

TÍTULO

TERAPÊUTICA CELULAR NA DIABETES MELLITUS TIPO 1

- TRANSPLANTE DE ILHÉUS ENCAPSULADOS –

CELL THERAPY IN DIABETES MELLITUS TYPE 1

-ENCAPSULATED ISLETS TRANSPLANT-

Adriana Formiga*, Joana Crisóstomo¹, Raquel Seiça¹

¹Laboratório de Fisiologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

Contactos*

Morada: Instituto de Fisiologia, Pólo III da Universidade de Coimbra, Faculdade de Medicina, Subunidade 1, Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000-354 Coimbra, Portugal.

E-mail: adriana_formiga@hotmail.com

RESUMO

A Diabetes Mellitus Tipo 1 é uma doença autoimune caracterizada pela destruição das células- β produtoras de insulina, presentes nos ilhéus pancreáticos, que afeta vários milhões de pessoas mundialmente. A terapêutica base atual é a administração de insulina exógena, que embora permita um perfil glicémico semelhante ao fisiológico, tem eficácia incompleta, necessita de injeções frequentes e não elimina as complicações tardias da doença. A insulino dependência tem aparecimento precoce na vida dos doentes, levando à diminuição da qualidade de vida.

Novas terapêuticas têm sido estudadas e a transplantação de ilhéus pancreáticos está no topo das alternativas, sendo menos invasiva e mais segura comparativamente ao transplante de pâncreas. A introdução do Protocolo de Edmonton tornou esta técnica mais eficaz, com insulino-independência em 70% dos pacientes transplantados, após dois anos, e níveis mais adequados de glicémia em comparação com a insulino terapia intensiva.

O conceito de encapsulamento de ilhéus surgiu para ultrapassar duas das principais dificuldades do transplante, disponibilidade limitada de órgãos e necessidade de terapia imunossupressora. O isolamento de ilhéus numa membrana semipermeável, em teoria, protege-as do ataque do sistema imune do hospedeiro, permitindo ainda a difusão de nutrientes, oxigénio, hormonas e metabolitos. Viabiliza também o uso de fontes de ilhéus xenogénicas permitindo ultrapassar a escassez de ilhéus humanos.

Os dispositivos de encapsulamento podem ser fabricados com inúmeros materiais biocompatíveis, sendo o alginato um dos mais utilizados.

A arquitetura, o diâmetro dos poros e a permeabilidade da membrana, influenciam a sobrevivência dos ilhéus encapsulados. Existem inúmeros protocolos para a construção de cápsulas (macro cápsulas, micro cápsulas e *conformal coating*), com o objetivo de otimizar

diferentes processos, como a secreção de insulina, a imunoproteção, a neovascularização e a oxigenação dos ilhéus. A função e a viabilidade dos ilhéus encapsulados podem ser potenciadas por conjugação de vários materiais na construção da cápsula, co-encapsulamento com outros tipos de células e imunomodulação celular.

Os estudos clínicos mostram redução gradual do sucesso do implante, ou seja, da insulino-independência. Contudo, a longo prazo, uma percentagem de doentes mantém uma função pancreática residual, com menores necessidades de insulina exógena, relativamente à fase pré-transplante, e maior estabilidade metabólica.

O encapsulamento de ilhéus e o seu transplante não é ainda aplicado a nível clínico mas a investigação na área mostra-se promissora.

Palavras – chave

Diabetes Mellitus Tipo 1, Transplante, Ilhéus, Encapsulamento, Imunoproteção

ABSTRACT

The Type 1 Diabetes Mellitus is an autoimmune disease characterized by the destruction of β -cells, which produce insulin, present in pancreatic islets, which affects several million people worldwide. The current base therapy is the administration of exogenous insulin, which although allowing a similar profile to the physiological glycemic, has incomplete efficacy, requires frequent injections and does not eliminate the late complications of the disease. The insulin dependency has early onset in patients' lives, leading to decreased quality of life.

New therapies have been studied and transplantation of pancreatic islets is at the top of the alternatives, being less invasive and safer compared to pancreas transplantation. The introduction of the Edmonton Protocol has made this technique more effective, with insulin independence in 70% of transplanted patients, after two years, and more appropriate levels of glucose compared with intensive insulin therapy.

The concept of encapsulating islets appeared to overcome two major difficulties of transplant, limited availability of organs and need for immunosuppressive therapy. The isolation of islets in a semipermeable membrane, in theory, protects them from attack by the host immune system, and allows diffusion of nutrients, oxygen, hormones and metabolites. Also enables the use of sources of xenogeneic islets, allowing to overcome the shortage of human islets.

The encapsulation devices can be manufactured with numerous biocompatible materials, the alginate being the most used.

The architecture, the pore diameter and membrane permeability influence the survival of encapsulated islets. There are numerous protocols for building capsules (macrocapsules, microcapsules and conformal coating), with the objective of optimizing different processes

such as insulin secretion, immunoprotection, neovascularization and oxygenation of cells. The function and viability of encapsulated islets can be enhanced by conjugation of various materials in the construction of the capsule, co-encapsulation with other cell types and cellular immune modulation.

Clinical studies show a gradual reduction of the success of the implant, that is, in insulin independence. However, long term, a proportion of patients maintain a residual pancreatic function with reduced need for exogenous insulin comparatively with the pre-transplant, and increased metabolic stability.

The encapsulation and transplantation of islet is not yet applied at clinical level but the area shows promise.

Keywords

Diabetes Mellitus Type 1, Transplant, Islets, Encapsulation, Immunoprotection

CONTEÚDO

ABREVIATURAS	7
INTRODUÇÃO	8
MATERIAIS E MÉTODOS	10
FISIOLOGIA DA DIABETES MELLITUS TIPO 1	11
TERAPÊUTICAS PARA A DIABETES MELLITUS TIPO 1	14
TRANSPLANTE DE ILHÉUS ENCAPSULADOS	19
1. Fontes de Células- β	22
2. Preparação Pré-Transplante: Isolamento e Cultura de Ilhéus.....	24
3. Materiais para Encapsulamento	26
4. Tipos de Cápsulas e Técnicas de Encapsulamento	29
5. Locais de Implantação dos Ilhéus Encapsulados	34
6. Proteção Imune dos Ilhéus Encapsulados	35
7. Métodos para Avaliar a Função e Viabilidade do Transplante	39
8. Causas de Falência do Transplante e Possíveis Soluções	41
9. Ensaios Clínicos em Humanos	45
CONCLUSÃO	48
BIBLIOGRAFIA.....	50

ABREVIATURAS

APA - Alginato-Poli-L-Lisina-Alginato

BaCl₂ – Cloreto de Bário

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CMH – Complexo Major de Histocompatibilidade

CP – Cavidade Peritoneal

DM T1 – Diabetes Mellitus Tipo 1

G – Ácido Gulurónico

HbA1c – Hemoglobina glicosilada

IBMIR – Reação Inflamatória Instantânea Mediada pelo Sangue

IE – Islet Equivalent

M – Ácido Manurónico

MAGE – Mean Amplitude of Glycemic Excursion

NO – Óxido Nítrico

PEG – Polietilenoglicol

PFC – Perfluorocarbono

PLL - Poli-L-Lisina

PLO – Poli-L-Ornitina

UW – Universidade de Wisconsin

INTRODUÇÃO

A Diabetes Mellitus afeta cerca de 180 milhões de pessoas mundialmente sendo que 10% são doentes com Diabéticos Mellitus Tipo 1 (DM T1) [1]. A Diabetes e as suas complicações têm impacto individual e social, estimando-se que os custos anuais diretos e indiretos sejam de 5 a 10% do total de despesas em saúde, a nível mundial [2,3]. As complicações severas da diabetes levam não só à diminuição da qualidade como também da esperança média de vida, sendo que a diabetes é a causa principal de cegueira e doença renal nos adultos e aumenta o risco de mortalidade por eventos cardiovasculares [4].

A DM T1 é um desafio terapêutico necessitando de responsabilidade por parte do doente e um acompanhamento familiar adequado pois um controlo glicémico negligenciado favorece o desenvolvimento de complicações agudas e crónicas, tal como um controlo demasiado rígido pode levar a episódios hipoglicémicos [5]. Na última década intensificou-se a investigação com o objetivo de reduzir e prevenir as consequências da diabetes, começando por uma terapêutica alternativa à insulino terapia, nomeadamente o transplante de ilhéus pancreáticos [6].

Neste trabalho analisou-se o estado da arte no que respeita ao transplante de ilhéus pancreáticos. Revisou-se, em particular, uma variante deste método, o transplante de ilhéus encapsulados. O encapsulamento destes numa membrana semipermeável tem o potencial de tratar efetivamente a diabetes sem imunossupressão do hospedeiro, o que torna esta técnica muito apelativa [7].

Apesar de não valorizado na prática clínica, tem ocorrido um grande desenvolvimento nos últimos anos, em termos de fontes celulares, materiais e técnicas para encapsulamento, mecanismos de proteção imune e de eficácia e viabilidade celular.

Embora estreitamente relacionados com o transplante de ilhéus encapsulados, não houve uma abordagem extensa relativamente a células estaminais como fonte de células para transplante, técnicas de imunomodulação para proteção dos ilhéus, métodos cirúrgicos de implantação do material encapsulado e ensaios que, embora façam uso da técnica de encapsulamento celular, usem em conjunto fármacos imunossupressores. Pretende-se analisar os benefícios e verificar a eficácia e a aplicabilidade clínica do transplante de ilhéus encapsulados no tratamento da DM T1.

Iremos, então, abordar, sequencialmente, o transplante de ilhéus encapsulados, partindo das fontes celulares, isolamento, cultura e preservação dos ilhéus, passando para o encapsulamento e os vários tipos de materiais envolvidos, locais de implante das partículas e avaliação do sucesso do transplante. Por fim, serão apresentados os motivos de falência desta técnica, analisando possíveis soluções para os mesmos.

É um tema que merece toda a atenção e esforço pois tem a potencialidade de se tornar não num tratamento mas numa cura para a Diabetes Mellitus.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para realizar a presente revisão, utilizou-se maioritariamente artigos disponíveis *online*. Efetuaram-se várias pesquisas da literatura publicada mais recentemente, tendo como alicerce a base de dados PubMed. Foram utilizadas como palavras-chave, “diabetes treatment” “encapsulated islet”, “islet transplantation” e “cell therapy”. Houve também pesquisa através de referências de artigos analisados.

Para restringir a procura introduziram-se limites relativamente à língua, artigos em português ou inglês, e relativamente à data, artigos publicados a partir de 2000 inclusive. Não se analisaram artigos que publicassem ensaios com células estaminais ou com uso de fármacos imunossupressores.

Assim, vários estudos sobre o transplante de ilhéus pancreáticos encapsulados foram selecionados e, através dos seus resultados, analisados os principais desenvolvimentos ocorridos nos últimos anos em relação a este tipo de transplante.

FISIOLOGIA DA DIABETES MELLITUS TIPO 1

O pâncreas é um órgão retroperitoneal constituído por uma porção exócrina e uma porção endócrina. Esta corresponde a 5% do pâncreas e desenvolve-se a partir das células ductais. Os ilhéus de Langerhans contêm dois tipos principais de células hormono-produtoras, as células- α que segregam glucagon e as células- β responsáveis pela secreção de insulina, sendo estas hormonas as principais responsáveis pela homeostasia da glicose [2, 3].

