveis PERV nelas contidos (Rood and Cooper, 2006). Tem sido visto com muito bons olhos os esforços combinados em busca de “porcos limpos”, livres de microorganismos tóxicos aos seres humanos, para serem utilizados como fonte de ilhotas bem como de outros tipos celulares. Os testes realizados na Nova Zelândia e no México (**Tabela 2**) utilizaram porcos da Nova Zelândia crescidos em um ambiente livre de microorganismos, mas, mesmo assim, apresentavam a infecção por PERV. O IXA recomendou uma série de medidas a serem impostas aos pacientes que se submetem a estes testes, como a limitação de seu livre trânsito entre países. Todavia, a obtenção de

“porcos limpos” tem apresentado avanços consideráveis, em um esforço combinado da empresa *Spring Point Project*, em Minnesota. Com o apoio do *Diabetes Research & Wellness Foundation*⁹ (DRWF) e supervisão colaborativa do FDA⁹, a empresa pretende iniciar testes clínicos em pacientes portadores de DM1 aprovados pelo FDA ainda em 2008 (<http://www.springpointproject.org>).

Tabela 1: Testes clínicos de transplante de ilhotas suínas em pacientes portadores de DM1.

Ref.	País	Ilhota suína	Recipiente (n)	Sítio de implante	n° de ilhotas (ICC ^a /NPI ^b)	Uso IMN ^c	Resultados
Groth, 1944	Suécia	ICC	Grupo A:2 Grupo B:8	A:ESR ^f B:CP ^g	A:200.000 e 410.000 B:330.000 - 1.020.000	Sim	A: Sem pep-C ^d . Infiltrado inflamatório no 21 ^o dia. B: Pep-C por 460 dias (n=4).
Elliot, 2007	NZ ^e	NPI	1	CP	1.000.000	Não	Citado no texto.
Valdez-Gozales, 2005	México	NPI	12	RS ^h em tubos de aço/teflon	14.000 - 21.000/kg	Não	Sem pep-C. Diminuição de insulina exógena por 4 anos para um n=6.
Wang, 2005	China	NPI	19	Artéria Intra-hepática	5 - 7.000.000	Sim	Com pep-C e diminuição de insulina exógena (1 ano, n=18)

^a ICC = *islets-like cell cluster* (agrupamento de células semelhante à ilhota); ^b NPI = *neonatal pig islet* (ilhota de porco neonato); ^c IMN = imunossupressores; ^d Pep-C = nível plasmático de peptídeo-C; ^e NZ = Nova Zelândia; ^f ESR = espaço subcapsular renal; ^g CP = cavidade peritoneal; ^h RS = região subcutânea.

Dos testes clínicos citados, apenas um utilizou a tecnologia de microencapsulamento. Foi o teste realizado na Universidade de Auckland na Nova Zelândia em conjunto com a empresa *Living Cell Technologies* (Elliott et al., 2007). O resultado apresentado foi semelhante aquele resultado apresentado pelo grupo do Dr. Ricardo Calafiore, na Itália (Calafiore et al., 2006). O paciente recebeu uma grande quantidade de ilhotas isoladas de porcos neonatos (15.000 IEQ por kg de massa corpórea), microencapsuladas em uma matriz de alginato-policátions-alginato gelificadas com íons cálcio. O paciente apresentou uma redução nos níveis de insulina exógena por 49 semanas, níveis de peptídeo-C detectáveis por 11 meses e nenhuma evidência de infecção pelo PERV, tendo sido monitorado por nove anos e meio após o implante (Elliott et al., 2007). A principal questão ética envolvendo o uso de xenotransplante microencapsulado está em assegurar que os pacientes sejam

⁹FDA: do inglês *U.S. Food and Drug Administration* é uma agência do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, responsável pela regulamentação e segurança de vários produtos como alimentos, medicamentos, vacinas, cosméticos, dentre outros.

submetidos a um procedimento que demonstre claramente a eficácia e principalmente a biossegurança, baseando-se em protocolos e procedimentos padronizados.

Como alternativa às ilhotas suínas vários grupos vêm trabalhando na busca por fatores indutores de proliferação *in vitro* de células β humanas. Contudo, este constitui um grande desafio clínico e científico dada a dificuldade em proliferar estas células sem que as mesmas percam seu fenótipo diferenciado.

Em um pâncreas adulto normal é observada uma baixa taxa de renovação de células β , de cerca de 2% (Finegood and Tzur, 1996) ou menos (Teta et al., 2005), que é responsável pela manutenção de uma massa de células adequada ao longo da vida do indivíduo. Esta taxa é acelerada em condições de demanda por insulina, como a gravidez (Sorenson and Brelje, 1997) e a obesidade (Bonner-Weir, 2000c; Butler et al., 2003; Flier et al., 2001). Essas demandas levam a mudanças adaptativas nas células β que incluem a hiperplasia¹⁰, a hipertrofia¹¹, e o aumento na síntese e na secreção de insulina (Accili et al., 2001; Bonner-Weir, 2000a; Bruning et al., 1997; Lingohr et al., 2002). Em humanos, a inabilidade do pâncreas em se adaptar a esta demanda por insulina pode resultar em hiperglicemia e desenvolvimento de diabetes, como DM2 e diabetes gestacional (Butler et al., 2003; Flier et al., 2001). A renovação de células β também pode ocorrer em estágios recentes do DM1, entretanto estas células recém formadas são igualmente destruídas pelo sistema imune, levando à redução na sua própria fonte de renovação. Não se sabe ao certo o quanto a renovação destas células em pâncreas adultos é resultante da replicação de células β diferenciadas, ou da neogênese¹² de células pancreáticas progenitoras.

¹⁰ Hiperplasia: é um termo que se refere à proliferação de células dentro de um órgão ou tecido. A hiperplasia é considerada uma resposta fisiológica a um estímulo específico e a célula nesta condição responde de maneira normal aos mecanismos de controle regulatórios.

¹¹ Hipertrofia: é caracterizada pelo aumento do tamanho de um órgão ou de uma área específica do tecido. Ela deve ser distinguida da hiperplasia que ocorre através da divisão celular, resultando em um aumento do número de células, enquanto na hipertrofia ocorre o aumento no tamanho das células, mas o número permanece o mesmo.

¹² Neogênese: diferenciação de células ductais a partir de uma suposta célula progenitora (Booner-Wier *et al.*, 2000)

Estudos *in vivo* de renovação de ilhotas em indivíduos adultos sugerem que células β diferenciadas mantêm uma capacidade de replicação (Dor and Melton, 2004). Contudo, a expansão *in vitro* de células β produtoras de insulina e com função preservada tem apresentado um sucesso limitado. A cultura de ilhotas humanas adultas resultou numa pequena taxa proliferativa e perda da expressão de insulina (Beattie et al., 2000; Beattie et al., 1999; Beattie et al., 2002; Halvorsen et al., 2000). Na ausência de marcadores estáveis para células β em cultura, não foi possível determinar o quanto a perda do fenótipo em células expandidas reflete a desdiferenciação de células β ou a morte celular acompanhada pela expansão de células da ilhota a partir de outros tipos celulares (Efrat, 2008b).

Dor e Melton (2004) têm avaliado o valor da contribuição da diferenciação de células ductais em novas células β e têm demonstrado que a maioria das células β é originada de células β adultas (Dor et al., 2004; Dor and Melton, 2004).

As evidências que indicam as células β como as principais contribuintes para o crescimento da ilhota e sua manutenção têm aumentado (Brennand et al., 2007; Teta et al., 2007). E por isso, o pâncreas endócrino se encontra como um modelo único, onde células β diferenciadas são capazes de se auto-renovar para a regulação da massa de células β em adultos (Dhawan et al., 2007).

Decifrar os mecanismos que regulam a plasticidade da massa de células β pode ser um importante passo no desenvolvimento de estratégias efetivas para o tratamento do diabetes. Ainda mais revolucionário seria encontrar efetores que induzam a proliferação das células β , *in vivo* ou *in vitro*, sem que estas células percam sua característica diferenciada.

Alguns hormônios e fatores de crescimento são conhecidos por estimular *in vivo* a renovação de células betas em roedores adultos (Nielsen et al., 2001). Dentre eles o exendin-4, um análogo estável do peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) (Xu et al., 2006) e a ação combinada do fator de crescimento epidermal (EGF) e a gastrina (Brand et al., 2002).

Assumindo o desafio da busca por fatores que levam à proliferação de células β *in vitro* e *in vivo*, nosso grupo iniciou um estudo sobre o efeito do veneno do escorpião do gênero *Tityus* sobre células β . Este estudo já resultou em uma publicação em 2003 a partir de uma colaboração com o grupo italiano, liderado pelo Dr. Ricardo Calafiore (Luca et al., 2003).

1.8. O veneno do escorpião *Tityus serrulatus* e seu efeito sobre a célula β

O escorpião *Tityus serrulatus*, Lutz e Melo (1922) é classificado como um artrópode pertencente à classe *Arachnida*, ordem *Scorpiones* (**Figura 4**). É considerada a espécie mais peçonhenta da subfamília *Tityinae* (América do Sul) e no Brasil pode ser encontrada nos estados de Minas Gerais, Bahia, norte de São Paulo e sudoeste de Goiás (Burcherl, 1980; Von Eickstedt, 1983/1984). A ampla distribuição geográfica do *T. serrulatus*, somada à grande toxicidade de sua peçonha, tem sido motivo constante de estudos e preocupação. Os primeiros estudos sobre o veneno do escorpião *T. serrulatus* foram feitos por Vital Brasil (1909), focalizando casos de envenenamento causados pelo animal.

Existem muitos trabalhos descrevendo análises bioquímicas e fisiológicas de diversas toxinas do *T. serrulatus*. Estas toxinas são principalmente proteínas básicas de baixo peso molecular, que ativam canais de cálcio de todas as células excitáveis. Estão contidas em uma família de mini-proteínas básicas de 60 a 70 resíduos de aminoácidos, contendo quatro pontes dissulfeto (De Lima and Martin-Euclaire, 1995).



Figura 4: Escorpião *Tityus serrulatus*.

De uma maneira geral, os venenos de escorpiões são misturas complexas contendo proteínas farmacologicamente ativas. Vários trabalhos têm demonstrado uma gama de propriedades comuns,

especialmente com respeito a proteínas tóxicas, em diversos gêneros e espécies de escorpiões (Sampaio et al., 1983).

Estudos clínicos dos efeitos do veneno relatam manifestações locais e sistêmicas envolvendo ativação de nervos periféricos e ativação do sistema nervoso autônomo. O veneno do escorpião *T. serrulatus* produz uma série de efeitos sobre o homem e animais como: salivação e secreção gástrica excessiva, vômito e contração ou relaxamento dos músculos lisos intestinais (Campos et al., 1979; Catanzaro et al., 1978; Cunha-Melo et al., 1973; Diniz and Valeri, 1959; Freire-Maia and Diniz, 1970; Tafuri et al., 1971) (Andrade et al., 1981; Gonzaga et al., 1979). Também foi demonstrada a ocorrência de pancreatite aguda em animais sob a ação do veneno do escorpião do gênero *Tityus* (Bartholomew et al., 1976) (Sankaran et al., 1977). Relatos da literatura descrevem que várias espécies de animais, incluindo o homem, apresentaram uma indução de nesidioblastose¹³ e hipoglicemia crônica após receberem os venenos dos escorpiões deste gênero (Novaes et al., 1990a). Sabe-se que estes distúrbios no metabolismo podem ser reflexos de alterações da secreção de hormônios pelas ilhotas pancreáticas (Clemente et al., 1999). Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que resultam em mudanças morfológicas e funcionais nestas células. Já foi evidenciado que as tityustoxinas¹⁴ induzem a secreção de insulina e a descarga de grânulos de zimogênio em ilhotas de Langerhans isoladas de ratos (Goncalves et al., 2003; Marangoni et al., 1995; Possani et al., 2000; Sankaran et al., 1977). Este efeito pode estar associado com a pancreatite desencadeada tanto pelo veneno, como apenas por tityustoxinas (Novaes et al., 1989). Estudos histológicos do pâncreas após o tratamento com tityustoxinas revelaram lesões do tipo fibrose intersticiais, atrofia acinar, dilatação ductal e alguns animais apresentaram alterações histológicas no pâncreas endócrino como nesidioblastose e hiperplasia (Novaes et al., 1990).

Conforme mencionado anteriormente, em colaboração com o grupo italiano liderado pelo Dr. Ricardo Calafiore (Luca et al., 2003) avaliamos o efeito mitogênico do veneno do *T. bahiensis* sobre

¹³ Nesidioblastose: hiperplasia das ilhotas de Langerhans, usualmente localizadas muito próximas dos ductos excretórios do pâncreas, que leva à hipersecreção de insulina e hipoglicemia (Novaes, 1999).

¹⁴ Tityustoxina: toxina purificada a partir de veneno de escorpião do gênero *Tityus*.

células β de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos, demonstrando a proliferação destas células quando expostas ao extrato bruto deste veneno. O fenômeno foi denominado “fetalização”, uma vez que o índice mitótico alcançado, sob condições fisiológicas, existe apenas no estágio embrionário. Os dados também indicaram que o veneno prolongou a viabilidade e funcionalidade da célula, com relação à liberação e ao conteúdo de insulina. Nesta Tese foi realizado um estudo sistemático do efeito proliferativo do veneno do escorpião *T. serrulatus* sobre células β , através do fracionamento do veneno e testes *in vitro* de atividade proliferativa de cada uma dessas frações.

Portanto o presente trabalho pretende apresentar alternativas para a superação de dois desafios cruciais que impedem um grande número de pacientes portadores de DM1 em se beneficiar do transplante de ilhotas pancreáticas. O primeiro desafio é aumentar a disponibilidade de massa de células β disponíveis para o transplante, através do xenotransplante ou da utilização de novas moléculas indutoras de proliferação, obtidas a partir do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. O segundo desafio é a eliminação da necessidade de terapia imunossupressora para o paciente que recebe o transplante de ilhotas pancreáticas, através do microencapsulamento de ilhotas pancreáticas.

2. Objetivos

1. Objetivo geral

O objetivo geral desta Tese é contribuir para o avanço do transplante de ilhotas pancreáticas através do desenvolvimento de um biomaterial com características adequadas ao microencapsulamento celular e da identificação de agentes indutores de proliferação de células β isolados a partir do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*.

2.2. Objetivos específicos

Objetivo 1: Obter um biomaterial que atenda às necessidades do microencapsulamento de ilhotas pancreáticas.

1. Obter alginato com alto grau de pureza;
2. Avaliar a influência da gelificação do biomaterial com íons bário e cálcio na estabilidade físico-química de microcápsulas, *in vitro* e *in vivo*;
3. Caracterizar a permeabilidade das microcápsulas;
4. Avaliar os efeitos biológicos do biomaterial sobre células RINm5F e ilhotas humanas, microencapsuladas, através de ensaios *in vitro*;
5. Avaliar a capacidade imunoprotetora do biomaterial em ensaios *in vitro* de co-cultivo de ilhotas microencapsuladas e macrófagos;
6. Avaliar a biocompatibilidade de microcápsulas vazias implantadas em camundongos imunocompetentes, através de análises histoquímicas e de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
7. Avaliar a viabilidade e a função de ilhotas humanas microencapsuladas através do xenotransplante em camundongos diabéticos;

Objetivo 2: Avaliar o efeito mitogênico do veneno do escorpião do *Tityus serrulatus* sobre células β .

1. Avaliar o efeito mitogênico do veneno do escorpião *T. serrulatus* sobre a linhagem celular de insulinoma de rato RINm5F;
2. Fracionar o veneno do escorpião *T. serrulatus* e identificar a(s) fração(ões) do veneno responsável(is) pela indução de proliferação sobre as células RINm5F;
3. Avaliar o efeito biológico da fração ativa do veneno sobre a liberação de insulina por ilhotas pancreáticas humanas estimuladas com glicose;
4. Avaliar a expressão dos genes de insulina e de PCNA em ilhotas pancreáticas humanas tratadas com a fração ativa do veneno.

3. Material e métodos

3.1. Ilhotas pancreáticas

3.1.1. Isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas humanas

Para obtenção das ilhotas foram utilizados pâncreas de doadores cadavéres humanos consentidos, de acordo com protocolo previamente aprovado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP e segundo as normas da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

O procedimento utilizado para isolamento e purificação das ilhotas humanas foi baseado na técnica descrita por Ricordi *et al.* (1998) com modificações (Maria-Engler *et al.*, 2004). Os pâncreas foram captados nas diferentes Organizações de Procura de Órgãos (OPOs) da cidade de São Paulo e transportados até a Unidade de Ilhotas Pancreáticas do Núcleo de Terapia Celular e Molecular da USP. O ducto pancreático de Wirsung foi canulado para que fosse infundida uma solução enzimática contendo collagenases e proteases (Liberase HI[®], Roche, Basel, Suíça). O pâncreas foi então colocado numa câmara de digestão na presença de Liberase HI[®] e agitado até que ocorresse a separação das ilhotas do tecido exócrino pancreático. Ao longo da digestão do pâncreas foram retiradas amostras de material digerido, as quais foram coradas com ditizona (um corante que se liga ao Zn²⁺ presente nas células β das ilhotas). A digestão foi interrompida quando mais de 50% das ilhotas estavam livres do tecido acinar adjacente. A mistura de tecido acinar e ilhotas foi submetida a um processo de purificação por centrifugação, em gradiente contínuo de Ficoll, para este processo foi utilizado o processador de células COBE[®] 2991 (Caridian BCT, Lakewood, EUA), o qual possibilita a obtenção de ilhotas purificadas. As ilhotas pancreáticas isoladas foram mantidas durante 24 horas em cultura em meio CMRL-1066 (Mediatech-Cellgro, Miami, FL), contendo glicose na concentração de 5,6 mM e 0,5% de albumina humana, a 37°C em atmosfera de 5% CO₂.

3.1.2. Isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas de ratos

As ilhotas foram isoladas de pâncreas extraídos de ratos machos da linhagem Wistar com peso corporal de aproximadamente 250 g. Os animais foram pré-anestesiados com uma injeção intramuscular de acepromazina (Univet/Vetnil) ($2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ de massa corporal) e anestesiados com uma injeção intraperitoneal de uma mistura de cetamina (Vetanarcol®/Konig) (75 mg.kg^{-1}) e xilazina (Coopazine®/Coopers) (10 mg.kg^{-1}). Após tricotomia abdominal e antisepsia com solução de povidona iodada (Riodeine Tópico, Rioquímica – Indústria Farmacêutica), realizou-se ampla laparotomia mediana ventral. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Química e da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo.

Após rebater o fígado, o ducto pancreático foi clampeado à jusante, próximo à sua comunicação com o duodeno, e o ducto colédoco foi canulado para que fosse realizada a infusão de 8 a 10 mL de solução contendo colagenase Liberase RI® (Roche) na concentração de $0,17 \text{ mg.mL}^{-1}$. O pâncreas foi então cuidadosamente extraído, lavado em solução salina gelada e, após remoção do tecido adiposo e linfonodos, mantido em tubo no gelo até o momento da digestão.

Durante a digestão, os tubos contendo os pâncreas foram mantidos por 20 minutos em banho-maria a 37°C . Após o término da digestão, o material digerido foi passado em peneira de $800 \mu\text{m}$ e lavado em meio RPMI-1640 (LGC Biotecnologia, São Paulo, São Paulo, Brasil). O precipitado foi ressuspenso em 10 mL de Ficoll (Mediatech - Cellgro) com a densidade de $1,110 \text{ g.cm}^{-3}$ e sucessivas camadas de 10 mL de Ficoll com densidades decrescentes ($1,096$; $1,069$ e $1,037 \text{ g.cm}^{-3}$) foram cuidadosamente adicionadas para formar um gradiente descontínuo que permite a separação das ilhotas do restante do tecido pancreático.

Após centrifugação a 453 g^{15} por 15 minutos, as ilhotas purificadas ficam localizadas entre as camadas de Ficoll com densidades de $1,096$ e $1,069 \text{ g.cm}^{-3}$. Essas camadas contendo ilhotas foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur. As ilhotas purificadas foram então lavadas e

¹⁵ g – força centrífuga relativa

cultivadas em meio CMRL 1066 (Mediatech-Cellgro), suplementado com 100 unidades/mL de penicilina, em estufa com fluxo de 5% de CO₂ a 37°C.

3.1.3. Contagem e avaliação da pureza e da viabilidade morfológica das ilhotas

A contagem e a avaliação da pureza das ilhotas foram realizadas através da coloração com Ditizona (Sigma) e observação ao microscópio óptico invertido (Nikon Corporation - Tokyo, Japão). A Ditizona cora em vermelho as células β e permite distingui-las dos ácidos. As ilhotas humanas foram contadas através de um método que normaliza o tamanho das ilhotas para 150 μm , cuja unidade é o Índice de Equivalentes de ilhotas ou IEQ.

A análise de viabilidade morfológica das ilhotas foi realizada através de dupla coloração com iodeto de propídio e laranja de acridina que coram, respectivamente, células mortas e células vivas. As ilhotas coradas foram observadas ao microscópio de fluorescência Nikon FluoPhot (Nikon Corporation - Tokyo, Japão) e foi realizada uma avaliação qualitativa das mesmas.

3.2. Cultura da linhagem celular RINm5F

A linhagem celular de insulinoma de rato, RINm5F (ATCC, *American Type Culture Collection*, CRL-11605®, Manassas, Virginia, EUA) foi mantida em meio de cultura RPMI-1640 (LGC Biotecnologia) suplementado com glutamina 2 mM, HEPES (Sigma) 10 mM, piruvato 0,01 mM, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de estreptomicina (Sigma), 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina (USBCorporation, Cleveland, Ohio, EUA), e 10% SFB (Cultilab), à temperatura de 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂. As culturas foram tripsinizadas para subcultivo quando atingiam uma densidade de aproximadamente 80 a 90% da densidade de saturação. Os estoques celulares foram mantidos em meio de cultura contendo 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido – Merck & Co., Inc. & Co, Inc.,) à -190°C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

Foi realizada a cultura de células da linhagem RINm5F (ATCC), em meio RPMI-1640 (LGC Biotecnologia) suplementado e 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Ao atingir 80% de confluência as células foram subcultivadas.

3.3. Microencapsulamento

3.3.1. Caracterização do alginato da Sigma purificado (ASP)

Amostras de alginato de média viscosidade (Sigma) foram submetidas a um processo adicional de purificação realizado pela empresa BIOMM SA. O alginato da Sigma purificado (ASP) foi analisado quanto ao seu grau de pureza e seus componentes moleculares foram caracterizados. Essas análises permitiram avaliar a sua aplicabilidade para a confecção de microcápsulas biocompatíveis. Os métodos analíticos utilizados para essa caracterização estão descritos a seguir.

a. Análise do conteúdo de compostos fenólicos

O conteúdo de compostos fenólicos, os contaminantes mais comuns em alginatos, foi determinado através da análise de sua fluorescência específica segundo o protocolo de Skjak-Braek (1989 Biotechnol Bioeng), utilizando um espectrofluorímetro modelo F-4500 FL (Hitachi Inc., Tokyo, Japão). As amostras de alginato foram dissolvidas em água ultrapura (MilliQ®, Millipore, Bedford, Massachusetts, EUA) na concentração de 1% (p/v). As leituras foram realizadas em duplicata utilizando-se um comprimento de onda de excitação de 366 nm e de emissão de 445 nm. Compostos fenólicos são detectáveis através de seu pico de absorbância a 445 nm. A quantidade relativa de polifenóis foi medida em unidades arbitrárias de fluorescência (AFU). Segundo a literatura, é necessário haver uma redução de 82 a 97% de polifenóis encontrados no alginato purificado, em relação ao não-purificado da Sigma para que se obtenha um alginato adequado ao microencapsulamento (Calafiore et al., 2004; Leinfelder et al., 2003; Orive et al., 2005).

b. Análise do conteúdo protéico

Para análise do conteúdo protéico foi utilizado o método descrito por (Bradford, 1976). Foi feita uma solução de 1% (p/v) de alginato em água ultrapura, seguida por esterilização através de filtração em filtro com poro de 0,22 µm de diâmetro (Millex®GV, Millipore, Bedford, Massachusetts, EUA). Foram utilizadas amostras nas diluições de 1:1 e 1:500. Foi feita uma curva padrão com albumina sérica bovina (BSA) (Sigma) nas concentrações de 2,5 a 10 µg.mL⁻¹. Após a purificação espera-se que

um alginato de boa qualidade para o microencapsulamento contenha menos de 0,5% (p/p) de proteína (Calafiore et al., 2004; Orive et al., 2005).

c. Análise do conteúdo de endotoxina

Para análise do conteúdo de endotoxina foi utilizado o kit *Limulus Amoebocyte Lysate*-LAL PYROGENT® PLUS (BioWhittaker, Cambrex Co., Walkersville, Maryland, EUA). Foram feitas soluções de alginato 1% (p/v) em água estéril e amostras diluídas 1:10 e 1:5.000 foram incubadas durante 1 h a 37°C. Os resultados foram expressos em unidades de equivalentes de endotoxina (EU) por grama de alginato seco. Alginatos que contenham endotoxina em níveis abaixo de 100 EU.g⁻¹ foram considerados aceitáveis para aplicação clínica (Calafiore et al., 2004).

d. Análise da viscosidade

As análises da viscosidade das amostras de alginato foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Omar El-Seoud do Instituto de Química da USP, São Paulo. A viscosidade foi analisada em aparelho Reômetro (modelo DV-III, Brookfield Eng. Lab. Inc. Middleborough, Massachusetts), com Spindle 52 para alginato e Biodritina®. Foram feitas 18 medidas de torques de 5 em 5 segundos. A temperatura foi mantida em 25°C. As amostras foram solubilizadas em solução de NaCl 0,15 mol.L⁻¹. Várias concentrações do alginato ASP (1 a 5% p/v) foram estudadas para a obtenção da concentração que confere a viscosidade de 100 cPs necessária à confecção de microcápsulas uniformes.

e. Análise da massa molecular

A análise da massa molecular das amostras de alginato foi feita através de cromatografia de exclusão molecular em aparelho HPLC (Shimadzu, modelo C-R4A Chromatopac). Foi utilizada uma coluna Ultrahydrogel® Linear (Waters) (10 µm, 7,8 x 300 mm, faixa de massa molecular 5 a 2.000 kDa). A coluna foi equilibrada com 0,014 mol.L⁻¹ de Na₂SO₄ (Merck & Co., Inc.) por 10 minutos, e o volume de 20 µL da amostra ASP (2 mg.mL⁻¹) foi eluído durante 20 minutos. A corrida foi monitorada em dois comprimentos de onda através do detector espectrofotométrico, a 212 nm e 280 nm. As corridas foram realizadas a temperatura ambiente entre 25 e 28°C, com um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹.

A coluna foi calibrada utilizando os seguintes padrões de peso molecular: Dextran 2.000 kDa, Dextran 600 kDa, Dextran 40 kDa, Dextran 10 kDa e PEG 5 kDa. Os padrões foram solubilizados em água ultrapura na concentração de 30 mg.mL⁻¹. A solução de ASP, 2 mg.mL⁻¹, também foi solubilizada em água ultrapura. Foi aplicado o volume de 20 µL de amostra na coluna. As corridas foram realizadas em duplicatas para o cálculo da massa molecular, o qual foi realizado de acordo com a fórmula:

$$K_{sec} = (V_e - V_{oid}) / (V_t - V_{oid})$$

Sendo: V_e (volume de eluição) = tempo de retenção x fluxo

V_{oid} = V_e do padrão Dextran 2.000.000 Da

V_t = 14,3278 (volume total da coluna)

Com o valor do K_{sec} na abscissa e a função logarítmica do peso molecular de cada padrão na ordenada foi possível construir uma curva de calibração da coluna. Calculando o K_{sec} do alginato purificado calcula-se então o valor da sua massa molecular.

Estas análises foram realizadas no Laboratório Prof. Dr. Marcos Luiz dos Mares Guia do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, coordenado pelo Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro.

f. Análise do conteúdo de ácido gulurônico (G) e ácido manurônico (M)

As análises do conteúdo de G e M foram feitas a partir de amostras de alginato submetidas à hidrólise ácida com HCl 0,5 N, 1,0 N e 2,0 N a 100°C por 2 horas. Os hidrolisados foram aplicados em papel Whatman nº 1 e submetido a uma cromatografia em papel com solução de ácido isobutírico: NH₃ 1 mol.L⁻¹, na proporção 5:3 (v:v), por 24 horas. O tipo de ácido urônico (G ou M) foi determinado segundo os padrões de ácido glucurônico e ácido galacturônico, sendo que a migração do ácido glucurônico é a referência para a identificação do ácido manurônico. A proporção entre os ácidos G e M foi realizada por análise de densitometria das bandas presentes na eletroforese em papel (Dietrich 1995). Todas essas análises foram feitas pelo corpo técnico do laboratório da Prof^a. Dr^a. Helena Nader, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

3.3.2. Produção de microcápsulas e microencapsulamento de ilhotas

Para a produção de microcápsulas foram utilizados dois materiais: alginato de cálcio (Sigma) e Biodritina[®]. A Biodritina[®] é um biomaterial composto por 80% de alginato de cálcio e 20% de sulfato de condroitina A[®] (Kin Master, RS, Brasil) de alto grau de pureza. Os alginatos utilizados foram o alginato da Sigma purificado (ASP) e o alginato ultra-puro (AUP) PRONOVA UP LVG[®] (Nova Matrix, FMC Biopolymer, Drammen, Norway). Os polímeros em questão foram diluídos em solução de NaCl 0,15 mol.L⁻¹, para uma concentração final de alginato de 1% e 1,2% para AUP e 1% e 4,2% para ASP. As soluções de gelificação testadas foram cloreto de cálcio 0,02 e 0,10 mol.L⁻¹ e cloreto de bário 0,02 mol.L⁻¹ (Merck & Co., Inc.), acrescidas de HEPES 20 mmol.L⁻¹ (Sigma), pH=7,2. Para a produção de microcápsulas contendo ilhotas, a suspensão celular foi cuidadosamente homogeneizada na solução de Biodritina[®]. Foram utilizadas 8.000 ilhotas de rato ou IEQs humanas por mL de solução de Biodritina[®]. Para a produção de microcápsulas contendo células RINm5F (ATCC) foi utilizada a concentração de $1,5 \times 10^6$ células.mL⁻¹.

As cápsulas foram obtidas pela extrusão da solução de Biodritina[®] contendo ilhotas (ou células RINm5F) através de uma microagulha com um fluxo de 19,9 mL.h⁻¹ controlado por uma bomba de seringa (SP 500 JMS do Brasil, Campinas, SP). Através da aplicação de um fluxo de ar (ar comprimido medicinal, Air Products Brasil, LTDA) de 2,2 L.min⁻¹ ao redor da agulha é possível desprender a gota no momento desejado, sendo possível, portanto, controlar o tamanho das microcápsulas. Após o desprendimento da agulha as microcápsulas caem em uma solução de polimerização (gelificação) composta por BaCl₂ ou CaCl₂. Com o fluxo acima determinado, obtém-se microcápsulas com aproximadamente 500-700 μm de diâmetro. Esse diâmetro é dependente do íon utilizado para a gelificação, da concentração da solução de gelificação e do fluxo de ar. A distância entre a ponta da agulha e a solução de gelificação foi ajustada para 7,5 cm, pois até essa altura as microcápsulas atingem delicadamente o fundo do recipiente onde são depositadas, evitando assim choques mecânicos que podem causar deformações. Ao final do processo, as microcápsulas permanecem na solução por mais 5 minutos. Após esta etapa de incubação, as microcápsulas são rapidamente

filtradas e lavadas com NaCl 0,15 mol.L⁻¹. O procedimento de microencapsulamento está resumido e ilustrado na **Figura 5**.

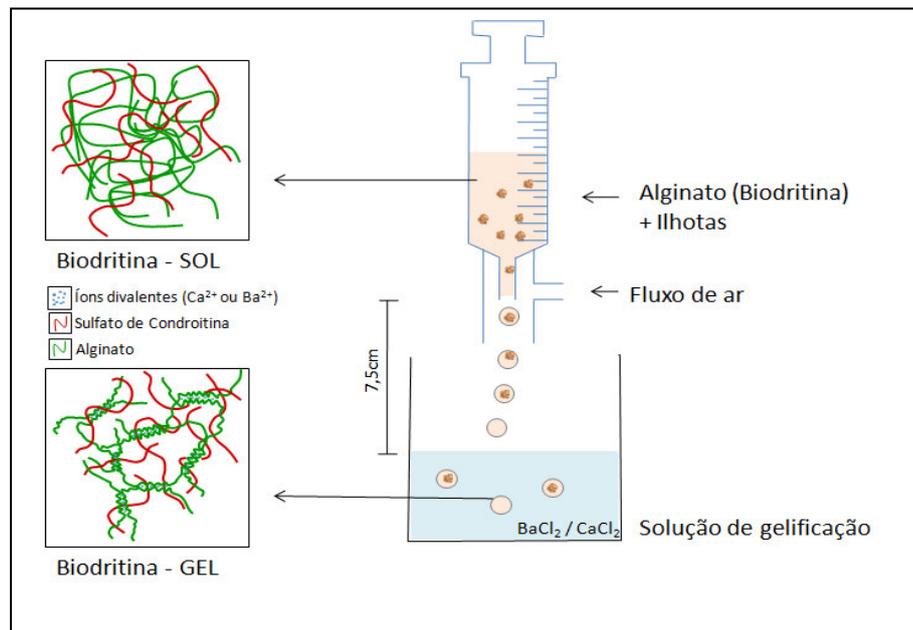


Figura 5: À direita, processo de confecção de microcápsulas contendo ilhotas. À esquerda, representação esquemática da estrutura da Biodritina® (alginato + sulfato de condroitina), antes e após a gelificação.

3.3.3. Avaliação das propriedades físico-químicas das microcápsulas

As propriedades físico-químicas das microcápsulas de Biodritina® gelificadas em cloreto de bário (BDTN-Ba) e em cloreto de cálcio (BDTN-Ca) foram avaliadas segundo dois aspectos: estabilidade mecânica e estabilidade térmica.

a. Estabilidade mecânica

Foram realizados quatro tipos de testes para avaliar a estabilidade mecânica das microcápsulas: três *in vitro* e um *in vivo*. No primeiro teste *in vitro*, as microcápsulas vazias foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 (LGC Biotecnologia) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C por quatro semanas. Durante esse período a morfologia das microcápsulas foi avaliada ao microscópio óptico de contraste de fase (Nikon Elipse TE300), levando-

se em consideração a manutenção de sua forma esférica, a ocorrência de intumescimento, e eventuais rupturas do biomaterial.

No segundo teste *in vitro*, as microcápsulas vazias foram submetidas a um ensaio de estresse rotacional (Haque et al., 2004). Para tanto, 0,5 mL de microcápsulas foram colocadas em tubos de 15 mL contendo 1,5 mL de solução NaCl 0,15 mol.L⁻¹. Os tubos foram colocados em agitadores mecânicos com movimentos rotacionais horizontais na velocidade de 150 rpm, a temperatura ambiente. Cem microcápsulas foram contadas e avaliadas quanto à sua estabilidade mecânica através de três critérios: presença de cápsulas quebradas, alterações no diâmetro e deformidades na sua superfície. As análises foram realizadas com o auxílio de um microscópio óptico de contraste de fase nos períodos de 1 hora e 1, 7 e 21 dias.

O terceiro teste *in vitro*, também denominado “teste explosivo” (Aranaz et al., 2006; Thu et al., 1996a) baseia-se na avaliação da capacidade da microcápsula em apresentar intumescimento quando imersa em água. Dependendo da resistência da membrana, a microcápsula irá se romper quando a pressão de intumescimento exceder certo valor. Em tubos de 15 mL foram colocados 0,5 mL de microcápsulas vazias imersas em 1,5 mL de água destilada. Esses tubos foram submetidos à incubação em agitador mecânico horizontal a temperatura ambiente. Após 0, 15, 20 e 60 minutos e 7 dias, 100 microcápsulas foram coletadas e tiveram seu diâmetro medido e seu aspecto morfológico avaliado por microscopia óptica de contraste de fase.

Para avaliação da estabilidade mecânica das microcápsulas *in vivo*, foi realizado o implante na região subcutânea de ratos Wistar machos, pesando aproximadamente 250 g. Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (Vetanarcol[®]/Konig) (75 mg.kg⁻¹) e xilazina (Coopazine[®]/Coopers) (10 mg.kg⁻¹). Através de uma pequena incisão de 0,5 cm no dorso do animal, as microcápsulas de BDTN-Ba ou BDTN-Ca foram implantadas com o auxílio de uma espátula estéril. A pele foi suturada e o animal colocado em lugar aquecido e observado até o final do efeito do anestésico. Meloxicam (Acepran 0,2%, UNIVET) 1 mg.Kg⁻¹ foi administrado subcutaneamente como analgésico. As cápsulas foram extraídas após quatro semanas. As análises foram realizadas em

microscópio óptico de fase e foram avaliados os seguintes parâmetros: resistência, intumescimento, presença de rupturas e adesão celular na superfície das microcápsulas. Todos os procedimentos descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Química e da Faculdade de Farmácia da USP, SP.

b. Estabilidade Térmica

Para a avaliação da estabilidade térmica, amostras de 0,5 mL de microcápsulas foram colocadas em tubos de 1,5 mL contendo 0,5 mL de solução de NaCl 0,15 mol.L⁻¹. Os tubos foram colocados em um termociclador (Thermo Stat *plus*, Eppendorf), e duas temperaturas foram utilizadas para o ensaio: 37°C e 40°C. Após 1 hora e 24 horas, foram coletadas 100 microcápsulas para avaliação do seu aspecto morfológico em microscópio óptico de contraste de fase.

3.3.4. Estudo da permeabilidade das microcápsulas a proteínas

A propriedade das membranas das microcápsulas de permitir a saída de proteínas produzidas pelas células que se encontram no seu interior foi determinada pela quantificação de proteínas no meio de cultura que continha células RINm5F microencapsuladas. Essas células foram microencapsuladas em ALG-Ba, ALG-Ca, BDTN-Ba e BDTN-Ca. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada tipo de microcápsula, e foram feitas duplicatas biológicas. Em cada ensaio, aproximadamente 30 microcápsulas por poço foram incubadas com 100 µL de meio RPMI-1640 (LGC Biotecnologia), sem soro, em placas de 96 poços, durante 15 dias. Cada microcápsula possuía aproximadamente $2,5 \times 10^4$ células RINm5F. De dois em dois dias os meios foram trocados. Nos dias 1, 4, 8, 12 e 15 foram coletados os sobrenadantes de cada poço para quantificar as proteínas liberadas e analisar suas massas moleculares através de eletroforese desnaturante. O conteúdo protéico foi dosado pelo método de Bradford (1976), utilizando-se BSA (Sigma) para a construção da curva-padrão. Com o objetivo de identificar as massas moleculares das proteínas que atravessam a membrana das microcápsulas foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), utilizando uma tensão de 90 V por 30 minutos seguidos por

110 V durante aproximadamente 2 horas. As amostras analisadas no gel corresponderam à reunião dos sobrenadantes coletados para cada tipo de microcápsula. Após a corrida, o gel foi corado com prata (ProteoSilver™ Plus, Silver Stain kit, Sigma). O padrão utilizado compreendia proteínas com massas moleculares de 5,7 a 170,8 kDa (Bench Mark, Invitrogen).

