

Joana Crisóstomo da Silva

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS BIO-ARTIFICIAIS DE LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE INSULINA PARA O TRATAMENTO DA DIABETES

Tese de Doutoramento do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Ciências Biomédicas,
orientada pela Professora Doutora Raquel Seiça e pelo Professor Doutor Jorge Coelho e apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Março 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS BIO-ARTIFICIAIS DE LIBERTAÇÃO
CONTROLADA DE INSULINA PARA O TRATAMENTO DA DIABETES**

DEVELOPMENT OF BIOARTIFICIAL SYSTEMS OF INSULIN CONTROLLED
RELEASE FOR DIABETES TREATMENT

Tese de Doutoramento do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde,
ramo de Ciências Biomédicas, orientada pela Professora Doutora Raquel Seiça
e pelo Professor Doutor Jorge Coelho e apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de Coimbra.

Joana Crisóstomo da Silva

2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Trabalho financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através do Projecto Estratégico (PEst-C/SAU/UI3282/2011-2013; UID/NEU/04539/2013) e Bolsa Individual de Doutoramento (SFRH/BD/72964/2010); Programa de Estímulo à Investigação (RMFS03) promovido pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e verbas anuais para projectos de investigação de alunos de doutoramento da mesma instituição.



“Não sou nada. Nunca serei nada. Não posso querer ser nada.

À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.”

Fernando Pessoa

À minha mãe, pelo apoio incondicional.

Ao João, por tudo!

AGRADECIMENTOS

Quero deixar uma palavra de agradecimento a todos os professores, colegas e funcionários com quem me cruzei ao longo destes anos, não só no IBILI - Faculdade de Medicina, mas também nas outras instituições por onde passei. A ajuda e solidariedade de todos foi fundamental, não só na troca de experiências e conhecimento no quotidiano laboratorial, mas também em todos os momentos de companheirismo e amizade partilhados.

À Professora Doutora Raquel Seiça, minha orientadora, que me abriu as portas do Laboratório de Fisiologia e me conquistou com a sua simpatia e entusiasmo quando eu era ainda estudante de Biologia. Agradeço-lhe, ainda, ter-me permitido, no meu doutoramento, enveredar por esta aventura de começar um trabalho completamente novo e desafiante, que permitiu trazer novos conhecimentos para o laboratório. Foi um caminho muito duro, mas muito enriquecedor. Obrigada pela sua amizade e disponibilidade!

Ao Laboratório de Fisiologia, a todos os que lá trabalham e que me ajudaram ao longo destes anos. Um agradecimento especial à Daniela Silva e à Ana Pereira pelo apoio no laboratório, amizade e companheirismo.

Ainda na Faculdade de Medicina, um agradecimento ao Laboratório de Oncobiologia e Hematologia, à sua directora Professora Doutora Ana Bela Sarmiento e a todas as colegas que lá trabalham, pelos ensinamentos e partilha de tarefas. À Ana Pires e Cristina Gonçalves, o meu agradecimento pela ajuda nos PCRs.

Ao Professor Doutor Jorge Coelho, meu co-orientador, que me recebeu no DEQ e partilhou comigo o seu conhecimento, permitindo-me abrir os horizontes para novas áreas do conhecimento. Obrigada pela simpatia de todos os que me receberam no DEQ, especialmente ao “pessoal do B37”, pelos ensinamentos e companheirismo. O meu agradecimento ao Professor Doutor Arménio Serra pela sua orientação na bancada e ao Francisco Catalão pela sua colaboração neste trabalho.

Ao Professor Doutor Pedro Granja, pela sua simpatia e disponibilidade em me receber no INEB, permitindo-me trabalhar com uma equipa multidisciplinar que muito me ensinou. Esta colaboração foi, sem dúvida, determinante para levar o meu projecto a bom porto. À Professora Doutora Cristina Barrias, por me ter acolhido no seu grupo. Obrigada pela sua disponibilidade, orientação e simpatia, sem a sua ajuda não teria sido possível. Ao Professor Doutor Bruno Sarmiento, pela simpatia e por me ter permitido colaborar com o seu grupo. A todos os “INEBianos” pelo acolhimento, companheirismo e boa disposição. Um agradecimento especial à Sílvia Bidarra, Francisca Araújo e Daniela Barros, pelo

apoio no laboratório e amizade. Um agradecimento à Susana Guerreiro por me ter proporcionado este contacto com o INEB.

À Professora Doutora Catarina de Oliveira, Presidente da Comissão Científica do meu Programa de Doutoramento e minha tutora, pela sua disponibilidade e incentivo ao longo destes anos.

Ao Professor Doutor Ramon Gomis e ao Hugo Figueiredo, do *Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer* de Barcelona, pela amável cedência da linha de células beta.

Ao Senhor Vítor e à D. Ilda, do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, pela ajuda com as bioquímicas do sangue e histologia.

À Professora Doutora Paula Gomes e Professor Doutor Nuno Vale, do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pela síntese dos péptidos.

Por fim, um agradecimento muito especial a todos aqueles que são o meu verdadeiro suporte! Aos meus pais, por me terem permitido chegar onde cheguei e me fazerem sentir que estão sempre comigo, aconteça o que acontecer.

Ao João que, com toda a ternura e compreensão, partilhou comigo esta luta no dia-a-dia, sem ti não seria possível!

À minha família, que me ajudou a crescer, acompanhando-me desde sempre.

A todos os meus amigos que têm um lugar especial no meu coração, longe ou perto, foi muito importante sentir o vosso apoio.

Neste percurso sinuoso, foi junto de vós que consegui a coragem, a persistência e a resiliência, foram a minha fonte de inspiração. Uma vez mais, o meu obrigada!

Índice

Abreviaturas	xvii
Resumo.....	xxi
Abstract.....	xxiii
CAPÍTULO 1 - Introdução geral	1
1. Diabetes.....	3
1.1 Classificação.....	3
1.2 Epidemiologia	3
1.3 Tratamentos.....	5
1.3.1 Transplantação de tecido produtor de insulina	5
2. Pâncreas bio-artificial	6
2.1 Tecnologia no desenvolvimento do pâncreas bio-artificial.....	8
2.1.1 Tipos de pâncreas bio-artificial	8
2.1.2 Locais de implante	9
2.1.3 Materiais usados	10
3. Hidrogéis de alginato.....	12
3.1 Tecnologias para produção dos hidrogéis de alginato	14
4. Limitações e obstáculos da aplicação do pâncreas bio-artificial	16
4.1 Resposta imunitária	16
4.1.1 Cirurgia.....	16
4.1.2 Deficiente biocompatibilidade e instabilidade dos materiais.....	16
4.1.3 Células encapsuladas	18
4.2 Imunoprotecção limitada.....	19
4.3 Hipóxia.....	19
5. Em busca de soluções	20
5.1 Melhoria da estabilidade dos hidrogéis	20
5.2 Diminuição do tamanho dos dispositivos	21
5.3 Funcionalização com bio-substâncias.....	22
5.4 Vascularização	23
5.5. Novas fontes celulares.....	24

6. Ensaio clínico	25
7. Referências bibliográficas	27
CAPÍTULO 2 - Motivações, objectivos e organização da tese	35
1. Motivações e objectivos do trabalho.....	37
2. Organização da tese	39
CAPÍTULO 3 - Estratégias para melhorar a viabilidade e função das células beta encapsuladas: ensaios <i>in vitro</i> em modelos 3D de hidrogéis de alginato.....	41
Secção 1 - Encapsulamento de células beta INS-1E em hidrogéis de alginato funcionalizado com o péptido RGD	43
1. Introdução.....	45
2. Material e métodos.....	48
2.1 Síntese e caracterização do alginato-RGD	48
2.2 Cultura celular	49
2.3 Hidrogéis de alginato com células INS-1E	49
2.3.1 Encapsulamento	49
2.3.2 Tamanho e morfologia das microsferas	50
2.3.3 Actividade metabólica	50
2.3.4 Viabilidade celular	50
2.3.5 Proliferação celular	51
2.3.6 Secreção de insulina	52
2.3.7 Imunomarcção da fibronectina	52
2.3.8 Análise de expressão génica	53
2.4 Análise estatística.....	54
3. Resultados.....	55
3.1 Efeito da densidade celular no comportamento das células INS-1E encapsuladas	55
3.2 Efeito da presença de RGD na actividade metabólica, proliferação e viabilidade das células INS-1E encapsuladas.....	57
3.3 Efeito da presença de RGD na secreção de insulina e expressão génica das células INS-1E encapsuladas.....	61
3.4 Efeito da presença de RGD na produção e interacção de componentes da matriz extracelular com as células INS-1E encapsuladas	63

4. Discussão.....	65
5. Referências bibliográficas	71

Secção 2 - Co-encapsulamento de células beta INS-1E e nanopartículas contendo GLP-1 em hidrogéis de alginato

1. Introdução	77
2. Materiais e métodos	80
2.1 Preparação das nanopartículas de PLGA contendo GLP-1	80
2.2 Caracterização das nanopartículas	81
2.2.1 Dynamic light scattering	81
2.2.2 Microscopia electrónica de transmissão	81
2.2.3 Eficiência de encapsulamento do GLP-1	81
2.2.4 Perfil de libertação do GLP-1 <i>in vitro</i>	82
2.3 Cultura celular.....	82
2.4 Citotoxicidade das nanopartículas	82
2.5 Co-encapsulamento das células INS-1E com as nanopartículas em hidrogéis de alginato.....	83
2.5.1 Actividade metabólica.....	83
2.5.2 Secreção de insulina	84
2.6 Análise estatística.....	84
3. Resultados	84
3.1 Caracterização das nanopartículas.....	84
3.2 Citotoxicidade das nanopartículas	86
3.3 Efeito do co-encapsulamento das nanopartículas contendo GLP-1 na actividade metabólica e secreção de insulina das células INS-1E	87
4. Discussão.....	89
5. Referências bibliográficas	93

CAPÍTULO 4 - Efeito do implante de células beta INS-1E, encapsuladas em alginato funcionalizado com o péptido RGD, num modelo de diabetes tipo 2.....

1. Introdução	97
2. Materiais e métodos	98
2.1 Modelos animais.....	98
2.2 Cultura celular.....	99

2.3 Encapsulamento das células INS-1E em hidrogéis de alginato-RGD	99
2.4 Procedimento cirúrgico para o implante das células beta encapsuladas.....	99
2.5. Avaliações <i>in vivo</i>	101
2.5.1 Peso corporal, ingestão de água e ração	101
2.5.2 Glicemia ocasional e em jejum.....	101
2.5.3 Prova de tolerância à glicose por via intraperitoneal (PTGIP).....	101
2.6 Recolha das amostras	101
2.6.1 Colheita de sangue	101
2.6.2 Remoção do implante e tecidos adjacentes	102
2.7 Bioquímica do sangue	102
2.8 Insulinemia e índices de insulino-resistência e insulino-sensibilidade	102
2.9 Análise histológica.....	102
2.9.1 Métodos de Hematoxilina-Eosina e Tricrômio de Masson	103
2.9.2 Imunomarcação de insulina, células endoteliais e macrófagos	103
2.10 Análise estatística.....	104
3. Resultados.....	104
3.1 Perfil glicémico e insulinemia dos ratos normais e diabéticos	104
3.2 Peso corporal, água e ração consumidas e análise bioquímica do sangue	106
3.3 Glicemias ocasionais e em jejum dos ratos diabéticos	107
3.4 Prova de tolerância à glicose dos ratos diabéticos	109
3.5 Insulinemia e índices de sensibilidade e resistência à insulina dos ratos diabéticos	112
3.6 Remoção do implante e histologia.....	112
4. Discussão	116
5. Referências bibliográficas	119
CAPÍTULO 5 - Aspectos físico-químicos e biológicos para melhorar o modelo 3D de hidrogéis de alginato para o encapsulamento de células produtoras de insulina: resultados preliminares e estratégias para ensaios futuros.....	121
Secção 1 - Funcionalizações e estratégias para produzir hidrogéis de alginato ..	123
1. Introdução.....	125
2. Materiais e métodos.....	127

2.1 Produção de esferas de alginato.....	127
2.1.1 Métodos para produção das gotículas de alginato.....	127
2.1.2 Produção de esferas de alginato-PLO-alginato	129
2.2 Modificações químicas do alginato	129
2.2.1 Introdução de grupos aldeído	129
2.2.2 Introdução de grupos metacrilato	130
3. Resultados	131
3.1 Preparação de hidrogéis de alginato.....	131
3.2 Introdução de grupos aldeído e metacrilato	133
4. Discussão.....	135
5. Referências bibliográficas	139
Anexo I.....	141
Anexo II.....	143
Secção 2 - Isolamento de ilhéus de Langerhans e encapsulamento em hidrogéis de alginato	145
1. Introdução	147
2. Materiais e métodos	148
2.1 Isolamento de ilhéus de Langerhans.....	148
2.2 Cultura celular.....	150
2.3 Secreção de insulina.....	150
2.4 Encapsulamento dos ilhéus	151
3. Resultados e Discussão	151
4. Referências bibliográficas	153
CAPÍTULO 6 - Conclusões finais e perspectivas futuras	155

Abreviaturas

Akt	Proteína cinase B
AMSCc	Células estaminais mesenquimais adiposas
AP	Fosfatase alcalina
Ba²⁺	Catião bário
BM-MSCs	Células estaminais mesenquimais da medula óssea
BSA	Albumina sérica bovina
Ca²⁺	Catião cálcio
CaCl₂	Cloreto de cálcio
Calceína AM	Calceína acetoximetil
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
<i>Col1a1</i>	<i>Collagen type I alpha 1 gene</i>
<i>Col4b1</i>	<i>Collagen type IV alpha 1 gene</i>
CO₂	Dióxido de carbono
CR1	Receptor 1 do complemento
DAB	<i>3,3-diaminobenzidine</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EDC	<i>N</i> -[3-(Dimetilamino)propil]- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EthD-1	Homodímero de etídeo
FBS	Soro fetal bovino
<i fn1<="" i=""></i>	<i>Fibronectin 1 gene</i>

FTIR-AR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada
G	Gulurónico
GK	Goto-Kakizaki
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i> - péptido semelhante à glucagina tipo 1
GLP-1R	<i>Glucagon-like peptide-1 receptor</i> - receptor do péptido semelhante à glucagina tipo 1
<i>Glut 2</i>	Glucose transporter 2 gene
GLUT4	Transportador da glicose 4
HE	Hematoxilina-eosina
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
<i>HPRT1</i>	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 gene</i>
IL-1β	Interleucina 1 beta
<i>Ins1</i>	<i>Insulin 1 gene</i>
iPSCs	Células estaminais pluripotentes induzidas
IR	Receptor de insulina
<i>Itga3</i>	<i>Integrin alfa 3</i>
<i>Itgb1</i>	<i>Integrin beta 1</i>
KCl	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	Fosfato monopotássico
<i>Lama1</i>	<i>Laminin 1 gene</i>
M	Manurónico
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monócitos-1
MES	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MSCs	Células estaminais mesenquimais

NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato reduzido
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NaH₂PO₄	Fosfato monossódico
NaIO₄	Periodato de sódio
NO	Óxido nítrico
NPs	Nanopartículas
O₂	Oxigênio
PAH	Hidrocloreto de polialilamina
PAN	Poliacrilonitrila
PBS	Tampão fosfato salino
<i>Pdx 1</i>	<i>Pancreatic and duodenal homeobox 1 gene</i>
PEG	Poli(etileno)glicol
PEGDA	Poli(etileno)glicol diacrilato
PEG-NHS	PEG com éster N-hidróxido succinimida
PEI	Poli(etileno)imina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PKA	Proteína cinase A
PLGA	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
PLL	Poli-L-lisina
PLO	Poli-L-ornitina
PVA	Álcool polivinílico
PVC	Policloreto de polivinila

PSS	Polistireno sulfonato
PTFE	Politetrafluoretileno
RFU	<i>Resazurin fluorescence units</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RGD	Arginina-Glicina-Aspartato
qRT-PCR	<i>Quantitative real time - polymerase chain reaction</i>
SOD	Superóxido dismutase
Sulfo-NHS	<i>N</i> -hidróxido de sulfosuccinimida
<i>Sur1</i>	<i>Sulfonylurea receptor 1 gene</i>
TBS	Tampão Tris salino
TM	Tricrómio de Masson
TNF-α	Factor de necrose tumoral alfa
Tris	Trishidroximitelaminometano
Tris-HCl	Trishidroximitelaminometano-ácido clorídrico
VEGF	Factor de crescimento endotelial vascular
W	Wistar
3D	Tridimensional

Resumo

O pâncreas bio-artificial é o mais complexo sistema de libertação de insulina e apresenta-se como uma metodologia inovadora e promissora para o tratamento da diabetes. Graças ao encapsulamento, as células produtoras de insulina mantêm-se protegidas do ataque do sistema imunitário do hospedeiro sem recorrer a imunossuppressores, enquanto libertam a insulina, permitindo assim a diminuição da hiperglicemia ou idealmente o restabelecimento da normoglicemia.

Apesar dos resultados promissores em modelos animais e no homem, alguns obstáculos limitam o emprego desta metodologia na prática clínica. A deficiente biocompatibilidade e instabilidade dos materiais, a imunoproteção limitada e a hipóxia são factores que levam à morte das células insulares, comprometendo o sucesso do implante. Estratégias que permitam melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas do pâncreas bio-artificial, ultrapassando as limitações desta metodologia, têm sido alvo de investigação nos últimos anos e estão na base deste trabalho. Este, focou-se essencialmente em aspectos biológicos, através da criação de estratégias para o desenvolvimento de um modelo tridimensional (3D) que melhore a sobrevivência e função das células encapsuladas, traduzindo-se na funcionalidade do implante a longo prazo.

Embora se pretenda, no futuro, usar ilhéus de Langerhans isolados de rato, os ensaios apresentados no decorrer da tese serviram-se da linha de células beta de rato INS-1E, permitindo, para além dos ensaios *in vitro*, o estudo de um transplante alogénico. Primeiro confirmou-se o número de células ideal para o encapsulamento num modelo 3D de hidrogéis de alginato, produzido por gelificação externa, e verificou-se que a densidade de 5 milhões de células por mililitro se traduziu, durante 7 dias em cultura, numa maior viabilidade e actividade metabólica e melhor função secretora de insulina das células encapsuladas. Mimetizando o nicho celular *in vivo*, enriqueceram-se os hidrogéis de alginato com um péptido presente na matriz extracelular, o RGD (Arginina-Glicina-Aspartato), através da química das carbodiimidas. A presença deste péptido melhorou a biocompatibilidade dos hidrogéis. As células puderam interagir com este componente da matriz extracelular, aspecto crucial para a sua sobrevivência e função. Verificou-se uma melhoria da viabilidade celular, da actividade metabólica, da proliferação e da secreção de insulina, acompanhada pelo aumento da expressão de alguns genes envolvidos na maquinaria da secreção da hormona. Uma explicação para estes resultados pode assentar no facto da presença do péptido RGD induzir aumento da expressão de genes de alguns constituintes da matriz extracelular, aumento de processos de adesão celular e favorecimento da formação de esferóides (pseudo-ilhéus).

Um modelo inovador foi criado, permitindo a libertação e acção nas células beta de um agente capaz de melhorar a sua secreção de insulina e protegê-las da apoptose, o GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*). Recorrendo ao método da dupla emulsão água/óleo/água com evaporação do solvente, foram produzidas nanopartículas de PLGA (ácido poli(láctico-co-glicólico)) contendo GLP-1, que foram co-encapsuladas com as células em hidrogéis de alginato. Sem causar toxicidade, a libertação do conteúdo das nanopartículas traduziu-se, durante 7 dias em cultura, num aumento da actividade metabólica e da secreção de insulina das células encapsuladas.

In vitro, ambas as estratégias propostas melhoraram a viabilidade e funcionalidade das células beta encapsuladas, antevendo o sucesso do implante *in vivo*. Com o objectivo de testar a potencialidade da aplicação do pâncreas bio-artificial num modelo de diabetes tipo 2, avaliou-se a eficácia do implante de células beta encapsuladas no modelo 3D de hidrogéis de alginato funcionalizado com o péptido de adesão RGD num transplante alogénico em ratos diabéticos Goto-Kakizaki imunocompetentes. Os hidrogéis foram implantados subcutaneamente e os animais foram avaliados ao longo de 21 dias após a cirurgia. Os ratos implantados com as células beta encapsuladas melhoraram o seu perfil glicémico, constatado pela melhoria da glicemia ocasional e do jejum e da tolerância à glicose. A insulinemia do jejum não mostrou alterações, mas estes animais melhoraram a sensibilidade à insulina e diminuíram a resistência à hormona, sugerindo que a insulina segregada pelas células beta implantadas teve um efeito mais eficiente. Após 21 dias, as marcações histológicas do implante e tecidos adjacentes mostraram a integridade das esferas que continham células insulino-positivas. Foi observada uma pequena reacção inflamatória e a presença de macrófagos a rodear o implante. A nível peri-implante, também foi possível observar a deposição de colagénio e a presença de múltiplos microvasos, capazes de suportar vivas e funcionais as células implantadas.

Por fim, descreveram-se duas modificações químicas do alginato, com a introdução de grupos aldeído e metacrilato que permitirão, no futuro, a reactividade com entidades de interesse, como as células ou ilhéus a encapsular e substâncias bio-activas benéficas para o modelo e, ainda, proporcionar uma forma de reticulação mais estável dos hidrogéis. Alguns métodos de encapsulamento celular também foram testados. Descreveu-se ainda o isolamento de ilhéus de Langerhans de rato mantendo a sua função secretora, para futuro encapsulamento no nosso modelo.

Concluindo, com este trabalho criaram-se estratégias que permitiram melhorar a viabilidade e a função das células beta encapsuladas, e delinearam-se novas abordagens para testar no futuro, culminando no desenvolvimento de um modelo 3D de hidrogéis de alginato, que será próximo do ideal para o encapsulamento de células produtoras de insulina e seu transplante, garantindo a função do implante ao longo do tempo.

Abstract

The bioartificial pancreas is the most complex insulin-delivery system and presents a new and promising methodology to treat diabetes. Due to encapsulation, insulin-producing cells are able to produce and deliver insulin, allowing the reduction of hyperglycaemia or normoglycaemia reestablishment, while being protected from the host immune system without the need of immunosuppressants.

Despite the promising results in animal models and in humans, there are pitfalls which limit the use of this methodology in clinical practice. Deficient biocompatibility and instability of materials, limited immunoprotection and hypoxia are limitations that lead to beta cell death, compromising the implant success. Strategies that allow the improvement of physicochemical and biological properties, overtaking the limitations of this methodology, have been the target of research in last years and are the basis of this work. Thus, this work focused essentially in biological aspects, creating strategies to develop a tridimensional (3D) model that increase cellular survival and functioning, leading to long-term implant functionality.

Although the intention to use, in the future, islets of Langerhans isolated from rat, the presented essays used rat beta cell line INS-1E, allowing the *in vitro* testing and the study of allogenic transplant.

First, the ideal cell number for encapsulation in a 3D alginate hydrogel model, produced by external gelation, was confirmed. Cell density of 5 million per millilitre showed, during 7 days in culture, better viability and high levels of metabolic activity and insulin secretion.

To mimic the *in vivo* cellular niche, the alginate hydrogels were enriched with a peptide present in extracellular matrix, the Arginine-Glycine-Aspartate (RGD), through carbodiimide chemistry. The presence of this peptide improved hydrogels biocompatibility and allowed cells to interact with this component, which is crucial for cell survival and functioning. It was observed that this modification induced enhancements of cellular viability, metabolic activity, proliferation and insulin secretion, followed by an increased expression of genes involved in insulin secretion machinery. One explanation for these results might be the fact that RGD induced increased gene expression of extracellular matrix components, cellular adhesion and also spheroids formation.

A new model was created that allows the release and action in beta cells of an agent able to improve beta cells insulin secretion and to protect them from apoptosis, the glucagon-like peptide-1 (GLP-1). PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)) nanoparticles with GLP-1 were produced by double emulsion water/oil/water with solvent evaporation method, and co-encapsulated with cells in alginate hydrogels. Without toxicity, the delivery of nanoparticles

content led to improvements in metabolic activity and insulin secretion of encapsulated cells during 7 days of culture.

In vitro, both proposed strategies resulted in ameliorated viability and functioning of encapsulated beta cells, foreseeing the implant success *in vivo*.

Aiming to test the capability of the application of bioartificial pancreas in a type 2 diabetes animal model, the efficacy of the implant of beta cells in the 3D alginate hydrogels functionalized with the adhesion peptide RGD was evaluated with allogenic transplantation in diabetic Goto-Kakizaki immunocompetent rats. Hydrogels were implanted subcutaneously and animals were evaluated during 21 days after surgery. During the whole experimental period, rats implanted with encapsulated cells improved their glycaemic control, observed by the improvement of occasional and fasting glycaemia and glucose tolerance. Fasting insulinemia did not show alterations, but these animals ameliorated insulin sensitivity and insulin resistance, suggesting that the action of insulin segregated from implanted beta cells was more efficient. After 21 days, the histological stains of implant and adjacent tissues showed integrity of spheres containing insulin-positive cells. It was observed a slight inflammatory reaction with macrophages surrounding the implant. It was also observed a deposition of collagen and the presence of multiple microvessels, which are useful to support alive and functional implanted cells. Finally, two chemical modifications in alginate were described, with introduction of aldehyde and methacrylate groups. These will allow, in the future, the reactivity with cells and islets, and bioactive substances beneficial to our model, as well as provide more stable hydrogels reticulation. Different encapsulation methods were also tested. Islet isolation procedure, with maintained secretory function, was also described in order to be encapsulated with our developed model.

Concluding, strategies that were able to improve the viability and functioning of encapsulated beta cells were developed. New strategies were outlined to test in the future, culminating in the development of a 3D model of alginate hydrogels that we believe to be near the ideal for encapsulation of insulin-producing cells and transplantation, ensuring the long-term implant functionality.

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1. Diabetes

A diabetes *mellitus* é uma doença metabólica caracterizada pelo aumento anormal da concentração sanguínea de glicose, a hiperglicemia (Figura 1). Este aumento traduz um dos dois acontecimentos ou a combinação de ambos: incapacidade do corpo produzir insulina, pela disfunção ou falência das células beta dos ilhéus pancreáticos e/ou pela destruição e conseqüente redução da sua massa, e ainda a redução da acção da insulina nas células-alvo resultado do fenómeno de insulinoresistência hepática e periférica. Nesta condição, no fígado, a glicogenólise e a gliconeogénese também contribuem para o aumento da concentração sanguínea de glicose que, ao longo do tempo, se traduz no desenvolvimento das complicações crónicas associadas à doença [1].

1.1 Classificação

Em 1997, a *World Health Organization* e a *American Diabetes Association* classificaram a diabetes *mellitus* em quatro categorias: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes gestacional e outros tipos específicos [2]. A diabetes tipo 2 representa a grande maioria dos diabéticos, 90 a 95%, e caracteriza-se por insulinoresistência e deficiente secreção de insulina. A diabetes tipo 1 representa 5 a 10% dos diabéticos e é caracterizada pela total ausência de produção de insulina, resultado da destruição auto-imune das células beta produtoras da hormona. Os outros dois tipos representam uma pequena fatia da população diabética e dizem respeito à diabetes gestacional que, na maior parte das vezes, é resolvida após o parto e à diabetes resultante de casos específicos, nomeadamente doenças do pâncreas exócrino, infecções, endocrinopatias, defeitos genéticos na função da célula beta ou na acção da insulina e indução por fármacos [2].

1.2 Epidemiologia

A diabetes *mellitus* é a terceira maior causa de morte em todo o mundo, antecedida pelas doenças cardiovasculares e o cancro. O crescimento da população, o aumento da esperança média de vida, a urbanização, a incidência progressivamente crescente da obesidade e a ausência de actividade física, juntam-se a factores genéticos que, em conjunto, levam esta patologia a atingir proporções epidémicas [3, 4]. Um estudo da *World Health Organization* estimou que, em 2030, haja no mundo aproximadamente 366 milhões de pessoas com esta doença [3], número que poderá estar subestimado, uma vez que, em 2012, a mesma organização contabilizou já 346 milhões de diabéticos [4].

Afectando múltiplos sistemas e órgãos, com a progressão da doença surgem as complicações associadas como neuropatia, retinopatia, nefropatia, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares e ainda doença vascular periférica [5] (Figura 1). Desta forma, as taxas de morbidade e os elevados custos associados tornam urgente o desenvolvimento de tratamentos efectivos para esta patologia.

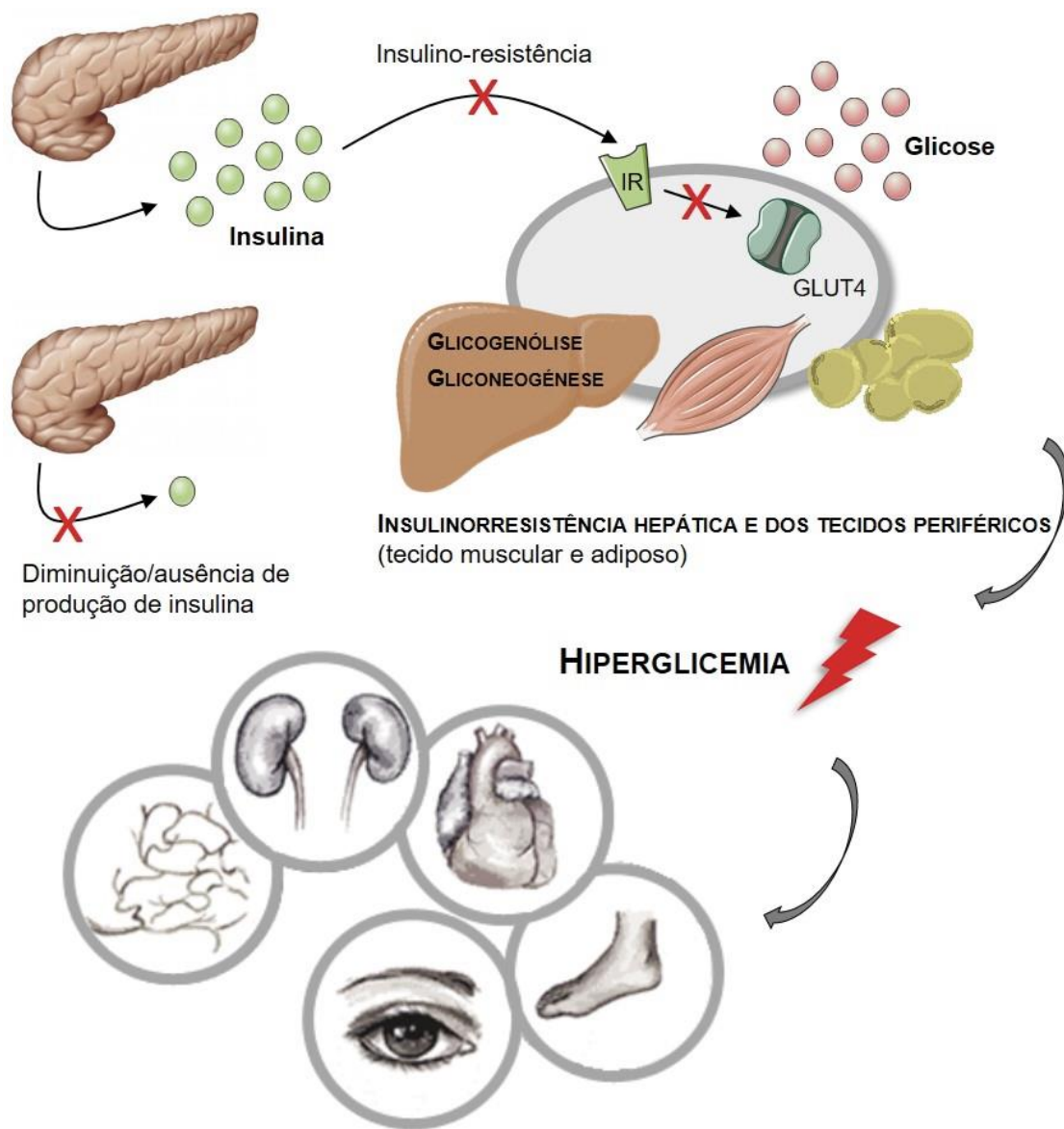


Figura 1: Representação esquemática da fisiopatologia da diabetes *mellitus* e das complicações associadas à doença (neuropatia, retinopatia, nefropatia, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares e doença vascular periférica), decorrentes da exposição a elevados níveis de glicose.

IR - receptor da insulina; GLUT4 - transportador de glicose 4.

1.3 Tratamentos

Uma dieta apropriada e exercício físico regular é recomendado a todos os doentes diabéticos, no entanto, e dependendo do tipo de diabetes, para que o controlo glicémico seja atingido, é necessário recorrer a fármacos antidiabéticos e/ou à administração de insulina. Comumente usados no tratamento da diabetes tipo 2, os antidiabéticos orais distribuem-se por diferentes classes relacionadas com os diferentes mecanismos de acção que, maioritariamente, permitem aumentar a secreção de insulina ou melhorar a acção da hormona no fígado e nos tecidos periféricos [6]. A intervenção clínica na diabetes tipo 2 recorre maioritariamente ao uso dos antidiabéticos em monoterapia ou em combinações. No entanto, certas correntes defendem o benefício da administração de insulina numa fase precoce da doença, permitindo um melhor controlo glicémico e um atraso no desenvolvimento das complicações associadas à doença [7, 8]. As opções terapêuticas passam sobretudo pela associação dos antidiabéticos orais e insulina e, por fim, quando o pâncreas endócrino entra em falência, a administração da hormona torna-se obrigatória [7, 8]. Na diabetes tipo 1, não havendo produção de insulina no pâncreas, a administração exógena da mesma é crucial e obrigatória para a sobrevivência dos doentes [9].

A administração da hormona recorre ao uso de seringas e canetas de insulina. Mais sofisticadas, as bombas infusoras de insulina permitem a contínua monitorização da glicose sanguínea e uma infusão de insulina mais apropriada. No entanto, mesmo com as bombas infusoras, o mecanismo de regulação da secreção de insulina está longe da perfeição obtida em células vivas e os episódios de hipoglicemia são um risco constante [10].

Neste contexto, a transplantação de tecido produtor de insulina, através do transplante do pâncreas ou dos ilhéus de Langerhans, assume um papel terapêutico relevante.

1.3.1 Transplantação de tecido produtor de insulina

Com o objectivo de controlar os níveis de glicose no sangue de uma forma efectiva, em 1966 foi realizado o primeiro transplante de pâncreas com sucesso [11]. O êxito deste tipo de intervenção tornou-se possível devido, principalmente, ao desenvolvimento dos imunossuppressores nos anos 60 [12]. Apesar da elevada taxa de sobrevivência dos doentes sujeitos a esta intervenção, os procedimentos cirúrgicos complexos e as complicações associadas à cirurgia, principalmente decorrentes dos intensos regimes de imunossuppressores, levaram à restrição deste procedimento maioritariamente a doentes com nefropatia diabética avançada que, ao receberem o novo rim, recebem também o pâncreas [13].

Outra estratégia que prometia um bom controlo glicémico e ultrapassava algumas das limitações reportadas no transplante do órgão ganhou visibilidade após o surgimento do protocolo de Edmonton e seus resultados promissores [14]. Desenvolvido em 1989, este protocolo envolve o isolamento dos ilhéus de Langerhans de doadores cadavéricos. Os doentes diabéticos tipo 1 imunodeprimidos recebem os ilhéus por infusão, através da veia porta, que se alojam nos sinusóides hepáticos [14]. Desde então, com a melhoria do regime de imunossupressores e dos protocolos de isolamento de ilhéus, a insulino-independência é mantida em 65% dos transplantados por uma média de 12 meses [15]. Apesar de ter sido demonstrado que o controlo glicémico pode ser restabelecido com esta metodologia, os ilhéus transplantados acabam por entrar em falência e a administração de insulina exógena volta a ser obrigatória [16]. A necessidade de um elevado número de doadores, juntamente com o permanente uso de imunossupressores são limitações que também comprometem a prática desta metodologia. Para além do seu efeito diabetogénico, os imunossupressores estão associados a outros efeitos secundários nefastos, tais como o aumento da susceptibilidade a infecções e o risco aumentado de desenvolvimento de cancro [17, 18].

Este cenário tem encorajado a investigação científica no desenvolvimento de metodologias capazes de proteger as células transplantadas do ataque do hospedeiro, sem o recurso aos imunossupressores, mantendo a sua função primordial, a secreção de insulina.

2. Pâncreas bio-artificial

O pâncreas bio-artificial é o mais complexo sistema de libertação de insulina e a sua história conta com mais de 40 anos. Desde o trabalho pioneiro de Chick e seus colaboradores no desenvolvimento do pâncreas bio-artificial [19] e o uso de alginato para o encapsulamento dos ilhéus, proposto por Lim e Sun [20], a comunidade científica muito tem apostado nesta área.

O princípio do pâncreas bio-artificial está representado na Figura 2. Rodeados por uma membrana semipermeável, usualmente de matriz polimérica, os ilhéus ficam protegidos dos anticorpos e das células do sistema imunitário do hospedeiro. Por outro lado, a membrana permite a livre difusão de oxigénio, glicose e outros nutrientes e metabolitos de baixo peso molecular, essenciais à sobrevivência celular. A insulina segregada pelas células tem também livre passagem através da membrana [1, 21, 22].

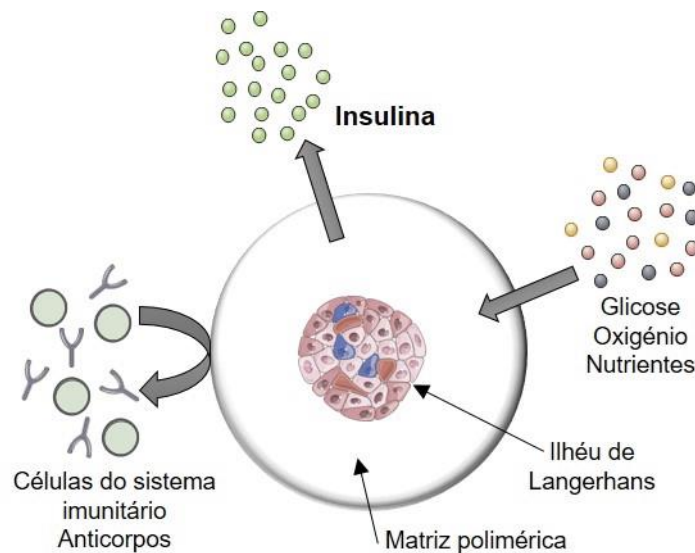


Figura 2: Princípio do pâncreas bio-artificial

Desta forma e idealmente, o transplante celular restabelece a normoglicemia pela libertação de insulina das células beta dos ilhéus, enquanto o encapsulamento promove a imunoproteção celular, evitando assim o uso dos imunossupressores. Desta forma, os ilhéus também ficam protegidos contra o ataque imunitário característico da diabetes tipo 1 [1]. Esta nova tecnologia imuno-isoladora oferece ainda a possibilidade do uso de fontes de células xenogénicas insulino-produtoras, colmatando assim a falta de dadores [1]. O transplante xenogénico impõe uma crescente exigência para o desenvolvimento dos materiais e processos de encapsulamento, devido também à elevada probabilidade de rejeição [1, 23].

Para ser eficaz, este método deve: 1) manter a viabilidade e função das células encapsuladas através do seu imuno-isolamento, evitando a rejeição imunitária do hospedeiro; 2) permitir a rápida detecção das flutuações da glicose sanguínea e rápida resposta secretora das células encapsuladas; 3) garantir a biocompatibilidade dos materiais ao longo do tempo, evitando reacções inflamatórias e fibrose do implante; 4) facilitar o processo de implantação e também de remoção do implante, caso ocorra algum problema [1, 22].

2.1 Tecnologia no desenvolvimento do pâncreas bio-artificial

2.1.1 Tipos de pâncreas bio-artificial

Diversos materiais, com diferentes propriedades físico-químicas e geometrias, têm sido testados para a criação do pâncreas bio-artificial. Estes incluem os convencionais intravasculares dispositivos de perfusão sanguínea e os extravasculares, como as macrocápsulas e as microcápsulas. Mais recentemente surgiu um novo conceito que pretende reduzir o tamanho dos modelos, baseado em técnicas de *conformal coating* (Figura 3) [1, 21, 24, 25].

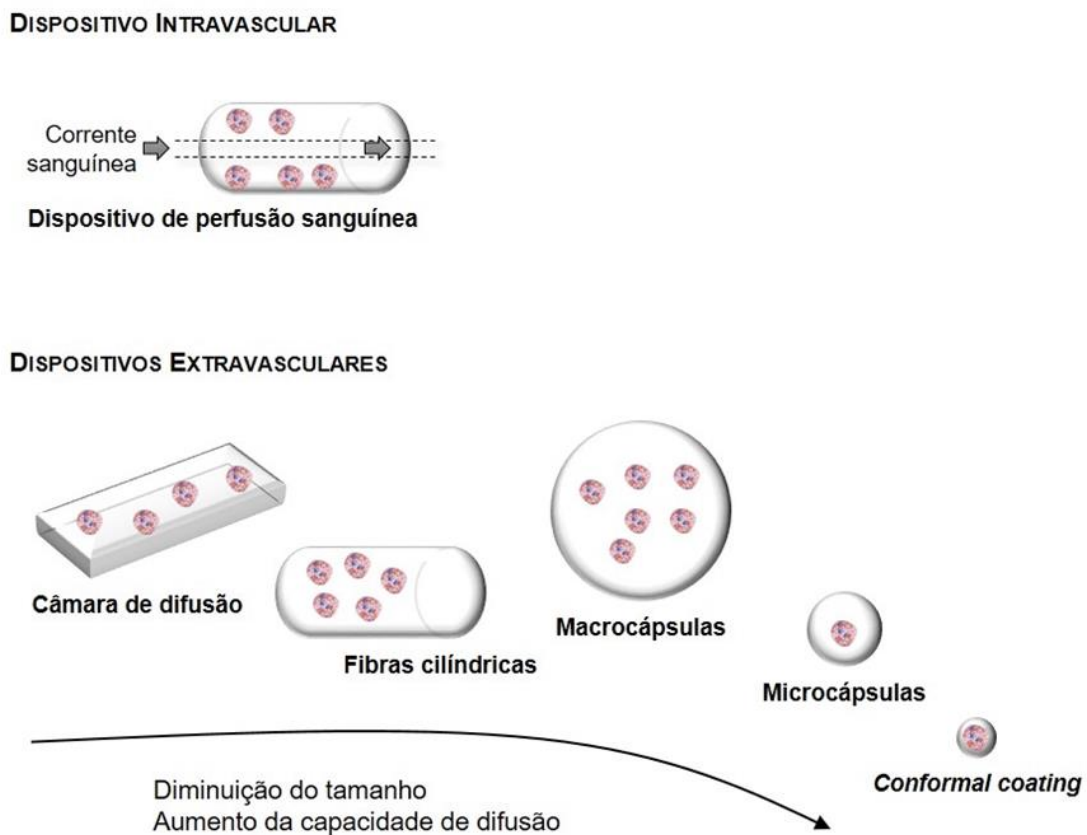


Figura 3: Representação esquemática dos diferentes tipos de pâncreas bio-artificial.

A complexa cirurgia vascular necessária para o implante de dispositivos intravasculares, bem como a frequência de trombozes no pós-operatório, levou ao abandono desta metodologia e à criação de dispositivos extravasculares. Estes são implantados por um processo cirúrgico muito mais simples e, dependendo do seu tamanho, podem ser colocados em diferentes locais do hospedeiro [1, 21]. Os extravasculares podem dividir-

se em duas categorias, as macrocápsulas e a microcápsulas. Esta designação de cápsulas, apesar de ser consensualmente adoptada, na sua grande maioria diz respeito a esferas (micro ou macro), uma vez que os ilhéus se encontram envolvidos na matriz polimérica. Na categoria das macrocápsulas, vários ilhéus são encapsulados no mesmo dispositivo, que pode ter várias conformações, como membranas planas apelidadas de câmaras de difusão, fibras cilíndricas e macrocápsulas esféricas, podendo atingir dimensões na ordem dos centímetros [1, 21]. As suas limitações prendem-se com o tamanho, levando a uma baixa razão superfície/volume, e com a frequente agregação dos ilhéus. Desta forma, não tendo acesso directo à rede vascular, a baixa difusão de oxigénio e nutrientes, principalmente para as células que se encontram na zona mais interior do dispositivo, leva à sua necrose. A secreção da insulina também sofre um atraso pela distância das células secretoras da corrente sanguínea [1, 21, 26].

No micro-encapsulamento, os ilhéus são individualmente encapsulados (ou em pequeno número, no máximo três), em microcápsulas esféricas com diâmetros variáveis entre os 0,02 - 1,5 mm. Esta conformação permite aumentar a relação superfície/volume, vantajosa para a difusão de oxigénio e nutrientes, traduzindo-se numa melhoria da viabilidade celular. Permite ainda uma resposta mais eficiente das células às alterações da concentração de glicose, sem o atraso da secreção de insulina observado nas macrocápsulas. Outras vantagens dizem respeito à sua estabilidade mecânica, à facilidade e diversidade de tecnologias para a sua preparação, e ainda, pela redução do tamanho, à facilidade do seu implante. Como desvantagem, surge a maior dificuldade da sua recuperação no caso da falência do implante [1, 21, 22, 26].

Uma conformação descrita mais recentemente permite o encapsulamento dos ilhéus com uma fina membrana através de métodos de *conformal coating*. Esta recorre a técnicas como polimerização interfacial [27], *layer-by-layer* por deposição de poli-eletrólitos [28], interacção hidrofóbica [29, 30] ou reacção química [31] à superfície das células, e ainda *conformal coatings* com células vivas [32]. Apesar de apresentarem a vantagem de restringir o tamanho do implante ao tamanho do material a encapsular, estes métodos necessitam de aperfeiçoamento pois demonstram uma estabilidade e suporte mecânico limitados [1, 21]. Desta forma, o micro-encapsulamento dos ilhéus continua a ser a metodologia mais vantajosa e, por isso, a mais usada em ensaios em modelos animais e também em ensaios clínicos [1, 33].

2.1.2 Locais de implante

Os locais para o implante do pâncreas bio-artificial devem idealmente cumprir determinados requisitos como: 1) garantir boa vascularização, permitindo o suprimento

de nutrientes e oxigénio às células encapsuladas e ainda garantir uma resposta secretora de insulina eficaz, sensível às flutuações da concentração da glicose sanguínea; 2) oferecer suporte mecânico necessário ao implante e 3) permitir o implante com uma cirurgia minimamente invasiva, bem como a remoção do mesmo caso algum problema ocorra [1].

Desde o trabalho pioneiro de Shapiro e seus colaboradores, os transplantes de ilhéus não encapsulados recorrem à sua infusão através da veia porta, e estes alojam-se nos sinusóides hepáticos [14]. Com o micro-encapsulamento, o volume a implantar inevitavelmente aumenta e o diâmetro dos ilhéus encapsulados é, em média, o triplo dos ilhéus nus, dificultando assim o implante no fígado [1, 21]. Juntamente com algumas limitações descritas no implante hepático, como a resposta inflamatória aguda mediada pelo contacto directo com a corrente sanguínea, o contacto com os níveis elevados de glicose, a baixa tenção de oxigénio e ainda a exposição a fármacos que se concentram no fígado, impulsionaram à investigação de novos locais de implantação [1, 16]. Muitos locais alternativos ao fígado, como diferentes órgãos, tecidos ou submucosas, têm sido alvo de estudo para o implante dos ilhéus em modelos animais [16, 26]. A dificuldade centra-se em encontrar um local que possua a vascularização desejável, que consiga albergar o volume necessário para o implante e ainda, mimetizando o que ocorre naturalmente, que proporcione a libertação da insulina junto da veia porta [16]. Para o implante dos ilhéus micro-encapsulados em roedores, os locais mais frequentemente usados são a cavidade peritoneal e o espaço subcutâneo [1, 34]. Em ensaios em humanos, estes são os únicos locais descritos para o implante quer de ilhéus micro-encapsulados quer de macrocápsulas [1, 33].

2.1.3 Materiais usados

O sucesso dos sistemas bio-artificiais depende grandemente dos materiais usados e dos métodos para a sua preparação. Para garantir a funcionalidade dos implantes, os biomateriais necessitam cumprir determinados requisitos fundamentais, resumidos na Tabela 1.

Os materiais usados no imuno-isolamento celular categorizam-se em não-poliméricos (inorgânico) e poliméricos.

Os materiais inorgânicos, como o silicone e os cerâmicos, permitem um melhor controlo do tamanho do poro relativamente aos materiais poliméricos orgânicos [35, 36], mas estão associados a condições de fabrico complicadas sendo ainda desfavoráveis para o encapsulamento celular [35]. Para além disso, as técnicas usadas restringem-se

maioritariamente ao fabrico de macrocápsulas, limitando a escolha do local de implante [22, 24].