Nos adultos há cerca de 2.000 células- β por ilhéu de Langerhans, e cerca de 1 milhão de ilhéus no pâncreas. Tem havido discussão sobre quais as células responsáveis pelo crescimento e regeneração dos ilhéus e, principalmente, se a neogénese de ilhéus é um processo real. A replicação de células- β é importante no crescimento durante a infância mas é infrequente em adultos, implicando quiescência dessas mesmas células. Contudo, a massa de células- β aumenta em resposta à obesidade e à gravidez, sugerindo capacidade de *turnover* [8, 9].

A insulina é um polipeptídeo pequeno, de 5,8kDa, sendo a única hormona hipoglicemiante. As células- β sintetizam pró-insulina que, clivada por enzimas proteolíticas, origina insulina e peptídeo-C. Ambos são libertados na corrente sanguínea em resposta ao aumento da glicémia. Esta reação dá-se em dois tempos, devido aos vários graus de sensibilidade dos grânulos, sendo que inicialmente há um rápido aumento da secreção seguido de uma fase mais lenta. (Fig. 1) A insulina diminui a glicémia através da inibição da produção hepática de glicose e da estimulação da captação e do armazenamento da mesma, particularmente no músculo-esquelético e no tecido adiposo [3, 9, 10].

A síntese e a secreção de insulina são um processo complexo, não completamente caracterizado. A glicose afeta a produção de insulina a todos os níveis, incluindo transcrição, translação e secreção. Os ilhéus contêm dois grupos de grânulos, sendo que 5% atua na

resposta imediata ao estímulo. Para renovar o *pool* de insulina, a biossíntese da mesma inicia-se rapidamente [10]. O peptídeo-C é libertado em quantidades equimolares à insulina, sendo um meio de quantificar a produção de insulina pelo organismo. Foi demonstrado que pacientes com níveis de peptídeo-C aquando do diagnóstico de diabetes sofrem menos complicações microvasculares e eventos hipoglicémicos [4, 11].

A DM T1 é consequência da destruição das células- β , maioritariamente por processos auto-ímmunes. Tem aparecimento precoce na infância e adolescência, mas há também casos documentados em adultos, uma forma conhecida por LADA – Diabetes Latente Autoimune do Adulto [2]. Existe um componente genético, com 95% dos casos consequência de susceptibilidade genética aliada a fatores ambientais como infeções ou dieta. Alguns genes do complexo major de histocompatibilidade (CMH) têm sido ligados à DM T1 com um componente familiar. Estes genes ativam as células T que atacam e levam à perda progressiva de células- β , através de lise das células alvo, do reconhecimento de antigénios ligados ao CHM ou da libertação de citocinas quimiotáxicas. É característica a presença de anticorpos anti-ilhéus pancreáticos, anti-insulina e anti-glutamato descarboxilase, que antecedem a perda das células- β . O pâncreas torna-se incapaz de regular a glicémia quando 70 a 90% das células- β estão destruídas [3, 11]. O processo autoimune leva à destruição específica das células- β e limita a regeneração celular compensadora de que resulta hiperglicémia [12, 13].

A história natural da doença associada a um controlo inadequado da glicémia tem consequências a nível micro e macro-vascular, associadas a baixa qualidade de vida e a aumento da mortalidade. Os repetidos episódios de hiper e hipoglicémia, têm consequências morfológicas e funcionais a nível neurológico, cardíaco, renal e oftalmológico, correlacionando-se a gravidade dos danos teciduais com a duração da doença e os valores de hemoglobina glicosilada (HbA1c) [3, 14].

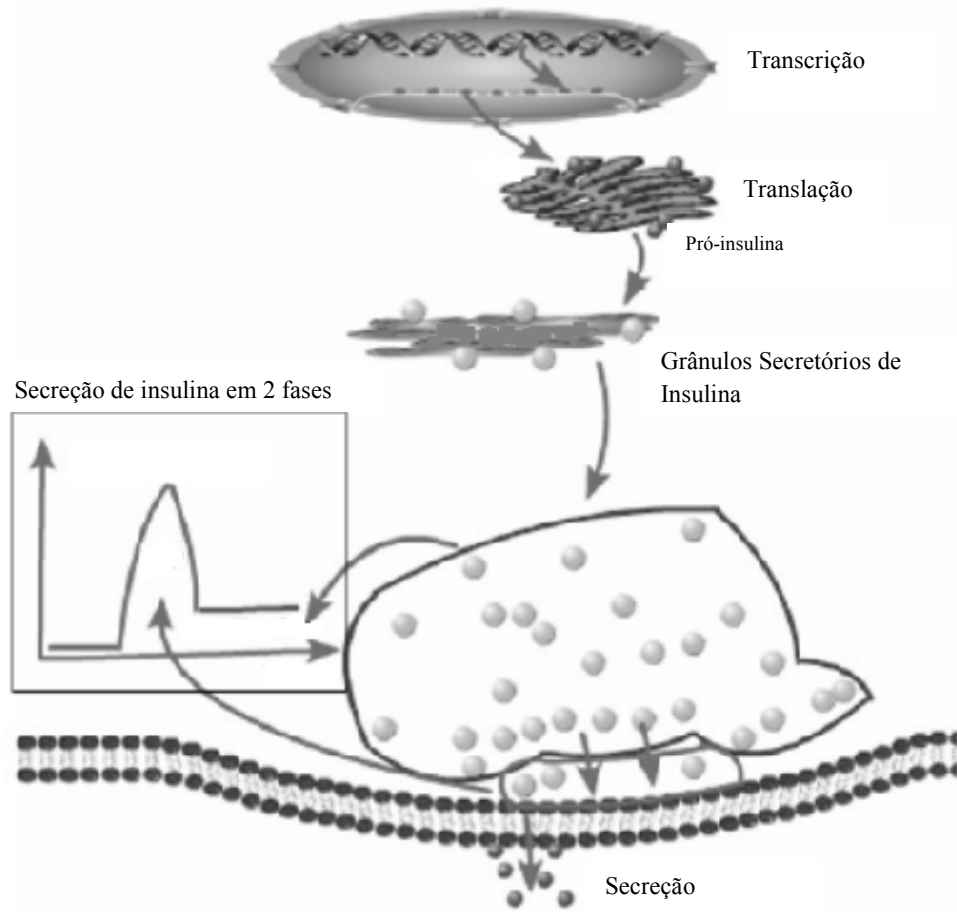


Figura 1 – Processo de síntese e secreção de insulina. Adaptado de Ren *et al.*, 2007

TERAPÊUTICAS PARA A DIABETES MELLITUS TIPO 1

O objetivo do tratamento da DM T1 não se limita a alcançar a insulino-independência mas também a redução da incidência e severidade das complicações da diabetes [6].

Insulinoterapia

O tratamento padrão atual da DM T1 consiste na administração de insulina. A terapia com insulina mudou o curso da diabetes, passando de uma doença aguda rapidamente fatal para uma doença crônica com várias complicações, como neuropatia, doença cardiovascular, insuficiência renal e retinopatia [10].

As várias insulinas disponíveis diferem a nível farmacocinético, oferecendo a possibilidade de esquemas individualizados que mimetizam a liberação fisiológica da hormona. Contudo, a insulinoterapia é incapaz de responder dinamicamente às mudanças na glicémia, não impede completamente o desenvolvimento das complicações e o seu uso, em esquema intensivo, aumenta a probabilidade de episódios hipoglicémicos e coma. [2, 3].

Assim, medicina e engenharia aliaram-se para desenvolver alternativas à insulinoterapia subcutânea, entre as quais se incluem insulina inalada, bombas infusoras (aparelhos que identificam os níveis de glicémia e libertam insulina em conformidade), ou reposição dos ilhéus de Langerhans através do transplante de pâncreas ou ilhéus pancreáticos [3, 5].

Transplante de Pâncreas

Para um reduzido número de doentes diabéticos o transplante de pâncreas apresenta-se como uma possibilidade de cura da DM T1. É uma técnica praticada a nível mundial, sendo que foram realizados aproximadamente 23.000 transplantes deste órgão até 2011. Realizado

desde 1966, é geralmente efetuado em conjunto com o transplante renal, em pacientes em estádios terminais de insuficiência renal devido à nefropatia diabética. A sobrevivência do enxerto é de 76% e 62% no primeiro e terceiro anos, respetivamente [2].

Os doentes submetidos a este transplante mostram controlo metabólico adequado, com valores de HbA1c normais e insulino-independência [5].

É uma intervenção a ponderar, uma vez que apresenta alguma morbilidade e mortalidade peri-operatórias, necessidade de imunossupressão e risco de rejeição a longo prazo [5, 11].

Transplante de Ilhéus Pancreáticos

Enquanto o transplante de pâncreas é considerado uma opção terapêutica, a transplantação de ilhéus ainda é vista como um procedimento experimental [5]. A terapia celular para tratar a diabetes insulino-dependente oferece um potencial mais fisiológico, menos invasivo e potencialmente mais barato que múltiplas injeções diárias de insulina [6, 7].

Lacy *et al.* em 1967, num ensaio *in vitro* conseguiram separar ilhéus pancreáticos de ratos, do tecido acinar, após injeção ductal de collagenase e digestão enzimática do pâncreas. Na década de 70, a mesma equipa, realizou os primeiros transplantes de ilhéus em ratos [2, 5].

Até ao ano 2000, todos os estudos realizados em humanos tiveram pouco sucesso, com apenas 12,4% e 8,2% dos doentes a ficarem insulino-independentes por períodos superiores a 1 semana e 1 ano, respetivamente [5].

Foi então que surgiu o primeiro estudo promissor com Shapiro *et al.* em 2000, no qual sete diabéticos, com história de complicações severas foram submetidos a transplante de ilhéus (11.500 IE/kg injetados na veia porta) provenientes de dadores em morte cerebral. Os doentes selecionados para este estudo tinham DM T1 há mais de 5 anos, níveis de peptídeo C não detetáveis e complicações secundárias à doença severas. Os resultados obtidos foram

surpreendentes pois 100% dos doentes mantiveram insulino-independência durante cerca de um ano após o transplante; esta percentagem diminuiu para 64% aos 2 anos e 8% aos 5 anos, com níveis de peptídeo-C de 86% e 85% aos 2 e 5 anos, respetivamente. Foi também observado normalização da HbA1c, diminuição da *Mean Amplitude of Glycemic Excursion* (MAGE) e dos títulos de anticorpos e ausência de novos episódios de hipoglicémia. Constatou-se que os pacientes com maiores níveis de peptídeo-C tinham menores necessidades de insulina exógena. Nenhum doente sofreu rejeição aguda ou faleceu durante o primeiro ano. O método utilizado por este grupo ficou conhecido como o Protocolo de Edmonton. Uma das características mais notáveis deste protocolo foi a terapia imunossupressora que consistiu em dacluzimab, sirolimus, baixa dose de tacrolimus, e ausência de corticóides [15].

Nove meses após este primeiro estudo, a mesma equipa reforçou os resultados anteriormente obtidos, desta vez em 12 doentes, em que 80% dos participantes mantiveram insulino-independência ao fim de um ano e 70% ao fim de dois anos de seguimento. Os restantes pacientes evidenciavam alguns benefícios do transplante, como a diminuição das doses de insulina exógena e menos episódios de hipoglicémia [5, 12].

