

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

CAMILA LEAL LOPES DA SILVA

**Terapias alternativas para o diabetes mellitus tipo 1:
caracterização funcional do gene *Txnip* na diferenciação
 β -pancreática e desenvolvimento de biomaterial
inovador para microencapsulamento celular**

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
04/04/2018

CAMILA LEAL LOPES DA SILVA

**Terapias alternativas para o diabetes mellitus tipo 1:
caracterização funcional do gene *Txnip* na diferenciação β -
pancreática e desenvolvimento de biomaterial inovador
para microencapsulamento celular**

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

Orientadora: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S586t Silva, Camila Leal Lopes
Terapias alternativas para o diabetes mellitus tipo 1: caracterização funcional do gene Txnip na diferenciação β -pancreática e desenvolvimento de biomaterial inovador para microencapsulamento celular / Camila Leal Lopes Silva. - São Paulo, 2018.
201 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Sogayar, Mari Cleide

1. Diabetes mellitus. 2. Células-tronco. 3. Encapsulamento celular. 4. Txnip. 5. Laminina. I. T. II. Sogayar, Mari Cleide, orientador.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

"Terapias alternativas para o diabetes mellitus tipo 1: caracterização funcional do gene *Txnip* na diferenciação β -pancreática e desenvolvimento de biomaterial inovador para microencapsulamento celular"

CAMILA LEAL LOPES DA SILVA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências - Área: Bioquímica.

Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar
(Orientadora e Presidente)

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. Alexandre Bruni Cardoso
IQ - USP

Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara
ICB - USP

Prof. Dr. Vitor Antonio Fortuna
UFBA

SÃO PAULO
13 de junho de 2018

Dedicado aos meus amados pais, Nara e Carlos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, que felizmente cedeu aos meus pedidos e me acolheu como aluna de Doutorado, por todos os ensinamentos, pela paciência, pela liderança habilmente mesclada à liberdade conferida a mim para a realização dos projetos e pelo amadurecimento científico que me proporcionou. Agradeço à Mari principalmente pela dedicação incansável ao grupo Nucel.

À Profa. Dra. Tatiana Coelho-Sampaio, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por nos presentear com a polilaminina, por me receber no Rio de Janeiro para realizar o ensaio de imunofluorescência confocal das microcápsulas e por contribuir com a discussão dos resultados.

Ao Prof. Dr. Duc Dong, pela oportunidade de ser parte de seu grupo de pesquisa no Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute (Califórnia, EUA), por apoiar a execução do projeto em *zebrafish* e por compartilhar comigo todo o conhecimento necessário para utilizar o modelo. Também agradeço a todos que me auxiliaram com o projeto e que me acolheram em San Diego: Jhonatan, Michelle, Keith, Shaday, Joseph, Clyde, Olympia e Issac.

Ao Dr. Fernando Lojudice, por compartilhar comigo os frutos de seu Doutorado e todo o conhecimento técnico necessário para a execução do projeto de diferenciação de células-tronco, assim como pela amizade.

À Profa. Dra. Maria Lucia Cardillo Correa Giannella, da Faculdade de Medicina da USP, por contribuir com alíquotas preciosas e por nos apresentar com sua visão esclarecida do diabetes mellitus.

Ao Dr. Thiago Mares Guia, por contribuir com o projeto de encapsulamento de células, por auxiliar na transição entre equipamentos de encapsulamento e por estar sempre aberto a discutir os resultados obtidos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro e pela bolsa de Doutorado que me foi concedida.

À Gisella Grazioli, cientista exemplar que me inspirou a adotar o projeto de encapsulamento de células, pelas incontáveis horas de dedicação ao projeto e por ser parte da minha vida, você tem minha amizade incondicional.

À minha irmã científica, Dra. Patrícia Kossugue, por auxiliar com a execução do projeto de diferenciação de células-tronco, pelas tardes infinitas produzindo corpos embrióides, pelas baladas e pelas muitas risadas.

À Marluce Mantovani, pelo apoio técnico fundamental para a execução de todo o projeto e pelo apoio emocional que me ofereceu 24h por dia, sete dias por semana, desde o primeiro dia.

À equipe técnica do Nucel, Zizi de Mendonça, Alan Pereira e Débora Lopes, pelo trabalho essencial para o funcionamento do grupo e execução dos projetos.

Ao Sr. Leonardo Gimenes Sgubin, do Instituto de Física da USP, pela ajuda na execução do ensaio de microscopia eletrônica de varredura e pelas belíssimas imagens geradas.

Aos alunos de Iniciação Científica que orientei, Otávio Gomes, Marina Guimarães e Olympia Miranda, por contribuírem com seu precioso tempo para o andamento do projeto e para meu crescimento pessoal e científico.

Aos demais doutorandos do grupo Nucel, Gabriel Levin, Túlio Pereira e Raquel Machado, meus contemporâneos, por compartilharem a dor e a alegria de cada dia de trabalho, assim como incontáveis cafés na copinha.

A todos os muitos membros e ex-membros da equipe Nucel: Marina Trombetta, Carlos DeOcesano, Fernando Velloso, Adauto Spindola, Ana Claudia Carreira, Ana Paula Barreto, Bruna Aguiar, Camila Azzi, Francesco Innocenti, Julia Campopiano, Gabriela Manini, Henrique Cesar, Lauren Camargo, Luis Pomatay, Luiz Ribeiro, Marcos Demasi, Emilia Zenteno, Mariel Alcorte, Mariele Moraes, Miriam Lemos, Michely Reis, Renato Astorino, Ricardo Corrêa, Talita Carmo, Tatiane Fonseca, Tatiane Maldonado e Thais Ribas.

Aos amigos que sempre me acompanham, independentemente da distancia: Ana Paula Santos, Isabela Sodré, Laís Crepaldi, Maria Júlia Tasso, Viviane Cangerana, Mariana Costa, Bruno Rodrigues, Malson Neilson de Lucena e Elise Marques.

A toda minha grande família, que sempre esteve torcendo por mim, a todos os tios, tias, primos e primas, pelo carinho, apoio e alegrias.

Ao Pingo, por ser o cachorro mais chato e mais amável do mundo (sim, do mundo).

Ao meu irmão, Eduardo, por me ensinar quais carros não comprar, pelas risadas, pela companhia eventual na academia, por compartilhar comigo o privilégio de nossa família e por nunca deixar eu me sentir sozinha.

Ao meu noivo, Dr. André Teixeira, por ser meu oráculo científico, por saber tudo de tudo e contribuir imensamente para meu crescimento profissional, por compartilhar detalhes técnicos preciosos, por me apoiar em todos os momentos (bons ou ruins), por acreditar em mim, por me agregar à sua família maravilhosa e por ser meu companheiro e melhor amigo para toda a vida.

Finalmente, aos meus pais, Carlos e Nara, por ser quem vocês são. Por todo o apoio emocional e financeiro, por cuidarem de mim todos os dias, por tolerarem minhas frustrações, por me ensinarem a amar e a respeitar a todos. A união de vocês é a base do meu ser. Obrigada.

“Para o mundo, nós [...] haveríamos de passar por pessoas estranhas, talvez loucas e até mesmo perigosas. Éramos pessoas que havíamos despertado ou despertávamos, e nossa aspiração era chegar a uma vigília ainda mais perfeita, enquanto que a aspiração e a felicidade dos demais consistia em ligar cada vez mais estreitamente suas opiniões, seus ideais e seus deveres, sua vida e sua fortuna, aos do rebanho. Também aqui havia um impulso, havia força e grandeza. Mas enquanto nós [...] representávamos a vontade da Natureza em direção ao indivíduo e o futuro, os demais viviam numa vontade de permanência. Para eles a humanidade — que amavam tanto quanto nós — era algo completo que devia ser conservado e protegido. Para nós, a humanidade era um futuro distante para o qual todos caminhávamos, sem que ninguém conhecesse sua imagem e sem que se encontrassem escritas suas leis em parte alguma.”