3.3.5. Avaliação da citotoxicidade das microcápsulas e da atividade metabólica das células RINm5F encapsuladas

Para a avaliação da eventual citotoxicidade das microcápsulas e da atividade metabólica das células RINm5F microencapsuladas, as quatro composições diferentes de biomaterial foram testadas: ALG-Ba, ALG-Ca, BDTN-Ba e BDTN-Ca. As células microencapsuladas foram mantidas em cultura por 15 dias e monitoradas quanto à sua atividade metabólica e conseqüente viabilidade nos dias 2, 4, 7, 10 e 15. A avaliação desses parâmetros foi realizada através do ensaio colorimétrico de redução do MTT, brometo 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólico (Sigma), segundo o método descrito por Haque (2004). O princípio do ensaio de MTT baseia-se na habilidade da enzima desidrogenase mitocondrial, presente em células viáveis, em converter o MTT a uma forma insolúvel denominada cristal de formazan. A quantidade de cristal formada pode ser quantificada em espectrofotômetro após solubilização com dimetilsulfóxido (DMSO, Merck & Co., Inc.). Aproximadamente 30 microcápsulas de cada biomaterial, contendo 2-3 x 10⁴ células RINm5F, foram incubadas com 100 µL de meio RPMI-1640 (LGC Biotecnologia) em placas de 96 poços em estufa a 37°C e atmosfera de 5% CO₂. Vinte e quatro horas antes de finalizar o ensaio, 25 µL de solução de MTT (50 µg de MTT em PBSA) foram aplicadas em cada poço. Este tempo de incubação foi importante para permitir toda a difusão do reagente para dentro dos diferentes tipos de microcápsulas. Durante este período a placa foi protegida da luz com papel alumínio. Após este tempo o meio de cultura contendo MTT foi removido e as microcápsulas foram lavadas uma vez com PBSA. Os cristais formados foram solubilizados através da adição de 200 µL de DMSO. Após 30 minutos de incubação com DMSO, a absorbância a 570 nm foi medida utilizando espectrofotômetro para placas de 96 poços (Synergy HT, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, Vermont, EUA). Através de uma curva de calibração previamente realizada com células RINm5F, foi possível correlacionar a absorbância a 570 nm com um número de

células para cada poço avaliado (Haque, 2004). Este ensaio foi realizado em triplicata para cada tipo de microcápsula, e com duplicatas biológicas. As análises estatísticas foram feitas através do programa *GraphPad Prism* versão 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EUA) e o teste aplicado foi o *one-way* ANOVA com o método Tukey como *post test*.

3.3.6. Avaliação da atividade funcional *in vitro* de ilhotas pancreáticas humanas microencapsuladas

As ilhotas humanas foram avaliadas quanto à sua capacidade de secreção de insulina quando microencapsuladas. Este ensaio permitiu ainda, avaliar a permeabilidade da microcápsula à insulina produzida pelas ilhotas em seu interior. Para este teste foram utilizadas ilhotas provenientes de seis pâncreas humanos, cujos códigos dos isolamentos de ilhotas realizados no NUCEL são: P15/06, P17/06, P22/06, P02/07, P05/07 e P09/07. Apenas microcápsulas de BDTN-Ba foram utilizadas nesses ensaios e, como controle, utilizou-se ilhotas não encapsuladas (nuas). Para cada condição de incubação descrita a seguir foram reservados 1.000 IEQ. Após reservar a quantidade de ilhotas necessária para todo o experimento aguardou-se até que as ilhotas microencapsuladas e as nuas decantassem. O sobrenadante foi retirado e as ilhotas foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (LGC Biotecnologia) sem soro contendo 2,8 mM de glicose. Esta suspensão de ilhotas foi distribuída em placas de 24 poços em triplicata contendo 2 mL por poço com aproximadamente 333 IEQ em cada. Após uma hora de incubação, o sobrenadante foi retirado e armazenado a -20°C para posterior análise do conteúdo de insulina. Na seqüência, o meio contendo 25 mM de glicose foi acrescentado sobre o volume restante a fim de se obter uma concentração final de 20 mM de glicose. Após uma hora de incubação, novamente o sobrenadante foi retirado para análise. A dosagem de insulina foi feita por eletroquimioluminescência no laboratório de Análises do Hospital Albert Einstein, São Paulo, e através do kit de ELISA para insulina humana (Immunoassay Kit, BioSource Europe S.A., Nivelles, Belgium) no próprio laboratório. O resultado deste teste foi expresso como um índice de liberação de insulina que resulta da razão entre a quantidade de insulina liberada na alta concentração de glicose pela quantidade liberada na baixa concentração de glicose.

3.3.7. Avaliação da capacidade imunoprotetora, *in vitro*, das microcápsulas sob o desafio de co-cultivo com macrófagos

O objetivo deste experimento foi cultivar macrófagos isolados do peritônio de camundongos Swiss com microcápsulas contendo, ou não, ilhotas para avaliar a capacidade imunoprotetora das microcápsulas de BDTN-Ba e BDTN-Ca. Como controle positivo utilizou-se ilhotas nuas e, como controle negativo, apenas meio de cultura. A avaliação foi feita de maneira indireta através da medida da indução da expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 β nas células de defesa.

a. Isolamento de macrófagos, ensaio de co-cultivo e extração de RNA total

Camundongos Swiss machos, com 8 \pm 2 semanas de vida foram utilizados para a obtenção de macrófagos peritoneais. Vinte animais foram sacrificados através da inalação do gás dióxido de carbono. Com uma seringa de 10 mL foi realizada uma injeção intraperitoneal de 6 mL de PBSA contendo 0,2% de EDTA. Os lavados peritoneais dos 20 animais foram coletados em tubos cônicos de 50 mL e centrifugados por 2 min, a 453 g, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram combinados em um tubo de 50 mL contendo RPMI-1640 (LGC Biotecnologia). As células foram contadas utilizando-se o método de exclusão convencional citômetro/azul de trypan, sendo que o corante azul permeia apenas as células mortas, as quais ficam, portanto, excluídas da contagem convencional em câmara de Neubauer. As células foram semeadas em placas de 48 poços na densidade de 1 a 1,5x10⁶ macrófagos por poço. Ilhotas microencapsuladas, microcápsulas vazias ou ilhotas nuas foram colocadas nas placas (50 por poço) as quais já continham os macrófagos em meio CMRL-1066 sem soro. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. O ensaio foi realizado em triplicata para cada tipo de microcápsula (BDTN-Ba e BDTN-Ca), sendo feitas duplicatas biológicas. Após 3, 6, 9 e 24 horas de incubação, os sobrenadantes foram removidos e os macrófagos foram lisados para extração de RNA através do kit RNeasy® (Qiagen, Hilden, Alemanha).

b. Produção de cDNA

Partindo-se de 1 µg de RNA total (quantificados no espectrofotômetro ND-1000 – NanoDrop Tech. Inc., Wilmington, Delaware, EUA) extraídos dos macrófagos, foram construídas fitas simples de cDNA por transcrição reversa, utilizando a enzima Super Script III (Invitrogen).

Para tanto, cada amostra de RNA foi submetida a uma reação contendo 0,5 µL de Oligo dT (0,5 µg/µL, Invitrogen), 0,5 µL de random *primers* (100 ηg/µL, Invitrogen) e 1 µL de dNTPs (10 mmol.L⁻¹, Invitrogen) para um volume final de 12 µL. As amostras foram incubadas a 75°C por 10 minutos para desnaturação das moléculas e, em seguida, foram adicionados 2 µL de tampão de síntese da primeira fita, 2 µL de DTT (0,1 mol.L⁻¹, Invitrogen), 0,5 µL de RNase OUTTM (40 U/µL, Invitrogen), 1 µL da enzima Super Script III (Invitrogen) e 2,5 µL de água ultrapura para um volume final de 20 µL. Uma nova incubação foi feita, por 10 minutos a 25°C, seguida por 2 horas, a 50°C e 10 minutos a 72°C.

Para degradar o RNA, foi adicionado 1 µL de RNase H (5 U/µL) em cada reação e, em seguida, foi feita uma nova incubação a 37°C por 30 minutos, e 72°C por 10 minutos para a inativação da enzima em questão. Amostras obtidas nas diferentes condições propostas foram diluídas em tampão TE (Tris-HCl 10 mmol.L⁻¹; EDTA 1 mmol.L⁻¹, pH 8,0).

c. Construção de *primers* para ensaio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Para as reações de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), foram construídos *primers* dos genes IL-1β e 36B4 utilizando o software *Primer Express*, versão 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) nas formas *Forward* e *Reverse*.

Os *primers* foram desenhados de acordo com as seguintes características para que apresentassem bom desempenho nas reações de qPCR e amplificassem seqüências específicas: amplificação de um fragmento de aproximadamente 150 pb, conteúdo de GC¹⁶ entre 40 e 60%, *temperature of melting* (T_m) próxima de 50°C, conteúdo de GC entre 40 e 60%. Além disso, para

¹⁶ GC – relação entre as bases guanina e citosina presentes na molécula de RNA ou DNA

evitar uma eventual co-amplificação de DNA genômico que pudesse estar contaminando a amostra, os pares de *primers* foram desenhados em diferentes exons dos genes quando possível.

As seqüências dos *primers* construídos para IL-1 β foram: *Forward* 5'AAGATGAAGGGCTGCTTCCA3' e *Reverse* 5'ATGAGTGATACTGCCTGCCTGAA3'. Para o gene endógeno 36B4: *Forward* 5'TTCTCTTAAACTCCGGTCTGGAT3' e *Reverse* 5'AGAAACAAAGATGCCAACACAAAG3'. Para o cálculo da eficiência dos *primers* foram realizadas reações de amplificação contendo *primer* na concentração de 600 η m e, como molde, uma mistura de cDNAs diluídos em série (1:30, 1:60, 1:120, 1:240, 1:480). A análise da regressão linear dos valores de Cts em função do logaritmo da respectiva diluição fornece o coeficiente angular da reta (a, em $y=ax+b$), que é utilizado para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos *primers*, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$Ef = 10^{-(1/\text{coeficiente angular})}$$

d. Ensaio de Real Time-PCR (qPCR)

Com a biblioteca de cDNA dos macrófagos foi realizado o ensaio de qPCR para o gene de interesse, IL-1 β , e o gene de expressão constitutiva 36B4. Para a quantificação do produto formado durante as reações de qPCR foi utilizado o reagente SYBR^R Green Dye (Applied Biosystems), que tem afinidade pela *minor groove* da dupla fita de DNA. Quando não está ligado ao DNA, emite uma pequena fluorescência no comprimento de onda de 520 η m, entretanto, quando se liga à dupla fita de DNA a fluorescência é aumentada 100 vezes, permitindo, desta forma, a detecção do produto do PCR em tempo real (Deprez et al., 2002). Todas as reações de qPCR foram montadas com 3 μ L do cDNA sintetizado anteriormente, diluído 30 vezes em tampão TE (Tris-HCl 10 mmol.L⁻¹; EDTA 1 mmol.L⁻¹, pH 8,0), 3 μ L do conjunto de *primers* (*Forward* e *Reverse*) e 6 μ L do reagente SYBR^R Green Dye. Foi utilizado o aparelho de Real-Time PCR 7300 da *Applied Biosystems*.

Os experimentos de qPCR foram programados da seguinte maneira: 1 ciclo de desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de amplificação (30 segundos de desnaturação a 95°C e 1 minuto de anelamento e extensão a 60°C). O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados

gerados durante a amplificação foram realizados pelo programa computacional GeneAmp 5700 (Applied Biosystems).

A análise inicial dos dados foi feita através do programa GeneAmp 5700, por meio da qual estabelece-se um valor arbitrário de corte na fase exponencial da amplificação do gene. Assim, a partir da intersecção deste valor arbitrário estabelecido com a curva de amplificação para o gene avaliado obtém-se o *threshold cycle*¹⁷ (Ct) da amostra. A especificidade do sinal foi confirmada através da análise das curvas de dissociação do produto amplificado.

Para que os dados pudessem ser comparados, foram realizadas duas reações para cada amostra de cDNA, sendo uma utilizando o *primer* do gene alvo (IL-1 β) e a outra, o *primer* do gene endógeno (36B4) (expressão constitutiva), permitindo, portanto, a normalização dos dados. Desta forma, a expressão do gene alvo foi expressa em função da expressão do gene controle.

De posse dos Cts, inicialmente calculou-se a média dos Cts das duplicatas. Dado que a expressão do gene é analisada em relação a uma amostra que é tomada como referência (controle negativo), calcula-se a diferença entre a Média dos Cts da amostra referência e a Média dos Cts da amostra estudada (controle positivo, ilhota encapsulada e cápsula vazia). Essa diferença é definida como ΔC_p . O cálculo do ΔC_p foi realizado para os dados do gene alvo e para os dados do gene de expressão constitutiva. A fórmula final (Pfaffl, 2001) para o cálculo da diferença de expressão dos genes entre as amostras analisadas, que considera que não há um ganho de duas vezes do produto amplificado a cada ciclo, dado que a eficiência de amplificação dos primers utilizado não é de 100%, é dada por:

$$\text{Ratio} = E_{\text{gene alvo}}^{\Delta C_p_{\text{gene alvo}}} / E_{\text{controle endógeno}}^{\Delta C_p_{\text{controle endógeno}}}$$

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística com auxílio do programa *Prism v4.02* (GraphPad), sendo utilizada uma análise de variância unidirecional (*one-way ANOVA*) seguida de um teste de Tukey, que realiza uma comparação dois a dois das médias dos valores de níveis de expressão.

¹⁷ Ct - número de ciclos da PCR que uma amostra atinge um valor de corte arbitrário nos ensaios de qRT-PCR.

3.3.8. Avaliação da biocompatibilidade de microcápsulas vazias após o implante em animais

Dez camundongos Balb/c machos, com 10 semanas de vida, receberam um implante intraperitoneal de microcápsulas vazias compostas por BDTN-Ba ou ANP-Ba, conforme os seguintes procedimentos cirúrgicos: os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (Vetanarcol®/Konig) (100 mg.kg^{-1}) e xilazina (Coopazine®/Coopers) (10 mg.kg^{-1}). Através de uma incisão de 0,5 cm, realizada na linha Alba do animal, 1 mL de microcápsulas de BDTN-Ba ou BDTN-Ca foram infundidas na cavidade com o auxílio de uma seringa de 3 mL e um catéter de Gelco de calibre 14G. O peritônio e a pele foram suturados com os fios cirúrgicos CATGUT 5.0 e Nylon 6.0, respectivamente. O animal foi colocado em lugar aquecido e observado até o final do efeito do anestésico. Meloxicam (Acepran 0,2%, UNIVET) 1 mg.Kg^{-1} foi administrado subcutaneamente como analgésico nas primeiras 24 horas. As microcápsulas foram recuperadas 7 e 30 dias após a infusão e avaliadas através de análises histológicas e morfológicas, descritas a seguir.

a. Análises histológicas

As microcápsulas recuperadas foram processadas segundo de Haan e colaboradores (2002). Logo após a recuperação, as microcápsulas foram fixadas por 3 horas a 4°C em paraformaldeído 2% tamponado com solução de fosfato de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,2. Após esse período, as microcápsulas foram mergulhadas em solução de sacarose 6% (solubilizada no mesmo tampão de fosfato de sódio) a 4°C e mantidas nessas condições por aproximadamente 12 horas. Em seguida, foi realizada a desidratação das microcápsulas através de gradiente crescente de etanol, partindo de solução 25% e aumentando de 5 em 5% até 100% (v/v). As amostras permaneceram 1 minuto em cada gradiente. Desidratadas, as microcápsulas foram incluídas em historresina segundo o kit *Leica Histo-resin* (Leica, Wetzlar, Alemanha). De cada bloco foram obtidos cortes de 3 e $5 \mu\text{m}$ (micrótomo Leica 2125Rt), que foram corados em azul de toluidina e posteriormente analisados sob microscopia de luz.

As análises histológicas foram realizadas no laboratório da Prof^a. Dr^a. Liana Verinaud, do departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

b. Análises das microcápsulas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O processamento das microcápsulas para análise através de MEV foi feito segundo Zimmermann e colaboradores (2007), com algumas modificações. As microcápsulas recuperadas dos animais foram lavadas em solução tampão HEPES 0,25 mol.L⁻¹ pH 7,2 e fixadas com glutaraldeído 2% solubilizado em solução tampão de cacodilato de sódio 0,12 mol.L⁻¹ pH 7,4 a temperatura ambiente. Após serem fixadas, as microcápsulas foram incubadas em duas soluções por 1 hora cada, a saber: tetróxido de ósmio 2%, e ácido tânico 1%, ambas solubilizadas na solução tampão de cacodilato de sódio 0,12 mol.L⁻¹ pH 7,4. A seguir, as microcápsulas foram seqüencialmente desidratadas em etanol nas seguintes concentrações: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 e 100% (v/v). Em cada concentração de etanol a incubação durou 1 minuto. Após a incubação em etanol 100%, as microcápsulas foram imediatamente secas em aparelho de ponto crítico (*Critical Point Dryer*, Balzers/CPD 030, Bal-Tec AG, Zürich, Suíça) com CO₂. Em seguida as microcápsulas foram gentilmente espalhadas sobre uma fita adesiva condutora (*Double Sided Carbon Tape*, Eletron Microscopy Sciences, Shinto Paint Co.) e recobertas com ouro com o auxílio do aparelho *Sputter coater* (Balzers/SCD 050, Bal-Tec AG), em 240 segundos de exposição. As análises por MEV foram feitas no aparelho JSM-5800 LV (*Scanning microscope*, JEOL, Tokyo, Japão) na voltagem de 10 kV, utilizando o programa ARC 58 JEOL JUS, versão 2.2.

Microcápsulas vazias de BDTN-Ca, BDTN-Ba, ALG-Ca e ALG-Ba, não implantadas em animais, também foram analisadas por MEV segundo o mesmo protocolo acima citado.

As análises por MEV foram realizadas na Central Analítica da UNICAMP, em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Liana Verinaud, do departamento de Microbiologia e Imunologia da mesma Universidade.

3.3.9. Xenotransplante de ilhotas humanas microencapsuladas em camundongos diabéticos

Para os ensaios de xenotransplante, 3.000 a 4.000 IEQ de ilhotas humanas nuas ou microencapsuladas em BDTN-Ba ou BDTN-Ca foram infundidas na cavidade peritoneal de camundongos Balb-c machos normais e diabéticos de 10 semanas de vida. Os animais foram

tornados diabéticos através de injeção intraperitoneal única de streptozotocina (Sigma) 250 mg.kg⁻¹. Os procedimentos cirúrgicos foram os mesmos já descritos no item **3.3.8** para a infusão de microcápsulas vazias. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Química da USP. Após o procedimento cirúrgico, o peso corporal e a glicemia dos animais foram monitorados diariamente, sempre no período da manhã e sem jejum prévio. Durante todo o período em que os animais mantiveram o implante, os mesmos receberam hidratação através de injeção subcutânea de 0,5 mL de solução fisiológica de Ringer contendo lactato de sódio (Laboratório Sanobiol LTDA, Pouso Alegre, Minas Gerais, Brasil). Após sete dias, a glicemia e o peso corporal foram avaliados nos animais três vezes por semana. O tempo para a retirada das microcápsulas variou entre os diferentes experimentos. Quando observada a perda da função do implante em pelo menos 50% dos animais contendo ilhotas microencapsuladas estas foram retiradas e avaliadas quanto à sua estabilidade (resistência, intumescimento, presença de rupturas) e à adesão de células na sua superfície. Também foi observada a glicemia do animal após a retirada do implante. Ilhotas provenientes de quatro pâncreas humanos (códigos NUCEL P17/06, P18/07, P05/07 e P08/07) foram utilizadas para estes experimentos de reversão do diabetes.

Para avaliar a função *in vivo* das ilhotas implantadas nos animais, foi realizado o teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Para tanto, os animais foram mantidos em jejum por 10 a 12 horas antes do teste. Após este período receberam por gavagem uma solução glicosada na dose de 6 gramas de glicose por quilograma de animal. As glicemias foram medidas após a administração da solução glicosada nos tempos 15, 30, 45 e 60 minutos ou até a normalização da glicemia.

Uma vez explantadas, as ilhotas microencapsuladas foram avaliadas através de análise morfológica em microscópio óptico. A função das ilhotas microencapsuladas explantadas também foi avaliada *in vitro* através do ensaio de liberação de insulina realizado em baixa (2,8 mM) e alta (20 mM) concentração de glicose, conforme previamente descrito.

3.4. Efeito do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* (TS) sobre células beta

3.4.1. Preparo do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* (TS)

O veneno foi retirado por estimulação elétrica da glândula secretora do escorpião *T. serrulatus* localizada na cauda. Este procedimento foi realizado no laboratório do Prof. Dr. Evanguedes Kalapotakis, do Instituto de Ciência Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, que gentilmente cedeu as amostras de veneno de TS necessárias a todos os experimentos relacionados a esta Tese. O veneno coletado foi diluído em solução de tampão fosfato (PBSA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e centrifugado a 15.000 g por 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação, foi possível observar a formação de um precipitado viscoso de coloração branca e um sobrenadante transparente, bastante denso. O sobrenadante do veneno centrifugado (SVC) foi separado e mantido em gelo durante todo o seu manuseio. O conteúdo protéico do veneno foi dosado pelo método de Bradford (*Protein assay*, Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA), utilizando albumina sérica bovina (Sigma) para a construção da curva-padrão. O SVC foi armazenado a -20°C para ser utilizado posteriormente em testes de indução de proliferação de célula RINm5F e também para ser fracionado. O SVC foi submetido a um pré-fracionamento em membrana Centricon® (Amicon, Millipore) com poro de 10 kDa seguido por um fracionamento em coluna de fase reversa (C-18) em aparelho de cromatografia líquida de alta pressão - HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão). O SVC também foi submetido à cromatografia de fase reversa em HPLC sem passar pelo pré-fracionamento. A quantificação de proteínas nas frações coletadas após as cromatografias de fase reversa foi realizada por estimativa utilizando a área sob cada pico no cromatograma.

3.4.2. Pré-fracionamento do veneno

O SVC foi diluído com PBSA para a concentração de 25 mg.mL⁻¹ para o pré-fracionamento em membrana Centricon® com poro de 10 kDa. Os tubos contendo 1 mL de SVC foram centrifugados a 15.000 g, 4°C. Antes que a membrana do Centricon® ficasse seca, foram acrescentados 0,5 mL de PBSA para permitir uma separação mais eficiente entre as moléculas abaixo de 10 kDa e as moléculas acima de 10 kDa. As frações abaixo e acima de 10 kDa foram denominadas LMW e HMW,

respectivamente. Cada fração teve seu volume completado para 1 mL e para os ensaios de proliferação com células RINm5F utilizou-se as seguintes diluições: 10,0; 5,0; 2,5; 1,0; 0,5 x 10⁻⁷ vezes a partir das frações LMW ou HMW. Para o fracionamento em coluna de fase reversa (C-18) as frações foram obtidas no mesmo dia da purificação.

3.4.3. Fracionamento do veneno por HPLC em colunas de fase de reversa C-18

As amostras LMW e HMW foram fracionadas através de cromatografia analítica em uma coluna de fase reversa (Shimadzu, C18, Shim-pack CLC-ODS(M), 25 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno em HPLC (Shimadzu). A coluna foi equilibrada por 10 minutos com solução de ácido trifluoracético (TFA) 0,1%. Foi utilizada uma solução de TFA 0,1% contendo 80% de acetonitrila, para a realização de um gradiente de 0 a 80% de acetonitrila durante 60 minutos. A temperatura da corrida foi de 35°C e o fluxo da cromatografia foi de 1 mL.min⁻¹. Amostras de LMW e HMW na concentração de 50 mg.mL⁻¹ foram aplicadas na coluna em volumes de 50, 100 e 200 µL. As corridas foram monitoradas a 280 nm e 214 nm em detectores espectrofotométricos.

3.4.4. Avaliação do potencial proliferativo do veneno de TS e suas frações sobre células beta

As células RINm5F (ATCC) foram cultivadas em placas de 96 poços (NUNC® - BD Falcon, San Jose, Califórnia, EUA), numa densidade inicial de 6x10³ células/poço em 0,1 mL de meio de cultura RPMI-1640 (LGC Biotecnologia) contendo 5% SFB, durante 24 horas. Após este período, o meio foi aspirado e lavado com PBSA. Acrescentou-se 0,1 mL de meio de cultura agora contendo 0,5% de SFB por poço. As placas foram incubadas por 24 horas no intuito de privar as células para soro. O meio pobre em fatores de crescimento permite sincronizar as células na fase G0 do ciclo celular. Novamente o meio foi aspirado e foram adicionados 0,1 mL de meio contendo SVC, LMW, HMW ou as frações após a fase reversa em diluições seriadas. Nas células controle foi adicionado apenas o meio de cultura. As placas foram cultivadas por 48 horas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% CO₂. Nas últimas 18 horas de cultivo foram adicionados 0,5 µCi de timidina tritiada (GE Healthcare Life Science, Piscataway, New Jersey, EUA) por poço. Ao final das 48 horas de cultivo, as células foram lavadas com PBSA e coletadas no aparelho coletor de células (Cell Harvester Systems, Inotech Biosystems

International Inc., Rockville, Maryland, EUA). Este aparelho permite coletar, simultaneamente, as amostras de todos os 96 poços da placa, através da passagem das mesmas por um filtro de lã de vidro o qual retém as moléculas de DNA. Este filtro foi seco e transferido para tubos de polipropileno. A cada tubo adicionou-se 0,5 mL de líquido de cintilação (BCS[®], Biodegradable Counting Scintillant, Amersham, GE Healthcare Life Science) para a contagem no Cintilador (Liquid Scintillation Analyzer 1500 TR, Packard, Frankfurt, Germany). A contagem automática das cintilações por minuto (cpm) é diretamente proporcional ao número de moléculas de [H³-metil]-timidina que são incorporadas no DNA, o que reflete a atividade de proliferação celular. Os resultados da ativação da mitose celular devem ser expressos convertendo-se os dados das cpm obtidos para “resposta relativa”. Para isso, atribuiu-se o valor arbitrário de 1 à média das cpm dos poços tratados com 0,5% SFB (controle negativo) (Armelin, 1973).

3.4.5. Avaliação da atividade metabólica das células beta após tratamento com a fração LMW do veneno de TS

A correlação entre a proliferação celular e a sua atividade metabólica mensurada através da densidade ótica do produto da redução do sal de tetrazólio ou MTT, foi estudada por Berridge e colaboradores (1993), que avaliaram a proliferação celular através da capacidade redutora da célula. Para isso, utilizaram a redução deste sal, de coloração amarela e solúvel em água, pela ação direta da enzima succinato desidrogenase mitocondrial, que resulta em um produto de coloração azul e solúvel em DMSO, o formazan, o qual pode ser mensurado espectrofotometricamente através de sua absorbância espectrofotométrica no comprimento de onda de 600 nm (Heo et al., 1990).

As células RINm5F foram submetidas ao tratamento com LMW conforme o protocolo de cultivo e incubação utilizado para o ensaio de incorporação de timidina tritiada em DNA, descrito acima. Uma quantidade de 50 µg de MTT foi adicionada a cada poço, quatro horas antes de finalizar o período de 48 h de tratamento das células com LMW.

Os resultados de atividade metabólica foram expressos convertendo-se os dados de absorbância obtidos para “resposta relativa”. Para isso, atribuiu-se o valor arbitrário de 1 à média da absorbância dos poços controle, tratados com SFB 0,5%.

3.4.6. Avaliação *in vitro* do efeito da fração ativa do veneno de TS sobre a liberação de insulina por ilhotas pancreáticas humanas

Logo após serem isoladas, amostras de ilhotas pancreáticas humanas foram incubadas com a fração ativa do veneno nas concentrações de 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 ng.mL^{-1} por 48 horas. Foram colocadas cerca de 330 IEQ por poço e os experimentos foram realizados em triplicata. Após o término do período de incubação com a fração ativa, as ilhotas foram submetidas ao ensaio funcional de liberação de insulina em meio contendo alta e baixa concentração de glicose, realizado segundo o protocolo descrito no item 3.3.6.

3.4.7. Avaliação do efeito do veneno de escorpião sobre a expressão do mRNA de insulina e de PCNA por ilhotas pancreáticas humanas através de PCR quantitativo em aparelho Real Time (qPCR)

As ilhotas pancreáticas humanas cultivadas com o veneno foram avaliadas quanto à expressão de RNA mensageiro de insulina e do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) em cada condição de tratamento com a fração ativa do veneno. Para tanto, após 48 horas de tratamento das células com a fração ativa nas concentrações de 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 ng.mL^{-1} , as ilhotas foram coletadas em tubos contendo 1.000 IEQ por condição. Estas ilhotas foram lavadas com solução de PBSA e tiveram seu RNA total extraído segundo as instruções do kit *RNAspin Mini (GE Healthcare Life Sciences)*.

O cDNA foi sintetizado segundo o mesmo protocolo descrito anteriormente (**item 3.3.7**) e utilizado como molde em reação de PCR em tempo real para os marcadores de interesse (insulina e PCNA) e para o gene de expressão constitutiva HPRT. As reações de qPCR para a quantificação do produto foram realizadas utilizando o reagente SYBR^R Green Dye (*Applied Biosystems*, Foster City, California, EUA). Todas as reações foram realizadas com 3 μL do cDNA sintetizado anteriormente, diluído 30 vezes em tampão TE (Tris.Cl 10 mM e EDTA 1mM, pH 8,0) 3 μL do conjunto de *primers* (*Forward* e *Reverse*) específicos para as seqüências a serem amplificadas e 6 μL do reagente SYBR^R Green Dye (*Applied Biosystems*). Foi utilizado o aparelho de qPCR 7300 (*Applied Biosystems*). Os

resultados do ensaio de qPCR foram analisados utilizando-se o programa GeneAmp 5700 (*Applied Biosystems*) e segundo os cálculos descritos no ítem **3.3.7**.

Seqüências dos primers utilizados:

- Insulina *Forward: 5'CAT CAC TGT CCT TCT GCC AT3'*
Reverse: 5'CAC AAT GCC ACG CTT CTG3'
- PCNA: *Forward: 5'CTC ACG TCT CCT TAG TGC AGC TTAC3'*
Reverse: 5'GGA CAT GCT GGT GAG GTT CA3'
- HPRT: *Forward: 5' GAA CGT CTT GCT CGA GAT GTGA3'*
Reverse: 5'TCC AGC AGG TCA GCA AAG AAT 3'

3.5. Coleta e análises dos dados

Os dados coletados e armazenados foram analisados utilizando o software Prisma e grupos de dados foram comparados para a significância através do teste t de Student's e ANOVA.

4. Resultados

4.1. Caracterização do alginato da Sigma purificado (ASP) e análise comparativa com o alginato ultrapurificado (AUP)

Para a confecção de microcápsulas biocompatíveis é importante minimizar o nível de impurezas presentes no alginato, constituídas principalmente por polifenóis, proteínas e endotoxinas.

A avaliação do conteúdo de polifenóis do ASP foi feita através da análise comparativa com o alginato de partida para a purificação, o alginato comercial da Sigma não purificado (ASN). A análise comparativa entre estes alginatos indicou o nível de redução obtido após o processo de purificação. É necessário haver uma redução de 82 a 97% de polifenóis (Calafiore et al., 2004; Calafiore et al., 2006; Leinfelder et al., 2003; Orive et al., 2005)). O resultado observado (**Figura 6**) foi uma redução de apenas 18% do conteúdo de polifenóis no ASP. O ASN apresentou um valor de $367,2 \pm 2,9$ UAF (Unidades Arbitrárias de Fluorescência) a 445 nm, o APS de $301,4 \pm 1,6$ UAF e o AUP de $82,1 \pm 0,3$ UAF. Portanto, o APS apresentou uma redução insuficiente dos níveis de polifenóis. O pico a 445 nm provavelmente corresponde ao composto poli-floroglucinol, considerado o principal polifenol contaminante de alginatos (Dusseault et al., 2005). Na **figura 6** pode-se observar a ausência de um pico a 445 nm para o AUP, confirmando as informações de análise fornecidas pelo fabricante (**Tabela 2**).

As dosagens do conteúdo protéico e do nível de endotoxinas no ASP também não mostraram valores satisfatórios que atendam às determinações das Agências de Vigilância Sanitária e dos Comitês de Ética para a aplicação do material em seres humanos. Estes valores podem ser observados na **Tabela 2**. Em contrapartida, o AUP possui as qualidades necessárias a esta aplicação.

Os outros parâmetros avaliados, como: massa molecular, viscosidade e conteúdo G/M são importantes, pois determinam propriedades físico-químicas das microcápsulas, como: porosidade e estabilidades mecânica e osmótica.

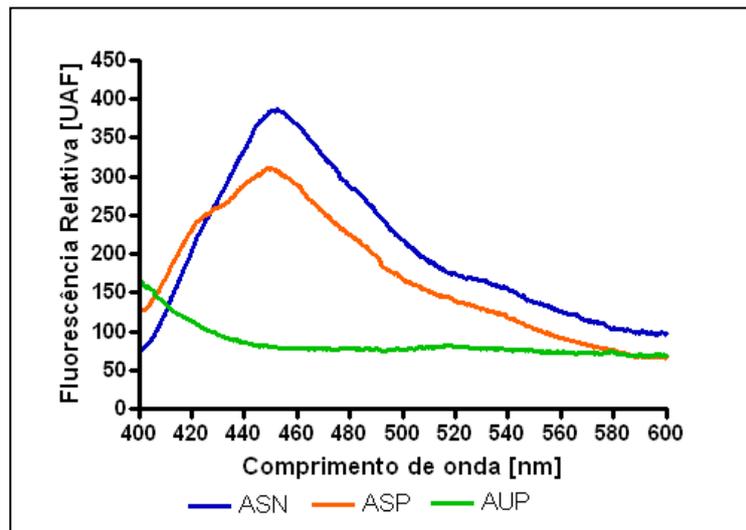


Figura 6: Espectro de fluorescência de amostras de ASN (alginato da Sigma não purificado), ASP (alginato da Sigma purificado) e AUP (alginato ultrapurificado).

A dinâmica de viscosidade foi realizada para amostras de ASP e AUP e também para a Biodritina® (BDTN), produzida com os dois tipos de alginato, BDTN-ASP e BDTN-AUP. Para a confecção de microcápsulas uniformes o ideal é utilizar soluções com a viscosidade de 100 cPs. Para AUP e BDTN-AUP foi obtida uma viscosidade de 100 cPs com as concentrações de 1% e 1,2% de alginato, respectivamente (**Figura 7**). Em contrapartida, para o ASP foi necessária uma concentração três vezes maior de alginato (3%) para atingir a viscosidade ideal e para BDTN-ASP esta concentração foi de 4,2% (**Figura 7**).

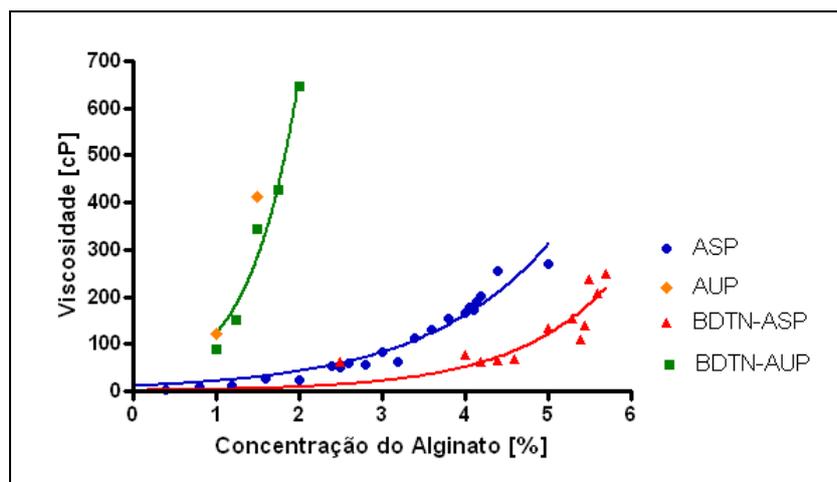


Figura 7: Dinâmica de viscosidade dos materiais ASP, AUP, BDTN-ASP e BDTN-AUP.

Segundo a literatura, a massa molecular do alginato deve estar entre 120 e 190 kDa para obtenção de poros de tamanho ideal (Calafiore et al., 2004). Quanto maior a massa molecular do

alginate, maior o tamanho dos poros formados nas microcápsulas. As análises cromatográficas do ASP permitiram calcular a sua massa molecular como sendo de aproximadamente 643 kDa. Essa alta massa molecular pode afetar as características de biocompatibilidade da microcápsula por não permitir a formação de poros menores, ideais para a função do biomaterial de atuar como uma barreira aos anticorpos. A determinação da massa molecular divulgada pelo fabricante para o AUP foi de 150 kDa (**Tabela 2**).

A proporção G/M também determina várias propriedades importantes da microcápsula. Foi determinado um conteúdo de aproximadamente 32,4% de G no alginato ASN e de 29,3% de G no alginato ASP (**Figura 8**). Este baixo conteúdo de G levou à decisão de utilizar preferencialmente íons bário, ou outra concentração de íons cálcio (100 mM) para realizar a gelificação de microcápsulas contendo ASP.

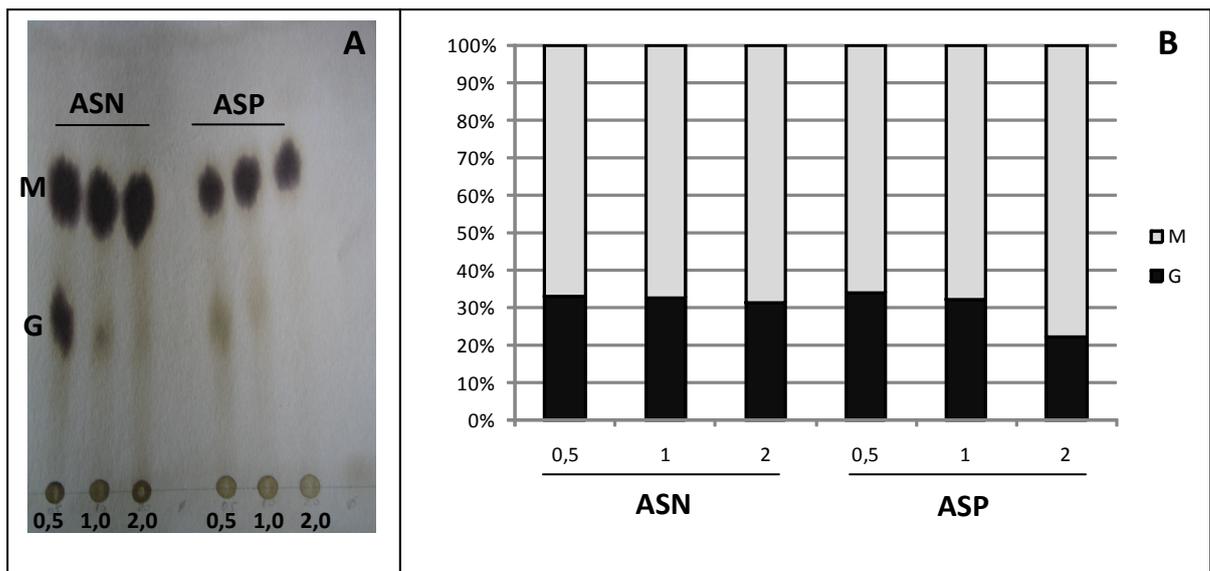


Figura 8: A- Cromatografia em papel das amostras ASN e ASP hidrolizadas em três condições diferentes: 0,5; 1,0 e 2,0 N de HCl. A letra G indica ácido gulurônico e M ácido manurônico. B- Valor em porcentagem do conteúdo G/M obtido a partir da densitometria da cromatografia em papel apresentada em (A).