O desenvolvimento do Protocolo de Edmonton transformou drasticamente a investigação nesta área. Com vários grupos a confirmarem o sucesso do mesmo, a transplantação de ilhéus ganhou indicações clínicas em doentes com diabetes instável e diabetes após transplantação renal, quando o transplante de pâncreas era contraindicado. O *Clinical Islet Transplantation Consortium* elaborou as condições que os doentes incluídos nas duas categorias anteriores devem ter para poderem ser sujeitos a este tipo de terapêutica: idade, entre os 18 e os 65 anos, serem diabéticos há pelo menos 5 anos, diabetes diagnosticada antes dos 40 anos, índice de massa corporal normal, estimulação negativa do peptídeo-C, utilização de esquemas intensivos de insulina sem alcançarem HbA1c <7%,

hipoglicémias severas, redução dos sintomas de hipoglicemia, ausência de infecção ativa ou doença maligna, função renal com taxa de filtração glomerular > 80ml/min e ausência de hábitos alcoólicos [5, 14].

A subsequente evolução nesta área deve-se ao aperfeiçoamento das técnicas de isolamento, cultura e cirurgia, à introdução de novos regimes imunossupressores e à seleção de recetores mais saudáveis [16].

O Protocolo de Edmonton, ligeiramente modificado, é agora utilizado mundialmente com bons resultados e, apesar dos mesmos serem animadores, as taxas de insulino-independência diminuem com o tempo [2, 11]. São apontadas como causas para a perda do enxerto, a imunossupressão, o insuficiente número de ilhéus, as técnicas de isolamento e cultura deficitárias e a isquemia prolongada do pâncreas. Também o fígado, principal local de transplante, é um meio não fisiológico, com grande concentração de toxinas e produtos farmacológicos, o que pode influenciar a sobrevivência das células pancreáticas [11, 16].

Sendo a DM T1 maioritariamente uma doença autoimune, quando são usados ilhéus de mais de um dador existe probabilidade de sensibilização do hospedeiro, com desenvolvimento de anticorpos anti-HLA (*Human Leucocyte Antigen*), fator de risco de recorrência da diabetes e de reação a um novo transplante de órgão [6].

Apesar do protocolo de fármacos imunossupressores introduzido por Edmonton diminuir complicações como hipertensão arterial e nefrotoxicidade, o estado de imunossupressão está inevitavelmente associada a problemas clínicos como náuseas, obstipação, astenia, fadiga, anemia, neutropenia e, a longo prazo risco de infeções e neoplasias devido ao estado imunodeprimido [5, 16, 17]. Afetam, também, a função das células- β e a sensibilidade à insulina, principalmente, o tacrolimus, que tem sido associado a diminuição da expressão génica, síntese e secreção de insulina [16]. Novos protocolos imunossupressores, com novas drogas, têm surgido, incluindo agentes depletos de células T

(alemtuzumab), agentes depletors de células B (rituximab) e agentes indutores de tolerância periférica (anticorpos anti-CD40L) [2].

Relativamente aos efeitos do transplante de ilhéus nas complicações crónicas da diabetes, existem ainda poucos dados que reflitam o antes e o pós-transplante. Alguns estudos reportaram benefícios, nas micro e macro-angiopatias, em doentes simultaneamente submetidos a transplante renal [6, 16].

O transplante de ilhéus envolve muitas áreas, desde técnicas de isolamento, purificação e cultura de ilhéus, e procedimentos cirúrgicos de implantação dos mesmos, que requerem otimização [3]. A investigação mantém-se pois, em doentes cuja insulinoaterapia falhe, quer pelas descompensações, quer pelas complicações, avizinham-se poucas alternativas [14].

TRANSPLANTE DE ILHÉUS ENCAPSULADOS

As pessoas com DM T1 mantêm uma função pancreática exócrina normal, tornando o transplante de ilhéus pancreáticos mais atrativo face ao transplante total de pâncreas [18].

O transplante de ilhéus encapsulados, começou a ser desenvolvido simultaneamente com os transplantes de ilhéus livres, há mais de 40 anos [3]. O encapsulamento tem como princípio envolver os ilhéus em cápsulas semipermeáveis de material inerte. Os poros da membrana devem ter um diâmetro que permita a difusão de glicose, oxigênio e hormonas, nomeadamente a insulina, mas que exclua as células de defesa e anticorpos (Fig.2) [6, 11, 19].

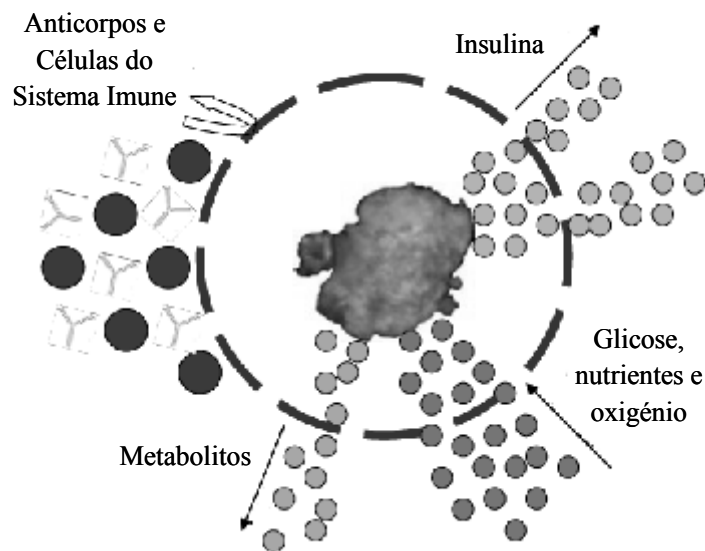


Figura 2 – Princípio do Encapsulamento de Ilhéus Pancreáticos. Adaptado de Vaithilingam e Tuch,

2011

Os dispositivos de encapsulamento evoluíram da simples membrana de fibra oca usada na diálise renal, para cápsulas multi-membranares com co-encapsulamento de moléculas que aumentam a funcionalidade do encapsulamento [3].

A característica mais apelativa nesta técnica é poder imunisolar os ilhéus, protegendo-os das células imunes e dos anticorpos do hospedeiro, sendo prescindível a utilização de drogas imunossupressoras. Outra vantagem é a aplicação de ilhéus xenogénicos, como de porco, uma mais-valia no que diz respeito a colmatar a escassez de dadores humanos [2, 3, 6].

Para o sucesso desta terapêutica é necessário uma fonte funcional de ilhéus e uma membrana mecânica e quimicamente biocompatível, que assegure a viabilidade do transplante. Os ilhéus encapsulados devem ser colocados num ambiente bem vascularizado, de modo a receberem nutrientes e oxigénio e libertarem insulina e metabolitos [6].

A normoglicémia obtida com a implantação de ilhéus encapsulados tem sido demonstrada em modelos animais diabéticos não-imunossuprimidos [3, 7].

Equipas multidisciplinares, envolvendo áreas como biotecnologia, cirurgia e endocrinologia, têm tentado superar as fragilidades deste método, tornando-o mais próximo das necessidades clínicas. Existem limitações tecnológicas e biológicas, questões éticas e de regulamentação. As maiores dificuldades no sucesso do transplante de ilhéus encapsulados relacionam-se com o local do transplante, a difusão de oxigénio, a fibrose pericapsular, a reprodutibilidade das técnicas de construção das cápsulas e a sobrevivência continuada dos ilhéus. A rejeição do enxerto, a toxicidade local, a autoimunidade recorrente e a não renovação das células dos ilhéus são contributos para a falência dos ilhéus transplantados [6, 11, 18].

A maior preocupação ética é demonstrar a biossegurança para se poder realizar ensaios clínicos em humanos. Recentemente, a *Food and Drug Administration* e a *European Medicines Agency* incluíram uma nova categoria baseada em terapia celular, constituindo um passo significativo na aceitação desta tecnologia e, de ensaios clínicos [6].

Para se proceder a estudos em humanos é necessário uma avaliação clínica multidisciplinar, explicar protocolos, os riscos e a duração limitada do tratamento [14, 18].

O desenvolvimento de novos métodos de encapsulamento e transplante, mantêm-se, dado o seu potencial no tratamento da diabetes [11].

1. Fontes de Células- β

Na DM T1, o número de ilhéus e o número de transplantes por doente necessários para a insulino-independência ultrapassa largamente o número de órgãos humanos disponíveis. Em média, são recomendadas cerca de 11.000 IE/kg, um número difícil de adquirir num só pâncreas humano com as técnicas de isolamento atuais [6, 20, 21].

Ilhéus alogénicos

A primeira opção para o transplante de ilhéus consiste no uso de órgãos de dadores em morte cerebral ou dadores cadavéricos [5].

A utilização de dadores cadavéricos é menos comum, embora tenha sido demonstrado que a quantidade e a qualidade de ilhéus são semelhantes à dos dadores em morte cerebral [1]. O processo para o isolamento de ilhéus de cadáver é uma adaptação do método de Ricordi (Protocolo de Edmonton), o método de Quioto, que permite obter mais ilhéus (12,6% superior à de dadores em morte cerebral), com viabilidade comparável. O primeiro transplante com ilhéus de dadores cadavéricos em humanos foi em 2004, por Nagata *et al.* (transplante de quatro doentes com redução subsequente das necessidades de insulina exógena e dos níveis de HbA1c) [5].

De referir ainda que pâncreas de pessoas obesas fornecem maior quantidade de ilhéus, assim como os de dadores mais jovens [5].

Ilhéus xenogénicos

Os ilhéus de origem animal oferecem uma alternativa aos ilhéus humanos. Os xenotransplantes envolvem o enxerto de ilhéus provenientes de outra espécie, permitindo uma

produção em grande escala. Animais geneticamente modificados, rigorosamente selecionados e livres de patogênicos mostram ser uma boa fonte de ilhéus [3, 19].

O transplante de ilhéus de porco encapsulados foi já efetuado em modelos animais e também no homem. O porco tem níveis de glicémia semelhantes aos humanos, a secreção de insulina é similar à do homem e a hormona difere da humana apenas em um resíduo de aminoácido. Nestes animais, a idade correlaciona-se com a maturação do ilhéu, e com a abundância e maturidade do tecido conectivo. Ilhéus porcinos fetais e neonatais são mais facilmente isolados, têm menor sensibilidade à variabilidade da colagenase, são menos imunogênicos, têm maior capacidade proliferativa e o pâncreas tem menor quantidade de tecido exócrino. A produção de ilhéus fetais ronda 10.000U/pâncreas enquanto os ilhéus neonatais atingem 45.000U/pâncreas [3, 19, 22].

Os maiores obstáculos ao uso de ilhéus xenogênicos são a incompatibilidade imune, o receio de infecções virais ou por príões e questões éticas [3, 6].

Estas questões pararam os ensaios clínicos por uma década mas, mais recentemente, o *follow-up* de animais e humanos transplantados com xeno-ilhéus contrariou tais evidências [1, 2, 3]. O estudo de um grupo do Minnesota, em 2011, concluiu que somente os porcos infetados por citomegalovírus ou com mais de 21 semanas devem ser excluídos como fonte de ilhéus, de forma a prevenir infecções virais [21]. Relatórios de 3 centros independentes descrevem a sobrevivência, após 6 meses, de ilhéus porcinos transplantados em primatas, sem transmissão de infecções [22].

Uma outra fonte possível de ilhéus xenogênicos são os bovinos. A insulina bovina difere da humana em três resíduos de aminoácidos. Os ilhéus destes animais são facilmente obtidos e mostram boa função *in vitro* e *in vivo*, sendo a pureza dos ilhéus tanto maior quanto menor a idade do dador. Animais que receberam ilhéus de bovinos micro-encapsulados mantiveram-se normoglicêmicos por períodos de 17 a 40 dias [23].