Hermann Hesse – Demian

RESUMO

SILVA, C.L.L. Terapias alternativas para o diabetes mellitus tipo 1: caracterização funcional do gene *Txnip* na diferenciação β -pancreática e desenvolvimento de biomaterial inovador para microencapsulamento celular. 2018. 201p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O diabetes mellitus do tipo 1 (DM1) é uma doença causada pela destruição autoimune das células- β produtoras de insulina do pâncreas. O transplante de ilhotas pancreáticas é um procedimento tecnicamente simples sendo uma alternativa terapêutica interessante para o DM1. Entretanto, a oferta limitada de pâncreas de doadores falecidos e a necessidade de imunossupressão crônica são fatores que limitam a aplicabilidade dessa modalidade de transplante. Neste trabalho foram estudadas duas estratégias que visam oferecer soluções aos fatores limitantes do transplante de ilhotas pancreáticas.

Na primeira parte do trabalho, o mecanismo molecular que dirige o processo de diferenciação de células-tronco embrionárias murinas (*murine embryonic stem cells*, mESCs) em células produtoras de insulina (*insulin producing cells*, IPCs) foi analisado visando otimizar o processo de diferenciação. Nós selecionamos o gene *Thioredoxin interacting protein* (*Txnip*), diferencialmente expresso ao longo da diferenciação β -pancreática, para realizar um estudo funcional através da modificação genética de mESCs. Os resultados obtidos permitiram verificar que a inibição de *Txnip* na diferenciação β -pancreática pode induzir a diferenciação de IPCs com maior expressão de marcadores de células- β e mais responsivas ao estímulo de glicose. Além disso, o modelo de *zebrafish* permitiu elucidar *in vivo* o papel de *Txnip* durante a organogênese pancreática, revelando que a inibição desse gene é capaz de aumentar a massa de células- β através do estímulo de células presentes no ducto extra-pancreático. Dessa forma, a inibição de *Txnip* pode aprimorar os protocolos para obtenção de IPCs a partir de células-tronco pluripotentes.

A exposição crônica a agentes imunossupressores diabetogênicos e a perda de componentes de matriz extracelular durante o isolamento de ilhotas pancreáticas são causas para a perda de funcionalidade do enxerto. Dessa forma, na segunda parte do trabalho, um biomaterial inovador foi desenvolvido, contendo um polímero de laminina (polilaminina, PLn) para o encapsulamento e a imunoproteção de ilhotas pancreáticas. As cápsulas produzidas com o biomaterial desenvolvido, Bioprotect-PLn, são térmica- e mecanicamente estáveis, além de serem biocompatíveis e capazes de imunoprotéger ilhotas pancreáticas humanas *in vitro*. O encapsulamento com Bioprotect-PLn preserva a funcionalidade de ilhotas pancreáticas. Além disso, quando cápsulas vazias de Bioprotect-PLn foram implantadas em camundongos imunocompetentes, houve atenuação da resposta inflamatória ao implante, uma das principais causas para perda de funcionalidade de enxertos encapsulados. Os resultados obtidos indicam que a presença de polilaminina na malha capsular induz uma resposta anti-inflamatória que pode beneficiar a preservação do enxerto de ilhotas pancreáticas encapsuladas.

Atualmente, o transplante de ilhotas pancreáticas é visto como a terapia celular mais promissora para atingir a independência de insulina em pacientes de DM1, porém, a aplicabilidade desse transplante ainda é limitada. Este trabalho contribuiu para a elucidação dos mecanismos moleculares que podem aprimorar o processo de diferenciação de células-tronco pluripotentes em IPCs, estabelecendo uma fonte alternativa de células para a terapia

de reposição, e, também, estabeleceu um biomaterial inovador, capaz de diminuir a resposta inflamatória ao implante de microcápsulas e de imunoprotoger células microencapsuladas. Desta forma, este trabalho contribui para o estabelecimento da terapia de reposição celular para pacientes de DM1.

Palavras-chave: Diabetes mellitus tipo 1, células-beta, células-tronco, Txnip, encapsulamento de células, laminina.

ABSTRACT

SILVA, C.L.L. Alternative therapies for type 1 diabetes mellitus: functional characterization of *Txnip* gene during β -pancreatic differentiation and generation of an innovative biomaterial for cell microencapsulation. 2018. 201p. PhD Thesis. Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Type 1 diabetes mellitus (DM1) is a disease caused by the autoimmune destruction of insulin-producing pancreatic β -cells. Pancreatic islet transplantation is a technically simple procedure and an interesting alternative therapy for DM1, however, the limited supply of cadaveric donated pancreas and the need of life-long immunosuppression are factors which limit its applicability. In the present work, two strategies were employed aiming at establishing viable solutions for the factors limiting pancreatic islet transplantation.

In the first part of this study, the molecular mechanism which drives differentiation of murine embryonic stem cells (mESCs) into insulin producing cells (IPCs) was analyzed in order to optimize the differentiation process. The Thioredoxin interacting protein (*Txnip*) gene, which is differentially expressed along β -pancreatic differentiation, was selected to undergo a functional analysis by genetically modifying mESCs. The results allowed us to verify that *Txnip* inhibition during the β -pancreatic differentiation process can induce differentiation of IPCs displaying higher expression of β -cell markers and being more responsive to glucose stimuli. In addition, the zebrafish model allowed us to elucidate *in vivo* the role of *Txnip* during pancreatic organogenesis, revealing that its inhibition is able to increase the mass of β -cells through stimulation of extra-pancreatic ductal cells. Therefore, *Txnip* inhibition may turbinatate IPCs differentiation from pluripotent stem cells.

The chronic exposure to diabetogenic immunosuppressive agents and the loss of extracellular matrix components during isolation of pancreatic islets are probable causes for the loss of pancreatic islet graft functionality. Therefore, in the second part of this study, an innovative biomaterial was developed by incorporating a laminin polymer (polylaminin, PIn) for the encapsulation and immunoprotection of pancreatic islets. The capsules produced with the novel biomaterial, Bioprotect-PIn, are biocompatible, thermally and mechanically stable and are able to immunoprotect human pancreatic islets *in vitro*. Encapsulation with Bioprotect-PIn preserves the functionality of pancreatic islets. In addition, when empty Bioprotect-PIn capsules were implanted into immunocompetent mice, an attenuation of the inflammatory response to the implant occurred, this being one of the main causes of encapsulated graft loss. The results indicate that polylaminin addition to the capsular mesh induces an anti-inflammatory response which may favor preservation of the engrafted encapsulated pancreatic islets.

Pancreatic islet transplantation is currently seen as the most promising cell therapy to achieve insulin independence in DM1 patients, however, the applicability of this transplant is still limited. This work contributed to the elucidation of the molecular mechanisms which can turbinatate the differentiation of pluripotent stem cells into IPCs, establishing an alternative source of cells for the replacement therapy, and, also, established an innovative biomaterial which is able to decrease the inflammatory response to the graft, thereby immunoprotecting the microencapsulated cells. Therefore, this work contributes to the establishment of the cell replacement therapy for DM1 patients.