Na **tabela 2** pode-se comparar os alginatos ASP e AUP em relação às características do alginato que seria considerado ideal para o microencapsulamento (Dusseault et al., 2006). O ASP não se encontra dentro dos padrões necessários para a confecção de microcápsulas biocompatíveis, sendo que um novo procedimento de purificação precisaria ser desenvolvido a fim de se obter maior eliminação de impurezas. Além disso, é necessário partir de outra fonte de alginato que não o

produto comercial da Sigma a fim de obter maior conteúdo de G (>60%), ideal para a confecção de cápsulas mais estáveis, como será apresentado e discutido a seguir.

Tabela 2: Avaliação comparativa entre o alginato da Sigma purificado (ASP), o alginato ultrapurificado Pronova® (AUP) e o alginato ideal segundo Dusseault e col. (2006).

	ASP	AUP*	Alginato Ideal
Massa Molecular [kDa]	643	150	120 a 190
Viscosidade 1% [Cp¹]	50	200	100 a 200
Conteúdo Protéico [%]	<2,3	<0,3	<0,5
Conteúdo de Polifenóis [UAF²]	301,4	0	0
Conteúdo de Endotoxinas [EU/g³]	6.660	<100	<100
Conteúdo de G [%]	32,4	>60	>60 (Ba ²⁺) <60 (Ca ²⁺ ou Ba ²⁺)

*Dados fornecidos pelo fabricante (Pronova®).

¹Cp: CentiPoise; ²UAF: Unidades Arbitrárias de Fluorescência; ³EU/g: Unidades de endotoxina por grama.

4.2. Obtenção de microcápsulas estáveis

A influência da viscosidade e do conteúdo de ácido gulurônico (G) sobre a produção de microcápsulas mecanicamente estáveis está ilustrada na **figura 9**. Pôde-se observar que microcápsulas produzidas com o ASP (1%) são mecanicamente instáveis. Isso é o resultado da viscosidade desse material, inferior à desejada, somada à baixa concentração de íons cálcio utilizada na gelificação (20 mM). Sugere-se utilizar essa concentração de íons cálcio devido à proporção G/M deste material. Esta instabilidade foi avaliada após a manutenção dessas microcápsulas por sete dias a 37°C em meio de cultura RPMI 1640 contendo 10% SFB. Em contrapartida, corrigida a viscosidade, aumentando a concentração da solução de ASP de 1% para 4,2% (100 cps), e substituindo-se os íons cálcio por íons bário, foi possível obter microcápsulas mecanicamente estáveis (**Figura 9**).

Microcápsulas produzidas com o AUP, viscosidade de 100 cps, apresentaram-se mecanicamente estáveis tanto com íons bário quanto com íons cálcio (**Figura 9**). Esta estabilidade foi avaliada por 30 dias de cultivo *in vitro*.

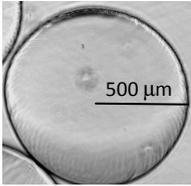
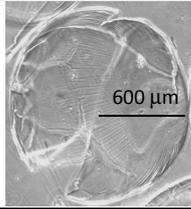
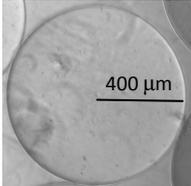
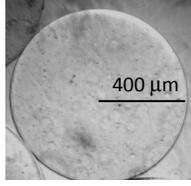
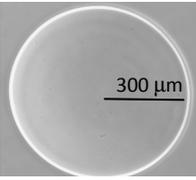
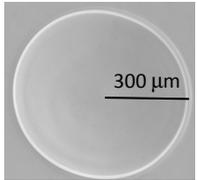
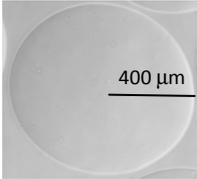
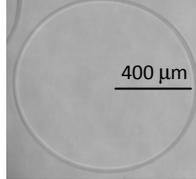
	Pré-Cultivo	Pós-Cultivo
	BDTN - ASP	
Solução 1% ASP Viscosidade 50 cps CaCl ₂ 20 mM		
Solução 4,2% ASP Viscosidade 100 cps BaCl ₂ 20 mM		
	BDTN - AUP	
Solução 1% AUP Viscosidade 100 cps BaCl ₂ 20 mM		
Solução 1% AUP Viscosidade 100 cps CaCl ₂ 100 mM		

Figura 9: Avaliação comparativa através de microscopia de fase de microcápsulas vazias produzidas com BDTN, variando-se o tipo de alginato utilizado (ASP ou AUP) e a solução de gelificação (CaCl₂ 20 ou 100 mM e BaCl₂ 20 mM), após manutenção em meio de cultura contendo 10% SFB em estufa a 37°C. O tempo pós-cultivo para BDTN-ASP foi de 7 dias e para BDTN-AUP, de 30 dias. Fotomicrografias obtida com aumento de 100X.

4.3. Avaliação das propriedades físico-químicas das microcápsulas

As propriedades físico-químicas das microcápsulas de BDTN-Ba e BDTN-Ca (produzidas com AUP) foram avaliadas segundo dois aspectos: estabilidade mecânica e estabilidade térmica. Foram realizados três testes de estabilidade mecânica *in vitro* e um teste *in vivo* para as microcápsulas de BDTN-Ba (gelificada com 20 mM de BaCl₂) e BDTN-Ca (gelificadas com 100 mM de CaCl₂).

a. Avaliações *in vitro*

No primeiro teste de estabilidade mecânica, as microcápsulas foram mantidas em cultivo sob a ação osmótica de íons e proteínas presentes no meio de cultura RPMI 1640 (LGC Biotecnologia)

contendo 10% SFB à temperatura de 37°C (**Figura 9**). Dentro do período de 30 dias, estas cápsulas se mantiveram mecanicamente estáveis, sem alterações morfológicas, incluindo ausência de inchaço.

No segundo teste, as microcápsulas foram submetidas ao estresse rotacional em solução de NaCl (0,15 mol.L⁻¹) e avaliadas durante 21 dias (**Figura 10**). Durante este período, não houve rompimento das microcápsulas, mas apenas alterações do diâmetro e das bordas. As microcápsulas de BDTN-Ca apresentaram um inchaço significativamente maior ($p < 0,001$) entre o dia 0 e 21 enquanto as microcápsulas de BDTN-Ba mantiveram seu diâmetro estável ($p > 0,05$). Após sete dias de estresse rotacional, as microcápsulas de BDTN-Ba mantiveram sua morfologia, conforme avaliação realizada através de microscópio óptico, enquanto as microcápsulas de BDTN-Ca apresentavam pequenas imperfeições na sua superfície (**Figura 10**). No entanto, no dia 21, nenhuma das microcápsulas apresentava uma superfície uniforme, como se pode observar na **figura 10**, embora não tenham se rompido.

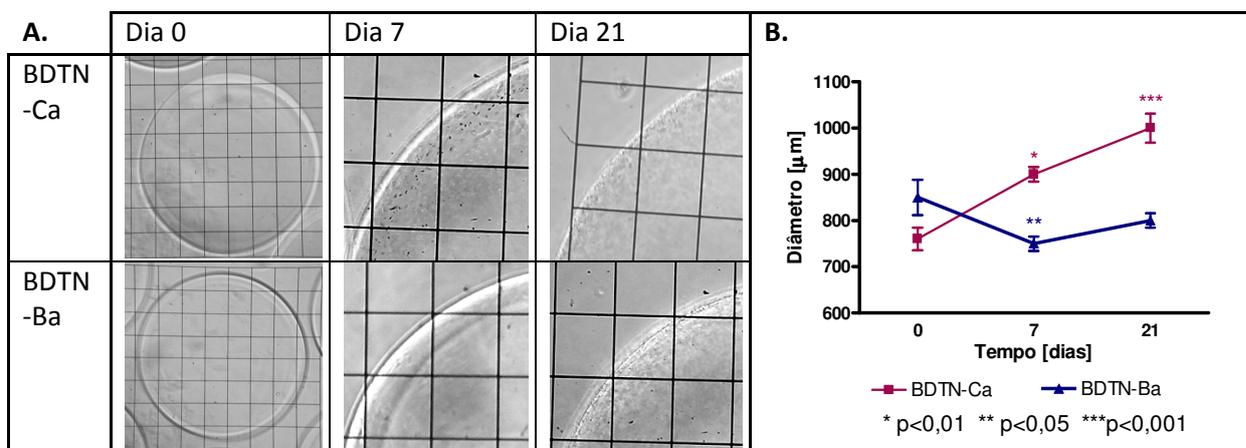


Figura 10: Microcápsulas de Biodritina[®] após terem sido submetidas ao teste de estresse rotacional (150 rpm) em solução de NaCl (0,15 mol.L⁻¹). **A:** Fotomicrografias de microcápsulas de BDTN-Ca e de BDTN-Ba nos tempos 0, 7 e 21 dias do experimento. **B:** Medidas dos diâmetros das microcápsulas durante o experimento. As análises estatísticas foram realizadas comparando-se microcápsulas do mesmo material nos distintos períodos de tempo. As fotos foram feitas com objetiva graduada, sendo que cada quadrado possui 100 µm de lado. Aumento de 100X. Os pontos representam as médias (n=100) de dois experimentos independentes ± SEM.

O terceiro teste foi o chamado “teste explosivo”, onde as propriedades de hidratação das microcápsulas foram acompanhadas através da medição do seu diâmetro com o auxílio de um microscópio óptico que possui objetiva graduada. As microcápsulas mantidas em água destilada, sob agitação, permitem avaliar a biodisponibilidade dos íons para o meio, uma vez que, nesta condição,

as interações iônicas, na malha da microcápsula, ficam submetidas a um estresse osmótico. Na **figura 11**, podemos observar que, no tempo zero, as microcápsulas de BDTN-Ca apresentam um diâmetro maior do que as microcápsulas de BDTN-Ba. Sabe-se que estas microcápsulas foram produzidas nas mesmas condições, e isto nos permite inferir que durante as lavagens iniciais das microcápsulas de BDTN-Ca, em solução salina, parte dos íons cálcio foi trocada com o meio, provocando um inchaço nestas microcápsulas. No entanto, a solução salina não foi suficientemente forte para seqüestrar os íons bário como o foi para os íons cálcio, levando o diâmetro das microcápsulas BDTN-Ba a apresentar-se 20% menor do que o das microcápsulas BDTN-Ca após as lavagens iniciais em solução salina.

Durante os sessenta minutos em que foram incubadas em água destilada, as microcápsulas BDTN-Ca não tiveram seu diâmetro alterado, permanecendo com 500 μm , enquanto, nos primeiros 15 minutos, as microcápsulas de BDTN-Ba alcançaram os 500 μm de raio e permaneceram dessa forma até a conclusão do experimento. Análises por microscopia de fase destas microcápsulas não evidenciaram alterações na sua estrutura (**figura 11**). Após o período de uma semana, o número de microcápsulas rompidas foi mensurado. As microcápsulas de BDTN-Ba se apresentaram relativamente estáveis no ensaio, aumentando de diâmetro e se tornando amolecidas, sendo que a maioria (65%) não se rompeu (**Figura 12**). Por outro lado, as microcápsulas de BDTN-Ca, se mostraram mais frágeis e, neste mesmo período, apenas 17% delas permaneceram íntegras (**Figura 12**). A superfície de ambos os tipos de microcápsulas se encontravam rugosas após 7 dias de experimento.

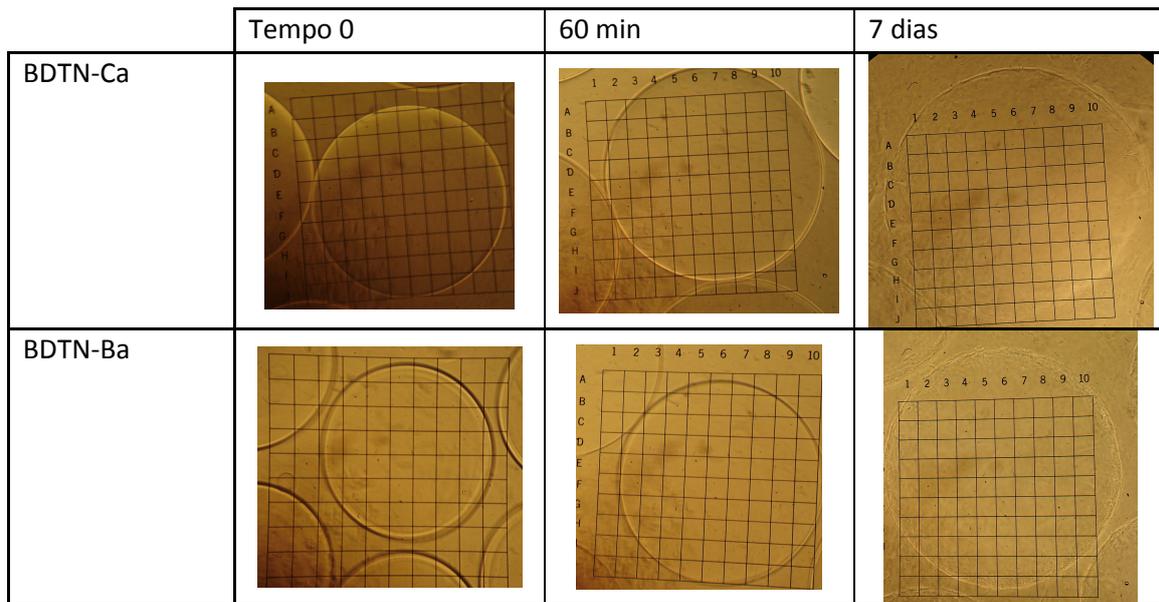


Figura 11: Microcápsulas de Biodritina® após terem sido submetidas a um estresse osmótico. Fotomicrografias de microcápsulas de BDTN-Ca e de BDTN-Ba nos tempos 0 e 60 minutos e 7 dias. As fotos foram feitas com objetiva graduada, cada quadrado possui 100 μm de lado. Aumento de 40X.

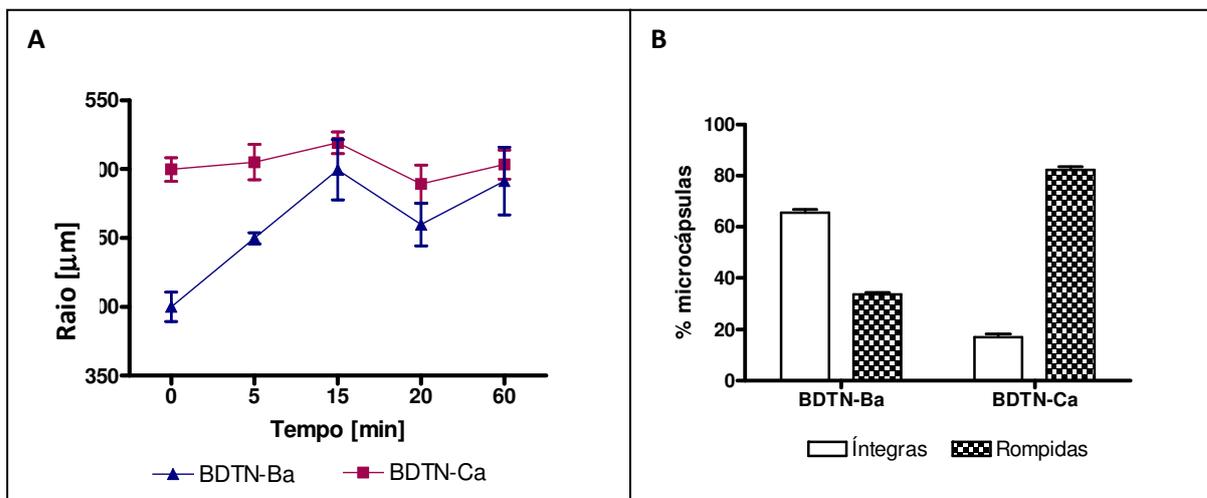


Figura 12: **A-** Medidas dos raios das microcápsulas de BDTN-Ba e BDTN-Ca durante o experimento de estresse osmótico. Os pontos representam as médias de triplicatas de dois experimentos independentes \pm SEM. **B-** Porcentagem destas microcápsulas, íntegras e rompidas, após o estresse osmótico por um período de 7 dias. As barras representam as médias de dois experimentos independentes \pm SEM nos quais 200 microcápsulas foram avaliadas ao todo.

b. Avaliação *in vivo*

As microcápsulas de BDTN-Ba e BDTN-Ca foram avaliadas após serem mantidas *in vivo* durante 4 semanas, na região subcutânea do dorso de ratos. De acordo com a **figura 13** percebe-se a elevada estabilidade mecânica e biocompatibilidade destas microcápsulas, conforme pode ser observado após o explante. Apesar de ter ocorrido a perda da esfericidade perfeita presente antes do implante (mais evidente nas microcápsulas de BDTN-Ba), não foram observadas microcápsulas rompidas, rachaduras em sua membranas, nem adesão celular, eventos observados quando se utilizou o alginato ASP (dados não mostrados) para confecção de microcápsulas de BDTN-Ba.

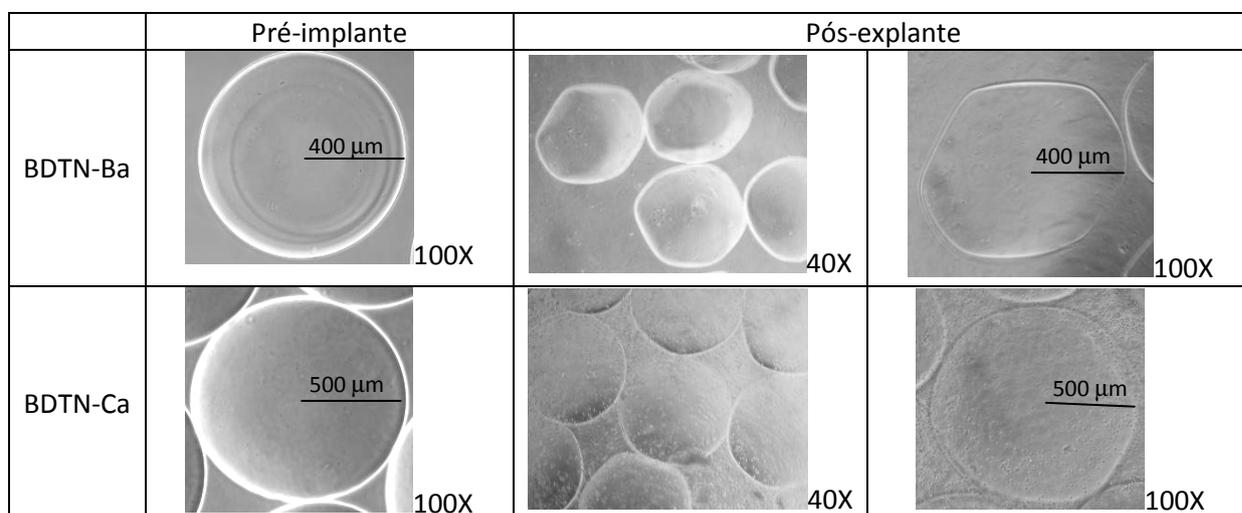


Figura 13: Avaliação comparativa da morfologia de microcápsulas vazias produzidas com BDTN-Ca e BDTN-Ba. Observação pré-implante e 4 semanas após terem sido retiradas (pós-explante) da região subcutânea de ratos.

c. Estabilidade Térmica

No teste de estabilidade térmica foi possível observar que as microcápsulas de BDTN-Ba mantiveram a sua morfologia inalterada após 24 horas a 37°C e a 40°C, enquanto as microcápsulas de BDTN-Ca apresentaram uma forma ovalada a 40°C (**Figura 14**). Essas alterações observadas no microscópio são indicativas de uma instabilidade físico-química nas microcápsulas de BDTN-Ca.

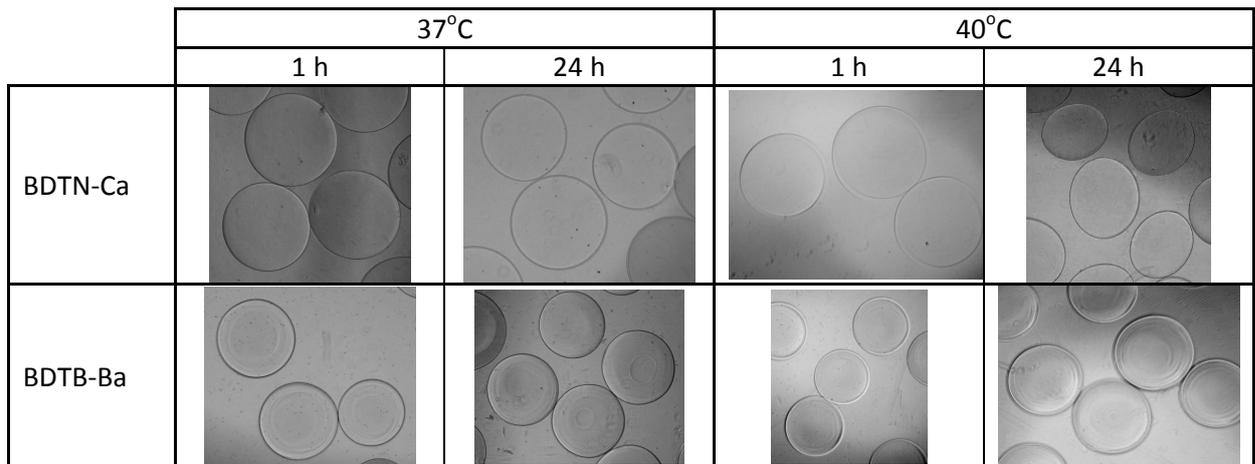


Figura 14: Fotomicrografias de microcápsulas de Biodritina[®] após terem sido submetidas a um estresse térmico, 37°C e 40°C. Microcápsulas de BDTN-Ca e de BDTN-Ba foram analisadas após 1 e 24 horas de experimento. Aumento de 40X.

4.4. Estudo da permeabilidade das microcápsulas a proteínas

Após o cultivo por 15 dias, de células RINm5F microencapsuladas em BDTN-Ba, ALG-Ba, BDTN-Ca e ALG-Ca, foram dosadas as proteínas presentes nos sobrenadantes dos meios de cultura em cada um desses sistemas. Os resultados apresentados na **figura 15** demonstram a habilidade das microcápsulas de permitir o livre fluxo de proteínas através de todos os tipos de biomateriais utilizados. Para microcápsulas gelificadas em solução de cloreto de cálcio, a quantidade de proteína dosada no sobrenadante foi reduzida à metade ao final dos 15 dias de cultivo. Já a quantidade de proteínas liberadas no sobrenadante por microcápsulas gelificadas em solução de cloreto de bário foi o triplo. Com este experimento foi possível avaliar também os valores de massas moleculares das proteínas liberadas. Na **figura 16**, o resultado da eletroforese desnaturante dos sobrenadantes dos meios de cultura permitiu inferir que as microcápsulas gelificadas em soluções de cloreto de bário apresentam um limite de poro de aproximadamente 70 kDa enquanto aquelas gelificadas em solução de cloreto de cálcio apresentam poros com limite de aproximadamente 100 kDa.

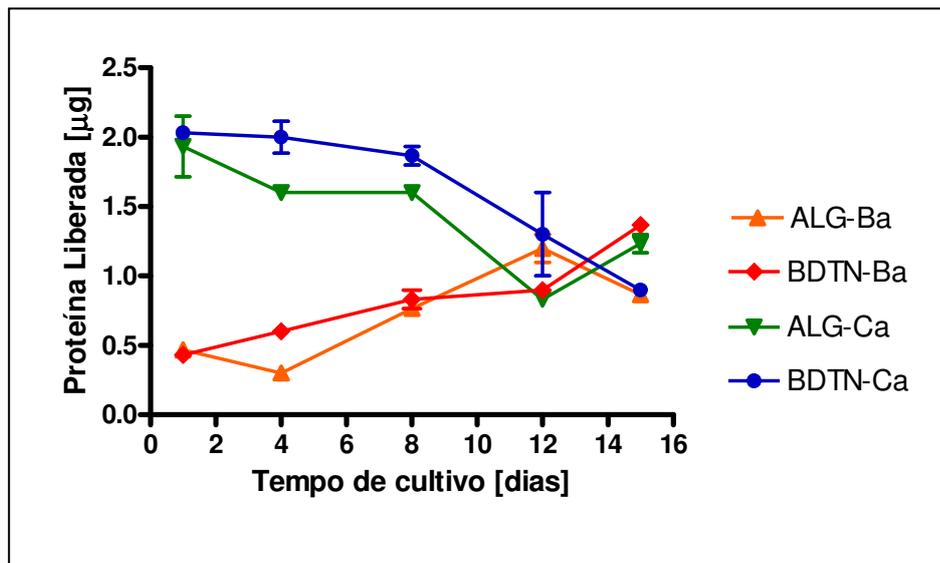


Figura 15: Dosagem de proteínas dos sobrenadantes dos meios de cultura de células RINm5F microencapsuladas em BDTN-Ba, ALG-Ba, BDTN-Ca e ALG-Ca cultivadas por 15 dias em meio de cultura sem soro.

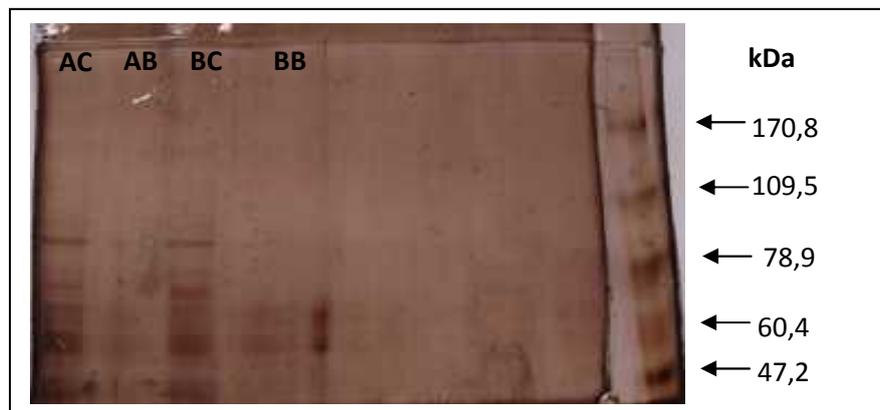


Figura 16: Eletroforese desnaturalizante do sobrenadante do meio de cultura de células RINm5F microencapsuladas em ALG-Ca (AC), ALG-Ba (AB), BDTN-Ca (BC) e BDTN-Ba (BB), cultivadas por 15 dias em meio de cultura sem soro.

4.5. Avaliação da citotoxicidade do biomaterial e da atividade metabólica das células RINm5F microencapsuladas

A citotoxicidade dos biomateriais utilizados na confecção das microcápsulas e o desempenho metabólico das células microencapsuladas com as diferentes formulações (ALG-Ca, ALG-Ba, BDTN-Ca e BDTN-Ba) foram comparados. Foi possível avaliar a influência dos íons na biocompatibilidade dos materiais bem como avaliar a influência do sulfato de condroitina combinado com o alginato

(Biodritina® X Alginato), que compõem a Biodritina®. A **figura 17** representa o número de células por 30 ± 3 microcápsulas nos intervalos de tempo determinados. Todas as microcápsulas revelaram aumento no número de células e, conseqüentemente, na atividade metabólica. No entanto, as microcápsulas gelificadas em cálcio apresentaram um aumento mais acentuado frente às microcápsulas gelificadas em bário, com uma diferença estatística de $p < 0,01$ para BDTN e $p < 0,05$ para ALG (**Figura 17**). Até o sétimo dia, as células microencapsuladas com BDTN apresentaram maior atividade metabólica em relação às suas correspondentes microencapsuladas com ALG, mas sem diferença estatística (**Figura 17**). Após esse período, as atividades metabólicas das células microencapsuladas com íons bário se igualaram, assim como as atividades das células microencapsuladas com íons cálcio, também similares (**Figura 17**). Pode-se afirmar, portanto, que não houve citotoxicidade às células microencapsuladas por parte dos quatro tipos de membranas.

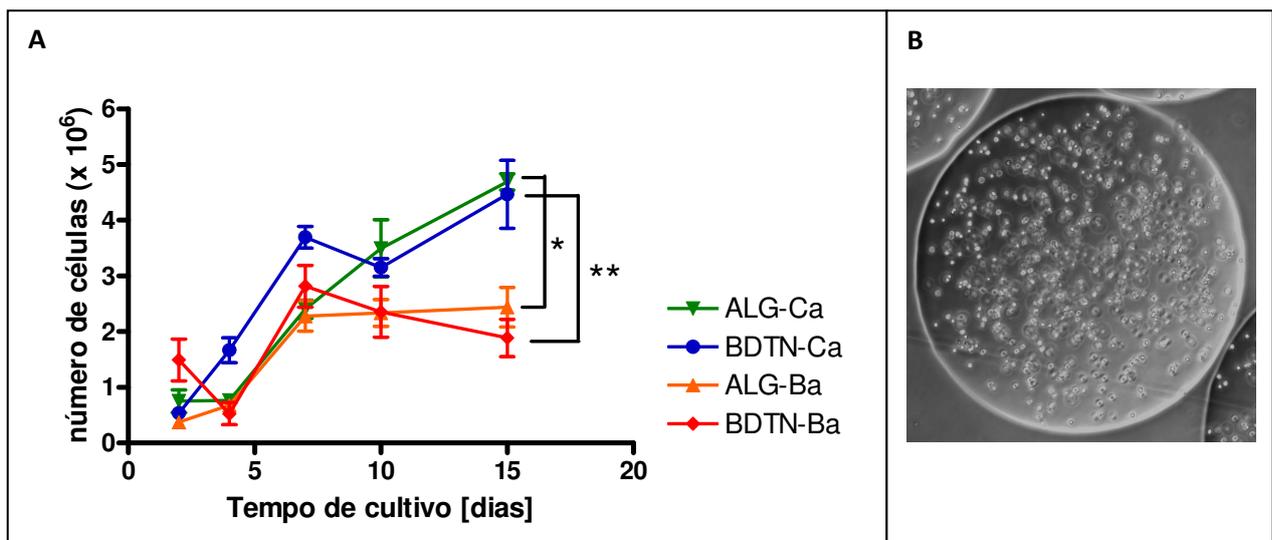


Figura 17: A- Cinética da atividade metabólica das células RINm5F microencapsuladas em BDTN-Ba, BDTN-Ca, ALG-Ba, ALG-Ca, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ (One-way ANOVA com Tukey post test). Os pontos representam as médias de triplicatas de dois experimentos independentes \pm SEM. B- Fotomicrografia representativa para os quatro tipos de microcápsulas contendo células RINm5F após 7 dias de cultivo. Aumento de 40X

4.6. Avaliação da atividade funcional *in vitro* de ilhotas pancreáticas microencapsuladas

Foi realizada a avaliação da capacidade de ilhotas nuas e microencapsuladas em BDTN-Ba em responder ao estímulo com alta concentração de glicose (20 mM) liberando insulina. Com este teste foi possível avaliar também a permeabilidade da membrana à insulina produzida por ilhotas presentes em seu interior. A **figura 18-A** contém os índices de liberação de insulina obtidos durante experimentos realizados com ilhotas isoladas de seis pâncreas humanos diferentes, tendo sido possível avaliar a variabilidade destes valores entre as diferentes preparações de ilhotas. Não houve diferença significativa entre as médias dos índices de liberação de insulina obtidos para ilhotas nuas e microencapsuladas dos diferentes pâncreas (**Figura 18-B**).

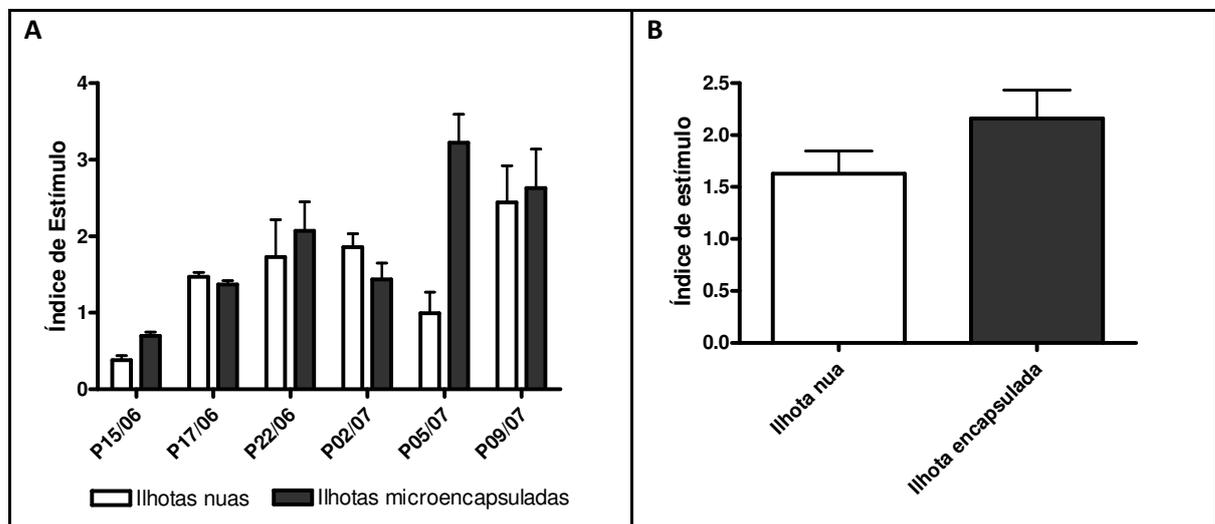


Figura 18: A- Ensaio de secreção de insulina por ilhotas nuas e microencapsuladas com BDTN-Ba durante incubação com baixa (2,8 mM) e alta (20 mM) concentração de glicose. Cada barra representa o valor médio de três valores de índice de estímulo calculado \pm SEM. B- Valor médio dos índices de secreção de insulina de ilhotas isoladas de seis pâncreas.

4.7. Avaliação da capacidade imunoprotetora das microcápsulas, *in vitro*, sob o desafio de co-cultivo com macrófagos

No experimento de co-cultivo de microcápsulas de BDTN-Ba vazias ou contendo ilhotas com macrófagos não foi observado um aumento significativo na expressão do mRNA da citocina IL-1 β . Entretanto, após 9 horas de co-cultivo, ilhotas nuas e microencapsuladas em BDTN-Ca induziram um aumento na expressão dessa citocina em macrófagos, na ordem de $2,8 \pm 0,7$ vezes ($P < 0,001$) e $4,4 \pm 0,5$ vezes ($P < 0,001$), respectivamente. Microcápsulas vazias de BDTN-Ca ou de BDTN-Ba não induziram expressão de IL-1 β . O controle positivo utilizado, ilhotas nuas, induziu significativamente a

expressão de IL-1 β nos três primeiros períodos de tempo medidos; 3, 6 e 9 horas, como pode ser visto na **tabela 3**.

Tabela 3: Análise da expressão de IL-1 β por macrófagos co-cultivados com ilhotas nuas e microencapsuladas por qPCR.

Tempo [h]	Macrófagos	Macrófagos + Ilhotas nuas	Macrófagos + Microcápsulas BDTN-Ca	Macrófagos + Microcápsulas BDTN-Ba	Macrófagos + Ilhotas em BDTN-Ca	Macrófagos + Ilhotas em BDTN-Ba
3	0,5 \pm 0,1	2,0 \pm 0,5***	0,5 \pm 0,1	0,4 \pm 0,3	0,8 \pm 0,2	0,6 \pm 0,0
6	1,0 \pm 0,3	2,2 \pm 0,3**	0,8 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2	0,8 \pm 0,7	0,4 \pm 0,2
9	1,0 \pm 0,6	2,8 \pm 0,7***	1,9 \pm 0,4	1,6 \pm 0,6	4,4 \pm 0,5***	1,5 \pm 0,6
24	1,0 \pm 0,8	1,4 \pm 0,4	1,4 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1	1,6 \pm 1,3	0,7 \pm 0,3

p<0.01 e *p<0.001

4.8. Avaliação da biocompatibilidade de microcápsulas vazias após o implante em animais

As microcápsulas implantadas na cavidade peritoneal de camundongos normais foram retiradas após os períodos de 7 e 30 dias. Observações dessas microcápsulas ao microscópio de contraste de fase permitiram observar níveis variáveis de deformações físicas na superfície das microcápsulas, com clara diferença entre os dois materiais, Biodritina®-bário (BDTN-Ba) e alginato da Sigma não purificado-bário (ASN-Ba) (**Figura 19**). Segundo Thanos e colaboradores (2007) microcápsulas com características desejáveis após o período de implante, se encontrariam livres na cavidade peritoneal enquanto microcápsulas consideradas de baixa qualidade seriam de difícil recuperação, apresentando adesão tecidual.

O volume de microcápsulas de BDTN-Ba infundido (1 mL) foi totalmente recuperado após 7 ou 30 dias de implante em camundongos imunocompetentes, sem observação de adesão tecidual. No entanto, para as microcápsulas de ASN-Ba a recuperação foi de 50-60% do volume previamente infundido após 7 e 30 dias de implante, com evidente adesão tecidual e microcápsulas rompidas. Dos dez animais que receberam as microcápsulas de ASN-Ba, quatro morreram antes de completarem os 7 dias de implante, provavelmente por inflamação severa (septicemia) em decorrência das impurezas presentes no ASN.