2. Preparação Pré-Transplante: Isolamento e Cultura de Ilhéus

É da maior importância desenvolver as condições ótimas de isolamento, cultura e preservação das células insulares. Existe uma variedade de técnicas de isolamento e cultura de ilhéus, sendo que alguns dos protocolos de maior sucesso são inacessíveis, sendo impossível fazer comparações apropriadas destas técnicas.

Inicialmente o meio de preservação do pâncreas era a solução da Universidade de Wisconsin (UW) mas estudos recentes revelaram que quando o órgão é preservado em solução de duas camadas, UW com perfluorocarbono (PFC), o tecido é mais oxigenado e mantém a integridade celular [5]. Outra solução, mais usada em pâncreas de cadáveres, é a ET-Kyoto, que tem constituição semelhante ao líquido extracelular, com trehalose e ulinastatina, para citoproteção e inibição da tripsina respectivamente [21]. O intervalo entre a extração e a digestão enzimática do tecido exócrino do pâncreas pode ser prolongado até 24 horas, mantendo o órgão hipotérmico [3].

A digestão é feita através da injeção de uma solução com colagenase e outras enzimas digestivas no ducto pancreático, e é finalizada na câmara de Ricordi sob agitação mecânica. Segue-se centrifugação para separar os ilhéus da parte exócrina [3, 5].

Os parâmetros pelos quais se deve avaliar o processo de isolamento são a quantidade, esterilidade, pureza, viabilidade, morfologia e função dos ilhéus [6].

A fase de cultura é ideal para aplicar técnicas que melhorem a função insular. A resposta dos ilhéus parece melhorar com o período de cultura pré-transplante. Estratégias como o aumento da tensão de oxigênio em 21% ou a inibição do *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) provocam um melhor desenvolvimento celular e favorecem a função do transplante. A citoproteção também pode ser alcançada pela adição de agentes anti-apoptóticos ao meio de cultura, como a nicotinamida [1, 24].

A criopreservação surgiu como um sistema de armazenamento de ilhéus pois o processo de isolar, purificar, encapsular e transplantar ilhéus num só dia é inexecutável, além de que abre a possibilidade para criação de um banco com grandes quantidades de ilhéus viáveis e disponíveis para transplante. Também permite o tempo adequado para tipagem do tecido e rastreio de doenças. Contudo, sem as devidas precauções pode danificar os ilhéus através da formação de cristais de gelo [25, 26, 27].

3. Materiais para Encapsulamento

Os materiais selecionados para o encapsulamento de ilhéus devem imuno-isolar os ilhéus e concomitantemente permitir a difusão de moléculas essenciais. Para o desenvolvimento de materiais adequados deve existir uma compreensão do sistema imune, da função e longevidade dos ilhéus encapsulados [2, 7, 8].

O êxito do encapsulamento de ilhéus depende da utilização de polímeros que possam controlar o comportamento dos mesmos, antes e após a implantação. Esforços para identificar materiais para encapsular ilhéus levaram à investigação de polímeros naturais e sintéticos, como o alginato e o Polietilenoglicol (PEG), respetivamente [6].

O material mais estudado para o encapsulamento de ilhéus é o alginato, um polissacarídeo natural abundante. O seu estudo levou ao desenvolvimento de alginatos ultrapurificados, que reavivaram o interesse na área do encapsulamento celular. O alginato não interfere na função celular e tem boa estabilidade [21]. Consiste numa mistura de resíduos de ácidos gulurónico (G) e manurónico (M), sendo que a proporção e ordem sequencial dos componentes influencia as características físicas e mecânicas da cápsula. O alginato rico em M liga-se mais efetivamente à Poli-L-Lisina (PLL), diminuindo o risco de reações inflamatórias e fibrose pericapsular [7, 17]. Alginatos ricos em G são mais estáveis e resistentes ao *stress* mecânico [3, 28]. A gelificação do alginato ocorre quando catiões divalentes interagem com os grupos carboxilo do G. A estabilidade da partícula é tanto maior quanto maior a afinidade do ião. Entre os iões de maior afinidade o Ba^{2+} é o menos tóxico, resultando em integridade mais duradoura quando comparado com o Ca^{2+} [2, 19, 29].

O alginato pode ser usado sob a forma de matriz única ou como parte de uma membrana com vários materiais e camadas [6].

Vários polímeros são usados no encapsulamento celular, alguns deles são usados particularmente para aumentar a funcionalidade do alginato.

O PEG é um polímero flexível e hidratável. Através do controlo do comprimento da cadeia do polímero, a peguilação da superfície celular camufla locais antigénicos, altera a carga superficial e atenua as ligações a células imunes, aumentando a biocompatibilidade do alginato [30]. Modificações na estrutura do PEG, como ativação de um éster que reaja com os grupos amina da membrana colagénica do ilhéu, ou conjugação com fosfolípidos hidrofóbicos, são utilizadas na formação de cápsulas com espessuras menores. Outros grupos funcionais do PEG, como a maleimida e biotina, podem ser utilizados na formação de cápsulas *layer-by-layer* (LbL) [27]

A PLL funciona como um policatión, ligando-se ao alginato e ajudando na reticulação do material. Tem propriedades inflamatórias, necessitando de ser recoberta por uma camada ultrafina de alginato para aumentar a biocompatibilidade. As cápsulas de Alginato-Poli-L-Lisina-Alginato (APA) proporcionam uma grande área de superfície, estabilidade e porosidade precisa [6, 7, 19].

Outros polímeros utilizados são a polisulfona (PSU), um material semelhante ao alginato. A sua rede de fibras ocas absorve grandes quantidades de insulina pelo que é um possível material a utilizar. O álcool polivinílico (PVA) é um polímero solúvel em água, com capacidade de proteger os ilhéus do ataque do sistema imune, baixa tendência para ligar proteínas e grande elasticidade [21, 31].

O quitosano é um polímero biocompatível, não imunogénico e com boas propriedades de manuseamento. A solução de quitosano com glicerol fosfato hidratado sal disódico torna-se um hidrogel a 37°C. A adição de gelatina ao composto aumenta a força mecânica do hidrogel, dando-lhe a viscosidade que facilita a manipulação e características imunoisolantes [32].

Mais recentemente surgiram membranas de silicone que possuem poros uniformes de apenas alguns nanómetros [6].

Todos estes materiais já foram utilizados em modelos animais com sucesso; contudo, ainda não foi encontrada a matéria-prima ou combinação de materiais que reúna todas as condições para provir uma sobrevida prolongada dos ilhéus encapsulados.

4. Tipos de Cápsulas e Técnicas de Encapsulamento

Para o sucesso do encapsulamento, deve-se identificar e otimizar todas as características das membranas protetoras, desde permeabilidade, imunoproteção e biocompatibilidade. Na prática, a forma, o tamanho e as propriedades mecânicas das cápsulas influenciam tais parâmetros. Até à data, uma variedade de matrizes e membranas poliméricas e inorgânicas foram utilizadas para produzir dispositivos de encapsulamento [3, 6].

As cápsulas são divididas em macrocápsulas e microcápsulas, embora não haja um valor específico que faça a separação entre os dois grupos (Fig. 3).

As macrocápsulas podem ter aplicação intravascular (dispositivos de perfusão sanguínea) ou extravascular (câmaras de difusão) [3, 19]. Nos dispositivos intravasculares os ilhéus estão dentro de uma câmara tubular com uma membrana semipermeável interna que é conectada à vasculatura do hospedeiro através de uma anastomose vascular. Os ilhéus são imobilizados entre a câmara e a membrana tubular. [21, 33]. Esta estratégia permite um contato direto com o fluxo sanguíneo, aumentando a oxigenação, nutrição e sensibilidade aos estímulos endócrinos. Contudo, têm utilização muito diminuída pois os riscos associados à formação de coágulos e necessidade de terapia anticoagulante ultrapassam os benefícios [3, 8].

As macrocápsulas extravasculares podem ter forma tubular ou plana. A forma cilíndrica aumenta a biocompatibilidade diminuindo a fibrose pericapsular, mas torna-as mais suscetíveis à ruptura. O dispositivo planar consiste em duas membranas ligadas por um suporte anelar; tem mais sucesso no fornecimento de oxigênio aos ilhéus, mas maiores níveis de fibrose pericapsular [8, 21].

As macrocápsulas são usadas isoladamente ou em pequenos grupos e têm uma área de superfície pequena, comparando com o volume global. Geralmente requerem laparotomia

para a sua implantação e são de fácil recuperação, o que as torna particularmente atrativas para estudos de biossegurança [3, 8].

A aplicação clínica de macrocápsulas tem sido prejudicada pela difusão insuficiente de oxigênio e nutrientes. A dificuldade de difusão nas macrocápsulas deve-se, em parte, à agregação dos ilhéus no espaço, facilitando a necrose celular. Trivedi *et al.*, em 2001, num estudo com macrocápsulas de alginato, demonstraram que a dinâmica da resposta da insulina estava comprometida, com ausência de resposta aguda [19, 34]. Assim, a maioria das estratégias de encapsulamento utiliza microcápsulas [30].

As microcápsulas são dispositivos esféricos, com dimensões na ordem das centenas de microns. Têm uma alta proporção área de superfície/volume o que favorece a difusão [6, 19]. As microcápsulas só contem um a dois ilhéus, necessitando do implante de mais elementos, por vezes na ordem das centenas, para atingirem a normoglicemia [3, 21].

Estudos mostram que a libertação de insulina de ilhéus microencapsulados tem um perfil similar aos ilhéus livres. Esta constatação aliada à sua construção simples, que permite alterar facilmente parâmetros como o tamanho dos poros, faz deste dispositivo o mais utilizado no desenho de pâncreas bioartificiais [2, 6]. O microencapsulamento possibilita o implante de material na cavidade peritoneal (CP) por laparoscopia [3, 17].

As propriedades mecânicas determinam a resistência da cápsula durante a sua produção e, posteriormente, *in vivo*. A espessura ideal ainda não foi calculada, sendo um possível fator limitante da sobrevivência celular [6].

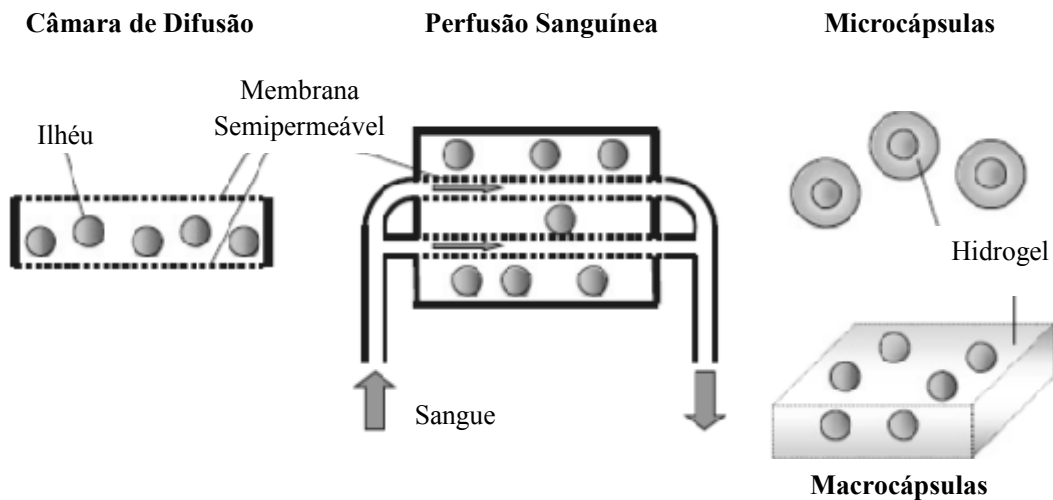


Figura 3 – Tipos de Encapsulamento. Adaptado de Sumi, 2011

Existem diversos métodos de produção de cápsulas. De modo simples, os ilhéus podem ser embebidos numa matriz que depois é revestida pela membrana imunoprotetora ou podem ser introduzidos numa membrana pré-fabricada que depois é selada [35].