Keywords: Diabetes mellitus, beta-cells, Stem cells, *Txnip*, Cell encapsulation, laminin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Células apresentadoras de antígeno (do inglês, <i>antigen-presenting cells</i>)
ASCs	Células-tronco adultas (do inglês, <i>adult stem cells</i>)
CBA	Do inglês, cytometric bead array
CEs	Corpos embrióides
CMV	Citomegalovírus
CRISPR	Conjunto de repetições palindrômicas regularmente espaçadas associado à enzima cas9 (do inglês, <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated to the cas9 enzyme</i>)
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMEM	Do inglês, <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ESCs	Células-tronco embrionárias (do inglês, <i>Embryonic stem cells</i>)
FACS	Do inglês, <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FBR	Do inglês, foreign body reaction
FCH	Hiperlipidemia combinada familiar
gRNA	RNA guia
HbA1c	Hemoglobina glicada
hESCs	Células-tronco embrionárias humanas (do inglês, <i>human Embryonic Stem Cells</i>)
HLA	Antígeno leucocitário humano (do inglês, <i>Human leukocyte antigen</i>)
Hpf	Horas após a fertilização (do inglês, <i>hours post fertilization</i>)
IAPP	<i>Polipeptídeo amiloide de ilhotas</i> (do inglês, <i>islet amyloid polypeptide</i>)
IEQ	Índice de equivalentes de ilhotas
IPCs	Células produtoras de insulina (do inglês, <i>insulin producing cells</i>)
iPSCs	Células-tronco de pluripotência induzida (do inglês, <i>induced pluripotent stem cells</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo
MEC	Matriz extracelular
mESCs	Células-tronco embrionárias murinas (do inglês, <i>murine Embryonic Stem Cells</i>)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIN-6	<i>Mouse insulinoma 6</i>
miRNA	microRNAs
MO	Morfolino
MOI	Multiplicidade de infecção (do inglês, <i>multiplicity of infection</i>)
MSCs	Células-tronco mesenquimais (do inglês, <i>mesenchymal stem cells</i>)
PBS	Salina tamponada com fosfato (do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>)
PBSA	Salina tamponada com fosfato sem Ca ²⁺ e sem Mg ²⁺
PCR	Reação de polimerase em cadeia (do inglês, <i>Polimerase chain reaction</i>)
Pln	Polilamina
PM	Peso molecular
PSCs	Células-tronco pluripotentes (do inglês, <i>pluripotent stem cells</i>)

qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real (do inglês, quantitative real time PCR)
RCF	Força centrífuga relativa (do inglês, relative centrifugal force)
RNA	ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>reactive oxygen species</i>)
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	PCR transcrição reversa (do inglês, reverse transcription PCR)
SCs	Células-tronco (do inglês, <i>stem cells</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, sodium dodecyl sulphate)
SFB	Soro fetal bovino
shRNA	Do inglês, <i>short hairpin RNA</i>
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês, <i>single nucleotide polymorphisms</i>)
TBS	Salina tamponada com Tris (do inglês, Tris-buffered saline)
Tg	Transgênico
UFC	Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1. Terapias alternativas para o diabetes mellitus tipo 1	16
2. Capítulo 1: Caracterização funcional do gene <i>Txnip</i> na diferenciação β-pancreática	24
2.1. Introdução	25
2.1.1. Embriologia e organogênese pancreática em murinos	27
2.1.2. Células-tronco como fonte de células produtoras de insulina	30
2.1.3. Protocolos para diferenciação β -pancreática	36
2.1.4. <i>Thioredoxin interacting protein</i> (TXNIP)	39
2.1.5. Estudo da organogênese pancreática utilizando o modelo <i>zebrafish</i>	49
2.2. Objetivos	52
2.2.1. Objetivo geral	52
2.2.2. Objetivos específicos	52
2.3. Materiais e Métodos	53
2.3.1. Estudo funcional do gene Thioredoxin-interacting protein (<i>Txnip</i>)	53
2.3.2. Cultivo de células	53
2.3.2.1. Fibroblastos embrionários de camundongo inativados	53
2.3.2.2. Células-tronco embrionárias murinas (mESCs)	54
2.3.2.3. Diferenciação de mESC em células produtoras de insulina (IPCs)	54
2.3.2.4. Células de insulinoma de camundongo	55
2.3.3. Análise de expressão gênica	55
2.3.3.1. Extração de RNA total	55
2.3.3.2. Síntese de cDNA	56
2.3.3.3. <i>Primers</i> utilizados e determinação de eficiência	57
2.3.3.4. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	57
2.3.4. Análise da secreção de insulina ou de peptídeo-C	58
2.3.5. Modulação da expressão do gene <i>Txnip</i>	59
2.3.5.1. Inibição da expressão do gene <i>Txnip</i>	59
2.3.5.2. Superexpressão do gene <i>Txnip</i>	60
2.3.5.3. Produção de partículas lentivirais	60
2.3.5.4. Transdução lentiviral	61
2.3.6. Curva de crescimento	62
2.3.7. Ensaio de apoptose	62
2.3.8. Índice de produção de insulina	63
2.3.9. Análise de expressão proteica	63
2.3.10. Avaliação do desenvolvimento pancreático de <i>zebrafish</i>	64
2.3.10.1. Obtenção de morfantes para o gene <i>Txnip</i>	65
2.3.10.2. Imunofluorescência confocal	65
2.3.10.3. Marcação celular com EdU	66
2.3.10.4. Análise de expressão gênica	66
2.3.10.5. Obtenção de mutantes para o gene <i>Txnip</i>	67
2.3.11. Análise estatística	68
2.4. Resultados	69
2.4.1. Seleção do gene <i>Txnip</i> para análise funcional	69
2.4.2. Estudo funcional do gene <i>Txnip</i> em células β -pancreáticas murinas	71
2.4.3. Diferenciação de mESC deficientes na expressão de <i>Txnip</i>	77
2.4.4. Diferenciação de mESC superexpressando <i>Txnip</i>	81
2.4.5. Influência de <i>Txnip</i> no desenvolvimento pancreático de <i>zebrafish</i>	85
2.4.5.1. Inibição de <i>Txnip</i> em <i>zebrafish</i> utilizando morfólino	85
2.4.5.2. Inibição de <i>Txnip</i> influencia o desenvolvimento do pâncreas endócrino	88
2.4.5.3. Células endócrinas pancreáticas induzidas pela inibição de <i>Txnip</i>	91