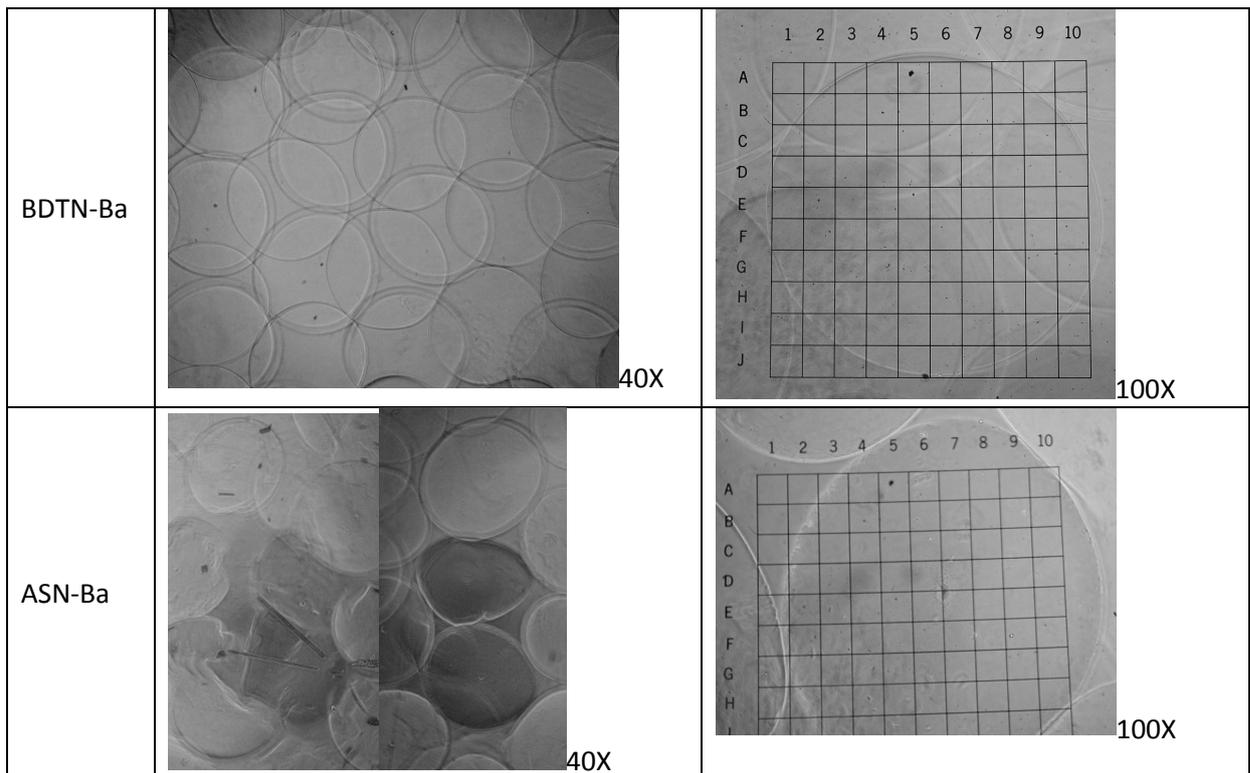


Figura 19: Avaliação comparativa, ao microscópio de contraste de fase, de microcápsulas vazias de BDTN-Ba ou ASN-Ba 30 dias após o implante em camundongo Balb/c.

As avaliações histoquímicas através da coloração com azul de toluidina, confirmaram a biocompatibilidade das microcápsulas de BDTN-Ba, com 99,3% de ausência de adesão celular, associada a uma recuperação de 100% do volume implantado, e com microcápsulas íntegras e apresentando superfície lisa (**Figura 20**). As microcápsulas confeccionadas com ASN-Ba apresentaram-se pouco estáveis após o transplante, com rompimento ou com muita irregularidade na superfície, além da reduzida recuperação do volume previamente infundido (50-60% de recuperação). As microcápsulas recuperadas de ASN-Ba apresentaram reduzida adesão celular (**Figura 20**). Observações de caráter morfológico tais como, deformação e irregularidades da superfície são indicativas de baixa estabilidade e foram confirmadas por MEV (**Figura 22**).

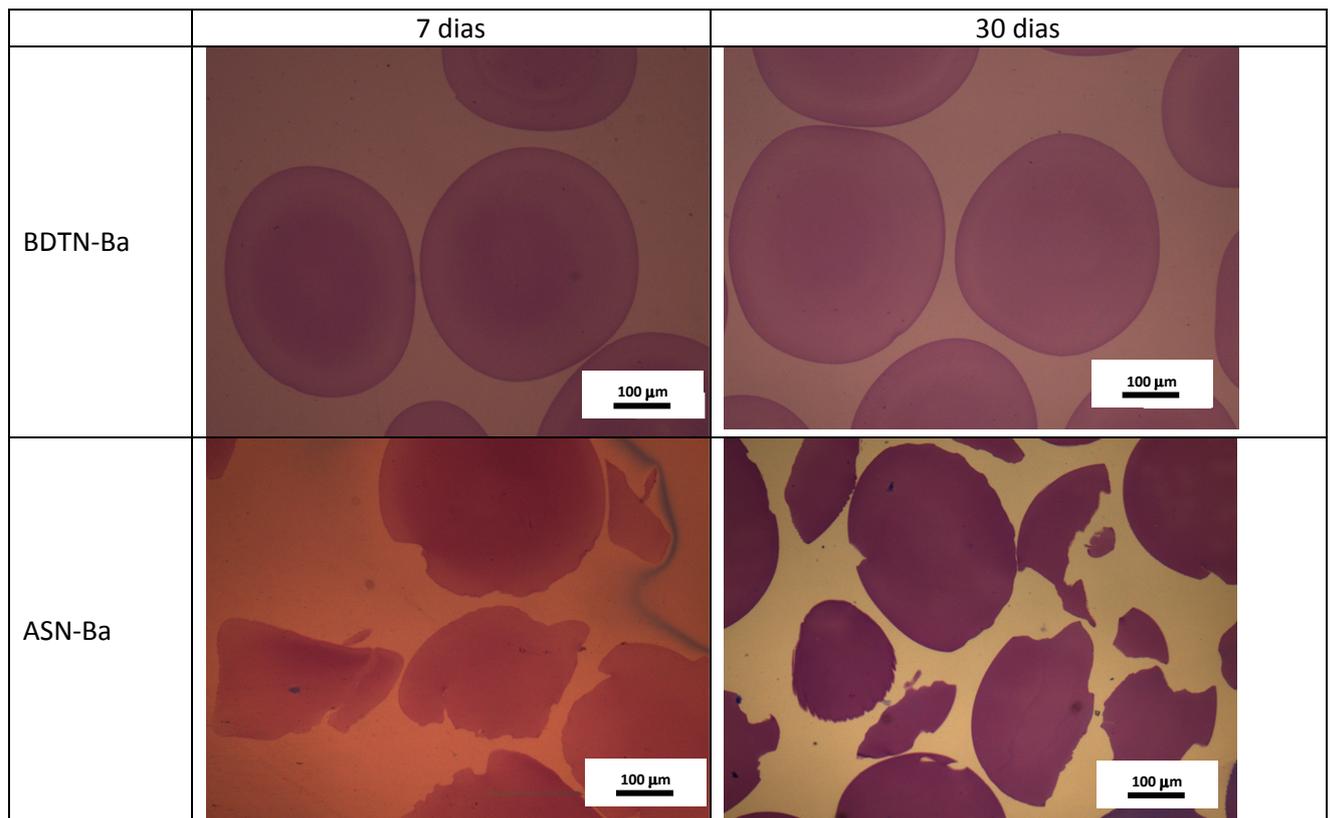


Figura 20: Microcápsulas vazias de BDTN-Ba ou ASN-Ba extraídas 7 e 30 dias após implante em camundongo Balb/c. Corte histológico corado com azul de toluidina, aumento de 40x.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar estruturalmente a superfície das microcápsulas explantadas da cavidade peritoneal. Até o trigésimo dia as microcápsulas de BDTN-Ba apresentaram-se esféricas sem evidências de erosão ou deformação da superfície (**Figura 21**). Contudo, estruturas semelhantes à fibrina, comumente presente em cirurgias no peritônio, foram observadas aderidas à superfície do biomaterial. Microcápsulas de ASN-Ba apresentaram depósito protéico similar, observado em ambos os períodos experimentais (**Figura 22**). Adicionalmente, foram observadas, neste mesmo material (ASN-Ba), ranhuras que eram evidentes no aumento de 200X e erosão ou deformação na superfície das microcápsulas no explante após 7 dias evidentes em aumento de 5.000X, demonstrando a instabilidade do material em estudo (**Figura 22**).

Na **figura 23** foi possível comparar os quatro tipos de microcápsulas estudados produzidas com o alginato AUP: ALG-Ba, ALG-Ca, BDTN-Ba e BDTN-Ca. No aumento de 200X observou-se a

presença de ranhuras apenas nas microcápsulas confeccionadas com cálcio. A textura observada no aumento de 5.000X para as microcápsulas confeccionadas com bário é menos rugosa e mais homogênea quando comparada com aquelas confeccionadas com cálcio. No entanto, observa-se a presença de ondas suaves nas microcápsulas de ALG-Ba, as quais estão ausentes naquelas de BDTN-Ba.

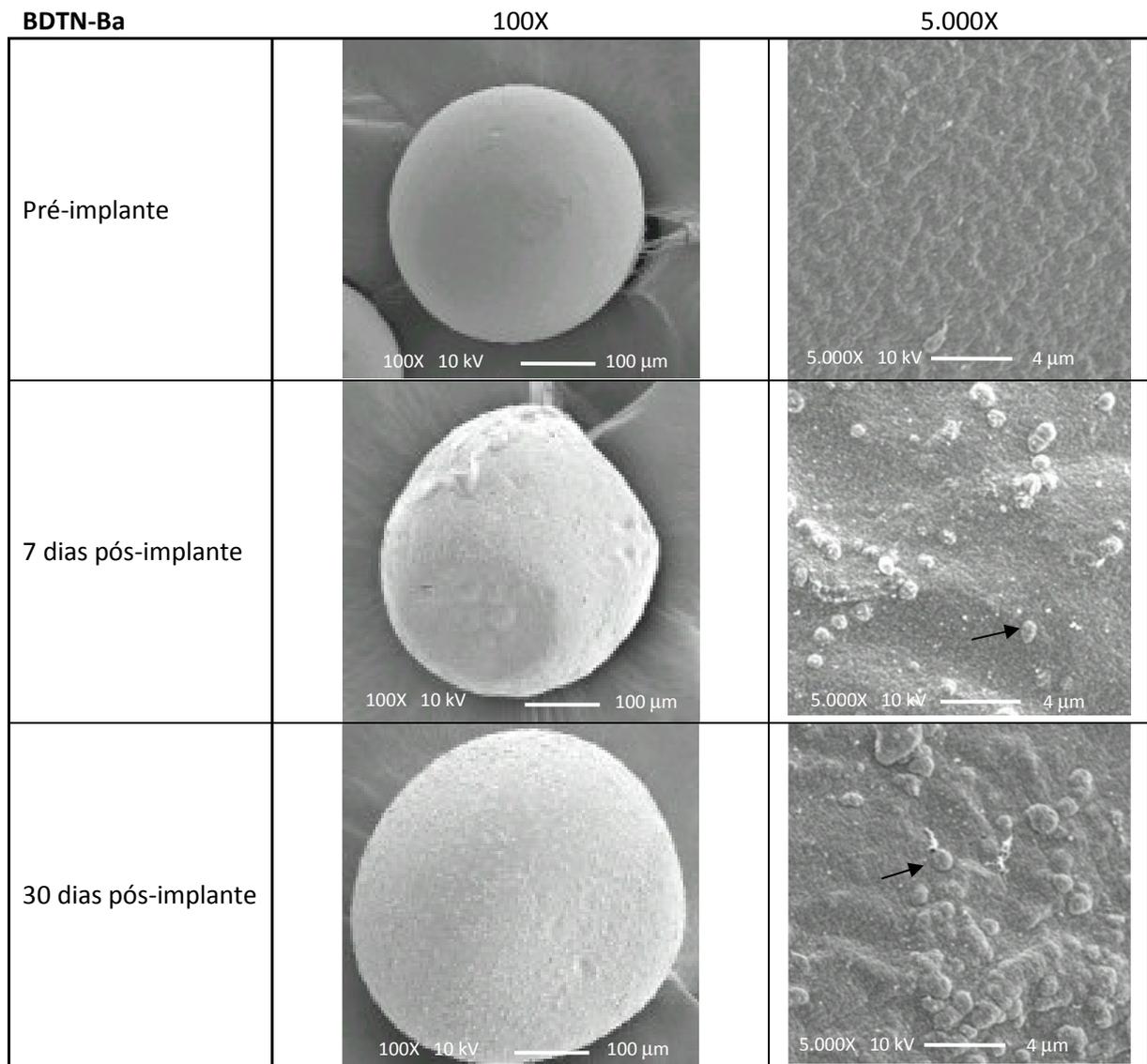


Figura 21: Micrografias obtidas em MEV de microcápsulas de BDTN-Ba antes e após o implante de 7 e 30 dias na região intraperitoneal de camundongos Balb/c. Aumento de 100X e 5.000X. As setas indicam a presença de estruturas semelhantes à fibrina.

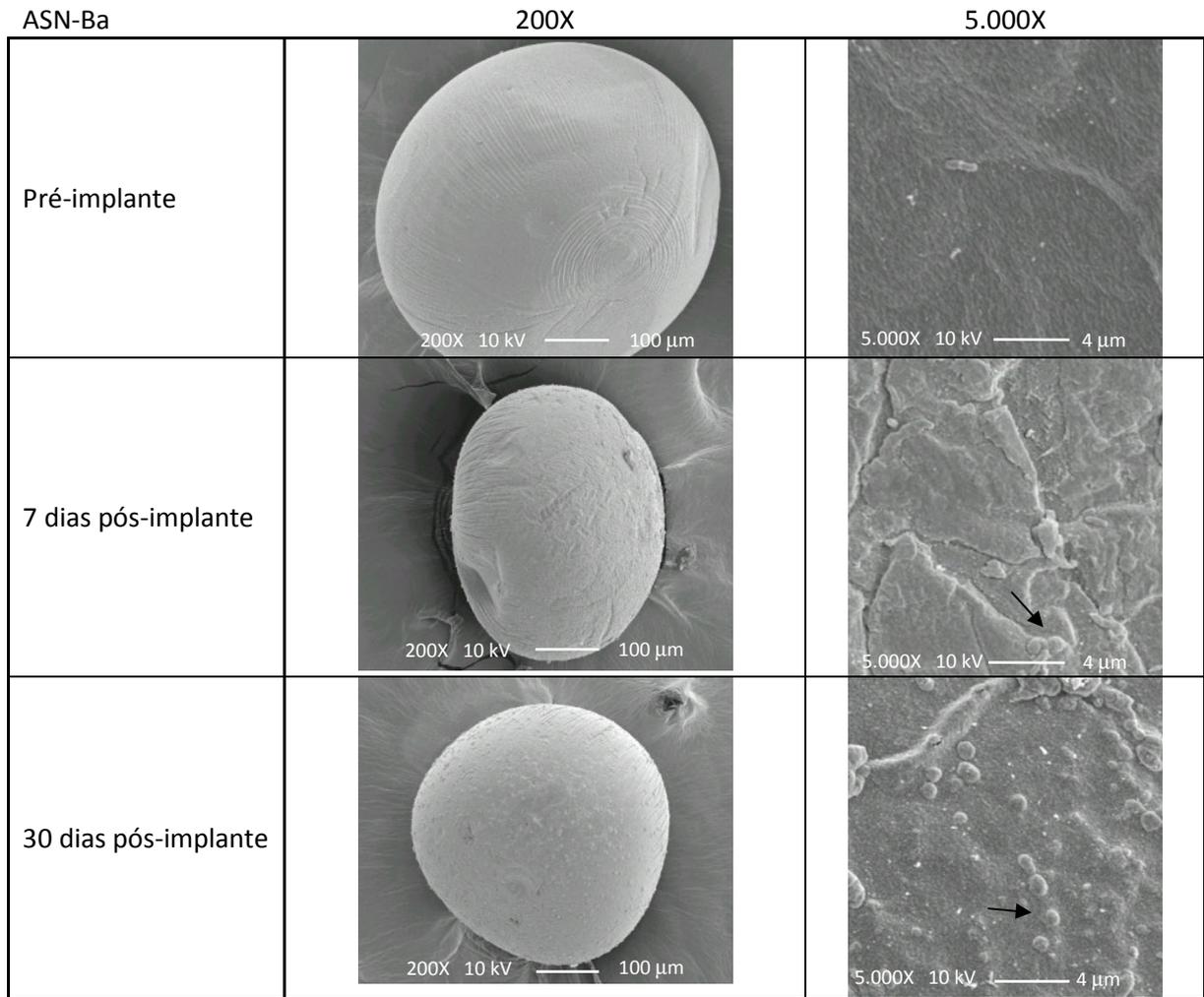


Figura 22: Micrografias obtidas em MEV de microcápsulas de ASN-Ba antes e após o implante de 7 e 30 dias na região intraperitoneal de camundongos Balb/c. Aumento de 200X e 5.000X. As setas indicam a presença de estruturas semelhantes à fibrina.

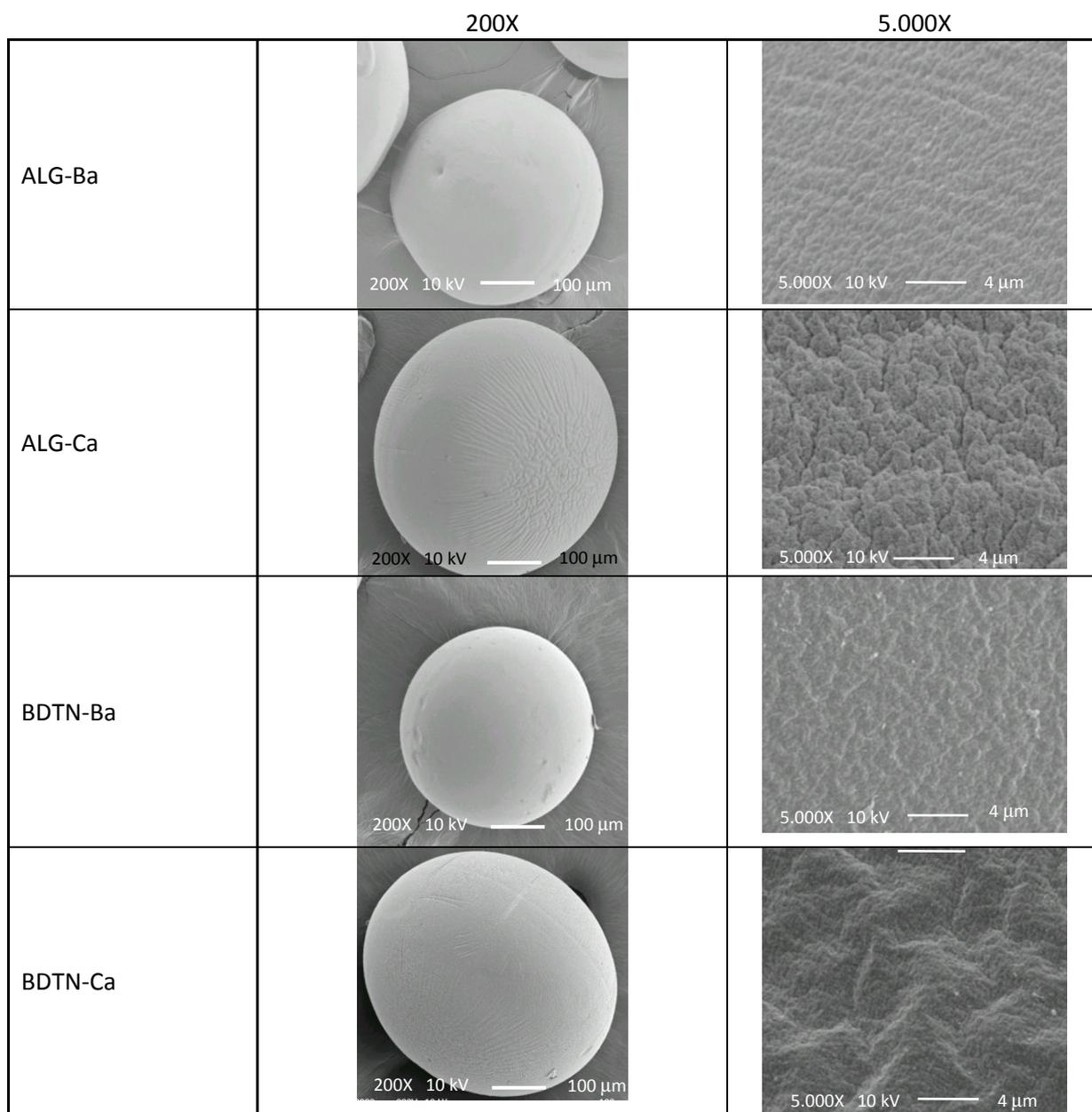


Figura 23: Micrografias obtidas em MEV de microcápsulas de ALG-Ba, ALG-Ca, BDTN-Ba e BDTN-Ca produzidas com o alginato AUP. Aumento de 200X e 5.000X.

4.9. Avaliar a habilidade de ilhotas humanas microencapsuladas em reverter a hiperglicemia de camundongos diabéticos em um modelo de xenotransplante

A utilização de alginato ultrapurificado (AUP) associada ao emprego de concentrações adequadas de íons bário ou cálcio na gelificação do alginato permitiu a confecção de microcápsulas de Biodritina® com uma ótima estabilidade mecânica e propriedades de materiais biocompatíveis. Dessa forma, ilhotas humanas nuas ou microencapsuladas com BDTN-Ba ou BDNT-Ca foram implantadas na cavidade peritoneal de camundongos diabéticos imunocompetentes, visando a avaliação funcional *in vivo* das ilhotas microencapsuladas (**Figura 24**).

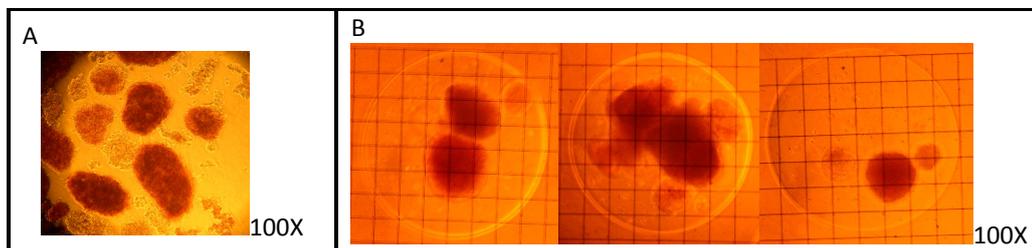


Figura 24: Ilhotas de Langerhans isoladas de pâncreas humano coradas com ditizona. **A:** ilhotas nuas - aumento de 100X; **B:** ilhotas humanas microencapsuladas em BDTN-Ba, aumento de 100X, grade com quadrados de 100 µm de lado.

Os animais diabéticos que receberam um implante de ilhotas microencapsuladas com BDTN-Ca alcançaram a normoglicemia logo após a cirurgia (**Figura 25-A**). A normoglicemia foi mantida por 46 dias, período durante o qual a massa corpórea dos animais foi mantida (**Figura 25-B**). No quadragésimo sexto dia após o implante as ilhotas microencapsuladas com BDTN-Ca foram retiradas e os animais foram mantidos vivos para o monitoramento da sua glicemia. Este procedimento permitiu confirmar que a reversão do diabetes deveu-se ao implante de ilhotas microencapsuladas e não da regeneração das ilhotas dos pâncreas destes animais. As ilhotas microencapsuladas explantadas foram avaliadas ao microscópio óptico quanto à adesão de células em sua superfície, verificando-se que 65% das microcápsulas observadas estavam livres desta adesão ou com uma adesão menor que 50% (**Figura 26**). Microcápsulas de BDTN-Ca vazias infundidas em animais diabéticos apresentaram 100% de ausência desta adesão (**Figura 26**).

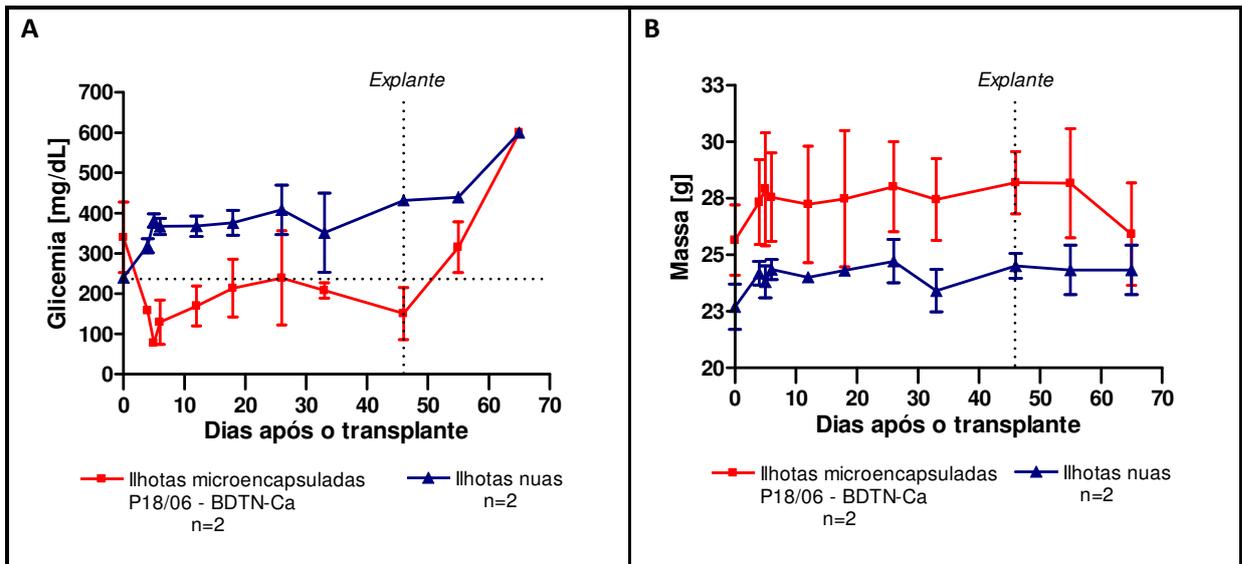


Figura 25: Glicemia (A) e massa corpórea (B) de camundongos Balb/c, diabéticos, após transplante de 3.000 IEQ de ilhotas humanas purificadas do pâncreas P18/06. Ilhotas microencapsuladas em BDTN-Ca (quadrados vermelhos) e ilhotas nuas (triângulos azuis). Os pontos representam as médias \pm SEM.

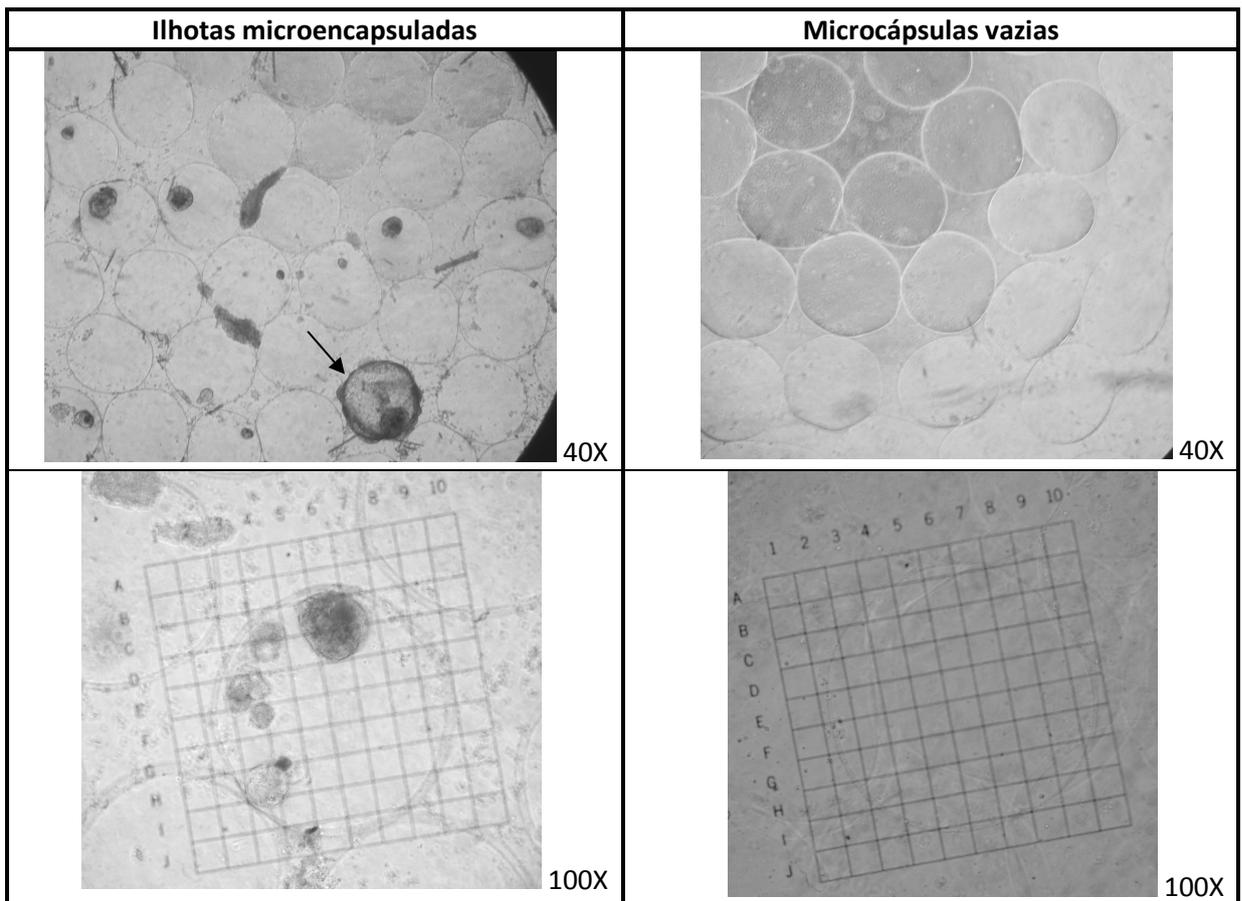


Figura 26: Avaliação ao microscópio óptico de microcápsulas vazias ou contendo ilhotas explantadas de animais diabéticos. Aumento de 40X e 100X, grade com quadrados com 100 μ m de lado. Aumento de 100X. A seta indica uma microcápsula com crescimento pericapsular abundante.

Os animais diabéticos que receberam ilhotas provenientes de três pâncreas diferentes e que foram microencapsuladas com BDTN-Ba, alcançaram a normoglicemia logo após o implante (**Figura 27**). A normoglicemia se manteve por 62, 80 e 83 dias para as ilhotas provenientes dos pâncreas P17/06, P05/07 e P08/07, respectivamente. Durante o período de reversão do diabetes os animais mantiveram ou ganharam massa corpórea (**Figura 27**). O teste oral de tolerância à glicose foi realizado com animais que receberam as ilhotas do P05/07 e P08/07, duas e três semanas após o implante, respectivamente (**Figura 28**). Os animais que receberam ilhotas do P05/07 microencapsuladas apresentaram uma resposta semelhante aos animais do grupo controle não diabético, validando, portanto, a qualidade e funcionalidade destas ilhotas. Os animais que receberam ilhotas do P08/07 microencapsuladas apresentaram uma resposta ao TOTG mais rápida que os animais controle, alcançando a normoglicemia 15 minutos após a gavagem, confirmando, assim, a viabilidade e funcionalidade das ilhotas.

A retirada do implante destes animais também confirmou a funcionalidade das ilhotas microencapsuladas (**Figura 27**). Os animais que receberam ilhotas do P05/07 já apresentavam alterações da glicemia no dia do explante, com valores de glicemia acima de 200 mg.dL^{-1} . O ensaio funcional *in vitro*, realizado com as ilhotas microencapsuladas explantadas, confirmou o seu mau funcionamento, com um índice de secreção de insulina menor que 1 ($0,5 \pm 0,05$). Em contrapartida, o índice de secreção de insulina das ilhotas do P08/07 microencapsuladas e explantadas foi maior do que 1 ($1,2 \pm 0,5$), sendo importante enfatizar que no dia do explante metade dos animais apresentava uma glicemia inferior a 200 mg.dL^{-1} .

As microcápsulas explantadas também foram avaliadas sob o microscópio óptico quanto à adesão de células em sua superfície (**Figura 29-A**). Aproximadamente 71% das microcápsulas contendo ilhotas do pâncreas P17/06 e 73% do P08/07 explantadas estavam livres desta adesão ou apresentando uma cobertura celular menor do que 50% (**Figura 29-A**). Por outro lado, apenas 22% das microcápsulas contendo ilhotas do pâncreas P05/07 apresentavam essas características (**Figura 29-A**).

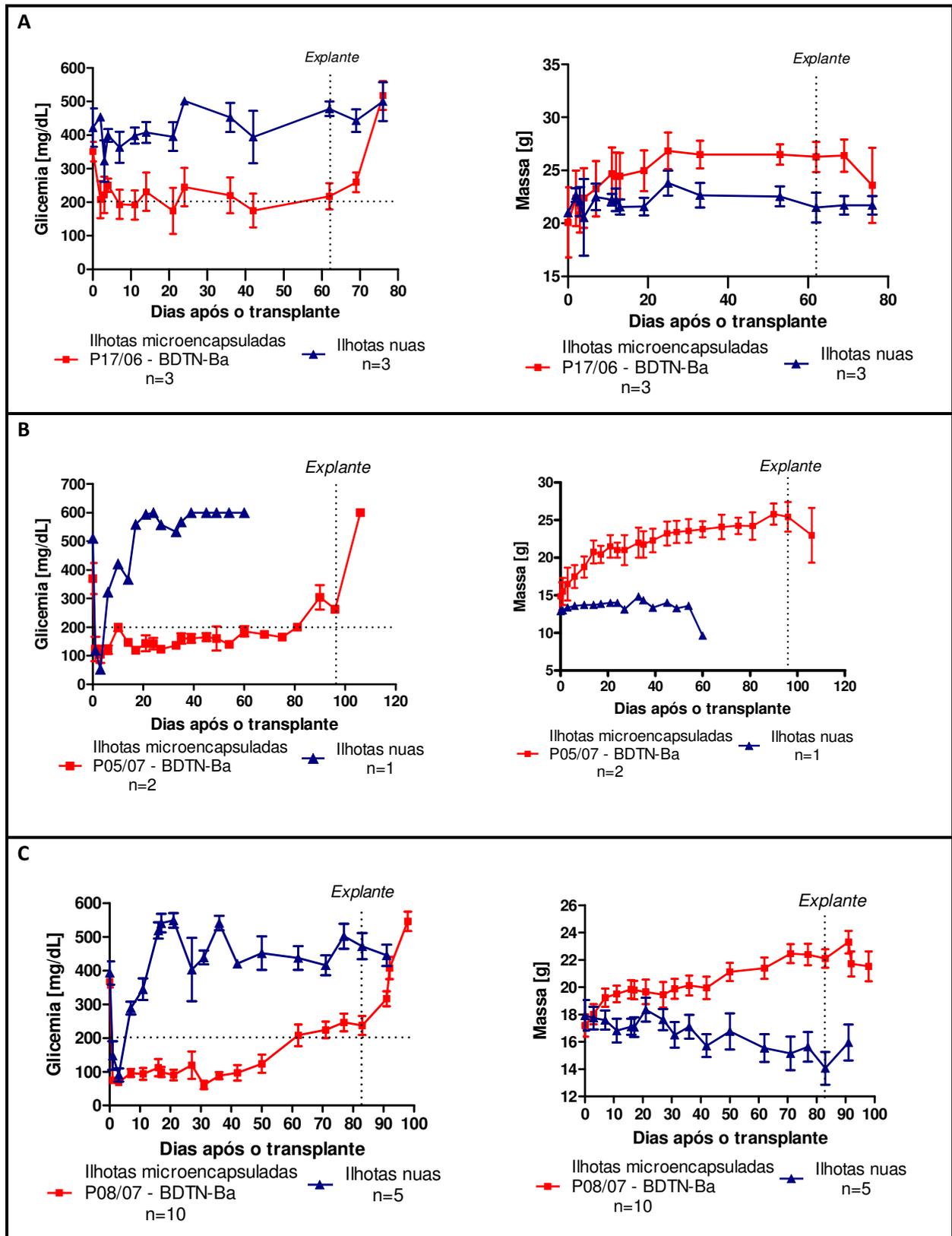


Figura 27: Glicemia e medidas de massa corpórea de camundongos Balb-c, diabéticos, após xenotransplante de ilhotas humanas purificadas dos pâncreas P17/06 (A), P05/07 (B) e P08/07 (C). Ilhotas microencapsuladas com BDTN-Ba (quadrados vermelhos). Ilhotas nuas (triângulos azuis). Os pontos representam as médias \pm SEM.

A contagem celular revelou a presença de uma concentração maior de células no lavado peritoneal de animais diabéticos do que no lavado peritoneal de animais com o diabetes controlado e de animais controle, não diabéticos (**Figura 28-B**).

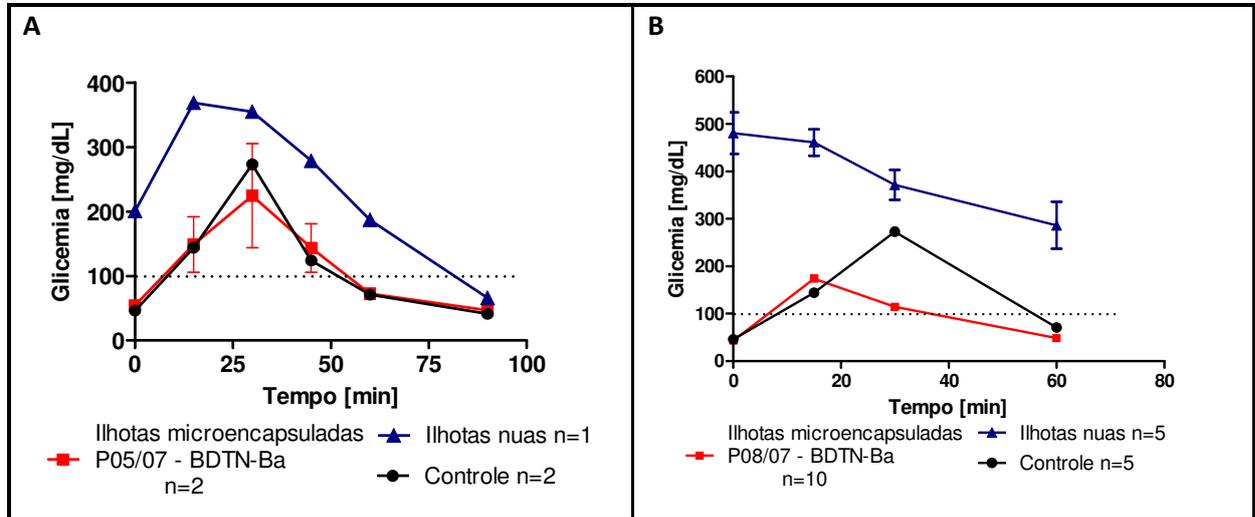


Figura 28: Teste oral de tolerância à glicose realizado em animais controle (círculos pretos) e em animais diabéticos, transplantados com ilhotas microencapsuladas (quadrados vermelhos) e ilhotas nuas (triângulos azuis), isoladas dos pâncreas P05/07 (**A**) e P08/07 (**B**). Os pontos representam as médias \pm SEM.