O microencapsulamento com alginato foi reportado pela primeira vez em 1980 por Lim e Sum e tornou-se a abordagem mais popular. As micropartículas são produzidas, tradicionalmente, através do uso de um sistema de fluxo de ar coaxial. Outros métodos como o encapsulamento através de um sistema de pulso de alta tensão electrostática, surgiram mais recentemente [3, 19, 30].

As cápsulas de alginato previnem a interação das células T com os ilhéus mas não são adequadas para xenotransplantes, pois não tem restrição suficiente para os anticorpos do hospedeiro [29, 36].

Várias alternativas existem para otimizar o encapsulamento com alginato, nomeadamente as cápsulas APA, onde a gotícula de alginato é revestida por uma camada de PLL e novamente por outra camada de alginato. A permeabilidade da microcápsula é influenciada por vários fatores, incluindo o peso molecular e o tempo de exposição do

alginate à PLL. Contudo, este dispositivo vai-se degradando com o tempo. Para reduzir este problema, substituiu-se a PLL por Poli-L-Ornitina (PLO), que tem propriedades mais estáveis e maior seletividade no *molecular weight cut-off* [29]. Um estudo de Cui et al, em 2004, demonstrou que ilhéus microencapsulados revestidos por uma membrana ultrafina de alginate-PLO têm grande viabilidade *in vitro* [24].

Relativamente ao tamanho das microcápsulas, sendo que o diâmetro médio dos ilhéus é de 150µm, e o diâmetro final da capsulas é geralmente o triplo, isto torna as partículas grandes para implante em locais como o fígado [27].

Para reduzir as limitações do volume do transplante, têm sido feitos esforços no desenvolvimento do *conformal coating*, que se traduz por revestimentos de espessura mínima que se adaptam à superfície do ilhéu. O volume do transplante é definido somente pelo tamanho do ilhéu e pela espessura do revestimento, reduzindo o volume enquanto mantém uma barreira de polímeros para imunoproteção. A passagem da solução de um polímero líquido em torno dos ilhéus, seguida de precipitação interfacial é o método mais utilizado. Os ilhéus revestidos com esta técnica apresentam melhor função pois, não há atraso na secreção de insulina [27, 30].

O encapsulamento com múltiplas camadas de polímeros é vantajoso e não diminui a biocompatibilidade, pelo contrário [6]. Num modelo animal de grande porte, Wang *et al.*, em 2008, elaborou um dispositivo de encapsulamento com 5 componentes e 3 membranas. Os componentes utilizados foram alginate-Na, CaCl₂, polimetileno-co-guanidina, sulfato de celulose e PLL. Quando as cápsulas foram removidas do hospedeiro, constatou-se fibrose pericapsular mínima e cápsulas maioritariamente intactas [37]. Nesta linha de produção, o método LbL é uma técnica que permite revestir a superfície do ilhéu com várias membranas poliméricas, cada uma com diferentes propriedades; por exemplo a membrana mais externa

pode ter moléculas anti-inflamatórias ou pró-angiogénicas, enquanto a camada mais interna contém moléculas que aumentem a função insular. [27, 30]

Técnicas que aumentem a viabilidade e função dos ilhéus passam pelo co-encapsulamento com outras células ou proteínas [3, 6]. Opara *et al.*, em 2010, desenhou um modelo de pâncreas bioartificial com ilhéus co-encapsulados com proteínas angiogénicas numa membrana de alginato-PLO-alginato. A camada interna de alginato encapsulou os ilhéus e a camada externa foi usada para encapsular o *fibroblast growth factor-1* (FGF-1) que induziu neovascularização do enxerto [38]

O encapsulamento também pode ser realizado por nano-encapsulamento. Esta técnica limita a perda precoce do enxerto pela geração de uma membrana biocompatível isoladora diretamente na superfície do ilhéu, reduzindo as barreiras à difusão [39, 30].

À medida que o tamanho dos dispositivos diminui, o risco de haver material saliente aumenta, com associação à falência do transplante. [29]

5. Locais de Implantação dos Ilhéus Encapsulados

A seleção do local de implante dos ilhéus encapsulados deve considerar a biodisponibilidade, o suporte nutricional e a longevidade celular associada. Também a segurança e a possibilidade de retransplante são dois fatores a considerar [3, 6].

O fígado foi o primeiro local utilizado para o implante dos ilhéus micro-encapsulados. O interesse neste local deve-se ao fato de ser o maior ponto de ação da insulina e é o sítio associado a maiores taxas de sucesso após um ano de transplante. A técnica mais recente para o implante das cápsulas consiste na infusão por acesso percutâneo da veia porta sob controle ecográfico ou laparotomia cirúrgica com canulação da veia mesentérica [14]. Deste modo, os ilhéus alojam-se nos capilares portais distais, com posterior neovascularização. Este procedimento pode ter consequências adversas como hemorragia, trombose da veia porta, hipertensão portal, perfuração da via biliar e fístula arteriovenosa [3, 5]. É também de salientar que o fígado é um local de destoxificação logo a concentração de toxinas é mais elevada que na vasculatura sistêmica, e a maioria das microcápsulas não se adequa a este local devido ao grande diâmetro [16, 30].

A CP é igualmente um local de implante de microcápsulas e o único local com tamanho suficiente para alojar macrocápsulas. Todavia, é um local pouco vascularizado [6].

Também a gordura subcutânea é utilizada para o implante de macrocápsulas embora com elevado risco de *stress* mecânico [17].

Outros locais com potencial para implantação são as cápsulas do rim e do baço, os testículos, o cérebro, a medula óssea e o omento [11, 16].

6. Proteção Imune dos Ilhéus Encapsulados

Uma das intenções mais nobres do encapsulamento de ilhéus é poder prescindir de terapia imunossupressora. Para isso é necessário que as cápsulas tenham propriedades que permitam proteger os ilhéus do sistema imune do hospedeiro, através da permeabilidade da cápsula e biocompatibilidade dos materiais utilizados no encapsulamento [17]. A permeabilidade difusa a anticorpos, moléculas de elevado peso molecular, proteínas individuais do complemento e a atividade do complemento podem ser avaliadas em cultura pré-transplante [6].

A rejeição imediata do transplante é um mecanismo de rejeição hiperaguda, em que anticorpos do hospedeiro têm como alvo antígenos na superfície dos ilhéus encapsulados. Outro mecanismo de rejeição aguda é a reação inflamatória instantânea mediada pelo sangue (IBMIR), caracterizada pelo consumo de plaquetas, ativação do complemento e início da cascata de coagulação. Agentes quimiotáticos podem ativar os macrófagos, havendo a libertação de citocinas pró-inflamatórias, interleucina-1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ) e espécies reativas de oxigênio que, com tamanhos na ordem dos 2 a 30 kDa, podem passar os poros das cápsulas [2, 19]. Um método de prevenção deste mecanismo imune é revestir os ilhéus encapsulados com uroquinase, uma protease sérica que ativa o plasminogênio, e inicia uma cascata de proteólise que pode dissolver pequenos trombos [27].

Podem diferenciar-se duas situações principais, a resposta do hospedeiro aos alotransplantes e aos xenotransplantes (Fig. 4) [19].

Nos tecidos alogênicos, a rejeição direta predomina. Este mecanismo é desencadeado pelo reconhecimento de epítomos estranhos na superfície das células apresentadoras de antígenos pelas células CD8 do hospedeiro. Como este mecanismo requer contato físico entre

as células T e as células do dador, surge por falha mecânica de uma parte das cápsulas ou padrões de permeabilidade pouco restritos [3, 6, 29].

Nos tecidos xenogénicos a resposta imune é iniciada pelo reconhecimento de antigénios de superfície nos ilhéus encapsulados, de que resulta o recrutamento de células mononucleares por citocinas [3]. É essencial prevenir o fluxo de material xenoreativo para o exterior da célula pois a via do complemento pode ser ativada mesmo na ausência de imunoglobulinas [6]. Estudos com implantação de ilhéus xenogénicos em ratos diabéticos tipo 1 (NOD) demonstraram que a rejeição do enxerto necessita de células CD4, é facilitada por células B e não requer células CD8 [40].

Quanto à transplantação de ilhéus porcinos, há que ter em conta que o porco expressa Gal α 1-3Gal, um sacarídeo ausente nos humanos, pelo que anticorpos específicos despoletam uma resposta imune aguda. Para controlar esta resposta, vários grupos desenvolveram animais *knockout* para a α 1-3 galactosiltransferase, a enzima que catalisa a síntese de Gal α 1-3Gal. Contudo, não há ainda evidências concretas do sucesso do transplante de ilhéus destes animais [3, 17].

Em adição ao desenvolvimento de materiais mais biocompatíveis, existem também estratégias de imunomodulação, como o co-encapsulamento de ilhéus com agentes protetores, a remoção de antigénios de superfície, engenharia genética dos enxertos para segregarem substâncias protetoras e transferência génica para inibir a apoptose e aumentar a proteção anti-oxidante [19].

Vários estudos analisaram o bloqueio co-estimulatório com CTLA4-Ig, uma proteína antagonista do CD28, alterando a resposta das células T e a sua proliferação. As dificuldades residem nos níveis transitórios e baixos de CTLA4-Ig quando é administrada localmente, um efeito predominante na via direta e, falta de efeito nas células de memória. Os resultados benéficos de Safley *et al.*, em 2002, com esta técnica mostraram prolongamento da função do

transplante, a ausência de fibrose e de células aderentes às cápsulas, aquando da sua recuperação [30, 41, 42]. Também a co-encapsulamento com hemoglobina, dexametasona ou cetoprofeno protege os ilhéus. [2, 30].