2.4.5.4. Células progenitoras estimuladas pela inibição de <i>Txnip</i>	92
2.4.5.5. Efeito da inibição de <i>Txnip</i> em modelo de diabetes em <i>zebrafish</i>	96
2.4.6. Obtenção de mutantes para <i>Txnip</i>	97
2.5. Discussão	102
2.6. Conclusões	116
3. Capítulo 2: Desenvolvimento de biomaterial inovador para microencapsulamento celular	117
3.1. Introdução	118
3.1.1. Microencapsulamento de células	119
3.1.2. Alginato de sódio	121
3.1.3. Eficiência do transplante de ilhotas pancreáticas encapsuladas	124
3.1.4. Matriz extracelular (MEC)	126
3.1.5. Laminina	127
3.1.6. Polilaminina	130
3.2. Objetivos	133
3.2.1. Objetivo geral	133
3.2.2. Objetivos específicos	133
3.3. Materiais e Métodos	134
3.3.1. Produção de microcápsulas	134
3.3.2. Imunofluorescência indireta	135
3.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	136
3.3.4. Testes de estabilidade das microcápsulas	136
3.3.5. Cultivo celular	137
3.3.5.1. Isolamento e cultivo de ilhotas pancreáticas de rato	137
3.3.5.2. Isolamento e cultivo de ilhotas pancreáticas humanas	139
3.3.5.3. Linhagem RAW264.7 de macrófagos murinos	140
3.3.6. Análise da secreção de insulina	140
3.3.7. Análise do perfil de expressão gênica	141
3.3.7.1. Extração de RNA total	141
3.3.7.2. Síntese de cDNA	142
3.3.7.3. <i>Primers</i> utilizados e determinação de sua eficiência	142
3.3.7.4. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	143
143143	
3.3.8. Análise de expressão proteica	143
3.3.9. Ensaio de biocompatibilidade das microcápsulas <i>in vitro</i>	145
3.3.10. Avaliação do potencial imunoprotetor <i>in vitro</i> das microcápsulas	146
3.3.11. Avaliação da biocompatibilidade das microcápsulas <i>in vivo</i>	146
3.3.12. Análise estatística	148
3.4. Resultados	149
3.4.1. Produção de microcápsulas	149
3.4.2. Avaliação da estabilidade mecânica e térmica das microcápsulas	151
3.4.3. Encapsulamento de ilhotas pancreáticas	153
3.4.4. Funcionalidade <i>in vitro</i> de ilhotas pancreáticas microencapsuladas	153
3.4.5. Avaliação da biocompatibilidade <i>in vitro</i> das microcápsulas	156
3.4.6. Avaliação do potencial imunoprotetor das microcápsulas <i>in vitro</i>	157
3.4.7. Avaliação da biocompatibilidade das microcápsulas <i>in vivo</i>	158
3.5. Discussão	165
3.6. Conclusões	181
4. Conclusões gerais	182
5. Referências bibliográficas	185
Anexo – Súmula curricular	199

1. Terapias alternativas para o diabetes mellitus tipo 1

A glicose é a principal fonte de energia metabólica utilizada pelos tecidos, sendo a única fonte energética para algumas células, como os neurônios e os eritrócitos. A manutenção da glicemia é de importância fundamental para o bom funcionamento do metabolismo dos indivíduos, sendo regulada por mecanismo hormonal orquestrado, principalmente, pelo pâncreas. O pâncreas é um órgão composto por dois tipos diferentes de tecidos: o exócrino, que secreta enzimas digestivas para o intestino, e o endócrino, que secreta hormônios para a corrente sanguínea. As células endócrinas estão agrupadas nas ilhotas de Langerhans, compostas por cinco tipos de células que secretam diferentes hormônios: α (glucagon), β (insulina, peptídeo C, amilina), δ (somatostatina), PP (polipeptídeo pancreático) e ϵ (grelina) (Figura 1).

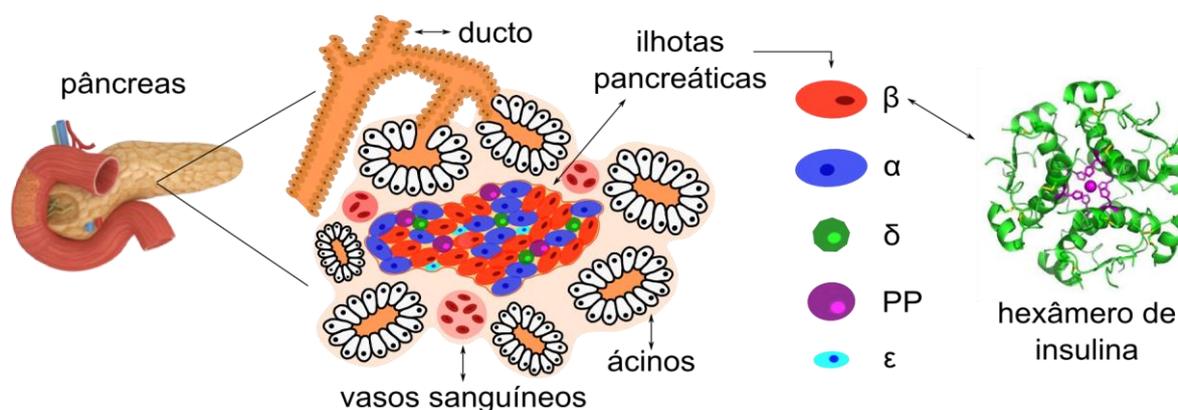


Figura 1: Representação esquemática dos principais componentes do pâncreas: vasos sanguíneos, ductos, ácinos e ilhotas pancreáticas, as quais são compostas por células ϵ , PP, δ , α e β . São as células β -pancreáticas as responsáveis pela síntese de insulina. No citoplasma das células- β , moléculas de insulina são coordenadas por íons zinco (representado em roxo), formando hexâmeros.

As células β -pancreáticas produzem e secretam insulina de forma a manter a concentração de glicose circulante dentro de um intervalo fisiológico estreito. A glicose é o principal secretagogo de insulina fisiológica, embora vários outros nutrientes, hormônios, neurotransmissores e medicamentos possam induzir a liberação do hormônio. Normalmente, a glicose é rapidamente equilibrada através da membrana plasmática das

células- β por transportadores específicos, Glut2 em particular, sendo fosforilada por ação da glucoquinase, a qual determina o fluxo metabólico através da glicólise. Moléculas reduzidas são então produzidas nas mitocôndrias durante o ciclo do ácido tricarboxílico e transferidas para a cadeia transportadora de elétrons. A energia liberada é utilizada para bombear prótons para fora da membrana mitocondrial interna, criando um gradiente eletroquímico transmembrana, o qual é utilizado para gerar adenosina trifosfato (ATP) a partir de adenosina difosfato (ADP) e fosfato. Esses eventos resultam em um aumento na razão ATP/ADP no citoplasma, o que determina o fechamento dos canais de K^+ dependentes de ATP. Assim, ocorre despolarização da membrana plasmática, influxo de Ca^{2+} extracelular e ativação da exocitose de insulina a partir de grânulos de insulina armazenados no citoplasma das células- β . A secreção de insulina estimula a captação da glicose pelas células do corpo, diminuindo, assim, a concentração de glicose no sangue. Quando o nível de glicose no sangue diminui, as células- α secretam glucagon, que estimula a hidrólise do glicogênio do fígado em glicose, aumentando, assim, a concentração de glicose no sangue entre as refeições.

O diabetes mellitus (DM) pertence à uma classe de desordens metabólicas nas quais a atividade reguladora da insulina está comprometida, por deficiência em sua síntese e/ou secreção, em sua ação ou em ambas. A Federação Internacional de Diabetes, estima que existam 425 milhões de adultos no Mundo sofrendo de DM (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). O Brasil possui a quarta maior incidência mundial de DM (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017) e a Pesquisa Nacional de Saúde estima que, em 2013, 6,2% da população brasileira acima dos 18 anos de idade era diabética (“PNS - Pesquisa Nacional de Saúde”, 2013). O DM causou aproximadamente quatro milhões de mortes em indivíduos adultos em 2017 e o total de gastos médicos com DM, apenas em

adultos, alcançou a marca de US\$ 727 bilhões (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). Estima-se que em 2045 existirão 629 milhões de pessoas vivendo com essa doença, com um aumento de 7% nos custos em saúde (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). Enfrentar esta epidemia global é uma tarefa monumental, que exige mais conhecimentos sobre a doença, além do desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

Os sintomas clínicos do DM foram descritos na Antiguidade no Papiro Ebers, um dos tratados médicos mais antigos e importantes que se conhece, datado de 1500 a.C (PAUL GHALIOUNGUI, 1987). A doença foi chamada de diabetes, com origem na palavra grega para sifão, em referência à poliúria e a polidipsia características dos pacientes. A observação de que a urina de diabéticos possui sabor adocicado foi feita na China e na Índia, entre os séculos V e VII, porém, a descrição patológica da glicosúria no diabetes começou com Paracelsus (1493–1541) e foi Willis (1621–1675) quem adicionou o termo “mellitus”, palavra em Latim para mel, ao nome da doença (KARAMANOU et al., 2016). Os dois principais tipos de DM são: a) diabetes mellitus tipo 1 (DM1), que é uma desordem caracterizada pela destruição de células β -pancreáticas devido a um processo autoimune, resultando em deficiência absoluta de insulina e sendo o tipo de diabetes mais prevalente entre crianças e adolescentes; b) diabetes mellitus tipo 2 (DM2), que é caracterizado por maior incidência em indivíduos adultos, os quais apresentam resistência à insulina e relativa deficiência na secreção deste hormônio.