Tabela 1: Características dos biomateriais para o desenvolvimento de sistemas bio-artificiais	
Propriedades químicas, formulação/processamento	Facilidade de processamento para as propriedades desejadas Reprodutibilidade das propriedades desejadas Obtenção com a máxima pureza Possibilidade de esterilização e manuseamento asséptico
Propriedades mecânicas	Propriedades mecânicas adequadas à aplicação
Interação com o hospedeiro	Estabilidade físico-química adequada para o tempo de vida do implante Não-citotóxico, não-tumorigénico e não-trombogénico
Interação com as células encapsuladas	Não-citotóxico Capaz de proteger e manter a viabilidade e função celular ao longo do tempo

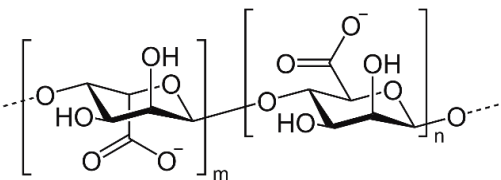
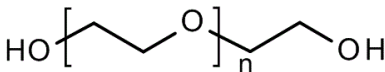
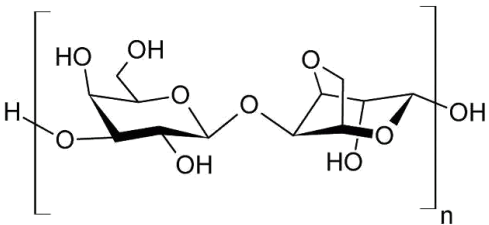
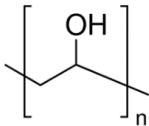
Os materiais poliméricos são os mais usados para o encapsulamento de células para imuno-isolamento [1] (Tabela 2). Estes materiais dividem-se em polímeros de origem natural e polímeros sintéticos. Com os naturais, usualmente formam-se hidrogéis, amplamente usados graças às suas propriedades semelhantes às dos tecidos e à sua elevada biocompatibilidade [1, 22, 26]. Assim, vários polímeros naturais de composição polissacarídica já foram testados no encapsulamento de ilhéus, tais como o alginato, a agarose, o quitosano, o colagénio e a celulose, dos quais o alginato é o polímero natural usado por excelência [22, 26, 37, 38].

Os polímeros sintéticos permitem um controlo maior sobre a estrutura e propriedades dos materiais, e maior facilidade de processamento [22]. No entanto, muitos dos processos de fabrico recorrem a compostos tóxicos que, posteriormente, se não forem eliminados de forma completa, afectam a viabilidade celular [1, 22, 26]. Polímeros sintéticos como polietilenoglicol (PEG), polietilenoimina (PEI), poli(*N,N*-dimetilacrilamida), poli(éter sulfona), poliuretano, álcool polivinílico (PVA) e politetrafluoretileno (PTFE), já foram testados no encapsulamento de ilhéus [22, 26]. Destes, o PEG é o mais usado, graças à

sua biocompatibilidade, às propriedades hidrofílicas e à capacidade de evitar a adesão inespecífica de proteínas [26].

Para o encapsulamento celular, e especificamente para o desenvolvimento do pâncreas bio-artificial, os sistemas mais usados são os hidrogéis [24] e o alginato é o polímero mais frequentemente utilizado [23, 37, 38].

Tabela 2: Polímeros mais usados para o desenvolvimento do pâncreas bio-artificial

Naturais	Sintéticos
<p>Alginato</p> 	<p>Polietilenoglicol (PEG)</p> 
<p>Agarose</p> 	<p>Álcool polivinílico (PVA)</p> 

3. Hidrogéis de alginato

O alginato é um polímero natural aniônico e hidrofílico, extraído maioritariamente de algas castanhas [39]. Os alginatos constituem uma família de polissacarídeos não ramificados, podendo conter quantidades variáveis de dois ácidos poliurónicos, o ácido β -D-manorónico (M) e o ácido α -L-gulurónico (G), ligados por ligações (1,4)-glicosídicas. Estes monómeros distribuem-se em blocos, podendo constituir regiões apenas com um dos resíduos (M ou G) ou regiões em que estes se alternam de forma aleatória. Os blocos G e M apresentam diferenças de conformação e, conseqüentemente, afectam a flexibilidade do polímero (Figura 4-A) [39]. Na presença de catiões multivalentes como o caso do Ca^{2+} , o mais usado para aplicações biomédicas, o alginato forma hidrogéis por um processo apelidado de gelificação ionotrópica (Figura 4-B).

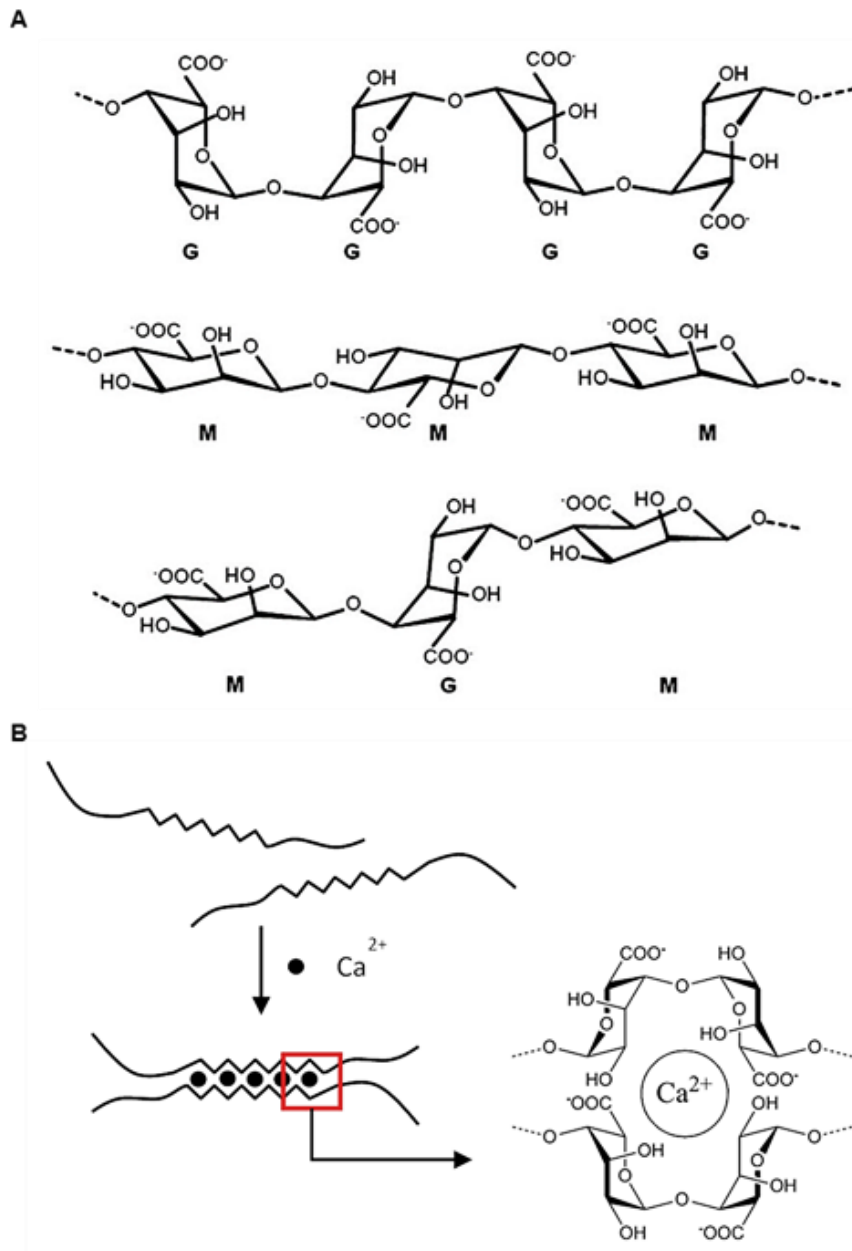


Figura 4: Estrutura química e gelificação ionotrópica do alginato. (A) Diferentes estruturas químicas e conformações, dependentes da composição do alginato em blocos de ácido gulurónico (G) ou ácido manurónico (M). (B) Formação do modelo “egg-box” pela interação do cálcio com o alginato.

No alginato de sódio, a gelificação ocorre pela troca dos cátions de sódio dos resíduos de ácido gulurónico com os cátions de cálcio. A essa ocupação das cavidades electronegativas por parte do Ca^{2+} e arranjo dos resíduos de ácido gulurónico chamou-se, por analogia, modelo de “caixa de ovos” (*egg-box*). Neste processo, o cálcio tem maior afinidade para os resíduos G do que para os resíduos M. Assim sendo, um hidrogel formado com alginato com elevado conteúdo em monómeros G é mais estável e rígido,

quebradiço e poroso do que um formado com alginato com baixo conteúdo em G que, por sua vez, forma hidrogéis mais elásticos e flexíveis, menos porosos e menos estáveis. Estas características também são influenciadas pela concentração do polímero, o seu peso molecular e ainda a concentração do catião gelificante [37–39].

O alginato não interfere com a funcionalidade das células encapsuladas e é dos poucos polímeros que permite a formação de hidrogéis em condições fisiológicas. O encapsulamento pode ser efectuado à temperatura corporal, a pH fisiológico e em soluções isotónicas. Esta capacidade de formar, em condições fisiológicas, hidrogéis altamente biocompatíveis que fornecem um ambiente tridimensional, com características semelhantes à matriz extracelular como a elasticidade e a elevada permeabilidade graças ao elevado conteúdo em água, e ainda a reduzida tensão superficial, minimizando a adsorção de proteínas e adesão celular (também pela sua carga negativa), tornam este polímero extremamente atractivo para o encapsulamento celular [35, 36, 38]. A possibilidade de funcionalizar estes hidrogéis, podendo modular as suas propriedades físico-químicas e ainda podendo dotá-los de actividade biológica, tem sido explorada para melhor suprir as necessidades das células encapsuladas no ambiente desafiante após o implante [35, 38]

3.1 Tecnologias para produção dos hidrogéis de alginato

Vários métodos têm sido desenvolvidos para o encapsulamento de células em hidrogéis de alginato [37, 40]. A maioria baseia-se na gelificação ionotrópica do alginato na presença de catiões multivalentes [23, 37]. O catião mais vulgarmente usado é o cálcio, embora também se use o bário [38]. O alginato também pode interagir com polímeros catiónicos como o caso do quitosano [41, 42], da poli-L-lisina (PLL) [43, 44] e da poli-L-ornitina (PLO) [45, 46], formando complexos poli-electrolíticos. Um método usual produz hidrogéis de alginato-policatión-alginato nos quais, após a gelificação do alginato, se forma um poli-electrólito à superfície pela complexação de PLL ou PLO e novamente alginato [38, 46]. Alguns autores sugerem que as cápsulas formadas com PLO são mais estáveis e com melhor capacidade imunoprotectora [38, 46]. A última camada de alginato é adicionada por reduzir a toxicidade dos polímeros catiónicos não complexados na primeira [47]. Este método melhora a estabilidade mecânica e a capacidade de imunoprotecção destes hidrogéis, pela diminuição do poro do sistema [38].

Tipicamente, a suspensão do alginato com os ilhéus é extrudida por uma agulha formando gotículas que, depois de gelificadas, formam hidrogéis esféricos. Quando apenas é usada a força da gravidade, as esferas atingem um diâmetro médio de 2000 µm [23, 40]. O desenvolvimento de técnicas mais avançadas pretende formar gotículas mais pequenas

e com uma menor variabilidade na distribuição de tamanhos [23, 40]. Assim, sistemas de extrusão sofisticados que recorrem a outras forças como é o caso do fluxo coaxial de ar, da força electrostática ou do corte/vibração de jacto laminar, permitem a redução das gotículas de alginato que, através da gelificação, formam microsferas mais pequenas (200 - 350 μm) [23, 40]. No entanto, à medida que o tamanho diminui, encapsulamentos inapropriados podem ocorrer, levando ao aumento da falência celular [48]. Uma vez que o diâmetro médio dos ilhéus é de 150 μm , alguns autores sugerem que, recorrendo a estas metodologias, atingir um diâmetro médio de 350 μm é o ideal para garantir o sucesso do encapsulamento dos mesmos [23]. Calafiore e seus colaboradores descreveram um método radicalmente diferente de dupla emulsão aquosa de alginato/PEG/*Ficoll*, em que os ilhéus ficam rodeados por finas membranas [49]. Por fim, alguns métodos de *conformal coatings* permitem encapsular os ilhéus em alginato recorrendo a diferentes processos como a precipitação interfacial [23, 50] e o *layer-by-layer* [51]. Nestes métodos, o tamanho final depende do tamanho do material a encapsular, pelo que o diâmetro final não excede os 200 μm [23]. Modificações químicas na cadeia do alginato [52], e a introdução de PEG [53–55], também têm sido exploradas para o encapsulamento de ilhéus ou células beta em materiais de base alginato.

A Figura 5 mostra as tecnologias usadas para a produção dos hidrogéis de alginato para o encapsulamento de ilhéus, bem como os tamanhos médios obtidos.

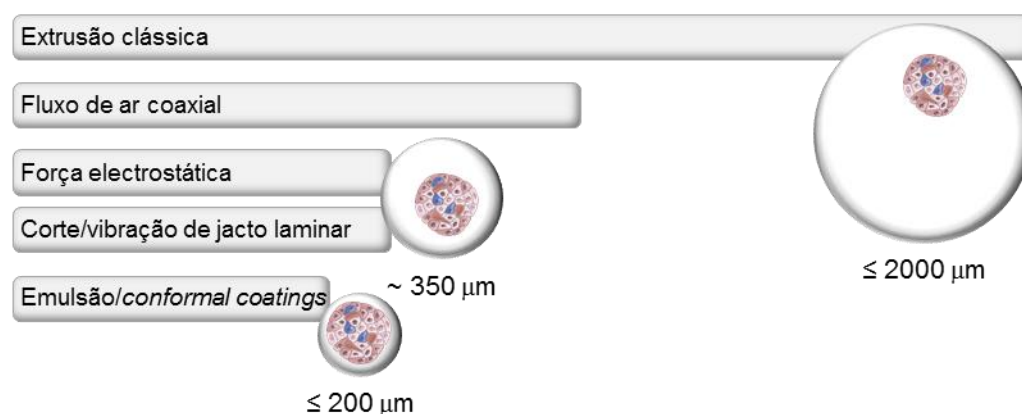


Figura 5: Tecnologias usadas para o encapsulamento de ilhéus em hidrogéis de alginato e tamanhos médios obtidos.

4. Limitações e obstáculos da aplicação do pâncreas bio-artificial

Reportados em ensaios com modelos animais e em humanos, são vários os factores que comprometem a viabilidade dos ilhéus encapsulados, tais como a deficiente biocompatibilidade e instabilidade dos materiais, a imunoprotecção limitada e a hipóxia, grandemente interligados por um acontecimento comum, a resposta imunitária [18, 56, 57]. Embora os estudos publicados mostrem a funcionalidade desta metodologia por longos períodos de tempo, uma vez que as células encapsuladas são alvo de agentes e condições nefastas que podem levar à sua morte, o número necessário de ilhéus para que o implante mantenha a sua funcionalidade é muito elevado que, como referido anteriormente, é uma das limitações desta metodologia [1, 38]. Algumas reacções imediatas causam a morte a uma percentagem de células e, pela acção de factores que prejudicam a viabilidade celular com o decorrer do tempo, outras vão-se perdendo e assim a falência do implante torna-se inevitável [18, 38, 56].

4.1 Resposta imunitária

A resposta imunitária, desencadeada por vários factores como a cirurgia, a resposta a um corpo estranho e ainda por mediadores libertados pelas células encapsuladas, está representada na Figura 6.

4.1.1 Cirurgia

O sistema imunitário do hospedeiro começa por ser activado pela cirurgia que, por menos invasiva que seja, activa a imunidade inata pelo trauma (Figura 6). Proteínas como o fibrinogénio, a trombina, a histamina e a fibronectina são libertadas nos tecidos danificados e graças à sua quimiotaxia, recrutam células inflamatórias, maioritariamente macrófagos e neutrófilos [1, 16, 38]. Estas células activadas levam à libertação de mediadores inflamatórios como a interleucina 1 beta (IL-1 β), o óxido nítrico (NO) e o factor de necrose tumoral alfa (TNF- α) que, para além de manterem o ambiente inflamatório num ciclo vicioso, pela sua pequena dimensão, atravessam livremente a membrana que rodeia as células e exercem os seus efeitos nefastos nas mesmas [16, 23, 25, 38].

4.1.2 Deficiente biocompatibilidade e instabilidade dos materiais

A reacção imune à introdução de um corpo estranho é normal (Figura 6), mas esta pode ser exacerbada se o organismo estiver na presença de matérias com deficiente

biocompatibilidade, levando ao crescimento fibrótico severo em torno do implante, responsável pela morte das células encapsuladas, maioritariamente por necrose [23, 38]. No encapsulamento com alginato, a biocompatibilidade do implante depende grandemente da composição do alginato, da sua pureza e da integridade dos hidrogéis [23, 38]. É necessário garantir que o polímero está livre de contaminações com metais pesados, polifenóis, proteínas e endotoxinas. Processos de purificação do alginato têm contribuído grandemente para o sucesso dos implantes [58]. Com alginatos ultrapuros não se observa a adsorção inespecífica de proteínas, a adesão celular e o crescimento de fibroblastos, mas apenas um aumento temporário de macrófagos e granulócitos, característicos da activação da resposta imunitária [58].

A constituição química, influente nas características dos hidrogéis formados, é também muito importante na sua imunogenicidade. Alginatos com elevado conteúdo de resíduos M (> 90%) estimulam uma resposta imunitária mais severa. *In vitro*, demonstrou-se que estimula os monócitos [59] e *in vivo*, identificaram-se anticorpos anti-alginato [60].

Por fim, a forma e a integridade das microsferas influenciam a resposta do organismo ao material. Encapsulamentos inadequados geram protuberâncias capazes de recrutar uma resposta imune e cápsulas com uma superfície rugosa também levam a um aumento da resposta inflamatória dos tecidos [61]. A perda gradual da estabilidade e integridade dos hidrogéis ao longo do tempo aumenta a interacção células-hospedeiro e a resposta daí subjacente. A estabilidade das microsferas de alginato depende da sua interacção com os iões de cálcio e, quando presente, do complexo poli-electrolítico formado pela interacção com polímeros policatiónicos. Em condições fisiológicas, os iões de cálcio podem ser trocados pelos de sódio, diminuindo a reticulação das cadeias e causando alterações osmóticas que levam ao *swelling* e destabilização das microcápsulas [62]. No entanto, a literatura reporta a sua estabilidade em pequenos roedores, animais de maiores dimensões e em humanos, durante anos [63].

As questões acima descritas abordam maioritariamente a biocompatibilidade na interacção com o hospedeiro, no entanto, a biocompatibilidade destes sistemas também se prende com a interacção do hidrogel com as células encapsuladas. Neste aspecto, este polímero demonstra não interferir com a função das células encapsuladas e, através da formação de hidrogéis tridimensionais, traz vantagens na sua função [37, 38]. Métodos que aumentam a interacção das células com o material, mimetizando a sua interacção com a matriz celular, permitem uma biocompatibilidade ainda mais eficiente [64].

4.1.3 Células encapsuladas

A libertação de mediadores inflamatórios pelos ilhéus encapsulados, que sofreram o *stress* do isolamento e encapsulamento, contribui também para o ambiente inflamatório do local e para o desencadeamento de uma resposta imunitária adaptativa (Figura 6). Desta forma e uma vez mais, mediadores inflamatórios de baixo peso molecular como a IL-1 β , o TNF- α e a proteína quimiotáctica de monócitos-1 (MCP-1), atravessam livremente a membrana, levando ao recrutamento e activação de células do sistema imunitário, mantendo o ciclo vicioso de ambiente inflamatório [1, 25, 38]. Por outro lado, pequenos antígenos são libertados pelas células encapsuladas e captados pelas células apresentadoras de antígenos, induzindo uma resposta adaptativa celular e humoral [16, 23, 65].

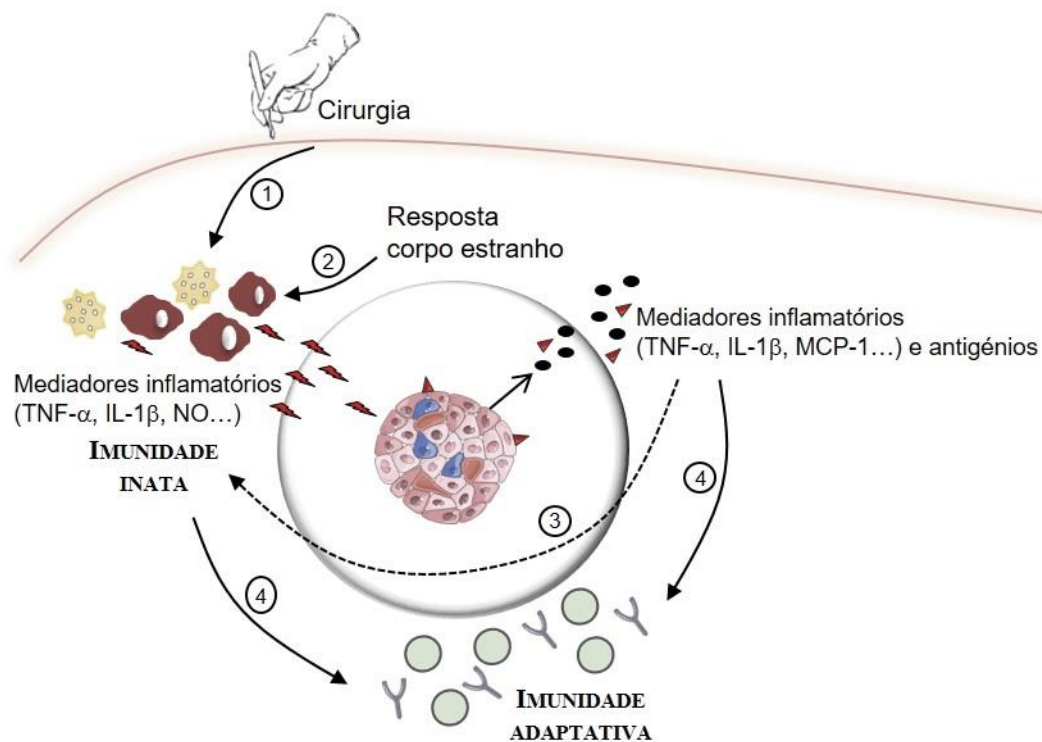


Figura 6: Representação esquemática da resposta imunitária ao implante de ilhéus micro-encapsulados. A cirurgia (1) e a introdução de um corpo estranho (2) levam à activação da imunidade inata com recrutamento maioritariamente de macrófagos e neutrófilos. A libertação de mediadores inflamatórios das células encapsuladas (3) contribui para um ciclo vicioso de inflamação nas redondezas do implante. Este ambiente, juntamente com a libertação de antígenos das células encapsuladas (4) levam à activação da imunidade adaptativa celular e humoral.

TNF- α - factor de necrose tumoral alfa; IL-1 β - interleucina 1 beta; MCP-1 - proteína quimiotáctica de monócitos-1; NO - óxido nítrico.

4.2 Imunoprotecção limitada

Neste ambiente inflamatório, as células encapsuladas mantêm-se protegidas do ataque dos anticorpos e células do sistema imunitário, pois estas entidades de elevado peso molecular/tamanho não conseguem atravessar a membrana imuno-isoladora [1]. No entanto, as células encapsuladas estão vulneráveis à acção de citocinas pró-inflamatórias já referidas e de espécies reactivas de oxigénio (ROS) que, por terem um peso molecular baixo, atravessam livremente a membrana e exercem efeitos deletérios nas células encapsuladas, causando citotoxicidade [1, 25, 38] (Figura 6). Membranas com poros que permitam a livre passagem da insulina, dificilmente poderão impedir a passagem destas entidades [1, 38]. Desta forma, outras estratégias são essenciais para permitir uma imunoprotecção adequada das células encapsulas.

4.3 Hipóxia

A baixa concentração de oxigénio a que os ilhéus encapsulados são sujeitos pode dever-se a diferentes factores como o tamanho das cápsulas, o local de implante e ainda a resposta imunitária decorrente [1, 25, 65].

A facilidade de acesso ao oxigénio é inversamente proporcional ao tamanho das cápsulas, razão pela qual é crucial desenvolver metodologias que reduzam o seu tamanho. Cápsulas maiores dificultam a chegada de oxigénio às células encapsuladas, bem como o acesso aos nutrientes e glicose e, pelo mesmo motivo, a secreção de insulina também sofre um atraso [1, 21].

A escolha do local de implante também é fundamental para a eficaz irrigação dos ilhéus, garantindo o sucesso do implante. Sem acesso directo à rede vascular, pela destruição da rede de microvasos durante o seu isolamento e pela presença da matriz polimérica após encapsulamento, o implante dos ilhéus deve privilegiar um local com uma boa irrigação [16]. Assim, diferentes locais influenciam o grau de hipóxia a que as células são sujeitas. A dificuldade passa por encontrar um local que albergue o número de ilhéus encapsulados necessários para o sucesso do implante e que, ao mesmo tempo, tenha uma rede vascular apropriada. A cavidade intraperitoneal é usualmente o local mais usado pelo espaço que dispõe, embora relatos de agregação das esferas, fibrose e hipóxia têm sido enumerados [1, 25]. A combinação da redução do tamanho das partículas para a exploração de novos locais e de estratégias de vascularização dos locais de implante trarão vantagens na redução da hipóxia e melhoria da função celular [1].

Por fim, a hipóxia também decorre das respostas inflamatórias severas e crónicas, que levam ao recrutamento de macrófagos e outras células do sistema imunitário, que

culminam em crescimento fibrótico não acompanhado pela formação de novos vasos. Desta forma, as células são privadas de oxigénio e nutrientes levando à sua morte por necrose [56].

5. Em busca de soluções

Clarificados os principais factores implicados na perda progressiva das células insulares que conduzem à falência do pâncreas bio-artificial, os últimos avanços na investigação científica pretendem encontrar soluções apropriadas para estes problemas. A Figura 7 representa as estratégias que poderão solucionar as limitações reportadas nesta metodologia, melhorando a viabilidade das células encapsuladas e consequentemente a função do implante.

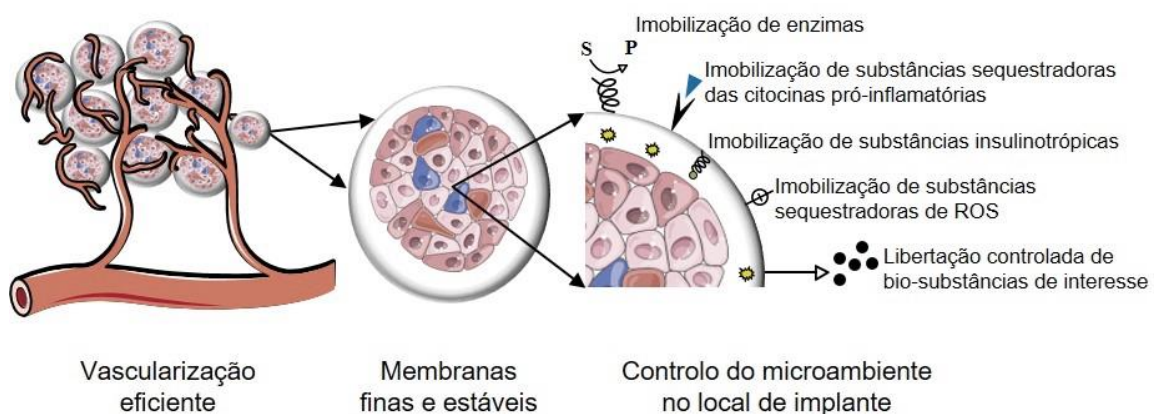


Figura 7: Estratégias fundamentais para a melhoria da funcionalidade do implante do pâncreas bio-artificial.
ROS - espécies reactivas de oxigénio.

5.1 Melhoria da estabilidade dos hidrogéis

Um dos desafios físico-químicos associados ao micro-encapsulamento é a estabilidade das cápsulas ao longo do tempo. Como abordado na secção 4.1.2, a estabilidade das microcápsulas de alginato depende das interacções do polímero com os iões de cálcio e, quando presente, com os polycatiões do complexo poli-electrolítico. Nos fluidos biológicos, os iões de cálcio podem ser trocados pelos de sódio, diminuindo a reticulação das cadeias, causando a destabilização das microcápsulas [37, 62]. Diferentes catiões já

foram testados na gelificação ionotrópica do alginato, assim como diferentes poli-electrólitos na tentativa aumentar a força da interacção entre estas entidades [23].

O recurso a métodos de *layer-by-layer*, baseados em poli-electrólitos como o poliestireno sulfonato/hidrocloreto de polialilamina (PSS/PAH), foram testados pela deposição deste poli-electrólito em membranas de alginato-PLO [51]. Este estudo demonstrou um aumento da resistência das microcápsulas à tensão causada pela proliferação das células beta MIN6 e teve um efeito mínimo na secreção e difusão da insulina [51].

Acrescentar ligações covalentes estáveis no hidrogel é uma estratégia que permite colmatar a fragilidade das interacções electrostáticas usuais e, assim, aumentar a integridade dos sistemas [62]. Exemplos como a estabilização covalente dos hidrogéis de alginato através de ligações *Staudinger* proposta por Gattás-Asfura et al. descreve a modificação do alginato e a sua posterior ligação a reticulantes de base PEG, aumentando a estabilidade do sistema sem comprometer a viabilidade de células beta e ilhéus [66]. Noutro estudo, o alginato mantém-se intacto e cria-se uma rede de alginato interpenetrado com o polímero de polietilenoglicol diacrilato (PEGDA) [53]. Desta forma, para além das interacções iónicas do alginato com o cálcio, através da fotopolimerização formam-se ligações carbono-carbono resultantes da presença de PEGDA, melhorando a estabilidade deste sistema, que demonstrou manter a viabilidade e capacidade de secreção de insulina dos ilhéus encapsulados [53].

5.2 Diminuição do tamanho dos dispositivos

Como abordado nas secções anteriores, a diminuição do tamanho trará vantagem para as células encapsuladas, melhorando o acesso ao oxigénio e nutrientes e melhorando a resposta secretora das células. Por outro lado, um menor volume a implantar permitirá explorar novos locais de implante que não a cavidade peritoneal, que possam apresentar características mais vantajosas para a sobrevivência celular [1].

As metodologias que permitem diminuir as gotículas de alginato para gelificação externa diminuem o tamanho dos hidrogéis, mas incorrem no risco de encapsulamentos ineficientes [23]. O método de emulsão parece colmatar esse risco, formando finas membranas de alginato a rodear os ilhéus que podem depois interagir com policatiões, formando poli-electrólitos [49]. Com o desenvolvimento dos *conformal coatings*, a espessura final das membranas pode ser reduzida a apenas 30 μm por processos de precipitação interfacial [23, 50], polimerização interfacial [67], *layer-by-layer* por deposição de poli-electrólito [28, 29], interacção hidrofóbica [29, 30] ou reacção química [31] à superfície das células e ainda *conformal coatings* com células vivas [32]. Nestas metodologias, recorre-se maioritariamente a polímeros sintéticos como o PSS, o PAH e a

PEI para as interações electrostáticas, PEG-lípido e PVA-alquilo para a interacção hidrofóbica na membrana das células a encapsular e PEG-NHS (PEG com éster de *N*-hidróxido succinimida) para a reacção covalente com grupos amina na superfície celular [21]. Apesar de apresentarem a vantagem de restringir o tamanho do implante ao tamanho do material a encapsular, estes métodos necessitam de aperfeiçoamento pois demonstram uma estabilidade e suporte mecânico limitados [1, 21].

5.3 Funcionalização com bio-substâncias

As funcionalizações dos hidrogéis podem dizer respeito à introdução de grupos químicos de interesse, modulando propriedades físicas ou químicas ou ainda à introdução de determinadas substâncias bio-activas, criando assim propriedades biológicas ou farmacológicas de interesse [1] (Figura 7).

A melhoria da biocompatibilidade, essencial para a função do implante, pode ser alcançada pela imobilização nos hidrogéis (por encapsulamento ou pelo seu enxerto covalente no polímero) de proteínas da matriz extracelular ou pequenos péptidos presentes nas proteínas da matriz, promovendo assim a interacção das células encapsuladas com estes componentes [16, 62]. Mimetizar o nicho celular tridimensional *in vivo*, privilegiando a interacção das células com a matriz extracelular, é crucial para a sua sobrevivência e função [68]. A modificação dos hidrogéis com o péptido Arginina-Glicina-Aspartato (RGD), presente nos componentes da matriz extracelular, é a metodologia mais usada para promover essa interacção [69].

A funcionalização dos hidrogéis também permite, através da adição de bio-sustâncias, dotá-los de capacidade protectora, evitando a perda das células encapsuladas, e ainda melhorar a função das mesmas por introdução de compostos farmacológicos [1]. No campo do transplante de ilhéus/células beta, exemplos de funcionalizações estão apresentados na Tabela 3 que, uma vez mais, são aplicados maioritariamente a polímeros sintéticos.

Devido ao aprisionamento directamente nos hidrogéis e ao desenvolvimento de sistemas de libertação controlada de fármacos, a administração sistémica de alguns fármacos deixou de ser uma opção no transplante de ilhéus encapsulados pois estes métodos permitem que a acção das substâncias de interesse se restrinja ao local de implante [1, 16]. Desta forma, é possível controlar localmente o microambiente do implante, através da imuno-modulação e a facilitação de requisitos celulares importantes para manter a funcionalidade celular, traduzindo-se assim no sucesso do implante. Estas estratégias podem também permitir a redução do número de células necessárias para a viabilidade do implante e ainda o envolvimento de outras fontes de células.

Tabela 3: Funcionalizações com substâncias bio-ativas para o desenvolvimento do pâncreas bio-artificial

Actividade biológica	Bio-substância	Polímero funcionalizado	Ref.
Anticoagulante/ Fibrinolítica/ Inibitória do sistema complemento		PEG	[70]
	Urocinase	PVA	[71]
	Urocinase e heparina	PEG	[72]
	Trombomodulina	PEG	[73]
	Urocinase e trombomodulina	PEG	[74]
	CR1 e heparin	PEG	[75]
Anti-inflamatória	CR1	Agarose	[76]
	Péptido anti-IL-1	PEG	[77]
	Péptido anti-TNF- α	PEGDA	[78]
Anti-oxidante	SOD	PEGDA	[79]
Pró-apoptótica	Anticorpo monoclonal anti-Fas	PEGDA	[80]
Insulinotrópica	GLP-1	PEGDA	[81]
Pró-angionénica	VEGF	Alginate	[82]

CR1 - receptor 1 do complemento; IL-1 - interleucina 1; TNF- α - factor de necrose tumoral alfa; SOD - superóxido dismutase; VEGF - factor de crescimento endotelial vascular; GLP-1 - *glucagon-like peptide-1*; PEG - polietilenoglicol; PVA - álcool polivinílico; PEGDA - polietilenoglicol diacrilato

5.4 Vascularização

Como descrito na secção 4.3, quando o local de implante não fornece a rede vascular necessária para o suprimento de oxigénio e nutrientes aos ilhéus encapsulados, os processos de necrose são frequentes [16]. Uma solução pode passar pela pré-vascularização do local de implante antes do transplante ou ainda promover a

vascularização juntamente com o transplante [1, 16]. Para tal, diferentes sistemas de libertação controlada permitem a libertação de substâncias angiogénicas, como é o caso do factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) [1]. O transplante de ilhéus para locais pré-vascularizados já mostrou uma melhoria na sobrevivência dos mesmos [83, 84]. Um estudo recente demonstra que, também através da funcionalização do alginato, recorrendo à química das carbodiimidas, é possível introduzir o VEGF no hidrogel, promovendo a angiogénese no transplante de ilhéus de ratinho encapsulados [82].

5.5. Novas fontes celulares

Uma das limitações da terapia celular para o tratamento da diabetes é a escassez de dadores alogénicos de ilhéus, impulsionando assim o estudo de fontes de células xenogénicas [22, 26]. Relativamente a outras espécies, o uso de ilhéus de porco mostraram-se favoráveis, pois estes são morfológicamente idênticos aos ilhéus humanos e a insulina de porco e humana possuem uma grande homologia [22, 85]. No entanto, transplantes xenogénicos acarretam o risco de infeções virais ou por príões e induzem uma resposta inflamatória mais agressiva que, na ausência de barreiras que permitam uma imunoprotecção eficiente, podem levar à falência do implante [85, 86].

A possibilidade de usar fontes alogénicas ou autogénicas surge com o desenvolvimento e recurso a linhas de células beta imortalizadas, com a reprogramação das células exócrinas em células produtoras de insulina e, ainda, a possibilidade de diferenciar as células estaminais em células beta funcionais [22, 26, 87].

No campo das linhas imortalizadas, Ravassard et al. descreveram um processo que permite a criação de uma linha de células beta humanas, as EndoC- β H1, que evidenciaram uma resposta secretora adequada aos níveis de glicose [88].

O tecido exócrino pancreático, descartado no isolamento dos ilhéus, pode ser também uma fonte de células beta, obtidas do mesmo dador [89]. Através da reprogramação das células acinares, pela introdução de vectores que induzem a expressão de factores de transcrição pancreáticos, é possível reprogramar e diferenciar estas células em células beta produtoras de insulina [89, 90].

Relativamente às células estaminais, as embrionárias, sendo células pluripotentes, podem dar origem a qualquer tipo de célula. Sendo auto-renováveis, apresentam uma fonte inesgotável de células que se podem diferenciar, através de processos complexos na presença da combinação de factores de crescimento e outros mediadores, em células beta [91]. A complexidade deste processo levou a que, depois de obtidas as células progenitoras endócrinas, estas sejam implantadas e sofram a sua maturação *in vivo* [92].

Com as células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs), surge a possibilidade de reprogramar células adultas, permitindo assim o uso das células do próprio doente o que facilita a transplantação por se tratar de um implante autólogo [93]. Uma vez mais, através da expressão de determinados genes, é possível converter as células adultas em células pluripotentes semelhantes às células estaminais embrionárias e reprogramá-las para a sua diferenciação em células beta [94].

A criação de células beta funcionais, com uma secreção apropriada de insulina é um processo muito complicado e, apesar da intensa investigação nos últimos anos, alguns métodos falham nesse objectivo [22]. O risco de mutagénese e a toxicidade viral aquando do uso de vectores virais, são problemas que podem limitar estes métodos de engenharia celular [26]. Por outro lado, as células beta individualizadas carecem da interacção com os outros tipos de células presentes nos ilhéus e que já mostraram ser importantes na complexa regulação da síntese de insulina [22]. Para colmatar a menor funcionalidade das células beta individualizadas, a criação de esferóides também apelidados de pseudo-ilhéus, favorecendo o contacto célula-célula, já mostrou conduzir a uma viabilidade e função secretora melhorada das células beta nesta conformação [95, 96].

O contributo de outros tipos celulares recorrendo ao co-transplante pode, através do seu secretoma, ajudar na protecção das células beta encapsuladas e na melhoria da sua função [1]. Células estaminais mesenquimais (MSCs) [97], mesenquimais adiposas (AMSCs) [98] e mesenquimais da medula óssea (BM-MSCs) [98], células da endoderme renal (HEK 293) [99] e células de Sertoli [100] são exemplos já testados no transplante de ilhéus.

6. Ensaio clínico

O primeiro ensaio clínico levado a cabo nesta área data de 1994 [101]. Soon-Shiong et al. reportam um transplante de ilhéus humanos encapsulados num doente com diabetes tipo 1 imunodeprimido pelo implante de um rim. Um total de 15000 IEQ/kg foram encapsulados em alginato-PLL e implantados na cavidade peritoneal. A insulino-independência foi mantida durante 9 meses após o implante [101]. Este resultado promissor veio confirmar a possibilidade do uso de ilhéus encapsulados para atingir um bom controlo glicémico em doentes com diabetes tipo 1, semelhante aos resultados obtidos com a infusão dos ilhéus não encapsulados através da veia porta. Desmistificado o uso de polímeros para o encapsulamento de ilhéus num ensaio clínico, seguraram-se vários ensaios em humanos recorrendo a diferentes tipos de pâncreas bio-artificial (Tabela 4). O micro-

encapsulamento em hidrogéis de base alginato é o método mais usado, e o implante ocorre maioritariamente na cavidade peritoneal [33, 102]. Fontes alogénicas e xenogénicas já foram testadas neste procedimento [22, 33, 102].

A empresa *Living Cell Technologies* tem demonstrado uma forte aposta no campo dos xenotransplantes, descrevendo o encapsulamento de ilhéus de porco em microcápsulas de alginato-PLO para o implante na cavidade peritoneal [103]. O seu *site* indica o começo de ensaios clínicos fase 2b/3 em 30 pacientes no ano de 2013, tendo como previsão a disponibilidade comercial desta metodologia em 2016 [104].

Numa consulta ao *site clinicaltrials.gov*, constata-se que, actualmente, estão em fase de recrutamento de participantes, três novas metodologias para alotransplante [105].

Tabela 4: Ensaios clínicos de transplante de pâncreas bio-artificial

Investigadores/ Empresas	Tipos	Fontes de Ilhéus	Locais do implante
Soon-Shiong et al. [101]	Microcápsulas de alginato-PLL	Alogénico	Cavidade peritoneal
Scharp et al. [106]	Câmaras de difusão de PAN-PVC	Alogénico	Espaço subcutâneo
Calafiore et al. [107]	Microcápsulas de alginato-PLO	Alogénico	Cavidade peritoneal
Tuch et al. [108]	Microsfemas Alginato-Ba ²⁺	Alogénico	Cavidade peritoneal
Amcyte, Inc.	Microcápsulas alginato-PLL	Alogénico	Cavidade peritoneal
Novocell, Inc.	PEG <i>conformal coating</i>	Alogénico	Cavidade peritoneal
Living Cell Technologies	Microcápsulas alginato-PLO	Xenogénico (porco)	Cavidade peritoneal
Jacobs-Tulleneers-Thevissen et al. [109]	Microsfemas de alginato-Ca ²⁺ /Ba ²⁺	Alogénico	Cavidade peritoneal
Sernova Corp.	Macroscápsulas <i>Cell Pouch System</i>	Alogénico	Espaço subcutâneo

PLL- poli-L-lisina; PAN - poliacrilonitrila; PVC - policloreto de polivinila; PLO - poli-L-ornitina; Ba²⁺ - catião bário; PEG - polietilenoglicol; Ca²⁺ - catião cálcio

7. Referências bibliográficas

1. Crisóstomo J, Coelho J, Seíça R (2013) Bioartificial Pancreas: In the Road to Clinical Application. In: Coelho J (ed) Drug Deliv. Syst. Adv. Technol. Potentially Apl. Pers. Treat. Springer, pp 127–151
2. American Diabetes Association (2004) Diagnosis and Classification Of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 27:s5–s10. doi: 10.2337/diacare.27.2007.S5
3. Wild S, Roglic G, Green A, et al. (2004) Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047–1053. doi: 10.2337/diacare.27.5.1047 *Diabetes Care* May 2004 vol. 27 no. 5 1047-1053
4. Scully T (2012) Diabetes in Numbers. *Nature* 485:S2–3.
5. Giacco F, Brownlee M (2010) Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 107:1058–1070.
6. Tran L, Zielinski A, Roach A, et al. (2015) Pharmacologic treatment of type 2 diabetes: oral medications. *Ann Pharmacother* 49:540–556.
7. Meier J (2016) Treatment of type 2 diabetes. *Internist (Berl)* 57:153–165. doi: 10.1007/s00108-015-0002-x
8. Ritzel R, Roussel R, Bolli G, et al. (2015) Patient-level meta-analysis of the EDITION 1, 2 and 3 studies: Glycaemic control and hypoglycaemia with new insulin glargine 300 U/ml versus glargine 100 U/ml in people with type 2 diabetes. *Diabetes, Obes Metab* 17:859–867. doi: 10.1111/dom.12485
9. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G (2010) Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 464:1293–1300.
10. Cryer PE (2010) Hypoglycemia in type 1 diabetes mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am* 39:641–654. doi: 10.1016/j.ecl.2010.05.003
11. Kelly W, Lillehei R, Merkel F, et al. (1967) Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery* 61:827–837.
12. Marquet R, Heystek G (1975) The effect of immunosuppressive treatment on the survival of allogeneic islets of Langerhans in rats. *Transplantation* 20:428–431.
13. Gruessner AC (2011) 2011 Update on pancreas transplantation: Comprehensive trend analysis of 25,000 cases followed up over the course of twenty-four years at the international pancreas Transplant Registry (IPTR). *Rev Diabet Stud* 8:6–16. doi: 10.1900/RDS.2011
14. Shapiro A, Lakey J, Ryan E, et al. (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *New Engl Journal Med* 343:230–238.
15. Alejandro R, Barton F, Hering B, et al. (2008) 2008 Update from the Collaborative Islet Transplant Registry. *Transplantation* 86:1783–1788.
16. Gibly RF, Graham JG, Luo X, et al. (2011) Advancing islet transplantation: From engraftment to the immune response. *Diabetologia* 54:2494–2505. doi: 10.1007/s00125-011-2243-0
17. Penn I (2000) Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression. *Drug Saf*

- 23:101–113.
18. Vaithilingam V, Tuch BE (2011) Islet transplantation and encapsulation: An update on recent developments. *Rev Diabet Stud* 8:51–67. doi: 10.1900/RDS.2011.8.51
 19. Chick W, Like A, Lauris V (1975) Beta cell culture on synthetic capillaries: an artificial endocrine pancreas. *Science* (80-) 187:847–849. doi: 10.1126/science.187.4179.847
 20. Lim F, Sun A (1980) Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* (80-) 210:908–910.
 21. Teramura Y, Iwata H (2010) Bioartificial pancreas. Microencapsulation and conformal coating of islet of Langerhans. *Adv Drug Deliv Rev* 62:827–840. doi: 10.1016/j.addr.2010.01.005
 22. Iacovacci V, Ricotti L, Menciassi A, Dario P (2016) The bioartificial pancreas (BAP): Biological, chemical and engineering challenges. *Biochem Pharmacol* 100:12–27. doi: 10.1016/j.bcp.2015.08.107
 23. Leung A, Nielsen LK, Trau M, Timmins NE (2010) Tissue transplantation by stealth-Coherent alginate microcapsules for immunoisolation. *Biochem Eng J* 48:337–347. doi: 10.1016/j.bej.2009.10.007
 24. Nafea EH, Poole-Warren AMLA, Martens PJ (2011) Immunisolating semi-permeable membranes for cell encapsulation: Focus on hydrogels. *J Control Release* 154:110–122. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.04.022
 25. Wilson JT, Chaikof EL (2008) Challenges and emerging technologies in the immunoisolation of cells and tissues. *Adv Drug Deliv Rev* 60:124–145. doi: 10.1016/j.addr.2007.08.034
 26. Kepsutlu B, Nazli C, Bal T, Kizilel S (2014) Design of bioartificial pancreas with functional micro/nano-based encapsulation of islets. *Curr Pharm Biotechnol* 15:590–608. doi: 10.2174/1389201015666140915145709
 27. Desmangles A, Jordan O, Marquis-Weible F (2001) Interfacial photopolymerization of beta-cell clusters: approaches to reduce coating thickness using ionic and lipophilic dyes. *Biotechnol Bioeng* 72:634–641.
 28. Krol S, Del Guerra S, Grupillo M, et al. (2006) Multilayer nanoencapsulation. new approach for immune protection of human pancreatic islets. *Nano Lett* 6:1933–1939. doi: 10.1021/nl061049r
 29. Teramura Y, Kaneda Y, Iwata H (2007) Islet-encapsulation in ultra-thin layer-by-layer membranes of poly(vinyl alcohol) anchored to poly(ethylene glycol)-lipids in the cell membrane. *Biomaterials* 28:4818–4825. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.050
 30. Miura S, Teramura Y, Iwata H (2006) Encapsulation of islets with ultra-thin polyion complex membrane through poly(ethylene glycol)-phospholipids anchored to cell membrane. *Biomaterials* 27:5828–5835. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.07.039
 31. Yun Lee D, Hee Nam J, Byun Y (2007) Functional and histological evaluation of transplanted pancreatic islets immunoprotected by PEGylation and cyclosporine for 1 year. *Biomaterials* 28:1957–1966.
 32. Teramura Y, Iwata H (2009) Islet encapsulation with living cells for improvement of

- biocompatibility. *Biomaterials* 30:2270–2275. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.036
33. Qi M (2014) Transplantation of Encapsulated Pancreatic Islets as a Treatment for Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *Adv Med*. doi: 10.1155/2014/429710
 34. Souza YEDM de, Chaib E, Lacerda PG de, et al. (2011) Islet transplantation in rodents. Do encapsulated islets really work? *Arq Gastroenterol* 48:146–152.
 35. Desai TA, West T, Cohen M, et al. (2004) Nanoporous microsystems for islet cell replacement. *Adv Drug Deliv Rev* 56:1661–1673. doi: 10.1016/j.addr.2003.11.006
 36. Smith C, Kirk R, West T, et al. (2005) Diffusion Characteristics of Microfabricated Silicon Nanopore Membranes as Immunoisolation Membranes for Use in Cellular Therapeutics. *Diabetes Technol Ther* 7:151–162. doi: 10.1089/dia.2005.7.151
 37. Sun J, Tan H (2013) Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials (Basel)* 6:1285–1309. doi: 10.3390/ma6041285
 38. de Vos P, Faas MM, Strand B, Calafiore R (2006) Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials* 27:5603–5617. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.07.010
 39. Draget K, Smidsrød O, Skjåk-Bræk G (2005) Alginates from algae. *Biopolym Online*. doi: 10.1002/3527600035.bpol6008
 40. Paques JP, Van Der Linden E, Van Rijn CJM, Sagis LMC (2014) Preparation methods of alginate nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci* 209:163–171. doi: 10.1016/j.cis.2014.03.009
 41. Takka S, Gürel A (2010) Evaluation of chitosan/alginate beads using experimental design: formulation and in vitro characterization. *AAPS PharmSciTech* 11:460–466. doi: 10.1208/s12249-010-9406-z
 42. Yang HK, Ham D-S, Park H-S, et al. (2016) Long-term Efficacy and Biocompatibility of Encapsulated Islet Transplantation With Chitosan-Coated Alginate Capsules in Mice and Canine Models of Diabetes. *Transplantation* 100:334–343. doi: 10.1097/TP.0000000000000927
 43. Strand BL, Mørch YA, Espevik T, Skjåk-Braek G (2003) Visualization of alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules by confocal laser scanning microscopy. *Biotechnol Bioeng* 82:386–394. doi: 10.1002/bit.10577
 44. Tam SK, de Haan BJ, Faas MM, et al. (2009) Adsorption of human immunoglobulin to implantable alginate-poly-L-lysine microcapsules: Effect of microcapsule composition. *J Biomed Mater Res Part A* 89:609–615. doi: 10.1002/jbm.a.32002
 45. Darrabie MD, Kendall WF, Opara EC (2005) Characteristics of Poly-L-Ornithine-coated alginate microcapsules. *Biomaterials* 26:6846–6852. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.009
 46. Leung A, Lawrie G, Nielsen LK, Trau M (2008) Synthesis and characterization of alginate/poly-L-ornithine/alginate microcapsules for local immunosuppression. *J Microencapsul* 25:387–398. doi: 10.1080/02652040802008857
 47. Clayton H, London N, Colloby P, et al. (1991) The effect of capsule composition on the