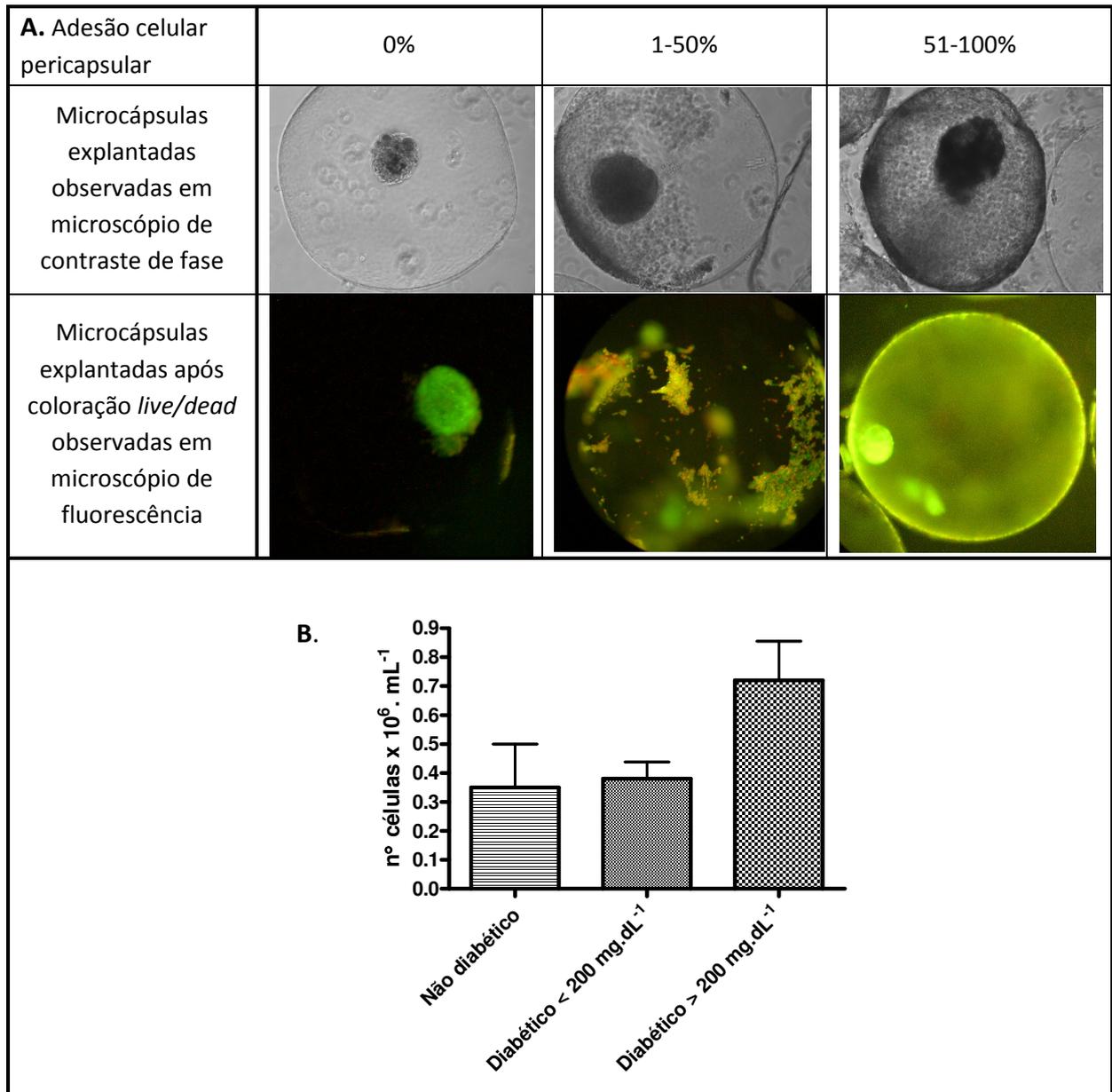


Figura 29: A. Fotos representativas correspondentes à avaliação da porcentagem de adesão celular sobre a superfície de microcápsulas explantadas. As fotos foram obtidas em microscópio de contraste de fase e em microscópio de fluorescência após coloração *live/dead*. Aumento de 100X. **B.** Avaliação comparativa entre a concentração de células presentes no lavado peritoneal no dia do explante de microcápsulas de animais agrupados da seguinte maneira: glicemia inferior a 200 mg.dL⁻¹, glicemia superior a 200 mg.dL⁻¹ e controle (não diabéticos). Estes valores representam a média dos três experimentos de avaliação *in vivo* da função de ilhotas microencapsuladas com BDTN-Ba em animais diabéticos.

4.10. Efeito do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* (TS) sobre células beta

4.10.1. Avaliação do ensaio de proliferação com incorporação de timidina tritiada por células RINm5F

O ensaio de proliferação celular utilizando o veneno de TS como agente indutor foi precedido por ensaios utilizando SFB como indutor para aperfeiçoar a resposta celular. Para isso, foram realizados estudos de densidade celular e de privação para soro. A concentração de 6×10^3 células por poço foi a que resultou no maior índice de proliferação após tratamento por 48 horas com 5% SFB. As densidades celulares testadas foram 3×10^3 , 6×10^3 , 1×10^4 , 3×10^4 células por poço (dados não mostrados).

O estudo de privação consistiu em privar as células completamente de SFB (0% SFB), ou mantê-las em 0,5% SFB, por 24 e 48 horas. O resultado foi que a privação total de SFB levou à morte das células RINm5F, as quais se soltaram da placa após 24 horas de privação. Já para a concentração de 0,5% SFB, a extensão do tempo de privação para 48 horas resultou no mesmo processo de morte e descolamento celular. Avaliou-se também, a retirada de glicose do meio de cultura sob privação de SFB. Da mesma forma, a retirada completa de glicose também resulta na morte destas células. Portanto, optou-se por um privação na presença de glicose e de 0,5% de SFB por 24 horas.

Ainda com o intuito de avaliar a condição da linhagem celular RINm5F disponível no laboratório, foram realizados ensaios de incorporação de timidina tritiada por células tratadas com concentrações crescentes de SFB e de glicose (**Figura 30**). Quanto maior a concentração de SFB, maior a resposta proliferativa das células. Sabe-se que a glicose é um indutor de proliferação para células beta, e na linhagem RINm5F estudada esta resposta foi confirmada.

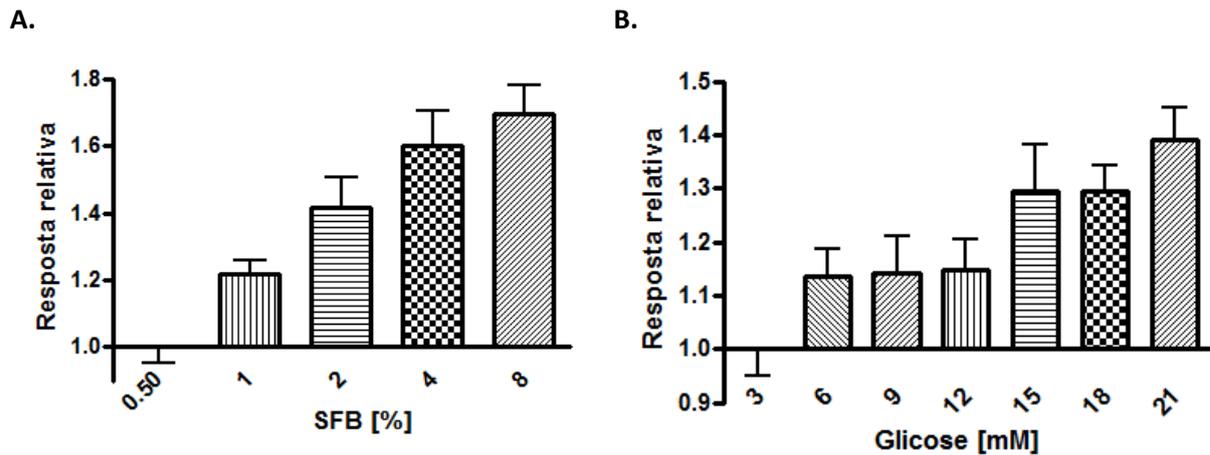


Figura 30: Ensaio de incorporação de timidina tritiada por células RINm5F tratadas com SFB (A) ou com glicose (B). Atribuiu-se um valor arbitrário de 1 à média das cintilações por minuto (cpm) das amostras tratadas com 0,5% de SFB. Os gráficos ilustram os resultados de dois experimentos independentes. Cada concentração foi testada em octuplicata. Barra - erro padrão (SEM).

4.10.2. Avaliação do efeito mitogênico do sobrenadante do veneno centrifugado (SVC) e das frações LMW e HMW sobre a linhagem celular RINm5F

Foi encontrado um índice de proliferação de $1,5 \pm 0,4$ através do ensaio de incorporação de timidina tritiada por células RINm5F tratadas com 6 ng.mL^{-1} de sobrenadante de veneno centrifugado (SVC) (Figura 31). Esta resposta apresentou-se significativa estatisticamente, com um $p < 0,001$.

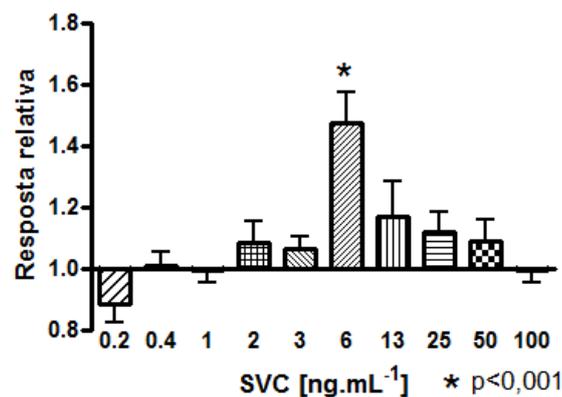


Figura 31: Ensaio de incorporação de timidina tritiada por células RINm5F tratadas com concentrações crescentes de SVC. Atribuiu-se um valor arbitrário de 1 à média das CPM do controle mantido em 0,5% SFB. Resultados de quatro experimentos independentes. Cada concentração foi testada em se xtuplicata. Barra - erro padrão (SEM).

No entanto, o efeito proliferativo do SVC foi ainda maior em frações semi-purificadas. A conhecida complexidade de moléculas presentes no extrato bruto do veneno pode minimizar o efeito desejável. Após o pré-fractionamento em membrana Centricon® contendo um poro com corte

de 10 kDa observou-se que a fração com massa molecular inferior a 10 kDa (LMW) produziu uma resposta relativa de $2,1 \pm 0,7$ para a diluição de $0,5 \times 10^{-7}$ vezes em relação a amostra base LMW (figura 32).

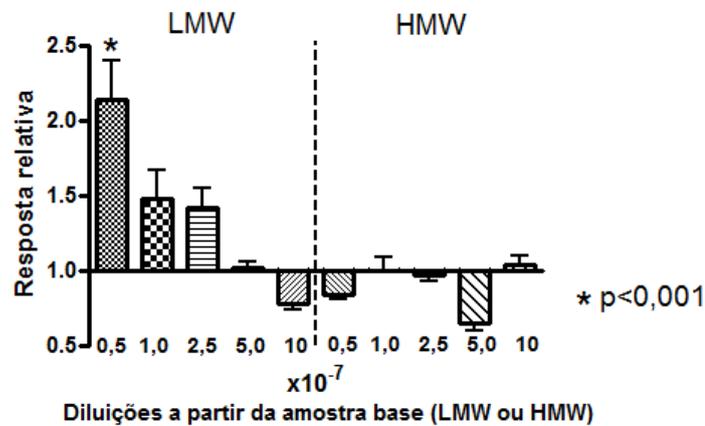


Figura 32: Ensaio de incorporação de timidina tritiada por células RINm5F tratadas com frações do veneno com massa molecular <10 kDa e > 10 kDa. Fração <10kDa = LMW e fração >10kDa = HMW. Atribuiu-se um valor arbitrário de 1 à média das CPM do controle mantido em 0,5% SFB. Resultados de dois experimentos independentes. Cada concentração foi testada em octuplicata. Barra - erro padrão (SEM).

4.10.3. Avaliação da atividade metabólica das células beta após tratamento com o SVC por redução do sal tetrazólio (MTT)

O ensaio de MTT realizado para células RINm5F tratadas com o SVC revelou a manutenção da atividade metabólicas nestas células tratadas (Figura 33). Além disso, observou-se uma resposta relativa significativa para três concentrações testadas, 0,1; 1,0 e 10 ng.mL^{-1} , com $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente.

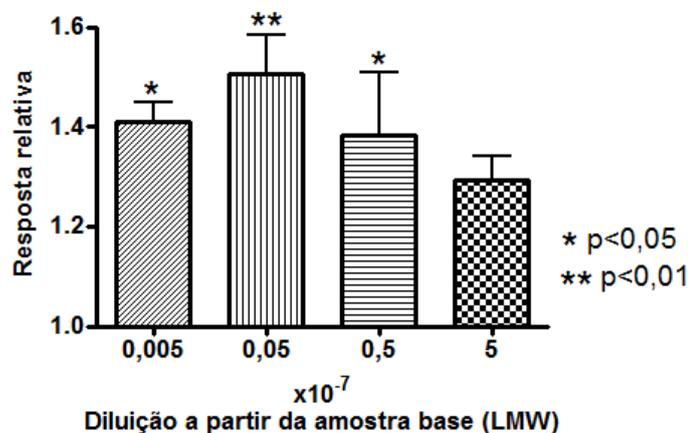


Figura 33: Ensaio de MTT com células RINm5f tratadas com o SVC. Atribuiu-se um valor arbitrário de 1 à média das absorbâncias do controle mantido em 0,5% SFB. Resultados de dois experimentos independentes, sendo que cada concentração foi testada em sextuplicata. Barra - erro padrão (SEM).

4.10.4. Fracionamento do SVC por HPLC em coluna de fase reversa C-18

O sobrenadante do veneno centrifugado (SVC) e a fração de baixa massa molecular (<10 kDa – LMW) foram submetidos à cromatografia em HPLC utilizando-se uma coluna de fase reversa (C18). Duas amostras de SVC foram analisadas, doravante denominadas lote 1 e 2. Na **figura 34** pode-se observar o perfil cromatográfico do lote 1 (RP1). Dos 16 picos avaliados, a fração contendo o pico 9 (tempo de retenção de 22,12 min) apresentou a maior atividade proliferativa sobre as células RINm5F, conforme avaliado no ensaio de incorporação de timidina tritiada (**Figura 35**). Para a concentração de 1 ng.mL^{-1} da fração 9 o índice de proliferação foi de $2,1 \pm 1,1$, com uma diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

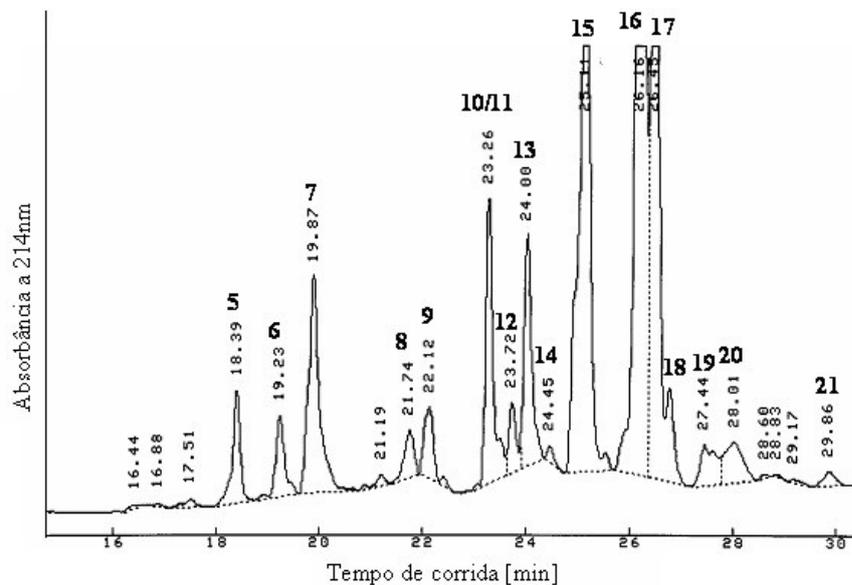
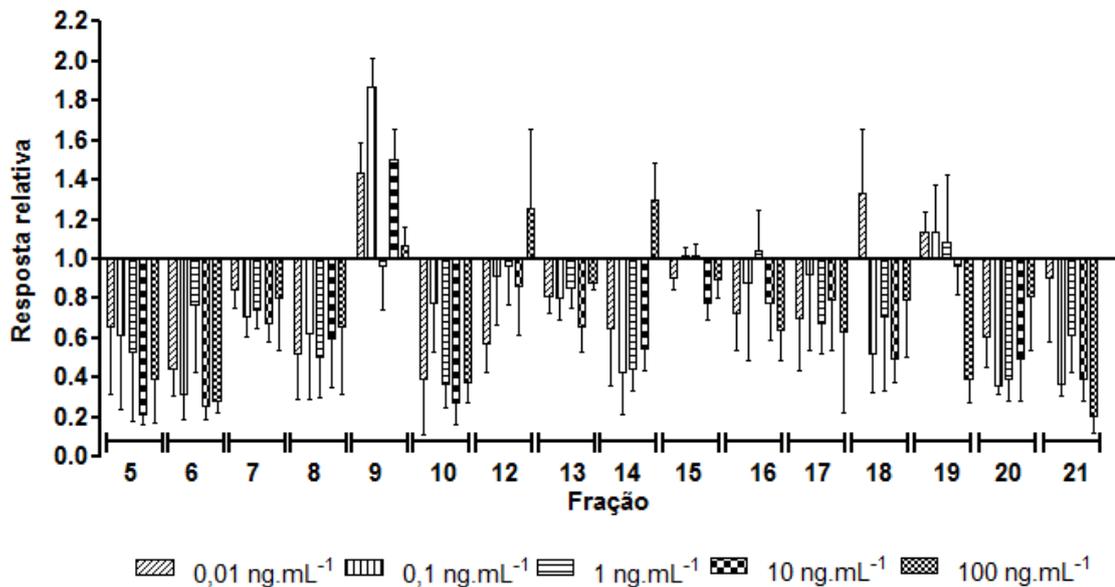


Figura 34: Perfil cromatográfico do SVC (lote 1) do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* após cromatografia de fase reversa, C-18, em HPLC. Os números apresentados acima de cada pico representam o tempo de retenção e logo acima destes, os números de identificação para cada pico testado.

A.



B.

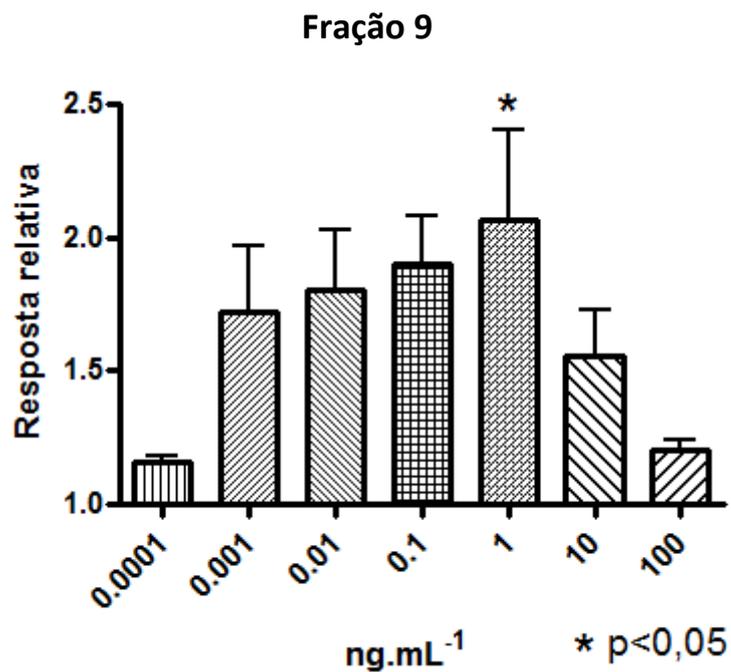


Figura 35: Ensaio de incorporação de timidina tritiada por células RINm5F: **A.** tratadas com as frações do lote 1 do veneno TS após fracionamento em coluna de fase reversa - RP1, resultado de três experimentos independentes. Cada concentração foi testada em quadruplicata; **B.** tratadas com a fração 9 da RP1, resultado de cinco experimentos independentes. Cada concentração foi testada em sextuplicata. Atribuiu-se um valor arbitrário de 1 à média das cpm do controle mantido em 0,5% SFB. Barra - erro padrão (SEM).

Os perfis cromatográficos apresentados na **figura 36** correspondem ao fracionamento da fração LMW (lote 2)(**Figura 36-A**) e a superposição das corridas das frações LMW e HMW (lote 2)(**Figura 36-B**). Dos 9 picos candidatos no perfil da RP2 - fração LMW, a fração contendo o pico 6 (tempo de retenção de 22,23 min) apresentou atividade proliferativa segundo o ensaio de incorporação de timidina tritiada (**Figura 37**). Pode-se observar que na concentração de $0,001 \text{ ng.ml}^{-1}$ a “fração 6” apresentou uma indução de $2,2 \pm 0,3$ vezes em relação ao controle negativo, com diferença significativa, $p < 0,01$. No perfil cromatográfico que superpõe o perfil de LMW e HMW, fica evidente a presença exclusiva deste pico de 22,23 min (“fração 6”) no perfil de LMW (figura 7-B).

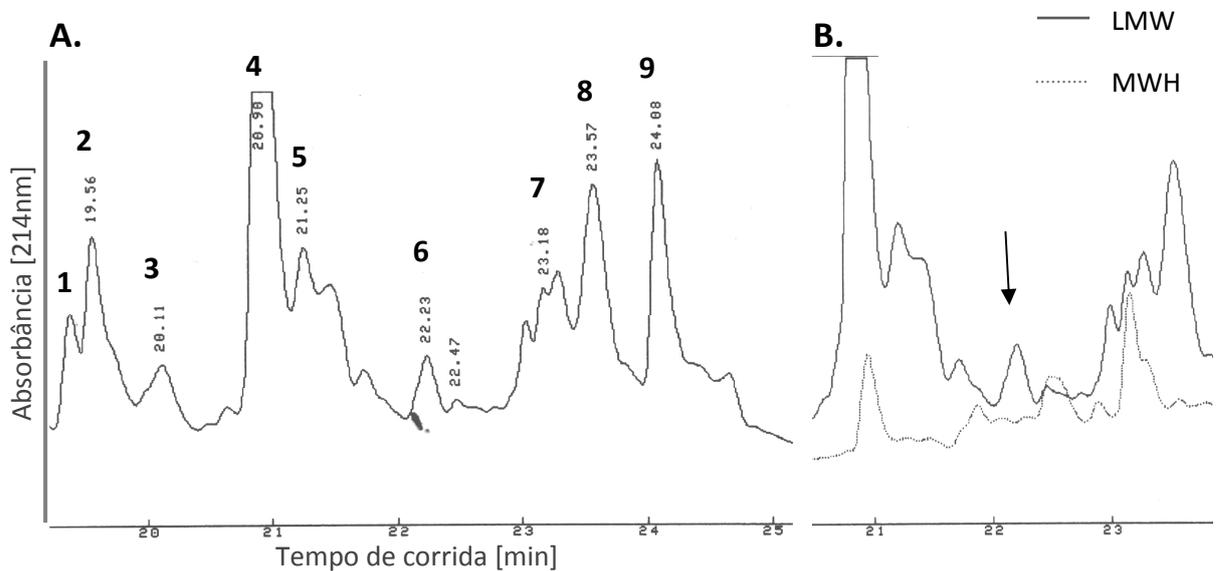


Figura 36: **A.** Perfil cromatográfico da fração LMW do veneno do escorpião TS após cromatografia de fase reversa, RP2. Os números apresentados acima de cada pico representam os tempos de retenção em minutos, seguidos pelas identificações de cada pico (1 a 9). **B.** Perfis cromatográficos sobrepostos da fração LMW (linha contínua) e da fração HMW (linha pontilhada) após cromatografia de fase reversa, RP2. A seta indica a fração com atividade proliferativa do veneno, “fração 6”.

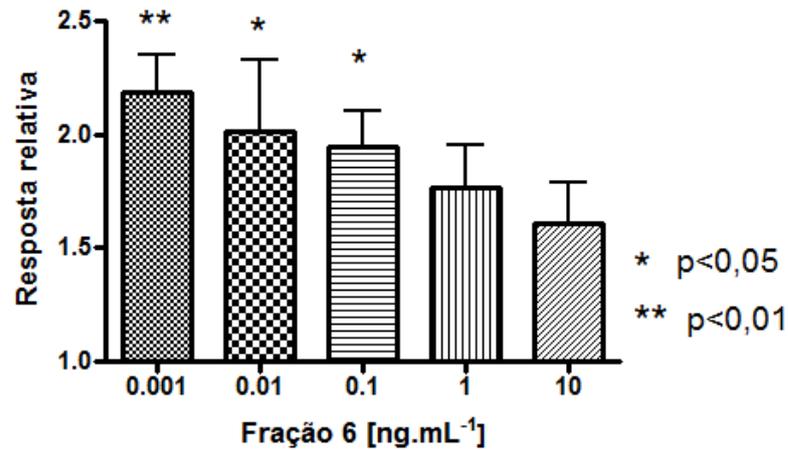


Figura 37: Ensaio de incorporação de timidina tritiada por células RINm5F tratadas com a fração 6 da RP2, resultado de três experimentos independentes. Cada concentração foi testada em sextuplicata. Atribuiu-se um valor arbitrário de 1 à média das CPM do controle mantido em 0,5% SFB. Barra - erro padrão da média (SEM).

4.10.5. Avaliação do efeito do veneno de escorpião sobre a secreção de insulina por ilhotas pancreáticas humanas

Ilhotas pancreáticas humanas incubadas com a “fração 9” do veneno por 48 horas foram avaliadas quanto à sua capacidade de secretar insulina *in vitro* durante a incubação com baixa (2,8 mM) e alta (20 mM) concentração de glicose. Ilhotas tratadas com a concentração de 0,001 ng.mL⁻¹ da fração 9 do veneno de *Tityus serrulatus* apresentaram um índice de liberação de insulina significativamente superior ao controle contendo ilhotas não tratadas, $p < 0,05$ (Figura 38).

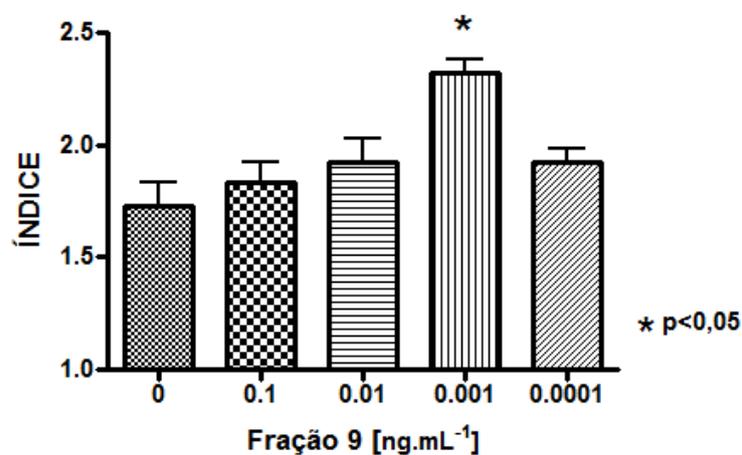


Figura 38: Índice de secreção de insulina de ilhotas humanas tratadas ou não com a fração ativa do veneno *T. serrulatus* (“fração 9” – RP1). Resultado de dois experimentos independentes. Cada concentração foi testada em triplicata. Barra - erro padrão da média (SEM)

4.10.6. Avaliação do efeito do veneno de escorpião sobre a expressão de insulina e PCNA por ilhotas pancreáticas humanas

Realizou-se qPCR de ilhotas pancreáticas humanas tratadas com as frações ativas do veneno, “fração 9” ou “fração 6”, com o objetivo de avaliar a indução da expressão dos genes de insulina e de PCNA. Como pode ser observado, na **figura 39**, houve uma indução significativa ($p < 0,001$) da expressão do RNA mensageiro de insulina em amostras tratadas com a concentração de $0,0001 \text{ ng.mL}^{-1}$ das duas frações ativas do veneno. Estas frações ativas também foram capazes de induzir a expressão do gene de proliferação PCNA nas mesmas ilhotas tratadas com a concentração de $0,0001 \text{ ng.mL}^{-1}$, com uma diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$ (**Figura 40**).

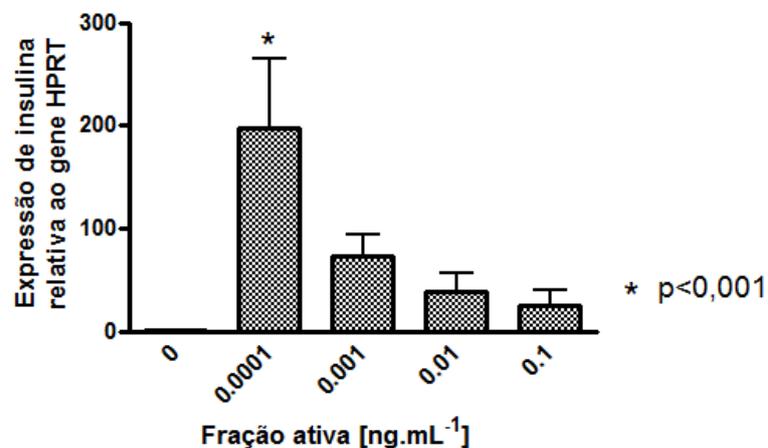


Figura 39: Efeito da fração ativa do veneno sobre a expressão do RNA mensageiro de insulina em células beta de ilhotas pancreáticas humanas após incubação por 48 horas. Avaliação quantitativa da expressão por qPCR, gene constitutivo HPRT. Resultado de dois experimentos independentes, um com a “fração 9” e outro com a “fração 6”, cada concentração foi testada em duplicata. Barra - erro padrão (SEM).

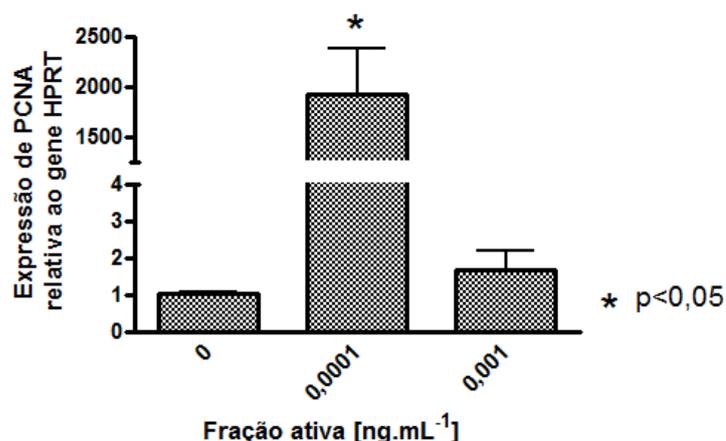


Figura 40: Efeito da fração ativa do veneno sobre a expressão do RNA mensageiro de PCNA em células beta de ilhotas pancreáticas humanas após incubação por 48 horas. Avaliação quantitativa da expressão por qPCR, gene constitutivo HPRT. Resultado de dois experimentos independentes, um com a “fração 9” e outro com a “fração 6”, cada concentração foi testada em duplicata. Barra - erro padrão (SEM).

5. Discussão

5.1. Obtenção de microcápsulas funcionais e biocompatíveis

Para a obtenção de microcápsulas funcionais e biocompatíveis é necessário responder três perguntas: a) o material ativa o sistema imune (reação do receptor ao corpo estranho)?; b) o material impede o funcionamento da célula microencapsulada (reação da célula ao corpo estranho)?; c) o material protege a célula microencapsulada do sistema imune (reação do receptor à célula dentro do corpo estranho)? Essas questões serão discutidas a seguir.

- **Obtenção de alginato livre de impurezas e de microcápsulas estéreis**

O alginato é um polímero natural e sua aplicação como um biomaterial depara-se com o desafio de eliminar os contaminantes que desencadeiam efeitos mitogênicos, citotóxicos e indutores de apoptose (Leinfelder et al., 2003). Dentre as impurezas comumente encontradas em amostras de alginato estão os polifenóis, as endotoxinas e as proteínas. A eliminação destas impurezas, mais do que a composição química do alginato em si, é o principal fator responsável pelo sucesso da aplicação das microcápsulas (Orive et al., 2005; Zhang et al., 2001; Zimmermann et al., 2003). Já foi demonstrada por histologia uma significativa resposta imunológica à microcápsulas com elevado conteúdo destas impurezas (Leinfelder et al., 2003).

A análise do alginato da Sigma Purificado (ASP) mostrou que o mesmo não possui as características adequadas para ser considerado um biomaterial aplicável ao uso clínico (**Tabela 2**). Os níveis elevados de endotoxinas e proteínas encontrados no ASP predisõem as microcápsulas à adesão de macrófagos em sua superfície, o que não apenas atrapalha o fluxo de nutrientes para as células microencapsuladas, mas também produz citocinas pró-inflamatórias conhecidas por ativar leucócitos, estimular a proliferação de fibroblastos e promover a migração de outras células inflamatórias secretoras de mais citocinas (Orive et al., 2005).

O ASP também apresentou um nível elevado de compostos polifenólicos (**Figura 6**) os quais estão associados com o evento de despolimerização catalisada e subsequente perda da viscosidade

do alginato (Skjak-Braek et al., 1989). De acordo com a viscosidade do alginato, obtém-se (ou não) microcápsulas de superfície uniforme. Entretanto, não só a viscosidade do alginato, mas o conteúdo de ácido gulurônico (G) e a massa molecular são fatores determinantes das propriedades morfológicas e funcionais das microcápsulas.

Os resultados da dinâmica de viscosidade do ASP (dez vezes menor do que a ideal para a concentração de 1%) associado à sua alta massa molecular (**Figura 7 e Tabela 2**) implicam na obtenção de microcápsulas pouco homogêneas e com tamanhos de poros grandes demais para impedir a passagem dos anticorpos.

O conteúdo de G encontrado no alginato determina o cátion divalente a ser utilizado para a sua gelificação. Alginatos com um alto conteúdo de G requerem íons bário para uma gelificação eficiente. Por outro lado, para gelificar alginatos com alto conteúdo de M deve-se utilizar o íon cálcio. As microcápsulas com alto conteúdo de G possuem maior resistência, enquanto as outras, maior elasticidade. Alginatos com um conteúdo de G intermediário permitem a obtenção de microcápsulas biocompatíveis (Orive et al., 2002) e com maior estabilidade e resistência mecânica (de Groot et al., 2004). O conteúdo de 31% de G encontrado no ASP (**Figura 8**) não é ideal, porém, os resultados da literatura não contemplam microcápsulas gelificadas em cloreto de bário e com sulfato de condroitina na sua composição. Portanto, o presente trabalho propôs utilizar o ASP para a produção de microcápsulas de BDTN-Ba. A utilização de cloreto de bário para a gelificação e o acréscimo de sulfato de condroitina ao alginato, o que configura a formulação típica da Biodritina[®], permitiram a confecção de microcápsulas com estabilidade mecânica superior (**Figura 9**).

Apesar da obtenção destas microcápsulas de ASP estáveis, a elevada presença das impurezas e o baixo conteúdo de G limitaram a continuidade dos ensaios com este material. Os dados descritos na literatura de ensaios com células/ilhotas encapsuladas com alginatos com essas características são de cápsulas que ativam o sistema imune sendo incapazes de imuno-protetor as células/ilhotas em seu interior. A inclusão de etapas adicionais no processo de purificação de alginato e a utilização de

outras fontes de alginato como amostra de partida estão sendo desenvolvidas pelo nosso grupo, visando à obtenção de alginato ultrapurificado e a independência da importação deste material.

Felizmente, o acesso ao alginato ultrapurificado (AUP), disponível comercialmente, permitiu avanços nos experimentos necessários à validação da Biodritina® como um biomaterial aplicável à reversão de diabetes em ensaios pré-clínicos. O conteúdo de 60% de G encontrado no AUP implicou na utilização de íons bário ou altas concentrações de íons cálcio para a gelificação de microcápsulas biocompatíveis e com maior resistência e estabilidade mecânica (**Figura 10**). Os resultados obtidos nos experimentos desta Tese, relativos a essa questão corroboram os dados discutidos na literatura (de Groot et al., 2004). Isso acontece porque no processo de gelificação, o íon cálcio se intercala entre as cadeias GG enquanto o íon bário se intercala entre dois tipos de cadeia, GG e MG, além de se ligar ao alginato com uma afinidade muito maior do que o íon cálcio (Zimmermann et al., 2007). Entretanto, a literatura sugere o uso exclusivo de íons bário quando o conteúdo de G for maior que 60% (Morch et al., 2006).

Nossos ensaios de avaliação das propriedades físico-químicas das microcápsulas gelificadas com cálcio (BDTN-Ca) versus bário (BDTN-Ba) apontaram as últimas como sendo as mais resistentes a estresses mecânicos, osmóticos e térmicos, conforme os resultados obtidos em experimentos *in vitro* (**Figuras 10, 11, 12 e 14**). Estes ensaios foram importantes para avaliar a durabilidade das microcápsulas durante os processos de produção e manipulação prévios ao implante, assim como para prever o comportamento das microcápsulas após o implante, quando estariam sujeitas a condições bastante adversas.

No ensaio de estabilidade mecânica (**Figura 10**) foi demonstrado que microcápsulas de BDTN-Ba são mais resistentes, fato confirmado pela ausência de ruptura e inchaço das microcápsulas durante o período de avaliação. Em contrapartida, as microcápsulas de BDTN-Ca apresentaram inchaço durante o experimento, o que comprometeu significativamente sua estabilidade. A estabilidade de uma microcápsula de alginato pode ser comprometida pela perda gradual de íons para o meio, o que pode ser avaliado através do aumento do diâmetro das microcápsulas (inchaço). Nossos resultados

(Figura 10) corroboram com os dados já descritos na literatura, os quais demonstraram uma resistência à compressão superior (três vezes maior) das microcápsulas de bário quando comparadas com aquelas gelificadas com íons cálcio (Orive et al., 2005).

Previamente ao transplante as microcápsulas devem se apresentar fisicamente íntegras. Para avaliar tal característica, alguns grupos propuseram um método denominado estresse osmótico no qual microcápsulas vazias ficam incubadas em solução hiposmótica de água ultrapura por um determinado período. Segundo De Vos e colaboradores (2002) a manutenção do diâmetro das microcápsulas nesta condição preconiza que a maioria das microcápsulas pode resistir aos estresses mecânico e osmótico após o implante na cavidade peritoneal. Os resultados obtidos com microcápsulas de BDTN-Ba e de BDTN-Ca durante este ensaio mostraram que ambos os materiais são resistentes a esses estresses (Figuras 10, 11 e 12). Além disso, Zimmermann e colaboradores (2007) publicaram resultados nos quais microcápsulas de bário expostas ao estresse osmótico apresentaram um inchaço máximo de 30%, enquanto as de BDTN-Ba, conforme avaliado em nossos experimentos, incharam apenas 25% (Zimmermann et al., 2007). A aplicação de estresse osmótico sobre as microcápsulas resulta em uma pressão sobre a superfície do biomaterial quando exposto à água, que pode resultar no rompimento da microcápsula (Thu et al., 1996a). Quanto maior a absorção de água pela microcápsula, menor a força de interação entre as cadeias de alginato, o que leva à diminuição da estabilidade do polímero. Após serem submetidas ao ensaio de estresse osmótico por uma semana, as microcápsulas de BDTN-Ba se apresentaram relativamente estáveis: apesar de apresentarem um aumento de 25% em seu volume, tornando-se mais amolecidas, apenas 35% destas microcápsulas se romperam. Em contrapartida, no mesmo ensaio de estresse osmótico, apenas 17% das microcápsulas de BDTN-Ca permaneceram íntegras. Aranaz e colaboradores (Aranaz et al., 2006) mostraram que a absorção de água pela microcápsula pode ser reduzida com o aumento da concentração do alginato.