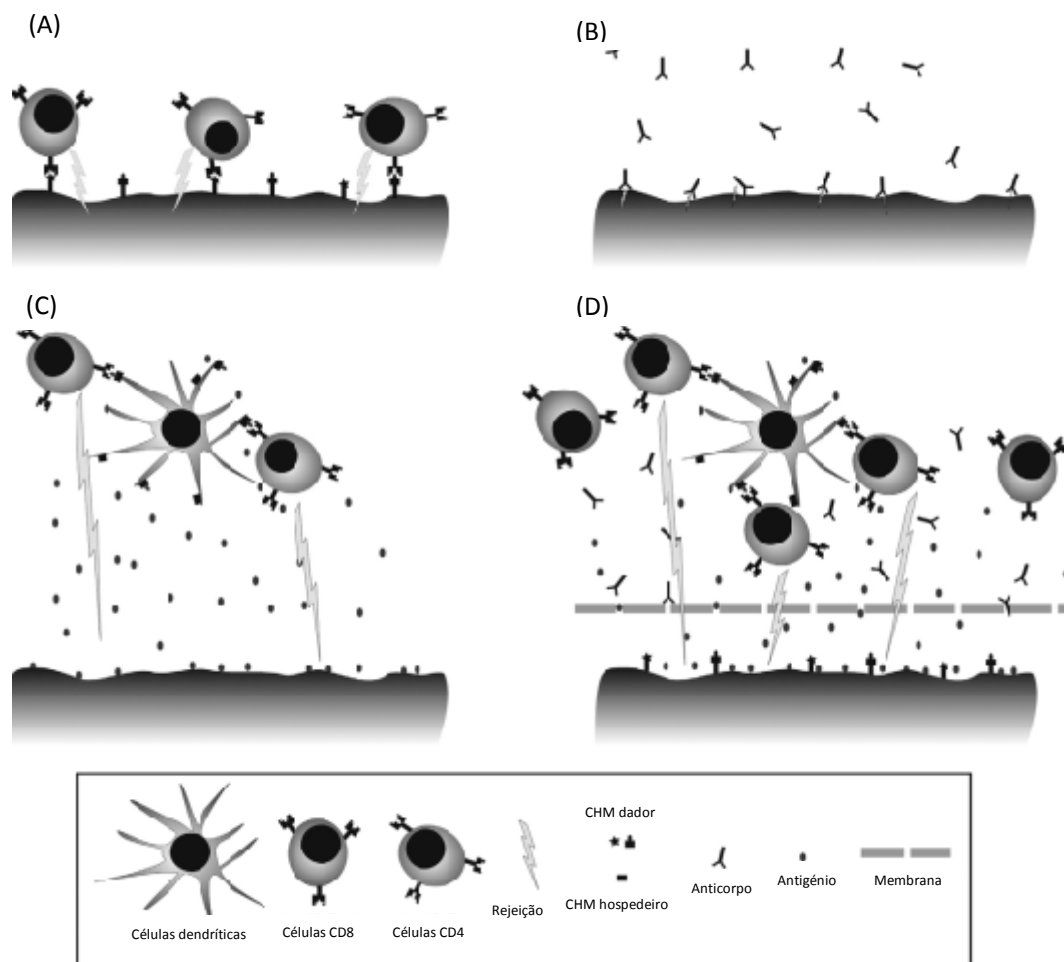


Figura 4 – Mecanismos de Rejeição do Transplante. (A) – Mediado Diretamente por Células T. (B) – Mediado por Anticorpos. (C) – Mediada Indiretamente por células. (D) – Membrana Semipermeável. Adaptado de Leung *et al.*, 2009

Outra estratégia é o co-encapsulamento com células de Sertoli que, modulam localmente a resposta imune através da secreção de fatores protetores como o *transforming growth factor beta* (TGF- β), ou com eritrócitos autólogos que providenciam proteção dos

macrófagos devido à capacidade de afastar o óxido nítrico (NO) ou convertê-lo em nitrato.
[30]

Também a administração de uma dose ou tratamento a curto prazo com drogas que inibam a ação das citocinas ou a função dos macrófagos, como a 15-deoxispergualina, melhoram a implantação do enxerto em modelos experimentais no pós-transplante imediato [30].

A modificação genética dos ilhéus, para segregarem moléculas anti-inflamatórias como TNFi (inibidor do TNF- α -) e IL-1RA (antagonista da IL-1), também diminui a resposta imune [2].

Por fim, há que ter em conta que os pacientes diabéticos têm alto risco de falência renal e conseqüente necessidade de transplante renal. O risco de sensibilização induzido pelas partículas encapsuladas e conseqüente produção de auto-anticorpos é bastante prejudicial. Sörenby *et al.* analisaram o risco de sensibilização por ilhéus alogénicos, através da contabilização do tempo de rejeição de um transplante cardíaco quatro semanas após o transplante das cápsulas com ilhéus. Concluiu-se que uma membrana bilaminar (TheraCyte®) pode prevenir a sensibilização e conseqüente rejeição aguda de um novo enxerto, dado a ausência de resposta imune e a presença de raros anticorpos-antidador [43].

7. Métodos para Avaliar a Função e Viabilidade do Transplante

Relativamente ao sucesso do transplante, há uma larga que vai do êxito completo à rejeição do enxerto. A maioria obtém sucesso parcial, e a funcionalidade é avaliada pelos níveis de peptídeo-C e necessidade de menores doses de insulina exógena [11, 16].

Em ordem a analisar os resultados do controlo metabólico em doentes transplantados, utiliza-se na maioria os valores de HbA1c, as glicémias em jejum e/ou pós-prandiais, assim como a prova de tolerância oral à glicose (PTGO), a MAGE, o HYPO score (baseado na frequência, severidade e grau de perceção de episódios de hipoglicémia) ou o Lability Index (calculado com base nas mudanças dos níveis de glicose ao longo do tempo) [3, 11].

Vantighen *et al.*, em 2009, investigou a função inicial do transplante utilizando o Score- β , um índice baseado na necessidade de tratamento com insulina e os valores sanguíneos peptídeo-C, glicose e HbA1c. Quanto melhor o resultado da função, maior a sobrevida [1].

Outros métodos consistem na avaliação da resposta secretora dos ilhéus à glicose ou à arginina [44, 45, 46].

Na avaliação da resposta inflamatória e da função dos ilhéus, pode-se estudar a atividade das citocinas, através de hibridização *in situ*, ensaio de reação da cadeia de polimerase transcriptase reversa e taxa de oxidação de glicose [6, 41].

Também a avaliação histológica das cápsulas recuperadas permite avaliar indiretamente a função, através da análise das camadas celulares pericapsulares. Embora estes métodos de avaliação providenciem informações acuradas, a maioria envolve a retirada da cápsula do hospedeiro, permitindo só uma avaliação por cada objeto de estudo [47].

Modificações nas técnicas de encapsulamento para poder avaliar a viabilidade e quantidade dos ilhéus por meios imagiológicos não invasivos, como a ressonância magnética

(RM), tomografia por emissão de positrões (PET) e tomografia computadorizada (TC), têm sido úteis para prever o resultado do transplante e medir a biocompatibilidade em tempo real e *in situ*. Estas técnicas permitem visualizar os ilhéus mas não permitem avaliar a função. Isto deve-se ao fato de, um estímulo ativar só uma parte das células- β , não sendo adequada a avaliação da massa funcional total por estes métodos [48].

Barnett *et al.*, em 2010, mostrou a possibilidade de visualizar os ilhéus imagiologicamente após a inclusão de PFC nas cápsulas. Este composto é detectado na RM e PET pelo uso de fluorina e na TC pela adição de um brometo ao PFC. A capacidade de rastrear as cápsulas com PFC dá informações valiosas sobre a distribuição/localização dos ilhéus no paciente e, permite acompanhar o implante dos dispositivos em tempo real. Contudo, esta técnica não fornece resultados sobre a viabilidade dos ilhéus pois detecta apenas as cápsulas [49, 50].

A engenharia genética pode ser útil através da indução da expressão de proteínas que possam ser rastreadas imagiologicamente. Um grupo utilizou um marcador nuclear, o NF- κ B, responsável pelo início da transcrição de muitas citocinas, moléculas de adesão e genes pró-inflamatórios. Quando o NF- κ B se liga a uma sequência promotora para iniciar transcrição, dá-se também a produção de luciferase que catalisa uma reação luminescente detectável por uma câmara sensível [47].

Estas modificações podem ser aplicadas em ilhéus encapsulados em materiais tão complexos como o alginato-PFC [51].

8. Causas de Falência do Transplante e Possíveis Soluções

As razões para a falha a longo prazo não são ainda totalmente entendidas. Muitos fatores podem influenciar a viabilidade e função dos ilhéus, sendo os mais relevantes a biocompatibilidade das partículas, a imunoproteção, o processo de isolamento e encapsulamento dos ilhéus [2]. Na maioria dos ensaios, ocorre diminuição progressiva da função dos ilhéus e fibrose pericapsular ao longo do tempo [17].

A análise genômica demonstrou que a origem dos ilhéus e os processos de isolamento destes induzem variabilidade na qualidade dos ilhéus contrariamente ao meio de cultura e ao processo de encapsulamento, que não afetam o genoma e a viabilidade celular [52].

Dimensão das cápsulas

O tamanho típico de 400 – 800 μ m das microcápsulas impõe limites que afetam a sobrevivência e função dos ilhéus. A concentração de oxigênio diminui radialmente e a hipóxia podem afetar as funções dependentes de ATP, como a secreção de insulina e induzir a expressão de mediadores inflamatórios [30].

O tamanho também restringe o local de transplante. Os protocolos atuais necessitam de 600.000 a 700.000 ilhéus, um volume correspondente a 10ml. Quando encapsulados, este volume sobe para 50ml, conseqüentemente, a maioria das cápsulas é implantada em locais que permitem tais volumes mas com reduzido suporte vascular, como a CP [30].

A diminuição do tamanho das partículas, embora uma opção óbvia, interfere com a difusão de nutrientes e insulina e, aumenta a probabilidade de encapsulamento incompleto dos ilhéus, com conseqüente resposta do hospedeiro, que pode levar a destruição de 40% do enxerto [30].

Materiais de encapsulamento

A resposta inflamatória aos biomateriais é descrita como um processo bioquímico dinâmico, iniciado pela adsorção não específica de proteínas à superfície do material, seguida de recrutamento de neutrófilos e macrófagos. A severidade da resposta é dependente do local de transplante e das propriedades do material, como a carga da superfície, porosidade, rugosidade e tamanho. Esta resposta generalizada tem sido observada numa variedade de dispositivos. Em relação ao alginato, a falência pode ser atribuída às impurezas presentes no mesmo, pois mesmo após purificação contém resíduos contaminantes. Uso de alginatos ultrapurificados de composição adequada melhorou a biocompatibilidade dos dispositivos baseados em alginato [30]. Também a peguilação tem sido usada para aumentar a biocompatibilidade das membranas [2].

Imunoproteção

A imunoproteção incompleta traduz-se na entrada de pequenas moléculas, como citocinas ou radicais livres, para o interior das cápsulas ou saída de detritos que ativem uma resposta imune indireta. O co-encapsulamento com eritrócitos autólogos ou células de Sertoli, como já referido, pode ser uma solução [17].

Outros peptídeos protetores que podem ser utilizados no co-encapsulamento são o fator de crescimento dos hepatócitos, o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina, o fator de crescimento dos nervos ou trombomodulina (TM) [30, 53].

Outra opção consiste na transferência para os ilhéus de genes protetores [17]. Também mudanças nos materiais de encapsulamento aumentam a imunoproteção. A utilização de PEG conjugado com fosfolípidos da membrana produz cápsulas na ordem dos micrómetros. A membrana ultrafina tem menos trombogenicidade, a estrutura rígida isola fisicamente do ataque de células T e atenua a IBMIR [54].

Vascularização

A falência do transplante a longo prazo está também relacionada com a dificuldade de vascularização direta dos dispositivos [6]. Durante o processo de isolamento, a rede vascular é destruída e os ilhéus sofrem hipóxia. Como, por exemplo, o fornecimento de oxigénio no peritoneu se faz por difusão passiva e o encapsulamento impede a revascularização, os ilhéus ficam sujeitas a hipóxia crónica, com perda de massa celular [2, 17]. Os ilhéus respondem a hipóxia aumentando a expressão de *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) que embora angiogénico é principalmente quimiotáxico, atraindo monócitos ao local [6].