- biocompatibility of alginate-poly-1-lysine capsules. *J Microencapsul Micro Nano Carriers* 8:221–233. doi: 10.3109/02652049109071490
48. De Vos P, De Haan B, Pater J, Van Schilfgaarde R (1996) Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation, and survival of microencapsulated rat islet allografts. *Transplantation* 62:893–899.
 49. Basta G, Osticioli L, Rossodivita M, et al. (1995) Method for fabrication of coherent microcapsules: a new, potential immunoisolatory barrier for pancreatic islet transplantation. *Diabetes Nutr Metab* 8:105–112.
 50. Zekorn T, Siebers U, Horcher A, et al. (1992) Alginate coating of islets of Langerhans: in vitro studies on a new method for microencapsulation for immuno-isolated transplantation. *Acta Diabetol* 29:41–45.
 51. Leung A, Trau M, Nielsen LK (2009) Assembly of multilayer PSS/PAH membrane on coherent alginate/PLO microcapsule for long-term graft transplantation. *J Biomed Mater Res Part A* 88A:226–237. doi: 10.1002/jbm.a.31891
 52. Ungerleider J (2012) Synthesis of Oxidized Alginate Microbeads. *The Spectra* 3:44–48.
 53. Desal NP, Sojomihardjo a, Yao Z, et al. (2000) Interpenetrating polymer networks of alginate and polyethylene glycol for encapsulation of islets of Langerhans. *J Microencapsul* 17:667–690. doi: 10.1080/02652040050161675
 54. Spasojevic M, Paredes-Juarez GA, Vorenkamp J, et al. (2014) Reduction of the inflammatory responses against alginate-poly-l-lysine microcapsules by anti-biofouling surfaces of PEG-b-PLL diblock copolymers. *PLoS One* 9:1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0109837
 55. Nabavimanesh MM, Hashemi-Najafabadi S, Vasheghani-Farahani E (2015) Islets immunoisolation using encapsulation and PEGylation, simultaneously, as a novel design. *J Biosci Bioeng* 119:486–491. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.09.023
 56. De Groot M, Schuurs TA, Van Schilfgaarde R (2004) Causes of limited survival of microencapsulated pancreatic islet grafts. *J Surg Res* 121:141–150. doi: 10.1016/j.jss.2004.02.018
 57. Weir G (2013) Islet encapsulation: Advances and obstacles. *Diabetologia* 56:1458–1461. doi: 10.1007/s00125-013-2921-1
 58. Langlois G, Dusseault J, Bilodeau S, et al. (2009) Direct effect of alginate purification on the survival of islets immobilized in alginate-based microcapsules. *Acta Biomater* 5:3433–3440. doi: 10.1016/j.actbio.2009.05.029
 59. Flo TH, Ryan L, Latz E, et al. (2002) Involvement of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in cell activation by mannuronic acid polymers. *J Biol Chem* 277:35489–35495. doi: 10.1074/jbc.M201366200
 60. Kulseng B, Skjåk-Braek G, Ryan L, et al. (1999) Transplantation of alginate microcapsules: generation of antibodies against alginates and encapsulated porcine islet-like cell clusters. *Transplantation* 67:978–984.
 61. Bunger C, Gerlach C, Freier T, et al. (2003) Biocompatibility and surface structure of

- chemically modified immunisolating alginate–PLL capsules. *J Biomed Mater Res A* 67:1219–1227.
62. Huang X, Zhang X, Wang X, et al. (2012) Microenvironment of alginate-based microcapsules for cell culture and tissue engineering. *J Biosci Bioeng* 114:1–8. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.02.024
 63. Soon-Shiong P (1999) Treatment of type I diabetes using encapsulated islets. *Adv Drug Deliv Rev* 35:259–270. doi: 10.1016/S0169-409X(98)00076-3
 64. Bidarra SJ, Barrias CC, Granja PL (2014) Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering. *Acta Biomater* 10:1646–1662. doi: 10.1016/j.actbio.2013.12.006
 65. Colton CK (2014) Oxygen supply to encapsulated therapeutic cells. *Adv Drug Deliv Rev* 67-68:93–110. doi: 10.1016/j.addr.2014.02.007
 66. Gattás-Asfura K, Fraker C, Stabler C (2011) Covalent stabilization of alginate hydrogel beads via Staudinger ligation: Assessment of poly(ethylene glycol) and alginate cross-linkers. *J Biomed Mater Res A* 99:47–57. doi: 10.1038/nature13314.A
 67. Cruise G, Hegre O, Scharp D, Hubbell J (1998) A sensitivity study of the key parameters in the interfacial photopolymerization of poly(ethylene glycol) diacrylate upon porcine islets. *Biotechnol Bioeng* 57:655–665.
 68. Rozario T, Desimone DW (2010) The Extracellular Matrix In Development and Morphogenesis: A Dynamic View. *Dev Biol* 341:126–140. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.10.026.The
 69. Ruoslahti E (1996) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:697–715. doi: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.697
 70. Takemoto N, Teramura Y, Iwata H (2011) Islet surface modification with urokinase through DNA hybridization. *Bioconjug Chem* 22:673–678. doi: 10.1021/bc100453r
 71. Totani T, Teramura Y, Iwata H (2008) Immobilization of urokinase on the islet surface by amphiphilic poly(vinyl alcohol) that carries alkyl side chains. *Biomaterials* 29:2878–2883. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.03.024
 72. Teramura Y, Iwata H (2008) Islets surface modification prevents blood-mediated inflammatory responses. *Bioconjug Chem* 19:1389–1395. doi: 10.1021/bc800064t
 73. Stabler CL, Sun XL, Cui W, et al. (2007) Surface re-engineering of pancreatic islets with recombinant azido-thrombomodulin. *Bioconjug Chem* 18:1713–1715. doi: 10.1021/bc7002814
 74. Chen H, Teramura Y, Iwata H (2011) Co-immobilization of urokinase and thrombomodulin on islet surfaces by poly(ethylene glycol)-conjugated phospholipid. *J Control Release* 150:229–234. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.11.011
 75. Luan NM, Teramura Y, Iwata H (2011) Layer-by-layer co-immobilization of soluble complement receptor 1 and heparin on islets. *Biomaterials* 32:6487–6492. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.048
 76. Luan NM, Iwata H (2012) Xenotransplantation of islets enclosed in agarose microcapsule carrying soluble complement receptor 1. *Biomaterials* 33:8075–8081. doi:

- 10.1016/j.biomaterials.2012.07.048
77. Su J, Hu BH, Lowe WLJ, et al. (2010) Anti-inflammatory peptide-functionalized hydrogels for insulin-secreting cell encapsulation. *Biomaterials* 31:308–314. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.045
 78. Lin CC, Metters AT, Anseth KS (2009) Functional PEG-peptide hydrogels to modulate local inflammation induced by the pro-inflammatory cytokine TNF α . *Biomaterials* 30:4907–4914. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.083
 79. Cheung CY, McCartney SJ, Anseth KS (2008) Synthesis of polymerizable superoxide dismutase mimetics to reduce reactive oxygen species damage in transplanted biomedical devices. *Adv Funct Mater* 18:3119–3126. doi: 10.1002/adfm.200800566
 80. Cheung CY, Anseth KS (2006) Synthesis of immunoisolation barriers that provide localized immunosuppression for encapsulated pancreatic islets. *Bioconj Chem* 17:1036–1042. doi: 10.1021/bc060023o
 81. Lin CC, Anseth KS (2009) Glucagon-like peptide-1 functionalized PEG hydrogels promote survival and function of encapsulated pancreatic beta-cells. *Biomacromolecules* 10:2460–2467. doi: 10.1021/bm900420f
 82. Yin N, Han Y, Xu H, et al. (2016) VEGF-conjugated alginate hydrogel prompt angiogenesis and improve pancreatic islet engraftment and function in type 1 diabetes. *Mater Sci Eng C, Mater Biol Appl* 59:958–964. doi: 10.1016/j.msec.2015.11.009
 83. Wenjing W, Yuanjun G, Tabata Y, et al. (2002) Reversal of diabetes in mice by xenotransplantation of a bioartificial pancreas in a prevascularized subcutaneous site. *73:122–129.*
 84. Balamurugan A, Gu Y, Tabata Y, et al. (2003) Bioartificial pancreas transplantation at prevascularized intermuscular space: effect of angiogenesis induction on islet survival. *Pancreas* 26:279–285.
 85. Thanos C, Elliott R (2009) Encapsulated porcine islet transplantation: an evolving therapy for the treatment of type I diabetes. *Expert Opin Biol Ther* 9:29–44. doi: 10.1517/14712590802630666
 86. Kumar Ganesh, Tuch BE, Deng YM, Rawlinson WD (2002) Limiting potential infectious risks of transplanting insulin-producing pig cells into humans. *Pathology* 34:178–184. doi: 10.1080/003130201201118007
 87. Orlando G, Gianello P, Salvatori M, et al. (2014) Cell replacement strategies aimed at reconstitution of the beta-cell compartment in type 1 diabetes. *Diabetes* 63:1433–1444. doi: 10.2337/db13-1742
 88. Weir GC, Bonner-Weir S (2011) Finally! A human pancreatic β cell line. *Journal Clin Investig* 121:3395–3397. doi: 10.1172/JCI58899
 89. Lee J, Sugiyama T, Liu Y, et al. (2013) Expansion and conversion of human pancreatic ductal cells into insulin-secreting endocrine cells. *Elife*. doi: 10.7554/eLife.00940
 90. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, et al. (2008) In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature* 455:627–632. doi: 10.1038/nature07314

91. Schulz TC, Young HY, Agulnick AD, et al. (2012) A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0037004
92. Kirk K, Hao E, Lahmy R, Itkin-Ansari P (2014) Human embryonic stem cell derived islet progenitors mature inside an encapsulation device without evidence of increased biomass or cell escape. *Stem Cell Res* 12:807–814. doi: 10.1016/j.scr.2014.03.003
93. Wu SM, Hochedlinger K (2011) Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat Cell Biol* 13:497–505. doi: 10.1038/ncb0511-497.Harnessing
94. Takeuchi H, Nakatsuji N, Suemori H (2014) Endodermal differentiation of human pluripotent stem cells to insulin-producing cells in 3D culture. *Sci Rep* 4:4488. doi: 10.1038/srep04488
95. Liu X, Li X, Zhang N, Wen X (2015) Engineering beta-cell spheroids for type 1 diabetes treatment. *Med Hypotheses* 85:82–84.
96. Chowdhury A, Dyachok O, Tengholm A, et al. (2013) Functional differences between aggregated and dispersed insulin-producing cells. *Diabetologia* 56:1557–1568.
97. Rackham C, Chagastelles P, Nardi N, et al. (2011) Co-transplantation of mesenchymal stem cells maintains islet organisation and morphology in mice. *Diabetologia* 54:1127–1135. doi: 10.1007/s00125-011-2053-4
98. Schubert T, Xhema D, VÉriter S, et al. (2011) The enhanced performance of bone allografts using osteogenic-differentiated adipose-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 32:8880–8891. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.009
99. Teramura Y, Minh LN, Kawamoto T, Iwata H (2010) Microencapsulation of islets with living cells using PolyDNA-PEG-lipid conjugate. *Bioconjug Chem* 21:792–796. doi: 10.1021/bc900494x
100. Dufour J, Lord S, Kin T, et al. (2008) Comparison of successful and unsuccessful islet/Sertoli cell cotransplant grafts in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant* 16:1029–1038.
101. Soon-Shiong P, Heintz R, Merideth N, et al. (1994) Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet* 343:950–951.
102. Calafiore R, Basta G (2014) Clinical application of microencapsulated islets: Actual perspectives on progress and challenges. *Adv Drug Deliv Rev* 67-68:84–92. doi: 10.1016/j.addr.2013.09.020
103. NIH ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=diabecell&Search=Search>.
104. DIABECCELL Clinical trials update. doi: 10.1097/00002820-200312001-00004
105. NIH ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=islet+encapsulation+&Search=Search>.
106. Scharp D, Swanson C, Olack B (1994) Protection of encapsulated human islets implanted without immunosuppression in patients with type I or type II diabetes and in non diabetic control subjects. *Diabetes* 43:1167–1170.
107. Calafiore R, Basta G, Luca G (2006) Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes: first two cases. *Diabetes Care*

- 29:137–138.
108. Tuch B, Keogh G, Williams J (2009) Safety and viability of microencapsulated human islets transplanted into diabetic humans. *Diabetes Care* 32:1887–1889.
 109. Jacobs-Tulleneers-Thevissen D, Chintinne M, Ling Z, et al. (2013) Sustained function of alginate-encapsulated human islet cell implants in the peritoneal cavity of mice leading to a pilot study in a type 1 diabetic patient. *Diabetologia* 56:1605–1614. doi: 10.1007/s00125-013-2906-0

CAPÍTULO 2

Motivações, objectivos e organização da tese

1. Motivações e objectivos do trabalho

Dadas as proporções epidémicas da diabetes bem como das comorbilidades decorrentes e o conseqüente custo elevado dos tratamentos, o desenvolvimento de terapias efectivas para esta patologia é urgente. A imunoprotecção de células produtoras de insulina (ilhéus ou células beta) pelo encapsulamento com biomateriais de base polimérica, e seu implante em doentes diabéticos, é uma metodologia promissora para o tratamento desta doença. O transplante celular restabelece a normoglicemia, enquanto o encapsulamento promove a imunoprotecção celular. Uma vez na prática clínica, esta metodologia poderá melhorar significativamente a qualidade de vida destes doentes.

Problemas como a deficiente biocompatibilidade e instabilidade físico-química dos materiais, a imunoprotecção limitada e a hipóxia celular continuam a limitar a introdução deste procedimento na prática clínica. Os desafios biológicos e físico-químicos na criação de um sistema óptimo que garanta a funcionalidade do implante têm sido alvo de intensa investigação nos últimos anos, e estão também na base do desenvolvimento deste trabalho.

Desta forma, os objectivos do presente trabalho prenderam-se maioritariamente com os desafios biológicos ou seja, com a criação, e validação *in vitro*, de duas estratégias que permitem melhorar a viabilidade e função das células beta encapsuladas em hidrogéis de alginato através de: i) criação de um ambiente 3D semelhante ao encontrado *in vivo*, favorecendo a interacção célula-célula e célula-matriz extracelular e ii) criação de um sistema de libertação de um agente insulínico, garantindo a sua actuação nas células beta encapsuladas. Após a validação *in vitro* do modelo 3D desenvolvido na estratégia i), e por o considerarmos como basilar para o encapsulamento celular, foi também objectivo deste trabalho a avaliação da sua eficácia no controlo glicémico de um modelo animal diabético. Apesar da literatura reportar apenas a aplicação desta metodologia a recipientes com diabetes tipo 1, quisemos avaliar a sua eficácia num modelo de diabetes tipo 2, pois julgamos que este tipo de intervenção possa também ser uma mais-valia para o tratamento deste tipo de diabetes em diferentes fases da doença. Pretendeu-se ainda com este implante, caracterizar o comportamento *in vivo* de células beta individualizadas de forma a usá-las, para além dos ilhéus, como uma possível fonte de células produtoras de insulina.

Foi também objectivo deste trabalho funcionalizar o alginato e ainda testar algumas metodologias para preparar os hidrogéis. Com a introdução de grupos químicos novos e de bio-substâncias de interesse nos hidrogéis, pretendemos, em ensaios futuros, melhorar o nosso modelo físico-quimicamente, pela redução do tamanho dos hidrogéis e

aumento da sua estabilidade e, biologicamente, dotando-os de actividade protectora anti-oxidante e anti-inflamatória.

Por fim, outro objectivo deste trabalho foi isolar ilhéus de Langerhans de rato, garantindo a sua viabilidade e função secretora. Pretendemos, em ensaios futuros, encapsular os ilhéus no modelo 3D desenvolvido, acreditando que estas estruturas altamente diferenciadas e adaptadas para a síntese de insulina possam ser vantajosas para o sucesso do implante.

2. Organização da tese

A presente tese está organizada em seis capítulos diferentes:

No CAPÍTULO 1 é apresentada uma introdução geral ao tema do pâncreas bio-artificial. Começando pelo enquadramento da doença alvo, a diabetes, e a introdução de alguns conceitos na área, a revisão bibliográfica foca-se no encapsulamento de células produtoras de insulina em hidrogéis de alginato para o tratamento desta doença.

No CAPÍTULO 2 são abordados os principais objectivos do trabalho desenvolvido bem como a sua organização e apresentação ao longo da tese, permitindo maior facilidade de leitura e compreensão da sequência do trabalho.

O CAPÍTULO 3 está dividido em duas secções onde são apresentadas duas estratégias que permitem a melhoria da viabilidade e da secreção das células beta insulino-produtoras INS-1E encapsuladas em hidrogéis de alginato. Na SECÇÃO 1, depois de encontrado o número ideal de células a encapsular, é avaliada a influência da presença do péptido da matriz extracelular - RGD, introduzido na cadeia de alginato pela química das carbodiimidas. Os resultados demonstraram a importância fundamental da interacção célula-matriz extracelular na melhoria da secreção de insulina. Na SECÇÃO 2, é descrito e avaliado um método inovador de co-encapsulamento das células beta INS-1E com nanopartículas de PLGA (poli(ácido láctico-co-glicólico)) contendo um agente insulino-trópico, o GLP-1 (*glucagon-like peptide 1*). A libertação desta incretina permitiu uma melhoria acentuada da secreção de insulina e o método usado mostra-se promissor para a libertação e acção, nas células alvo, deste e de outros agentes terapêuticos de interesse.

No CAPÍTULO 4, é avaliado o efeito do transplante de células beta INS-1E encapsuladas em hidrogéis de alginato funcionalizado com o péptido RGD num modelo animal diabético tipo 2. Depois dos resultados promissores que descrevemos, e uma vez que qualquer incremento efectuado ao nosso modelo 3D, partirá sempre da base de hidrogéis de alginato enriquecidos com péptidos da matriz, foi nosso objectivo caracterizar a resposta dos animais a este modelo. Os animais melhoraram o seu perfil glicémico, demonstrando a potencialidade deste tipo de metodologia na diabetes tipo 2.

No CAPÍTULO 5 são apresentados alguns resultados preliminares e estratégias para ensaios futuros, acreditando que trarão melhorias em aspectos físico-químicos e biológicos ao nosso modelo 3D. Na SECÇÃO 1 são descritas duas modificações químicas do alginato, originando alginato com grupos aldeído e alginato com grupos metacrilato.

São ainda testadas algumas metodologias para a preparação dos hidrogéis com base na gelificação ionotrópica do alginato e interacção com electrólitos. No futuro, pretendemos aprofundar os métodos abordados e testar nas células os propósitos das funcionalizações químicas que efectuámos e das funcionalizações biológicas que estamos agora em condições de efectuar. Na SECÇÃO 2, uma vez que se pretende testar o modelo 3D desenvolvido em ilhéus, é descrito o isolamento de ilhéus de Langerhans de rato. Após o estímulo com diferentes concentrações de glicose, os ilhéus isolados demonstram a manutenção da sua função secretora.

Por fim, no CAPÍTULO 6, é feita uma discussão final e tiradas as conclusões do trabalho desenvolvido e apresentado nos capítulos anteriores e ainda abordadas as perspectivas futuras do mesmo.

CAPÍTULO 3

Estratégias para melhorar a viabilidade e função das células beta encapsuladas: ensaios *in vitro* em modelos 3D de hidrogéis de alginato

SECÇÃO 1

**Encapsulamento de células beta INS-1E em hidrogéis
de alginato funcionalizado com o péptido RGD**

1. Introdução

Tecnologias emergentes, como o encapsulamento e transplantação de células produtoras de insulina, mostram-se promissoras para o tratamento da diabetes. Através da imunoproteção celular pelo encapsulamento, o uso de imunossuppressores é abolido e surge ainda a vantajosa possibilidade do recurso a outras fontes de células para além da mesma espécie, permitindo ultrapassar duas das maiores limitações desta metodologia. Outra limitação reportada prende-se com a sobrevivência das células encapsuladas, colocando em causa a funcionalidade do transplante [1].

No caso do uso de ilhéus de Langerhans, durante o seu isolamento, o microambiente é destruído pelos processos de digestão enzimática e mecânica. Ocorre a perda da rede vascular e a destruição da matriz extracelular, conduzindo à reduzida funcionalidade e sobrevivência celulares [2]. Um requisito fundamental para a sobrevivência celular, quer no caso de ilhéus da própria ou de outra espécie, ou ainda de células beta individualizadas isoladas a partir de ilhéus ou oriundas de diferentes processos de bioengenharia celular, é a criação de um nicho que mimetize a organização tridimensional encontrada no microambiente *in vivo* [3]. Garantir a interação célula-célula e célula-matriz extracelular é fundamental para a sobrevivência e funcionalidade das células beta [3–5].

Contrariamente ao que acontece com os ilhéus, quando se utilizam células individualizadas, a comunicação células-célula é definida maioritariamente pela densidade celular utilizada durante o encapsulamento, sendo a viabilidade celular geralmente favorecida para maiores densidades [4, 6, 7], embora esta seja variável entre diferentes tipos de células.

Os componentes da matriz extracelular já mostraram estar implicados em processos como diferenciação celular, migração, crescimento, função e sobrevivência [8]. Estudos anteriores demonstraram que a presença de colagénio I, colagénio IV, laminina e fibronectina levam a uma melhoria da viabilidade e da secreção de insulina, em células beta individualizadas e ilhéus de modelos animais e humanos [9–12]. Nikolova e seus colaboradores demonstraram que, contrariamente às células acinares, as células beta não são capazes de formar a sua membrana basal, a qual está presente apenas na cápsula que rodeia os ilhéus e na vizinhança das células endoteliais, estando ausente nas células beta desagregadas [9]. O mesmo estudo confirma que o tratamento com laminina melhora a função das células beta MIN6, mediada pelas integrinas [9]. Desta forma, as interações célula-matriz parecem ser essenciais para a sobrevivência e função das células produtoras de insulina, quer na forma de ilhéus, quer como células individualizadas. O incremento da função das células produtoras de insulina pela

interacção com constituintes da matriz extracelular já foi observado tanto em modelos 2D [12], como em diferentes modelos 3D de encapsulamento celular [5, 13, 14].

Com o encapsulamento celular em hidrogéis é possível a criação de uma rede 3D que se aproxima do microambiente encontrado *in vivo*, graças ao seu elevado conteúdo em água e grande permeabilidade, que favorece o transporte dos nutrientes e oxigénio. As propriedades mecânicas dos hidrogéis também se aproximam das da matriz extracelular natural [15, 16]. O alginato é o polímero mais usado para encapsulamento celular [17], o que está em grande parte relacionado com a sua capacidade de formar hidrogéis biocompatíveis, por um processo que não compromete a viabilidade celular, e também com a sua grande versatilidade química. Em particular, a funcionalização deste polímero natural com péptidos da matriz extracelular poderá trazer benefícios para as células encapsuladas [17].

O péptido Arginina-Glicina-Aspartato (RGD) é uma sequência encontrada em várias proteínas da matriz extracelular, tal como a fibronectina, as lamininas, o colagénio tipo I, a vitronectina e o fibrinogénio, entre outras [18]. Aproximadamente um terço da família dos receptores do tipo integrinas reconhecem o RGD [18].

A incubação deste péptido com ilhéus isolados de rato melhorou a resistência celular contra a apoptose [12]. O potencial do seu uso também já foi demonstrado em modelos 2D com superfícies tratadas com RGD [19–21]. Cultivadas nestas superfícies, observou-se a melhoria da secreção de insulina nas linhas de células beta de rato INS-1 [19], e ratinho MIN6 [20] e β -TC6 [21]. Nos seus estudos com as células β -TC6, Lee *et al.* acrescenta ainda que a presença de RGD favorece a formação de pseudo-ilhéus [21]. Em modelos 3D de hidrogéis de polietilenoglicol (PEG), o seu uso também melhorou a viabilidade das células MIN6 [22]. Curiosamente, num modelo 3D de alginato para encapsulamento de células beta, ainda não foi descrito o seu uso, apesar de todos os resultados positivos reportados para outros modelos.

Desta forma, no presente estudo, e com o objectivo de criar um modelo óptimo para o encapsulamento de células produtoras de insulina, construímos um modelo 3D de alginato modificado com RGD, recorrendo à química das carbodiimidas (Figura 1).

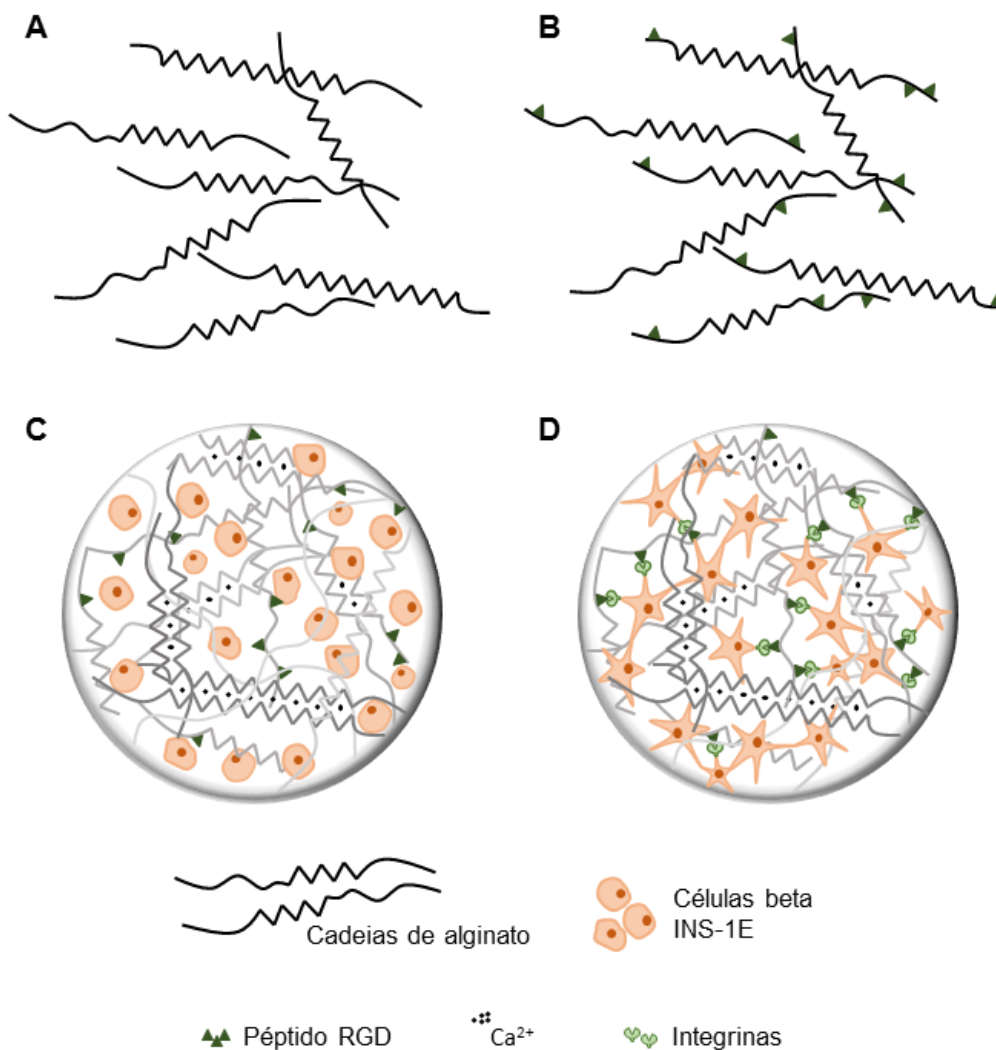


Figura 1: Representação esquemática do encapsulamento das células beta INS-1E em hidrogéis de alginato funcionalizado com o péptido de adesão RGD. (A) Cadeias de alginato solubilizadas; (B) alginato funcionalizado com o péptido RGD (Alg-RGD); (C) encapsulamento das células através da gelificação ionotrópica do Alg-RGD com os cátions de cálcio; (D) microambiente 3D composto pela interação célula-célula e interação célula-matriz extracelular, criada através da adesão mediada pelas integrinas ao RGD presente no hidrogel. Adaptado de [35].

Foram usadas as células beta INS-1E, derivadas de insulinoma de rato induzido por irradiação com raios X, reportadas pela primeira vez por Afari e seus colaboradores [23] e, após isolamento de uma linha clonal estável e homogénea, por Merglen e seus colaboradores [24]. Estas células apresentam importantes características tais como elevado conteúdo em insulina e capacidade de resposta às alterações fisiológicas da concentração de glicose, muito semelhante à de ilhéus de rato, enquanto mantêm a sua capacidade proliferativa [24].

Após o encapsulamento, a resposta celular foi avaliada ao longo de 7 dias em cultura. Foi dada especial atenção à capacidade de secreção da insulina e expressão de genes envolvidos nesta maquinaria, bem como à produção de componentes da matriz extracelular pelas células encapsuladas.

2. Material e métodos

2.1 Síntese e caracterização do alginato-RGD

O péptido de adesão G₄RGDSP (abreviado em RGD) (GenSript) foi ligado covalentemente à cadeia do alginato recorrendo à química das carbodiimidas, como descrito anteriormente [25]. Em meio aquoso, ocorre a formação de ligações entre os grupos terminais amina do péptido e os grupos carboxílico da cadeia do alginato, como esquematizado na Figura 2. O *N*-[3-(Dimetilamino)propil]-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) é usado para formar as ditas ligações e o *N*-hidróxido de sulfosuccinimida (sulfo-NHS) é usado como estabilizador do intermediário formado, evitando a sua hidrólise.

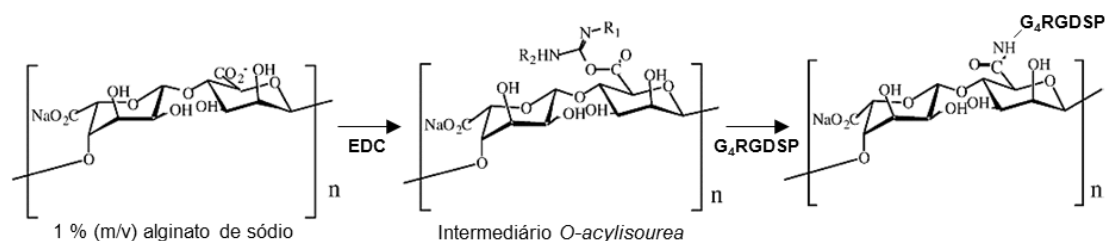


Figura 2: Esquema representativo da reacção de ligação do péptido RGD à cadeia de alginato pela química das carbodiimidas. Adaptado de [25].

Foi preparada uma solução de 1% (m/v) de alginato (*PRONOVA Ultrapure Sodium Alginate LVG*, NovaMatrix, FCM BioPolymer) em tampão MES (0,1 M MES, 0,3 M NaCl, pH 6,5) ficando protegida da luz, à temperatura ambiente e sob agitação durante a noite, para completa dissolução do alginato. Para 1 g de alginato, foram adicionados 27,40 mg de sulfo-NHS, 48,42 mg de EDC e 16,7 mg de péptido (dissolvido em MES), pela ordem mencionada, sob constante agitação. Após 20 horas de reacção, esta foi neutralizada pela adição de 18 mg de hidroxilamina. O produto foi colocado em membranas de diálise (*molecular weight cut-off* ~ 3500 Da) e purificado dos compostos que não reagiram por

diálise em água destilada, com concentrações decrescentes de NaCl (inicial 0,6% m/v) durante dois dias e, no último dia, apenas com água destilada. No final da diálise, o alginato-RGD foi congelado e liofilizado e por fim guardado a -20 °C.

Para determinar a quantidade de péptido acoplado, a fim de usar a concentração desejada na produção dos hidrogéis, foi calculado o rendimento da reacção recorrendo ao método do *BCA Protein Assay* (Pierce), seguindo as instruções do fabricante. Foi elaborada uma curva de calibração em solução de 1% (m/v) de alginato não modificado com péptido dissolvido numa gama de concentrações entre 0 mg/mL e 1 mg/mL. O alginato não modificado também serviu de branco na leitura. Foram efectuadas 6 réplicas para a medição da absorvância do alginato-RGD. A eficiência da ligação foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência (\%)} = (\text{péptido acoplado} / \text{péptido usado}) \times 100.$$

2.2 Cultura celular

As células beta INS-1E foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sódio e 50 µM de β-mercaptoetanol. As células foram mantidas sob atmosfera humidificada, a 37 °C e contendo 5% (v/v) CO₂. O meio de cultura foi mudado duas vezes por semana e a potencial presença de micoplasma regularmente testada. Exceptuando o β-mercaptoetanol, adquirido na Sigma, todos os restantes compostos usados na cultura celular foram adquiridos à Gibco, Life Technologies.

2.3 Hidrogéis de alginato com células INS-1E

2.3.1 Encapsulamento

Para o encapsulamento das células, foi preparada uma solução de alginato de sódio com a concentração final de 2% (m/v) em 0,9% (m/v) de cloreto de sódio (NaCl). Nos hidrogéis com RGD, a solução continha uma mistura de alginato modificado com RGD e alginato não modificado, de forma a obter uma concentração final de péptido de 200 µM. Para o encapsulamento foram usadas células beta INS-1E com a densidade de 5x10⁶ células/mL (Alg-0 5M) ou 20x10⁶ células/mL (Alg-0 20M). Após homogeneização, esta suspensão foi extrudida através de uma agulha de 25G ou através de uma extrusora com fluxo coaxial de ar (*Nisco Var J1 encapsulation unit*) para uma solução gelificante (100 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl). As esferas permaneceram na solução gelificante durante 15

minutos. Após a reticulação e lavagem em meio de cultura, as células encapsuladas nos hidrogéis foram distribuídas por placas de 24 poços com 500 μ L meio/poço e colocadas em cultura.

Depois da avaliação do efeito da densidade celular, apresentada apenas na condição Alg-0, foi testado o efeito da presença de RGD (Alg-RGD), comparando com a condição controlo sem a adição do péptido (Alg-0). As células foram avaliadas *in situ*, ou seja, dentro do hidrogel ou após terem sido recuperadas por dissolução do hidrogel com solução de tripsina/EDTA (0,25% tripsina, 50 mM EDTA, pH 7,5) e centrifugação (400 g, 5 min).

2.3.2 Tamanho e morfologia das microsferas

As esferas foram observadas recorrendo a um Microscópio estereoscópico (SZX10 Stereo Microscope, Olympus) e um Microscópio óptico invertido (*Inverted Fluorescence Microscope*, Axiovert 200M, Zeiss). Algumas imagens foram recolhidas para a determinação do tamanho das esferas (n=15).

2.3.3 Actividade metabólica

A actividade metabólica foi avaliada nos dias 1, 4 e 7 através do ensaio da resazurina. Na mitocôndria, esta molécula é reduzida, na presença de NADPH ou NADH, a resorufina. Desta forma a quantificação da fluorescência emitida pela resorufina traduz actividade metabólica mitocondrial. No ensaio, os hidrogéis com as células foram incubados com resazurina a 20% (v/v) (stock a 0,1 mg/mL) em meio de cultura (500 μ L) durante 2 horas a 37 °C, protegidos da luz. Para a leitura, transferiram-se 200 μ L do sobrenadante para uma placa de 96 poços preta com fundo transparente (*96-well black clear-bottom plate*, Costar) e procedeu-se à leitura da fluorescência num espectrofluorímetro para microplacas (*Synergy MX*, BioTek Instruments Inc.) com excitação a 530 nm e emissão a 590 nm.

2.3.4 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada por três métodos diferentes: método de exclusão pelo azul de tripano, citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, nas duas últimas recorrendo à marcação com os corantes do *Live/Dead Viability/Cytotoxicity Assay Kit* (Invitrogen). Para as contagens das células (método de exclusão pelo azul de tripano e citometria de fluxo), as células foram libertadas do hidrogel, marcadas e analisadas. Para a microscopia, os hidrogéis mantiveram-se íntegros.

Para o ensaio com o azul de tripano, após a dissolução dos hidrogéis, a suspensão celular foi marcada com 0,4% do composto. Este corante entra através da membrana danificada das células mortas, corando-as de azul. As células vivas são excluídas pelo corante. As contagens das células (vivas e mortas) foram feitas ao microscópio, recorrendo a uma câmara de *Neubauer*. Esta quantificação foi feita nos dias 1, 4 e 7 da cultura celular. Nas outras duas técnicas, recorreu-se ao *Live/Dead Assay* que fornece dois compostos fluorescentes que reconhecem a actividade intracelular da enzima esterase e a integridade da membrana plasmática, permitindo assim avaliar a viabilidade celular. Em células vivas, a calceína acetoximetil (calceína AM) é convertida através da esterase a calceína, que emite fluorescência verde. O homodímero de etídeo (EthD-1) atravessa a membrana apenas das células mortas, pois estas apresentam-na danificada, ligando-se ao DNA e emitindo fluorescência vermelha. Para a citometria de fluxo, os hidrogéis foram transferidos para placas de fundo redondo (*96-well polystyrene round-bottom plate*, Costar), onde foram dissolvidos para a recolha das células que, após lavagem em tampão fosfato salino - PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4), foram incubadas com EthD-1 (2 µM) durante 15 minutos, protegido da luz e a 37 °C. Finalmente, as amostras foram diluídas em PBS, filtradas e colocadas no citómetro *FACS Calibur*, Becton Dickinson. Foram avaliadas 1x10⁴ células e para a análise dos dados recorreu-se ao *FlowJo software*. Esta avaliação foi efectuada após 7 dias em cultura. Para a microscopia de fluorescência, a viabilidade foi avaliada nos dias 1 e 7. Após a lavagem dos hidrogéis, estes foram incubados com 1 mM de calceína AM e 2,5 mM de EthD-1 durante 45 minutos na incubadora. O meio foi removido e adicionado meio fresco e depois trocado por tampão Tris salino, suplementado com cálcio - TBS-cálcio (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 7,5 mM CaCl₂, pH 7,6) para a análise no microscópio confocal (*Confocal laser scanning microscopy*, Leica SP2 AOBs). Posteriormente, as imagens obtidas foram tratadas no programa *ImageJ*.

2.3.5 Proliferação celular

Para avaliar a proliferação das células encapsuladas, foi quantificado o DNA (*double stranded DNA* - DNA dupla hélice) recorrendo ao *kit Quant-iT PicoGreen dsDNA* (Molecular Probes, Invitrogen). Depois de recuperadas dos hidrogéis, as células foram lisadas com 1% v/v Triton X-100 durante 1 hora a 400 rpm e a 4 °C. Posteriormente, as amostras foram diluídas 10x em PBS e usadas para a quantificação de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços preta com fundo transparente (*96-well black clear-bottom plate*, Costar) e diluídas com o tampão TE (200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7,5). De seguida

adicionou-se o reagente fornecido pelo *kit* e incubou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz. Procedeu-se à leitura da fluorescência num espectrofluorímetro para microplacas (Synergy MX, BioTek Instruments Inc.) com as seguintes definições, Ex/Em = 480/520 nm. As unidades de fluorescência foram convertidas na concentração das amostras usando uma curva de calibração do dsDNA (1 - 1000 ng/mL).

2.3.6 Secreção de insulina

O teste de secreção de insulina, após estímulo com glicose, foi realizado às células encapsuladas depois de 4 dias em cultura. Para tal, após a remoção do meio e a lavagem das esferas com tampão *Krebs-Ringer* modificado (135 mM NaCl, 3,6 mM KCl, 0,5 mM NaH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 1,5 mM CaCl₂, 0,5mM MgCl₂, 0,1% (m/v) BSA, pH 7,4), estas foram incubadas com o mesmo tampão durante 1 hora. Após lavagens, as esferas foram incubadas com o tampão suplementado com glicose (2,8 mM ou 16,7 mM) durante 1 hora. Após a incubação, foram recolhidos os sobrenadantes e congelados a -20 °C para posterior quantificação da insulina. Os níveis de insulina foram determinados por ELISA, recorrendo a um *kit* comercial (*Ultrasensitive Rat Insulin ELISA*, Mercodia), seguindo as recomendações do fabricante. A absorvância foi lida a um comprimento de onda de 450 nm, recorrendo a um leitor para microplacas (Synergy MX, BioTek Instruments Inc).

2.3.7 Imunomarcação da fibronectina

Para a imunomarcação da fibronectina, usaram-se os hidrogéis íntegros, permitindo assim observar a localização espacial deste componente da matriz extracelular. Todas as soluções de trabalho foram preparadas com TBS-cálcio para garantir a integridade das esferas ao longo de todo o procedimento. Após 7 dias em cultura, as esferas foram recolhidas e lavadas com TBS-cálcio. Posteriormente, foram fixadas com 4% (v/v) de paraformaldeído (PFA) durante 20 minutos, novamente lavadas e permeabilizadas com 0,2% (v/v) de Triton X-100 durante 10 minutos. Depois do bloqueio com 1% (m/v) BSA durante 1 hora, os hidrogéis foram incubados com o anticorpo primário anti-fibronectina (*F3648 Anti-Fibronectin*, Sigma, 1:400) durante a noite, a 4 °C. Seguiram-se as lavagens e a incubação com o anticorpo secundário (*Alexa Fluor 594 F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit*, Invitrogen, 1:1000) durante 1 hora à temperatura ambiente. Os núcleos foram contrastados com DAPI, presente no meio de montagem *Vectashield*. Os hidrogéis foram

observados no Microscópio confocal (*Confocal laser scanning microscopy*, Leica SP2 AOBS) e as imagens obtidas tratadas no programa *ImageJ*.

2.3.8 Análise de expressão génica

No dia 7, o RNA total foi extraído das células recuperadas dos hidrogéis (após sua dissolução) usando o *Isolate II RNA Mini Kit* (Bioline), de acordo com o procedimento do fabricante. A quantificação do RNA e a avaliação da sua pureza foi calculada recorrendo ao espectrofotómetro *NanoDrop 1000*. De seguida 0,5 µg do RNA total foi convertido em cDNA usando o *Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit* (Invitrogen), de acordo com o procedimento do fabricante. Após a síntese do cDNA, para o qRT-PCR elaborou-se uma mistura contendo o cDNA, os *primers* (*forward* e *reverse*) e o *SsoFast EvaGreen Supermix* (BioRad), de acordo com as instruções do fabricante. O qRT-PCR foi desenvolvido no aparelho *CFX96* (BioRad) com as seguintes condições: desnaturação inicial de 30 seg a 95 °C, 40 ciclos de 5 seg a 95 °C e 20 seg a 60 °C, seguido de curva de *melting* (50 °C - 95 °C, com incremento 0,5 °C a cada 10 seg).

Cada amostra foi corrida em triplicado. O gene *housekeeping* (gene controlo) usado foi o *Hprt1* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*). Para a quantificação relativa da amplificação dos genes de estudo fez-se a normalização com o gene *housekeeping* e calculou-se segundo a seguinte fórmula: $2^{\Delta Ct}$. Os níveis de expressão dos genes de estudo estão representados em relação à situação controlo (Alg-0). As sequências dos *primers* usados estão indicadas na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Primers usados na análise de expressão gênica por qRT-PCR

Gene	Sequência de primers	Referência
<i>Ins1</i>	F: 5'-GTGGCATTGTGGATCAGT-3' R: 5'-GCTCATTCAAAGGCTTTATTCA-3'	NM_019129
<i>Pdx1</i>	F: 5'-TGGAAGAAAGAGGAAGATAAGAAA-3' R: 5'-GAGGTTACGGCACAATCC-3'	NM_022852
<i>Glut2</i>	F: 5'-GATTACTGGCACATCCTACTTG-3' R: 5'-CCTGACTTCCTCTTCCAAC-3'	NM_012879
<i>Sur1</i>	F: 5'-GCCACCTCCACTTATACA-3' R: 5'-AGAACTTGACGAACCTTGATG-3'	NM_013039
<i>Col1a1</i>	F: 5'-GTGCGATGGCGTGCTATG-3' R: 5'-ACTTCTGCGTCTGGTGATACA-3'	NM_053304
<i>Col4a1</i>	F: 5'-TCTTCCACCCTCTACACAGA-3' R: 5'-TCCACAGAAAGCCATGACTT-3'	NM_001135009
<i>Lama1</i>	F: 5'-GACGGTGGACAGTAATCTC-3' R: 5'-TTCTCAGGCACAAGTCTAAC-3'	NM_001108237
<i>Fn1</i>	F: 5'-AGCACAGAACTCAACCTT-3' R: 5'-CTCCTCCACAGCATAGATAG-3'	NM_019143
<i>Itga3</i>	F: 5'-GAACGATTGTGAACGCATGG-3' R: 5'-GCCAGGGTCGAGCTGTAGGT-3'	XM_340884
<i>Itgb1</i>	F: 5'-CAGATGAAGTGAACAGTGAAGACA-3' R: 5'-GTTGGACCTATCGCAGTTGAAG-3'	NM_017022

Ins1 - insulín 1; *Pdx1* - pancreatic and duodenal homeobox 1; *Glut2* - glucose transporter 2; *Sur1* - sulfonylurea receptor 1; *Col1a1* - collagen type I alpha 1; *Col4a1* - collagen type IV alpha 1; *Lama1* - laminin alpha 1; *Fn1* - fibronectin 1; *Itga3* - integrin alpha 3; *Itgb1* - integrin beta 1; F - forward primer; R - reverse primer

2.4 Análise estatística

Para a análise estatística, recorreu-se ao programa *GraphPad Prism*. Nos dados da secreção de insulina sem estímulo de glicose usou-se o teste *Mann-Whitney* e na análise da expressão gênica usou-se o teste *Wilcoxon Signed Rank*. As restantes significâncias estatísticas foram determinadas pelo teste *Two-way ANOVA*, seguido da avaliação das comparações múltiplas com os testes *Tukey* ou *Sidak*. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Efeito da densidade celular no comportamento das células INS-1E encapsuladas

Primeiramente, avaliou-se o efeito da densidade celular, encapsulando para tal 5 milhões (Alg-0 5M) e 20 milhões (Alg-0 20M) de células beta INS-1E por mililitro de alginato, produzindo esferas pelo método clássico de gelificação externa do alginato com cálcio. A dimensão média das esferas preparadas foi de $2000 \pm 4 \mu\text{m}$, e não foram observadas diferenças nas duas condições (Alg-0 5M e Alg-0 20M) (Figura 3).

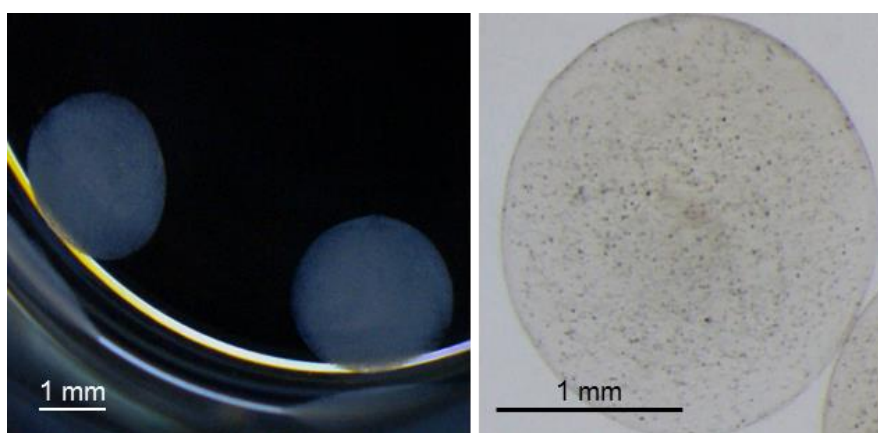


Figura 3: Esferas de alginato com células beta INS-1E observadas ao Microscópio estereoscópico. As imagens ilustram a sua forma esférica e distribuição uniforme das células no seu interior. O tamanho médio das esferas é de $2000 \pm 4 \mu\text{m}$, sem diferenças observadas entre as duas condições (Alg-0 5M e Alg-0 20M).

Quer na avaliação da actividade metabólica (Figura 4-A), como da viabilidade (Figura 4-B) observou-se que, ao longo do tempo em cultura, a condição Alg-0 5M tem uma resposta mais favorável do que a condição Alg-0 20M. Como seria de esperar, uma vez que o número total de células é superior, a actividade metabólica nos dias 1 e 4 é superior na condição Alg-0 20M ($p < 0,001$). Porém, esta diminui acentuadamente no dia 7 para valores significativamente inferiores aos da condição Alg-0 5M no mesmo dia ($p < 0,001$) (Figura 4-A). Na condição Alg-0 5M, o aumento da actividade metabólica ao longo do tempo em cultura é estatisticamente significativo entre os diferentes dias ($p < 0,001$). Por outro lado, na condição Alg-0 20M, a actividade metabólica aumenta significativamente do dia 1 para o dia 4 ($p < 0,001$), mas reduz significativamente no dia 7 ($p < 0,001$ comparando com o dia 1 e 4). A viabilidade, traduzida pela percentagem de células vivas relativamente ao número total de células, denota, nos dias 4 e 7, uma redução da sua

percentagem na condição Alg-0 20M comparando com a Alg-0 5M ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente) (Figura 4-Bi).