No ensaio *in vivo* de estabilidade de microcápsulas vazias foi possível confirmar a biocompatibilidade do material BDTN. As microcápsulas certamente sofrem mudanças em sua forma

quando implantadas *in vivo*, e o grau desta mudança é dependente das características do ambiente onde elas se encontram, incluindo; a quantidade e a composição do fluido presente, a área disponível para a microcápsula ser instalada e a sua resistência física em relação aos tecidos vizinhos, além da sua própria composição (Thanos et al., 2007b). Como neste ensaio as microcápsulas foram implantadas na região subcutânea de ratos, elas foram reunidas em um granuloma que acabou por comprimi-las em um espaço restrito. Após romper o granuloma *ex vivo* para a visualização das microcápsulas, foi possível observar que as microcápsulas de BDTN-Ba haviam adquirido uma forma hexagonal estável, enquanto as microcápsulas de BDTN-Ca retomaram a forma arredondada. Esse resultado confirmou a característica esperada de rigidez das microcápsulas de BDTN-Ba e elasticidade das de BDTN-Ca (**Figura 13**).

- **Avaliação da permeabilidade e da citotoxicidade das microcápsulas**

A sobrevivência da célula microencapsulada depende de um balanço ótimo entre a permeabilidade da microcápsula (a qual determina a entrada de nutrientes essenciais e a saída de metabólitos tóxicos) e o tamanho limite do seu poro (o qual define o tamanho molecular máximo capaz de transitar através da membrana). Este balanço é importante para garantir a imunoproteção sem que haja perda da viabilidade e função da célula microencapsulada. Acredita-se que a massa molecular de corte ideal esteja em torno de 100 kDa, o que permitiria a troca de nutrientes como albumina (66 kDa) e preveniria a entrada de imunoglobulinas (IgG=146 kDa; IgA=950 kDa; IgM=300 a 400 kDa) e de alguns componentes do sistema de complemento (C1q=410 kDa) (van Montfoort et al., 2007). Uma variedade de técnicas vem sendo empregada para estudar a permeabilidade de microcápsulas, tais como: difusão de dextranas de peso molecular conhecido (Coromili and Chang, 1993), cromatografia de exclusão molecular (Brissova et al., 1998), e difusão de proteínas de massa molecular conhecida (Ribeiro, 1999). Nesta Tese foi utilizada uma técnica alternativa que envolveu microencapsular células e analisar por eletroforese desnaturante as proteínas que difundiam para o meio de cultura nos quais as células microencapsuladas foram mantidas durante 15 dias (Haque et al., 2004). Com este experimento foi possível observar a quantidade de proteína produzida pelas

células microencapsuladas (**Figura 15**) e avaliar o perfil protéico do sobrenadante através de análise por eletroforese (**Figura 16**). Microcápsulas de BDTN e ALG gelificadas em cálcio e bário foram analisadas. Não foi possível observar diferença no limite de poro para microcápsulas gelificadas com o mesmo íon em materiais diferentes, mas observou-se que o limite de poro das microcápsulas gelificadas em cálcio (100 kDa) era maior do que o das microcápsulas gelificadas em bário (70 kDa). Os quatro tipos de microcápsulas apresentaram, portanto, uma permeabilidade desejável e ao final do experimento as células nelas microencapsuladas produziam quantidades de proteínas sem diferenças significativas.

Também corroborando os nossos resultados, experimentos realizados por Mørch e colaboradores (2006) mostraram que microcápsulas contendo alto conteúdo de G apresentaram poros menores quando gelificadas com bário em comparação com microcápsulas gelificadas com cálcio. Este grupo de pesquisadores também demonstrou que é possível reduzir o tamanho do poro ao aumentar a concentração de bário na solução de gelificação para microcápsulas confeccionadas com alginato contendo alto conteúdo de G. Independente do íon sabe-se que géis produzidos com alginato de alto conteúdo de G têm a estrutura dos poros mais aberta e exibem maiores taxas de difusão para proteínas (Martinsen et al., 1992).

Estudos de difusão molecular permitiram, ainda, avaliar o diâmetro dos poros de microcápsulas confeccionadas com alginato. Os diâmetros mensurados em microcápsulas de ALG-Ba variavam desde aproximadamente 4 nm (Zimmermann et al., 2005) a 50 a 150 nm (Kang and Schwendeman, 2006), enquanto os diâmetros dos poros de microcápsulas de ALG-Ca situavam-se nas faixas entre 5 e 200 nm (Andresen et al., 1977) ou 12 e 16 nm (Klein et al., 1983). Sabe-se que o raio molecular da insulina varia de 1,5 a 4 nm e o da IgG é de aproximadamente 7,5 nm, sendo importante, portanto, que os poros tenham um raio entre 4 e 7 nm para a obtenção de uma microcápsula funcional. Além disso, Mullon (1999) demonstrou que poros de 150 nm presentes nas microcápsula já seriam suficientes para reduzir, de um fator de 100.000 vezes, o risco de transmissão do retrovírus endógeno suíno, no caso de ilhotas suínas microencapsuladas (Mullon, 1999).

O artifício comumente utilizado para controlar o tamanho do poro de microcápsulas de alginato confeccionadas com íons cálcio é o seu revestimento com policátions (poli-L-lisina, poli-L-ornitina, dentre outros) (de Vos et al., 2006). O revestimento com os policátions é realizado depois da confecção das microcápsulas de alginato, as quais são mergulhadas na solução de policátion e em seguida novamente colocadas em solução de alginato para recobrir os policátions, que, conhecidamente, induzem resposta inflamatória ao implante (Clayton et al., 1991). Também é possível dificultar a difusão de proteínas em microcápsulas ao reduzir o pH utilizado durante a gelificação ou aumentar a concentração do alginato (Ribeiro, 1999).

A difusão de pequenas moléculas, como a glicose (180 Da), não é afetada pela matriz do alginato, enquanto a difusão de proteínas de alto peso molecular tem se mostrado dependente não só das suas massas moleculares, mas também, das suas cargas residuais (Ribeiro, 1999).

Ribeiro (1999), ao trabalhar com microcápsulas de BDTN-Ca confeccionadas com alginato de alto conteúdo de M, comprovou que proteínas pequenas em relação aos poros das microcápsulas e com cargas residuais positivas, se difundem facilmente para dentro das microcápsulas, e ligam-se eletrostaticamente ao polímero, como observado com a proteína Citocromo C. Por outro lado, quando a proteína tem carga residual positiva e tamanho próximo ao dos poros do biomaterial, ocorre crescente dificuldade na sua difusão para dentro da microcápsula. Além disso, quando a proteína apresenta carga residual negativa, mesmo que tenha seu tamanho menor do que o dos poros da microcápsula apresenta dificuldade em se difundir para dentro da mesma, como é o caso da albumina. Da mesma maneira, a insulina, uma proteína de 5,8 kDa, pI de 5,30 e, portanto, com carga residual negativa em pH neutro, quando microencapsulada, é rapidamente liberada da microcápsula (Ribeiro, 1999).

Os ensaios de atividade funcional de ilhotas humanas microencapsuladas em BDTN-Ba também permitiram observar a livre difusão de insulina através da microcápsula, sendo que não houve diferença significativa no índice de secreção de insulina de ilhotas microencapsuladas em relação ao de ilhotas nuas (**Figura 18**). Esse ensaio também comprovou a ausência de toxicidade do material

para as células microencapsuladas. A medida desta atividade funcional é considerada clássica para verificar a viabilidade da ilhota e para prever o sucesso no transplante delas em animais.

Apesar das microcápsulas de BDTN-Ba mostrarem-se mecanicamente resistentes e permeáveis à insulina, ainda foi necessário demonstrar sua permeabilidade a oxigênio, nutrientes e outros produtos celulares. Essa permeabilidade é essencial para a sobrevivência das células microencapsuladas por um longo período. Com este objetivo, células RINm5F microencapsuladas em BDTN-Ba, ALG-Ba, BDTN-Ca e ALG-Ca, foram mantidas em cultivo por até 15 dias e a sua atividade metabólica monitorada ao longo destes dias através do ensaio de MTT (**Figura 17**). Neste ensaio foi possível observar que os materiais não são citotóxicos e detectar um aumento do número de células no interior das microcápsulas, uma semana após o início do experimento. Após este período, nas microcápsulas confeccionadas com bário as células mantiveram a sua atividade metabólica, porém sem aumentar em número. Este resultado poderia estar relacionado à maior resistência mecânica destas microcápsulas, que apresentam um espaço limitado para a acomodação de novas células. A característica elástica das microcápsulas gelificadas com cálcio não apenas permitiu o aumento do número de células em seu interior, como também não foi capaz de manter microencapsuladas todas as células em crescimento, liberando parte delas para o meio de cultura. Esse episódio também foi observado por outros grupos de pesquisa, que do mesmo modo utilizaram cálcio para a gelificação das microcápsulas (Ponce et al., 2005).

Diversos grupos de pesquisa demonstraram que esta proliferação celular ocorre apenas durante a primeira semana em que as células foram microencapsuladas. Após esse período, há uma estabilização no número de células, que mantêm atividade metabólica e viabilidade por um período prolongado (Baruch and Machluf, 2006; Haque et al., 2004; Orive et al., 2003b).

- **Avaliação da capacidade imunoprotetora, *in vitro*, das microcápsulas sob o desafio de co-cultivo com macrófagos**

Um método simples e sensível foi desenvolvido e validado pelo grupo de Juste e colaboradores (2005) com o objetivo de avaliar a biocompatibilidade de diferentes biomateriais baseando-se nas

interações entre macrófagos e a superfície das microcápsulas (Juste et al., 2005). Este método consistiu em incubar microcápsulas, contendo ilhotas (ou não), com macrófagos e avaliar a expressão de mRNA correspondente a citocinas por qPCR após 3 horas de co-cultivo. Sabe-se que pode existir uma descontinuidade entre a produção do mRNA da citocina e o efeito biológico da proteína. No entanto, a produção da citocina (proteína) pode ser regulada também ao nível pós-transcricional ou ter seu efeito controlado pela ação de antagonistas produzidos. Desta forma, o nível da citocina dosado no sobrenadante do co-cultivo pode não corresponder ao efeito biológico observado, assim como o nível de expressão de mRNA avaliado. Por isso, o nível de mRNA da citocina medido foi usado como um marcador de ativação de macrófagos, o qual permite avaliar a biocompatibilidade da microcápsula e do biomaterial, não tendo como objetivo a investigação do efeito biológico da citocina. Claramente, para este segundo objetivo devem ser realizados ensaios complementares. Este método foi, portanto, validado neste trabalho (Juste et al., 2005) e mostrou ser capaz de diferenciar microcápsulas confeccionadas com alginatos impuros versus puros, na presença e na ausência de PLL (poli-L-lisina) (um conhecido ativador de macrófagos).

Os macrófagos desempenham um papel importante nos eventos de inflamação e crescimento pericapsular. Estudos *in vivo* demonstraram uma superexpressão de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em macrófagos 3 horas após o implante de microcápsulas vazias na região intraperitoneal de ratos. Os macrófagos peritoniais são facilmente ativados. Eles agem liberando um grande número de agentes citotóxicos, incluindo citocinas e óxido nítrico. As citocinas liberadas seguem um padrão de cascata que se inicia com MIP-2 e continua com IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Ferlito et al., 2001). Estas moléculas são conhecidas por induzir apoptose e necrose de células.

As imperfeições encontradas nas microcápsulas, como a presença de pontas e rupturas, são capazes de ativar macrófagos (Basta et al., 2004). Já o conteúdo M/G do alginato utilizado para a confecção das microcápsulas não influencia na ativação dos mesmos (Orive et al., 2005). A pureza e a presença de PLL são fatores ativadores de macrófagos (Orive et al., 2005). A viabilidade e a função das ilhotas microencapsuladas também podem influenciar na reatividade dos macrófagos às microcápsulas (Basta et al., 2004).

Em nossos experimentos optamos por quantificar a expressão de IL-1 β (uma citocina do início da cascata de ativação) em macrófagos peritoneais co-cultivados com microcápsulas de BDTN-Ca e BDTN-Ba vazias e contendo ilhotas de ratos e, como controle positivo, macrófagos co-cultivados com ilhotas nuas.

As ilhotas nuas, utilizadas como controle positivo, induziram a expressão de IL-1 β durante os três primeiros períodos de tempo avaliados (3, 6 e 9 horas) (**Tabela 3**). Basta e colaboradores (2004) demonstraram que os níveis de IL-1 β dosados no sobrenadante do co-cultivo com macrófagos de ilhotas nuas ou LPS (25 ng.mL⁻¹) foram semelhantes nos períodos de 6, 12 e 18 horas.

Não houve indução significativa da expressão de IL-1 β no co-cultivo de macrófagos com microcápsulas vazias de BDTN-Ba e de BDTN-Ca, avaliada durante o experimento (3, 6, 9 e 24 horas). A biocompatibilidade dos dois materiais foi, portanto, novamente confirmada. Entretanto, a habilidade da microcápsula em evitar a ativação de macrófagos quando ilhotas estavam presentes em seu interior foi alcançada apenas para aquelas confeccionadas com BDTN-Ba. Após 9 horas de co-cultivo de macrófagos com ilhotas microencapsuladas em BDTN-Ca, foi observada uma expressão significativa da citocina IL-1 β em relação ao controle negativo ($p < 0,001$). Essa ativação dos macrófagos observada apenas após 9 horas de co-cultivo pode ser explicada por uma maior instabilidade mecânica das microcápsulas de BDTN-Ca contendo ilhotas em seu interior, as quais podem ter: 1) permitido um contato direto das células da ilhota com os macrófagos; 2) induzido a produção e liberação de moléculas pelas células microencapsuladas capazes de ativar os macrófagos; ou 3) permitido a liberação de moléculas pelas células microencapsuladas capazes de ativar os macrófagos as quais não foram permeáveis às microcápsulas de BDTN-Ba, que possuem poros de tamanho médio menor do que as de BDTN-Ca.

A secreção de TNF- α e IL-1 β por macrófagos também foi induzida por ilhotas alo e isogênicas microencapsuladas em ALG-PLL-ALG-Ca e não por microcápsulas vazias (de Vos et al., 2003a). Isso poderia ser explicado pela produção de outras citocinas pelas ilhotas, moléculas capazes de ativar os macrófagos caso atravessassem a membrana das microcápsulas. Estas outras citocinas podem ser MCP-

1 e/ou VEGF produzidas em resposta a uma condição de estresse celular como a baixa tensão de oxigênio.

- **Avaliação da biocompatibilidade de microcápsulas vazias após o implante em animais**

Materiais biológicos utilizados para o microencapsulamento celular em transplantes requerem uma maior compreensão da sua estabilidade e de como esta estabilidade influencia a sobrevivência da célula microencapsulada, a imunoproteção e a biocompatibilidade. A compreensão da estabilidade do alginato *in vivo*, principalmente no que diz respeito à sua degradação, é bastante limitada (Thanos et al., 2006). Análises detalhadas das propriedades químicas e morfológicas das microcápsulas explantadas e microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos permitiram avançar na avaliação da Biodritina®.

A utilização do alginato como um biomaterial para o microencapsulamento celular presume que ele deva prover uma proteção infinita ao enxerto. No entanto, por ser um polissacarídeo, o alginato está sujeito a degradações hidrolíticas e enzimáticas (Holtan et al., 2006). A degradação da superfície das microcápsulas de alginato começou a ser estudada, recentemente, através de ensaios *in vitro* (Kong et al., 2004; Lee et al., 2004) e *in vivo* (Thanos et al., 2006; Thanos et al., 2007a; Thanos et al., 2007b).

Os resultados apresentados por Thanos e colaboradores (2006) mostraram que quanto menor o conteúdo de contaminantes protéicos e de endotoxinas presentes no alginato, menor a degradação das microcápsulas *in vivo*. O conteúdo M/G não apresentou influência direta sobre a degradação. A presença de impurezas permitiu a visualização de erosão em microcápsulas 30 dias após o implante, enquanto microcápsulas confeccionadas com alginatos ultrapurificados mostraram-se resistentes durante os 90 dias de monitoramento. De acordo com nossos resultados, as microcápsulas de BDTN-Ba analisadas por MEV não apresentaram erosão na sua superfície após 30 dias de implante (**Figura 21**). A presença de algumas rugosidades na superfície dessas microcápsulas foi considerada normal, acontecendo em decorrência da desidratação das

microcápsulas, a qual é necessária para a realização das análises por MEV (Aranaz et al., 2006). No entanto, o aspecto frisado, que foi observado nas microcápsulas de ASN-Ba, não surgiu em decorrência do processamento para análise, pois foi previamente observado ao microscópio de contraste de fase. Essa textura frisada pode estar relacionada à baixa estabilidade e à alta reatividade das microcápsulas de ASN-Ba, que foram encontradas em sua maioria rompidas ou aderidas aos tecidos adjacentes no dia do explante.

As análises histoquímicas dos explantes também confirmaram a biocompatibilidade e a estabilidade das microcápsulas de BDTN-Ba, que mantiveram a forma esférica, a superfície arredondada e lisa e sem adesão celular em sua superfície (**Figura 20**). Já as análises do material ASN-Ba denotaram um biomaterial pouco estável. As poucas microcápsulas recuperadas estavam em sua maioria rompidas ou disformes. Trabalhos prévios que comparam alginatos, devidamente purificados ou não, apresentam análises histológicas semelhantes às que obtivemos em nossos experimentos (Calafiore et al., 1999; de Vos et al., 2003b). Além destas, as análises por MEV realizadas por Thanos e colaboradores (2006) também foram compatíveis com nossos resultados, principalmente quando comparados os alginatos resistentes à degradação (VPMG X BDTN-Ba) com os não resistentes (VPLG, pKel, pFlu e pMan X ANP-Ba) apresentados na **figura 41**.

A avaliação da estabilidade de microcápsulas confeccionadas com alginato devidamente purificado, não revelou diferenças após implante em sítios alternativos à cavidade peritoneal, como os sítios subcutâneo e intra-atrial (cérebro) (Thanos et al., 2007b). As microcápsulas foram avaliadas por MEV, e apresentando-se, por até 210 dias, esféricas e com superfície lisa, independente do sítio de implante.

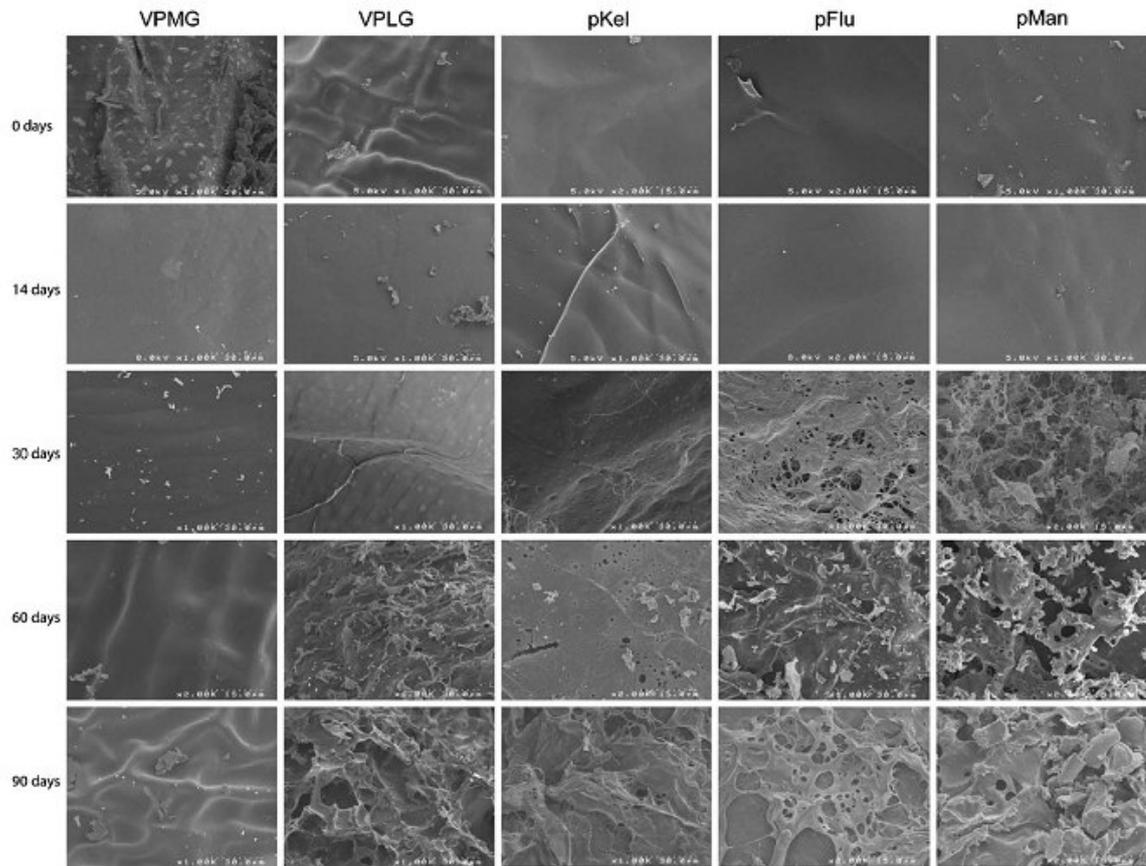


Figura 41: Figura retirada do artigo de Thanos et al. (2006). Análise por MEV de microcápsulas vazias implantadas na região intraperitoneal, de camundongos. As abreviações correspondem ao tipo de alginato utilizado na confecção das microcápsulas: VPMG – *vendor-purified medium G*, VPLG – *vendor-purified low G*, pKel – *purified Keltone LVCR* (ISP Corporation, USA), pFlu – *purified Fluka* (Sigma-Aldrich), pMan – *purified Manurol* (ISP Corporation, USA).

As análises pós-implante das microcápsulas de BDTN-Ba e de ASN-Ba revelaram a presença de estruturas arredondadas em sua superfície com um diâmetro inferior a 1 μm . Um fibroblasto aderido à superfície apresenta entre 50 e 100 μm de diâmetro. Um fibroblasto não aderido teria um diâmetro de aproximadamente 25 μm , o que descarta a possibilidade de adesão celular, além das análises por histoquímica que não revelaram células nas superfícies das microcápsulas de BDTN-Ba. As estruturas apontadas pela seta nas **figuras 21 e 22** são condizentes com estruturas imuno-reveladas de fibrina (Meier and Drake, 1984). O efeito pós-cirúrgico de recrutamento de células inflamatórias responsáveis por regenerar a região lesada durante a cirurgia acaba levando à formação de uma matriz de fibrina organizada. Esta matriz é responsável por ancorar principalmente fibroblastos e macrófagos que irão reparar a injúria. Após o reparo esta matriz de fibrina é degradada por fibrinólise em pequenas moléculas denominadas produto de degradação de fibrina (FDP – do inglês: *fibrin degradation products*) (Cheong et al., 2001). Estes FDP podem ser as estruturas apontadas pelas setas nas figuras 21 e 22. Entretanto, para confirmar essa hipótese seria necessário a imuno-revelação destas microcápsulas com anticorpos anti-fibrina. Já foi demonstrado que independente da pureza do material utilizado no microencapsulamento, até sete dias após o implante, observa-se uma grande quantidade de células inflamatórias na região que contém as microcápsulas. No primeiro dia após o implante os granulócitos são as primeiras células que aparecem, seguidos pelos basófilos, células gigantes mononucleadas e eritrócitos. Essas células têm seus números reduzidos entre 5 e 7 dias após a cirurgia. Quando o material utilizado na confecção das microcápsulas é de alta pureza e apresenta boa biocompatibilidade, ao final desse período de 5 a 7 dias, observa-se a substituição destas células inflamatórias por fibroblastos, que também desaparecem após duas semanas (de Vos et al., 2002b).

- **Avaliação da viabilidade e da função de ilhotas humanas microencapsuladas através do xenotransplante em camundongos diabéticos**

Desde a primeira aplicação proposta por Lim & Sun (1980), ilhotas microencapsuladas sustentam o potencial de viabilizar o transplante de ilhotas na ausência de imunossupressores e também de suprir a limitada fonte de pâncreas humanos ao permitirem o uso de ilhotas xenogênicas

(Lim and Sun, 1980). Vários estudos têm demonstrado a habilidade de algumas microcápsulas em restabelecer a normoglicemia em diversos modelos de animais diabéticos (**Tabela 4**). O número de relatos é grande assim como as variadas taxas de sucesso apresentadas, as quais reforçam os inerentes desafios que envolvem a aplicação desta tecnologia. Em alotransplantes de ilhotas nuas, as ilhotas são geralmente destruídas dentro de duas semanas após o implante enquanto em xenotransplantes isso ocorre dentro de uma semana. O imunisolamento melhora significativamente a sobrevivência do tecido transplantado. Contudo, a independência de insulina, principalmente em animais maiores ou modelos de pequenos animais, apresenta uma duração limitada. Os experimentos de Sun e colaboradores (1996), nos quais primatas não humanos diabéticos que receberam ilhotas suínas microencapsuladas apresentaram normoglicemia por aproximadamente 800 dias, nunca foi reproduzido por outros grupos (Sun et al., 1996). Além disso, a falta de um controle para este experimento levou a um grande questionamento dos resultados obtidos (Duvivier-Kali et al., 2004).

Seis causas principais foram apontadas para falhas no transplante de ilhotas microencapsuladas (Wilson et al., 2007): 1) a presença de contaminantes e impurezas no material utilizado na confecção das microcápsulas; 2) o uso de PLL; 3) receptores animais de grande porte e/ou a presença de auto-imunidade no receptor do enxerto; 4) número insuficiente de ilhotas microencapsuladas; 5) o sítio de implante; 6) a perda do tecido implantado por morte das células microencapsuladas.

As microcápsulas de BDTN-Ba foram qualificadas quanto a ausência de contaminantes que ativem o sistema imune. Além disso, elas dispensam o uso de PLL para aumentar a sua estabilidade e controlar o tamanho de seus poros. Em nossos experimentos os animais que receberam as ilhotas microencapsuladas foram camundongos imunocompetentes que tiveram o diabetes mellitus tipo 1 induzido por injeção única de streptozotocina.

A ação de anticorpos que porventura consigam atravessar a barreira da microcápsula e alcançar as ilhotas em seu interior é um fator de insucesso no transplante de ilhotas microencapsuladas. Camundongos NOD, nos quais o diabetes se desenvolve através de um mecanismo auto-imune,

apresentam elevados níveis de anticorpos anti-insulina e/ou anti-célula beta. Quando submetidos a um transplante de ilhotas microencapsuladas com ALG-Ca foi observado um difícil controle da glicemia, devido principalmente ao fato de ter sido utilizado um polímero com poros grandes demais para impedirem a entrada dos anticorpos no interior das microcápsulas (Weber et al., 1990b). No entanto, em transplantes nos quais foram utilizadas microcápsulas de ALG-Ba já foi demonstrado um sucesso prolongado, uma vez que as microcápsulas gelificadas com esse íon possuíam porosidade ideal para impedir a ação do sistema imune via anticorpos (Duvivier-Kali et al., 2004). A porosidade estimada para as microcápsulas de BDTN-Ba também aponta para uma permeabilidade ideal, capaz de impedir a entrada de anticorpos, sem afetar o livre trânsito de nutrientes, oxigênio e metabólitos necessários às células microencapsuladas.

O número de ilhotas implantadas nos ensaios de reversão do diabetes variou entre 3.000 a 4.000 IEQ microencapsuladas em BDTN-Ba. Nesses ensaios foi observada não apenas a manutenção da normoglicemia dos animais (**Figura 27**), como uma habilidade destas ilhotas em responder à alta concentração de glicose de maneira tão eficiente quanto as de animais normais, não diabéticos, ou ainda com melhor performance, conforme demonstrado pelo teste de TOTG (**Figura 28**). O teste de TOTG permite avaliar com maior precisão e confiabilidade o desempenho das ilhotas microencapsuladas (Duvivier-Kali et al., 2004; Schneider et al., 2005; Wilson et al., 2007). O tempo necessário para que os animais diabéticos que receberam ilhotas microencapsuladas (P08/07) atingissem a normoglicemia no teste de TOTG foi ainda menor do que o tempo observado nos animais controle, não diabéticos.

Ilhotas microencapsuladas com ALG-Ba utilizadas pelo grupo do Joslin Diabetes Center (Duvivier-Kali et al., 2004) e pelo grupo da Universidade de Mainz (Schneider et al., 2005) apresentaram os melhores resultados de sustentação da normoglicemia em animais diabéticos, conforme demonstrado pelo prolongado período de sucesso, 184 dias para o primeiro e 268 dias para o segundo. O tempo máximo de reversão do diabetes que alcançamos em camundongos com ilhotas humanas microencapsuladas em BDTN-Ba foi de 83 dias, inferior aos apresentados por esses grupos.

No entanto, nosso experimento foi propositalmente interrompido quando 50% dos animais (5 animais) ainda se apresentavam normoglicêmicos. Os implantes desses animais foram retirados, o que levou ao retorno do estado hiperglicêmico, e nos permitiu assegurar que a reversão do diabetes ocorreu em função do transplante de ilhotas humanas microencapsuladas e não por uma regeneração do pâncreas do animal. Portanto, não descartamos a possibilidade de conseguirmos atingir períodos de normoglicemia tão longos quanto os apresentados pelos grupos citados acima, utilizando ilhotas microencapsuladas em BDTN-Ba. No experimento do grupo de Schneider e colaboradores (2005) apenas um animal diabético que recebeu o implante de ilhotas microencapsuladas alcançou o tempo de 268 dias de normoglicemia (**Tabela 4**)(De Vos et al., 1997; de Vos et al., 2003b; Duvivier-Kali et al., 2004; Kin et al., 2002; Lanza et al., 1995; Lum et al., 1992; Ohyama et al., 1998; Orive et al., 2005; Orive et al., 2003a; Safley et al., 2005; Schneider et al., 2005; Sun et al., 1996; Tashiro et al., 1997; Tun et al., 1996; Wang et al., 1997; Weber et al., 1990a).

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

Doador	Receptor	Tipo de microcápsula	Número de ilhotas implantadas	Normoglicemia [dias] ^a	Referência
<i>Alotransplante</i>					
Camundongo B6AF1	Camundongo NOD	ALG-Ba	900-1.000	350	de Vos, 1997
Rato DA	Rato Lewis	ALG-Ba	5.000 IEQ	54	Omer, 2005
Rato Lewis	Rato AO	APA	3.500-4.200	103	de Vos, 2003
Cachorro	Cachorro	Agarose	4.300-11.000 IEQ/kg	21	Tashiro, 1997
<i>Xenotransplante</i>					
Rato SD	Camundongo Balb/c	Agarose	500	79	Tun, 1996
Hamster	Rato Wistar	Agarose	3000	125	Ohyama, 1998
Porco	Cachorro	Agarose	4.000-45.000 IEQ/kg	50	Kin, 2002
Rato Wistar	Camundongo Balb/c	APA	900-1.000	220	Lum, 1992
Porco	Primata não humano	APA	3-7 x 10 ⁴ ^d	120-804	Sun, 1996
Cachorro	Camundongo NOD	APA	4x10 ³ -1,2x10 ⁴	12	Weber, 1990
Cachorro	Camundongo C57BL/6	APA	4x10 ³ -1,2x10 ⁴	52	Weber, 1990
Rato Lewis	Camundongo NOD	APA	1.800-2.000	10	Weber, 1990
Porco	Camundongo NOD	APA	11.341 ± 3.293 IEQ	13	Safley, 2005
Rato SD	Camundongo C57BL/6	ALG-PMCG	1.000	20-300	Wang, 1997
Rato SD	Camundongo NOD	ALG-PMCG	1.000	40-180	Wang, 1997
Boi	Camundongo Balb/c	ALG-Ca	2-4x10 ³	30-70	Lanza, 1995
Porco	Camundongo B6AF1	ALG-Ba	10.000	140 ^c	Omer, 2003
Porco	Camundongo NOD	ALG-Ba	5.000 IEQ	42-184	Duvivier-Kali, 2004
Rato SD	Camundongo Balb/c	ALG-Ba	1.800	90-270	Schneider, 2005
Homem	Camundongo Balb/c	ALG-Ba	1.800	115-268	Schneider, 2005

APA: alginato/poli-(L-lisina)/alginato. PMCG: poli-metil-co-guanidina.

^a tempo de normoglicemia médio; ^b foram utilizados múltiplos transplantes; ^c o estudo foi interrompido neste dia.

Os excelentes resultados apresentados por Duvivier-Kali e colaboradores (2004), onde camundongos diabéticos receberam um implante de ilhotas suínas microencapsuladas com ALG-Ba, provavelmente foram alcançados pelo fato de ter sido utilizado um número bastante elevado de ilhotas suínas, 5.000 IEQ por receptor. Entretanto, as primeiras falhas dos enxertos de alguns animais puderam ser observadas 42 dias após os implantes terem sido realizados (Duvivier-Kali et al., 2004). Sabe-se que em xenotransplantes de ilhotas suínas ou humanas, onde os enxertos foram implantados sob a cápsula renal de camundongos diabéticos, são necessárias entre 1.000 a 3.000 IEQ para reverter o diabetes nesses animais (Davalli et al., 1995). As diferenças estruturais entre as insulinas murinas e as insulinas humana/suína provavelmente são grandes o bastante para exigir um aumento na dose de ilhotas xenogênicas implantadas para que a normoglicemia seja atingida.

As ilhotas humanas microencapsuladas em BDTN-Ba se mostraram estáveis e funcionais ao manterem o estado normoglicêmico dos camundongos diabéticos por no mínimo 80 dias, impedindo a rejeição xenogênica. Isto também pôde ser confirmado pelos estudos de atividade funcional *in vitro* das ilhotas microencapsuladas explantadas. Um índice de secreção de insulina superior a 1,2 foi observado para as ilhotas microencapsuladas explantadas dos animais que receberam ilhotas do pâncreas P08/05. Esse grupo experimental continha 50% dos seus animais ainda normoglicêmicos no momento do explante (após 83 dias). Contudo, o índice de secreção de insulina de ilhotas microencapsuladas retiradas dos animais que receberam ilhotas do pâncreas P05/07 foi inferior a um. Esse resultado insatisfatório era esperado, uma vez que 100% dos animais desse grupo apresentavam-se hiperglicêmicos no momento em que os implantes foram extraídos (após 96 dias). Isto provavelmente ocorreu em decorrência da constante degranulação das células beta em condições de hiperglicemia e de glicotoxicidade (Weir et al., 2001). Nos três experimentos realizados com ilhotas isoladas de três pâncreas diferentes as falhas do implante de ilhotas microencapsuladas observadas em alguns animais tiveram início 40, 50 e 80 dias após a cirurgia, tempos estes iguais ou superiores aos observados por Duvivier-Kali e colaboradores (2004).

A análise comparativa do crescimento celular pericapsular nas microcápsulas explantadas de animais normo- e hiperglicêmicos revelou que a falha dos implantes estava associada a microcápsulas com adesão peri-capsular de células (**Figura 29**). Setenta por cento das microcápsulas explantadas dos animais normoglicêmicos estavam livres de adesão celular ou com pouca adesão, resultado também observado para microcápsulas explantadas de animais normoglicêmicos no trabalho de Duvivier-Kali e colaboradores (2004). Já em animais que se encontravam hiperglicêmicos no momento do explante, 70% das microcápsulas apresentaram crescimento celular pericapsular. A ausência de formação de fibrose sobre microcápsulas vazias reforça a hipótese de uma adesão celular desencadeada por células danificadas no interior da microcápsula. O fato das microcápsulas se encontrarem livres na cavidade peritoneal sem nenhuma vascularização no sítio do implante resulta em uma limitada fonte de nutrientes e de oxigênio para as ilhotas microencapsuladas, um microambiente bastante diferente ao encontrado no pâncreas, onde as ilhotas encontram-se fartamente vascularizadas e submetidas a uma elevada tensão de oxigênio. Este comprometimento da nutrição e oxigenação das ilhotas pode levar à perda de massa celular com conseqüente perda da função do implante. No entanto, o fato de alguns implantes resistirem por mais tempo do que outros pode ser decorrência de uma adaptação satisfatória por algumas ilhotas às condições adversas apresentadas (Schneider et al., 2005).

A escolha do sítio de implante é um aspecto importante para a sobrevivência das ilhotas microencapsuladas. É necessário levar em consideração: a possibilidade de retirada do implante e o re-transplante, a proximidade de regiões vascularizadas (de Vos et al., 2002a) e evitar sítios de implante muito susceptíveis a estresses químicos e físicos. Com relação às ilhotas pancreáticas microencapsuladas, a perda da vascularização causada pelo processo de isolamento das ilhotas interfere com o desempenho funcional e com a longevidade do enxerto, como dito anteriormente. A opção do transplante intra-hepático, próximo à circulação, é utilizada no transplante de ilhotas nuas, porém é inviável para aplicação de ilhotas microencapsuladas devido ao grande volume de microcápsulas a ser injetado no paciente. A melhor alternativa encontrada foi, portanto, a cavidade peritoneal, principalmente por ser um sítio de fácil acesso, mas também por permitir o implante de

um volume considerável de ilhotas microencapsuladas. Tanto em experimentos em animais quanto em ensaios clínicos, a cavidade peritoneal foi o sítio de implante mais utilizado. A grande desvantagem deste sítio está na sua baixa tensão de oxigênio, a qual pode ser parcialmente compensada pela forma esférica da microcápsula e sua dimensão entre 500 e 700 μm , aperfeiçoando o processo de difusão do gás e minimizando o espaço morto entre a célula e a cavidade peritoneal, respectivamente.