A resistência à hipóxia pode ser obtida antes do transplante, por meios de pré-condicionamento isquémico ou choque térmico. A pré-cultura do enxerto e o tratamento do hospedeiro na primeira semana com exedina-4, um agonista do recetor do *glucagon-like Peptide-1* (GLP-1), com capacidade de inibir a apoptose, melhorou o desempenho dos enxertos [55]. Outras estratégias como a pré-vascularização, diminuem a hipóxia no pós-transplante imediato mas não a longo-prazo. Alguns ensaios mostram que a co-encapsulamento com o *vascular endothelial growth factor* (VEGF) resulta numa maior libertação de insulina em ambiente com reduzido oxigénio.

Também a citoproteção através de fármacos ou técnicas de bioengenharia aumenta a função e a viabilidade celulares. Estratégias para proteger os ilhéus do *stress* resultante de hipóxia incluem, entre outros, a indução da expressão da superóxido dismutase ou da glutathione peroxidase, de forma a minimizar os efeitos dos radicais livres e do NO [2].

Outra solução em estudo é o uso ilhéus isolados de tilápia, que estão adaptados a meios hipóxicos [17].

Uma outra consequência da reduzida vascularização são os depósitos amilóide, um achado frequente nos ilhéus humanos transplantados. Pensa-se que a baixa densidade vascular

das partículas facilite a deposição do polipeptídeo amilóide dos ilhéus. Fibrilhas tóxicas do peptídeo podem incorporar-se na membrana e alterar a permeabilidade da mesma [56].

Fibrose pericapsular

A bio-incompatibilidade das partículas leva a fibrose pericapsular, sendo perdidas cerca de 40% das cápsulas por este mecanismo [17]. São necessárias modificações da superfície das microcápsulas para prevenir a fibrose. Eventualmente, os ilhéus encapsulados podem precisar do auxílio de fármacos anti-fibróticos para prolongar a sua funcionalidade in vivo [2, 7].

9. Ensaios Clínicos em Humanos

A investigação do encapsulamento de ilhéus pancreáticos está a ganhar cada vez mais consideração pois, assegura, entre outros, um meio seguro e reprodutível de introduzir ilhéus xenogénicos nos doentes diabéticos [21]. Apesar de resultados promissores, os ilhéus encapsulados ainda não têm fator de impacto na prática clínica [2]. A aplicação clínica dos dispositivos de encapsulamento tem sido travada pela fragilidade mecânica, a inviabilidade a longo prazo e a necessidade de um procedimento cirúrgico mais eficaz [6].

Valdés-González *et al.* em 2005 utilizou ilhéus porcinos neonatais encapsulados, implantados subcutaneamente em 12 doentes diabéticos, em combinação com células de Sertoli, mantendo-se insulino-independentes por uma média de 6,7 anos. Nestes doentes, 2 meses antes do transplante de ilhéus foram implantadas partículas de teflon revestidas de malha de aço com o intuito de estimular a vascularização [3].

Em 2006, Calafiore *et al.* transplantou ilhéus alogénicos encapsulados em 10 diabéticos. Os ilhéus foram encapsulados em partículas de alginato de sódio revestidas com PLO e alginato, sendo que foram injetadas na CP dos doentes entre 400.000 a 600.000 ilhéus encapsulados. Nenhum dos pacientes ficou insulino-independente mas 2 deles tiveram necessidades reduzidas de insulina e peptídeo-C detetável, até aos 12 meses pós-transplante [19, 21].

Um dos poucos estudos com dispositivos intravasculares, realizado por Prochorov *et al.* em 2008, recorreu ao transplante de ilhéus xenogénicos de coelho micro-encapsulados. Dezanove doentes diabéticos receberam cápsulas de *nylon* com uma média de 6.000IE/kg, que foram enxertadas na artéria femoral profunda ou na fúrcula da veia cubital após anastomose arteriovenosa. Ao fim de dois anos, em 73,7% dos doentes as necessidades de insulina diminuíram 65% e desapareceram os episódios de hipo e hiperglicémia [57].

Um estudo conduzido por Tuch *et al.* em 2009 injetou 178.000IE/Kg em microesferas de alginato-BaCl₂ com ilhéus humanos, na CP de 4 diabéticos. O peptídeo-C foi detectável passado um dia, mas na quarta semana os seus níveis eram indetectáveis. Semelhantemente as necessidades de insulina diminuíram após o primeiro dia, mas foram voltando gradualmente aos valores pré-transplante. Foi realizada laparoscopia após 16 meses, que mostrou dispersão das cápsulas no peritoneu parietal, omento, baço e rim; a biópsia mostrou cápsulas intactas mas rodeadas de tecido fibroso, com capilares finos e alguns histiócitos. Este estudo mostrou segurança do transplante de ilhéus alogénicos mas com eficácia reduzida [58].

No estudo de Elliot *et al.*, em 2007 encapsulou ilhéus porcinos neonatais em alginato-PLL, tendo sido injetados 10.000IE/kg na CP de um diabético de 38 anos, com DM T1 há 30 anos. A necessidade de insulina diminuiu 30% durante 14 meses, retomando depois valores pré-transplante. Os ilhéus recuperados 9,5 anos depois mostraram viabilidade mas reduzida secreção de insulina. Os ilhéus foram examinados por microscopia fluoroscópica que revelou escassez de células- β e abundantes células- α . As células mostravam-se glicoresponsivas com estimulação *in vitro*, segregando insulina até 0.3 μ U/ilhéu/h [59].

A mesma equipa em 2010 implantou em sete diabéticos microcápsulas de alginato-PLO contendo ilhéus porcinos, numa proporção de 5.000 a 10.000 IE/kg. A avaliação após 6 meses mostrou normoglicémia em dois pacientes e nos restantes diminuição da necessidade de insulina exógena em 34%. Nas duas fases do estudo não foram reportadas quaisquer reações adversas [59].

Recentemente um grupo italiano preparou protocolos sobre o encapsulamento insular, desde os passos iniciais, até ao método de implantação. Preconizaram o fabrico de microcápsulas de alginato-Na purificadas, seleccionaram preparações de ilhéus humanos com 80% de viabilidade e desenvolveram um método de injeção intra-peritoneal simples sob

controle ecográfico com anestesia local. Estes protocolos foram aprovados pelo Ministério Italiano que deu permissão a um ensaio de fase 1 com ilhéus humanos encapsulados [60].

Encontram-se ativos neste momento cinco estudos de fase 1 e 2 em humanos. Todos visam avaliar a segurança e eficácia do transplante de ilhéus encapsulados em humanos. Três dos estudos estão a testar o dispositivo DIABECCELL®, um dispositivo de encapsulamento de alginato com ilhéus porcinos. Outro estudo está a testar alo-enxertos de ilhéus encapsulados em PEG. Finalmente, o último ensaio testa a segurança e eficácia de ilhéus humanos encapsulados num dispositivo celular com monocamada, implantado no tecido subcutâneo de 15 diabéticos [61].

CONCLUSÃO

Embora os resultados clínicos tenham sido escassos durante 30 anos, o transplante de ilhéus tem sido aplicado clinicamente como uma opção terapêutica fiável, desde o desenvolvimento do Protocolo de Edmonton.

Qualquer nova terapia para o tratamento da diabetes, nomeadamente o transplante de ilhéus encapsulados, deve providenciar uma regulação fisiológica da glicémia, de modo a melhorar os perfis analíticos e a qualidade de vida dos pacientes, mantendo viável a massa e a função dos ilhéus implantados.

A imunossupressão sistémica pode ser eliminada se os ilhéus estiverem fisicamente isolados do sistema imune. O encapsulamento de ilhéus em membranas especializadas é uma técnica com potencial de cura da Diabetes Mellitus Tipo 1 que permite recorrer ao transplante xenogénico, ultrapassando a necessidade de ilhéus humanos. O transplante bem-sucedido deve restaurar a secreção de insulina induzida pela glicose e levar à reposição dos valores normais da glicémia em jejum e da HbA1C, eliminando a necessidade de insulina exógena.

Nos últimos anos, a tecnologia refinou os processos de microencapsulamento com diferentes materiais, embora, as microcápsulas baseadas em alginato sejam as mais estudadas. Existe também a capacidade de seleccionar ilhéus de dadores animais, com baixa imunogenicidade e sem transmissão de vírus.

Os dispositivos utilizados são modelos biocompatíveis que reduzem a resposta imune do hospedeiro; contudo têm limitações funcionais a longo prazo. Limitações inerentes à difusão devem ser minimizadas para assegurar o fluxo adequado de insulina, nutrientes e metabolitos. Dos fatores de falência dos dispositivos ressalta a resposta imune aos biomateriais mas também a inflamação decorrente da cirurgia de implantação das partículas.

Apesar de estudos promissores em modelos animais, o sucesso clínico é limitado. Para a aplicação clínica em maior escala, várias barreiras devem ser ultrapassadas, nomeadamente as inerentes às técnicas de isolamento e de encapsulamento de ilhéus, bem como o local e o método de implante.

Os polímeros usados no encapsulamento devem ser estandardizados para reduzir a variabilidade interlaboratórios e produzir resultados comparáveis. Este rigor deve também ser aplicado às técnicas de isolamento e encapsulamento.

É também necessário formular um *score* que permita decidir quais os indivíduos mais adequados para este tipo de terapêutica, tal como existe para outros tipos de transplante.

O caminho para o sucesso far-se-á com colaboração multidisciplinar, impulsionando esta terapêutica em todas as suas vertentes.

BIBLIOGRAFIA

1. Soggia A, Hoarau E, Bechetoille C, Simon MT, Heinis M, Duvillié B. Cell-based therapy of diabetes: what are the new sources of beta cells? *Diabetes Metab.* 2011 Nov;37[5]:371-5.
2. Vaithilingam V, Tuch BE. Islet transplantation and encapsulation: an update on recent developments. *Rev Diabet Stud.* 2011 Spring;8[1]:51-67.
3. Thanos CG, Elliott RB. Encapsulated porcine islet transplantation: an evolving therapy for the treatment of type I diabetes. *Expert Opin Biol Ther.* 2009 Jan;9[1]:29-44.
4. Gonez LJ, Knight KR. Cell therapy for diabetes: stem cells, progenitors or beta-cell replication? *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Jul 8;323[1]:55-61.
5. Souto S, Braga DC, Medina JL. Transplante de células dos ilhéus pancreáticos - estado da arte, *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, 2007;2: 57-69
6. Fernandes J, Ferreira D, Sarmiento B. Microencapsulação de Células β , Uma Abordagem Terapêutica em Progresso, 2007, *Revista Portuguesa de Diabetes*. 2007; 3: 5-14
7. Sambanis A. Encapsulated islets in diabetes treatment. *Diabetes Technol Ther.* 2003;5[4]:665-8.
8. Sumi S. Regenerative medicine for insulin deficiency: creation of pancreatic islets and bioartificial pancreas. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2011 Jan;18[1]:6-12.
9. Butler PC, Meier JJ, Butler AE, Bhushan A. The replication of beta cells in normal physiology, in disease and for therapy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007 Nov;3[11]:758-68.
10. Ren J, Jin P, Wang E, Liu E, Harlan DM, Li X, Stronck DF. Pancreatic islet cell therapy for type I diabetes: understanding the effects of glucose stimulation on islets in order to produce better islets for transplantation. *J Transl Med.* 2007 Jan 3;5:1.