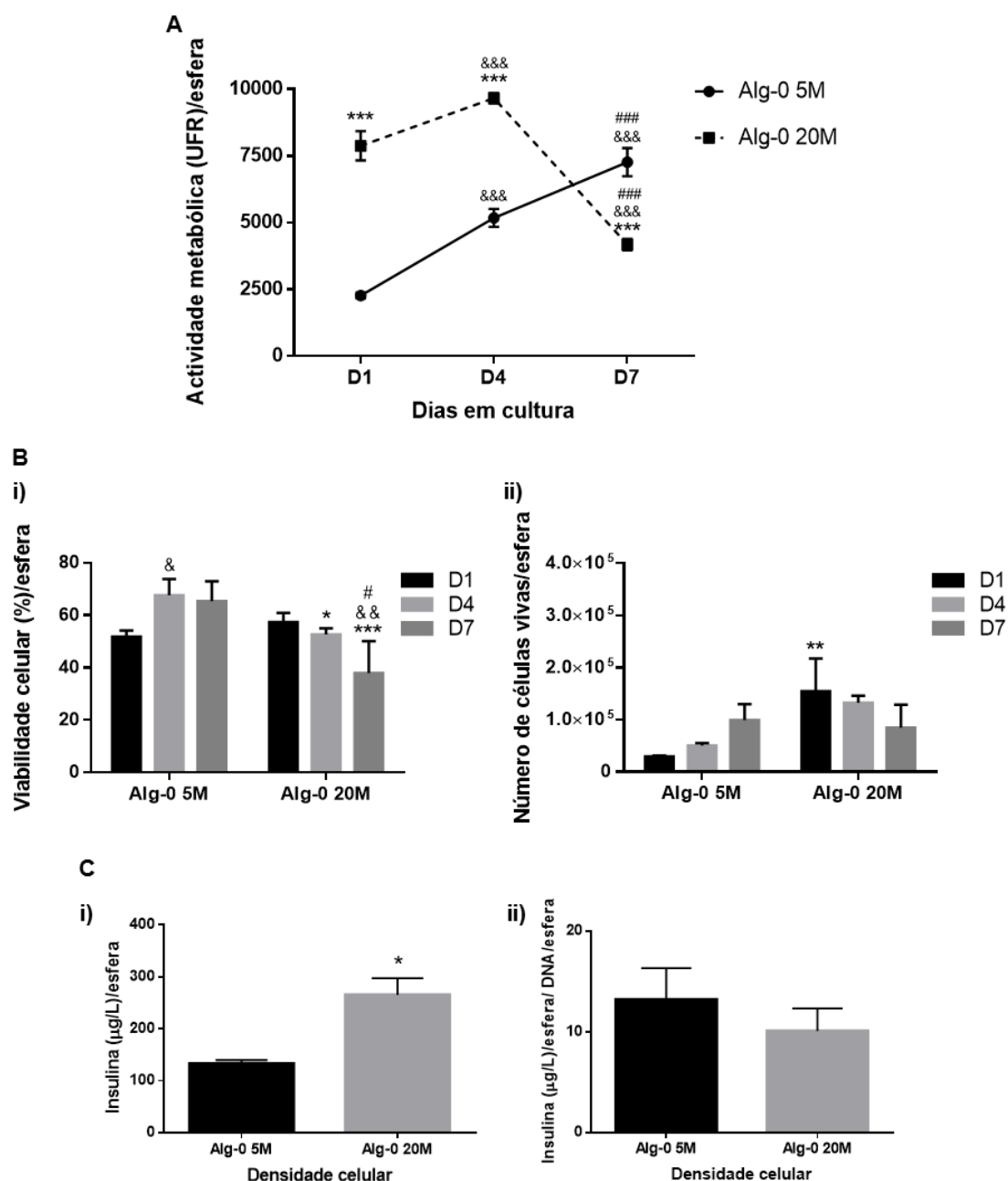


Figura 4: Efeito da densidade celular (5×10^6 - Alg-0 5M e 20×10^6 - Alg-0 20M) na resposta das células encapsuladas em esferas de alginato ao longo de uma semana em cultura. (A) Actividade metabólica obtida pelo método da resazurina. (B) Viabilidade celular (i) e número de células viáveis (ii), obtidos pelo método de exclusão pelo azul de tripano. (C) Níveis de insulina basal no meio de cultura, obtido no dia 4 por ELISA, normalizado por esfera (i) e normalizado por esfera/DNA/esfera (ii).

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3-5$). * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$) entre Alg-0 20M e Alg-0 5M, & ($p < 0,05$) e && ($p < 0,01$) entre os dias 4 e 7 e o dia 1 e # ($p < 0,05$) entre o dia 7 e o dia 4.

O aumento da viabilidade celular na condição Alg-0 5M é visível no dia 4 ($p < 0,05$ comparando com o dia 1), e depois parece atingir um patamar. O decréscimo neste parâmetro na condição Alg-0 20M é mais acentuado no dia 7 ($p < 0,01$ em relação ao dia 1 e $p < 0,05$ em relação ao dia 7).

As percentagens de viabilidade apresentadas estão sempre abaixo dos 70%, e logo no primeiro dia rondam os 50% (Alg-0 5M) e 60% (Alg-0 20M). Este valor inicial relativamente baixo poderá resultar da metodologia usada para esta avaliação. De facto, sabe-se que com a dissolução do hidrogel, ocorre *stress* mecânico de cisalhamento associado ao processo de pipetagem que poderá ter causado alguma morte celular [7].

Na Figura 4-Bii que ilustra o número total de células viáveis, conforme esperado, quando comparando com a condição Alg-0 5M, o número de células viáveis na condição de maior densidade celular (Alg-0 20M) é aproximadamente 4 vezes superior no dia 1 ($p < 0,01$) e 3 vezes no dia 4. No entanto, esse número decresce à medida que o tempo em cultura aumenta, sendo que no dia 7, tende a ser inferior ao observado na condição Alg-0 5M.

No dia 4 da cultura celular, a secreção de insulina basal (sem estímulos adicionais de glicose) mostra ser superior na condição Alg-0 20M ($p < 0,05$) (Figura 4-Ci), resultado do maior número de células. Contudo, após a normalização pela quantidade de DNA por esfera, a diferença dilui-se (Figura 4-Cii).

3.2 Efeito da presença de RGD na actividade metabólica, proliferação e viabilidade das células INS-1E encapsuladas

Depois de escolhida a densidade celular a usar, ou seja, 5 milhões de células por mililitro de alginato, seguiu-se a avaliação do efeito da presença do péptido RGD na resposta das células encapsuladas. Foram produzidas microsferas também pelo método da gelificação externa do alginato, mas recorrendo a uma extrusora que permite fazer esferas de menor dimensão. A dimensão média das microsferas é de $1270 \pm 69 \mu\text{m}$, e não foram observadas diferenças nas duas condições (Alg-0 e Alg-RGD) (Figura 5).

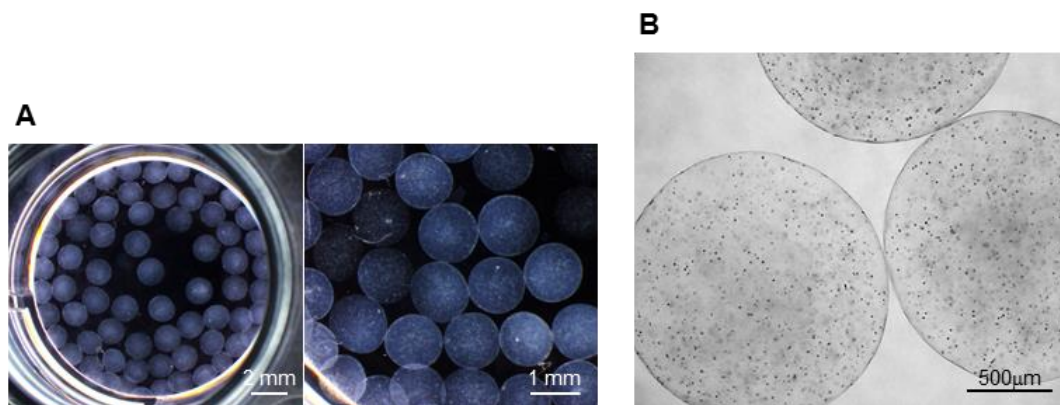


Figura 5: Microsféras de alginato com células beta INS-1E observadas ao Microscópio estereoscópico (A) e ao Microscópio óptico invertido (B). As imagens ilustram a forma esférica dos hidrogéis e a distribuição uniforme das células no seu interior. O tamanho médio das microsferas é de $1270 \pm 69 \mu\text{m}$ e não se encontraram diferenças entre os tamanhos médios das duas condições (Alg-0 e Alg-RGD).

A avaliação da actividade metabólica mostrou claramente o efeito benéfico da presença do péptido (Figura 6-A).

As células encapsuladas em alginato modificado com RGD (Alg-RGD) mostraram, após 4 e 7 dias em cultura, um aumento na actividade metabólica quando comparada com a das células da condição Alg-0 ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). Na condição Alg-RGD, o aumento da actividade metabólica ao longo do tempo em cultura é estatisticamente significativo entre os diferentes dias ($p < 0,001$). Por outro lado, na condição Alg-0, verifica-se um aumento significativo entre o dia 1 e 4 ($p < 0,001$), que depois tende para um patamar, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os dias 4 e 7.

Os resultados obtidos na determinação do DNA total, que permite estimar a proliferação celular, sugerem que o aumento da actividade metabólica ao longo do tempo se deve ao aumento do número de células (Figura 6-B). Verificou-se que, em ambas as condições, ocorre proliferação celular ao longo do tempo em cultura, embora tenda para um patamar a partir do dia 4. Acompanhando a actividade metabólica, a condição Alg-RGD apresenta uma quantidade superior de DNA em relação à situação controlo (Alg-0) nos dias 4 ($p < 0,01$) e 7 ($p < 0,001$). A proliferação celular é então mais pronunciada na condição Alg-RGD ($p < 0,001$ entre os dias 4 e 7 e o dia 1) em que a quantidade de DNA é 2,4 e 2,6 vezes superior no dia 4 e 7, respectivamente, relativamente à quantidade do dia 1. Na condição controlo (Alg-0), a capacidade de proliferação das células é menos acentuada ($p < 0,01$ entre os dias 4 e 1 e $p < 0,05$ entre os dias 7 e 1).

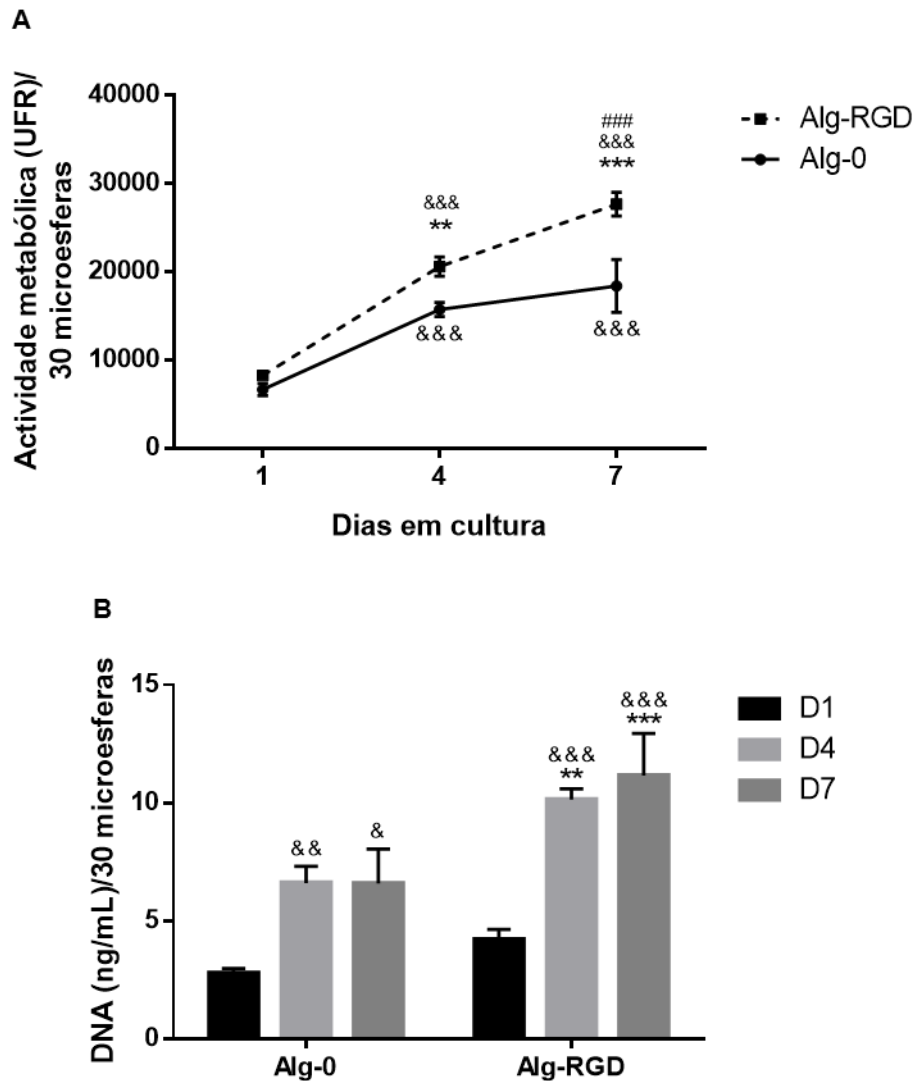


Figura 6: Efeito da presença do péptido RGD na resposta das células beta INS-1E encapsuladas em microsferas de alginato ao longo de uma semana em cultura. (A) Actividade metabólica obtida pelo método da resazurina e (B) concentração de DNA obtida pelo *PicoGreen* Assay, em ambas as condições (Alg-0 e Alg-RGD).

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3). **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$) entre Alg-0 e Alg-RGD, & ($p < 0,05$), && ($p < 0,01$) e &&& ($p < 0,001$) entre os dias 4 e 7 e o dia 1 e &&& ($p < 0,001$) entre os dias 7 e 4.

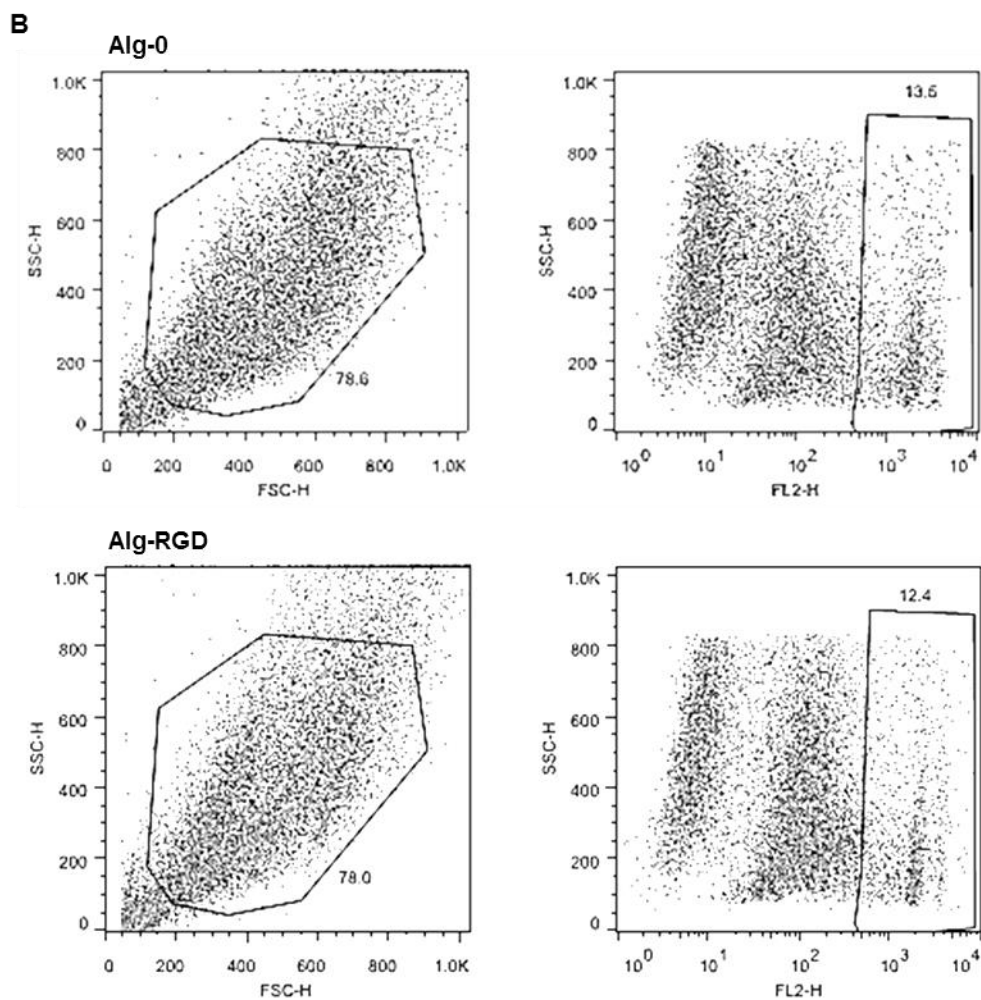
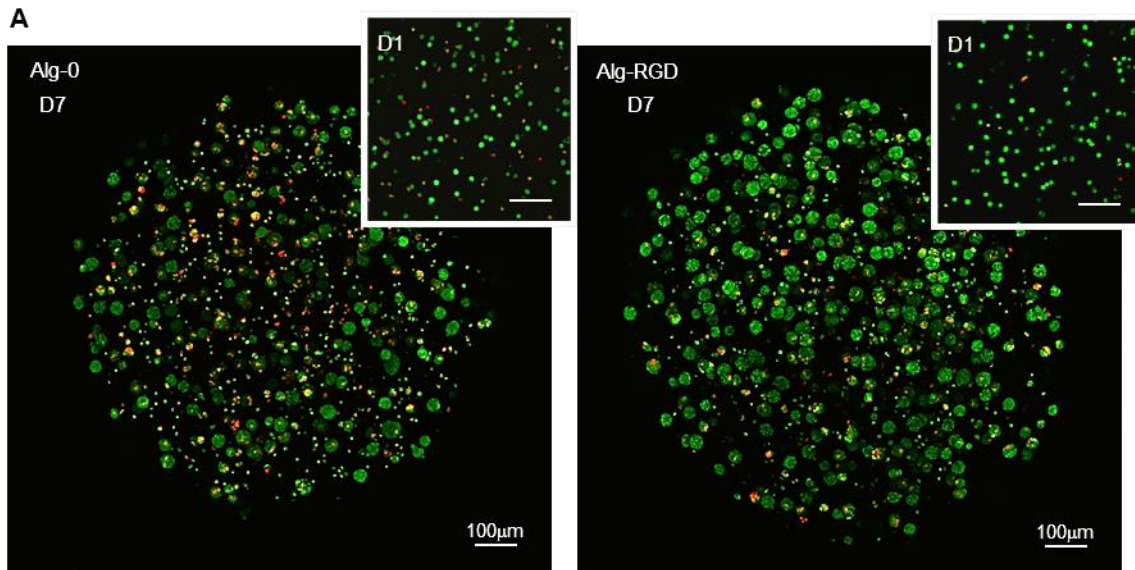


Figura 7: Efeito da presença do péptido RGD na viabilidade das células beta INS-1E encapsuladas em microsferas de alginato. (A) Imagens representativas de microscopia confocal nos dias 1 e 7 (D1, D7) após marcação das células com o *LiveDead Assay* em ambas as condições (Alg-0 e Alg-RGD). A calceína marca as células vivas e o EthD-1 as células mortas, emitindo fluorescência verde e vermelha, respectivamente. (B) Resultados de citometria de fluxo com as respectivas percentagens de células mortas, marcadas pelo EthD-1 no dia 7, em ambas as condições (Alg-0 e Alg-RGD).

A Figura 7 mostra a viabilidade das células beta INS-1E encapsuladas, determinada por dois métodos diferentes, recorrendo ambas ao *Live/dead Assay*. Este ensaio permite distinguir simultaneamente as células vivas e as células mortas, baseando-se na interacção de dois compostos fluorescentes de cor diferente com as mesmas. No dia 1, em ambas as condições (Alg-0 e Alg-RGD) as imagens mostram as células individualizadas, maioritariamente com fluorescência verde, ou seja, viáveis. Após 7 dias em cultura, as células formaram pequenos esferóides em ambas as condições, mas em número superior quando na presença de RGD. Embora se tenha observado uma maioria de células vivas, a percentagem de células mortas, com fluorescência vermelha, parece ser superior na condição Alg-0 (Figura 7-A). A citometria de fluxo, embora com algumas desvantagens metodológicas comuns ao método de exclusão com azul de tripano, pela necessidade de desfazer os hidrogéis que pode acarretar danos celulares, apresenta percentagens idênticas de células mortas nas duas condições: 13,5% para a condição Alg-0 e 12,4% para a condição Alg-RGD (Figura 7-B).

3.3 Efeito da presença de RGD na secreção de insulina e expressão génica das células INS-1E encapsuladas

Relativamente à capacidade de secreção de insulina, as células beta encapsuladas em ambas as condições (Alg-0 e Alg-RGD), quando estimuladas com uma concentração elevada de glicose (16,7 mM), responderam com um aumento da secreção de insulina ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). No entanto, as células encapsuladas em Alg-RGD mostraram um aumento na secreção de 2,5 vezes, quando estimuladas com 16,7 mM de glucose relativamente a um estímulo de 2,8 mM, enquanto as células da condição controlo (Alg-0) aumentaram a secreção somente 1,4 vezes (Figura 8-A). Este aumento da resposta secretora entre as duas condições (Alg-0 e Alg-RGD) é estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

Os genes envolvidos na maquinaria de secreção da insulina mostraram aumentos da sua expressão média, embora não estatisticamente significativos, nas células encapsuladas em Alg-RGD, relativamente à condição Alg-0. O aumento mais pronunciado foi o da expressão do gene do receptor da sulfonilureia (*Sur1*), com valores que atingiram quase o dobro do valor da expressão observada na condição controlo (Alg-0). Todos os outros genes avaliados (*Ins1*, *Pdx1* e *Glut2*) apresentaram um aumento médio da sua expressão até 50% em relação à condição Alg-0. Embora a insulina segregada em resposta a um estímulo de glicose tenha aumentado na condição Alg-RGD (Figura 8-A), encontrámos apenas um aumento ligeiro da expressão génica de uma das isoformas da insulina (*Ins1*). No entanto, a avaliação da expressão génica foi efectuada sem que as células tenham

vido previamente sujeitas a estímulos de glicose, podendo assim explicar este resultado (Figura 8-B).

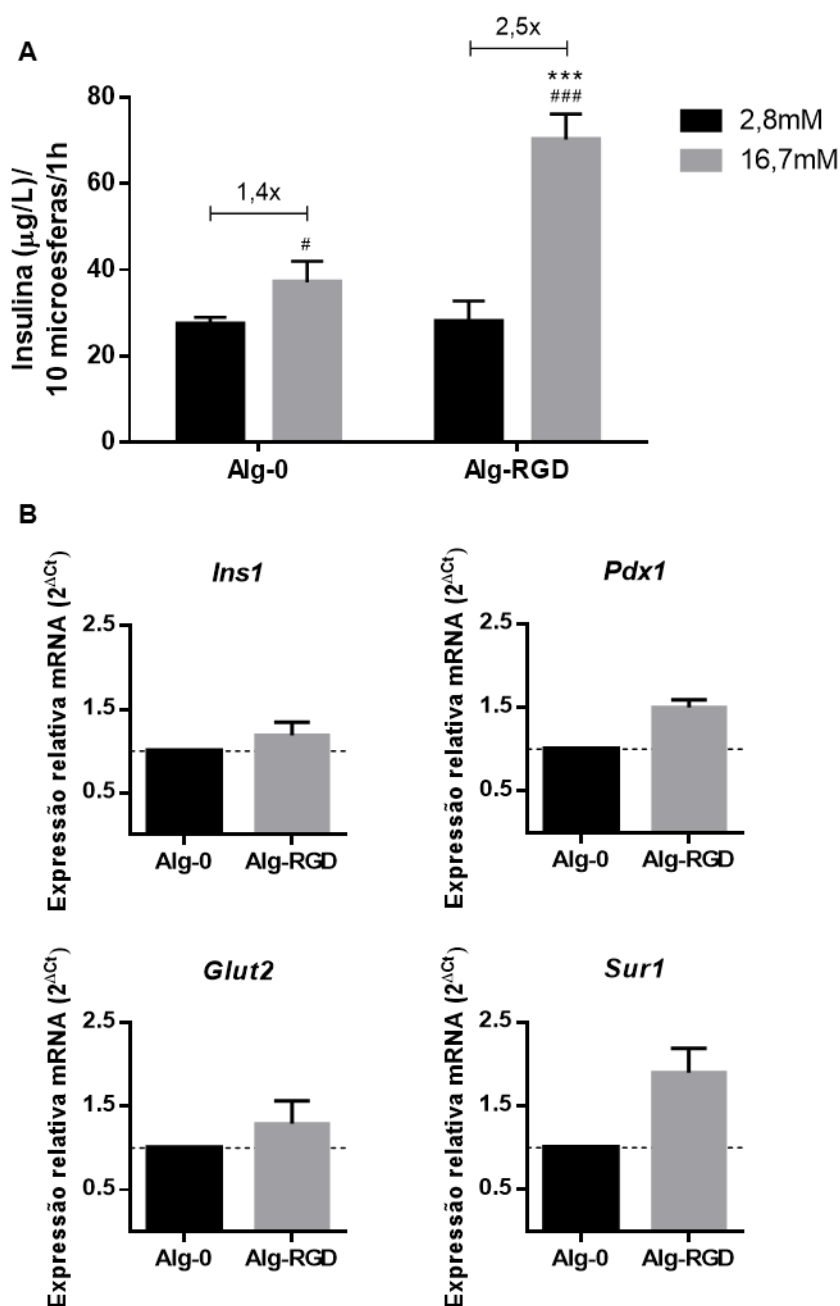


Figura 8: Efeito da presença do péptido RGD na secreção de insulina das células beta INS-1E encapsuladas em microsferas de alginato. (A) Secreção de insulina no dia 4 da cultura celular, após estímulo com glicose (2,8 mM e 16,7 mM) em ambas as condições (Alg-0 e Alg-RGD), detectada por ELISA. (B) Análise de qRT-PCR da expressão de genes envolvidos na maquinaria da secreção de insulina (*Ins1*, *Pdx1*, *Glut2* e *Sur1*), relativamente à expressão do gene *Hprt1* (*housekeeping*) e normalizado pela expressão dos mesmos na condição Alg-0 (controlo), avaliada após 7 dias de cultura.

Os resultados são apresentados como media ± desvio padrão (n=3-4). *** (p<0,001) entre Alg-0 e Alg-RGD, # (p<0,05) e ## (p<0,01) entre 2,8 mM e 16,7 mM. *Ins1* - *insulin 1*; *Pdx1* - *pancreatic and duodenal homeobox 1*; *Glut2* - *glucose transporter 2*; *Sur1* - *sulfonylurea receptor 1*.

3.4 Efeito da presença de RGD na produção e interação de componentes da matriz extracelular com as células INS-1E encapsuladas

Por qRT-PCR, observámos que a expressão génica média dos componentes da matriz extracelular avaliados (colagénio tipo I (*Col1a1*) e tipo IV (*Col4a1*), laminina (*Lama1*) e fibronectina (*Fn1*)) e das subunidades $\alpha 3$ e $\beta 1$ das integrinas (*Itga3* e *Itgb1*) se encontra aumentada, embora sem significância estatística, na condição em que as células foram encapsuladas num hidrogel modificado com RGD (Alg-RGD) (Figura 9-A). No caso dos colagénios tipo I e IV e da laminina, a expressão génica foi em média duas vezes superior à da condição controlo (Alg-0), enquanto no caso da fibronectina o aumento foi menos pronunciado, mas mais consistente. O aumento da expressão dos genes das integrinas sugerem que a interacção célula-matriz extracelular é mediada por estes receptores de adesão presentes na membrana celular (Figura 9-A).

Observando os esferóides em maior pormenor, a marcação da fibronectina mostra que este componente da matriz extracelular está a ser produzido pelas células beta INS-1E e que pode estar na base da formação e/ou estabilização destes esferóides formados no interior do hidrogel de alginato (Figura 9-B).

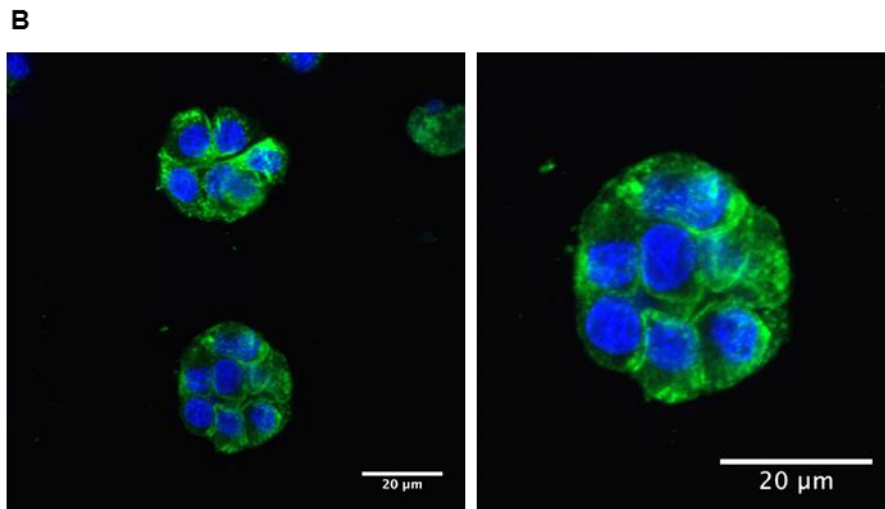
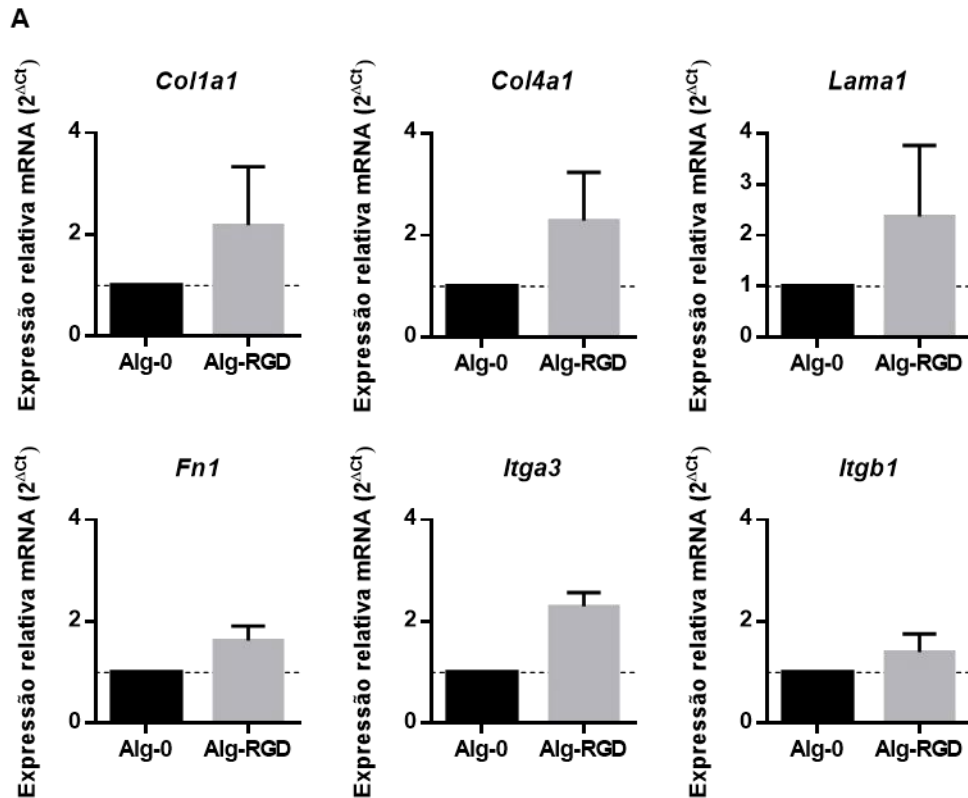


Figura 9: Efeito da presença do péptido RGD na produção e interação de componentes da matriz extracelular com as células beta INS-1E encapsuladas em microsferas de alginato. (A) Análise de qRT-PCR da expressão dos genes *Col1a1*, *Col4a1*, *Lama1*, *Fn1*, *Itga3* e *Itgb1*, relativamente à expressão do gene *Hprt1* (*housekeeping*) e normalizado pela expressão dos mesmos na condição Alg-0 (controlo), avaliada após 7 dias de cultura. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3). (B) Imagens representativas de microscopia confocal no dia 7 (D7) após marcação imunológica com o anticorpo anti-fibronectina (cor verde). Os núcleos foram marcados com DAPI (cor azul). *Col1a1* - collagen type I alpha 1; *Col4a1* - collagen type IV alpha 1; *Lama1* - laminin alpha 1; *Fn1* - fibronectin 1; *Itga3* - integrin alpha 3; *Itgb1* - integrin beta 1; F - forward primer; R - reverse primer.

4. Discussão

Foi objectivo do presente trabalho, criar um nicho para as células beta que mimetizasse a organização tridimensional encontrada no microambiente *in vivo*, e que promovesse o estabelecimento de interações célula-célula e célula-matriz extracelular, fundamentais para a sobrevivência e funcionalidade celular. Directamente relacionada com a interacção célula-célula, a densidade celular utilizada no encapsulamento é um parâmetro fulcral para o sucesso do sistema *in vitro* e principalmente *in vivo*, onde as condições são mais complexas e desafiantes. A densidade óptima é variável e depende do modelo usado e do tipo de células a encapsular, pelo que é normal encontrarem-se diferentes valores referenciados na literatura. Em particular, para o encapsulamento de células beta da linha INS-1E em hidrogéis de alginato, estudos anteriores reportaram densidades de $1,5 \times 10^6$ células/mL [26] e $7,5 \times 10^6$ células/mL [27], mas não foi encontrado nenhum estudo que avaliasse o efeito da variação da densidade na resposta celular nestes modelos. No entanto, no encapsulamento de células beta humanas em alginato, as densidades reportadas são superiores [28]. Por outro lado, dois estudos que compararam diferentes densidades no encapsulamento das células beta MIN6 de rato em polietilenoglicol diacrilato (PEGDA), comprovaram que as densidades superiores (10×10^6 e 20×10^6 de células/mL) resultavam numa melhoria da viabilidade e capacidade de secreção de insulina [4, 6]. Tendo em conta este cenário, procurou-se clarificar qual a densidade celular óptima para o encapsulamento de células beta INS-1E no nosso modelo, e para tal compararam-se duas densidades diferentes: 5×10^6 e 20×10^6 células/mL. A densidade de 5×10^6 células/mL mostrou ser a mais vantajosa para o encapsulamento destas células, durante o período estudado (Figura 4). O facto de, comparando com a condição Alg-0 20M, levar a um aumento da actividade metabólica, traduzido pelo aumento do número de células vivas ao longo do tempo em cultura, e uma maior capacidade de secreção de insulina fez desta densidade a escolhida para os ensaios que se seguiram. A possibilidade de uma resposta celular adequada, sem o recurso a um número elevado de células, por vezes condição limitante na clínica, foi proposta por Lin, com a introdução no hidrogel de PEGDA do receptor de superfície *EphA*, um dos responsáveis pela interacção célula-célula, e o seu ligando *ephrinA*, permitindo assim a activação da sinalização decorrente da interacção célula-célula [4]. Os autores mostraram que, com essa estratégia, foi possível reduzir o número de células a encapsular de 1×10^7 para 2×10^6 células/mL, valor na mesma ordem de grandeza do que propomos no nosso sistema.

No estudo da viabilidade celular, quando se analisa a marcação com o *LiveDead*, é possível observar que as células com esta densidade crescem em esferóides (Figura 7), facto que necessita de ser clarificado pela marcação da actina em ensaios futuros. Na

figura representativa do dia 1, é possível observar as células individualizadas que, ao longo do tempo vão, aparentemente, proliferando e formando os esferóides. Para melhor investigar a origem dos esferóides, e perceber se estes se formam por proliferação celular e/ou por processos de migração e agregação celular, é também nosso objectivo analisar no futuro a expressão do marcador de proliferação Ki-67, uma proteína que está presente somente em células que se encontram em divisão celular. Conforme já reportado em estudos anteriores [29, 30], sabe-se que as células beta apresentam um comportamento diferente, quando estão dispersas ou organizadas em agregados, os quais funcionam como pseudo-ilhéus. Chowdhury et al. caracterizou essa diferença de comportamento nas células MIN6, quando em monocamada ou como pseudo-ilhéus, mostrando que a última conformação permite aproximar a capacidade de secreção de insulina dessas células à da observada em ilhéus humanos [30]. Outras evidências em modelos 3D de hidrogéis indicam que o aumento da densidade celular potencia a agregação das células, com formação de esferóides, e a produção de proteínas [6]. Apesar de não termos avaliado se a condição Alg-0 20M permite a formação de esferóides, depreende-se pelos restantes resultados que talvez o espaço limitado do hidrogel possa ter sido um travão à proliferação das células com esta densidade, colocando em causa a formação dos mesmos. Desta forma, as células acabaram por morrer, explicando o decréscimo da actividade metabólica e a diminuição do número de células observado a partir do dia 4. Mesmo ao dia 4, em que as células ainda se mantinham metabolicamente activas, a secreção de insulina não mostrou ser superior à das células na condição Alg-0 5M, ou seja, os níveis de secreção foram equivalentes nas duas condições apesar de o número de células em Alg-0 20M ser quatro vezes superior (Figura 4).

Prosseguindo com o objectivo da criação de um nicho óptimo para o encapsulamento das células beta INS-1E, procedemos à funcionalização do hidrogel de alginato com o péptido RGD, de forma a potenciar a interacção célula-matriz extracelular, crucial para a sobrevivência celular. Vários autores defendem a vantagem da funcionalização de hidrogéis com pequenos péptidos adesivos, em detrimento de componentes mais complexos da matriz extracelular [31], sendo a química das carbodiimidas a mais vulgarmente usada [25, 32]. Apenas num passo, esta química cria uma ligação peptídica entre os grupos carboxílicos do alginato e os grupos amina terminais do péptido. O excesso de reagentes e os produtos secundários da reacção, solúveis em água, são facilmente removidos por diálise [25, 32].

Em culturas 2D, Kuehen demonstrou que a cultura de células beta INS-1E em superfícies modificadas com RGD, leva a um aumento da proliferação celular e da capacidade de secreção de insulina, aumentando ainda a percentagem de células positivas para o factor de transcrição Pdx1. Estas melhorias na função celular deveram-se à interacção das

células com o péptido, mediada pelas integrinas. [19]. No modelo 3D que desenvolvemos, comparando o efeito da introdução do RGD no hidrogel (Alg-RGD) com a condição controlo (Alg-0), também observámos um aumento da proliferação, traduzida pelo aumento da quantidade de DNA, e consequente aumento da actividade metabólica ao longo do tempo em cultura (Figura 6). A secreção de insulina foi mais eficaz, para concentrações elevadas de glicose, e a expressão média de alguns genes envolvidos na maquinaria da secreção de insulina também mostrou um aumento, embora não estatisticamente significativo, nas células encapsuladas em Alg-RGD (Figura 8). Com uma expressão média 50% maior que na condição Alg-0, foi o caso do factor de transcrição Pdx1, responsável pela manutenção da função secretora das células beta. Com um aumento mais pronunciado, atingindo o dobro da expressão observada na condição Alg-0, foi o caso do receptor da sulfonilureia, uma subunidade dos canais de potássio dependentes de ATP, envolvidos na secreção da insulina. Desta forma, o modelo 3D proposto acompanhou os resultados obtidos em 2D e mostrou ser mais eficaz que os modelos 3D já descritos, demonstrando resultados mais promissores para uma concentração de péptido menor. De facto, dois estudos de Weber e seus colaboradores, apesar de usarem outras células (MIN6 e ilhéus de rato) e estas terem sido encapsuladas noutro tipo de hidrogel (PEGDA), a concentração de péptido RGD reportada é 25 vezes superior (5000 μ M) à que utilizámos no nosso sistema (200 μ M) [14, 22].

Embora os valores da citometria de fluxo não tenham permitido detectar diferenças na percentagem de células mortas, observando as imagens da viabilidade celular com a marcação do *LiveDead*, a condição Alg-RGD parece ter menos células mortas e mais células vivas do que a condição Alg-0. Outra observação diz respeito aos esferóides, que parecem estar em maior quantidade na condição enriquecida com RGD. Este fenómeno já foi reportado por outros autores em culturas 2D enriquecidas com matriz extracelular. Favorecidas pela presença de componentes da matriz extracelular, as células β -TC6 [21] e RINm5F [29] formaram pseudo-ilhéus, tendo sido observado um aumento da expressão de mRNA de proteínas da matriz extracelular e de moléculas de adesão nas células aglomeradas, quando comparados com as mesmas em monocamada [21, 25].

Recentemente, um estudo descreveu a criação de um método automático capaz de formar esferóides uniformes de células RIN-m para posterior encapsulamento [25], apostando assim na vantagem desta conformação em esferóide, também apelidada de pseudo-ilhéu, para a sobrevivência e função das células beta. Sem recorrer a este método automático, encontramos na literatura esferóides entre os 20 e os 90 μ m em modelos 3D

[4, 6] e, no nosso modelo, observámos esferóides entre os 20 e os 50 μm , que possivelmente se poderiam tornar maiores após um período de tempo superior em cultura. A incapacidade das células beta formarem a sua própria membrana basal, reportada por Nikolova et. al [9], parece ter sido ultrapassada neste modelo. Embora com alguma variabilidade, as células beta encapsuladas na presença do péptido de adesão, aumentaram a expressão génica média de alguns constituintes da matriz extracelular, nomeadamente da laminina e do colagénio tipo IV, componentes da membrana basal (Figura 8-A). Este tipo de colagénio já mostrou melhorar a função das células beta INS-1E, mediado pela integrina $\alpha3\beta1$ [33], o que parece corroborar os nossos resultados. No nosso modelo, a expressão génica média destas duas subunidades da integrina também mostrou estar aumentada nas células encapsuladas em Alg-RGD (Figura 8-A), sugerindo que, conforme esperado, a presença do péptido favorece a interacção célula-matriz mediada por integrinas.

Através da análise por imunocitoquímica dos hidrogéis, gostaríamos de perceber a localização espacial dos componentes da matriz cuja expressão génica foi aumentada na presença de RGD. Devido a alguns problemas metodológicos encontrados, apenas nos foi possível marcar a fibronectina, que foi também o componente com um aumento médio menos variável. Produzida intracelularmente como um complexo dimérico inactivo, quando se liga aos receptores de adesão superficiais torna-se activa, alterando a sua conformação para fibrilhas que suportam o crescimento e coesão celular [19, 34]. Observando a Figura 8-B, parece haver uma acumulação desta proteína na zona membranar, sugerindo que possa estar a mediar a interacção e coesão entre as células do esferóide. Em pseudo-ilhéus de células RINm5F também foi demonstrado um aumento da expressão de fibronectina, estando esta na base da consolidação da formação dos mesmos como componente da matriz extracelular. Corroborando estes estudos, os nossos resultados também sugerem que a polimerização da fibronectina regula a estabilidade e adesão celulares [29].

Concluindo, o encapsulamento de 5×10^6 células INS-1E/mL em alginato enriquecido com 200 μM de RGD, traduz-se num modelo promissor para manter as células beta viáveis e com uma função secretora melhorada. Estas mostraram proliferar e formar esferóides, uma conformação vantajosa relacionada com a produção de componentes da matriz extracelular que, ao interagirem com as células, activam a sinalização decorrente desta comunicação, fundamental à sobrevivência celular. A facilidade em formar hidrogéis sem acarretar danos celulares e a simplicidade da química usada para a introdução do péptido RGD (ou outros de interesse biológico) no alginato, torna o nosso modelo muito atraente, quando comparado com os modelos reportados na literatura, por exemplo à base de PEG.

Na sua maioria, esses recorrem a químicas mais elaboradas, traduzindo-se em mais danos celulares. Nesses modelos, são assim necessários números superiores de células e uma maior concentração das substâncias bio-activas adicionadas ao polímero.

5. Referências bibliográficas

1. Crisóstomo J, Coelho J, Seíça R (2013) Bioartificial Pancreas: In the Road to Clinical Application. In: Coelho J (ed) Drug Deliv. Syst. Adv. Technol. Potentially Apl. Pers. Treat. Springer, pp 127–151
2. Wang R, Rosenberg L (1999) Maintenance of beta-cell function and survival following islet isolation requires re-establishment of the islet-matrix relationship. *J Endocrinol* 163:181–190. doi: 10.1677/joe.0.1630181
3. Cheng JYC, Raghunath M, Whitelock J, Poole-Warren L (2011) Matrix Components and Scaffolds for Sustained Islet Function. *Tissue Eng Part B Rev* 17:235–247. doi: 10.1089/ten.teb.2011.0004
4. Lin C-C, Anseth KS (2011) Cell–cell communication mimicry with poly(ethylene glycol) hydrogels for enhancing β -cell function. *PNAS* 108:6380–6385.
5. Weber LM, Hayda KN, Anseth KS (2008) Cell–Matrix Interactions Improve b-Cell Survival and Insulin Secretion in Three-Dimensional Culture. *Tissue Eng Part A* 14:1959–1968.
6. Lin CC, Raza A, Shih H (2011) PEG hydrogels formed by thiol-ene photo-click chemistry and their effect on the formation and recovery of insulin-secreting cell spheroids. *Biomaterials* 32:9685–9695. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.083
7. Maia FR, Lourenço AH, Granja PL, et al. (2014) Effect of cell density on mesenchymal stem cells aggregation in RGD-alginate 3D matrices under osteoinductive conditions. *Macromol Biosci* 14:759–771. doi: 10.1002/mabi.201300567
8. Rozario T, Desimone DW (2010) The Extracellular Matrix In Development and Morphogenesis: A Dynamic View. *Dev Biol* 341:126–140. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.10.026.The
9. Nikolova G, Jabs N, Konstantinova I, et al. (2006) The Vascular Basement Membrane: A Niche for Insulin Gene Expression and β Cell Proliferation. *Dev Cell* 10:397–405. doi: 10.1016/j.devcel.2006.01.015
10. Daoud J, Petropavlovskaja M, Rosenberg L, Tabrizian M (2010) The effect of extracellular matrix components on the preservation of human islet function in vitro. *Biomaterials* 31:1676–1682. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.057
11. Kaido T, Yebra M, Cirulli V, et al. (2006) Impact of defined matrix interactions on insulin production by cultured human beta-cells: Effect on insulin content, secretion, and gene transcription. *Diabetes* 55:2723–2729. doi: 10.2337/db06-0120
12. Pinkse GG, Bouwman WP, Jiawan-Lalai R, et al. (2006) Integrin signaling via RGD peptides and anti-beta1 antibodies confers resistance to apoptosis in islets of Langerhans. *Diabetes* 55:312–317.
13. Beenken-Rothkopf LN, Karfeld-Sulzer LS, Davis NE, et al. (2013) The incorporation of extracellular matrix proteins in protein polymer hydrogels to improve encapsulated beta-cell function. *Ann Clin Lab Sci* 43:111–121.
14. Weber LM, Anseth KS (2008) Hydrogel encapsulation environments functionalized with

- extracellular matrix interactions increase islet insulin secretion. *Matrix Biol* 27:667–673. doi: 10.1016/j.matbio.2008.08.001
15. Huang G, Wang L, Wang S, et al. (2012) Engineering three-dimensional cell mechanical microenvironment with hydrogels. *Biofabrication* 4:042001. doi: 10.1088/1758-5082/4/4/042001
 16. Maia FR, Fonseca KB, Rodrigues G, et al. (2014) Matrix-driven formation of mesenchymal stem cell–extracellular matrix microtissues on soft alginate hydrogels. *Acta Biomater* 10:3197–3208. doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.049
 17. Sun J, Tan H (2013) Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials (Basel)* 6:1285–1309. doi: 10.3390/ma6041285
 18. Ruoslahti E (1996) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:697–715. doi: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.697
 19. Kuehn C, Dubiel EA, Sabra G, Vermette P (2012) Culturing INS-1 cells on CDPGYIGSR-, RGD-and fibronectin surfaces improves insulin secretion and cell proliferation. *Acta Biomater* 8:619–626. doi: 10.1016/j.actbio.2011.10.036
 20. Lim DJ, Antipenko S V., Vines JB, et al. (2013) Improved MIN6 b-Cell function on self-assembled peptide amphiphile nanomatrix inscribed with extracellular matrix-derived cell adhesive ligands. *Macromol Biosci* 13:1404–1412. doi: 10.1002/mabi.201300155
 21. Lee K-M, Jung G-S, Park J-K, et al. (2013) Effects of Arg-Gly-Asp-modified elastin-like polypeptide on pseudoislet formation via up-regulation of cell adhesion molecules and extracellular matrix proteins. *Acta Biomater* 9:5600–5608. doi: 10.1016/j.actbio.2012.10.036
 22. Weber LM, Hayda KN, Haskins K, Anseth KS (2007) The effects of cell-matrix interactions on encapsulated beta-cell function within hydrogels functionalized with matrix-derived adhesive peptides. *Biomaterials* 28:3004–3011. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.03.005
 23. Asfari M, Janjic D, Meda P, et al. (1992) Establishment of 2-Mercaptoethanol-Dependent Differentiated Insulin-Secreting Cell Lines. *Endocrinology* 130:167–178.
 24. Merglen A, Theander S, Rubi B, et al. (2004) Glucose Sensitivity and Metabolism-Secretion Coupling Studied during Two-Year Continuous Culture in INS-1E Insulinoma Cells. *Endocrinology* 145:667–678. doi: 10.1210/en.2003-1099
 25. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ (1999) Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 20:45–53.
 26. Dang TT, Xu Q, Bratlie KM, et al. (2009) Microfabrication of homogenous, asymmetric cell-laden hydrogel capsules. *Biomaterials* 30:6896–6902. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.012
 27. Bloch K, Bloch O, Tarasenko I, et al. (2011) A strategy for the engineering of insulin producing cells with a broad spectrum of defense properties. *Biomaterials* 32:1816–1825. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.11.018
 28. Jacobs-Tulleneers-Thevissen D, Chintinne M, Ling Z, et al. (2013) Sustained function of alginate-encapsulated human islet cell implants in the peritoneal cavity of mice leading to a pilot study in a type 1 diabetic patient. *Diabetologia* 56:1605–1614. doi: 10.1007/s00125-

013-2906-0

29. Maillard E, Sencier M-C, Langlois A, et al. (2009) Extracellular matrix proteins involved in pseudoislets formation. *Islets* 1:232–241. doi: 10.4161/isl.1.3.9754
30. Chowdhury A, Dyachok O, Tengholm A, et al. (2013) Functional differences between aggregated and dispersed insulin-producing cells. *Diabetologia* 56:1557–1568.
31. Collier JH, Segura T (2011) Evolving the use of peptides as components of biomaterials. *Biomaterials* 32:4198–4204. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.02.030
32. McDonagh BH (2012) Optimised Carbodiimide Chemistry for RGD-coupled Alginate. Norwegian University of Science and Technology
33. Krishnamurthy M, Li J, Al-Masri M, Wang R (2008) Expression and function of $\alpha\beta 1$ integrins in pancreatic beta (INS-1) cells. *J Cell Commun Signal* 2:67–79. doi: 10.1007/s12079-008-0030-6
34. Robinson E, Foty R, Corbett S (2004) Fibronectin Matrix Assembly Regulates $\alpha 5\beta 1$ -mediated Cell Cohesion. *Mol Biol Cell* 15:973–981. doi: 10.1091/mbc.E03
35. Fonseca KB, Bidarra SJ, Oliveira MJ, et al. (2011) Molecularly designed alginate hydrogels susceptible to local proteolysis as three-dimensional cellular microenvironments. *Acta Biomater* 7:1674–1682. doi: 10.1016/j.actbio.2010.12

SECÇÃO 2

Co-encapsulamento de células beta INS-1E e nanopartículas contendo GLP-1 em hidrogéis de alginato

1. Introdução

O encapsulamento de células produtoras de insulina em hidrogéis de alginato tem apresentado um enorme potencial, permitindo a imunoprotecção e suporte das células encapsuladas após o transplante para recipientes com diabetes [1]. A facilidade de formar hidrogéis em condições favoráveis à sobrevivência celular e a sua biocompatibilidade fazem do alginato o polímero mais usado para esta aplicação [2]. Um problema ainda por ultrapassar continua a ser a funcionalidade e sobrevivência das células ao longo do tempo [1, 3]. Os hidrogéis evitam o contacto directo com o hospedeiro bem como a passagem de células do sistema imunitário e anticorpos. No entanto, entidades de baixo peso molecular, como as espécies reactivas de oxigénio (ROS) ou as citocinas pró-inflamatórias produzidas na resposta inflamatória ao implante, conseguem atravessar livremente a membrana interagindo com as células encapsuladas causando, em última instância, morte celular [1]. Desta forma, criar estratégias que permitam melhorar a funcionalidade e sobrevivência das células encapsuladas, o objectivo do presente trabalho, é premente para o sucesso desta aplicação. Células mais responsivas e mais resistentes à apoptose garantem a funcionalidade do implante e permitem o recurso a um menor número de células, resolvendo também a questão da falta de dadores.