O DM1 é uma doença multifatorial, causada pela destruição de células- β produtoras de insulina do pâncreas, sendo mediada, principalmente, pela ação de linfócitos T, em indivíduos geneticamente susceptíveis e pela presença de diversos fatores ambientais (ZOKA et al., 2013). Em 1921, o nome insulina, referência à palavra em Latim para ilha, passou a se

referir ao hormônio descoberto por Banting e Best (BANTING; BEST, 1922). Esses pesquisadores trataram com sucesso o primeiro paciente diabético utilizando insulina obtida a partir de extratos de pâncreas de bezerras (BANTING et al., 1922). Antes do tratamento com insulina, a única forma de tratamento disponível para o DM era o jejum, causando desnutrição severa e a morte (BANTING et al., 1922). Atualmente, quando apropriadamente modulada, a terapia com insulina exógena reduz significativamente os riscos de desenvolvimento das complicações crônicas secundárias ao DM1, especialmente as micro- e macro-angiopatias, que, invariavelmente causam retinopatia, neuropatia, doenças cardiovasculares e falência renal.

Entretanto, enquanto a terapia de reposição de insulina pode salvar vidas de pacientes diabéticos e retardar as complicações secundárias crônicas da doença, essa terapia ainda está associada a diversas dificuldades, baseadas no princípio fundamental de que a administração de insulina exógena nunca poderá mimetizar, com precisão, a cinética de secreção de insulina oferecida por células- β em resposta aos estímulos fisiológicos. Além disso, em uma coorte menor de pacientes de DM1, o controle da glicemia é difícil, lábil, mesmo com a manutenção de regimes intensivos de administração de insulina, seja por administração intravenosa convencional ou com o uso de bombas de insulina. Dessa forma, em geral, o controle da glicemia utilizando insulina exógena será imperfeito mesmo utilizando as melhores condições de monitoramento da glicemia e de administração da insulina, problemática esta que motiva a busca por vias alternativas para substituir as ilhotas pancreáticas danificadas durante o desenvolvimento de DM1 por tecido viável e funcional.

O primeiro transplante de pâncreas realizado com sucesso ocorreu em 1966, tendo sido um transplante duplo rim-pancreas, no qual o paciente apresentou normoglicemia por aproximadamente dois meses (KELLY et al., 1967). Atualmente, o transplante de pâncreas

está associado à uma melhora na qualidade de vida e até mesmo à reversão de algumas complicações tardias associadas ao DM1 (FIORETTO et al., 1998). Porém, apesar das constantes otimizações, os benefícios que o transplante de pâncreas órgão total proporciona são acompanhados dos malefícios de um regime imunossupressor e de uma intervenção cirúrgica de grande porte, sendo indicada a poucos pacientes, usualmente apenas àqueles que necessitam de transplante renal e dependem de um bom funcionamento do pâncreas para o sucesso dos tratamentos.

Por tratar-se de um procedimento tecnicamente mais simples, que apresenta baixa morbidade pela simplicidade cirúrgica, com infusão de pequena massa de enxerto e pela eliminação de possíveis complicações associadas à presença das enzimas exócrinas, presentes no transplante de pâncreas órgão total, o transplante de ilhotas pancreáticas é uma alternativa interessante ao transplante de pâncreas órgão total. A primeira tentativa de isolar e transplantar ilhotas pancreáticas foi descrita em 1972 em ratos com diabetes quimicamente induzida (BALLINGER; LACY, 1972). Após cinco anos, o primeiro transplante de ilhotas pancreáticas em humanos foi realizado (NAJARIAN et al., 1977). Desde então, muitos esforços e um progresso significativo resultaram na publicação do Protocolo de Edmonton, em 2000, o qual possibilitou atingir independência de insulina em sete pacientes de DM1 que receberam ilhotas de múltiplos doadores e foram tratados com protocolo imunossupressor livre de esteroides (SHAPIRO et al., 2000). Nas últimas três décadas, as técnicas de isolamento e de transplante de ilhotas pancreáticas deixaram de ser procedimentos experimentais e se tornaram procedimentos clínicos de rotina, com eficácia satisfatória em pacientes de DM1. O tratamento é oferecido apenas para pacientes selecionados com DM1 instável, episódios hipoglicêmicos graves e labilidade glicêmica que não podem ser estabilizados através da terapia com insulina, bombas de insulina ou terapias

contínuas de monitoramento de glicose. O critério de inclusão compreende quadro de DM1 por mais de cinco anos e idade acima de 18 anos, para evitar o risco de imunossupressão em pacientes pediátricos. O transplante de ilhotas pancreáticas já é aprovado e reembolsável por companhia de seguro ou coberto por Sistemas Nacionais de Saúde em diversos países, incluindo Canadá, Austrália, Reino Unido, Suíça, Itália, França e outros países da Europa. Mais de 1.500 procedimentos já foram realizados ao redor do Mundo, incluindo 864 transplantes alogênicos e 480 transplantes autólogos (COLLABORATIVE ISLET TRANSPLANT REGISTRY (CITR), 2016).

O processo de isolamento e de purificação de ilhotas pancreáticas a partir de pâncreas humanos envolve múltiplas etapas que duram de 5-7 horas para extrair a pequena fração de ilhotas pancreáticas, a qual representa apenas de 1-2% da massa pancreática total. A digestão enzimática e mecânica, a purificação e a cultura são a abordagem estabelecida para a preparação de um produto final de ilhotas enriquecidas em $<5 \text{ cm}^3$ de tecido, massa que é considerada segura para infusão pela veia porta, tornando o transplante de ilhotas um dos procedimentos de transplante mais seguros e simples (VENTURINI et al., 2005). Recomenda-se o transplante de mais de 5.000 equivalentes de ilhotas (IEQ) por kg do peso corporal do receptor, no entanto, frequentemente, não é possível obter massa de ilhotas suficiente a partir de um único pâncreas doado, os quais apresentam grande escassez e alta demanda, limitando a aplicabilidade da terapia de reposição (SHAPIRO; POKRYWCZYNSKA; RICORDI, 2017).

A independência de insulina após o transplante de ilhotas pancreáticas é atingida em até 80% dos pacientes com quadro favorável, o que inclui ausência de autoanticorpos contra ilhotas pancreáticas, massa de ilhotas pancreáticas infundidas $>5.000 \text{ IEQ/kg}$, curto período de armazenamento do órgão processado no isolamento de ilhotas, indução e manutenção

de terapia imunossupressora adequada (COLLABORATIVE ISLET TRANSPLANT REGISTRY (CITR), 2016). Aproximadamente 50% dos pacientes permanecem independentes de insulina nos primeiros cinco anos após receberem o transplante, quando o regime imunossupressor é adequado (GRUESSNER, 2011). Dos pacientes que foram monitorados por até 10 anos após o transplante de ilhotas pancreáticas, 73% demonstraram níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) corrigidos e produção de peptídeo-C, além de proteção contra episódios hipoglicêmicos severos. Porém, a independência de insulina não foi durável em longo prazo e a maioria dos pacientes retomou o uso de pequenas quantidades de insulina. As razões para a perda de funcionalidade do enxerto são associadas à rejeição imune e à recorrência de autoimunidade ou à exposição crônica a agentes imunossupressores diabetogênicos (PEPPER et al., 2013).