No ano de 2006, Dufrane e colaboradores apresentaram um estudo analisando a influência do sítio de implante para as ilhotas microencapsuladas. Três sítios foram examinados neste trabalho: a cavidade peritoneal (CP), o espaço subcapsular renal (ESR) e a região subcutânea (RS). Este estudo envolveu a avaliação da estabilidade mecânica e a presença de adesão celular sobre microcápsulas vazias. Também considerou a reversão do diabetes em ratos que receberam implante de ilhotas de porco microencapsuladas. O sítio CP se mostrou inferior aos outros dois. Os sítios ESR e RS foram menos traumáticos às microcápsulas, sendo que cerca de 5% das microcápsulas vazias implantadas nesses dois últimos sítios estavam rompidas, em comparação com 13% encontradas no CP. A presença considerável de macrófagos, sete dias após o implante, foi observada apenas nas microcápsulas implantadas no sítio CP. Além disso, as ilhotas microencapsuladas implantadas na região CP perderam a função após sete dias, enquanto as implantadas nos outros sítios mantiveram a funcionalidade por até 30 dias, mantendo a reversão do diabetes durante esse período. É válido ressaltar que o alginato utilizado nesses experimentos foi o alginato ultrapurificado Pronova®, que contém 56% de M, e que as microcápsulas foram gelificadas com íons cálcio. Além disso, para seres humanos o implante na cápsula renal representa um acesso cirúrgico desprivilegiado. Por sua vez, o espaço subcutâneo é muito propenso a choques mecânicos, danosos à estrutura das microcápsulas. Para equacionar esses problemas, vem sendo estudada a pré-vascularização de suportes sólidos e resistentes, que poderão ser implantados tanto CP quanto RS. No interior deste suportes, as ilhotas microencapsuladas não só estarão protegidas de choques mecânicos, como estarão muito próximas da corrente sanguínea e conseqüentemente melhor oxigenadas e nutridas. Além disso, a

possibilidade de substituição das ilhotas microencapsuladas após a perda da função do enxerto se torna muito mais acessível (de Vos and Marchetti, 2002).

Baseando-se na observação de uma falha na secreção de insulina *in vitro* por ilhotas microencapsuladas explantadas, Duvivier-Kali e colaboradores (2004) assim como Schneider e colaboradores (2005), concluíram que a perda de células beta após o transplante nos seus experimentos foi a principal razão para a falha na manutenção da normoglicemia por um período prolongado. Os mecanismos responsáveis pela perda da massa de células transplantadas não são muito bem definidos, a hipótese de uma ineficiente proteção do sistema imune versus uma sobrevivência limitada das células beta fora do ambiente pancreas foi discutida a seguir.

Como mencionado anteriormente, o DM1 resulta da destruição auto-imune das células β das ilhotas. Uma variedade de teorias acerca da etiologia da auto-imunidade do diabetes já foi posta à prova, e nenhuma delas pôde ser comprovada ainda. O fato é que a destruição auto-imune de ilhotas transplantadas é uma causa importante da perda da função do enxerto, o que vale tanto para o transplante de ilhotas isoladas quanto para o transplante de pâncreas órgão total. Outro ponto crucial a respeito da auto-imunidade está no efeito deletério dos auto-anticorpos (Titus et al., 2000).

Do ponto de vista do microencapsulamento as microcápsulas não só oferecem uma barreira física, impedindo a ativação do sistema imune dependente do contato célula-célula, como também impedem a entrada de anticorpos como mencionado previamente. Entretanto, deve-se chamar a atenção para reações imunes inevitáveis, relacionadas ao implante, às quais as ilhotas microencapsuladas podem ser susceptíveis. Um dos eventos inevitáveis é a ativação não específica do sistema imune após os procedimentos cirúrgicos do transplante. Em decorrência destes procedimentos, diversos mediadores inflamatórios são liberados gerando aumento da quimiotaxia de leucócitos e conseqüente liberação de fatores bioativos tóxicos para as células implantadas (Tang and Eaton, 1999). Estes fatores são as citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β (Bendtzen et al., 1986), TNF- α e IFN- γ (Campbell et al., 1988). Este evento é observado tanto para o implante de ilhotas microencapsuladas como de ilhotas nuas (Bendtzen et al., 1986; Campbell et al., 1988).

A resposta inflamatória evolui a seguir de acordo com a natureza do que foi implantado. No caso de ilhotas nuas inicia-se um processo de rejeição imune mediado envolvendo vias diretas e indiretas de apresentação de antígenos. Na via direta, as células apresentadoras de antígenos (APC), presentes nas ilhotas transplantadas, migram para os linfonodos do receptor e ativam células T neste sítio por apresentarem os antígenos do implante. As células T ativadas retornam à região do implante e o destroem (Sutton et al., 1989). Para tanto, essas células precisam expandir em número e é neste ponto que atuam muitas drogas imunossupressoras. Na via indireta, células dendríticas do próprio receptor migram para a região do implante e fagocitam peptídeos e proteínas do tecido implantado, incluindo antígenos específicos das células β do doador. Estas células migram até os linfonodos, onde ativam linfócitos T, que da mesma forma retornam para destruir o implante (Hegre et al., 1984b).

Em se tratando de ilhotas microencapsuladas os eventos de migração de células dendríticas do implante para os linfonodos são barrados pela microcápsula. Já o efeito da resposta imune via apresentação indireta de antígenos vem ganhando atenção nos últimos anos (Orive et al., 2006). As células APC ao fagocitarem os antígenos, alogênicos ou xenogênicos, provindos do tecido microencapsulado, iniciam a resposta imune via ativação de linfócito B com produção de anticorpos tecido-específicos (Lanza and Chick, 1997a). A produção destes anticorpos não é considerada deletéria uma vez que a microcápsula apresenta uma barreira física que impede a entrada dos mesmos. Em contrapartida, associada à produção de anticorpos está também a produção de citocinas com efeitos deletérios para o tecido transplantado, por serem capazes de penetrar na microcápsula. Felizmente, esforços combinados têm mostrado que o efeito final das citocinas liberadas é dependente da combinação da presença de diferentes tipos de citocinas e das suas respectivas concentrações ótimas (de Groot et al., 2001; de Vos et al., 2004; King et al., 2000). Além disso, nos casos de xenotransplante foi demonstrado que as ilhotas xenogênicas possuem receptores de menor afinidade às citocinas liberadas pelo receptor (de Vos et al., 2006; Piro et al., 2001).

A resposta inflamatória inevitavelmente observada, dentro de um período de duas semanas após o transplante, terá seu progresso segundo as propriedades do corpo estranho implantado, ou seja, a própria microcápsula. Dependendo da característica do material utilizado no microencapsulamento e

do quanto ele é propenso à adesão de proteínas em sua superfície, estas células inflamatórias recrutadas podem ou não aderir à microcápsula. No entanto, esta resposta ao corpo estranho se tornou um evento raro após a aplicação do alginato ultrapurificado Pronova®, sobretudo em microcápsulas que não utilizam policátions em sua confecção (de Vos et al., 2006).

Como consequência de uma mínima resposta inflamatória desencadeada pelas microcápsulas, foi observado que alguns macrófagos e fibroblastos permanecem aderidos em até 10% das microcápsulas (de Vos et al., 2006). Estes macrófagos, que permanecem aderidos e ativos, podem dar início a um ciclo vicioso e deletério para as ilhotas microencapsuladas implantadas, mantendo células inflamatórias ativas dentro e fora das microcápsulas (**Figura 42**). Elas produzem as citocinas pró-inflamatórias, que permeiam as microcápsulas, e induzem algumas células das ilhotas a produzirem outros fatores bioativos (MCP-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, etc) os quais recrutam mais células inflamatórias fechando o ciclo (de Vos et al., 2006). Estes eventos podem resultar em uma perda considerável de tecido implantado (de Vos et al., 2002a). Uma vez que todo este ciclo de ativação do sistema imune em decorrência dos eventos associados com a cirurgia não é característico de rejeição ou auto-imunidade, sugere-se fortemente uma intervenção farmacológica, para prevenir a liberação de produtos pró-inflamatórios durante as primeiras duas semanas após o implante (de Vos et al., 2006).

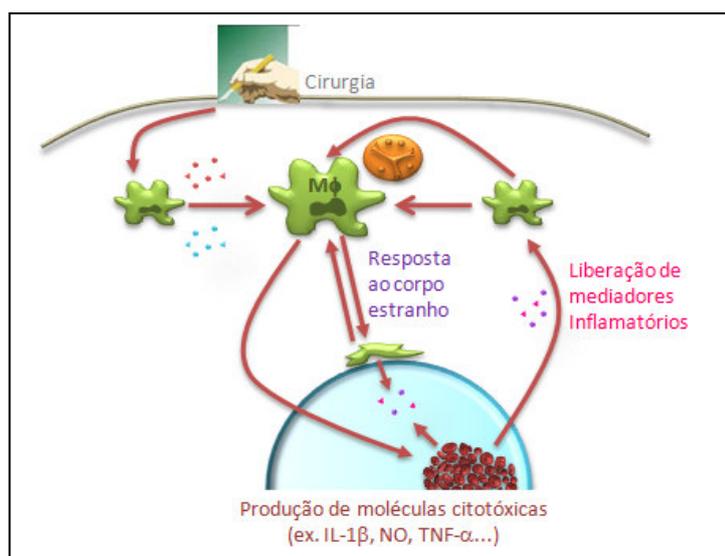


Figura 42: O ciclo vicioso de ativação do sistema imune pode ser iniciado após a cirurgia em resposta ao corpo estranho implantado (microcápsula). Células da ilhota microencapsulada são ativadas e liberam também mediadores inflamatórios, fechando o ciclo. (Adaptação de (Wilson and Chaikof, 2008)).

E enquanto os testes clínicos com ilhotas microencapsuladas, nuas e outros tipos celulares continuam avançando com variável sucesso, o evidente funcionamento do implante e a melhora da saúde do paciente motivam a busca por mecanismos que aumentem a sobrevida do enxerto com estratégias de imunisolamento cada vez mais eficazes.

5.2. Efeito do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* (TS) sobre células beta pancreáticas

A renovação das células β destruídas pelo diabetes mellitus tipo 1 (DM1) através da regeneração ou transplante representa a mais promissora opção para a cura dos pacientes portadores dessa patologia. Esta opção enfrenta dois desafios: gerar massa de células em quantidade suficiente e com capacidade de produzir e liberar insulina em resposta aos sinais fisiológicos, e proteger estas células da auto-imunidade recorrente. Todo avanço no que diz respeito a esta terapia celular representa uma vantagem significativa em relação ao tratamento por administração de insulina, que é comumente utilizado (Efrat, 2008a).

Durante a embriogênese do pâncreas, as células endócrinas são geradas a partir de uma população de células pancreáticas progenitoras. Estas células progenitoras, em estágios recentes do desenvolvimento, recebem múltiplos sinais simultaneamente, sendo alguns mitogênicos e outros indutores de diferenciação. Estes sinais extrínsecos são interpretados através de um mecanismo intrínseco que, ou compromete a célula progenitora a entrar no ciclo celular, ou a tira do ciclo celular para se diferenciar (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Gradwohl, 2006; Servitja and Ferrer, 2004; Wilson et al., 2003). As células endócrinas que se diferenciam a partir das células progenitoras são pós-mitóticas, tendo sido demonstrado que uma população de células progenitoras persiste através da embriogênese para permitir a diferenciação de novas células endócrinas na sua fase mais avançada (McEvoy and Madson, 1980a; McEvoy and Madson, 1980b). No período pós-natal recente são observadas altas taxas de proliferação de células β levando a um aumento considerável de sua massa (Bernard-Kargar et al., 2001; Hellerstrom and Swenne, 1991; Swenne, 1982). Entretanto, nos animais adultos, a expansão da massa de células β diminui consideravelmente (**Figura 43**). A taxa de expansão destas células é governada pelo número de novas células β formadas em relação ao

número de células β que morrem. A questão é: durante a fase adulta as células β se auto-renovam ou é necessária a presença de células progenitoras para repor as células β que morrem? Um número considerável de observações, incluindo tanto a prevalência de células ductais hormônio-positivas, quanto a proximidade de ilhotas dos ductos, tem levado à idéia de que pode ocorrer alguma diferenciação de células ductais em células endócrinas. Além disso, a diferenciação de células ductais a partir de uma suposta célula progenitora, algumas vezes referida como “neogênese” (Bonner-Weir, 2000a; Bonner-Weir, 2000b), tem sua ocorrência sugerida em animais neonatos (Finegood et al., 1995; Hellerstrom et al., 1988), existindo alguns estudos que demonstraram a incidência aumentada de células ductais diferenciadas em modelos de injúria pancreática (Bonner-Weir et al., 1993; Gu and Sarvetnick, 1993). Em contrapartida, Melton e Dor têm avaliado o valor da contribuição da diferenciação de células ductais em novas células β , e têm demonstrado que a maioria das células β é originada de células β pré-existentes (Dor et al., 2004). Trabalhos ainda mais recentes evidenciaram que as células β adultas são as principais contribuintes para o crescimento da ilhota e sua manutenção (Brennand et al., 2007; Teta et al., 2007). O trabalho do nosso grupo de pesquisa demonstrou ainda que cultura primária de células β humanas após estímulo com prolactina e laminina também proliferam *in vitro* (Labriola et al., 2007a; Labriola et al., 2007b). Apoiados nestas evidências, optamos por tratar células β adultas com veneno de escorpião visando a identificação de fatores capazes de induzir a proliferação dessas células, *in vitro*.

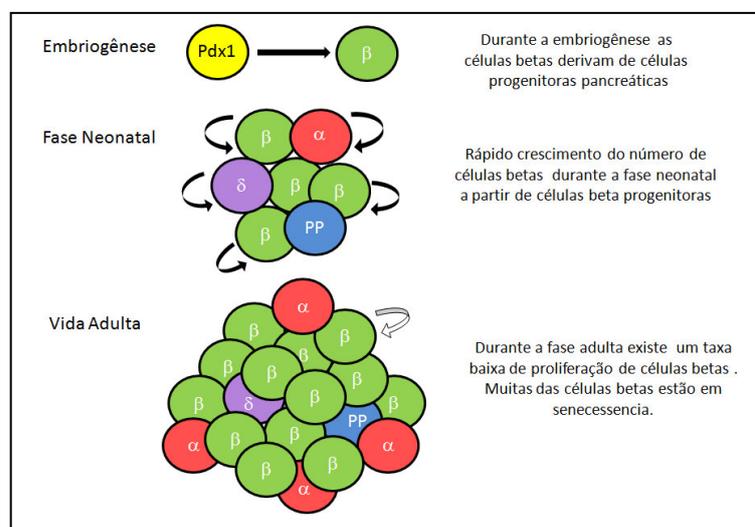


Figura 43: Alterações da capacidade proliferativa da célula β durante a embriogênese, a fase neonatal e na vida adulta. (Adaptação de (Dhawan et al., 2007)).

A idéia de expandir *in vitro* a população de células β humanas adultas pode ajudar a solucionar o problema relacionado à limitada fonte de ilhotas, além de prover vantagens imunogênicas no que diz respeito ao xenotransplante. A busca por fatores celulares e humorais que promovam a proliferação de células β adultas é um grande desafio que ainda não foi sobrepujado.

Relatos na literatura mostram efeitos de indução de nesidioblastose e hipoglicemia crônica em animais que receberam veneno do escorpião do gênero *Tityus* (Novaes et al., 1990a). Outro trabalho demonstrou a ocorrência de efeitos mitogênicos sobre células β de ilhotas de rato tratadas, *in vitro*, com o extrato bruto do veneno (Luca et al., 2003). Pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares induzidos por estes venenos que resultam em mudanças morfológicas e funcionais nas células β das ilhotas, a não ser pelos conhecidos efeitos sobre a permeabilidade de canais iônicos (Rodriguez de la Vega and Possani, 2005) que podem influenciar vias metabólicas destas células e a resposta fisiológica de liberação de insulina (Goncalves et al., 2003; Marangoni et al., 1995; Novaes et al., 1982; Sankaran et al., 1983).

Esta Tese não teve o objetivo de elucidar os mecanismos moleculares induzidos pelo veneno, mas comprovar a presença de efetores no veneno com potencial mitogênico e com competências fisiológicas sobre células β sem apresentar toxicidade significativa.

Neste estudo foi possível comprovar que o extrato bruto do veneno de *T. serrulatus* (fração SVC) aumenta significativamente o índice mitótico das células de insulinoma de rato da linhagem RINm5F (**Figura 31**). Além disso, foi possível atestar a presença desta atividade em frações de baixa massa molecular (<10 kDa) (**Figura 32**). Após um fracionamento mais preciso dos componentes do veneno, identificou-se uma fração ativa, que ainda deverá ser caracterizada (**Figura 35 e 37**).

Além da atividade mitótica encontrada, foi possível comprovar, através de ensaios de viabilidade celular (MTT), a ausência de uma ação citotóxica do SVC sobre células RINm5F (**Figura 33**). A ausência da toxicidade sobre células β de ilhotas humanas também foi comprovada através do ensaio de secreção de insulina durante a incubação com baixa e alta concentração de glicose. O desempenho funcional das ilhotas tratadas com a fração ativa do veneno, avaliado pelo ensaio de

secreção de insulina, foi melhor do que o desempenho de ilhotas não tratadas (**Figura 38**). Este efeito estimulatório da secreção de insulina também foi observado em ilhotas de rato tratadas com o extrato bruto do veneno do escorpião *T. bahiensis* em um trabalho prévio (Luca et al., 2003). Gonçalves e colaboradores (2003) e Marangoni e colaboradores (1995) também já demonstraram este efeito indutor de secreção de insulina em células β incubadas com glicose. No entanto, nestes trabalhos as células foram tratadas com uma toxina, a TsTx-V, isolada do veneno de *T. serrulatus*. Foi demonstrado que TsTx-V estende o período de despolarização da membrana da célula β e aumenta a duração da atividade elétrica na fase ativa, potencializando a secreção de insulina nestas células. TsTx-V aumentou a secreção de insulina da ordem de duas vezes, enquanto a fração ativa com a qual trabalhamos aumentou essa secreção da ordem de 1,3 vezes. Além de melhorar o desempenho das células β das ilhotas, a fração ativa que purificamos a partir do veneno de TS também aumentou, significativamente, a expressão do mRNA para insulina e do mRNA para o gene de proliferação PCNA. Estes últimos resultados reforçam, portanto, a idéia de que a fração ativa do veneno não só leva à proliferação de células β como mantém estas células preparadas para uma resposta fisiológica apropriada com respeito à liberação de insulina.

Os extratos brutos de venenos de escorpiões são misturas complexas de moléculas, muitas das quais são peptídeos curtos que desempenham diversas atividades biológicas. Tem-se estudado bastante os alvos farmacológicos dos constituintes destes venenos que, além de modular canais iônicos, vem sendo implicados em número crescente de outras atividades biológicas como: analgesia, atividade antibiótica, atividade inseticida e modulação do sistema imune. Essas descobertas têm elevado o interesse biotecnológico e farmacológico sobre os venenos e seus componentes (Panyi et al., 2006; Possani et al., 2000; Rodriguez de la Vega and Possani, 2004; Rodriguez de la Vega and Possani, 2005). Estima-se que existam mais de 1.500 espécies de escorpiões no mundo e cerca de 100.000 compostos moleculares diferentes nestes venenos (Possani et al., 1999). Análises moleculares por espectrometria de massas têm demonstrado uma elevada semelhança entre os constituintes dos venenos dos escorpiões do gênero *Tityus* (Batista et al., 2007).

Apesar das necessárias investigações futuras com respeito à atividade da fração ativa do veneno com a qual trabalhamos, os resultados obtidos demonstram que a atividade mitótica nas células β adultas pode ser alterada e possivelmente com potenciais benefícios para o desempenho funcional da ilhota.

6. Conclusões

Esta Tese fornece a primeira evidência de que ilhotas humanas podem ser eficientemente microencapsuladas com um biomaterial (Biodritina®), composto de alginato e sulfato de condroitina, gelificado com íons de bário ou de cálcio, sem a necessidade de adição de polycations;

O alginato da Sigma purificado (ASP) mostrou-se impróprio para a utilização no microencapsulamento por apresentar conteúdo elevado de contaminantes (polifenóis, endotoxinas e proteínas), enquanto o alginato ultrapurificado (AUP) possui as características ideais para o microencapsulamento de células e tecidos;

Dentre as diferentes formulações de biomateriais avaliadas, as microcápsulas confeccionadas com bário-Biodritina apresentaram o melhor desempenho em testes físico-químicos de estabilidade mecânica, osmótica e térmica;

As microcápsulas de bário-Biodritina mantiveram sua morfologia e estabilidade estrutural após permanecerem 30 dias na cavidade peritoneal de camundongos, conforme demonstrado por microscopia eletrônica de varredura (MEV);

A análise histológica mostrou que as microcápsulas de bário-Biodritina não estimularam a adesão celular durante os 30 dias em que permaneceram implantadas na cavidade peritoneal de camundongos;

As microcápsulas de bário-Biodritina são permeáveis a proteínas com massa molecular de até 70 kDa, enquanto as microcápsulas de cálcio-Biodritina permitem a passagem de proteínas de até 100 kDa;

As microcápsulas de bário-Biodritina fornecem imunoproteção mais eficiente a ilhotas de rato microencapsuladas do que as microcápsulas de cálcio-Biodritina, conforme demonstrado através de

ensaios de co-cultivo com macrófagos peritoneais, que foram ativados apenas pelas ilhotas microencapsuladas com cálcio-Biodritina;

Ilhotas humanas microencapsuladas com bário-Biodritina mantêm viabilidade e função idênticas às ilhotas nuas, conforme observado em experimentos *in vitro* de secreção de insulina induzida por glicose;

A prova de conceito do biomaterial, realizada através do xenotransplante de ilhotas humanas microencapsuladas em bário-Biodritina em camundongos com DM1 induzido pela estreptozotocina mostrou que a hiperglicemia dos animais diabéticos foi corrigida pelo implante por um período superior a 60 dias. Durante este período o teste oral de tolerância à glicose mostrou-se normal, demonstrando a completa funcionalidade e eficiência das ilhotas microencapsuladas com bário-Biodritina;

Foi obtida uma fração do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* que possui atividade proliferativa sobre células de insulinoma de rato RINm5F;

A fração ativa do veneno de escorpião *Tityus serrulatus* também eleva o índice de secreção de insulina e induz um aumento na expressão dos mRNAs de insulina e PCNA em ilhotas humanas isoladas.

7. Referências bibliográficas

Sites citados:

Opas - Organização Pan-Americana de Saúde; 30 de julho de 2007, <http://www.opas.org.br/prevencao/temas.cfm?id=46&area=conceito>

Who - World Health Organization; 30 julho 2007, <http://www.who.int>.

ReNeuron Group; 30 de julho de 2007, <http://www.reneuron.com>.

Lctglobal; 30 de julho de 2007, <http://www.lctglobal.com>.

Novocell; 30 de julho de 2007, <http://www.novocell.com>.

Springpointproject; 30 de julho de 2007, <http://www.springpointproject.org>.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2003. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 26 (Supplement 1): S5-S20.

Accili D, Kido Y, Nakae J, Lauro D, Park BC. 2001. Genetics of type 2 diabetes: insight from targeted mouse mutants. *Curr Mol Med* 1(1):9-23.

Aebischer P, Goddard M, Signore AP, Timpson RL. 1994. Functional recovery in hemiparkinsonian primates transplanted with polymer-encapsulated PC12 cells. *Experimental neurology* 126(2):151-158.

Aebischer P, Panol G, Galletti PM. 1986. An intraperitoneal receptacle for macroencapsulated endocrine tissue. *ASAIO transactions / American Society for Artificial Internal Organs* 32(1):130-133.

Andrade SP, Santos RAS, Beraldo WL. 1981. Comparative study of the action of purified scorpion toxin (tityustoxin) on the submandibular and paratireoid glands of the rat. *Toxicon* 19(2):7.

Andresen IL, Skipnes O, Smidsrød O, Østgaard K, Hemmer PC. 1977. Some biological functions of matrix components in benthic algae in relation to their chemistry and the composition of seawater. *ACS Symp Ser* 48:30.

Aranaz I, Acosta N, Heras A. 2006. Synthesis of p-hydroxyphenylglycine by cell extract from *Agrobacterium radiobacter* encapsulated in alginate capsules. *Enzyme and Microbial Technology* 39:7.

Armelin HA. 1973. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(9):2702-2706.

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284(5415):770-776.

Ballinger WF, Lacy PE. 1972. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 72(2):175-186.

Bartholomew C, Mcgeeney KF, Murphy JJ, Fitzgerald O, Sankaran H. 1976. Experimental studies on the aetiology of acute scorpion pancreatitis. *Br J Surg* 63:4.

Baruch L, Machluf M. 2006. Alginate-chitosan complex coacervation for cell encapsulation: effect on mechanical properties and on long-term viability. *Biopolymers* 82(6):570-579.

Basta G, Sarchielli P, Luca G, Racanicchi L, Nastruzzi C, Guido L, Mancuso F, Macchiarulo G, Calabrese G, Brunetti P, Calafiore R. 2004. Optimized parameters for microencapsulation of pancreatic islet cells: an in vitro study clueing on islet graft immunoprotection in type 1 diabetes mellitus. *Transplant immunology* 13(4):289-296.

- Batista CV, Roman-Gonzalez SA, Salas-Castillo SP, Zamudio FZ, Gomez-Lagunas F, Possani LD. 2007. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146(1-2):147-157.
- Beattie GM, Hayek A, Levine F. 2000. Growth and genetic modification of human beta-cells and beta-cell precursors. *Genetic engineering* 22:99-120.
- Beattie GM, Itkin-Ansari P, Cirulli V, Leibowitz G, Lopez AD, Bossie S, Mally MI, Levine F, Hayek A. 1999. Sustained proliferation of PDX-1+ cells derived from human islets. *Diabetes* 48(5):1013-1019.
- Beattie GM, Montgomery AM, Lopez AD, Hao E, Perez B, Just ML, Lakey JR, Hart ME, Hayek A. 2002. A novel approach to increase human islet cell mass while preserving beta-cell function. *Diabetes* 51(12):3435-3439.
- Bendtsen K, Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Nielsen JH, Dinarello CA, Svenson M. 1986. Cytotoxicity of human IL-1 for pancreatic islets of Langerhans. *Science* 20(232(4757)):3.
- Bennett JC, Plum F. 1997. Cecil Textbook of Medicine. 20th, editor.: W. B. Saunders Company. 2647 p.
- Bernard-Kargar C, Kassis N, Berthault MF, Pralong W, Ktorza A. 2001. Sialylated form of the neural cell adhesion molecule (NCAM): a new tool for the identification and sorting of beta-cell subpopulations with different functional activity. *Diabetes* 50 Suppl 1:S125-130.
- Bonner-Weir S. 2000a. Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol* 24(3):297-302.
- Bonner-Weir S. 2000b. Life and death of the pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metab* 11(9):375-378.
- Bonner-Weir S. 2000c. Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology* 141(6):1926-1929.
- Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppert GT, Smith FE. 1993. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 42(12):1715-1720.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-254.
- Brand SJ, Tagerud S, Lambert P, Magil SG, Tatarkiewicz K, Doiron K, Yan Y. 2002. Pharmacological treatment of chronic diabetes by stimulating pancreatic beta-cell regeneration with systemic co-administration of EGF and gastrin. *Pharmacology & toxicology* 91(6):414-420.
- Brennan K, Huangfu D, Melton D. 2007. All beta Cells Contribute Equally to Islet Growth and Maintenance. *PLoS Biol* 5(7):e163.
- Brissova M, Lacik I, Powers AC, Anilkumar AV, Wang T. 1998. Control and measurement of permeability for design of microcapsule cell delivery system. *Journal of biomedical materials research* 39(1):61-70.
- Bruning JC, Winnay J, Cheatham B, Kahn CR. 1997. Differential signaling by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in IRS-1-deficient cells. *Mol Cell Biol* 17(3):1513-1521.
- Burcherl W. 1980. Domesticando o escorpião. 4th, editor. Rio de Janeiro: Kosmos.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52(1):102-110.
- Calafiore R. 1997. Perspectives in pancreatic and islet cell transplantation for the therapy of IDDM. *Diabetes Care* 20(5):889-896.
- Calafiore R, Basta G. 1995. Microencapsulation of pancreatic islets: theoretical principles, technologies and practice Ricordi C, editor. Austin: R G Landes Company. 12 p.
- Calafiore R, Basta G, Luca G, Boselli C, Bufalari A, Bufalari A, Cassarani MP, Giustozzi GM, Brunetti P. 1999. Transplantation of pancreatic islets contained in minimal volume microcapsules in diabetic high mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 875:219-232.
- Calafiore R, Basta G, Luca G, Calvitti M, Calabrese G, Racanicchi L, Macchiarulo G, Mancuso F, Guido L, Brunetti P. 2004. Grafts of microencapsulated pancreatic islet cells for the therapy of diabetes mellitus in non-immunosuppressed animals. *Biotechnology and applied biochemistry* 39(Pt 2):159-164.

- Calafiore R, Basta G, Luca G, Lemmi A, Montanucci MP, Calabrese G, Racanicchi L, Mancuso F, Brunetti P. 2006. Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes: first two cases. *Diabetes Care* 29(1):137-138.
- Campbell IL, Oxbrow L, Koulmanda M, Harrison LC. 1988. IFN-gamma induces islet cell MHC antigens and enhances autoimmune, streptozotocin-induced diabetes in the mouse. *J Immunol* 140(4):1111-1116.
- Campos JA, Silva OA, Lopez M, Freire-Maia L. 1979. Signals symptoms and treatment of severe scorpion poisoning in children. *Toxicon* 17(1):1.
- Catanzaro OL, Santos RAS, Parra OM, Santos RM, Freire-Maia L, Beraldo WL. 1978. Effect of scorpion toxin (tityustoxin) on the salivary gland of the rat, *in vivo* and *in vitro*. *Agents Actions* 8:6.
- Chang PL, Shen N, Westcott AJ. 1993. Delivery of recombinant gene products with microencapsulated cells in vivo. *Human gene therapy* 4(4):433-440.
- Chang TM. 1964. Semipermeable Microcapsules. *Science* 146:524-525.
- Cheong YC, Laird SM, Li TC, Shelton JB, Ledger WL, Cooke ID. 2001. Peritoneal healing and adhesion formation/reformation. *Human reproduction update* 7(6):556-566.
- Cieslinski DA, David Humes H. 1994. Tissue engineering of a bioartificial kidney. *Biotechnology and bioengineering* 43(7):678-681.
- Clayton HA, London NJ, Colloby PS, Bell PR, James RF. 1991. The effect of capsule composition on the biocompatibility of alginate-poly-l-lysine capsules. *Journal of microencapsulation* 8(2):221-233.
- Clemente GT, Rossoni RB, Safe JM, Freire-Maia L. 1999. Effects of crude venom, tityustoxin and toxin Ts-gamma from *Tityus serrulatus* scorpion on secretion and structure of the rat submandibular gland. *Archives of oral biology* 44(2):103-110.
- Coromili V, Chang TM. 1993. Polydisperse dextran as a diffusing test solute to study the membrane permeability of alginate polylysine microcapsules. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol* 21(3):427-444.
- Cunha-Melo JR, Freire-Maia L, Tafuri WL, Maria TA. 1973. Mechanism of action of purified scorpion toxin on the isolated rat intestine. *Toxicon* 11:4.
- Davalli AM, Ogawa Y, Scaglia L, Wu YJ, Hollister J, Bonner-Weir S, Weir GC. 1995. Function, mass, and replication of porcine and rat islets transplanted into diabetic nude mice. *Diabetes* 44(1):104-111.
- de Groot M, Keizer PP, de Haan BJ, Schuurs TA, Leuvenink HG, van Schilfgaarde R, de Vos P. 2001. Microcapsules and their ability to protect islets against cytokine-mediated dysfunction. *Transplant Proc* 33(1-2):1711-1712.
- de Groot M, Schuurs TA, van Schilfgaarde R. 2004. Causes of limited survival of microencapsulated pancreatic islet grafts. *The Journal of surgical research* 121(1):141-150.
- de Haan BJ, Faas MM, de Vos P. 2003. Factors influencing insulin secretion from encapsulated islets. *Cell transplantation* 12(6):617-625.
- De Lima ME, Martin-Euclaire M. 1995. Th toxins purified from *Tityus serrulatus* (Lutz & Mello) venom. *Toxicol* 14(3):5.
- de Vos P, de Haan BJ, de Haan A, van Zanten J, Faas MM. 2004. Factors influencing functional survival of microencapsulated islet grafts. *Cell transplantation* 13(5):515-524.
- De Vos P, De Haan BJ, Wolters GH, Strubbe JH, Van Schilfgaarde R. 1997. Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets. *Diabetologia* 40(3):262-270.
- de Vos P, Faas MM, Strand B, Calafiore R. 2006. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials* 27(32):5603-5617.
- de Vos P, Hamel AF, Tatarkiewicz K. 2002a. Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetologia* 45(2):159-173.
- de Vos P, Hoogmoed CG, Busscher HJ. 2002b. Chemistry and biocompatibility of alginate-PLL capsules for immunoprotection of mammalian cells. *Journal of biomedical materials research* 60(2):252-259.

- de Vos P, Marchetti P. 2002. Encapsulation of pancreatic islets for transplantation in diabetes: the untouchable islets. *Trends Mol Med* 8(8):363-366.
- de Vos P, Smedema I, van Goor H, Moes H, van Zanten J, Netters S, de Leij LF, de Haan A, de Haan BJ. 2003a. Association between macrophage activation and function of micro-encapsulated rat islets. *Diabetologia* 46(5):666-673.
- de Vos P, van Hoogmoed CG, de Haan BJ, Busscher HJ. 2002c. Tissue responses against immunisolating alginate-PLL capsules in the immediate posttransplant period. *Journal of biomedical materials research* 62(3):430-437.
- de Vos P, van Hoogmoed CG, van Zanten J, Netter S, Strubbe JH, Busscher HJ. 2003b. Long-term biocompatibility, chemistry, and function of microencapsulated pancreatic islets. *Biomaterials* 24(2):305-312.
- Deprez P, Mandine E, Gofflo D, Meunier S, Lesuisse D. 2002. Small ligands interacting with the phosphotyrosine binding pocket of the Src SH2 protein. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 12(9):1295-1298.
- Dhawan S, Georgia S, Bhushan A. 2007. Formation and regeneration of the endocrine pancreas. *Current opinion in cell biology* 19(6):634-645.
- Diniz CR, Valeri V. 1959. Effects of a toxin present in a purified extract of telson from the scorpion *Tityus serrulatus* on smooth muscle preparations and in mice. *Archs Int Pharmacodyn Ther* 71(1-2):11.
- Donati I, Holtan S, Morch YA, Borgogna M, Dentini M, Skjak-Braek G. 2005. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. *Biomacromolecules* 6(2):1031-1040.
- Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. 2004. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429(6987):41-46.
- Dor Y, Melton DA. 2004. How important are adult stem cells for tissue maintenance? *Cell Cycle* 3(9):1104-1106.
- Dusseault J, Leblond FA, Robitaille R, Jourdan G, Tessier J, Menard M, Henley N, Halle JP. 2005. Microencapsulation of living cells in semi-permeable membranes with covalently cross-linked layers. *Biomaterials* 26(13):1515-1522.
- Dusseault J, Tam SK, Menard M, Polizu S, Jourdan G, Yahia L, Halle JP. 2006. Evaluation of alginate purification methods: effect on polyphenol, endotoxin, and protein contamination. *J Biomed Mater Res A* 76(2):243-251.
- Duvivier-Kali VF, Omer A, Lopez-Avalos MD, O'Neil JJ, Weir GC. 2004. Survival of microencapsulated adult pig islets in mice in spite of an antibody response. *Am J Transplant* 4(12):1991-2000.
- Efrat S. 2008a. Beta-cell replacement for insulin-dependent diabetes mellitus. *Advanced drug delivery reviews* 60(2):114-123.
- Efrat S. 2008b. In vitro expansion of human beta cells. *Diabetologia* 51(7):1338-1339.
- Elliott RB, Escobar L, Garkavenko O, Croxson MC, Schroeder BA, McGregor M, Ferguson G, Beckman N, Ferguson S. 2000. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts. *Cell transplantation* 9(6):895-901.
- Elliott RB, Escobar L, Tan PL, Muzina M, Zwain S, Buchanan C. 2007. Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation. *Xenotransplantation* 14(2):157-161.
- Ferlito M, Romanenko OG, Ashton S, Squadrito F, Halushka PV, Cook JA. 2001. Effect of cross-tolerance between endotoxin and TNF-alpha or IL-1beta on cellular signaling and mediator production. *Journal of leukocyte biology* 70(5):821-829.
- Finegood DT, Scaglia L, Bonner-Weir S. 1995. Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 44(3):249-256.
- Finegood DT, Tzur D. 1996. Reduced glucose effectiveness associated with reduced insulin release: an artifact of the minimal-model method. *Am J Physiol* 271(3 Pt 1):E485-495.
- Fiorina P, Folli F, Maffi P, Placidi C, Venturini M, Finzi G, Bertuzzi F, Davalli A, D'Angelo A, Socci C, Gremizzi C, Orsenigo E, La Rosa S, Ponzoni M, Cardillo M, Scalamogna M, Del Maschio A, Capella C, Di Carlo V, Secchi A. 2003. Islet transplantation improves vascular diabetic complications in patients with diabetes who underwent kidney transplantation: a

- comparison between kidney-pancreas and kidney-alone transplantation. *Transplantation* 75(8):1296-1301.
- Flier SN, Kulkarni RN, Kahn CR. 2001. Evidence for a circulating islet cell growth factor in insulin-resistant states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(13):7475-7480.
- Freire-Maia L, Diniz CR. 1970. Pharmacological action of a purified scorpion toxin in the rat. *Toxicon* 8:1.
- Goncalves AA, Toyama MH, Carneiro EM, Marangoni S, Arantes EC, Giglio JR, Boschero AC. 2003. Participation of Na(+) channels in the potentiation by *Tityus serrulatus* alpha-toxin TsTx-V of glucose-induced electrical activity and insulin secretion in rodent islet beta-cells. *Toxicon* 41(8):1039-1045.
- Gonzaga HMS, Alzamora F, Cunha-Melo JR, Freire-Maia L. 1979. Gastric secretion induced by scorpion toxin. *Toxicon* 17:3.
- Gradwohl G. 2006. Development of the endocrine pancreas. *Diabetes Metab* 32(5 Pt 2):532-533.
- Groth CG, Korsgren O, Tibell A, Tollemar J, Moller E, Bolinder J, Ostman J, Reinholt FP, Hellerstrom C, Andersson A. 1994. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* 344(8934):1402-1404.
- Gu D, Sarvetnick N. 1993. Epithelial cell proliferation and islet neogenesis in IFN-g transgenic mice. *Development* 118(1):33-46.
- Gunzburg WH, Salmons B. 2000. Xenotransplantation: is the risk of viral infection as great as we thought? *Molecular medicine today* 6(5):199-208.
- Halvorsen TL, Beattie GM, Lopez AD, Hayek A, Levine F. 2000. Accelerated telomere shortening and senescence in human pancreatic islet cells stimulated to divide in vitro. *The Journal of endocrinology* 166(1):103-109.
- Haque T, Chen H, Ouyang W, Martoni C, Lawuyi B, Urbanska AM, Prakash S. 2004. Superior Cell Delivery Features of Poly(ethylene glycol) Incorporated Alginate, Chitosan, and Poly-L-lysine Microcapsules. *Molecular Pharmaceutics* 2(1):8.
- Hasse C, Zielke A, Klock G, Schlosser A, Zimmermann U, Rothmund M. 1997. Isotransplantation of microencapsulated parathyroid tissue in rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105(1):53-56.
- Hegre OD, Hickey GE, Marshall S, Serie JR. 1984a. Modification of allograft immunogenicity in perinatal islets isolated and purified in vitro. *Transplantation* 37(3):227-233.
- Hegre OD, Serie J, Hickey G. 1984b. Modification of immunogenicity in perinatal islets isolated and purified in vitro. *Transplant Proc* 16(4):1057-1058.
- Hellerstrom C, Andersson A, Groth CG, Sandler S, Jansson L, Korsgren O, Swenne I, Petersson B, Tollemar J, Tyden G. 1988. Experimental pancreatic transplantation in diabetes. *Diabetes Care* 11 Suppl 1:45-53.
- Hellerstrom C, Swenne I. 1991. Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic beta-cells. *Diabetes* 40 Suppl 2:89-93.
- Heo DS, Park JG, Hata K, Day R, Herberman RB, Whiteside TL. 1990. Evaluation of tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity. *Cancer research* 50(12):3681-3690.
- Holtan S, Zhang Q, Strand WI, Skjak-Braek G. 2006. Characterization of the hydrolysis mechanism of polyalternating alginate in weak acid and assignment of the resulting MG-oligosaccharides by NMR spectroscopy and ESI-mass spectrometry. *Biomacromolecules* 7(7):2108-2121.
- Hortelano G, Al-Hendy A, Ofosu FA, Chang PL. 1996. Delivery of human factor IX in mice by encapsulated recombinant myoblasts: a novel approach towards allogeneic gene therapy of hemophilia B. *Blood* 87(12):5095-5103.
- Ido Y, Vindigni A, Chang K, Stramm L, Chance R, Heath WF, DiMarchi RD, Di Cera E, Williamson JR. 1997. Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide. *Science* 277(5325):563-566.
- Juste S, Lessard M, Henley N, Menard M, Halle JP. 2005. Effect of poly-L-lysine coating on macrophage activation by alginate-based microcapsules: assessment using a new in vitro method. *J Biomed Mater Res A* 72(4):389-398.