Um agente terapêutico proposto para aumentar a capacidade insulínica das células beta bem como para as proteger da apoptose é o *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) [4–6]. Esta incretina, produzida nas células L do intestino em resposta ao aumento da ingestão de alimentos, particularmente hidratos de carbono e lípidos, leva ao aumento da secreção de insulina dependente da glicose [4–6]. No pâncreas, a ligação ao seu receptor, para além do seu efeito insulínico, leva a um aumento da neogénese e proliferação das células beta e redução da sua apoptose e ainda à inibição da secreção de glucagon pelas células alfa [4, 6]. Estas acções devem-se ao envolvimento de múltiplas vias intracelulares mediadas maioritariamente pela PI3-K/Akt e cAMP/PKA, como mostra o esquema da Figura 1.

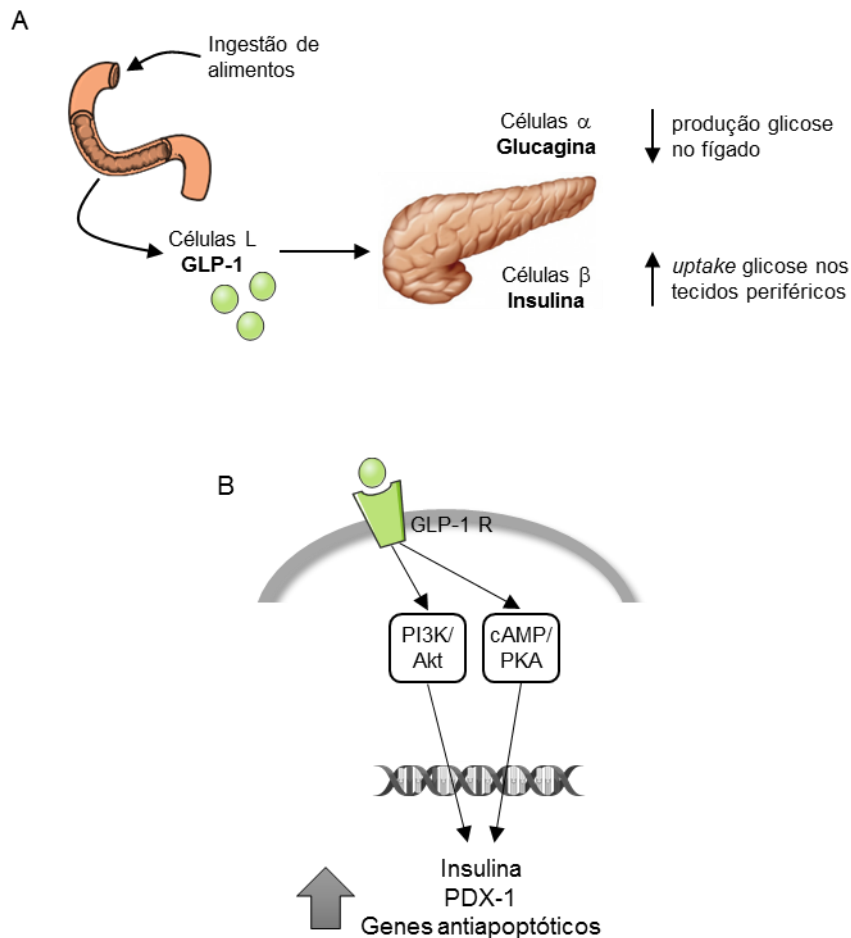


Figura 1: Produção e acção do GLP-1 (A) e seus efeitos intracelulares na célula beta (B). GLP-1 - *glucagon-like peptide-1*; GLP-1R - *glucagon-like peptide-1 receptor*; PI3K/Akt - Fosfatidilinositol-3-cinase/Proteína cinase B; cAMP/PKA - Monofosfato cíclico de adenosina/Proteína cinase A; PDX-1 - *Pancreatic and duodenal homeobox 1*

No âmbito da transplantação de células produtoras de insulina, um estudo *in vivo* revelou que a sinalização mediada pelo receptor do GLP-1 protege as células beta, inibindo a sua apoptose. Esta protecção deveu-se à administração intraperitoneal diária de *exendin-4*, um mimético do GLP-1, após o transplante via intraportal de ilhéus de ratinho para o fígado [7].

O tratamento *in vitro* de ilhéus micro-encapsulados com este mimético também mostrou um aumento da secreção de insulina e da taxa de oxidação da glicose. No entanto, estes efeitos não permaneceram quando os ilhéus foram implantados na cavidade peritoneal de ratinhos diabéticos [8]. Na tentativa de aumentar a estabilidade do GLP-1 no interior do hidrogel, desenvolveram-se conjugados poliméricos com o mesmo, que foram co-encapsulados com ilhéus de rato e avaliados *in vitro*. Embora tenham apresentado resultados promissores, a principal limitação prendeu-se com a aleatoriedade da reacção entre a incretina e os polímeros. Reacções na zona bioactiva do GLP-1 levaram à perda

da sua função [9]. Uma metodologia mais arrojada permitiu o encapsulamento de células beta RIN-m5F e ilhéus de rato num hidrogel de polietilenoglicol (PEG) funcionalizado com GLP-1 [10]. Os autores descrevem a síntese de GLP-1 com um resíduo adicional de cisteína no terminal carboxílico, local onde se dá a fotopolimerização (via tiol-acrilato) com o polietilenoglicol diacrilato (PEGDA). Estes hidrogéis permitiram uma melhoria da secreção de insulina bem como um aumento da sobrevivência celular [10]. Outra metodologia consistiu na modificação genética das células beta para posterior implante, através do aumento da expressão do receptor do GLP-1 nas células beta INS-1E levando à estimulação do gene promotor da insulina [11].

No presente trabalho, propomos uma forma diferente de proporcionar o contacto do GLP-1 com as células beta. O GLP-1 é encapsulado em nanopartículas (NPs) que, por sua vez, são encapsuladas juntamente com as células no hidrogel de alginato (Figura 2). Para o efeito, a incretina foi encapsulada em NPs de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), um dos sistemas mais usados e bem caracterizados para libertação controlada de agentes farmacológicos. Aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), estes sistemas são biocompatíveis e biodegradáveis, permitindo, através do controlo de algumas das propriedades do polímero, controlar a libertação dos agentes farmacológicos [12].

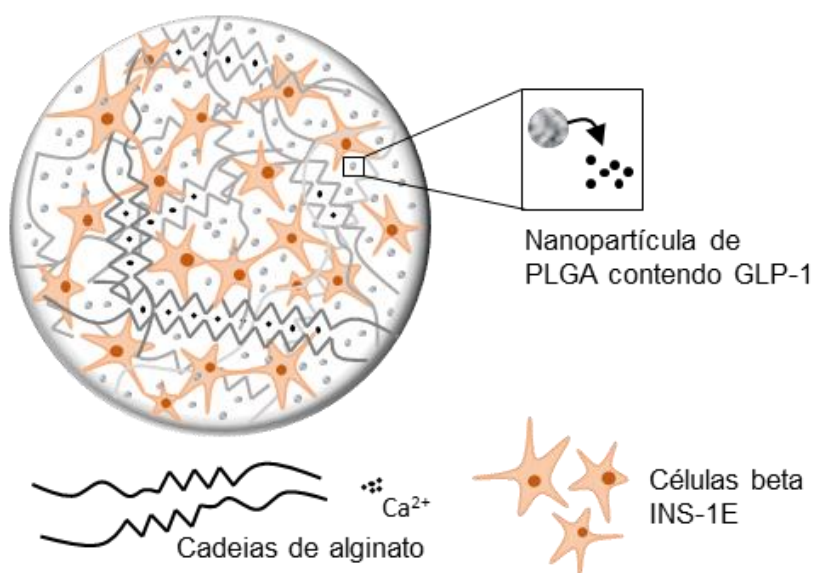


Figura 2: Co-encapsulamento das células beta INS-1E e das nanopartículas contendo GLP-1, em hidrogéis de alginato.

PLGA - ácido poli(láctico-co-glicólico); GLP-1 - *glucagon-like peptide-1*.

Desta forma, a libertação e acção do GLP-1 é restrita ao local de interesse e com a garantia da sua total eficácia, uma vez que a estrutura da incretina não é alterada. Após caracterização das NPs, este trabalho teve como objectivo avaliar o efeito do co-encapsulamento destas com as células beta INS-1E, avaliando a resposta celular *in vitro*.

2. Materiais e métodos

2.1 Preparação das nanopartículas de PLGA contendo GLP-1

As NPs de PLGA foram produzidas através do método de dupla emulsão água/óleo/água (a/o/a) com evaporação do solvente [13], como esquematizado na Figura 3. Todos os parâmetros foram previamente otimizados para o encapsulamento do GLP-1 [14].

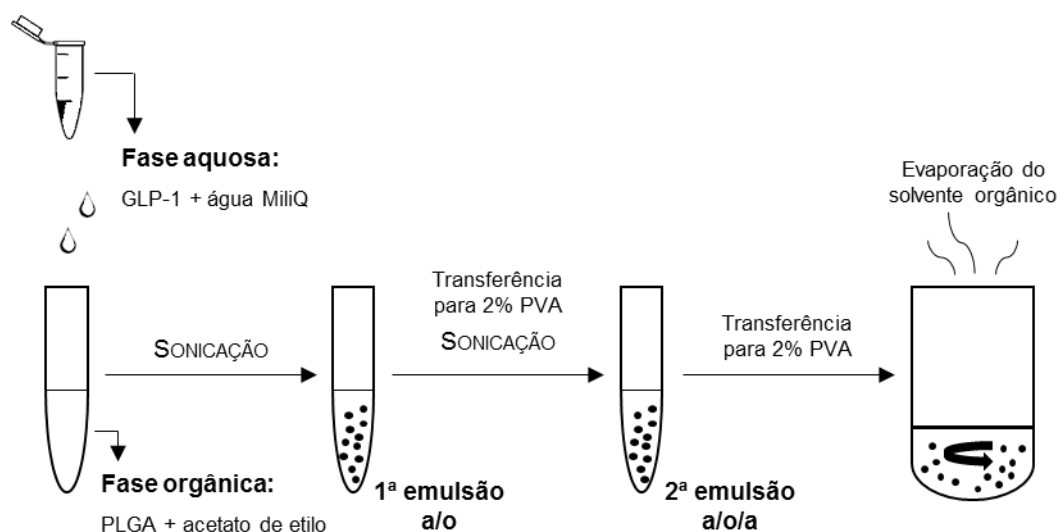


Figura 3: Método de preparação das nanopartículas de PLGA contendo GLP-1.

O polímero de PLGA (*Purasorb PDLG 5004*, Purac Biomateriais) foi dissolvido no solvente orgânico acetato de etilo na concentração de 100 mg/mL e o GLP-1 (Glucagon like peptide-1, United Peptides) em água MiliQ numa concentração de 2,5 mg/mL. A solução do péptido foi adicionada à do polímero seguindo-se um período de sonicação de 30 segundos a 70% de amplitude (*Vibra-Cell™ ultrasonic processor*, Sonics and Materials). A primeira emulsão (a/o) foi então adicionada a 4 mL de solução surfactante de álcool

polivinílico (PVA, 99% hidrolisado, Sigma) a 2% (m/v) em água MiliQ e novamente sonicada durante 30 segundos. Por fim, a segunda emulsão resultante (a/o/a) foi adicionada a 7,5 mL da mesma solução surfactante, permanecendo a agitar (300 rpm) durante 3 horas para a evaporação do solvente orgânico.

As NPs foram lavadas 3 vezes em água MiliQ através de centrifugações a uma rotação de 20 000 g durante 20 minutos, recorrendo a uma ultracentrifuga (*Beckman Avanti J-26 XP*, Beckman Coulter). Depois deste passo, as NPs foram ressuspensas em água MiliQ e guardadas a 4 °C para posterior análise. Para a esterilização, a suspensão das NPs foi exposta à luz ultravioleta durante 20 minutos.

2.2 Caracterização das nanopartículas

2.2.1 *Dynamic light scattering*

Após a produção das NPs, estas foram caracterizadas por *dynamic light scattering* (dispersão dinâmica da luz) através do aparelho Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd) onde foi possível avaliar o seu tamanho médio (nm), o índice de polidispersividade e a sua carga (potencial zeta - mV). Para tal, as amostras foram diluídas em água MiliQ e colocadas nas células de leitura do aparelho, onde foram avaliadas em triplicado, a 25 °C, com um ângulo de detecção de 173°.

2.2.2 *Microscopia electrónica de transmissão*

Para a avaliação da morfologia das NPs bem como a confirmação do seu tamanho, estas foram observadas recorrendo a um Microscópio electrónico de transmissão (TEM FEI-Tecni G2 Spirit Biotwin), com uma tensão de aceleração de 100 kV. Para a preparação das amostras, as NPs foram diluídas em água MiliQ e colocadas a adsorver 5 minutos numa grelha de cobre previamente revestida de *Formvar/Carbon*. O contraste foi feito com a adição de acetato de uranilo a 2% (m/v) durante 1 minuto. Em cada passo, os excessos das soluções foram removidos com papel de filtro e, no final, a grelha foi deixada a secar uns minutos à temperatura ambiente antes da observação ao microscópio.

2.2.3 *Eficiência de encapsulamento do GLP-1*

Foi determinada a eficiência de encapsulamento do GLP-1 com as NPs através do método indirecto, de acordo com a seguinte fórmula:

Eficiência de encapsulamento (%) = [(massa péptido usado - massa péptido no sobrenadante) / péptido usado] x 100.

Os cálculos foram feitos através da diferença entre a massa total de GLP-1 usada para preparar as NPs e a quantidade de GLP-1 que se quantificou na solução aquosa após a lavagem das partículas e centrifugação.

2.2.4 Perfil de libertação do GLP-1 in vitro

Para a avaliação do perfil de libertação do GLP-1 das NPs, foi usada uma quantidade de NPs correspondentes à 50 µg de GLP-1. As NPs foram adicionadas a 25 mL de tampão Tris salino (TBS), suplementado com cálcio - TBS-cálcio (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 7,5 mM CaCl₂, pH=7,6), em constante agitação (150 rpm) e a 37 °C durante 7 dias. No dia 1 foram recolhidas alíquotas (800 µL) da solução com as NPs a diferentes tempos de 1, 5 e 10 horas após o início do ensaio. Nos restantes dias (dia 2 - dia 7) foram recolhidas alíquotas (800 µL) sempre à mesma hora. As amostras foram centrifugadas a 20 000 g durante 20 minutos e o sobrenadante foi guardado para posterior quantificação de GLP-1 através de um Kit comercial (*GLP-1 EIA Kit*, Sigma Aldrich). O *pellet* de NP foi ressuspenso com o mesmo volume de solução (800 µL), pré-aquecida, e voltado a adicionar à solução inicial, mantendo sempre o volume constante e as condições *sink*.

2.3 Cultura celular

As células beta INS-1E foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomomicina, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sódio e 50 µM de β-mercaptoetanol. As células foram mantidas sob atmosfera humidificada, a 37 °C e contendo 5% (v/v) CO₂. O meio de cultura foi mudado duas vezes por semana e a potencial presença de micoplasma regularmente testada. Exceptuando o β-mercaptoetanol, adquirido na Sigma, todos os restantes compostos usados na cultura celular foram adquiridos à Gibco, Life Technologies.

2.4 Citotoxicidade das nanopartículas

Para os testes de citotoxicidade as células INS-1E foram plaquedadas em placas de 96 poços com uma densidade de 2x10⁴ células/poço. Após 24 horas em cultura, o meio foi removido e as células foram incubadas com as NPs em meio, com concentrações de PLGA correspondentes uma gama entre 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 5 mg/mL e 10

mg/mL, pelo período de 24 e 48 horas. Nos diferentes tempos (24h e 48h), a citotoxicidade foi avaliada pela actividade metabólica celular através do ensaio da resazurina. Na mitocôndria, esta molécula é reduzida, na presença de NADPH ou NADH, a resorufina. Desta forma, a quantificação da fluorescência emitida pela resorufina traduz actividade metabólica mitocondrial. No ensaio, as células foram incubadas com resazurina a 20% (v/v) (stock a 0,1 mg/mL) em meio de cultura (200 µL) durante 2 horas a 37 °C, protegidas da luz. Para a leitura, transferiram-se 100 µL do sobrenadante para uma placa de 96 poços preta com fundo transparente (*96-Well Black Clear-Bottom Plate, Costar*) e procedeu-se à leitura da fluorescência num espectrofluorímetro para microplacas (Synergy MX, BioTek Instruments Inc.) com excitação a 530 nm e emissão a 590 nm. Células tratadas com Triton 1% foram usadas como controlo negativo. Todas as leituras foram comparadas com o controlo positivo (células apenas com meio de cultura), considerado com actividade celular de 100%.

2.5. Co-encapsulamento das células INS-1E com as nanopartículas em hidrogéis de alginato

Para o encapsulamento, foi preparada uma solução de alginato de sódio (*PRONOVA Ultrapure Sodium Alginate LVG, NovaMatrix, FCM BioPolymer*), com a concentração final de 2% (m/v), em 0,9% (m/v) de cloreto de sódio (NaCl). A essa solução foram adicionadas as células INS-1E (5×10^6 células/mL) e as NPs contendo GLP-1. A quantidade de NPs foi calculada para que, no final, cada hidrogel de alginato ficasse com aproximadamente 33 nM de GLP-1. Após homogeneização, esta suspensão foi extrudida através de uma agulha de 25G para uma solução gelificante (100 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl). As esferas permaneceram na solução gelificante durante 15 minutos. Após a reticulação e lavagem em meio de cultura, as células encapsuladas nos hidrogéis foram distribuídas por placas de 24 poços (3 esferas/poço) com 500 µL meio/poço e colocadas em cultura. As avaliações do co-encapsulamento das NPs com as células (Alg-GLP1) foram comparadas com a condição controlo, ou seja, sem a adição das NPs (Alg-0).

2.5.1 Actividade metabólica

A actividade metabólica celular foi avaliada nos dias 1, 4 e 7 após o co-encapsulamento através do ensaio da resazurina. Como explicado anteriormente, a fluorescência emitida pela resorufina traduz a actividade metabólica mitocondrial. No ensaio, as esferas (3 esferas/poço) foram incubadas com resazurina a 20% (v/v) (stock a 0,1 mg/mL) em meio de cultura (500 µL) durante 2 horas a 37 °C, protegidas da luz. Para a leitura, transferiu-

se 200 µL do sobrenadante para uma placa de 96 poços preta com fundo transparente (96-well black clear-bottom plate, Costar) e procedeu-se à leitura da fluorescência num espectrofluorímetro para microplacas (Synergy MX, BioTek Instruments Inc) com as seguintes definições: Ex/Em = 530/590 nm.

2.5.2 Secreção de insulina

O teste de secreção de insulina após estímulo com glicose foi realizado às células encapsuladas depois de 4 dias em cultura. Para tal, após a remoção do meio e a lavagem das esferas (3 esferas/poço) com tampão *Krebs-Ringer* modificado (135 mM NaCl, 3,6 mM KCl, 0,5 mM NaH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 1,5 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 0,1% (m/v) BSA, pH=7,4), estas foram incubadas com o mesmo tampão durante 1 hora. Após lavagens, as esferas foram incubadas com o tampão suplementado com glicose (2 mM ou 20 mM) durante 1 hora. Após a incubação, foram recolhidos os sobrenadantes e congelados a -20 °C para posterior quantificação da insulina. Os níveis de insulina foram determinados por ELISA, recorrendo a um *kit* comercial (*Ultrasensitive Rat Insulin ELISA*, Mercodia), seguindo as recomendações do fabricante. A absorvância foi lida a um comprimento de onda de 450 nm, recorrendo a um leitor para microplacas (Synergy MX, BioTek Instruments Inc).

2.6 Análise estatística

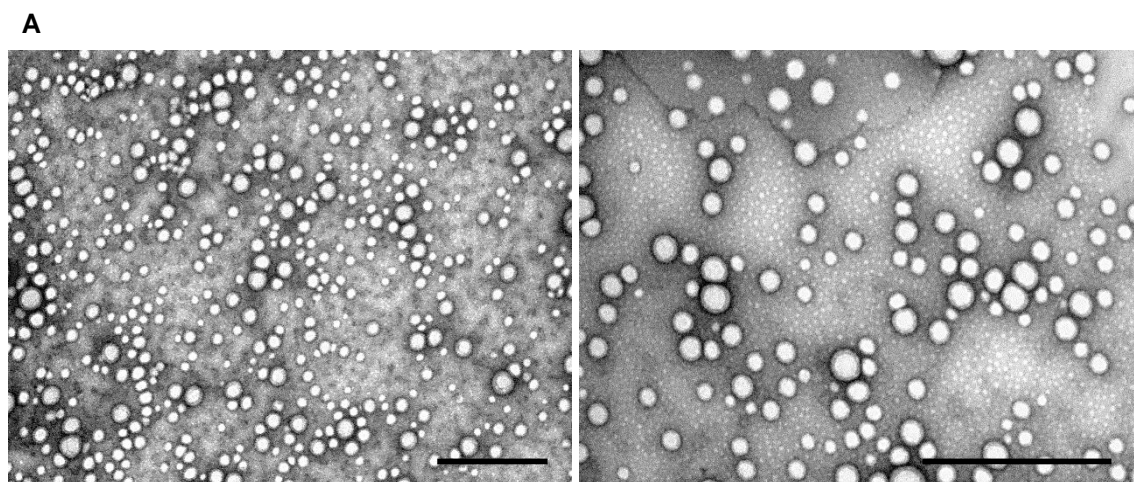
Para a análise estatística, recorreu-se ao programa *GraphPad Prism*. Foi testada a normalidade da distribuição das variáveis com os testes de *Shapiro-Wilk* e *D'Agostino*. As significâncias estatísticas foram determinadas pelo teste *Two-way ANOVA*, seguido da avaliação das comparações múltiplas com os testes *Tukey* ou *Sidak*. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Caracterização das nanopartículas

Após a produção das NPs, estas foram caracterizadas segundo o seu tamanho, polidispersividade e potencial zeta (carga) (Figura 4-B). As NPs apresentaram um

tamanho médio de aproximadamente 170 nm e um baixo valor médio de polidispersividade (0,05). As imagens de microscopia electrónica de transmissão mostram a forma esférica das NPs e confirmam os tamanhos das mesmas (Figura 4-A). A carga superficial, medida pelo potencial zeta médio, é negativa (-24,3 mV).



B

Parâmetros

Tamanho (nm)	$169,3 \pm 3,24$
Índice de polidispersividade	$0,05 \pm 0,01$
Potencial zeta (mV)	$- 24,3 \pm 3,94$

Os valores dizem respeito às médias \pm erro padrão da média, correspondentes a 5 formulações diferentes de nanopartículas de PLGA.

Figura 4: (A) Imagens de microscopia electrónica de transmissão das nanopartículas de PLGA. As barras correspondem a 1000 nm. (B) Tamanho, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas, obtidos por *dynamic light scattering*.

A eficiência de encapsulamento média do GLP-1 nas NPs de PLGA foi de 65,4% (Figura 5-A), próximo do valor reportado anteriormente para o GLP-1 nestas NPs [14]. O perfil de libertação do GLP-1 pelas NPs mostrou um aumento gradual da libertação ao longo dos dias, atingindo 71% de libertação 7 dias após o início do estudo (Figura 5-B).

A

Parâmetro	
Eficiência de encapsulamento (%)	65,4 ± 11,5

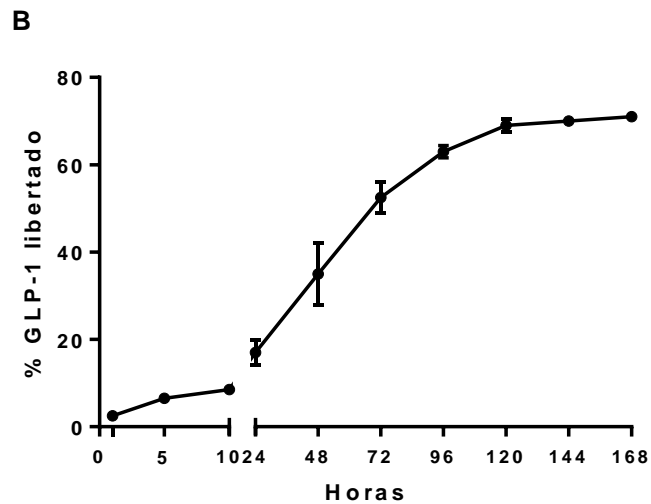


Figura 5: (A) Eficiência de encapsulamento do GLP-1 nas nanopartículas (n=3). (B) Perfil de liberação do péptido GLP-1 (n=2). Os valores são apresentados pela média ± DP.

3.2 Citotoxicidade das nanopartículas

A citotoxicidade foi avaliada pela actividade metabólica das células beta INS-1E em monocamada, após 24 e 48 horas de exposição a concentrações crescentes de NPs de PLGA. Como podemos observar na Figura 6, após 24 horas de exposição às NPs, não houve alteração da actividade metabólica em nenhuma das concentrações testadas. Após a exposição mais prolongada (48h), apenas a concentração de 10 mg/mL induziu um decréscimo de 12% na actividade metabólica das células, comparando com as células controlo não tratadas ($p < 0,05$). Ainda assim, a actividade metabólica apresentada é sempre superior a 85% o que representa um nível de toxicidade muito baixo.

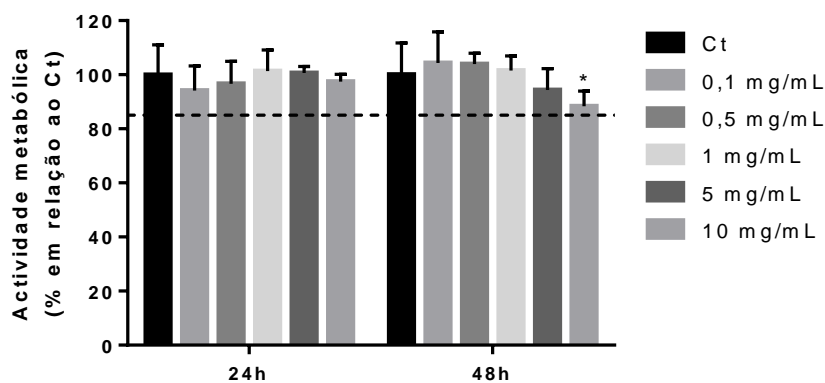


Figura 6: Actividade metabólica das células beta INS-1E após exposição a diferentes concentrações de PLGA (0,1 - 10mg/mL) durante 24 e 48 horas. Para a determinação da actividade metabólica, recorreu-se ao ensaio da resazurina. Os valores estão representados pela média da percentagem em relação ao controlo (células apenas com meio de cultura) \pm DP (n=7). * $p < 0,05$ vs. o respectivo controlo (Ct).

3.3 Efeito do co-encapsulamento das nanopartículas contendo GLP-1 na actividade metabólica e secreção de insulina das células INS-1E

A actividade metabólica, traduzida pelo aumento da fluorescência da resorufina, mostrou, em todos os tempos avaliados, um aumento estatisticamente significativo nas células que foram co-encapsuladas com as NPs contendo GLP-1 (Alg-GLP1), comparando com as que foram encapsuladas isoladamente (Alg-0). As diferenças foram mais pronunciadas nos dias 1 e 4 ($p < 0,001$) e menos no último dia da experiência, dia 7 ($p < 0,05$) (Figura 7). Desta forma, na condição Alg-GLP1 o aumento da actividade metabólica ao longo do tempo em cultura é estatisticamente significativo entre os diferentes dias ($p < 0,001$). Por outro lado, na condição Alg-0, o aumento da actividade metabólica é mais lento e apenas encontramos diferenças estatisticamente significativas no dia 7 ($p < 0,001$ comparando com o dia 1 e $p < 0,05$ comparando com o dia 4).

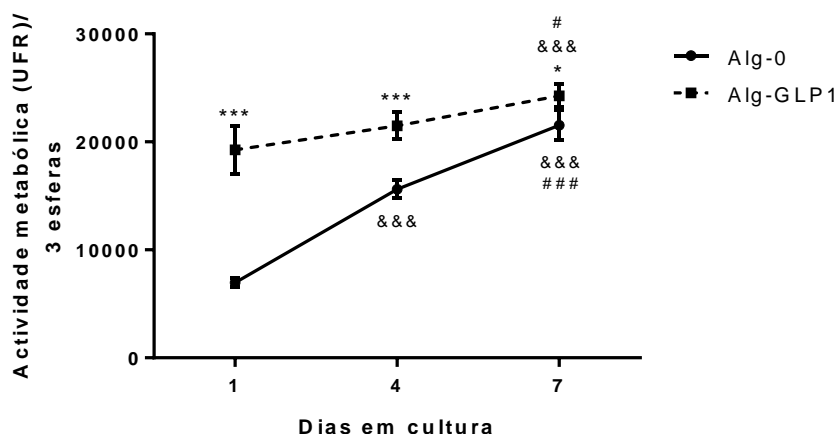


Figura 7: Efeito da presença das nanopartículas de GLP-1 na actividade metabólica das células beta INS-1E encapsuladas durante 7 dias em cultura. A actividade metabólica foi avaliada pelo método da resazurina e medido em RFU (*resazurin fluorescence units*). Os resultados são representados pela média \pm DP ($n=3,4$). * $p<0,05$ e *** $p<0,001$ entre Alg-0 e Alg-GLP1; &&& $p<0,001$ entre os dias 4 e 7 e o dia 1 e # $p<0,05$ ### $p<0,001$ entre o dia 7 e o dia 4.

Relativamente à capacidade de secreção de insulina (Figura 8), as células de ambas as condições (Alg-0 e Alg-GLP1), quando estimuladas com uma concentração elevada de glicose (20 mM), responderam com um aumento na secreção da insulina, embora este seja apenas estatisticamente significativo ($p<0,01$) na condição Alg-GLP1. Mais ainda, as células co-encapsuladas com as NPs com GLP-1 (Alg-GLP1) mostraram um aumento de 5,7 vezes nos níveis de insulina, comparando com o estímulo de 2 mM, enquanto as células da condição controlo (Alg-0) aumentaram os valores apenas 1,8 vezes em relação ao estímulo de 2 mM. Este aumento da resposta secretora entre as duas condições (Alg-0 e Alg-GLP1) é estatisticamente significativo ($p<0,001$).

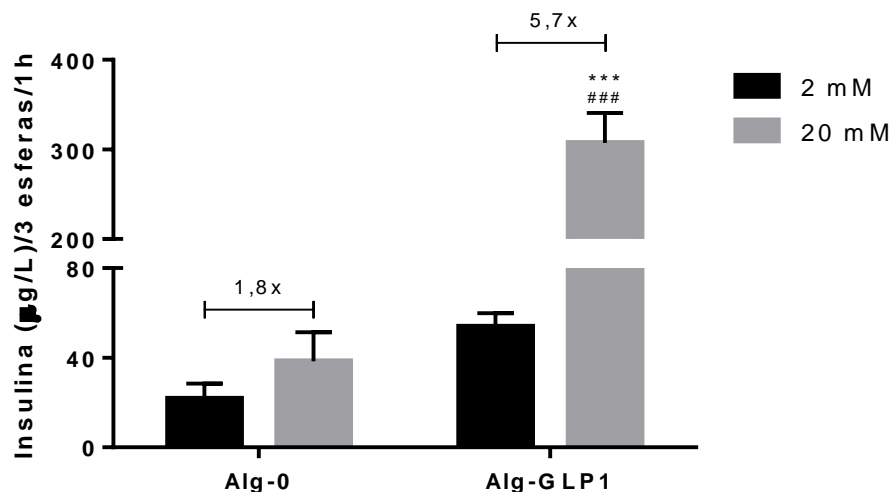


Figura 8: Efeito da presença das nanopartículas de GLP-1 na secreção de insulina das células INS-1E. O teste de secreção de insulina após estímulo com glicose (2 mM e 20 mM) foi efectuado ao dia 4 da cultura celular e os níveis de insulina determinados por ELISA. Os resultados são representados pela média \pm DP (n=3,5). ***p<0,001 entre Alg-GLP1 e Alg-0 e ### p<0,001 entre 2 mM e 20 mM.

4. Discussão

Melhorar a secreção de insulina e melhorar a resistência à apoptose das células beta imobilizadas é apostar na melhor funcionalidade e na maior longevidade dos implantes para o tratamento da diabetes. O uso do GLP-1 já foi avaliado nesta aplicação, embora com algumas limitações [9, 10, 15]. Nos trabalhos reportados, o péptido é aprisionado quimicamente a um polímero, quer seja o polímero usado como estabilizador do GLP-1 [9, 15] ou o polímero que encapsula as células beta [10], podendo acarretar problemas para a funcionalidade da incretina. Na metodologia que propomos, uma vez que apenas ocorre um aprisionamento físico, certificamo-nos que não há qualquer alteração no local activo do GLP-1 que possa inviabilizar a sua função. Mesmo garantindo que a reacção química não ocorre aleatoriamente, mas num resíduo adicional do GLP-1, como garante Lin e seus colaboradores [10], postulamos que a libertação do GLP-1 das NPs, como propomos na nossa metodologia, facilita a ligação aos seus receptores e a sua consequente acção. Esta metodologia permite então acrescentar bioactividade às esferas de alginato sem prejuízo na capacidade de reticulação do alginato, dado não haver alterações químicas do polímero, nem no tamanho final dos hidrogéis, uma vez que estamos a introduzir elementos a uma escala nanométrica.

O método da dupla emulsão água/óleo/água com evaporação do solvente permitiu preparar NPs com tamanhos monodispersos, garantindo uma maior uniformidade no comportamento das mesmas no que respeita ao perfil de libertação [16]. A geometria esférica resultante do método também influencia positivamente à interacção das partículas com as células [14]. Este método e o uso de acetato de etilo como solvente orgânico permitiram ainda uma eficiência de encapsulamento superior à já descrita para outras proteínas como a insulina [14].

Neste trabalho, a avaliação do perfil de libertação do GLP-1 das NPs pretende ser mais um parâmetro da sua caracterização que, no entanto, poderá não traduzir o perfil de libertação das NPs no sistema que propomos. Neste, estando encapsuladas juntamente com as células numa rede de alginato, as NPs estarão mais protegidas, facto que poderá influenciar a sua taxa de libertação, possivelmente reduzindo-a, e prolongando assim o tempo de acção da incretina. As NPs poderão ainda interagir com as células, questão que também influencia o seu perfil de libertação. Embora não tenha sido possível caracterizar detalhadamente este perfil, podemos facilmente garantir que o GLP-1 está a ser libertado e a actuar nas células encapsuladas, uma vez que os seus efeitos nas mesmas são visíveis. Comparando com a condição controlo (Alg-0), as células co-encapsuladas com as NPs contendo GLP-1 (Alg-GLP-1), aumentam a sua actividade metabólica e a sua função insulino-secretora, efeitos já reportados noutros sistemas [6, 17, 18]. Estes efeitos são obtidos com uma concentração de PLGA por poço quase 1000 vezes inferior (e com uma quantidade de PLGA por célula também menor, pois estamos na presença de um maior número de células por poço) àquela que se revelou citotóxica. O aumento da actividade metabólica das células co-encapsuladas com as NPs, observado ao longo do tempo em cultura, também comprova a biocompatibilidade das mesmas no sistema estudado.

Acredita-se que o GLP-1 se vá libertando ao longo de todo o período experimental, ocorrendo libertação logo após as primeiras 24 horas em cultura. Nesse momento, a actividade metabólica das células é superior à situação controlo, mantendo-se essa tendência de crescimento e superioridade até ao dia 7. O aumento da actividade metabólica observado deverá traduzir um aumento da proliferação celular, que poderá ser confirmada pela quantificação do DNA numa experiência futura. A proliferação celular é uma consequência da acção do GLP-1 mediada pela activação da proteína cinase B, já descrita em estudos anteriores nesta linha celular [17]. Neste estudo, Wang demonstrou que as células beta INS-1 proliferam proporcionalmente à exposição a concentrações crescentes de GLP-1 entre 1 mM e 100 mM [17]. No nosso sistema, embora não tenha sido possível clarificar num preciso momento a que concentração de GLP-1 as células estão expostas, sabe-se que, por poço, a quantidade de GLP-1 encapsulada é de 100

mM, distribuído pelas partículas de 3 esferas (≈ 33 mM GLP-1/esfera). No entanto, indirectamente conseguiu-se perceber que houve libertação do péptido e que a concentração é causal, quer na actividade metabólica quer na secreção de insulina. No dia 4, verificou-se que a capacidade secretora das células expostas ao GLP-1 mostra, em média, três vezes maior eficiência quando comparada com as células da situação controlo. Quando estimuladas pela concentração de glicose de 20 mM as células encapsuladas em Alg-GLP1 aumentaram os níveis de insulina 5,7 vezes em relação à concentração de glicose de 2 mM, enquanto as células encapsuladas em Agl-0 aumentaram 1,8 vezes para o mesmo estímulo. Os níveis superiores de insulina observados nas células co-encapsuladas com as nanopartículas (Alg-GLP1) poderão dever-se ao maior número de células por poço, como se pode inferir da actividade metabólica medida nesse dia. A melhoria da secreção da insulina dependente da glicose foi já confirmada nesta linha celular após exposição a 10 nM de GLP-1 [18] e está descrito noutras linhas de células beta, em ilhéus e em modelos animais [4, 6], resultado da consequente elevação do cAMP e subsequente activação da PKA [4–6]. Também num sistema reportado por Lin, as células encapsuladas com o PEG/GLP-1 aumentam significativamente a secreção de insulina a partir de concentrações do GLP-1C de 1 μ M [10]. Uma vez mais, não se conseguiu clarificar a concentração de GLP-1 que levou ao aumento pronunciado da secreção de insulina, mas pode-se afirmar que é mais baixa que 1 μ M reportado no sistema de Lin. No ensaio de libertação *in vitro*, no dia 4, as NPs já tinham libertado aproximadamente 65% do seu conteúdo, mas, como discutido anteriormente, esse dado poderá não traduzir a taxa de libertação do péptido no sistema que criámos. Ensaio futuros serão necessários para caracterizar de uma forma directa a libertação da incretina após o encapsulamento das nanopartículas NPs nos hidrogéis de alginato.

Mais experiências são também necessárias para esclarecer se as NPs ficam retidas na malha do alginato e se é o péptido que, após ser libertado, vai interagir com as células ou se, pelo tamanho nanométrico das partículas e pela sua geometria esférica, estas conseguem mover-se e interagir com as células, libertando o seu conteúdo no interior das mesmas. Resultados preliminares que necessitam de ser validados mostram, através de microscopia electrónica de transmissão, a ocorrência dos dois cenários: NPs fora e dentro das células. Qualquer que seja o cenário, a libertação é feita *in loco*, e o GLP-1 terá uma acção parácrina ou mesmo autócrina, contrariamente ao que acontece em ambiente fisiológico. Fisiologicamente, após a secreção pelas células L intestinais, a incretina entra na circulação sanguínea onde tem um tempo de semi-vida de apenas 2 minutos [6]. A passagem pelo fígado e a acção da enzima DPP-4 são as responsáveis pela sua

degradação rápida, tendo sido já demonstrado que a inibição da acção desta enzima traduz-se numa melhoria da secreção de insulina dependente da glicose [6].

Concluindo, o presente trabalho permitiu criar um novo sistema que possibilita a melhoria da viabilidade das células beta, traduzida na secreção aumentada de insulina. Com esta metodologia poderá ser possível ajustar o tempo de libertação do agente terapêutico para períodos prolongados, dependentes da taxa de degradação das NPs. Estando encapsulado nas mesmas, o GLP-1 não sofre modificações químicas que poderiam levar à perda da sua função. Por outro lado, este método não descarta a essencial protecção por parte do hidrogel de alginato que encapsula as células, crucial para a sobrevivência celular após o implante. O hidrogel não é alterado, não sendo perturbada a sua capacidade de reticulação e interacção com as células encapsuladas. Este sistema é versátil e poderá ser usado para encapsular diferentes agentes farmacológicos em NPs que são co-encapsuladas com as células alvo. Desta forma, garantimos que a libertação é feita *in loco*, nas células alvo ou na sua periferia. A degradação das NPs pode ser modulada, mas a possibilidade de perder o agente farmacológico antes do contacto com as células alvo é completamente abolida neste tipo de sistema.

5. Referências bibliográficas

1. Crisóstomo J, Coelho J, Seíça R (2013) Bioartificial Pancreas: In the Road to Clinical Application. In: Coelho J (ed) Drug Deliv. Syst. Adv. Technol. Potentially Apl. Pers. Treat. Springer, pp 127–151
2. Sun J, Tan H (2013) Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials (Basel)* 6:1285–1309. doi: 10.3390/ma6041285
3. Vaithilingam V, Tuch BE (2011) Islet transplantation and encapsulation: An update on recent developments. *Rev Diabet Stud* 8:51–67. doi: 10.1900/RDS.2011.8.51
4. Brubaker P, Drucker D (2004) Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. *Endocrinology* 145:2653–2659. doi: 10.1210/en.2004-0015
5. Puddu A, Sanguineti R, Mach F, et al. (2013) Update on the protective molecular pathways improving pancreatic beta-cell dysfunction. *Mediators Inflamm.* doi: 10.1155/2013/750540
6. Holst JJ (2007) The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. *Physiol Rev* 87:1409–1439. doi: 10.1152/physrev.00034.2006.
7. Toyoda K, Okitsu T, Yamane S, et al. (2008) GLP-1 receptor signaling protects pancreatic beta cells in intraportal islet transplant by inhibiting apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 367:793–798. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.01.046
8. Bohman S, Waern I, Andersson A, King A (2007) Transient beneficial effects of exendin-4 treatment on the function of microencapsulated mouse pancreatic islets. *Cell Transplant* 16:15–22.
9. Kim S, Wan Kim S, Bae YH (2005) Synthesis, bioactivity and specificity of glucagon-like peptide-1 (7-37)/polymer conjugate to isolated rat islets. *Biomaterials* 26:3597–3606. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.09.045
10. Lin CC, Anseth KS (2009) Glucagon-like peptide-1 functionalized PEG hydrogels promote survival and function of encapsulated pancreatic beta-cells. *Biomacromolecules* 10:2460–2467. doi: 10.1021/bm900420f
11. Chepurny OG, Holz GG (2002) Over-expression of the glucagon-like peptide-1 receptor on INS-1 cells confers autocrine stimulation of insulin gene promoter activity: a strategy for production of pancreatic beta-cell lines for use in transplantation. *Cell Tissue Res* 307:191–201. doi: 10.1007/s00441-001-0494-7
12. Sadat TM, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, et al. (2014) PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pacific J Cancer Prev* 15:517–535. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.2.517
13. Vauthier C, Bouchemal K (2009) Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm Res* 26:1025–1058. doi: 10.1007/s11095-008-9800-3
14. Araújo F, Shrestha N, Shahbazi M-A, et al. (2014) The impact of nanoparticles on the mucosal translocation and transport of GLP-1 across the intestinal epithelium. *Biomaterials* 35:9199–9207. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.07.026

15. Kim S, Bae Y (2004) Long-term insulinotropic activity of glucagon-like peptide-1/polymer conjugate on islet microcapsules. *Tissue Eng* 10:1607–1616.
16. Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A (2011) The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems - A review. *Int J Pharm* 415:34–52. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.05.049
17. Wang Q, Li L, Xu E, et al. (2004) Glucagon-like peptide-1 regulates proliferation and apoptosis via activation of protein kinase B in pancreatic INS-1 beta cells. *Diabetologia* 47:478–487. doi: 10.1007/s00125-004-1327-5
18. Luo G, Kong X, Lu L, et al. (2013) Glucagon-like peptide 1 potentiates glucotoxicity-diminished insulin secretion via stimulation of cAMP-PKA signaling in INS-1E cells and mouse islets. *Int J Biochem Cell Biol* 45:483–490. doi: 10.1016/j.biocel.2012.11.016

CAPÍTULO 4

**Efeito do implante de células beta INS-1E,
encapsuladas em alginato funcionalizado com o
péptido RGD, num modelo de diabetes tipo 2**

1. Introdução

É vasta a literatura e promissores os resultados da terapia de transplantação de ilhéus de Langerhans encapsulados para o tratamento da diabetes [1]. Inicialmente, os estudos *in vitro* confirmaram a sua potencialidade, demonstrando a capacidade das células produzirem insulina enquanto permaneciam protegidas das agressões do exterior [1–3]. Seguiram-se os ensaios *in vivo* em vários modelos animais que abriram as portas aos testes em humanos, que aproximam cada vez mais este método inovador da prática clínica [2, 4]. Desde as primeiras experiências com o alginato [5], este polímero natural tem sido o mais explorado para esta aplicação [6].

Uma revisão na literatura permite observar que, em todos os casos da aplicação desta metodologia, o recipiente reportado é sempre um modelo de diabetes tipo 1 [1–3, 7–9]. Esta patologia é caracterizada pela completa supressão da secreção de insulina, pelo que a terapêutica passa obrigatoriamente pela administração desta hormona. Com a transplantação dos ilhéus encapsulados e enquanto o implante mantiver a sua funcionalidade, uma redução ou a eliminação da administração exógena da insulina pode ser atingida [1, 2]. Até ao momento, não encontramos referência à avaliação desta metodologia na diabetes tipo 2. A intervenção clínica neste tipo de diabetes recorre maioritariamente ao uso dos antidiabéticos orais [10]. No entanto, certas correntes defendem o benefício da administração de insulina numa fase precoce da doença [11], permitindo um melhor controlo glicémico que evita ou leva a um atraso das complicações associadas a estadios avançados da doença. Mais vulgarmente, as opções terapêuticas passam pela associação dos antidiabéticos orais e administração da insulina e, por fim, quando o pâncreas endócrino entra em falência, a administração da hormona torna-se obrigatória para a sobrevivência do doente [11, 12]. Este cenário encorajou-nos a avaliar a potencialidade do pâncreas bio-artificial num modelo de diabetes tipo 2. Para tal recorreremos aos ratos Goto-Kakizaki (GK), um modelo genético de diabetes tipo 2 não obesa em que predominam alterações estruturais e funcionais da célula beta pancreática. Outro aspecto que também gostaríamos de clarificar com esta experiência diz respeito ao uso de células beta individualizadas em alternativa ao uso de ilhéus. Estes são estruturas altamente especializadas na secreção de insulina e a sua composição em diferentes tipos celulares é importante para o complexo mecanismo de regulação da secreção de insulina [2]. No entanto, como sabemos, um dos problemas que limita o transplante de ilhéus prende-se com a carência de dadores alogénicos, pelo que a transplantação de ilhéus xenogénicos ou ainda a transplantação de células beta individualizadas, quer imortalizadas, derivadas de células estaminais ou de processos de reprogramação celular, são soluções a considerar [2, 13]. Neste campo das células beta individualizadas,

dada a possibilidade de serem uma fonte celular inesgotável, é importante caracterizar o seu comportamento e criar um nicho que permita a manutenção da sua viabilidade e função secretora semelhante aos ilhéus. Um estudo deste ano de Vegas e seus colaboradores demonstrou, pela primeira vez, um controlo glicémico prolongado em ratinhos imunocompetentes com diabetes tipo 1, após o implante de células beta humanas derivadas de células estaminais embrionárias, encapsuladas em hidrogéis de alginato [14]. Dada a intensa investigação nesta área, depois deste resultado *in vivo* promissor e ainda impulsionados pelos resultados positivos que descrevemos *in vitro*, foi também nosso objectivo avaliar o comportamento do implante alogénico de uma linha de células beta em ratos diabéticos. Para tal, usaram-se as células beta INS-1E que possuem uma capacidade de resposta às alterações fisiológicas da concentração de glicose, muito semelhante à de ilhéus de rato [15].