Em 2015, um estudo de fase III, realizado em diversos centros especializados, confirmou que o transplante de ilhotas pancreáticas é um tratamento seguro e eficaz para pacientes com DM1 complicado por quadros severos de hipoglicemia (HERING et al., 2016). Entretanto, a oferta limitada de pâncreas de doadores falecidos e a necessidade de imunossupressão crônica dos receptores são fatores que limitam a aplicabilidade do transplante de ilhotas pancreáticas em pacientes de DM1. Alternativas que dispensem o uso de imunossupressores em associação ao transplante de ilhotas pancreáticas, como o revestimento das células com materiais biocompatíveis e imunoprotetores, eliminam o risco de imunossupressão crônica e permitem que o transplante alogênico também seja indicado para pacientes jovens (menos de 18 anos de idade) e àqueles com DM1 mais estável. Se o transplante de ilhotas pancreáticas visa evitar as complicações crônicas do DM, a habilidade de oferecer essa terapia durante os primeiros estágios da doença irá maximizar seu potencial terapêutico. Quando a questão da tolerância imune for contornada e a terapia de

reposição for estendida a um número maior de pacientes, haverá um aumento dramático na demanda por células produtoras de insulina (*insulin producing cells*, IPCs). Dessa forma, será fundamental identificar fontes ilimitadas e financeiramente viáveis de IPCs, como as IPCs derivadas de células-tronco.

Neste trabalho foram estudadas duas estratégias terapêuticas, que visam oferecer soluções aos fatores limitantes do transplante de ilhotas pancreáticas: a baixa disponibilidade de células para a terapia de reposição e a necessidade de imunossupressão. Na primeira parte do trabalho, o mecanismo molecular que dirige o processo de diferenciação de células-tronco embrionárias murinas (*murine embryonic stem cells*, mESCs) em IPCs foi analisado visando otimizar o processo de diferenciação. Nós selecionamos o gene *Thioredoxin interacting protein (Txnip)*, que é diferencialmente expresso ao longo da diferenciação β -pancreática, e realizamos uma análise funcional deste gene em linhagens celulares de células- β pancreáticas e de mESCs, que foram diferenciadas em IPCs. Além disso, os resultados observados *in vitro* foram validados *in vivo* no modelo de *zebrafish*. Na segunda parte deste trabalho, um biomaterial inovador foi desenvolvido contendo um polímero de laminina (polilaminina, PLn). A produção de microcápsulas biocompatíveis e estáveis com um componente de membrana extracelular visa preservar a funcionalidade das células microencapsuladas e estabelecer um ambiente imunoprotegido para o encapsulamento de ilhotas pancreáticas e células produtoras de insulina, eliminando a necessidade de imunossupressão associada ao transplante de IPCs.

2. Capítulo 1:

Caracterização funcional do gene *Txnip* na diferenciação β -pancreática

2.1. Introdução

Terapias envolvendo a substituição de células- β defeituosas constituem proposta alternativa para o tratamento de Diabetes Mellitus. Para o diabetes mellitus tipo 1 (DM1), esse conceito é amparado nos benefícios obtidos com o transplante de ilhotas pancreáticas. Atualmente, o transplante de ilhotas pancreáticas de baseia no isolamento e na purificação de ilhotas a partir de pâncreas de doadores falecidos, os quais estão sempre em grande escassez e demanda. Sendo assim, é essencial o desenvolvimento de abordagens que aumentem o suprimento de célula produtoras de insulina (*insulin producing cells*, IPCs) para a terapia de reposição de células- β . Uma terapia alternativa interessante para o DM1 é o transplante de células produtoras de insulina diferenciadas a partir de células-tronco.

As células-tronco (*Stem Cells*, SCs) são caracterizadas por duas propriedades principais: são células não especializadas, as quais se renovam, através de divisão celular, por longos períodos de tempo, sem se diferenciarem em outros tipos celulares, porém apresentam o potencial de se desenvolverem em diferentes tipos celulares especializados, em certas condições fisiológicas ou experimentais, através do processo de diferenciação celular. Esse processo pode ser induzido por sinais internos, como a restrição ou a expressão de genes chave, ou externos, como as moléculas indutoras da diferenciação celular, o contato físico e o microambiente molecular.

As SCs podem ser classificadas de acordo com o grau de plasticidade, que é a habilidade de se diferenciarem na totalidade ou apenas em uma parte das diferentes linhagens celulares. O zigoto, resultante da fusão dos gametas feminino e masculino, é uma célula totipotente, podendo originar células de todos os tecidos do organismo, inclusive a placenta e os anexos embrionários. Após quatro dias de divisões mitóticas, o zigoto gera o blastocisto. As células-tronco embrionárias (*Embryonic Stem Cells*, ESCs) derivadas da massa

celular interna do blastocisto, são pluripotentes e podem gerar células dos três folhetos embrionários (endoderme, ectoderme e mesoderme), porém, não geram tecidos extra-embrionários. As ESCs murinas (mESCs) foram isoladas em 1981 (EVANS; KAUFMAN, 1981), sendo que, seu estudo permitiu a obtenção de ESCs humanas (hESCs) em 1998 a partir de embriões humanos (THOMSON et al., 1998). O transplante de hESCs em camundongos imunodeficientes revela outra característica de células pluripotentes, ou seja, a capacidade de gerar teratomas, que são tumores compostos por tecidos de todas as linhagens celulares. Em 2006, através da indução da expressão de um conjunto de fatores de transcrição, incluindo *Oct4* (*octamer-binding transcription factor 4*), *Sox2* (*sex determining region Y-box 2*), *c-Myc*, e *Klf4* (*kruppel-like factor 4*), foi possível reprogramar células adultas murinas especializadas em células-tronco pluripotentes, as chamadas células-tronco de pluripotência induzida (*induced pluripotent stem cells*, iPSCs) (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). O mesmo objetivo foi alcançado com células humanas em 2007 (TAKAHASHI et al., 2007), gerando células com potencial de diferenciação em células dos três folhetos embrionários. Em contraste, as células-tronco adultas (*adult stem cells*, ASCs), já identificadas em vários órgãos e tecidos, são multipotentes, apresentando potencial de diferenciação restrito a apenas algumas linhagens. Devido a suas características, as SCs possuem grande potencial para o futuro terapêutico do DM1. O objetivo da terapia regenerativa, de modo geral, é estabelecer uma fonte renovável e segura de SCs as quais, quando diferenciadas nas células-alvo, possam constituir uma fonte inesgotável de células diferenciadas para o tratamento de diferentes doenças degenerativas.

Muitos esforços têm sido feitos para viabilizar a obtenção de células- β a partir da diferenciação de SC, com base nos conhecimentos acerca do processo natural de desenvolvimento das células- β . Os protocolos de diferenciação buscam otimizar as

condições de cultivo celular através da complementação do meio de cultivo das células progenitoras com as concentrações adequadas e pelo tempo necessário de constituintes que atuam nas vias de sinalização-chave (ativação ou inibição), de forma a conduzir à diferenciação gradual destas células mimetizando o desenvolvimento β -pancreático natural.