11. Jamiolkowski R, Guo L, Li YR, Shaffer S, Najj A. Islet Transplantation in Type I Diabetes Mellitus, 2012, *Yale Journal of Biology and Medicine* 85 [2012], pp.37-43
12. Claiborn KC, Stoffers DA. Toward a cell-based cure for diabetes: advances in production and transplant of beta cells. *Mt Sinai J Med.* 2008 Aug;75[4]:362-71.
13. Casu A, Trucco M, Pietropaolo M. A look to the future: prediction, prevention, and cure including islet transplantation and stem cell therapy. *Pediatr Clin North Am.* 2005 Dec;52[6]:1779-804.
14. Vantyghem MC, Balavoine AS, Kerr-Conte J, Pattou F, Noel C. Who should benefit from diabetes cell therapy? *Ann Endocrinol [Paris].* 2009 Dec;70[6]:443-8.
15. Shapiro AM, Lakey J, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL et al. Islet Transplantation in Seven Patients with Type 1 Diabetes Mellitus Using a Glucocorticoid-Free Immunosuppressive Regimen. *N Engl J Med* 2000; 343:230-238
16. Robertson RP. Update on transplanting beta cells for reversing type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010 Sep;39[3]:655-67.
17. de Groot M, Schuurs TA, van Schilfgaarde R. Causes of limited survival of microencapsulated pancreatic islet grafts. *J Surg Res.* 2004 Sep;121[1]:141-50.
18. Srinivasan P, Huang G C, Amiel S A, Heaton N D. Islet cell transplantation, 2007, Review, *Postgrad Med J,* 2007;83:224–229
19. Krishnamurthy NV, Gimi B. Encapsulated cell grafts to treat cellular deficiencies and dysfunction. *Crit Rev Biomed Eng.* 2011;39[6]:473-91.
20. Sahu S, Tosh D, Hardikar AA. New sources of beta-cells for treating diabetes. *J Endocrinol.* 2009 Jul;202[1]:13-6.
21. Sakata N, Sumi S, Yoshimatsu G, Goto M, Egawa S, Unno M. Encapsulated islets transplantation: Past, present and future. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2012 Feb 15;3[1]:19-26.

- 22.** Cozzi E, Bosio E. Islet xenotransplantation: current status of preclinical studies in the pig-to-nonhuman primate model. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008 Apr;13[2]:155-8.
- 23.** Figliuzzi M, Zappella S, Morigi M, Rossi P, Marchetti P, Remuzzi A. Influence of donor age on bovine pancreatic islet isolation. *Transplantation*. 2000 Oct 15;70[7]:1032-7.
- 24.** Cui W, Barr G, Faucher KM, Sun XL, Safley SA, Weber CJ, Chaikof EL. A membrane-mimetic barrier for islet encapsulation. *Transplant Proc*. 2004 May;36[4]:1206-8.
- 25.** Stiegler PB, Stadlbauer V, Schaffellner S, Halwachs G, Lackner C, Hauser O et al. Cryopreservation of insulin-producing cells microencapsulated in sodium cellulose sulfate. *Transplant Proc*. 2006 Nov;38[9]:3026-30.
- 26.** Murakami M, Satou H, Kimura T, Kobayashi T, Yamaguchi A, Nakagawara G, Iwata H. Effects of micro-encapsulation on morphology and endocrine function of cryopreserved neonatal porcine islet-like cell clusters. *Transplantation*. 2000 Oct 27;70[8]:1143-8.
- 27.** Teramura Y, Iwata H. Bioartificial pancreas - Microencapsulation and conformal coating of islet of Langerhans, *Adv Drug Deliv Rev*. 2010 Jun 15;62(7-8):827-40.
- 28.** Omer A, Duvivier-Kali V, Fernandes J, Tchipashvili V, Colton CK, Weir GC. Long-term normoglycemia in rats receiving transplants with encapsulated islets. *Transplantation*. 2005 Jan 15;79[1]:52-8.
- 29.** Leung A, Nielsen LK, Trau M, Timmins NE. Tissue transplantation by stealth—Coherent alginate microcapsules for Immunoisolation. *Biochemical Engineering Journal* 48 (2010) 337–347
- 30.** Wilson JT, Chaikof EL. Challenges and emerging technologies in the immunoisolation of cells and tissues. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Jan 14;60(2):124-45.
- 31.** Qi Z, Yamamoto C, Imori N, Kinukawa A, Yang KC, Yanai G et al. Immunoisolation effect of polyvinyl alcohol [PVA] macroencapsulated islets in type 1 diabetes therapy. *Cell Transplant*. 2012;21[2-3]:525-34

- 32.** Yang KC, Wu CC, Lin FH, Qi Z, Kuo TF, Cheng YH et al. Chitosan/gelatin hydrogel as immunoisolative matrix for injectable bioartificial pancreas. *Xenotransplantation*. 2008 Nov-Dec;15[6]:407-16.
- 33.** de Vos P, Hamel AF, Tatarkiewicz K. Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetologia*. 2002 Feb;45[2]:159-73.
- 34.** Trivedi N, Keegan M, Steil GM, Hollister-Lock J, Hasenkamp WM, Colton CK et al. Islets in alginate macrobeads reverse diabetes despite minimal acute insulin secretory responses. *Transplantation*. 2001 Jan 27;71(2):203-11.
- 35.** Sambanis A. Engineering challenges in the development of an encapsulated cell system for treatment of type 1 diabetes. *Diabetes Technol Ther*. 2000 Spring;2[1]:81-9.
- 36.** Jones KS, Sefton MV, Gorczynski RM. In vivo recognition by the host adaptive immune system of microencapsulated xenogeneic cells. *Transplantation*. 2004 Nov 27;78[10]:1454-62.
- 37.** Wang T, Adcock J, Kührtreiber W, Qiang D, Salleng KJ, Trenary I, Williams P. Successful allotransplantation of encapsulated islets in pancreatectomized canines for diabetic management without the use of immunosuppression. *Transplantation*. 2008 Feb 15;85[3]:331-7.
- 38.** Opara E, Mirmalek-Sani SH, Khanna O, Moya M, Brey E. Design a bioartificial pancreas, 2010, *Investig Med*. 2010 October ; 58[7]: 831–837.
- 39.** Zhi ZL, Kerby A, King AJ, Jones PM, Pickup JC. Nano-scale encapsulation enhances allograft survival and function of islets transplanted in a mouse model of diabetes. *Diabetologia*. 2012 Apr;55[4]:1081-90.
- 40.** Xu BY, Yang H, Serreze DV, MacIntosh R, Yu W, Wright JR Rapid destruction of encapsulated islet xenografts by NOD mice is CD4-dependent and facilitated by B-cells:

innate immunity and autoimmunity do not play significant roles. *Jr. Transplantation*. 2005 Aug 15;80[3]:402-9.

41. Safley SA, Kapp LM, Tucker-Burden C, Hering B, Kapp JA, Weber CJ. Inhibition of cellular immune responses to encapsulated porcine islet xenografts by simultaneous blockade of two different costimulatory pathways. *Transplantation*. 2005 Feb 27;79[4]:409-18.

42. Benhamou PY. Immunomodulation with CTLA4-Ig in islet transplantation. *Transplantation*. 2002 Jan 15;73[1 Suppl]:S40-2.

43. Sörenby AK, Wu GS, Zhu S, Wernerson AM, Sumitran-Holgersson S, Tibell AB. Macroencapsulation protects against sensitization after allogeneic islet transplantation in rats. *Transplantation*. 2006 Aug 15;82[3]:393-7.

44. Tashiro H, Iwata H, Warnock GL, Tanigawa M, Ototani Y, Tsuji T. Functional assessment of microencapsulated porcine islets with agarose polystyrene sulfonic acid in vitro and in xenotransplantation. *Transplant Proc*. 2005 Oct;37[8]:3512-3.

45. Bohman S, Andersson A, King A. No differences in efficacy between noncultured and cultured islets in reducing hyperglycemia in a nonvascularized islet graft model. *Diabetes Technol Ther*. 2006 Oct;8[5]:536-45.

46. Dufrane D, Goebbels RM, Gianello P. Alginate macroencapsulation of pig islets allows correction of streptozotocin-induced diabetes in primates up to 6 months without immunosuppression. *Transplantation*. 2010 Nov 27;90[10]:1054-62.

47. Roth DJ, Jansen ED, Powers AC, Wang TG. A novel method of monitoring response to islet transplantation: bioluminescent imaging of an NF-kB transgenic mouse model. *Transplantation*. 2006 Apr 27;81[8]:1185-90

48. Gillard P, Mathieu C. Immune and cell therapy in type 1 diabetes: too little too late? *Expert Opin Biol Ther*. 2011 May;11[5]:609-21.

- 49.** Barnett BP, Ruiz-Cabello J, Hota P, Liddell R, Walczak P, Howland V, et al. Fluorocapsules for improved function, immunoprotection, and visualization of cellular therapeutics with MR, US, and CT imaging. *Radiology*. 2011 Jan;258[1]:182-91.
- 50.** Cormode DP, Mulder WJ, Fayad ZA. Science to practice: versatile method to track transplanted encapsulated islet cells with multiple imaging modalities. *Radiology*. 2011 Jan;258[1]:1-2
- 51.** Johnson A, O'Sullivan E, D'Aoust L, Omer A, Bonner-Weir S, Fisher R et al. Quantitative Assessment of Islets of Langerhans Encapsulated in Alginate, 2011, *Tissue Engineering: Part C Volume 17, Number 4, 2011*
- 52.** Vaithilingam V, Quayum N, Joglekar MV, Jensen J, Hardikar AA, Oberholzer J et al. Effect of alginate encapsulation on the cellular transcriptome of human islets. *Biomaterials*. 2011 Nov;32[33]:8416-25.
- 53.** Jourdan G, Dusseault J, Benhamou PY, Rosenberg L, Hallé JP. Co-encapsulation of bioengineered IGF-II-producing cells and pancreatic islets: effect on beta-cell survival. *Gene Ther*. 2011 Jun;18[6]:539-45.
- 54.** Teramura Y, Oommen OP, Olerud J, Hilborn J, Nilsson B. Microencapsulation of cells, including islets, within stable ultra-thin membranes of maleimide-conjugated PEG-lipid with multifunctional crosslinkers. *Biomaterials*. 2013 Jan 21
- 55.** Jia X, Sharma A, Kumagai-Braesch M, Wernerson AM, Sörenby AK, Yamamoto S et al. Exendin-4 increases the expression of hypoxia-inducible factor-1 α in rat islets and preserves the endocrine cell volume of both free and macroencapsulated islet grafts. *Cell Transplant*. 2012;21[6]:1269-83.
- 56.** Bohman S, Westermark GT. Extensive amyloid formation in transplanted microencapsulated mouse and human islets. *Amyloid*. 2012 Jun;19[2]:87-93.

57. Prochorov AV, Tretjak SI, Goranov VA, Glinnik AA, Goltsev MV. Treatment of insulin dependent diabetes mellitus with intravascular transplantation of pancreatic islet cells without immunosuppressive therapy. *Adv Med Sci.* 2008;53[2]:240-4.

58. Tuch BE, Keogh GW, Williams LJ, Wu W, Foster JL, Vaithilingam V, Philips R. Safety and viability of microencapsulated human islets transplanted into diabetic humans. *Diabetes Care.* 2009 Oct;32[10]:1887-9.

59. Elliott RB, Escobar L, Tan PL, Muzina M, Zwain S, Buchanan C. Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 2007; 14:157–61

60. Calafiore R, Basta G, Luca G, Lemmi A, Racanicchi L, Mancuso F et al. Standard technical procedures for microencapsulation of human islets for graft into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes mellitus. *Transplant Proc.* 2006 May;38[4]:1156-7

61. Clinicaltrials.gov, A service of the U.S. National Institutes of Health. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=encapsulated+islets&Search=Search>