As células INS-1E foram então encapsuladas em hidrogéis de alginato funcionalizado com o péptido de adesão RGD e posteriormente implantadas nos animais. O perfil glicémico dos animais foi avaliado ao longo de 21 dias após o implante e, no final, foram efectuadas análises histológicas para melhor caracterizar o implante e a sua interacção com os tecidos adjacentes e, assim, perceber a sua potencialidade neste modelo animal.

2. Materiais e métodos

2.1 Modelos animais

Para testar a resposta das células encapsuladas após o implante, recorreu-se a um modelo animal de diabetes tipo 2 não obesa, os ratos Goto-Kakizaki (GK), com idades compreendidas entre as 22 e 26 semanas. O modelo de ratos Wistar (W) serviu como o grupo controlo de ratos saudáveis. Os dois modelos animais são provenientes de colónias locais (Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra), mantidas sob temperatura e humidade controladas (22-24 °C e 50-60%, respectivamente), ventilação adequada (12 renovações de ar/hora) e ciclos alternados (12h) de luz e obscuridade. Os animais tiveram livre acesso à ração (dieta standard laboratorial AO3; Panlab) e água. Todos os protocolos experimentais envolvendo os animais foram aprovados pela Comissão de Ética local e estão de acordo com os protocolos internacionais de manutenção e utilização de animais de laboratório.

Os ratos GK foram divididos em 3 grupos experimentais: GK controlo não operados - GKc (n=4), GK implantados com esferas de alginato-RGD (veículo) - GKv (n=3) e GK

implantados com células beta INS-1E encapsuladas em esferas de alginato-RGD - GKI (n=3). Como referido anteriormente, os ratos Wistar foram os controlos saudáveis do estudo - Wc (n=4).

2.2 Cultura celular

As células beta INS-1E foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sódio e 50 µM de β-mercaptoetanol. As células foram mantidas sob atmosfera humidificada, a 37 °C e contendo 5% (v/v) CO₂. O meio de cultura foi mudado duas vezes por semana e a potencial presença de micoplasma regularmente testada. Exceptuando o β-mercaptoetanol, adquirido na Sigma, todos os restantes compostos usados na cultura celular foram adquiridos à Gibco, Life Technologies

2.3 Encapsulamento das células INS-1E em hidrogéis de alginato-RGD

Para o encapsulamento das células, foi preparada uma solução de alginato de sódio (*PRONOVA Ultrapure Sodium Alginate LVG*, NovaMatrix, FCM BioPolymer) com a concentração final de 2% (m/v) em 0,9% (m/v) de cloreto de sódio (NaCl). A solução de alginato continha uma mistura de alginato modificado com RGD e alginato não modificado, de forma a obter uma concentração final de péptido de 200 µM. O péptido RGD foi ligado covalentemente à cadeia de alginato, recorrendo à química das carbodiimidias, como descrito em detalhe no Capítulo 3 - Secção 1. Para o encapsulamento, 5x10⁶ células INS-1E/mL foram suspensas na solução de alginato, que foi extrudida através de uma agulha de 25 G para uma solução gelificante (100 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl). As esferas permaneceram na solução gelificante durante 15 minutos. Após a reticulação e lavagem em meio de cultura, as células encapsuladas nos hidrogéis foram distribuídas por placas de 24 poços com 500 µL meio/poço e colocadas em cultura durante 24 horas, até ao seu implante.

2.4 Procedimento cirúrgico para o implante das células beta encapsuladas

Para o implante, os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com cloridrato de quetamina (Parke-Davis) e cloridrato de clorpromazina (Laboratórios Vitória) nas doses de 75 mg/Kg e 3 mg/Kg, respectivamente.

Após tricotomia e esterilização da zona anterior do dorso do animal, foi feita uma incisão transversal interescapular com aproximadamente 2 cm e exposta uma pequena loca subcutânea, (entre o tecido celular subcutâneo e o músculo *trapezius*). As esferas foram inseridas nesta loca com a ajuda de uma pequena espátula, a que se seguiu o encerramento da parede dorsal com sutura contínua utilizando linha 2/0, e desinfecção posterior com betadine (Figura 1).

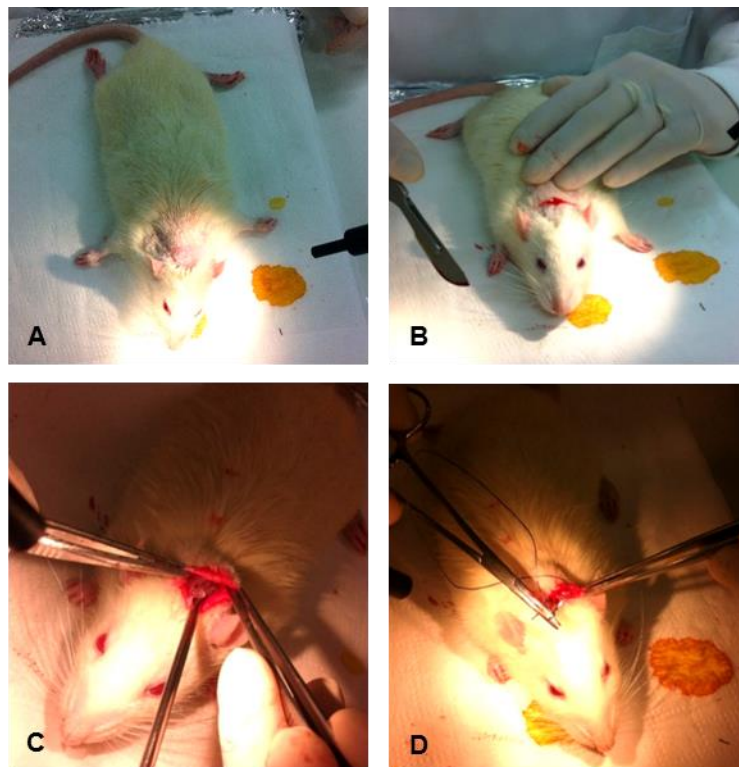


Figura 1: Procedimento operatório para o implante das esferas. (A) Animal tricotomizado e desinfectado; (B) incisão transversal interescapular; (C) introdução das esferas na loca subcutânea e (D) sutura contínua da parede dorsal.

Cada animal (grupo GKi) foi implantado com cerca de 100 esferas de 2 mm cada, contendo no seu total uma densidade celular de 5 milhões. Os ratos GK veículo (grupo GKv) sofreram o mesmo procedimento, tendo sido implantados com o mesmo número de esferas, sem células.

2.5. Avaliações *in vivo*

2.5.1 *Peso corporal, ingestão de água e ração*

O peso corporal (gramas) foi determinado nos animais, em jejum (de 6h), no início do estudo e 21 dias após a implantação. Foi também monitorizada ao longo do período experimental a água (ml) e a ração (g) ingeridas diariamente por cada rato.

2.5.2 *Glicemia ocasional e em jejum*

As concentrações sanguíneas de glicose (mg/dL) foram determinadas no sangue total da veia da cauda, através do método da glicose-oxidase, utilizando um glicómetro e tiras-teste (Glucometer Elite - Bayer SA). Foram avaliadas as glicemias ocasionais, sempre à mesma hora (10h), antes da implantação (dia 0) e nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 14, 18 e 21 após o implante. Nos dias 0, 7 e 21 foi igualmente avaliada a glicemia em jejum (6 horas de jejum).

2.5.3 *Prova de tolerância à glicose por via intraperitoneal (PTGIP)*

Antes da implantação (dia 0) e 7 dias depois, posteriormente à avaliação da glicemia em jejum, os animais foram submetidos a uma prova de tolerância à glicose por via intraperitoneal. Para tal, foram medidos os níveis de glicose no sangue aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após administração intraperitoneal de glicose na dose de 1,8 g/Kg de peso.

2.6 Recolha das amostras

2.6.1 *Colheita de sangue*

As colheitas de sangue foram realizadas no final do período experimental (aos 21 dias), por punção cardíaca, nos animais submetidos a jejum de 6 horas e anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de quetamina e cloridrato de clorpromazina nas doses anteriormente referidas. Para a separação do soro e do plasma foram utilizados, respectivamente, tubos *BD Vacutainer* e *BD Vacutainer K3E* com 5,4mg de EDTA (BD Vacutainer). O sangue foi centrifugado (3500 g, 10 min, 4 °C) e o soro e o plasma foram aliquotados e guardados a - 80 °C para posterior análise.

2.6.2 Remoção do implante e tecidos adjacentes

Após a colheita de sangue, os animais (grupos GKi e GKv) foram sacrificados por deslocamento cervical e o implante foi removido juntamente com o tecido adjacente (pele, tecido celular subcutâneo e músculo) e imediatamente fixado em paraformaldeído (PFA) a 4% (v/v) em tampão Tris salino, suplementado com cálcio - TBS-cálcio (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 7,5 mM CaCl₂, pH 7,6).

2.7 Bioquímica do sangue

De forma a excluir repercussões renais e hepáticas decorrentes do implante, foram calculadas, através de um analisador automático (Olympus Diagnóstica, Produtos de Diagnóstico SA), as concentrações sanguíneas, em jejum, dos seguintes parâmetros: azoto ureico, creatinina, uratos, proteínas totais e albumina; alanina aminotransferase - ALT, aspartato aminotransferase - AST, fosfatase alcalina e bilirrubina total.

2.8 Insulinemia e índices de insulino-resistência e insulino-sensibilidade

Os níveis plasmáticos de insulina foram determinados pela técnica de ELISA, utilizando o *kit* comercial *Ultrasensitive Rat Insulin ELISA* (Mercodia), seguindo as recomendações do fabricante. A absorvância foi lida a um comprimento de onda de 450 nm, recorrendo a um leitor para microplacas (Synergy MX, BioTek Instruments Inc).

Os índices de insulino-resistência (HOMA) e insulino-sensibilidade (QUICKI) foram calculados de acordo com as seguintes equações:

$$HOMA = (\text{Insulinemia do jejum } (\mu\text{U/mL}) \times \text{Glicemia de jejum } (\text{mmol/L}) / 22,5$$

$$QUICKI = 1 / [\log (\text{Insulinemia do jejum } (\mu\text{U/mL})) + \log (\text{Glicemia do jejum } (\text{mg/dL}))]$$

2.9 Análise histológica

O tecido fixado foi posteriormente processado, sendo submetido a tratamentos sequenciais: desidratação em etanol, clarificação com xilol e impregnação em parafina líquida. Após a solidificação da parafina, os blocos resultantes foram seccionados, obtendo cortes histológicos seriados de 3 µm de espessura para posterior análise. Os cortes foram desparafinados com xilol e posteriormente hidratados com concentrações decrescentes de etanol (100%, 70%, 50%) e finalmente com água. Posteriormente foram aplicadas as diferentes técnicas de coloração histológica e imunohistoquímica. No final de todos os procedimentos, procedeu-se à montagem dos cortes histológicos com meio de montagem aquoso. Nas análises com menor ampliação foi utilizada o Microscópio

estereoscópico *SteREO Discovery V8*, Zeiss e nas de maior ampliação, o Microscópio *Axio Lab. A1*, Zeiss.

2.9.1 Métodos de Hematoxilina-Eosina e Tricrómio de Masson

Para avaliar as características básicas estruturais dos tecidos, recorreu-se ao método da Hematoxilina-Eosina (HE) [16]. Neste método de coloração de rotina, a Hematoxilina cora de azul os núcleos das células e a Eosina cora de rosa o citoplasma.

Para a identificação do colagénio, recorreu-se ao método do Tricrómio de Masson (TM) [16]. O corante *Light Green* cora o colagénio de verde, contrastando com as restantes estruturas coradas com Hematoxilina (núcleos azuis) e com Ponceu-Fuscina (coloração vermelha do citoplasma e dos eritrócitos).

2.9.2 Imunomarcação de insulina, células endoteliais e macrófagos

Para as imunomarcações da insulina, das células endoteliais e dos macrófagos, usaram-se anticorpos específicos, detectados através do uso do *kit* de detecção *MultiView mouse-HRP/rabbit-AP IHC* (Enzo). Resumidamente, após desparafinação e hidratação dos cortes, e com o objectivo de recuperar os epítomos, estes foram mergulhados numa solução de 10 mM de citrato a 90 °C (30 min) (10 mM, 0,5% (v/v) Tween 20). Seguiu-se o bloqueio das peroxidases endógenas durante 15 minutos com a solução fornecida para o efeito. Após lavagens, e com o objectivo de diminuir as ligações inespecíficas, foi feito o bloqueio durante 1 hora com tampão fosfato salino - PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4), suplementado com 1% (m/v) BSA e 10% (v/v) soro de cabra. Durante a noite, os cortes foram incubados com os anticorpos primários específicos para a insulina, as células endoteliais e os macrófagos, (*Mouse anti-human Insulin monoclonal antibody*, BioTrend, 1:100; *Rabbit anti-human Von Willebrand factor polyclonal antibody*, Chemicon International, 1:100; *Rabbit polyclonal to F4/80 antibody*, Abcam, 1:100, respectivamente) em solução de PBS com 1% (m/v) de BSA. Depois das lavagens, os cortes foram incubados durante 2 horas com os reagentes: *mouse-HRP* para os cortes incubados com o anticorpo anti-insulina e *rabbit-AP* para os cortes incubados com os anticorpos anti-factor Von Willebrand e anti-F4/80. Como cromogéneos foram utilizados o DAB (*3,3'-diaminobenzidine*) com incubação de 5 minutos e o AP (*alkaline phosphatase*) com incubação de 15 minutos. Seguiu-se a marcação dos núcleos pela Hematoxilina durante 8 minutos e, após lavagem, a montagem com meio aquoso.

2.10 Análise estatística

Para a análise estatística, recorreu-se ao programa *GraphPad Prism*. Foi testada a normalidade da distribuição das variáveis com os testes de *Shapiro-Wilk* e *D'Agostino*. As significâncias estatísticas foram determinadas, para comparações entre dois grupos, com o teste *Mann-Whitney* e para comparações entre 3 ou mais grupos com o teste *Kruskal-Wallis*, seguido da avaliação das comparações múltiplas com o teste *Dunn*. Para o cálculo das significâncias estatísticas das PTGIP e dos perfis das glicemias ocasionais, recorreu-se ao teste *Two-way ANOVA*, seguido da avaliação das comparações múltiplas com os testes *Sidak* e *Tukey*. Foi usado o mesmo programa para o cálculo das áreas abaixo da curva. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Perfil glicémico e insulinemia dos ratos normais e diabéticos

A Figura 2 é representativa das diferenças entre as duas estirpes usadas neste estudo, a estirpe de ratos normais (Wistar - Wc) e a estirpe de ratos diabéticos tipo 2 (Goto-Kakizaki - GKc), no que respeita à glicemia e à insulinemia. Como esperado, os animais GKc apresentam valores da glicemia ocasional superiores a 200 mg/dL e os Wc valores inferiores a 100 mg/dL (Figura 2-Ai e 2-Aii). Como tal, a diferença entre os valores médios das glicemias destas duas estirpes é estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (Figura 2-Aii).

Esta hiperglicemia mantida é reforçada pela marcada intolerância à glicose observada na PTGIP (Figura 2-Bi). Os valores de glicose nos ratos diabéticos são significativamente superiores aos dos ratos controlo: $p < 0,05$ em jejum e $p < 0,001$ para os restantes tempos (15, 30, 60, 90 e 120 min). As respectivas médias das áreas abaixo das curvas das PTGIP, confirmam a marcada diferença na resposta dos animais, observando-se um valor significativamente mais elevado ($p < 0,05$) nos ratos GKc (Figura 2-Bii).

Os níveis sanguíneos de insulina estão significativamente diminuídos ($p < 0,05$) nos ratos diabéticos (GKc), sugerindo alterações morfo-funcionais da célula beta nestes animais (Figura 2-C).

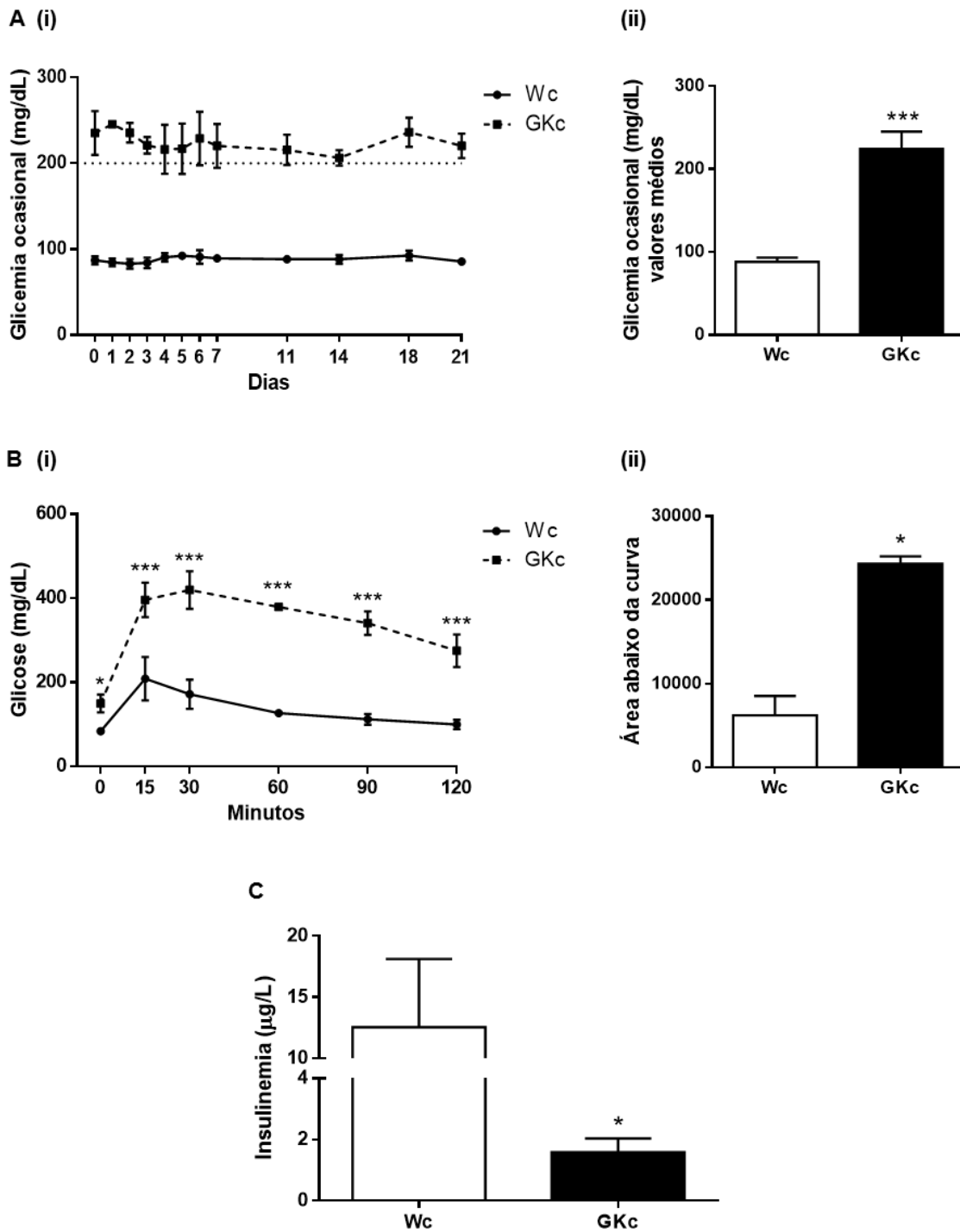


Figura 2: Perfil glicêmico e insulinemia dos ratos normais e diabéticos controle. (A) Glicemias ocasionais ao longo do período experimental (i) e respectivas médias por grupo (ii). (B) Provas de tolerância à glicose por via intraperitoneal (i) e respectivas áreas abaixo da curva (ii). (C) Níveis plasmáticos de insulina. Os resultados são apresentados como média \pm DP ($n=4$ /grupo): * $p<0,05$ e *** $p<0,001$ vs. Wc. Wc - ratos Wistar controle; GKc - ratos GK controle

3.2 Peso corporal, água e ração consumidas e análise bioquímica do sangue

A Tabela 1 mostra o peso corporal, no início e no final do período experimental, dos animais dos 4 grupos experimentais (Wc, GKc, GKv e GK_i) bem como o consumo de água e ração ao longo do estudo. Tal como observado anteriormente no nosso laboratório, os ratos Wistar (Wc) têm um peso corporal médio superior ao dos ratos GKc da mesma idade, nos dias 0 e 21, ($p < 0,05$ entre o grupo GK_i e Wc). Nos animais intervencionados (GKv e GK_i), não observámos alterações do peso em relação aos seus controlos (GKc). O consumo de ração não mostrou diferenças significativas entre os grupos. Já o consumo de água mostrou ser diferente entre os grupos experimentais ($p = 0,0464$), embora após a avaliação das comparações múltiplas não seja possível encontrar valores de p inferiores a 0,05 (entre GK_i e GKc $p = 0,0725$). A tendência de diminuição do consumo de água nos ratos implantados com as células (GK_i), quando comparado com os seus pares (GKc e GKv), assemelhando-se ao consumo dos ratos Wc, é um bom indicativo da melhoria do seu perfil glicémico.

Tabela 1: Peso corporal, água e ração consumidas

Parâmetros		Wc	GKc	GKv	GK _i
Peso (g)	D0	533,67 ± 34,65	381,67 ± 12,34	373,00 ± 13,75	350,33 ± 4,04*
	D21	547,67 ± 27,30	394,67 ± 2,31	375,67 ± 12,90	356,00 ± 8,54*
Ração (g/rato/dia)		28,58 ± 1,85	26,38 ± 2,02	25,67 ± 1,00	24,95 ± 2,52
Água (ml/rato/dia)		28,16 ± 3,77	45,67 ± 7,67	43,10 ± 15,49	25,56 ± 2,82

Foram avaliadas, durante o período experimental, a ração e a água consumidas por rato por dia e, no início (dia 0 - D0) e no final (dia 21 - D21) o peso corporal.

Os resultados são apresentados como média ± DP (n=3-4/grupo): * $p < 0,05$ vs. Wc

Wc - ratos Wistar controlo; GKc - ratos GK controlo; GKv - ratos GK veículo; GK_i - ratos GK implantado com células

As concentrações dos parâmetros sanguíneos da função hepática e renal estão expressas na Tabela 2. Os animais intervencionados (GKv e GK_i) não mostraram qualquer diferença nestes parâmetros em relação aos respectivos controlos (GKc), sugerindo que os implantes não induziram efeitos adversos. Os ratos GK, quando comparados com os ratos Wc, apresentam diferenças significativas em alguns parâmetros: diminuição do azoto ureico nos ratos GKv ($p < 0,05$), aumento dos uratos nos

ratos GK_i ($p < 0,05$) e aumento da bilirrubina total nos 3 grupos de ratos diabéticos (GK_c, GK_v, GK_i) ($p < 0,05$), variações estas dentro dos limites considerados normais.

Tabela 2: Análise bioquímica do sangue

Parâmetros	Wc	GK _c	GK _v	GK _i
Azoto ureico (mg/dL)	20,2 ± 1,07	14,7 ± 1,49	13,7 ± 0,32*	16,4 ± 2,38
Creatinina (mg/dL)	0,3 ± 0,02	0,4 ± 0,08	0,4 ± 0,10	0,4 ± 0,08
Uratos (mg/dL)	0,7 ± 0,00	1,4 ± 0,22	1,2 ± 0,25	1,7 ± 0,45*
Proteínas totais (g/dL)	6 ± 0,41	6,2 ± 0,10	6 ± 0,21	5,9 ± 0,22
Albumina (g/dL)	2,8 ± 0,21	3,1 ± 0,10	3,1 ± 0,10	3,1 ± 0,13
ALT (U/L)	44,3 ± 4,11	45,3 ± 2,31	51,7 ± 6,66	55,5 ± 23,29
AST (U/L)	154,8 ± 55,84	107,3 ± 20,55	107,3 ± 20,55	117 ± 31,11
Fosfatase Alcalina (U/L)	98,3 ± 12,69	264,5 ± 113,83	236 ± 25,51	250,8 ± 61,03
Bilirrubina total (mg/dL)	0,1 ± 0,00	0,2 ± 0,00*	0,2 ± 0,00*	0,2 ± 0,00*

No final do período experimental, foram determinadas, após jejum de 6 horas, as concentrações sanguíneas de parâmetros da função renal e hepática.

Os resultados são apresentados como média ± DP (n=3-4/grupo): * $p < 0,05$ vs. Wc

ALT- alanina aminotransferase; AST- aspartato aminotransferase; Wc - ratos Wistar controle; GK_c - ratos GK controle; GK_i - ratos GK implantado com células; GK_v - ratos GK veículo

3.3 Glicemias ocasionais e em jejum dos ratos diabéticos

Como é possível observar na Figura 3-A, os animais GK submetidos à implantação das esferas de alginato com (GK_v) e sem (GK_i) células beta INS-1E mostraram, a partir das 24 horas após o implante, um decréscimo dos níveis da glicose ocasional. Nos ratos GK_i esse decréscimo manteve-se estatisticamente significativo ao longo do período experimental ($p < 0,001$, excepto no dia 3, 4 e 21 com $p < 0,01$, comparativamente aos ratos GK_c). Nos ratos GK_v, que apresentaram maior variabilidade, a glicemia ocasional começa a aumentar ao 11º dia e deixa de ser significativamente diferente da glicemia dos ratos GK_c a partir do 14º dia, passando a sê-lo em relação aos GK_i ($p < 0,05$ nos dias 14 e 21 e $p < 0,01$ no dia 18) (valores estatísticos não apresentados no gráfico).

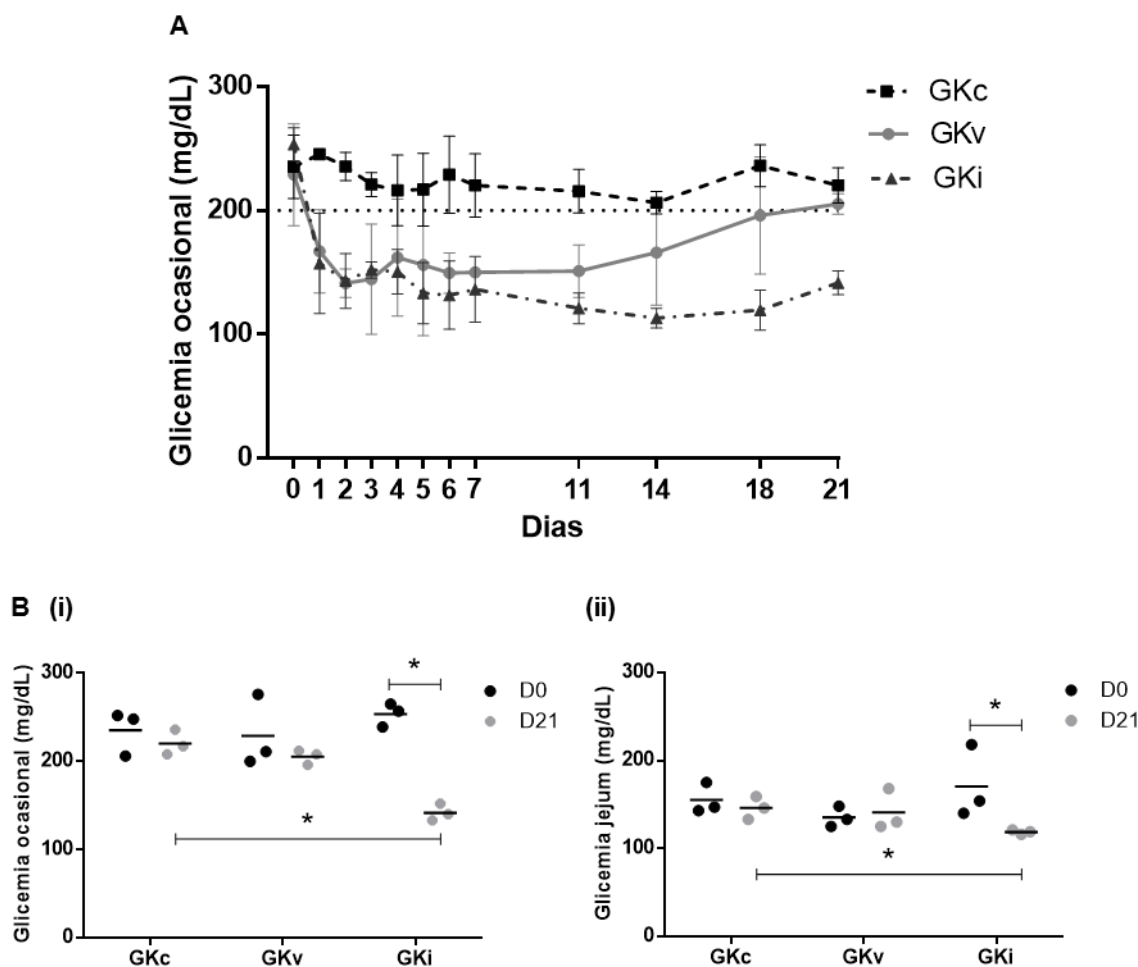


Figura 3: Perfil glicémico dos ratos diabéticos. (A) Glicemias ocasionais ao longo do período experimental. (B) Glicemias ocasionais (i) e do jejum (ii), no início (dia 0 - D0) e no final do período experimental (dia 21 - D21).

Os resultados são apresentados como média \pm DP ($n=3$ /grupo): * $p<0,05$ entre D0 e D21; GKc - ratos GK controlo; GKv - ratos GK veículo; GKl - ratos GK implantado com células

Na mesma figura (3-B) a comparação entre os valores da glicemia ocasional (i) bem como os da glicemia do jejum (ii) no início (dia 0) e no final do período experimental (dia 21) mostram que os ratos GKc e GKv mantiveram os valores constantes. Já os ratos GKl diminuíram significativamente, aos 21 dias, os valores sanguíneos da glicose ocasional e em jejum, quer comparando com os seus valores no dia 0, quer com os valores dos ratos GKc também no dia 21 ($p<0,05$). No final do período experimental, a glicemia ocasional apresentou um valor médio de 140 mg/dL e a glicemia do jejum um valor médio de 119 mg/dL, ambas abaixo dos valores indicativos de diabetes (≥ 200 mg/dL e ≥ 126 mg/dL, respectivamente). Determinámos ainda a percentagem individual da diminuição da glicemia nestes animais (Figura 5-A). Verificámos uma redução média da glicemia ocasional em 43%, sendo atingido um decréscimo máximo de 48% no rato GKl1. Já a

redução média da glicose do jejum foi de 28%, com o seu máximo no rato GK_i2 com 44,5% de decréscimo.

3.4 Prova de tolerância à glicose dos ratos diabéticos

Na Figura 4 estão representadas as provas de tolerância à glicose via intraperitoneal (PTIGP) dos ratos diabéticos controlo (GK_c) e intervencionados (GK_v e GK_i), bem como as respectivas áreas abaixo da curva antes do implante (D0) e 7 dias depois (D7). No que se refere às áreas abaixo da curva, não observámos diferenças estatisticamente significativas entre os dois dias (0 e 7). No entanto, no dia 7, a glicemia 2 horas após administração de glicose é significativamente mais baixa ($p < 0,05$) nos ratos GK_i (Figura 4-A). Na Figura 5, a observação individual demonstra também uma redução da glicemia no dia 7. Duas horas após a administração de glicose, os valores da glicemia são em média 16% mais baixos do que os correspondentes à prova do dia 0, sendo atingida uma percentagem de descida de 56,7% no animal GK_i2. Todos os animais têm, também no dia 7, um valor de glicemia em jejum 32% mais baixa que no dia 0 e uma vez mais o rato GK_i2 é o que apresenta a descida mais acentuada, 42,7%.

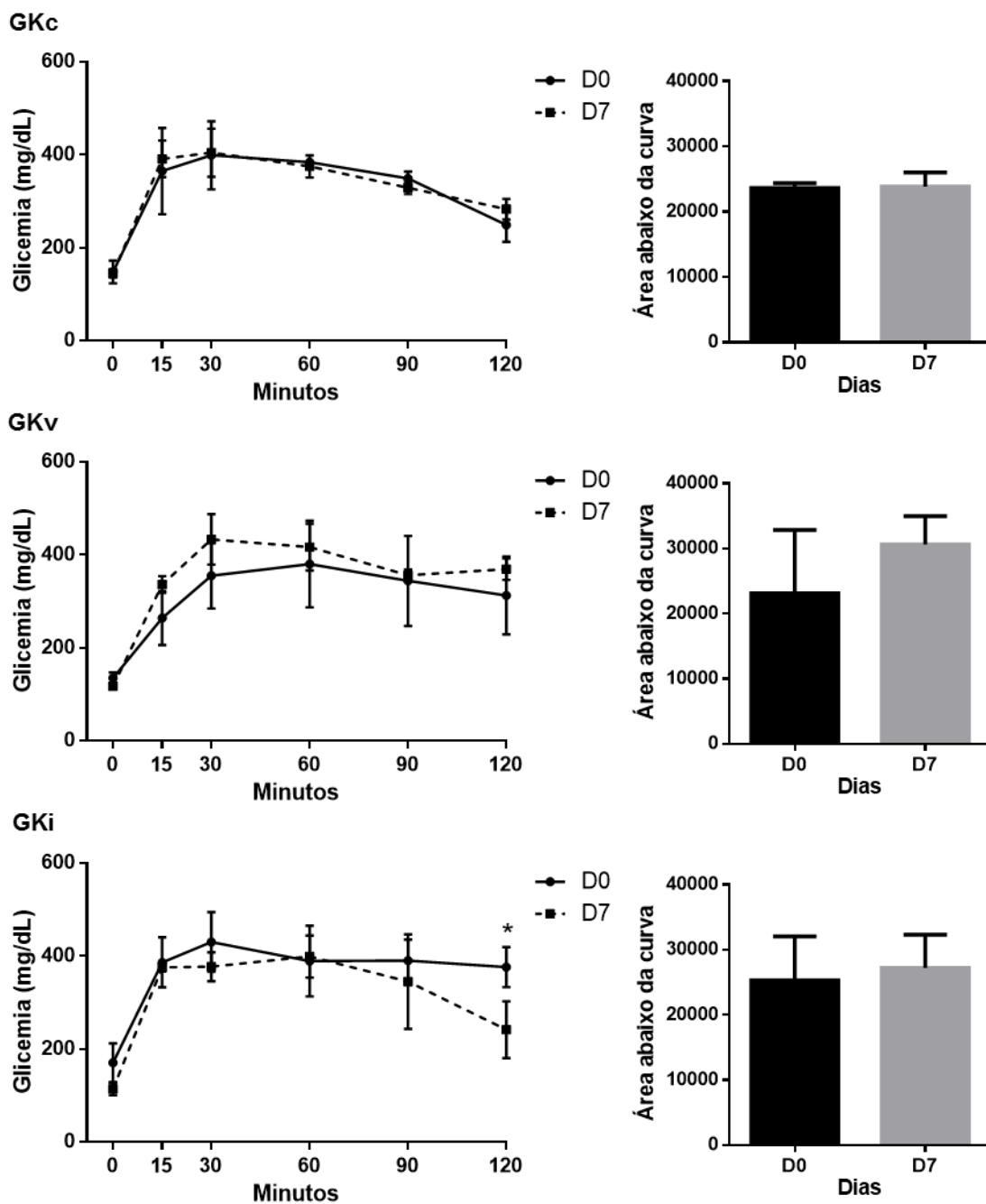


Figura 4: Provas de tolerância à glicose por via intraperitoneal (PTGIP) dos ratos GK controle e implantados, no início do período experimental (dia 0 - D0) e após 7 dias do implante (dia 7 - D7) e respectivas áreas abaixo da curva. Os resultados são apresentados como média ± DP (n=3/grupo): *p<0,05 entre D0 e D7
 GKc - ratos GK controle; GKv - ratos GK veículo; GKi - ratos GK implantado com células

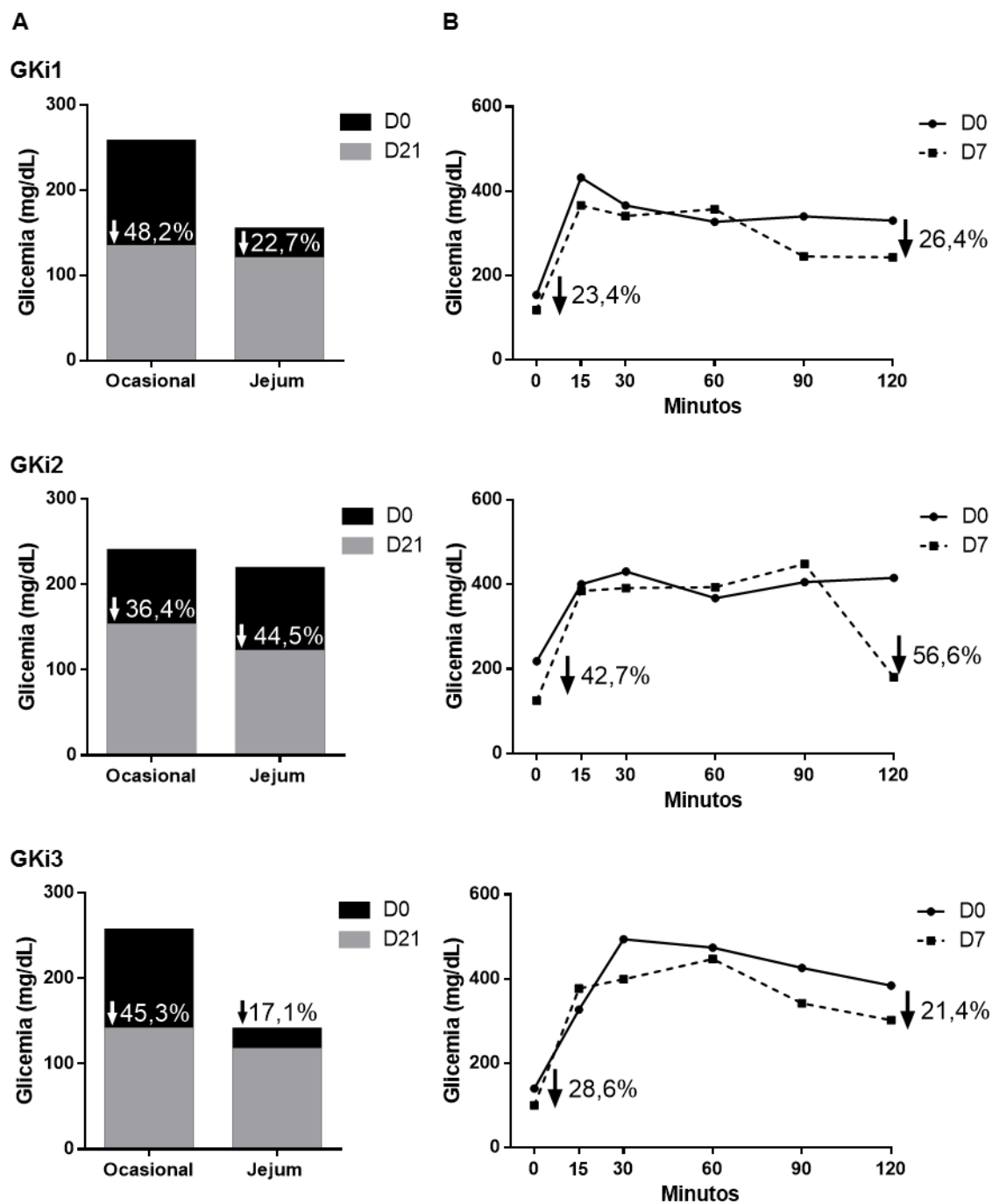


Figura 5: Perfil glicêmico individual dos ratos diabéticos implantados com as células. (A) Valores médios da glicemia ocasional e do jejum no dia 0 (D0) e no dia 21 (D21) e respectivas alterações em percentagem. (B) Provas de tolerância à glicose no dia 0 (D0) e dia 7 (D7) e respectivas alterações em percentagem nos tempos 0 e 120 minutos.

3.5 Insulinemia e índices de sensibilidade e resistência à insulina dos ratos diabéticos

No final do período experimental, os níveis plasmáticos de insulina em jejum não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos de ratos diabéticos (Figura 6-A). Por outro lado, quando comparados com o grupo GKc, os ratos GKi mostram um aumento da sensibilidade à hormona ($p < 0,05$) e uma diminuição da sua resistência ($p < 0,05$), evidenciada pelos índices de insulino-sensibilidade (QUICKI) e insulino-resistência (HOMA), respectivamente (Figura 6-B).

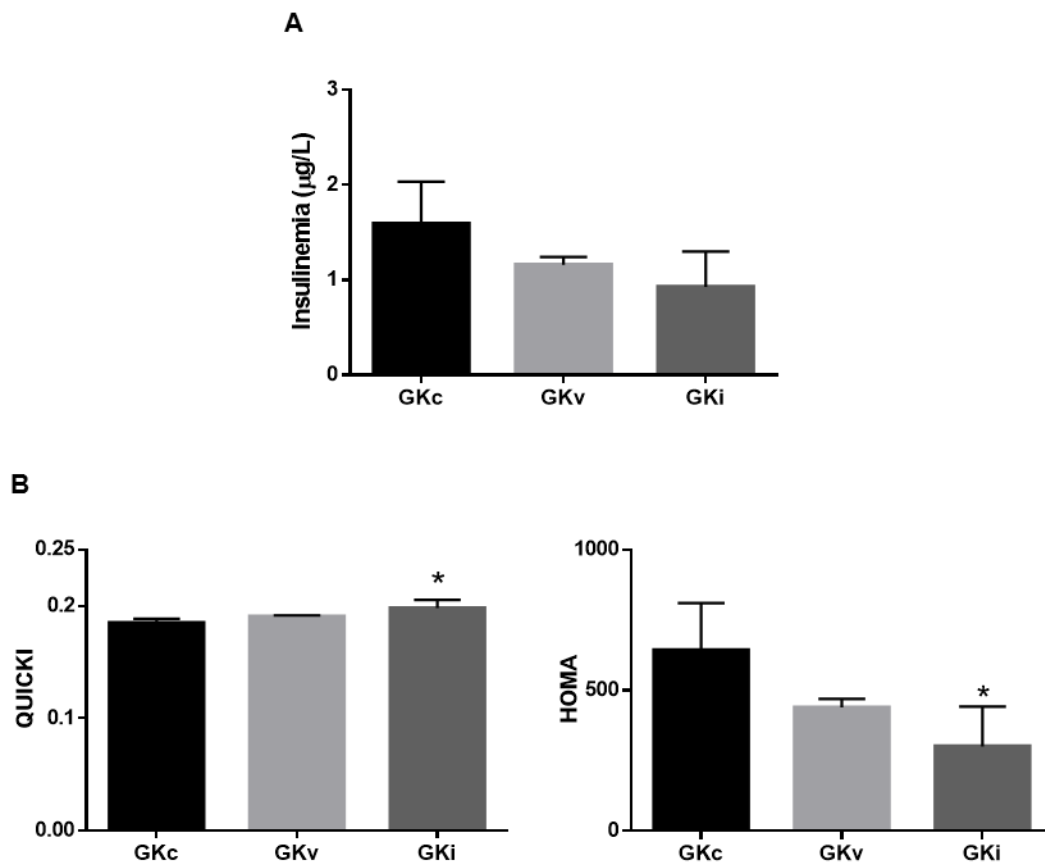


Figura 6: Insulinemia e índices QUICKI e HOMA dos ratos GK controlo e implantados, no final do período experimental (dia 21). (A) Valores plasmáticos da insulina em jejum. (B) Índices de sensibilidade à insulina (QUICKI) e de insulino-resistência (HOMA). Os resultados são apresentados como média \pm DP ($n=3-4$ /grupo): * $p < 0,05$ vs. GKc. GKc - ratos GK controlo; GKv - ratos GK veículo; GKi - ratos GK implantado com células

3.6 Remoção do implante e histologia

Como descrito na secção dos métodos, no final do período experimental o implante e os tecidos adjacentes foram removidos. Macroscopicamente, não foram observados sinais inflamatórios locais e as esferas estavam intactas sem qualquer sinal de degradação, demonstrando a estabilidade do material. Observou-se ainda que o implante estava rodeado por uma fina membrana, delimitando-o dos tecidos adjacentes (Figura 7).

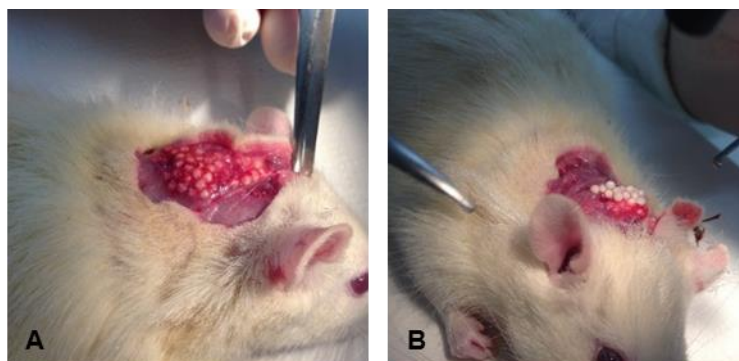


Figura 7: Esferas implantadas no final do período experimental. Macroscopicamente não foram visíveis processos inflamatórios reaccionais. Foi possível observar que o implante estava rodeado por uma fina membrana (A) que, depois de rompida, mostrou a integridade das esferas no seu interior (B).

A Figura 8 mostra o local do implante, permitindo observar todos os tecidos adjacentes (pele, tecido celular subcutâneo e músculo). Com a HE observámos as características básicas estruturais dos tecidos num animal GK controlo (8-A) e num animal GK implantado (8-C). Com o TM, nas figuras 8-B e 8-D, evidência-se a deposição de colagénio nos animais controlo e implantado, respectivamente. Nos animais implantados, confirmámos a presença de uma fina membrana a rodear o implante. Em maior ampliação (Figura 9) é possível observar a natureza conjuntiva da membrana, com proliferação fibroblática e deposição de colagénio (9-A) e ainda um pequeno infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (9-B). Após a imunomarcção específica dos macrófagos, confirmamos a sua localização preferencial no revestimento interno da membrana (9-C). Foi ainda possível observar microvasos por histologia convencional e após a imunomarcção específica das células endoteliais (9-D). Em relação às células beta INS-1E implantadas, a imunomarcção específica da insulina permite a identificação destas células, activas e com secreção de insulina (Figura 10).

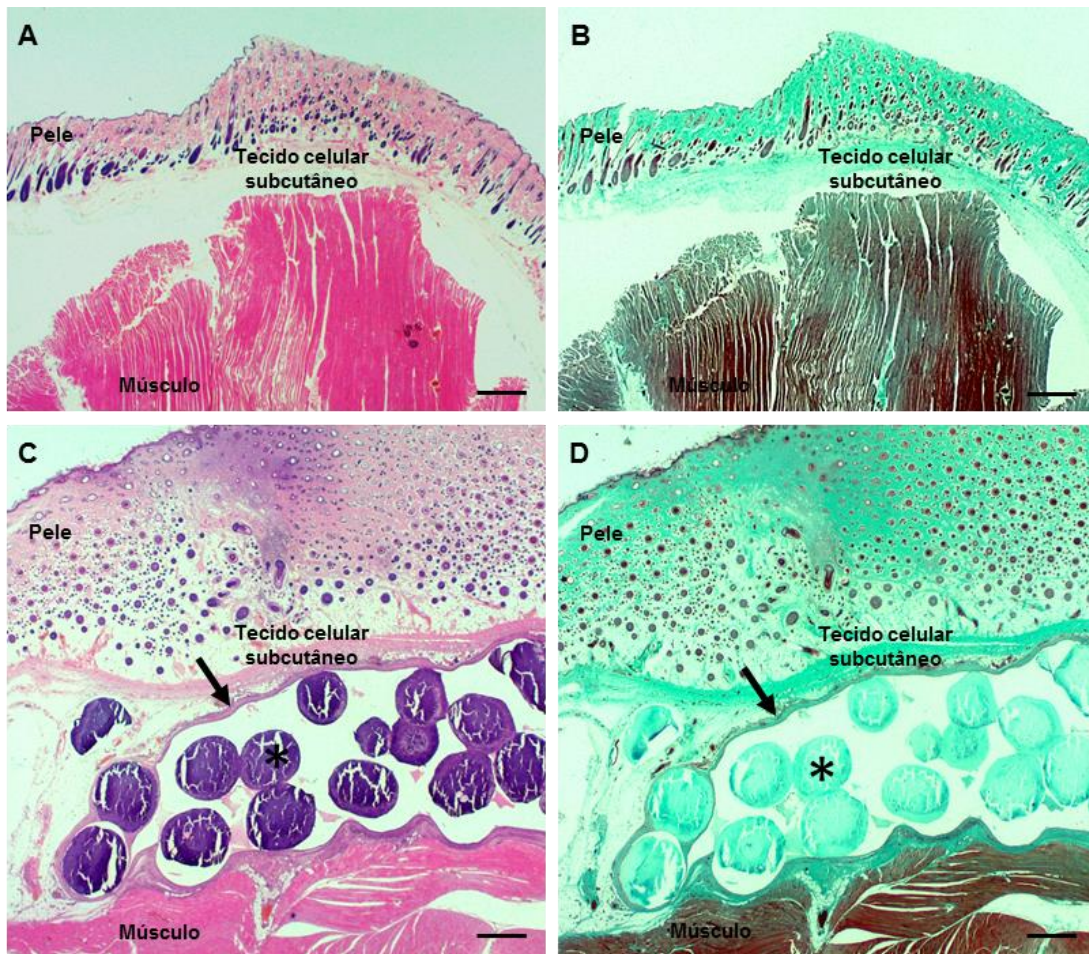


Figura 8: Imagens histológicas representativas do implante e tecidos adjacentes dos animais. Marcação com Hematoxilina-Eosina (A) e (C) e com Tricrômio de Masson (B) e (D) de cortes histológicos de ratos GK controle (A) e (B) e ratos GK implantados (C) e (D). As esferas de alginato (asterisco) estão rodeadas por uma fina membrana (seta) de natureza conjuntiva. A barra representa 2 mm.