2.1.1. Embriologia e organogênese pancreática em murinos

O desenvolvimento pancreático em camundongos começa no dia embrionário 8.5, tendo sua origem em duas porções do intestino primitivo e sendo dirigida pela expressão de fatores de transcrição específicos (Figura 2). A partir da endoderme do intestino primitivo, ocorre a especificação dos brotos pancreáticos ventral e dorsal. Os brotos são diferenciados a partir de células progenitoras multipotentes presentes na endoderme, as quais expressam os fatores de transcrição *Pdx1* (*pancreatic and duodenal homeobox 1*), *Ptf1a* (*pancreas-specific transcription factor 1a*) e *Foxa1/2* (*Forkhead Box A1/2*) (BURLISON et al., 2008). Para que ocorra a especificação em célula progenitora pancreática, a expressão de *Pdx1* e de *Ptf1a* é acompanhada por outros fatores de transcrição, como *Sox9* (*sex determining region Y-box 9*) e *Hnf1 β* (*hepatocyte nuclear factor 1 β*) (GAO et al., 2008; HAUMAITRE et al., 2005; LYNN et al., 2007). A expansão dos brotos, processo que, em camundongos, é conhecido como primeira transição pancreática, depende de sinais oriundos de tecidos adjacentes, a mesoderme cardíaca secreta fatores, como o ácido retinóico, que alcançam, em baixa concentração, a região que dará origem ao pâncreas ventral, permitindo o desenvolvimento pancreático (BASTIDAS-PONCE et al., 2017). Por outro lado, a notocorda e a aorta dorsal secretam fatores, como *Fgf2* (*fibroblast growth factor 2*) e Activina, possibilitando o desenvolvimento do pâncreas dorsal (BASTIDAS-PONCE et al., 2017).

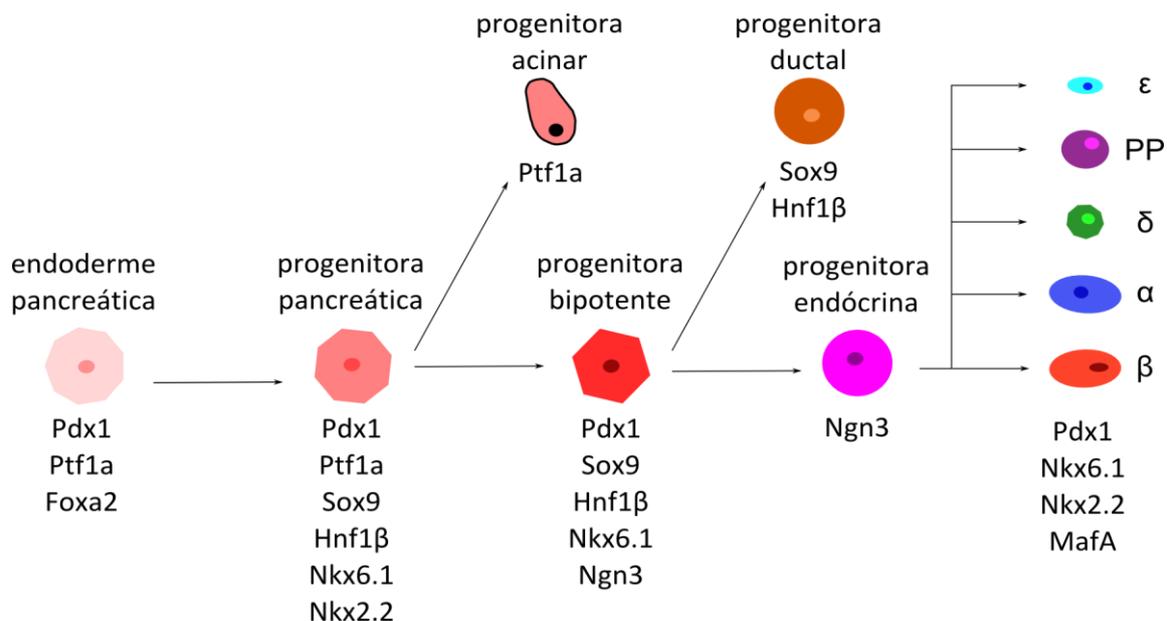


Figura 2: Representação esquemática dos fatores de transcrição envolvidos nas principais etapas de especificação das linhagens pancreáticas, que culminam na especificação das células- β .

Durante o desenvolvimento dos brotos ventral e dorsal, as células progenitoras multipotentes se proliferam e formam um epitélio multicamadas. O broto ventral “gira” em direção ao broto dorsal e se funde, enquanto o epitélio pancreático é progressivamente ramificado em domínios de ponta, contendo células que expressam *Ptf1a* e se comprometem com a linhagem acinar, e domínios de tronco, nos quais as células expressam *Sox9*, *Nkx6.1* (*NK6 homeobox 1*), *Hnf1b* e *Pdx1* (BASTIDAS-PONCE et al., 2017), representando células progenitoras bi-potentes endócrinas e ductais. O processo de ramificação é conhecido como segunda transição pancreática, sendo compartilhado entre murinos e humanos. Os dois domínios são delimitados por uma membrana basal, composta, principalmente, por Laminina-1, Colágeno V e Fibronectina, a qual separa o epitélio do mesênquima (HISAOKA; HARATAKE; HASHIMOTO, 1993). A ramificação em domínio de ponta ou de tronco, ou seja, a diferenciação endócrina/ductal em detrimento da exócrina, é mediada pela via de Notch, a qual inibe o fator de transcrição *Ngn3* (*neurogenin 3*). Enquanto células *Ngn3*-positivas estão destinadas à linhagem endócrina, células em que a

via de Notch inibe a expressão de *Ngn3*, podem se comprometer à linhagem exócrina, expressando fatores como o *Ptf1a* (WILSON; SCHEEL; GERMAN, 2003).

Na verdade, o regulador mestre da formação endócrina é *Ngn3*, uma vez que, quando expresso nas células progenitoras bi-potentes endócrinas e ductais, induz a expressão de diversos genes endócrinos específicos, como *NeuroD1* (Neuronal differentiation 1), *Pax4* (*Paired box gene 4*) e *Nkx2.2* (*Nirenberg and Kim homeobox factor 2.2*), desencadeando o comprometimento endócrino e a de-laminação do epitélio (MAGENHEIM et al., 2011). Os fatores de transcrição passam então a ser progressivamente restritos a tipos celulares endócrinos específicos, como, por exemplo, *Arx* (*Aristaless related homeobox*) e *Pax4*, sendo ambos alvos de *Ngn3* e expressos de forma balanceada nas progenitoras endócrinas, passando a exercer inibição recíproca, de modo que células que expressam altos níveis de *Arx* se tornam células- α e células que expressam altos níveis de *Pax4* se tornam células- β (COLLOMBAT et al., 2005; SOSA-PINEDA et al., 1997). Durante o desenvolvimento, a expressão de *Nkx6.1* e *Pdx1* se torna restrita às células- β e progressivamente mais alta, assim como a expressão de *Nkx2.2*, que, nas células progenitoras *Ngn3*-positivas, possui função dupla ao interagir com diferentes fatores de transcrição, reprimindo *NeuroD* para formar células- α ou induzindo *NeuroD* e inibindo *Arx* para formar células- β (BASTIDAS-PONCE et al., 2017). Para que ocorra a maturação das células- β , a expressão de *MafB* (*v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B*) é diminuída e esse fator de transcrição se torna progressivamente restrito às células- α , nas quais define a maturação e a identidade celular (ARTNER et al., 2007). Já nas células- β ocorre a troca entre a expressão de *MafB* por *MafA* (*v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A*), o que é crucial para a maturação celular (NISHIMURA et al., 2006). *MafA* está sob o controle de fatores de transcrição específicos de células- β , como *NeuroD*, *Nkx6.1*, *Nkx2.2* e *Foxa2*,

atuando com *Pdx1*, *Nkx6.1* e *NeuroD* para regular a transcrição do gene codificador da insulina (BASTIDAS-PONCE et al., 2017).