- Kang J, Schwendeman SP. 2006. Pore Closing and Opening in Biodegradable Polymers and Their Effect on the Controlled Release of Proteins. *Molecular Pharmaceutics*(1):15.
- Kin T, Iwata H, Aomatsu Y, Ohyama T, Kanehiro H, Hisanaga M, Nakajima Y. 2002. Xenotransplantation of pig islets in diabetic dogs with use of a microcapsule composed of agarose and polystyrene sulfonic acid mixed gel. *Pancreas* 25(1):94-100.
- King A, Andersson A, Sandler S. 2000. Cytokine-induced functional suppression of microencapsulated rat pancreatic islets in vitro. *Transplantation* 70(2):380-383.
- King A, Sandler S, Andersson A. 2001. The effect of host factors and capsule composition on the cellular overgrowth on implanted alginate capsules. *Journal of biomedical materials research* 57(3):374-383.
- Klein J, Stock J, Vorlop KD. 1983. Pore Size and Properties of Spherical Ca-Alginate Biocatalysts. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 18:6.
- Kong HJ, Kaigler D, Kim K, Mooney DJ. 2004. Controlling rigidity and degradation of alginate hydrogels via molecular weight distribution. *Biomacromolecules* 5(5):1720-1727.
- Koo J, Chang TM. 1993. Secretion of erythropoietin from microencapsulated rat kidney cells: preliminary results. *The International journal of artificial organs* 16(7):557-560.
- Korbitt GS, Mallett AG, Ao Z, Flashner M, Rajotte RV. 2004. Improved survival of microencapsulated islets during in vitro culture and enhanced metabolic function following transplantation. *Diabetologia* 47(10):1810-1818.
- Labriola L, Ferreira GB, Montor WR, Demasi MA, Pimenta DC, Lojudice FH, Genzini T, Goldberg AC, Eliaschewitz FG, Sogayar MC. 2007a. Prolactin-induced changes in protein expression in human pancreatic islets. *Molecular and cellular endocrinology* 264(1-2):16-27.
- Labriola L, Montor WR, Krogh K, Lojudice FH, Genzini T, Goldberg AC, Eliaschewitz FG, Sogayar MC. 2007b. Beneficial effects of prolactin and laminin on human pancreatic islet-cell cultures. *Molecular and cellular endocrinology* 263(1-2):120-133.
- Lanza RP, Beyer AM, Staruk JE, Chick WL. 1993. Biohybrid artificial pancreas. Long-term function of discordant islet xenografts in streptozotocin diabetic rats. *Transplantation* 56(5):1067-1072.
- Lanza RP, Butler DH, Borland KM, Staruk JE, Faustman DL, Solomon BA, Muller TE, Rupp RG, Maki T, Monaco AP, et al. 1991. Xenotransplantation of canine, bovine, and porcine islets in diabetic rats without immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(24):11100-11104.
- Lanza RP, Chick WL. 1997a. Immunoisolation: at a turning point. *Immunology today* 18(3):135-139.
- Lanza RP, Chick WL. 1997b. Transplantation of encapsulated cells and tissues. *Surgery* 121(1):1-9.
- Lanza RP, Chick WL. 1997c. Transplantation of pancreatic islets. *Annals of the New York Academy of Sciences* 831:323-331.
- Lanza RP, Kuhlreiber WM, Ecker D, Staruk JE, Chick WL. 1995. Xenotransplantation of porcine and bovine islets without immunosuppression using uncoated alginate microspheres. *Transplantation* 59(10):1377-1384.
- Laugharne M, Cross S, Richards S, Dawson C, Ilchysyn L, Saleem M, Mathieson P, Smith R. 2007. Sirolimus toxicity and vascular endothelial growth factor release from islet and renal cell lines. *Transplantation* 83(12):1635-1638.
- Lee KY, Bouhadir KH, Mooney DJ. 2004. Controlled degradation of hydrogels using multi-functional cross-linking molecules. *Biomaterials* 25(13):2461-2466.
- Leinfelder U, Brunnenmeier F, Cramer H, Schiller J, Arnold K, Vasquez JA, Zimmermann U. 2003. A highly sensitive cell assay for validation of purification regimes of alginates. *Biomaterials* 24(23):4161-4172.
- Lillehei RC, Idezuki Y, Kelly WD, Najarian JS, Merkel FK, Goetz FC. 1969a. Transplantation of the intestine and pancreas. *Transplant Proc* 1(1):230-238.
- Lillehei RC, Idezuki Y, Uchida H, Kelly WD, Najarian JS, Merkel F, Goetz FC. 1969b. Pancreatic allotransplantation in the dog and in man. *Br J Surg* 56(9):699.
- Lim F, Sun AM. 1980. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210(4472):908-910.
- Lingohr MK, Buettner R, Rhodes CJ. 2002. Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes? *Trends Mol Med* 8(8):375-384.

- Liu HW, Ofosu FA, Chang PL. 1993. Expression of human factor IX by microencapsulated recombinant fibroblasts. *Human gene therapy* 4(3):291-301.
- Luca G, Calvitti M, Basta G, Baroni T, Neri LM, Becchetti E, Capitani S, Novaes G, Correa-Giannella ML, Kalapothakis E, Engler SS, Eliaschewitz FG, Sogayar MC, Fanelli C, Brunetti P, Calafiore R. 2003. Mitogenic effects of Brazilian arthropod venom on isolated islet beta cells: in vitro morphologic ultrastructural and functional studies. *J Investig Med* 51(2):79-85.
- Lum ZP, Krestow M, Tai IT, Vacek I, Sun AM. 1992. Xenografts of rat islets into diabetic mice. An evaluation of new smaller capsules. *Transplantation* 53(6):1180-1183.
- Maffi P, Bertuzzi F, De Taddeo F, Magistretti P, Nano R, Fiorina P, Caumo A, Pozzi P, Socci C, Venturini M, del Maschio A, Secchi A. 2007. Kidney function after islet transplant alone in type 1 diabetes: impact of immunosuppressive therapy on progression of diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 30(5):1150-1155.
- Maki T, Otsu I, O'Neil JJ, Dunleavy K, Mullon CJ, Solomon BA, Monaco AP. 1996. Treatment of diabetes by xenogeneic islets without immunosuppression. Use of a vascularized bioartificial pancreas. *Diabetes* 45(3):342-347.
- Marangoni S, Toyama MH, Arantes EC, Giglio JR, da Silva CA, Carneiro EM, Goncalves AA, Oliveira B. 1995. Amino acid sequence of TsTX-V, an alpha-toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom, and its effect on K⁺ permeability of beta-cells from isolated rat islets of Langerhans. *Biochimica et biophysica acta* 1243(3):309-314.
- Mares-Guia M, Ricordi C; 1997 June, 17. Novel hetero-polysaccharide conjugates, novel S-INP polysaccharide gels and methods of making and using the same. USA patent 540519-2004.1.
- Maria-Engler SS, Correa-Giannella ML, Labriola L, Krogh K, Colin C, Lojudice FH, Aita CA, de Oliveira EM, Correa TC, da Silva IC, Genzini T, de Miranda MP, Noronha IL, Vilela L, Coimbra CN, Mortara RA, Guia MM, Eliaschewitz FG, Sogayar MC. 2004. Co-localization of nestin and insulin and expression of islet cell markers in long-term human pancreatic nestin-positive cell cultures. *The Journal of endocrinology* 183(3):455-467.
- Martinsen A, Storro I, Skjark-Braek G. 1992. Alginate as immobilization material: III. Diffusional properties. *Biotechnology and bioengineering* 39(2):186-194.
- Mathias D, Brendel MD. 2008. International Islets Transplant Registry. ITR.
- McEvoy RC, Madson KL. 1980a. Pancreatic insulin-, glucagon-, and somatostatin-positive islet cell populations during the perinatal development of the rat. I. Morphometric quantitation. *Biol Neonate* 38(5-6):248-254.
- McEvoy RC, Madson KL. 1980b. Pancreatic insulin-, glucagon-, and somatostatin-positive islet cell populations during the perinatal development of the rat. II. Changes in hormone content and concentration. *Biol Neonate* 38(5-6):255-259.
- Meier S, Drake C. 1984. SEM localization of cell-surface-associated fibronectin in the cranium of chick embryos utilizing immunolabelled microspheres. *J Embryol Exp Morph* 80:20.
- Merani S, Shapiro AM. 2006. Current status of pancreatic islet transplantation. *Clin Sci (Lond)* 110(6):611-625.
- Moe ST, Draget KI, Skjåk-Braek G, Smidsrød O. 1995. Alginates. Stephen AM ed. New York: M Dekker. 245-286 p.
- Morch YA, Donati I, Strand BL, Skjak-Braek G. 2006. Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on alginate microbeads. *Biomacromolecules* 7(5):1471-1480.
- Mullen Y, Maruyama M, Smith CV. 2000. Current progress and perspectives in immunoisolated islet transplantation. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery* 7(4):347-357.
- Mullon C. 1999. Bioartificial organs may help reduce risk of zoonosis in xenotransplantation. *Artificial organs* 23(4):366-367.
- Nielsen JH, Galsgaard ED, Moldrup A, Friedrichsen BN, Billestrup N, Hansen JA, Lee YC, Carlsson C. 2001. Regulation of beta-cell mass by hormones and growth factors. *Diabetes* 50 Suppl 1:S25-29.
- Nielsen S, Emborg C, Molbak AG. 2002. Mortality in concurrent type 1 diabetes and anorexia nervosa. *Diabetes Care* 25(2):309-312.

- Novaes G, Cabral APG, Falco CNML, Queiroz AC. 1989. Acute pancreatitis induced by scorpion toxin, tityustoxin. Histopathological study in rats. *Arq Gastroenterol* 26(1/2):4.
- Novaes G, Cardoso CC, Costa NMO, Falco CNML, Carvalho MHB, Queiroz AC. 1990. Experimental chronic intestinal pancreatitis induced by scorpion toxin in rats. *Arq Gastroenterol* 27(4):3.
- Novaes G, Catanzaro OL, Beraldo WT, Freire-Maia L. 1982. Effect of purified scorpion toxin (tityustoxin) on the pancreatic secretion of the rat. *Toxicon* 20(5):847-853.
- Novaes G, Chetto de Queiroz A, Cardoso CC, Carvalho MHB, Ribeiro Filho LA, Gonçalves AO. 1990a. Nesidioblastose associated with chronic experimental pancreatitis produced by a scorpion toxin, Tityustoxin, in rats. *Braz J Med Biol Res* 23:3.
- Ohya T, Nakajima Y, Kanehiro H, Hisanaga M, Aomatsu Y, Kin T, Nishio K, Ohashi K, Sho M, Nagao M, Tatekawa Y, Ikeda N, Kanokogi H, Yamada T, Iwata H, Nakano H. 1998. Long-term normalization of diabetes by xenotransplantation of newly developed encapsulated pancreatic islets. *Transplant Proc* 30(7):3433-3435.
- Orive G, Carcaboso AM, Hernandez RM, Gascon AR, Pedraz JL. 2005. Biocompatibility evaluation of different alginates and alginate-based microcapsules. *Biomacromolecules* 6(2):927-931.
- Orive G, Hernandez RM, Gascon AR, Igartua M, Pedraz JL. 2003a. Development and optimisation of alginate-PMCG-alginate microcapsules for cell immobilisation. *International journal of pharmaceutics* 259(1-2):57-68.
- Orive G, Hernandez RM, Gascon AR, Igartua M, Pedraz JL. 2003b. Survival of different cell lines in alginate-agarose microcapsules. *Eur J Pharm Sci* 18(1):23-30.
- Orive G, Ponce S, Hernandez RM, Gascon AR, Igartua M, Pedraz JL. 2002. Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials* 23(18):3825-3831.
- Orive G, Tam SK, Pedraz JL, Halle JP. 2006. Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials* 27(20):3691-3700.
- Panyi G, Possani LD, Rodriguez de la Vega RC, Gaspar R, Varga Z. 2006. K⁺ channel blockers: novel tools to inhibit T cell activation leading to specific immunosuppression. *Current pharmaceutical design* 12(18):2199-2220.
- Piro S, Lupi R, Dotta F, Patane G, Rabuazzo MA, Marselli L, Santangelo C, Realacci M, Del Guerra S, Purrello F, Marchetti P. 2001. Bovine islets are less susceptible than human islets to damage by human cytokines. *Transplantation* 71(1):21-26.
- Ponce S, Orive G, Gascon AR, Hernandez RM, Pedraz JL. 2005. Microcapsules prepared with different biomaterials to immobilize GDNF secreting 3T3 fibroblasts. *International journal of pharmaceutics* 293(1-2):1-10.
- Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *European journal of biochemistry / FEBS* 264(2):287-300.
- Possani LD, Merino E, Corona M, Bolivar F, Becerril B. 2000. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie* 82(9-10):861-868.
- Prakash S, Chang TM. 1996. Microencapsulated genetically engineered live E. coli DH5 cells administered orally to maintain normal plasma urea level in uremic rats. *Nature medicine* 2(8):883-887.
- Ribeiro MM. 1999. Permeabilidade de microcápsulas de Biodritin à proteínas: a importância da carga líquida da proteína. Distrito Federal: Universidade de Brasília. 100 p.
- Robertson RP, Davis C, Larsen J, Stratta R, Sutherland DE. 2000. Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. *Diabetes Care* 23(1):112-116.
- Rodriguez de la Vega RC, Possani LD. 2004. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon* 43(8):865-875.
- Rodriguez de la Vega RC, Possani LD. 2005. On the evolution of invertebrate defensins. *Trends Genet* 21(6):330-332.
- Rood PP, Cooper DK. 2006. Islet xenotransplantation: are we really ready for clinical trials? *Am J Transplant* 6(6):1269-1274.
- Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM. 2005. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54(7):2060-2069.

- Safley SA, Kapp LM, Tucker-Burden C, Hering B, Kapp JA, Weber CJ. 2005. Inhibition of cellular immune responses to encapsulated porcine islet xenografts by simultaneous blockade of two different costimulatory pathways. *Transplantation* 79(4):409-418.
- Sampaio SV, Laure CJ, Giglio JR. 1983. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 21(2):265-277.
- Sankaran H, Bartholomew C, Fitzgerald O, Mcgeeney KF. 1977. Secretory effect of the venom of the scorpion *Tityus trinitatis* on rat pancreatic slices. *Toxicon* 15:6.
- Sankaran H, Deveney CW, Bartholomew C, Raghupathy E. 1983. Action of the venom of the scorpion *Tityus trinitatis* on pancreatic insulin secretion. *Biochemical pharmacology* 32(6):1101-1104.
- Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, McCullough CS, Weide LG, Falqui L, Marchetti P, Gingerich RL, Jaffe AS, Cryer PE, et al. 1990. Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patient. *Diabetes* 39(4):515-518.
- Schneider S, Feilen PJ, Brunnenmeier F, Minnemann T, Zimmermann H, Zimmermann U, Weber MM. 2005. Long-term graft function of adult rat and human islets encapsulated in novel alginate-based microcapsules after transplantation in immunocompetent diabetic mice. *Diabetes* 54(3):687-693.
- Servitja JM, Ferrer J. 2004. Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function. *Diabetologia* 47(4):597-613.
- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. 2000. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343(4):230-238.
- Skjak-Braek G, Murano E, Paoletti S. 1989. Alginate as immobilization material. II: Determination of polyphenol contaminants by fluorescence spectroscopy, and evaluation of methods for their removal. *Biotechnology and bioengineering* 33(1):90-94.
- Soon-Shiong P, Heintz RE, Merideth N, Yao QX, Yao Z, Zheng T, Murphy M, Moloney MK, Schmehl M, Harris M, et al. 1994. Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet* 343(8903):950-951.
- Sorenson RL, Brelje TC. 1997. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* 29(6):301-307.
- Steiner DF, Rubenstein AH. 1997. Proinsulin C-peptide--biological activity? *Science* 277(5325):531-532.
- Strand BL, Morch YA, Espevik T, Skjak-Braek G. 2003. Visualization of alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules by confocal laser scanning microscopy. *Biotechnology and bioengineering* 82(4):386-394.
- Sun Y, Ma X, Zhou D, Vacek I, Sun AM. 1996. Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. *J Clin Invest* 98(6):1417-1422.
- Sutherland DE. 2003. Current status of beta-cell replacement therapy (pancreas and islet transplantation) for treatment of diabetes mellitus. *Transplant Proc* 35(5):1625-1627.
- Sutherland DE, Gruessner RW, Dunn DL, Matas AJ, Humar A, Kandaswamy R, Mauer SM, Kennedy WR, Goetz FC, Robertson RP, Gruessner AC, Najarian JS. 2001. Lessons learned from more than 1,000 pancreas transplants at a single institution. *Ann Surg* 233(4):463-501.
- Sutton R, Gray DW, McShane P, Dallman MJ, Morris PJ. 1989. The specificity of rejection and the absence of susceptibility of pancreatic islet beta cells to nonspecific immune destruction in mixed strain islets grafted beneath the renal capsule in the rat. *The Journal of experimental medicine* 170(3):751-762.
- Suzuki K, Bonner-Weir S, Trivedi N, Yoon KH, Hollister-Lock J, Colton CK, Weir GC. 1998. Function and survival of macroencapsulated syngeneic islets transplanted into streptozocin-diabetic mice. *Transplantation* 66(1):21-28.
- Swenne I. 1982. Effects of cyclic AMP on DNA replication and protein biosynthesis in fetal rat islets of Langerhans maintained in tissue culture. *Biosci Rep* 2(11):867-876.

- Tafari WL, Maria TA, Freire-Maia L, Cunha-Melo JR. 1971. Effect of purified scorpion toxin on vesicular components in the myenteric plexus of the rat. *Toxicon* 9:1.
- Tam SK, Dusseault J, Polizu S, Menard M, Halle JP, Yahia L. 2005. Physicochemical model of alginate-poly-L-lysine microcapsules defined at the micrometric/nanometric scale using ATR-FTIR, XPS, and ToF-SIMS. *Biomaterials* 26(34):6950-6961.
- Tang L, Eaton JW. 1999. Natural responses to unnatural materials: A molecular mechanism for foreign body reactions. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 5(6):351-358.
- Tashiro H, Iwata H, Warnock GL, Takagi T, Machida H, Ikada Y, Tsuji T. 1997. Characterization and transplantation of agarose microencapsulated canine islets of Langerhans. *Ann Transplant* 2(3):33-39.
- Tattersall R. 1977. Brittle diabetes. *Clinics in endocrinology and metabolism* 6(2):403-419.
- Taylor AL, Marcus R, Bradley JA. 2005. Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after solid organ transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol* 56(1):155-167.
- Teta M, Long SY, Wartschow LM, Rankin MM, Kushner JA. 2005. Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes* 54(9):2557-2567.
- Teta M, Rankin MM, Long SY, Stein GM, Kushner JA. 2007. Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors. *Dev Cell* 12(5):817-826.
- Thanos CG, Bintz BE, Bell WJ, Qian H, Schneider PA, MacArthur DH, Emerich DF. 2006. Intraperitoneal stability of alginate-polyornithine microcapsules in rats: an FTIR and SEM analysis. *Biomaterials* 27(19):3570-3579.
- Thanos CG, Bintz BE, Emerich DF. 2007a. Stability of alginate-polyornithine microcapsules is profoundly dependent on the site of transplantation. *J Biomed Mater Res A* 81(1):1-11.
- Thanos CG, Calafiore R, Basta G, Bintz BE, Bell WJ, Hudak J, Vasconcellos A, Schneider P, Skinner SJ, Geaney M, Tan P, Elliot RB, Tatnell M, Escobar L, Qian H, Mathiowitz E, Emerich DF. 2007b. Formulating the alginate-polyornithine biocapsule for prolonged stability: evaluation of composition and manufacturing technique. *J Biomed Mater Res A* 83(1):216-224.
- Thu B, Bruheim P, Espevik T, Smidsrod O, Soon-Shiong P, Skjak-Braek G. 1996a. Alginate polycation microcapsules. I. Interaction between alginate and polycation. *Biomaterials* 17(10):1031-1040.
- Thu B, Bruheim P, Espevik T, Smidsrod O, Soon-Shiong P, Skjak-Braek G. 1996b. Alginate polycation microcapsules. II. Some functional properties. *Biomaterials* 17(11):1069-1079.
- Titus T, Badet L, Gray DW. 2000. Islet cell transplantation for insulin-dependant diabetes mellitus: perspectives from the present and prospects for the future. *Expert reviews in molecular medicine* 2(6):1-28.
- Tun T, Inoue K, Hayashi H, Aung T, Gu YJ, Doi R, Kaji H, Echigo Y, Wang WJ, Setoyama H, Imamura M, Maetani S, Morikawa N, Iwata H, Ikada Y. 1996. A newly developed three-layer agarose microcapsule for a promising biohybrid artificial pancreas: rat to mouse xenotransplantation. *Cell transplantation* 5(5 Suppl 1):S59-63.
- Uludag H, De Vos P, Tresco PA. 2000. Technology of mammalian cell encapsulation. *Advanced drug delivery reviews* 42(1-2):29-64.
- Valdes-Gonzalez RA, Dorantes LM, Garibay GN, Bracho-Blanchet E, Mendez AJ, Davila-Perez R, Elliott RB, Teran L, White DJ. 2005. Xenotransplantation of porcine neonatal islets of Langerhans and Sertoli cells: a 4-year study. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 153(3):419-427.
- van Hoogmoed CG, Busscher HJ, de Vos P. 2003. Fourier transform infrared spectroscopy studies of alginate-PLL capsules with varying compositions. *J Biomed Mater Res A* 67(1):172-178.
- van Montfoort N, de Jong JM, Schuurhuis DH, van der Voort EI, Camps MG, Huizinga TW, van Kooten C, Daha MR, Verbeek JS, Ossendorp F, Toes RE. 2007. A novel role of complement factor C1q in augmenting the presentation of antigen captured in immune complexes to CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 178(12):7581-7586.
- Von Eickstedt VRD. 1983/1984. Escorpionismos por *Tityus stigmurus* no Nordeste do Brasil (Scorpiones: Buthidae). *Mem Inst Butantan* 47/48:5.

- Wahren J, Johansson BL, Wallberg-Henriksson H. 1994. Does C-peptide have a physiological role? *Diabetologia* 37 Suppl 2:S99-107.
- Wang T, Lacik I, Brissova M, Anilkumar AV, Prokop A, Hunkeler D, Green R, Shahrokhi K, Powers AC. 1997. An encapsulation system for the immunoisolation of pancreatic islets. *Nature biotechnology* 15(4):358-362.
- Wang W, Zhaohui M, Bin Y. 2005. Intra-hepatic artery transplantation of newborn porcine islets (NPI) into 20 type 1 diabetic patients with steroids immunosuppression protocol. Abstract OP-056 - Presented at the 10th Congress of the International Pancreas an Islet Transplantatio Association in Geneva 2005. Geneva.
- Weber CJ, Zabinski S, Koschitzky T, Rajotte R, Wicker L, Peterson L, D'Agati V, Reemtsma K. 1990a. Microencapsulated dog and rat islet xenografts into streptozotocin-diabetic and NOD mice. *Hormone and metabolic research* 25:219-226.
- Weber CJ, Zabinski S, Koschitzky T, Wicker L, Rajotte R, D'Agati V, Peterson L, Norton J, Reemtsma K. 1990b. The role of CD4+ helper T cells in the destruction of microencapsulated islet xenografts in nod mice. *Transplantation* 49(2):396-404.
- Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A. 2001. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* 50 Suppl 1:S154-159.
- Williams DF. 1987. *Dictionary of biomaterials*. Liverpool: Liverpool University Press.
- Wilson JT, Chaikof EL. 2008. Challenges and emerging technologies in the immunoisolation of cells and tissues. *Advanced drug delivery reviews* 60(2):124-145.
- Wilson JT, Cui W, Sun XL, Tucker-Burden C, Weber CJ, Chaikof EL. 2007. In vivo biocompatibility and stability of a substrate-supported polymerizable membrane-mimetic film. *Biomaterials* 28(4):609-617.
- Wilson ME, Scheel D, German MS. 2003. Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech Dev* 120(1):65-80.
- Wong H, Chang TM. 1986. Bioartificial liver: implanted artificial cells microencapsulated living hepatocytes increases survival of liver failure rats. *The International journal of artificial organs* 9(5):335-336.
- Xu G, Kaneto H, Lopez-Avalos MD, Weir GC, Bonner-Weir S. 2006. GLP-1/exendin-4 facilitates beta-cell neogenesis in rat and human pancreatic ducts. *Diabetes research and clinical practice* 73(1):107-110.
- Xu W, Liu L, Charles IG. 2002. Microencapsulated iNOS-expressing cells cause tumor suppression in mice. *Faseb J* 16(2):213-215.
- Zhang WJ, Laue C, Hyder A, Schrezenmeir J. 2001. Purity of alginate affects the viability and fibrotic overgrowth of encapsulated porcine islet xenografts. *Transplant Proc* 33(7-8):3517-3519.
- Zimmermann H, Hillgartner M, Manz B, Feilen P, Brunnenmeier F, Leinfelder U, Weber M, Cramer H, Schneider S, Hendrich C, Volke F, Zimmermann U. 2003. Fabrication of homogeneously cross-linked, functional alginate microcapsules validated by NMR-, CLSM- and AFM-imaging. *Biomaterials* 24(12):2083-2096.
- Zimmermann H, Wahlisch F, Baier C, Westhoff M, Reuss R, Zimmermann D, Behringer M, Ehrhart F, Katsen-Globa A, Giese C, Marx U, Sukhorukov VL, Vasquez JA, Jakob P, Shirley SG, Zimmermann U. 2007. Physical and biological properties of barium cross-linked alginate membranes. *Biomaterials* 28(7):1327-1345.
- Zimmermann H, Zimmermann D, Reuss R, Feilen PJ, Manz B, Katsen A, Weber M, Ihmig FR, Ehrhart F, Gessner P, Behringer M, Steinbach A, Wegner LH, Sukhorukov VL, Vasquez JA, Schneider S, Weber MM, Volke F, Wolf R, Zimmermann U. 2005. Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. *Journal of materials science* 16(6):491-501.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Ana Carolina Vale Campos Lisbôa

Local e data de nascimento: Belo Horizonte, 16 de Maio de 1980

EDUCAÇÃO

Colégio Santo Antônio, Belo Horizonte, MG, 1997

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2004.
Graduação em Biologia, Bacharel em Bioquímica

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2005.
Mestrado em Ciências (Bioquímica e Imunologia).

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Professora Substituta de Bioquímica, UFMG, Setembro/2003 a Setembro/2004.

Representante no Colegiado dos alunos de pós-graduação do Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, 2003/2004.

Observer ship no Diabetes Research Institute – University of Miami School of Medicine, DRI, assunto: Human Pancreatic Islets Isolation and Transplantation. Maio-Junho/2005

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado, CNPq, vigência da bolsa Abril/2005 a Março/2009

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS NACIONAIS

BARACAT-PEREIRA, M.C., ESTEVES, S.A., CAMPOS, A.C.V., OLIVEIRA, M.G.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A., e SANTORO, M.M. **Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenases presence of soluble and membrane-bound forms** na XXIX Reunião Anual de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambu, MG, Brasil, 2000.

BARACAT-PEREIRA, M.C., CAMPOS, A.C.V., ESTEVES, S.A., OLIVEIRA, M.G.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A., e SANTORO, M.M. **Partial purification and characterization of lipoxygenases from soybean leaves** na XXIX Reunião Anual de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambu, MG, Brasil, 2000.

BARACAT-PEREIRA, M.C., CAMPOS, A.C.V., ESTEVES, S.A., OLIVEIRA, M.G.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A., BEMQUERER, M.P., e SANTORO, M.M. **Purification and kinetic characterization of different forms of lipoxygenases from soybean leaves** na XXX Reunião Anual de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambu, MG, Brasil, 2001.

ESTEVEES, S.A., BEMQUERER, M.P., CAMPOS, A.C.V., BARACAT-PEREIRA, e SANTORO, M.M. **Purificação e caracterização cinética de diferentes formas de lipoxigenases de folhas de soja** na X Semana de Iniciação Científica – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2002.

* Trabalho Premiado – apresentação na SBPC – Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência.

ESTEVEES, S.A., BEMQUERER, M.P., CAMPOS, A.C.V., BARACAT-PEREIRA, e SANTORO, M.M. **Purificação e caracterização cinética de diferentes formas de lipoxigenases de folhas de soja** na Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência - Brasília, DF, Brasil, 2002.

MAIA, A.L.T., BARBOSA, P.M.M., MORETTI, M.S., CAMPOS, A.C.V., CORREA, C.R., GOMES, M.T.R. **Riqueza da fauna de macroinvertebrados bentônicos em um experimento de decomposição em Litter** na X Semana de Iniciação Científica – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2002.

NAGIB, P.R., CRUZ, A.R., LOYOLA, R.D., LOBO, F.P., CAMPOS, A.C.V., GOMES, M.T.R., CORREA, C.R. **Levantamento sobre o uso de plantas medicinais na população: estudos etnofarmacológicos em Belo Horizonte, MG** na X Semana de Iniciação Científica – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2002.

CAMPOS, A.C.V., CORRÊA, C., GARCIA, L., MORETTI, M., NAGIB, P., e LOYOLA, R. **Influência de fatores abióticos na distribuição espacial de Echinaster brasiliensis (Echinodermata: Asteroidea) em uma área de costão rochoso da Ponta do Jarobá, São Sebastião, SP** no XXIV Congresso Brasileiro de Zoologia, Universidade Vale do Itajaí, SC, Brasil, 2002.

CAMPOS, A.C.V., BARACAT-PEREIRA, M.C., MORAES, R.M.A., e SANTORO, M.M. **Electrophoresis patterns of lipoxigenases from soybean leaves (Glycine max L.)** na XXXI Reunião Anual de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambu, MG, Brasil, 2002.

* Trabalho selecionado para a Sessão Comunicação Livre no Congresso.

CAMPOS, A.C.V., BARACAT-PEREIRA, M.C., MORAES, R.M.A., e SANTORO, M.M. **Padrões Eletroforéticos de lipoxigenases de Folha de Soja (Glycine max L.)** na XI Semana de Iniciação Científica – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2003

CAMPOS, A.C.V., BARACAT-PEREIRA, M.C., MARES-GUIA, T.R., NETO, A.M., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C., e SANTORO, M.M. **Purification of antibodies and immunorecognition of purified lipoxigenases from soybean (Glycine max [L.] Merrill)** na XXXII Reunião Anual de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambu, MG, Brasil, 2003.

TROCHINE, A., CAMPOS, A.C.V., FIGUEREDO, R.C.R., MIRANDA, A., OLIVEIRA, V.X.Jr., SPISNI, A. **Structural studies on hormone angiotensin II analogues** na 13ª Reunião Anual de Usuários do Laboratório Nacional de Luz Sincotron (LNLS), Campinas, SP, Brasil, 2003.

CAMPOS, A.C.V., BARACAT-PEREIRA, M.C., NETO, A.M., e SANTORO, M.M. **Purification and characterization of different forms of lipoxigenases from soybean leaves** no V Congresso Íbero-Americano de Biofísica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2003.

CAMPOS, A.C.V., BARACAT-PEREIRA, M.C., BEMQUERER, M.P., PIMENTA, A.M.C., e SANTORO, M.M. **Are soybean LOX bifunctional proteins in that they can function enzymatically and as vegetative storage protein?** na XXXIII Reunião Anual de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambu, MG, Brasil, 2004.

CAMPOS, A.C.V., SANTOS, P.B., KALAPOTHAKIS, E. GOLDBERG, A.C. e SOGAYAR, M.C. **Mitogenic effects of Tityus serrulatus and Tityus bahiensis venom on beta cell's insulinom, RINm5f cells** na XXIX Reunião Anual de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Águas de Lindóia, SP, Brasil, 2005.

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS INTERNACIONAIS

CAMPOS-LISBÔA A.C.V., GRAZIOLI G., GOLDBERG A.C., SOGAYAR M.C. **Microencapsulation of human pancreatic islets for treatment of type 1 diabetes mellitus** na XXXVI Reunião Anual de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) e 10th IUBMB Conference, Salvador, BA, Brasil, 2007

CAMPOS-LISBOA A.C.V., GRAZIOLI G., SILVA J., SANTORO M.M., KALAPOTHAKIS E., SOGAYAR M.C. **Mitogenic effect of scorpion venom purified fractions: relevance for human islet transplantation and diabetes** na XXXVI Reunião Anual de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) e 10th IUBMB Conference, Salvador, BA, Brasil, 2007

MARES-GUIA, T.R.; SANTOS, E.O.; MARIANI, D.B; CAMPOS, A.C.V.; GRAZIOLI, G.; SOGAYAR, M.C. **Effects of proinsulin c-peptide on cytokine-mediated cytotoxicity in RINm5f insulinoma cells and rat pancreatic islets** na XXXVI Reunião Anual de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) e 10th IUBMB Conference, Salvador, BA, Brasil, 2007

MARES-GUIA, T.R.; CAMPOS, A.C.V.; SILVA-ALVES, J.M.; SANTORO, M.M.; MARES-GUIA, M.; SOGAYAR, M.C. **Microcalorimetric evaluation of the effect of glucose on human pancreatic islets microencapsulated with biodritin®** na XXXVI Reunião Anual de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) e 10th IUBMB Conference, Salvador, BA, Brasil, 2007

MARES-GUIA, T.R.; MARIANI, D.B.; SANTOS, E.O.; CAMPOS, A.C.V.; GRAZIOLI, G.; SOGAYAR, M.C. **Effects of vitamin e and proinsulin c-peptide on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in RINm5f insulinoma cells and rat pancreatic islets** na XXXVI Reunião Anual de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) e 10th IUBMB Conference, Salvador, BA, Brasil, 2007

FORTUNA V.A., PETERS H., CAMPOS-LISBOA A.C.V., GRAZIOLI G., SOGAYAR M.C. **Three-dimensional islet-cell structures as a new source for cell-based diabetes therapy** na XXXVI Reunião Anual de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) e 10th IUBMB Conference, Salvador, BA, Brasil, 2007

CAMPOS-LISBÔA A.C.V., GRAZIOLI G., GOLDBERG A.C., SOGAYAR M. **Biocompatibility study of Biodritin® microcapsules used in transplantation of islets of Langerhans** na 13th International Congress of Immunology , August 21-25, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2007

CAMPOS-LISBÔA A.C.V., GRAZIOLI G., MARES-GUIA T.R., GOLDBERG A.C., SOGAYAR M.C. **Aplicability of Biodritin® microcapsules for islets of Langerhans transplantation in type 1 diabetes mellitus patients** CTS-IPITA-IXA 2007 Joint Conference, September 15-20, Minneapolis, MN, EUA, 2007

CAMPOS-LISBÔA A.C.V., GRAZIOLI G., SOGAYAR M.C. **Viable human pancreatic islet for transplantation, by increasing islets cell mass and immunoisolating in biocompatible Biodritin microcapsules** Campus de Excelencia, Junio 21-27, Las Palmas, Gran Canaria, ES, 2008.

TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

CAMPOS-LISBÔA, ACV, VALENZUELA, MGS, JUSTI, DM, GRAZIOLI, G, GOLDBERG, A.C. e SOGAYAR, M.C. **Produção de microcápsulas a partir de alginato de sódio para utilização em transplantes de ilhotas pancreáticas humanas** no 17º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (CBCiMat), Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 2006.

CAPÍTULO DE LIVRO

LOJUDICE, F., FORTUNA, V.A., LABRIOLA, L., CAMPOS, A.C.V., GOLDBERG, A. C., ELIASCHEWITZ, F. G., SOGAYAR, M. C. Células tronco para o tratamento de diabetes melito In: Células Tronco - a nova fronteira da Medicina. **ed.São Paulo : Atheneu**, 2006, p. 159-172.

ARTIGOS PUBLICADOS

A.C.V. CAMPOS-LISBOA, T.R. MARES-GUIA, G. GRAZIOLI, A.C. GOLDBERG, AND M.C. SOGAYAR Biodritin microencapsulated human islets of langerhans and their potential for type 1 diabetes mellitus therapy. **Transplantation Proceedings 40(2)**: 433-435, 2008. (Em anexo)

C. V. CAMPOS-LISBOA, M. G. SILVA-VALENZUELA, G. GRAZIOLLI, F. R. VALENZUELA-DIAZ, M. C. SOGAYAR. Polymeric microcapsules production from sodium alginic acid for cell therapy. **Materials Research 10(4)**: 353-358, 2007. (Em anexo)

M.C. SOGAYAR, F.G. ELIASCHEWITZ, A.C. GOLDENBERG, I.L. NORONHA, T. GENZINI, L. LABRIOLA, A.C.V. CAMPOS, et al. Diabetes mellitus: new therapeutic approaches to treat an old disease. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 26:1-8, 2005.

A.C.V. CAMPOS-LISBOA, G. GRAZIOLI, J. DA SILVA, C.BLOCH, M.M. SANTORO, I. KALAPOTAKIS, M.C. SOGAYAR. Effect of a toxin from scorpion venom Tityus serrulatus in beta cells in context of islet pancreatics transplant. (em preparação).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)