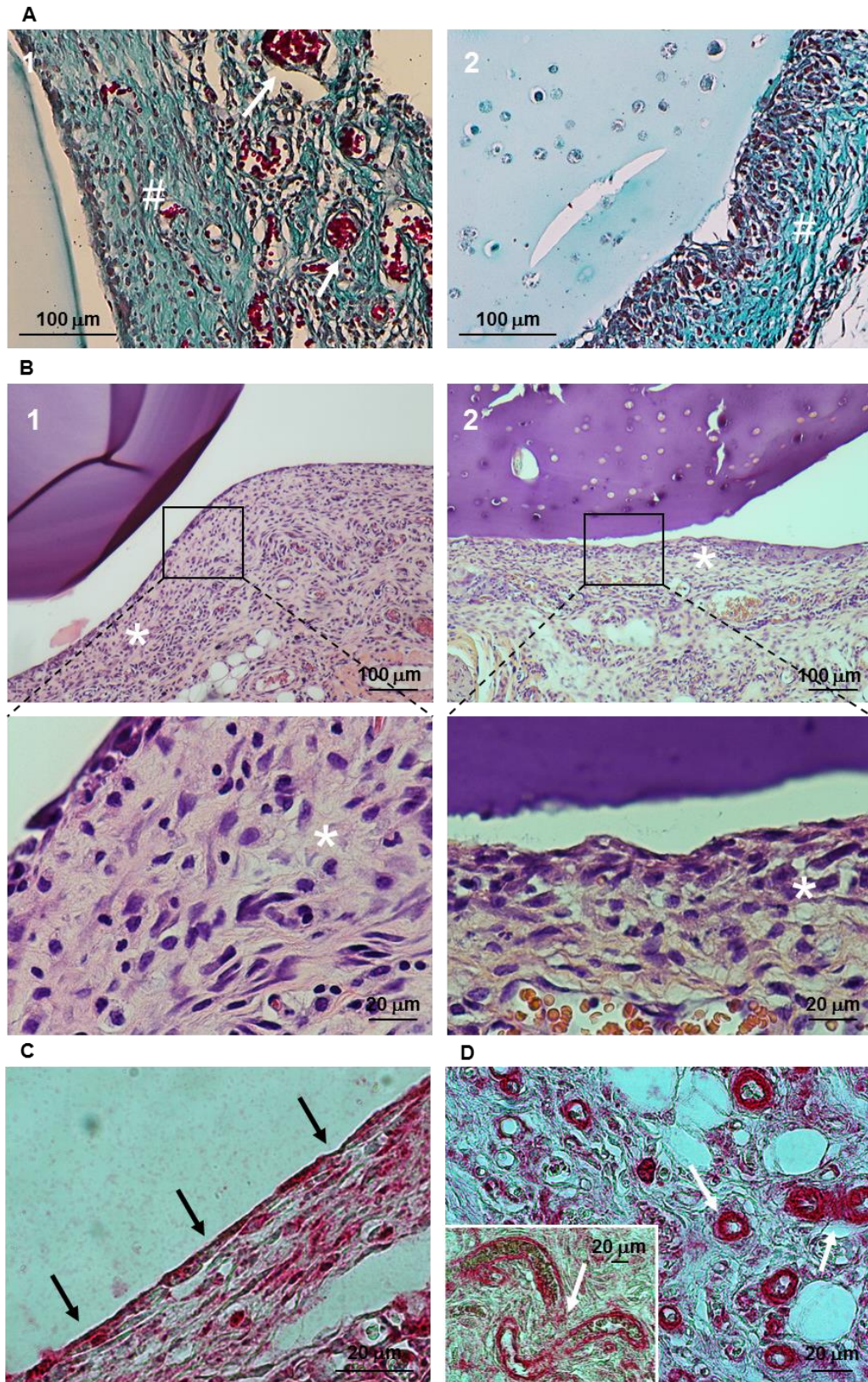


Figura 9: Imagens histológicas representativas do implante e tecidos adjacentes dos animais. Marcação com Tricrômio de Masson (A), Hematoxilina-Eosina (B), imunomarcção específica de macrófagos (C) e imunomarcção específica de células endoteliais (D).
 1 - esferas de alginato-RGD sem células; 2 - esferas de alginato-RGD com células beta encapsuladas; cardinal - deposição de colagênio; asterisco - infiltrado inflamatório; setas brancas - microvasos e setas pretas macrófagos.

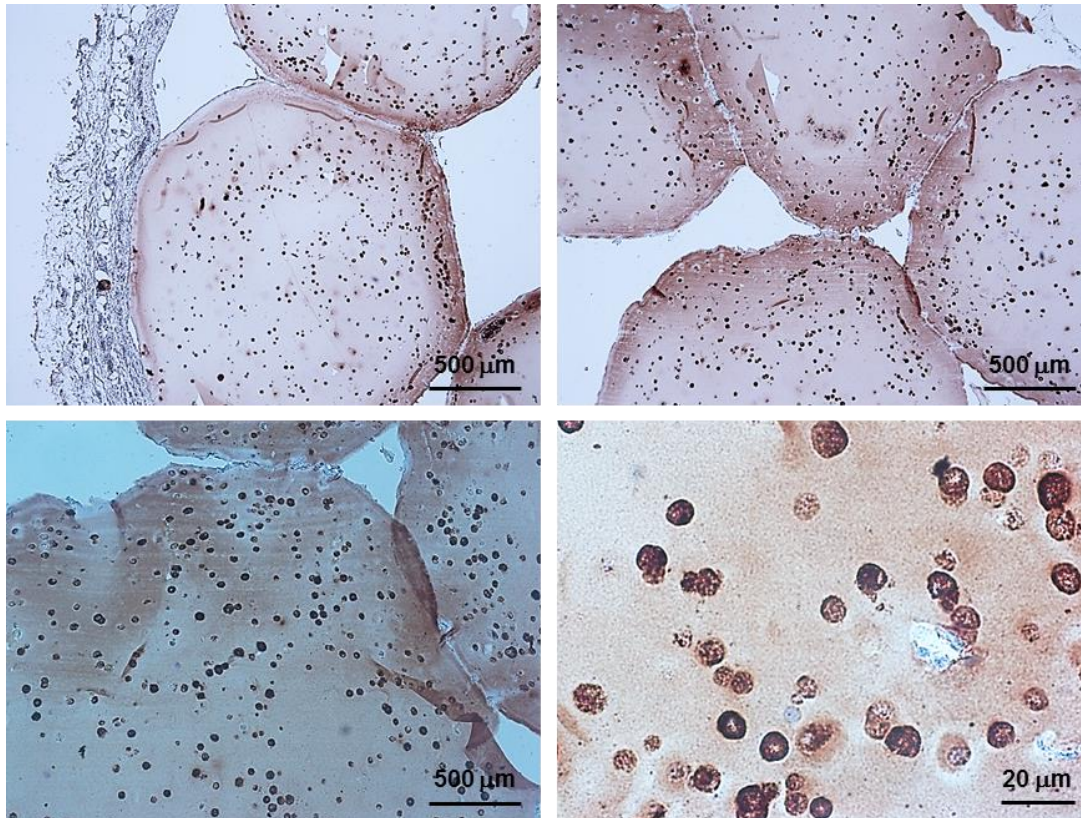


Figura 10: Imagens histológicas representativas das esferas de alginato-RGD com imunomarcção específica da insulina, em diferentes ampliações.

4. Discussão

A metodologia de encapsulamento de ilhéus/células beta já deu provas da sua potencialidade para a terapia da diabetes tipo 1 [1, 7, 8], no entanto não há relatos na literatura da sua aplicação na diabetes tipo 2. Acreditamos que este tipo de intervenção possa trazer benefícios para o controlo glicémico ainda numa fase inicial deste tipo de diabetes e assim atrasar o desenvolvimento das complicações associadas à hiperglicemia crónica, bem como ser uma opção quando a administração de insulina passa a constar das opções terapêuticas. Desta forma, foi nosso propósito avaliar o implante alogénico das células beta INS-1E encapsuladas num modelo 3D de hidrogéis de alginato-RGD, num modelo diabético tipo 2, os ratos GK, onde predominam os defeitos da célula beta. Os ensaios *in vitro* que desenvolvemos com este modelo de hidrogéis mostraram o efeito positivo da presença do péptido de adesão RGD, favorecendo a formação de esferóides de células viáveis e com uma melhor capacidade de secreção de insulina. Estes resultados encorajaram-nos a testar este modelo, que consideramos como basilar para o encapsulamento celular, *in vivo*, onde os desafios são mais exigentes.

Uma questão que influencia a longevidade das células encapsuladas e consequentemente a resposta dos animais após implante prende-se com o local de implante [1, 17, 18]. Nos estudos em animais já foram testados diferentes locais de implantação, sendo que os mais comumente usados para ilhéus/células beta encapsulados(as) são a cavidade peritoneal o espaço subcutâneo, pelo fácil acesso e espaço disponível [1, 8]. Um estudo de Dufrane e seus colaboradores testou a influência do local de implante de ilhéus de porco encapsulados em alginato, na resposta dos tecidos adjacentes ao implante e na resposta das células encapsuladas [18]. Os ilhéus implantados subcutaneamente, e comparando com aqueles colocados na cavidade peritoneal e na cápsula renal, apresentaram maior conteúdo e secreção de insulina e o tecido adjacente apresentou uma baixa resposta inflamatória. Na cavidade peritoneal, os ilhéus apresentaram menor viabilidade e desempenho, acompanhado por uma resposta inflamatória severa [17], como já havia sido reportado noutros estudos para este local [1]. Pela facilidade de acesso e espaço disponível, e incentivados pelos estudos anteriores, neste trabalho optámos por colocar o implante no espaço subcutâneo. Como mostra a Figura 1, as esferas foram então colocadas entre o tecido celular subcutâneo e o músculo que tem, no rato, uma localização preferencial a nível do dorso. Este é um local que permite um bom suporte físico, boa vascularização e o implante é feito apenas com uma pequena intervenção.

Os ratos GK implantados com as células (GKi) mostraram uma melhoria do perfil glicémico global, diminuição da glicemia ocasional e do jejum, e melhoria da tolerância à glicose. Não observámos alterações na insulinemia destes animais, que pode dever-se ao facto desta avaliação ocorrer após um período de jejum e, assim, não reflectir a secreção total de insulina. A acrescentar, observámos uma diminuição da resistência à hormona e um aumento da sua sensibilidade, sugerindo que a insulina segregada pelas células beta implantadas possa ter exercido as suas funções de uma forma mais eficiente. O facto de não haver redução do peso corporal nos animais intervencionados, afasta a hipótese do efeito deste na insulino-resistência. Respondemos, desta forma, à questão colocada sobre os efeitos metabólicos do implante.

Em relação ao implante, observámos que, após os 21 dias, as esferas estavam íntegras e com células insulino-positivas. No que se refere à reacção do organismo ao implante alogénico, não observámos reacções sistémicas, hepáticas, renais, no peso dos animais e no seu bem-estar. Localmente, de referir a formação de uma membrana com tecido conjuntivo e abundância de microvasos, capazes de suportar vivas as células implantadas. Uma pequena reacção inflamatória era igualmente espectável [17, 18], como reacção à pequena intervenção cirúrgica e à introdução de um corpo estranho. No

entanto, esta não impediu a manutenção do implante e os seus efeitos metabólicos benéficos durante o período estudado.

Relativamente ao encapsulamento e implante de células beta individualizadas, pela facilidade da sua obtenção [13] e resultados promissores reportados [14], o seu uso poderá ser uma solução interessante ao uso de ilhéus. Assim, quisemos também perceber se o nosso modelo com as células beta INS-1E seria eficiente *in vivo*, e perceber qual o comportamento das células neste ambiente. *In vitro*, as células proliferaram em esferóides, adquirindo assim uma estrutura de pseudo-ilhéus. *In vivo*, durante o período que permaneceram implantadas no animal, não observámos o mesmo comportamento. Constatámos que a divisão celular ocorreu em menor escala, tendo sido observados pontualmente apenas pequenos aglomerados celulares. Como está descrito, a conformação de pseudo-ilhéus influencia grandemente a sobrevivência das células e a sua funcionalidade [19], questões que se prendem com as interações entre as mesmas e com a matriz extracelular [20, 21]. Uma vez que demonstrámos, após sete dias em cultura, que as INS-1E encapsuladas em alginato-RGD formam esferóides viáveis e com melhor secreção de insulina, uma hipótese que gostaríamos de testar nos próximos ensaios passará por manter em cultura os hidrogéis durante esse tempo, ou um período maior, e só depois implantá-los nos animais. Assim, a conformação de pseudo-ilhéus será alcançada, aspecto que acreditamos ser uma mais-valia para a performance do implante *in vivo*.

O tamanho das esferas usadas no estudo está aquém do tamanho desejado. A sua grande dimensão não só dificulta o acesso aos nutrientes e oxigénio cruciais à sobrevivência das células encapsuladas, como dificulta a percepção das alterações da concentração da glicose sanguínea e a libertação adequada da insulina para a corrente sanguínea. Desta forma, seria de esperar que prolongando o tempo de estudo as células acabariam por entrar em falência, inviabilizando assim o implante. Contribuições de estratégias que permitam a redução do tamanho das esferas [3, 22] e metodologias que permitam uma melhor vascularização do local de implante [23, 24], já mostraram efeitos benéficos na longevidade do implante. Desta forma, em experiências futuras, gostaríamos de reduzir o tamanho das esferas e ainda implantar, juntamente com as esferas de alginato, nanopartículas de PLGA para a libertação de VEGF no local do implante, favorecendo assim a angiogénese e permitindo a formação de novos vasos que rodeariam as esferas.

5. Referências bibliográficas

1. Crisóstomo J, Coelho J, Seíça R (2013) Bioartificial Pancreas: In the Road to Clinical Application. In: Coelho J (ed) *Drug Deliv. Syst. Adv. Technol. Potentially Apl. Pers. Treat.* Springer, pp 127–151
2. Iacovacci V, Ricotti L, Mencassi A, Dario P (2016) The bioartificial pancreas (BAP): Biological, chemical and engineering challenges. *Biochem Pharmacol* 100:12–27. doi: 10.1016/j.bcp.2015.08.107
3. Kepsutlu B, Nazli C, Bal T, Kizilel S (2014) Design of bioartificial pancreas with functional micro/nano-based encapsulation of islets. *Curr Pharm Biotechnol* 15:590–608. doi: 10.2174/1389201015666140915145709
4. Calafiore R, Basta G (2014) Clinical application of microencapsulated islets: Actual prospectives on progress and challenges. *Adv Drug Deliv Rev* 67-68:84–92. doi: 10.1016/j.addr.2013.09.020
5. Lim F, Sun A (1980) Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* (80-) 210:908–910.
6. de Vos P, Faas MM, Strand B, Calafiore R (2006) Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials* 27:5603–5617. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.07.010
7. Qi M (2014) Transplantation of Encapsulated Pancreatic Islets as a Treatment for Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *Adv Med.* doi: 10.1155/2014/429710
8. Souza YEDM de, Chaib E, Lacerda PG de, et al. (2011) Islet transplantation in rodents. Do encapsulated islets really work? *Arq Gastroenterol* 48:146–152.
9. Teramura Y, Iwata H (2010) Bioartificial pancreas. Microencapsulation and conformal coating of islet of Langerhans. *Adv Drug Deliv Rev* 62:827–840. doi: 10.1016/j.addr.2010.01.005
10. Tran L, Zielinski A, Roach A, et al. (2015) Pharmacologic treatment of type 2 diabetes: oral medications. *Ann Pharmacother* 49:540–556.
11. Ritzel R, Roussel R, Bolli G, et al. (2015) Patient-level meta-analysis of the EDITION 1, 2 and 3 studies: Glycaemic control and hypoglycaemia with new insulin glargine 300 U/ml versus glargine 100 U/ml in people with type 2 diabetes. *Diabetes, Obes Metab* 17:859–867. doi: 10.1111/dom.12485
12. Meier J (2016) Treatment of type 2 diabetes. *Internist (Berl)* 57:153–165. doi: 10.1007/s00108-015-0002-x
13. Orlando G, Gianello P, Salvatori M, et al. (2014) Cell replacement strategies aimed at reconstitution of the beta-cell compartment in type 1 diabetes. *Diabetes* 63:1433–1444. doi: 10.2337/db13-1742
14. Vegas AJ, Veiseh O, Gürtler M, et al. (2016) Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice. *Nat Med* 22:306–311. doi: 10.1038/nm.4030

15. Merglen A, Theander S, Rubi B, et al. (2004) Glucose Sensitivity and Metabolism-Secretion Coupling Studied during Two-Year Continuous Culture in INS-1E Insulinoma Cells. *Endocrinology* 145:667–678. doi: 10.1210/en.2003-1099
16. Bancroft JD, Gamble M (2007) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 6th ed. Churchill Livingstone
17. Dufrane D, Steenberghe M Van, Goebbels RM, et al. (2006) The influence of implantation site on the biocompatibility and survival of alginate encapsulated pig islets in rats. *Biomaterials* 27:3201–3208. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.028
18. Liu XY, Nothias J-M, Scavone A, et al. (2010) Biocompatibility investigation of polyethylene glycol and alginate-poly-L-lysine for islet encapsulation. *ASAIO J (American Soc Artif Intern Organs)* 56:241–245. doi: 10.1097/MAT.0b013e3181d7b8e3
19. Chowdhury A, Dyachok O, Tengholm A, et al. (2013) Functional differences between aggregated and dispersed insulin-producing cells. *Diabetologia* 56:1557–1568.
20. Maillard E, Sencier M-C, Langlois A, et al. (2009) Extracellular matrix proteins involved in pseudoislets formation. *Islets* 1:232–241. doi: 10.4161/isl.1.3.9754
21. Lin C-C, Anseth KS (2011) Cell–cell communication mimicry with poly(ethylene glycol) hydrogels for enhancing β -cell function. *PNAS* 108:6380–6385.
22. Leung A, Nielsen LK, Trau M, Timmins NE (2010) Tissue transplantation by stealth-Coherent alginate microcapsules for immunoisolation. *Biochem Eng J* 48:337–347. doi: 10.1016/j.bej.2009.10.007
23. Liu X, Li X, Zhang N, Wen X (2015) Engineering beta-cell islets or islet-like structures for type 1 diabetes treatment. *Med Hypotheses* 85:82–84. doi: 10.1016/j.mehy.2015.04.005
24. Phelps EA (2011) *Bio-Functionalized Peg-Maleimide Hydrogel for Vascularization of Transplanted Pancreatic Islets*. Georgia Institute of Technology

CAPÍTULO 5

Aspectos físico-químicos e biológicos para melhorar o modelo 3D de hidrogéis de alginato para o encapsulamento de células produtoras de insulina: resultados preliminares e estratégias para ensaios futuros

SECÇÃO 1

Funcionalizações e estratégias para produzir hidrogéis de alginato

1. Introdução

Os hidrogéis de alginato foram propostos pela primeira vez em medicina regenerativa em 1980 para o encapsulamento de ilhéus de Langerhans [1]. Aprovado pela FDA, este polímero natural é hoje o mais usado nesta área [2–4]. A sua capacidade de formar, em condições fisiológicas, hidrogéis altamente biocompatíveis que fornecem um ambiente tridimensional, com características semelhantes à matriz extracelular como a elasticidade e a elevada permeabilidade, tornam este polímero extremamente atractivo para o encapsulamento celular [3–5]. A possibilidade de funcionalizar estes hidrogéis, permite ainda um manancial de hipóteses para modular as suas propriedades [4, 5]. As funcionalizações podem dizer respeito à introdução de grupos químicos de interesse ou mesmo à introdução de determinadas moléculas, criando assim propriedades químicas, físicas, biológicas ou farmacológicas de interesse [6]. Desta forma, modelando determinadas propriedades dos hidrogéis, os aspectos físico-químicos e biológicos que ainda limitam a aplicação desta metodologia na prática clínica podem ser melhorados e assim garantir o sucesso do implante [6, 7]. Os dois principais desafios físico-químicos prendem-se com a diminuição do tamanho das esferas e com o aumento da estabilidade das mesmas ao longo do tempo [6–8]. Embora a literatura reporte a estabilidade das cápsulas/esferas, especialmente das microcápsulas/microesferas, em pequenos roedores, animais de maiores dimensões e em humanos, durante anos [9], mesmo que numa taxa muito baixa, a destabilização dos hidrogéis contribui para a diminuição da protecção celular e o desencadeamento da resposta inflamatória, com efeitos deletérios para as células encapsuladas [3, 6]. Locais de implante como o espaço subcutâneo também necessitam de cápsulas mais estáveis a fim de manterem a integridade neste local onde o *stress* mecânico é mais elevado [6].

Relativamente aos desafios biológicos, garantir uma imunoprotecção adequada é ainda um objectivo fundamental a atingir, com benefício directo na viabilidade das células encapsuladas [3, 6, 8].

A diminuição do tamanho das esferas de alginato é possível através do recurso a diferentes tecnologias baseadas em sistemas de extrusão sofisticados, como o caso do fluxo coaxial de ar, da força electrostática ou do corte/vibração de jacto laminar, permitindo a redução das gotículas de alginato que, através da gelificação externa, formam esferas mais pequenas (~ 200 μm) [2, 8]. Um método radicalmente diferente foi proposto por Calafiore e seus colaboradores, que descreveram o encapsulamento por emulsão, formando finas membranas a rodear os ilhéus [10]. Mais recentemente, outro método veio revolucionar as estratégias de encapsulação, possibilitando o encapsulamento pela interacção à superfície das células. Os apelidados *conformal coatings* podem ser

resultado de interacções do polímero com as células, de natureza hidrofóbica [10] electrostática [12] ou covalente [13]. Assim, o tamanho final do sistema é ditado pelo tamanho do material a encapsular [14]. Curiosamente, este tipo de metodologia apenas é apresentado recorrendo a polímeros sintéticos como o álcool polivinílico (PVA), o polietilenoglicol (PEG) e o polietilenoimina (PEI) [14], quando a grande aposta no encapsulamento de ilhéus sempre se prendeu com o uso do alginato.

Desta forma, e com o objectivo de diminuir o tamanho dos hidrogéis de alginato, testaram-se duas abordagens diferentes: tecnologias baseadas na extrusão e gelificação externa do alginato e tecnologias baseadas nos *conformal coatings*, criando a possibilidade do encapsulamento através da interacção do alginato com a superfície celular (dos esferóides de células beta) ou com o colagénio que rodeia os ilhéus. Para testar essa hipótese em experiências futuras, procedeu-se à oxidação do alginato para possibilitar a reactividade entre os grupos aldeído daí formados e as aminas da superfície celular ou do colagénio [4]. O alginato dialdeído e a sua reacção com grupos amina de substâncias/polímeros de interesse já foi descrito em aplicações biomédicas como em hidrogéis para imobilização de células cardíacas [15] e para a cicatrização de feridas [16]. Na transplantação de ilhéus encapsulados, o uso do alginato oxidado foi testado com o objectivo de aumentar a degradação da camada exterior do complexo polieletrólítico (alginato-PLO-alginato oxidado), libertando assim agentes farmacológicos lá encapsulados [17]. Para a aplicação que propomos, este polímero modificado e a formação da base de Schiff com as aminas da superfície celular ou colagénio que rodeia os ilhéus, nunca foram descritos.

Como referido anteriormente, outra questão que urge ser solucionada, diz respeito à falta de estabilidade dos hidrogéis de alginato *in vivo* [3]. A formação de complexos electrolíticos, através da introdução de camadas externas pela interacção do alginato com polímeros de carga oposta, é uma abordagem que tem sido testada do ponto de vista do aumento da estabilidade das esferas e da melhoria da sua capacidade de imunoprotecção, graças à redução do tamanho do poro [1, 3], e que também foi testada neste trabalho. A introdução de novas formas de reticulação no alginato, para além da tradicional gelificação por catiões divalentes e da sua interacção com poli-electrólitos, também poderá ser uma solução para melhorar a sua estabilidade nos fluidos fisiológicos, especialmente se recorrermos a ligações covalentes estáveis [4]. A introdução no alginato de grupos metacrilato passíveis de sofrerem polimerização radicalar, é um método interessante que ainda não foi reportado no encapsulamento de ilhéus [4]. Este composto poderá, assim, ver as suas cadeias reticuladas por uma ligação química mais estável e ter ainda a possibilidade de as reticular com polietilenoglicol diacrilato (PEGDA). A introdução de ligações covalentes nos hidrogéis de alginato já foi testada por Gattás-

Asfura *et al.* que descreve uma ligação *Staudinger* selectiva entre o alginato modificado e *cross-linkers* de base PEG, aumentando a estabilidade do sistema sem comprometer a viabilidade de células beta e ilhéus [18]. Desta forma, outro objectivo do presente trabalho foi a síntese de alginato metacrilato para testes futuros, com o intuito de aumentar a reticulação do hidrogel, introduzindo ligações covalentes e melhorar assim a sua estabilidade.

A reactividade do alginato metacrilato e a natureza aniónica do alginato também serão alvo de testes futuros que permitam a interacção com duas substâncias protectoras das células encapsuladas, como se abordará em mais pormenor na discussão.

Assim, nesta secção são abordadas algumas estratégias que julgamos importantes na melhoria das características dos hidrogéis, necessárias para o sucesso do implante das células produtoras de insulina e que temos como objectivo aprofundar no futuro.

2. Materiais e métodos

2.1 Produção de esferas de alginato

Os encapsulamentos apresentados neste trabalho recorreram todos ao método de gelificação externa do alginato. A suspensão de 2% (m/v) de alginato (*PRONOVA Ultrapure Sodium Alginate LVG*, NovaMatrix, FCM BioPolymer ou *Sodium alginate*, 65-70% ácido gulurónico, viscosidade ~ 100-300 mPa.s, Fluka BioChemica) com as células beta ou ilhéus (ou apenas com o alginato para alguns testes) foi extrudida através de uma seringa, formando gotículas que, depois de permanecerem 10 a 15 minutos numa solução gelificante de cloreto de cálcio (100 mM CaCl₂, 10 mM HEPES e 150 mM NaCl), formaram os hidrogéis. Com esta metodologia é possível formar hidrogéis com diâmetros entre os 500 e os 5000 µm, dependendo dos métodos de produção das gotículas [2]. No presente trabalho foram abordados três métodos diferentes.

Descreve-se também outra abordagem que poderá possibilitar o encapsulamento por *conformal coating*, graças à introdução no alginato de grupos reactivos com a superfície celular a encapsular.

2.1.1 Métodos para produção das gotículas de alginato

O gotejamento ocorre pela força exercida na seringa e, no método clássico, apenas opera o efeito da força da gravidade e da espessura da agulha usada. Gotículas mais pequenas

podem ser formadas recorrendo a outras forças como a gerada pela corrente de ar coaxial ou pela força electrostática (Figura 1). No presente trabalho, foram testados os três métodos diferentes de produção das esferas de alginato embora, para o encapsulamento das células, apenas se tenha recorrido ao método clássico e à extrusora com fluxo coaxial e ar.

No método clássico usou-se uma seringa e apenas uma agulha de 25 G (Figura 1-A). Na extrusora de fluxo coaxial de ar, a introdução do ar foi levada a cabo pelo fluxo de uma bomba que o manteve constante ao longo do tempo (Figura 1-B), e foram testadas duas agulhas de diâmetros diferentes (0,40 mm e 0,25 mm). No aparelho que gera a força electrostática (Figura 1-C), esta foi criada com uma voltagem de 10 KV e foi usada uma agulha de 0,17 mm. Em todos os métodos acima descritos foi exercida na seringa contendo a solução de alginato, uma força manual que empurrou o êmbolo a uma velocidade constante.

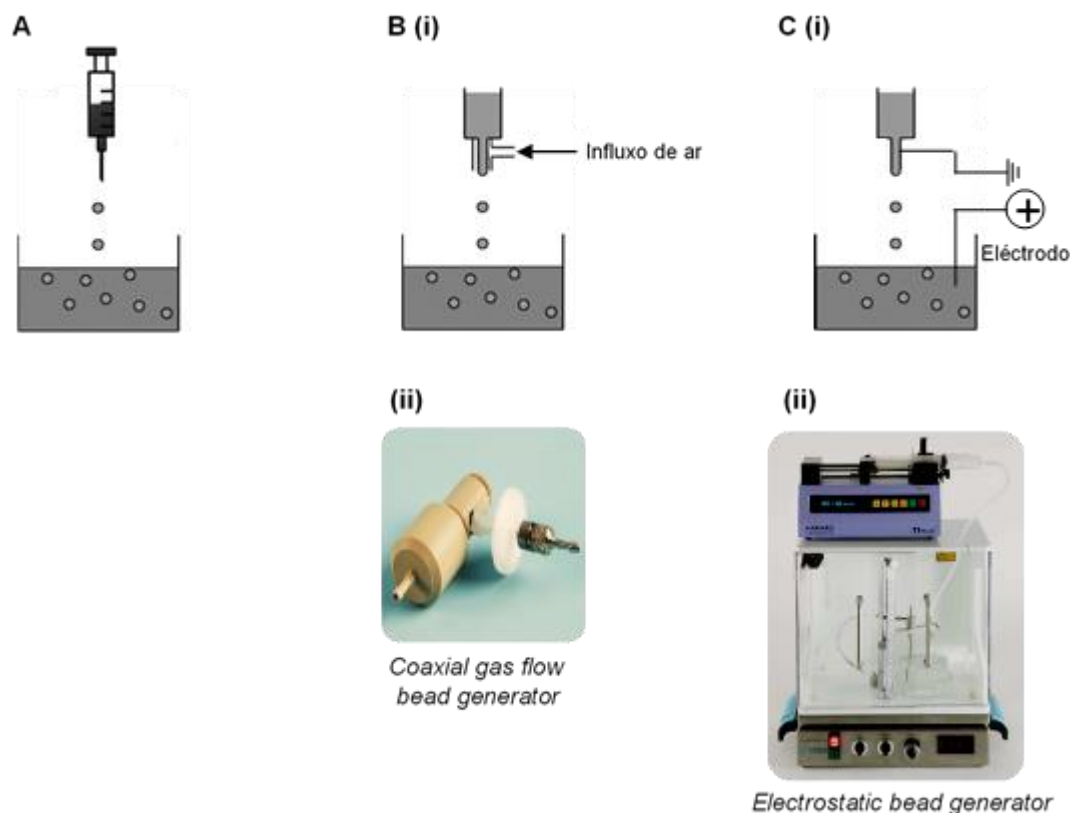


Figura 1: Diferentes tecnologias para produzir gotículas para a gelificação externa do alginato. Representações esquemáticas da extrusão clássica (A), do uso do fluxo coaxial de ar (B-i) e respectiva extrusora (B-ii), e do uso da força electrostática (C-i) e respectivo aparelho (C-ii).

2.1.2 Produção de esferas de alginato-PLO-alginato

Como esquematizado na Figura 2, após a reticulação das esferas, estas passaram por um processo de deposição de mais duas camadas de polímero originando um complexo poli-electrolítico à superfície da cápsula, processo também apelidado de *layer-by-layer*. Para tal, após a reticulação na solução gelificante (10-15 min), as esferas foram lavadas com solução salina e transferidas para uma solução de poli-L-ornitina (PLO) (0,1% (m/v) PLO, 150mM NaCl) onde permaneceram por mais 10 minutos. Após nova lavagem, foram novamente transferidas para uma solução de alginato (0,2% (m/v), 150 mM NaCl) e, na última lavagem, a solução salina foi suplementada com cloreto de cálcio (150 mM NaCl, 22 mM CaCl₂). A deposição das camadas foi avaliada pela observação microscópica, recorrendo a um Microscópio estereoscópio (*SZX10 Stereo Microscope*, Olympus) e ainda pela determinação da carga superficial das esferas (potencial zeta). Este parâmetro foi medido recorrendo ao aparelho *Electro Kinetic Analyzer* (EKA, Anton Paar). Para a medição, as amostras foram colocadas numa célula cilíndrica do aparelho e foi usada a solução electrolítica de KCl 1mM.

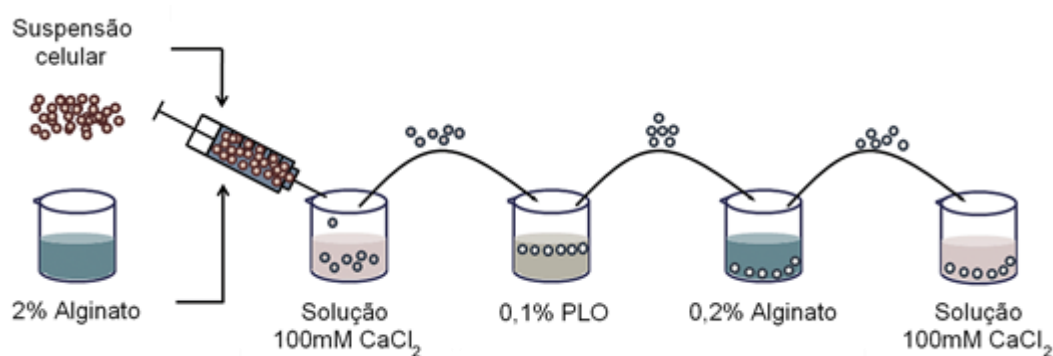


Figura 2: Esquema representativo do encapsulamento celular e formação do complexo electrolítico alginato-PLO-alginato.

2.2 Modificações químicas do alginato

2.2.1 Introdução de grupos aldeído

Com o objectivo de introduzir grupos aldeído na cadeia do alginato, originando o alginato dialdeído, o polímero foi oxidado com periodato de sódio (NaIO₄). Esta reacção consiste na quebra da ligação carbono - carbono, em carbonos que estejam ligados ao oxigénio, quer em forma de hidroxilo (OH) quer em carbonilo (RC=O), criando grupos aldeído, como mostra a Figura 3.

Para tal, foi preparada uma solução de 1 g de alginato de sódio (*Sodium alginate*, 65-70% ácido gulurónico, viscosidade ~ 100-300 mPa.s, Fluka BioChemica) em 40 mL de água destilada na qual foi adicionada 1,08 g de NaIO_4 (quantidade que proporciona uma oxidação teórica de ~ 20%). A mistura permaneceu em agitação, à temperatura ambiente e protegida da luz, durante 24 horas. Após esse período de tempo, a reacção foi neutralizada com a adição de 2 mL etilenoglicol, permanecendo em agitação durante 15 minutos. O alginato oxidado foi purificado através da sua precipitação após adição de 500 mg de cloreto de sódio (NaCl) e 60 mL de etanol. De seguida, o polímero foi dissolvido em 20 mL de água destilada e novamente precipitado pela adição de 40 mL de etanol. Este processo foi repetido três vezes e o precipitado final foi filtrado e seco à temperatura ambiente, sob vácuo.

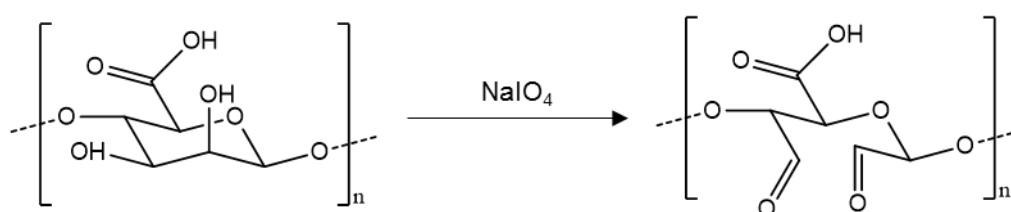


Figura 3: Esquema da reacção simplificada da síntese do alginato dialdeído através da oxidação do alginato com periodato de sódio.

Para confirmar a ocorrência da reacção, foi utilizada a técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR). Os espectros na zona de infravermelhos do alginato original e do oxidado foram então registados a uma resolução de 4 cm^{-1} , entre os números de onda de 4000 cm^{-1} e 550 cm^{-1} , recorrendo a um espectrofotómetro *FTIR-4200* (Jasco Analytical Instruments).

2.2.2 Introdução de grupos metacrilato

Tirando proveito da oxidação do alginato, foi feita uma adição nucleofílica entre os grupos aldeído do alginato oxidado e o grupo amina do metacrilato de 2-amino etilo, ficando os grupos metacrilato livres para posterior reacção (Figura 4).

O procedimento consistiu na preparação de duas soluções: solução A e B. A solução A continha 202 mg de alginato oxidado em 10 mL de tampão fosfato salino - PBS (137 mM NaCl , 2,7 mM KCl , 10mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) na qual foram adicionados 46 mg de cianoborohidreto de sódio (NaCNBH_3). A solução B foi preparada dissolvendo

207,25 mg de metacrilato de 2-amino etilo em 5 mL de metanol. A solução B foi adicionada gota à gota à solução A e a reacção ocorreu durante 24 horas sob agitação, à temperatura ambiente e protegida da luz. O produto da reacção foi purificado por diálise em água destilada durante 3 dias, recorrendo a membranas de diálise (*molecular weight cut-off* ~ 3500 Da). No final da diálise o produto purificado foi congelado e liofilizado.

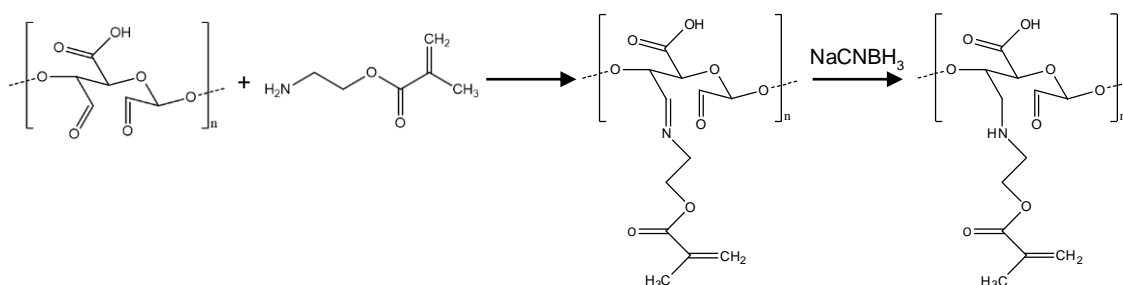


Figura 4: Esquema da reacção simplificada da síntese do alginato metacrilato através da adição nucleofílica de metacrilato de 2-amino etilo, seguida de uma aaminação redutiva.

Para confirmar a modificação, foi utilizada a técnica de ressonância magnética nuclear de protão (^1H -RMN). Os espectros de ^1H -RMN do alginato modificado foi registado em água deuterada (20-25 mg em 0,2 mL) a 25 °C, com um espectrómetro de RMN (*Varian Unity 600 MHz Spectrometer*), utilizando uma sonda de banda larga de 3 mm, um pulso de 90° e um tempo de relaxamento de 30s.

3. Resultados

3.1 Preparação de hidrogéis de alginato

Todos os hidrogéis de alginato foram preparados pela gelificação externa, tirando proveito da capacidade da interacção deste polímero natural com os catiões de cálcio, como descrito em pormenor anteriormente. Recorrendo a diferentes tecnologias, neste caso todas baseadas na extrusão do alginato, é possível diminuir o tamanho das esferas produzidas [2]. A Figura 5 mostra o resultado dessa diminuição de tamanho: ~ 2000 μm para as esferas produzidas pela extrusão clássica, ~ 1000 μm e ~ 750 μm para as esferas produzidas pela extrusora com fluxo coaxial de ar (com dois diâmetros de agulha diferentes) e ainda ~ 300 μm para as esferas produzidas pela acção da força

electroestática. Na imagem, a esfera A contém células encapsuladas, explicando a diferente opacidade em relação às outras esferas. Verificou-se também, nas experiências realizadas, que o encapsulamento celular aumenta em poucos micras o tamanho das esferas.

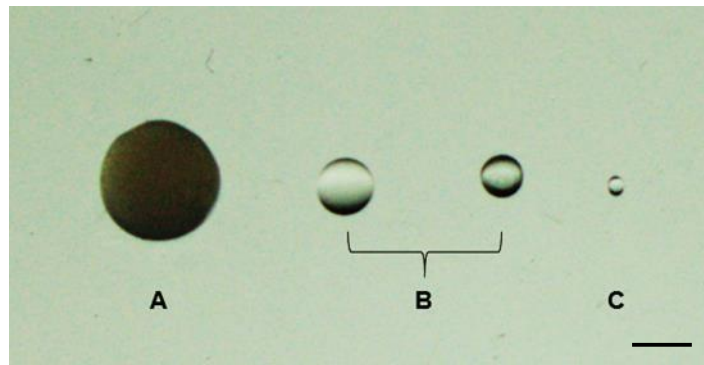
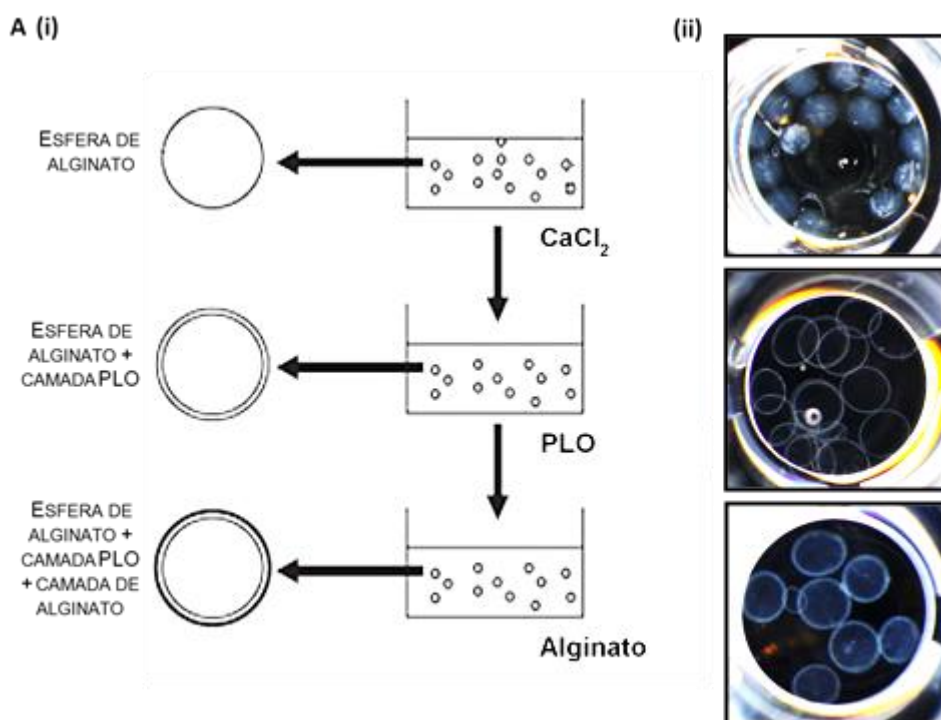


Figura 5: Imagem obtida por Microscopia estereoscópica das esferas produzidas pelos três diferentes métodos testados: (A) extrusão clássica, (B) extrusão pelo fluxo coaxial de ar, usando agulhas de diâmetros diferentes (0,5 e 0,09 mm) e (C) extrusão pela força electrostática. A barra na imagem corresponde a 1000 μm .

A interacção das esferas de alginato com poli-electrólitos de cargas opostas é também uma técnica muito usada para o encapsulamento de células produtoras de insulina, por permitir um melhor imuno-isolamento e maior estabilidade do sistema. Pretendeu-se também testar essa interacção através da adição de uma camada de PLO, um polímero carregado positivamente, e nova adição de alginato. Embora não tenha sido possível mostrar a mudança da carga das esferas de negativa para positiva, após a introdução do PLO, conseguiu-se observar uma alteração do valor da carga. Medida pelo potencial zeta, a carga sofre uma alteração para valores menos negativos, sugerindo a deposição do PLO (Figura 6-B). Acreditamos que esta deposição tenha ocorrido, e a subsequente também, com a introdução de mais uma camada de alginato, pois há uma nítida mudança na estrutura das esferas a cada passo, como podemos observar ao microscópio (Figura 6-Aii). As imagens são semelhantes às reportadas na literatura [3].



B

Potencial zeta (mV)

Alginato	- 11,5 ± 0,2
Alginato-PLO	- 7,6 ± 0,7

Os valores dizem respeito às médias ± desvio padrão (n=3-6).

Figura 6: Microsfemas de alginato-PLO-alginato. (A) Representação esquemática (i) e respectivas imagens reais (ii) da formação das microsferas por interacção entre os poli-electrólitos. (B) Avaliação da carga de superfície das microsferas através da determinação do seu potencial zeta.

3.2 Introdução de grupos aldeído e metacrilato no alginato

Com o objectivo de introduzir grupos aldeído na cadeia de alginato para futuras reacções por adição nucleofílica, procedeu-se à oxidação do mesmo. A confirmação da reacção de oxidação foi avaliada por FTIR-ATR (Figura 7). Observando o espectro, é possível encontrar a banda característica dos grupos aldeído no alginato que sofreu a oxidação, originando o alginato dialdeído. A banda encontra-se a 1739 cm⁻¹, muito próximo do valor referenciado na literatura de 1730 cm⁻¹ [17]. A percentagem de oxidação não foi estudada, mas teoricamente a reacção que desenvolvemos levaria a 20% de oxidação.

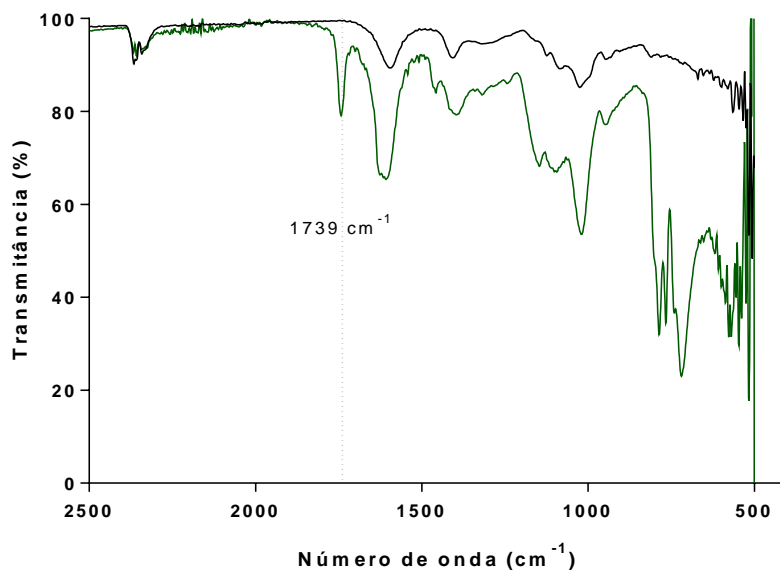


Figura 7: Espectro de FTIR-ATR do alginato de sódio (preto) e do alginato dialdeído (verde).

Com o objectivo de introduzir grupos metacrilato na cadeia de alginato, para posterior uso na polimerização radicalar, usou-se o composto metacrilato de 2-amino etilo. As amins do composto reagiram com os aldeídos do alginato dialdeído pela reacção de adição nucleofílica, seguida de uma aminação redutiva. A confirmação da reacção foi avaliada por $^1\text{H-RMN}$ (Figura 8). A observação do espectro permite a observação dos picos característicos dos grupos acrilato garantindo assim o sucesso da funcionalização.

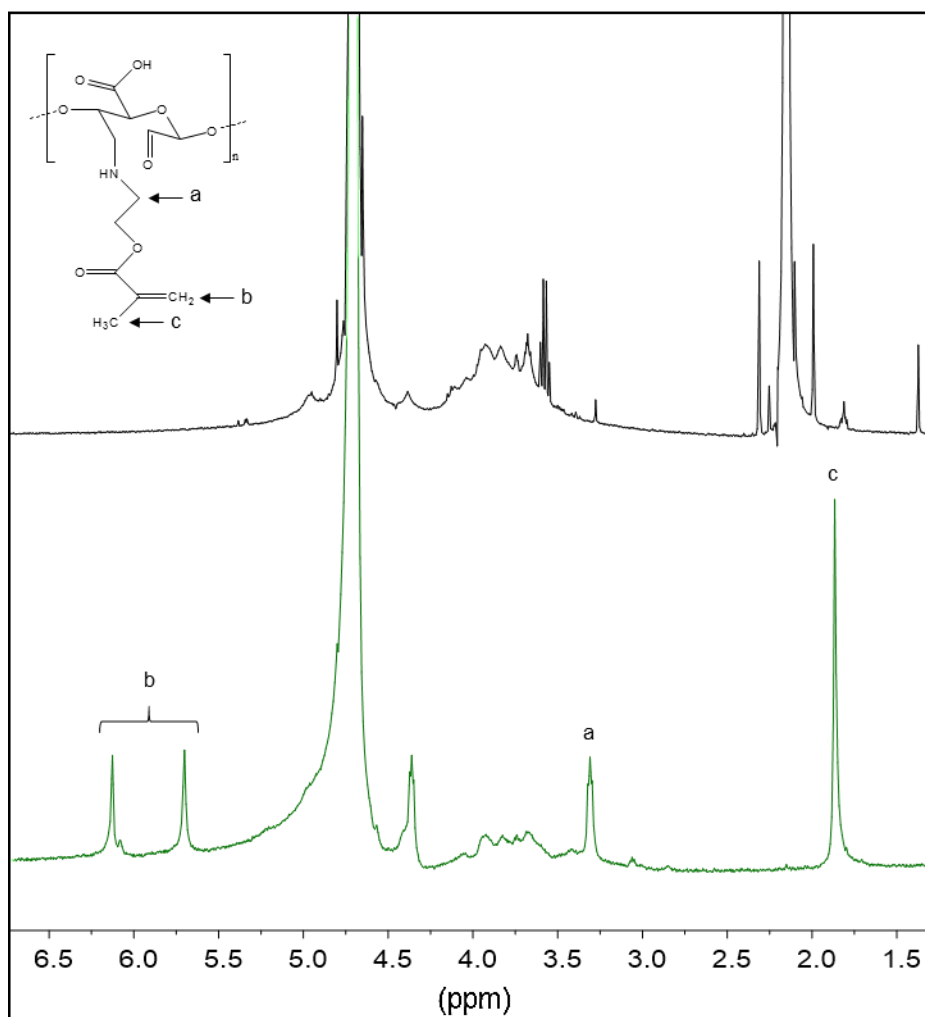


Figura 8: Espectro de ¹H-RMN do alginato de sódio (preto) e do alginato metacrilato (verde) produzido a partir do alginato dialdeído.

4. Discussão

A possibilidade de modular as características dos hidrogéis de alginato, melhorando aspectos físico-químicos como o tamanho e a estabilidade e aspectos biológicos como a biocompatibilidade e a capacidade de imunoproteção, permite aproximar esta metodologia da prática clínica. Garantir a função do implante ao longo do tempo, com todos os desafios daí decorrentes, é então o principal objectivo de quem trabalha com o pâncreas bio-artificial e, portanto, do presente trabalho. Neste sentido, para além de se terem testado alguns métodos já descritos na literatura, como é o caso das metodologias baseadas na extrusão e gelificação externa para a redução das esferas de alginato e do método para produção de esferas de alginato-PLO-alginato, foi também objectivo deste trabalho sintetizar materiais de base alginato para novas aplicações. Efectuámos então

duas modificações químicas no polímero que, embora sejam já conhecidas e utilizadas em aplicações biomédicas, nunca foram descritas para as aplicações que gostaríamos de lhes dar em ensaios futuros.

Na primeira modificação, pretendeu-se com a oxidação do alginato, torná-lo reactivo para futuras adições nucleofílicas, formando bases de Schiff entre os grupos aldeído do alginato dialdeído e as aminas [4] que, neste caso, estão presentes na superfície celular ou na camada de colagénio que rodeia os ilhéus. Estudos recentes já tiraram proveito desta reactividade dos grupos aldeído com aminas de polímeros/substâncias de interesse para aplicações biomédicas [15, 16]. No encapsulamento de ilhéus a interacção entre estes dois grupos funcionais já foi demonstrada numa técnica de *layer-by-layer*, em que o uso de dextrano oxidado permitiu a ancoragem da enzima urocinase através da formação da base de Schiff [19]. Para o teste da reacção à superfície celular, as condições fisiológicas terão que ser mantidas e os reagentes usados citocompatíveis, garantindo que não haverá prejuízo para as células, o maior desafio de qualquer procedimento nesta área. Após a reacção com o periodato de sódio, a percentagem de oxidação terá que ser confirmada e deverão ser testadas diferentes percentagens de oxidação, na tentativa de encontrar qual a óptima para o sucesso do encapsulamento por este método. Esta informação é muito relevante, uma vez que também tirámos proveito deste material para alterações subsequentes, no grupo aldeído.

Com o objectivo de introduzir grupos metacrilato na cadeia do alginato, tirou-se proveito do alginato oxidado e, através da adição nucleofílica do composto metacrilato de 2-amino etilo, seguida de uma aminação redutiva, produziu-se uma amina estável [20, 21] que aprisiona os grupos funcionais pretendidos (Figura 4). O intuito de introduzir os grupos metacrilato na cadeia de alginato teve diferentes objectivos. Um diz respeito à possibilidade de, com estes grupos adicionais, melhorar a estabilidade dos hidrogéis em fluidos biológicos ao longo do tempo. Como é conhecido, a perda gradual da estabilidade e integridade dos hidrogéis ocorre, em condições fisiológicas, pela troca dos iões de cálcio pelos de sódio, diminuindo a reticulação das cadeias e causando alterações osmóticas que levam ao *swelling* e destabilização dos hidrogéis [22]. Com os grupos metacrilato, pretende-se então criar duas possibilidades diferentes de reticulação estável, ambas baseadas na polimerização radicalar. Vulgarmente, recorrem-se a foto-iniciadores biocompatíveis que, pela acção da luz, geram radicais que reagem com os grupos acrilato formando ligações covalentes, mas outro tipo de iniciadores da reacção podem ser utilizados [4]. Assim, os grupos metacrilato introduzidos poderão reticular as cadeias de alginato de uma forma permanente, uma vez que se trata de uma reacção química mais estável ao invés da meramente electrostática que ocorre vulgarmente com o cálcio. Neste contexto, *Desai* e seus colaboradores descrevem a extrusão de uma mistura entre

polímeros de alginato e de PEGDA que sofre uma dupla reticulação, no banho gelificante e por acção da luz ultravioleta [23]. Este estudo demonstrou maior coesão do sistema, impulsionando o estudo da metodologia que propomos. Recorrendo à mesma reacção, o alginato metacrilato poderá ainda interagir com o PEGDA, dando mais robustez ao sistema e melhorando a sua biocompatibilidade pela peguilação. O uso do PEG com o objectivo de melhorar a biocompatibilidade do sistema também já foi reportado através do uso de outros sistemas [24, 25].

Pretendíamos que a introdução do alginato metacrilato ocorre-se apenas na camada exterior do modelo que seria então um complexo poli-electrolítico alginato-PLO-alginato metacrilato, por fim reticulado com PEGDA. Diferentes percentagens de reticulação poderiam ser estudadas, garantindo a robustez e a manutenção da viabilidade celular.

A técnica de fotopolimerização de hidrogéis de PEGDA também já foi aplicada no encapsulamento de células beta de ratinho MIN6 [26] e células beta de rato RIN5-m5F [27] de forma a incluir no hidrogel bio-sustâncias de interesse. Outro objectivo de trabalho futuro consiste em abordar esta metodologia, ao introduzir um péptido capaz de sequestrar citocinas pró-inflamatórias (péptido anti-TNF), sintetizado com um terminal metacrilato para reagir por polimerização radicalar com o alginato metacrilato (Anexo I). Uma vez mais a caracterização da percentagem de oxidação inicial será necessária para perceber a quantidade de péptido adicionada e fazer um estudo da influência de diferentes quantidades na protecção celular contra citocinas pró-inflamatórias. Para introduzir capacidade protectora contra espécies reactivas de oxigénio (ROS) pretende-se também, interagir electrostaticamente uma porfirina com actividade de superóxido dismutase (Anexo II), aquando da formação do complexo poli-electrolítico alginato-PLO.

Resumindo, apenas com a preparação de um material, o alginato dialdeído, é possível, de uma forma controlada dependente da oxidação do alginato, e recorrendo a diferentes métodos, introduzir novos grupos funcionais e criar interacções com entidades de interesse, como o caso das células a encapsular e bio-sustâncias que tragam benefícios ao modelo.

5. Referências bibliográficas

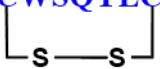
1. Lim F, Sun A (1980) Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* (80-) 210:908–910.
2. Paques JP, Van Der Linden E, Van Rijn CJM, Sagis LMC (2014) Preparation methods of alginate nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci* 209:163–171. doi: 10.1016/j.cis.2014.03.009
3. de Vos P, Faas MM, Strand B, Calafiore R (2006) Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials* 27:5603–5617. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.07.010
4. Sun J, Tan H (2013) Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials (Basel)* 6:1285–1309. doi: 10.3390/ma6041285
5. Bidarra SJ, Barrias CC, Granja PL (2014) Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering. *Acta Biomater* 10:1646–1662. doi: 10.1016/j.actbio.2013.12.006
6. Crisóstomo J, Coelho J, Seiça R (2013) Bioartificial Pancreas: In the Road to Clinical Application. In: Coelho J (ed) *Drug Deliv. Syst. Adv. Technol. Potentially Apl. Pers. Treat.* Springer, pp 127–151
7. Iacovacci V, Ricotti L, Menciassi A, Dario P (2016) The bioartificial pancreas (BAP): Biological, chemical and engineering challenges. *Biochem Pharmacol* 100:12–27. doi: 10.1016/j.bcp.2015.08.107
8. Leung A, Nielsen LK, Trau M, Timmins NE (2010) Tissue transplantation by stealth-Coherent alginate microcapsules for immunoisolation. *Biochem Eng J* 48:337–347. doi: 10.1016/j.bej.2009.10.007
9. Soon-Shiong P (1999) Treatment of type I diabetes using encapsulated islets. *Adv Drug Deliv Rev* 35:259–270. doi: 10.1016/S0169-409X(98)00076-3
10. Basta G, Osticioli L, Rossodivita M, et al. (1995) Method for fabrication of coherent microcapsules: a new, potential immunoisulatory barrier for pancreatic islet transplantation. *Diabetes Nutr Metab* 8:105–112.
11. Miura S, Teramura Y, Iwata H (2006) Encapsulation of islets with ultra-thin polyion complex membrane through poly(ethylene glycol)-phospholipids anchored to cell membrane. *Biomaterials* 27:5828–5835.
12. Teramura Y, Kaneda y, Iwata H (2007) Islet-encapsulation in ultra-thin layer-by-layer membranes of poly(vinyl alcohol) anchored to poly(ethylene glycol)-lipids in the cell membrane. *Biomaterials* 28:4818–4825.
13. Contreras JL, Xie D, Mays J, et al. (2004) A novel approach to xenotransplantation combining surface engineering and genetic modification of isolated adult porcine islets. *Surgery* 136:537–547. doi: 10.1016/j.surg.2004.05.031
14. Teramura Y, Iwata H (2010) Bioartificial pancreas. Microencapsulation and conformal coating of islet of Langerhans. *Adv Drug Deliv Rev* 62:827–840. doi: 10.1016/j.addr.2010.01.005

15. Dahlmann J, Krause A, Möller L, et al. (2013) Fully defined in situ cross-linkable alginate and hyaluronic acid hydrogels for myocardial tissue engineering. *Biomaterials* 34:940–951. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.008
16. Balakrishnan B, Mohanty M, Umashankar P, Jayakrishnan A (2005) Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials* 26:6335–6342. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.012
17. Ungerleider J (2012) Synthesis of Oxidized Alginate Microbeads. *The Spectra* 3:44–48.
18. Gattás-Asfura K, Fraker C, Stabler C (2011) Covalent stabilization of alginate hydrogel beads via Staudinger ligation: Assessment of poly(ethylene glycol) and alginate cross-linkers. *J Biomed Mater Res A* 99:47–57. doi: 10.1038/nature13314.A
19. Teramura Y, Iwata H (2008) Islets surface modification prevents blood-mediated inflammatory responses. *Bioconj Chem* 19:1389–1395. doi: 10.1021/bc800064t
20. Maia J, Carvalho RA, Coelho JF, et al. (2011) Insight on the periodate oxidation of dextran and its structural vicissitudes. *Polymer (Guildf)* 52:258–265. doi: 10.1016/j.polymer.2010.11.058
21. Suvorova O, Iozep A, Passet B (2001) Reactivity of Polysaccharide Aldehydes toward N-Nucleophiles. *Russ J Appl Chem* 74:1016–1020. doi: 10.1023/A:1013011911022
22. Huang X, Zhang X, Wang X, et al. (2012) Microenvironment of alginate-based microcapsules for cell culture and tissue engineering. *J Biosci Bioeng* 114:1–8. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.02.024
23. Desal NP, Sojomihardjo a, Yao Z, et al. (2000) Interpenetrating polymer networks of alginate and polyethylene glycol for encapsulation of islets of Langerhans. *J Microencapsul* 17:667–690. doi: 10.1080/02652040050161675
24. Spasojevic M, Paredes-Juarez GA, Vorenkamp J, et al. (2014) Reduction of the inflammatory responses against alginate-poly-L-lysine microcapsules by anti-biofouling surfaces of PEG-b-PLL diblock copolymers. *PLoS One* 9:1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0109837
25. Nabavimanesh MM, Hashemi-Najafabadi S, Vasheghani-Farahani E (2015) Islets immunoisolation using encapsulation and PEGylation, simultaneously, as a novel design. *J Biosci Bioeng* 119:486–491. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.09.023
26. Hume PS, Anseth KS (2011) Polymerizable superoxide dismutase mimetic protects cells encapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels from reactive oxygen species-mediated damage. *J Biomed Mater Res* 99 A:29–37. doi: 10.1002/jbm.a.33160
27. Lin CC, Anseth KS (2009) Glucagon-like peptide-1 functionalized PEG hydrogels promote survival and function of encapsulated pancreatic beta-cells. *Biomacromolecules* 10:2460–2467. doi: 10.1021/bm900420f

Anexo I

Nome: Péptido Acryl-WP9QY

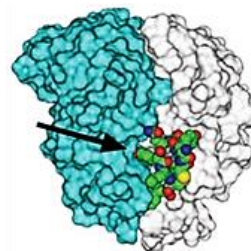
Sequência: **Acryl**-**YCWSQYLCY**-NH₂



Peso molecular: 1280 Da

Pureza: 93,6%

Péptido anti-TNF



Síntese peptídica Fmoc em fase sólida, purificação por HPLC (Figura 1) e caracterização por microscopia de massa MALDO-TOF (Figura 2).

[Trabalho realizado por Nuno Vale e Paula Gomes, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto]

Figura 1

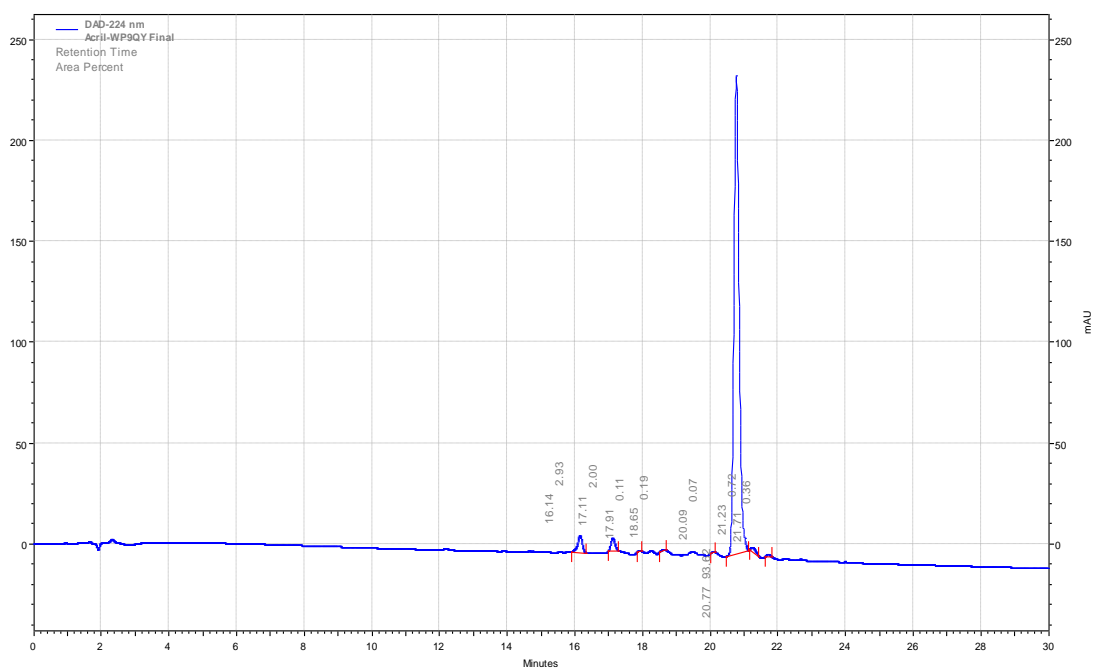
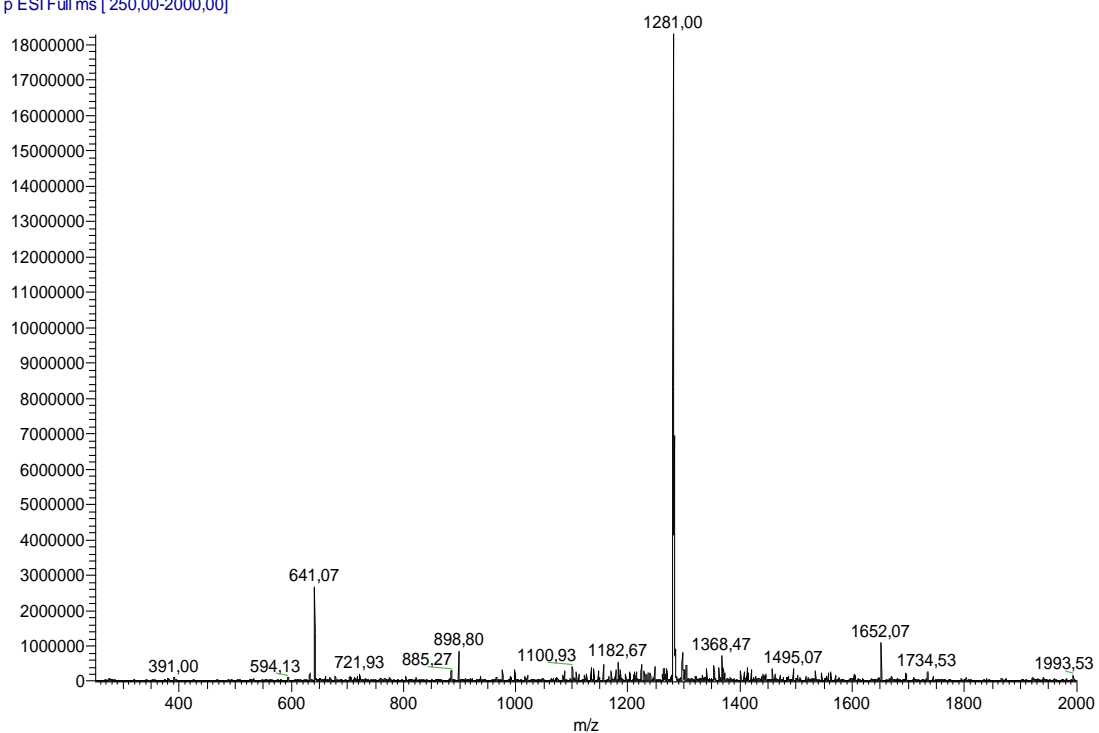


Figura 2

NVAcriWP9QK_130515134208 #714-723 RT: 18,1
T: + p ESI Full ms [250,00-2000,00]

10 NL: 1,83E7



Anexo II

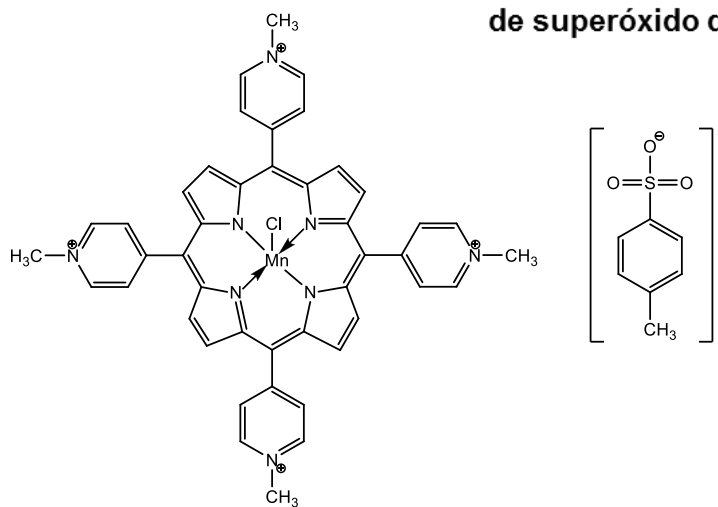
Nome: 5,10,15,20-Tetrakis-(N-methyl-4-pyridyl)-porphyrin-Mn(III) chloride tetratosylate

Sinónimo: TMPyPMn(III)

Peso molecular: 1451,97 Da

Triportech, Germany

**Porfirina com actividade
de superóxido dismutase**



SECÇÃO 2

**Isolamento de ilhéus de Langerhans e encapsulamento
em hidrogéis de alginato**

1. Introdução

Com o crescimento de abordagens metodológicas de encapsulamento de células produtoras de insulina para o tratamento da diabetes, o recurso a novas fontes de células tem sido investigado, na tentativa de, no futuro, solucionar a falta de dadores alogénicos para os implantes em humanos [1, 2]. Para além de fontes xenogénicas, metodologias baseadas na criação de linhas de células beta imortalizadas, células beta derivadas de células estaminais ou de processos de reprogramação celular, têm sido alvo de estudo [1, 2]. Com estes procedimentos, cria-se a possibilidade de autotransplantes, reduzindo assim a reacção imunitária e diminuindo também a complexidade dos modelos para o imuno-isolamento [1–3]. No entanto, a criação de células beta funcionais, com uma secreção apropriada de insulina, é desafiante, e muitos dos métodos falham nesse objectivo [2].

No pâncreas, os ilhéus são compostos por células beta secretoras de insulina, células alfa secretoras de glucagon, células delta secretoras de somatostatina e ainda células PP secretoras do polipeptídeo pancreático, entre outras. O íntimo contacto entre estes tipos celulares, permite uma comunicação parácrina que, juntamente com os efeitos autócrinos e neuroendócrinos, regulam a complexa função endócrina destas células. Demonstrando o crucial contacto célula-célula, embora apenas com células beta MIN6, um estudo de Chowdhury et al. mostra que a formação de aglomerados, também apelidados de pseudo-ilhéus, torna a secreção de insulina mais eficiente do que a das células em monocamada, assemelhando-se assim à capacidade secretora de ilhéus humanos [4].

Retendo as complexas interacções multicelulares, os ilhéus íntegros mostram uma maior eficiência na secreção de insulina comparativamente com as células beta individualizadas [1, 5]. Já foi demonstrado que, em células beta isoladas de ilhéus humanos, aquelas que se mantêm indissociáveis de células alfa, segregam mais insulina quando estimuladas por glicose [6].

Desta forma, com o objectivo de manter a vantajosa complexidade celular encontrada nos ilhéus, pretende-se testar o modelo 3D de hidrogéis de alginato funcionalizado em ilhéus de rato, para posterior implante alogénico. De facto, perspectiva-se que estas estruturas altamente diferenciadas e adaptadas para a síntese de insulina possam ser vantajosas para o sucesso do implante. Assim, nesta secção é apresentada a descrição do isolamento de ilhéus de Langerhans de rato, alguns resultados preliminares que confirmam a sua funcionalidade e ainda um teste preliminar do seu encapsulamento.

2. Materiais e métodos

2.1 Isolamento de ilhéus de Langerhans

O método de isolamento dos ilhéus de Langerhans usado consiste na sua separação do tecido exócrino pancreático, por digestão enzimática, mantendo a estrutura e a função dos ilhéus preservadas. Este método foi inicialmente descrito por Lacy e Kostianovsky [7], tendo sofrido pequenas adaptações já descritas por Silva [8] e Seiça [9].

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, estes foram colocados na mesa cirúrgica em posição dorsal e foi desinfectada e limpa a zona abdominal. Todos os procedimentos que se seguiram foram efectuados com a maior brevidade possível a fim de minimizar a hipóxia celular. Todas as soluções usadas (Tabela 1) foram mantidas em gelo e sob atmosfera de 95% O₂ e 5% CO₂.

Tabela 1: Composição das soluções de isolamento

Soluções	Composição
Solução A	115 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM NaHCO ₃ , 1,2 mM NaH ₂ PO ₄ , 25 mM HEPES ácido, 1 mM MgCl ₂ ; 2,56 mM CaCl ₂ ; 8 mM glicose, pH=7,4
Solução B	Solução A suplementada com 3% (m/v) de BSA, pH=7,4
Solução enzimática	Solução A suplementada com <i>Liberase TL</i> ou <i>Collagenase P</i>

Após incisão mediana xifo-púbica, expôs-se a árvore biliar e a face posterior do pâncreas e, à lupa, laqueou-se o colédoco a nível distal (*clamp* a nível da ampola de Vater) e a nível proximal (nó cirúrgico abaixo das ramificações cística e hepática). A jusante da laqueação proximal, e através de uma pequena incisão transversal no colédoco, injectou-se lentamente a solução enzimática (Tabela 1) (Figura 1 - A e B). Para evitar a desidratação e promover o arrefecimento dos órgãos de modo a garantir a actividade reduzida da enzima durante a injeção e posterior dissecação do pâncreas, os órgãos foram humedecidos com a solução A arrefecida (Tabela 1). Neste trabalho foram testadas duas enzimas diferentes, a *Liberase TL* e a *Collagenase P*, ambas adquiridas à Roche Diagnostics. Depois da distensão completa do pâncreas com a solução enzimática (10 - 15 mL para ratos com um peso entre os 200 - 300 g), procedeu-se à sua dissecação com

a maior brevidade possível (remoção inicial da porção gastrosplénica, seguida da duodenal e por fim a porção biliar) (Figura 1 - C e D).

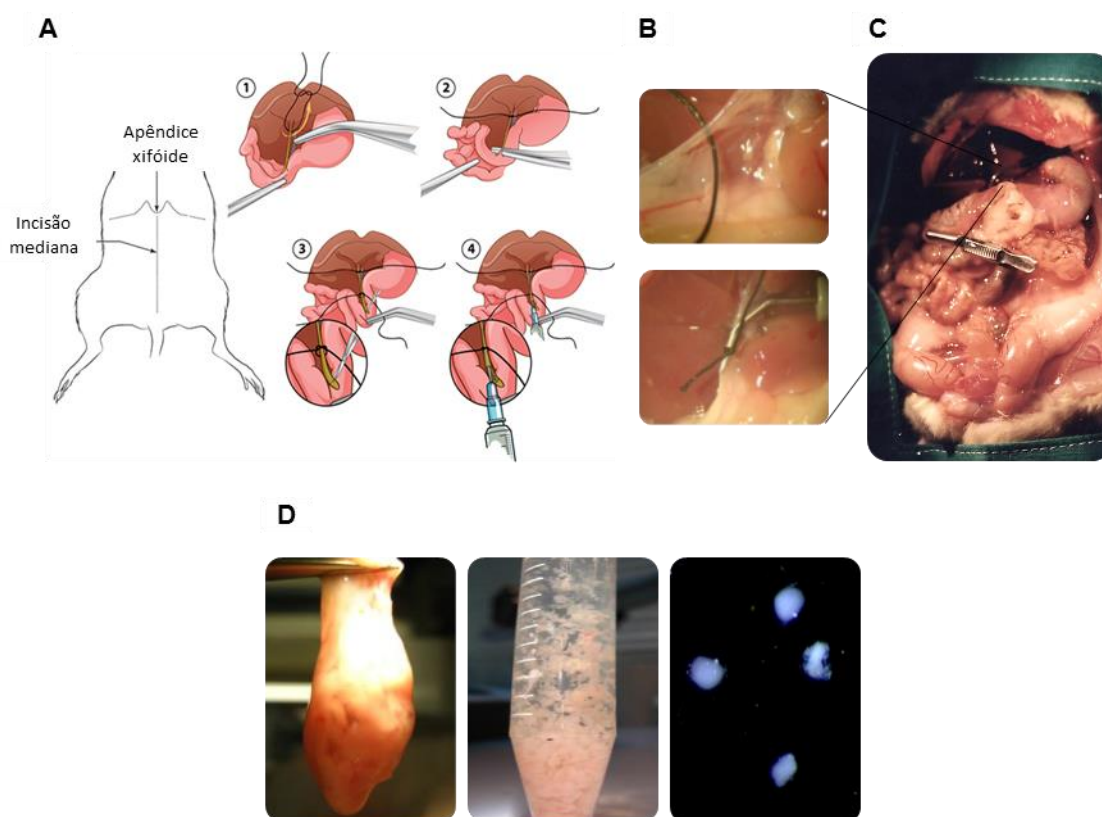


Figura 1: Representação esquemática e fotografias do processo de isolamento dos ilhéus de Langerhans. Pormenor da canulação do colédoco em representação esquemática (A) e no rato (B) e pâncreas distendido com a solução enzimática (C). Da esquerda para a direita, fotografia do pâncreas dissecado, após a digestão, e ilhéus livres de tecido exócrino (D). Adaptado de Stull et al. 2012 e Figueiredo 2010.

A digestão foi realizada a 37 °C por imersão do tubo *falcon* com o pâncreas dissecado num banho termostaticado, acompanhado por suave agitação manual. O tempo de digestão variou na dependência da enzima usada, da concentração da mesma e da sua actividade. Este intervalo de tempo também é condicionado por outras variáveis, como a idade e o peso do animal. Deste modo, utilizaram-se critérios visuais, tais como o aumento da turbidez da suspensão e o desprendimento de pequenos fragmentos do pâncreas, de forma a decidir o momento exacto para parar a reacção. Os melhores resultados foram conseguidos com a enzima *Collagenase P* numa concentração de 1mg/mL (actividade 2,4U/mg), com o tempo de digestão de 8 - 9 minutos. A reacção enzimática foi terminada pela diminuição brusca da temperatura, pela diluição e pela presença de BSA (colocação do tubo *falcon* no gelo e adição da solução B arrefecida) (Tabela 1). O tubo foi em seguida

agitado, promovendo a disrupção mecânica do pâncreas e, posteriormente, deixou-se sedimentar no gelo durante 3 minutos, sob atmosfera de 95% O₂ e 5% CO₂. O sobrenadante foi retirado por aspiração com o auxílio de uma pipeta de Pasteur descartável e o tubo foi de novo cheio com a solução B para nova sedimentação. Este processo de lavagem foi repetido 3 vezes até remover toda a gordura, tecido exócrino mal digerido e também para garantir a eliminação de toda a enzima residual.

No final das lavagens adicionou-se novamente solução de isolamento B mantida à temperatura ambiente e, com a ajuda de uma pipeta graduada, homogeneizou-se suavemente o material biológico e distribuiu-se por caixas de Petri para posterior selecção dos ilhéus à lupa (Figura 1-D). Os ilhéus foram seleccionados em função da sua integridade morfológica (contornos regulares e cor branca opaca) e recolhidos por aspiração manual com uma pipeta automática para a referida solução de isolamento, à temperatura ambiente e em atmosfera de 95% O₂ e 5% CO₂. Este processo repetiu-se até eliminação da contaminação com os fragmentos restantes do tecido exócrino (Figura 1-D).

2.2 Cultura celular

Após isolamento, os ilhéus seleccionados passaram por um processo de esterilização na camara de fluxo laminar. Este consistiu na transferência consecutiva (3 vezes) dos ilhéus para caixas de Petri contendo meio estéril. No fim, os ilhéus permaneceram em meio *Roswell Park Memorial Institute* (1640 RPMI 1640), suplementado com 8 mM de glicose, 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, mantidos numa incubadora sob atmosfera humidificada, a 37 °C e contendo 5% (v/v) CO₂.

2.3 Secreção de insulina

O teste de secreção de insulina em resposta à glicose foi realizado nos ilhéus após 24 horas em cultura. Para tal, após a remoção do meio e a lavagem dos ilhéus com tampão *Krebs-Ringer* modificado (135 mM NaCl, 3,6 mM KCl, 0,5 mM NaH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 1,5 mM CaCl₂, 0,5mM MgCl₂, 0,1% (m/v) BSA, pH 7,4), estes foram incubados com o mesmo tampão durante 30 minutos. Após lavagens, os ilhéus foram incubados com o tampão suplementado com glicose (2 mM, 8 mM ou 11 mM) durante 30 minutos. Após a incubação, foram recolhidos os sobrenadantes e congelados a -20 °C para posterior quantificação da insulina. Os níveis de insulina foram determinados pela técnica de ELISA, recorrendo a um *kit* comercial *Ultrasensitive Rat Insulin ELISA*

(MercoDIA). A absorvância, a 450 nm, foi lida no leitor para microplacas *Synergy MX*, BioTek Instruments Inc.

2.4 Encapsulamento dos ilhéus

Para o encapsulamento, foi preparada uma solução com a concentração final de 2% (m/v) de alginato de sódio (*Sodium alginate*, 65-70% ácido gulurónico, viscosidade ~ 100-300 mPa.s, Fluka BioChemica) em 0,9% de NaCl. A essa solução adicionaram-se os ilhéus isolados e a suspensão foi extrudida através de uma agulha de 25G para uma solução gelificante (100 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl). As esferas permaneceram na solução gelificante durante 15 minutos. Após a reticulação e lavagem em meio de cultura, os ilhéus encapsulados foram colocados em cultura, de acordo com o descrito no ponto 2 desta secção.

3. Resultados e Discussão

Os ilhéus de Langerhans isolados de ratos Wistar saudáveis mostraram, após isolamento com *Collagenase P*, integridade morfológica, apresentando contornos regulares e cor branca opaca, alguns deles ainda rodeados por pequenas fracções de tecido exócrino (Figura 2-Ai). Após estimulação com diferentes concentrações de glicose (2 mM, 8 mM e 11 mM), os ilhéus responderam segregando insulina, de acordo com a concentração de glicose (Figura 2-B). A Figura 2 também mostra os ilhéus encapsulados em esferas de alginato (Figura 2-Aii).

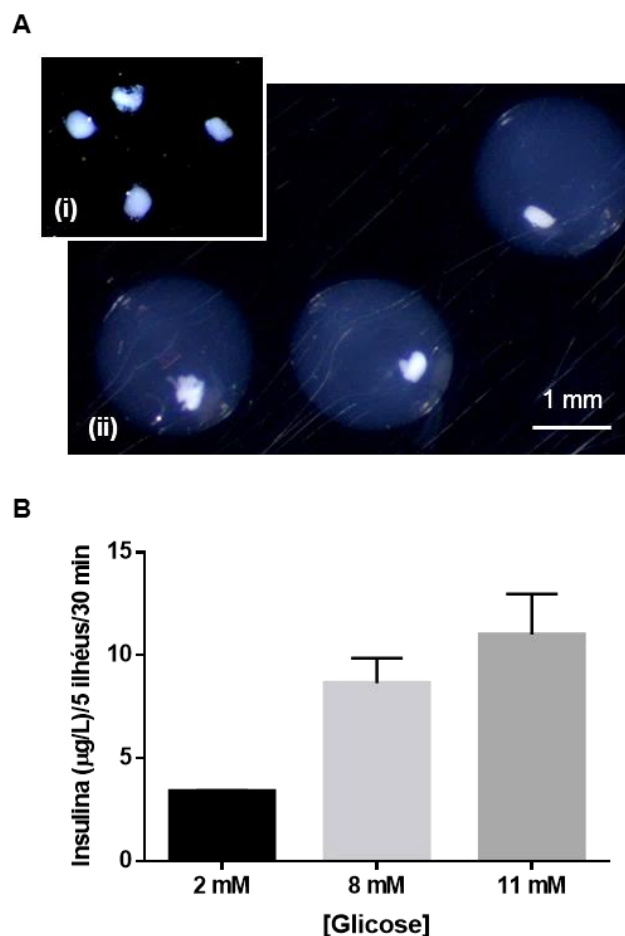


Figura 2: Isolamento e secreção de insulina de ilhéus de Langerhans de rato. (A) Ilhéus isolados (i) e encapsulados em hidrogéis de alginato (ii). (B) Teste de secreção de insulina de ilhéus isolados e incubados com diferentes concentrações de glicose (2 mM, 8 mM e 11 mM), detectada por ELISA. Os valores estão representados pela média \pm DP (n= 2,3).

Assim, demonstrámos a funcionalidade dos ilhéus isolados e mantidos em cultura, e o seu encapsulamento em hidrogéis de alginato. Pretende-se, em ensaios futuros, testar a capacidade de secreção dos ilhéus encapsulados, demonstrando que a glicose é detectada pelas células encapsuladas e que a insulina atravessa o hidrogel e é libertada no meio. O objectivo final será testar, nos ilhéus isolados, o modelo 3D de hidrogéis de alginato que desenvolvemos com as melhorias acrescentadas ao nível da sua funcionalização com RGD, com a introdução das nanopartículas para libertação de GLP-1 e outras habilidades que ainda pretendemos acrescentar ao nosso sistema.

4. Referências bibliográficas

1. Iacovacci V, Ricotti L, Mencias A, Dario P (2016) The bioartificial pancreas (BAP): Biological, chemical and engineering challenges. *Biochem Pharmacol* 100:12–27. doi: 10.1016/j.bcp.2015.08.107
2. Orlando G, Gianello P, Salvatori M, et al. (2014) Cell replacement strategies aimed at reconstitution of the beta-cell compartment in type 1 diabetes. *Diabetes* 63:1433–1444. doi: 10.2337/db13-1742
3. Crisóstomo J, Coelho J, Seica R (2013) Bioartificial Pancreas: In the Road to Clinical Application. In: Coelho J (ed) *Drug Deliv. Syst. Adv. Technol. Potentially Apl. Pers. Treat.* Springer, pp 127–151
4. Chowdhury A, Dyachok O, Tengholm A, et al. (2013) Functional differences between aggregated and dispersed insulin-producing cells. *Diabetologia* 56:1557–1568.
5. Caicedo A (2013) Paracrine and autocrine interactions in the human islet: More than meets the eye. *Semin Cell Dev Biol* 24:11–21. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.09.007
6. Wojtuszczyk A, Armanet M, Morel P, et al. (2008) Insulin secretion from human beta cells is heterogeneous and dependent on cell-to-cell contacts. *Diabetologia* 51:1843–1852. doi: 10.1007/s00125-008-1103-z
7. Lacy P, Kostianovsky M (1967) Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16:35–39. doi: 10.2337/diab.16.1.35
8. Silva AM, Rosário LM, Santos RM (1994) Background Ca^{2+} Influx Mediated by a Dihydropyridine- and Voltage-insensitive Channel in Pancreatic β -Cells: Modulation by Ni^{2+} , Diphenylamine-2-carboxylate, and Glucose Metabolism. *J Biol Chem* 269:17095–17103.
9. Seica RM, Suzuki K, Santos R, Do Rosário LM (2004) Deficiência primária da secreção de insulina de ilhéus isolados de ratos Goto-Kakizaki, um modelo animal de diabetes tipo 2 não obesa. *Acta Med Port* 17:42–48.

CAPÍTULO 6

Conclusões finais e perspectivas futuras

O desenvolvimento do presente trabalho pretendeu dar um contributo para a resolução dos problemas reportados na aplicação do pâncreas bio-artificial. Este complexo sistema de libertação de insulina, por recorrer a células insulino-produtoras, é o único que se aproxima da secreção do pâncreas endócrino. Desta forma, o sucesso desta metodologia trará uma mudança de paradigma no tratamento da diabetes e a qualidade de vida destes doentes mudará radicalmente.

Estratégias que permitam melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas do pâncreas bio-artificial, ultrapassando as limitações desta metodologia, têm sido alvo de investigação nos últimos anos e estão na base deste trabalho, que se focou especialmente nos aspectos biológicos.

Numa primeira parte, recorrendo a substâncias bio-activas, pretendeu-se criar estratégias para o desenvolvimento de um modelo 3D que melhorasse a sobrevivência e funcionalidade das células beta encapsuladas. Por um lado, modificou-se o alginato com o péptido de adesão RGD, e por outro incorporaram-se nos hidrogéis nanopartículas para a libertação de GLP-1. Após a avaliação das duas estratégias *in vitro* propostas, concluiu-se que, juntamente com a densidade celular óptima a encapsular, ambas cumpriram o objectivo proposto, levando às seguintes considerações:

- Directamente relacionada com a interacção célula-célula, a densidade celular utilizada no encapsulamento é um parâmetro fulcral para a sobrevivência celular e, para as células beta INS-1E, a densidade óptima encontrada foi de 5 milhões de células por mililitro.

- A presença do péptido de adesão RGD no hidrogel permitiu a interacção das células com o mesmo, o aumento da expressão genética de alguns dos componentes da matriz extracelular e ainda um aumento da formação de esferóides. Estes factos traduziram-se numa melhoria da sobrevivência e função das células encapsuladas, com especial importância na melhoria da capacidade de secreção de insulina.

- O co-encapsulamento das células beta com as nanopartículas de PLGA contendo GLP-1 é um método inovador e vantajoso para a sua libertação no local de interesse, as células beta. Sem induzir toxicidade, a actuação da incretina libertada pelas nanopartículas mostrou melhorar a actividade metabólica e induzir um incremento acentuado na capacidade de secreção de insulina pelas células encapsuladas.

Na segunda parte do trabalho pretendeu-se testar a eficácia do implante das células beta INS-1E encapsuladas no modelo 3D de hidrogéis de alginato funcionalizado com o péptido de adesão RGD, num transplante alogénico, em ratos diabéticos tipo 2 imunocompetentes. As avaliações realizadas permitem chegar às seguintes conclusões:

- Os animais implantados com as células neste modelo melhoraram o seu perfil glicémico, constatado pela melhoria da glicemia ocasional, de jejum e da prova de tolerância intraperitoneal à glicose. Estes animais mostraram uma melhoria da sua sensibilidade à insulina e da resistência à hormona, sugerindo que a insulina segregada pelas células beta implantadas possa ter sido usada de uma forma mais eficiente.

- Nunca antes avaliada, demonstrou-se assim a potencialidade da aplicação desta metodologia para o tratamento da diabetes tipo 2, permitindo um bom controlo glicémico nesta doença.

- Com a falta de dadores alogénicos de ilhéus, este implante alogénico de células beta individualizadas contribuiu também para o estudo desta possível fonte de células produtoras de insulina, ao caracterizar o seu comportamento e sua potencialidade *in vivo*. Contrariamente ao que foi observado *in vitro*, as células não foram capazes de proliferar e formar esferóides após o seu implante, tendo sido observados apenas alguns aglomerados celulares. As condições desafiantes encontradas *in vivo* podem ter comprometido a capacidade de divisão destas células, mas não comprometeram a sua capacidade de secretora, demonstrada pela marcação histológica insulino-positiva das mesmas dentro das esferas de alginato e pelos seus efeitos metabólicos.

A optimização do isolamento de ilhéus de Langerhans de rato também foi abordada neste trabalho para, no futuro, permitir o teste do modelo desenvolvido nestas estruturas altamente diferenciadas na síntese de insulina, acreditando poder melhorar a eficácia do implante.

Por fim, foram descritas duas modificações químicas do alginato, com a introdução de grupos aldeído e metacrilato. Estes permitirão, no futuro, a ligação a moléculas/estruturas de interesse, como as células ou os ilhéus a encapsular e substâncias bio-activas benéficas para o modelo, e ainda, proporcionarão uma forma de reticulação mais estável dos hidrogéis. Em testes futuros, recorrendo a estes materiais, pretende-se diminuir o tamanho das esferas de alginato pela reacção à superfície dos ilhéus ou células beta a encapsular, e torná-las mais estáveis e biocompatíveis, graças à sua reticulação por ligações covalentes estáveis entre as cadeias de alginato e com o PEGDA. As funcionalizações com substâncias bio-activas que propomos adicionar ao sistema pretendem, pela adição de um péptido anti-TNF- α e uma porfirina com actividade superóxido dismutase, proteger as células encapsuladas contra a acção nefasta das citocinas pró-inflamatórias e ROS, respectivamente.

Ainda de salientar que a estratégia química seleccionada neste trabalho teve em consideração dois aspectos essenciais: a simplicidade e ausência de citotoxicidade. Para além destes aspectos, quer na modificação do alginato através da química das cardodiimidias, quer pela sua oxidação, permite-se criar uma grande versatilidade no modelo, pois teoricamente qualquer composto com terminais amínicos poderá interagir quimicamente com o hidrogel. A fotopolimerização que se pretende testar no futuro para a reticulação covalente do hidrogel e introdução de PEG e uma bio-substância, é também citocompatível.

A incorporação das nanopartículas de PLGA no hidrogel também é uma estratégia valiosa que poderá ser usada para o encapsulamento de outros compostos de interesse e assim modular o microambiente das células encapsuladas. Uma das aplicações que se poderá testar com as nanopartículas é a libertação de VEGF para potenciar a angiogénese local. A possibilidade de juntar diferentes estratégias no mesmo modelo poderá ser a chave do sucesso dos implantes no ambiente *in vivo* desafiante.

Concluindo, o presente trabalho é o início de um caminho que ambiciona contribuir para o desenvolvimento de um modelo ideal de pâncreas bio-artificial que possibilite o tratamento ou a cura da diabetes. A junção das estratégias criadas, com outras já delineadas para testar no futuro, culminará no desenvolvimento de um modelo 3D de hidrogéis de alginato, esquematizado na Figura 1, que acreditamos poder ser próximo do ideal para o encapsulamento de células produtoras de insulina e seu transplante, garantindo a função do implante ao longo do tempo.

O esforço conjunto de uma equipa multidisciplinar de engenheiros, biólogos e clínicos é essencial para encontrar soluções realísticas, capazes de ultrapassar os problemas reportados nesta aplicação, tornando-a numa realidade tão ansiada por um número cada vez maior de doentes.

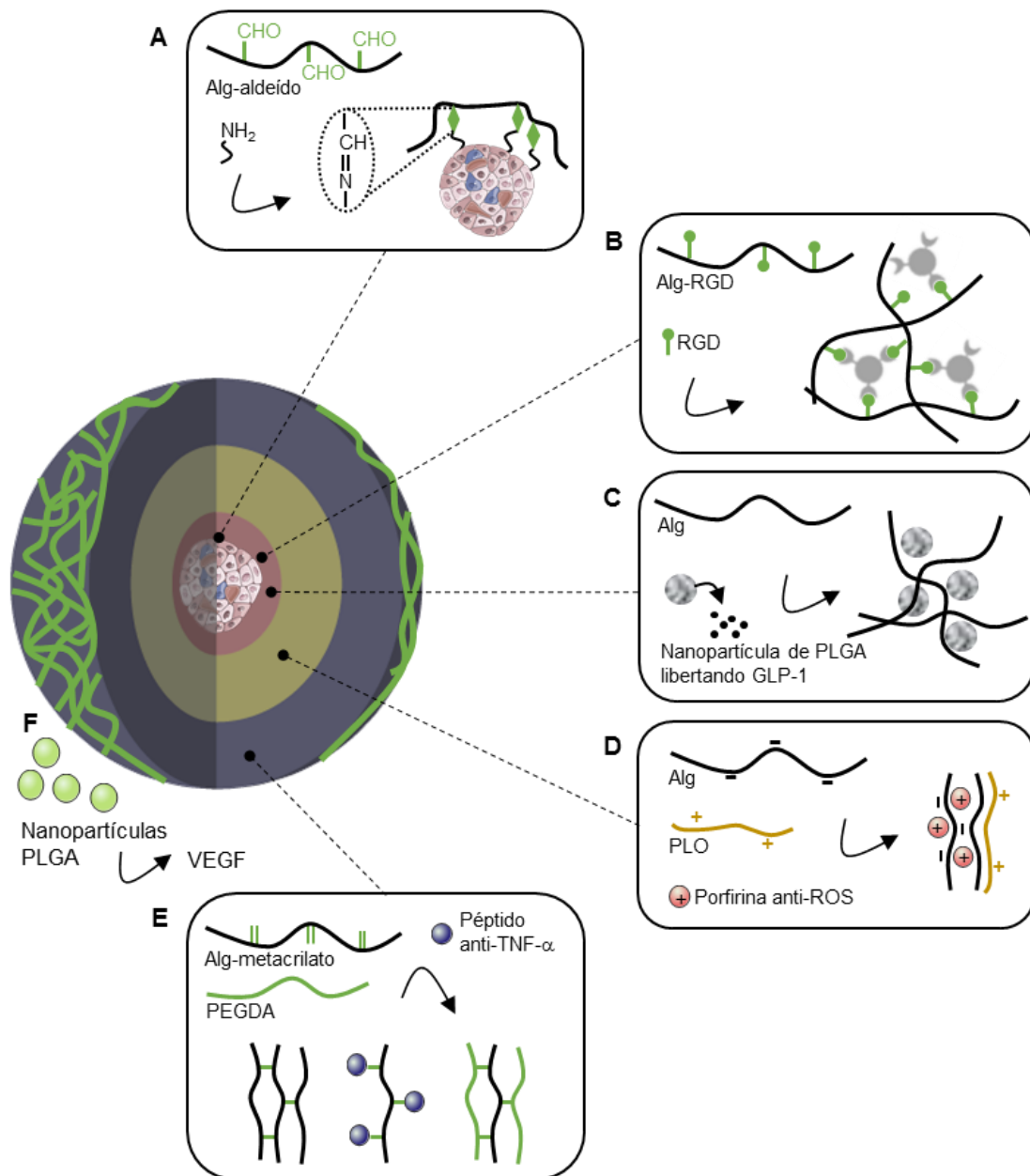


Figura 1: Representação esquemática do modelo 3D de hidrogéis de alginato que pretendemos criar com a junção de diferentes estratégias, importantes para: (A) permitir a diminuição do tamanho do hidrogel pela reacção à superfície dos ilhéus ou células beta a encapsular; (B) promover a interacção célula-matriz extracelular; (C) melhorar a capacidade secretora de insulina pela libertação de um agente insulínico; (D) melhorar a imunoprotecção pela deposição do poli-electrólito PLO e especificamente a protecção contra ROS pela interacção electrostática de uma porfirina anti-ROS; (E) permitir a protecção contra citocinas pró-inflamatórias pela ligação covalente de um péptido anti-TNF- α e ainda melhorar a estabilidade e biocompatibilidade pela reacção covalente entre as cadeias de alginato e estas com o PEGDA; (F) promover a angiogénese pelo implante conjunto de nanopartículas com VEGF. Com este modelo, julgamos estar próximos do modelo ideal para o encapsulamento de células produtoras de insulina e seu transplante, garantindo a função do implante ao longo do tempo.

Alg - alginato; RGD - arginina-glicina-aspartato; PLGA - ácido poli(láctico-co-glicólico); GLP-1 - *glucagon-like peptide-1*; PLO - poli-L-ornitina; ROS - espécies reactivas de oxigénio; TNF- α - factor de necrose tumoral alfa; PEGDA - polietilenoglicol diacrilato; VEGF - factor de crescimento endotelial vascular.