Após a de-laminação das células progenitoras endócrinas do tronco epitelial, essas células migram dentro do mesênquima e, finalmente, diversas células endócrinas se agregam para formar as ilhotas pancreáticas. As ilhotas formadas mantêm contato próximo com células endoteliais e neurônios, que podem influenciar a arquitetura e a função das ilhotas. Após o nascimento, as células- β sofrem maturação para atingir o seu fenótipo final capaz de responder à glicose, com aumento da produção e da secreção de insulina, sabendo-se que esse processo é regulado por fatores de transcrição como *MafA*, *Nkx2.2*, *Pdx1* e *Foxa2*, porém, ainda não se sabe como as células- β atingem o estado de completa maturação.

2.1.2. Células-tronco como fonte de células produtoras de insulina

Visando estabelecer fontes alternativas para aumentar a disponibilidade de células- β ou de IPCs para o tratamento de DM1, diferentes populações celulares são estudadas (Figura 3). Ainda existe muita controversa quanto à existência de ASCs no pâncreas. As ASCs são encontradas entre as células diferenciadas de um tecido, podendo se auto-renovar e também se diferenciar, porém, exclusivamente, em tipos celulares do tecido no qual residem. Diferentes populações de ASCs já foram identificadas a partir de diversos tecidos adultos, incluindo a medula óssea, tecido neural, pele, retina, tecido muscular, entre outros. O papel principal das ASCs num organismo é manter e reparar o tecido no qual são encontradas. Considera-se a conversão de um tipo celular em outras linhagens, passando por um estágio progenitor (desdiferenciação) ou não (transdiferenciação), o principal mecanismo de reparação pancreática. Dessa forma, o reparo pancreático é atribuído,

principalmente a: 1) progenitoras facultativas, células ductais e centro-acinares que se desdiferenciam para um estado similar àquele de células progenitoras, adquirindo características de multipotência em condições de não-homeostase; 2) transdiferenciação, por conversão direta de uma célula especializada em outro tipo celular também especializado, sem a passagem por um estado desdiferenciado similar à células progenitoras; 3) simples proliferação compensatória.

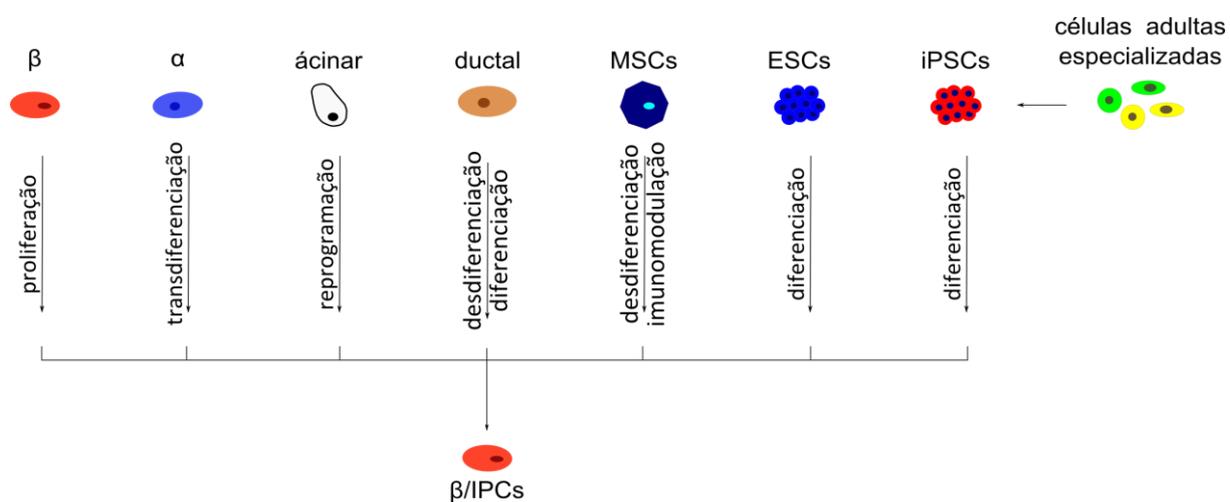


Figura 3: Fontes alternativas para a obtenção de células- β ou de IPCs para o tratamento de DM1.

Em condições de alta demanda metabólica, como a gravidez ou a obesidade, o pâncreas é capaz de se adaptar, aumentando a massa de células- β , principalmente por auto-replicação e hipertrofia celular (BONNER-WEIR, 2000; LINGOHR; BUETTNER; RHODES, 2002). Porém, o pâncreas possui uma taxa de renovação extremamente baixa em condições fisiológicas, especialmente o compartimento endócrino. A velocidade de replicação de células- β cai de 3% nas células- β fetais para menos de 0,5% aos seis meses de idade, chegando a níveis ainda mais baixos na idade adulta (KASSEM et al., 2000; PERL et al., 2010; TETA et al., 2005). Além disso, existe um balanço entre a funcionalidade de células- β maduras e a habilidade de expansão, pois células- β maduras adotam um estado menos funcional quando estimuladas com sinais proliferativos (PURI et al., 2018). Dessa forma, a

regeneração de células- β baseada na indução da replicação das células pré-existentes tem aplicabilidade limitada.

Células multipotentes com potencial de proliferação em agregados são descritas nas ilhotas pancreáticas, nos ductos pancreáticos e nas junções entre ácinos e as terminações ductais, as células centro-acinares (KOPP; GROMPE; SANDER, 2016). Células ductais adultas contribuem para a formação de células endócrinas *in vivo*, em condições normais e, principalmente, quando ocorre a necessidade de regeneração (XU et al., 2008a), pequenos agregados endócrinos se formam adjacentes aos ductos pancreáticos, especialmente após injúria, indicando a existência de células progenitoras facultativas nos ductos pancreáticos (BOUWENS; PIPELEERS, 1998; PESHAVARIA et al., 2006; WANG; KLÖPPEL; BOUWENS, 1995; XU et al., 2008a). Assume-se que essa seja uma via possível de regeneração pancreática, principalmente pela observação de que células endócrinas se originam a partir de estruturas ductais durante o desenvolvimento fetal (GU; BROWN; MELTON, 2003). Além disso, células ductais também podem ser reprogramadas *in vivo* pela indução da expressão do fator de transcrição *Pax4*, importante regulador da diferenciação de células- β (AL-HASANI et al., 2013).

Apesar de estudos *in vivo* fornecerem resultados contraditórios quanto à capacidade de células acinares de gerar células- β em resposta à injúria, as células acinares possuem plasticidade intrínseca, que as tornam capazes de assumir o fenótipo β -pancreático em resposta à introdução de apenas alguns genes. A indução da expressão de três fatores de transcrição β -pancreáticos, *Pdx1*, *Ngn3* e *MafA*, no pâncreas exócrino de camundongos, foi suficiente para converter ácinos em células- β (ZHOU et al., 2008). A plasticidade das células acinares é ainda mais pronunciada *in vitro*, adotando, espontaneamente, um fenótipo similar ao de células progenitoras e adquirindo a habilidade de se diferenciarem em células-

β (JIANG et al., 2007b). O tratamento com Egf (*epidermal growth factor*), Lif (*leukemia inhibitory factor*) ou a superexpressão de *Pdx1*, *MafA*, *Ngn3* e *Pax4* possibilitam a diferenciação de células acinares em células- β (DEMCOLLARI; CUJBA; SANCHO, 2017).

Uma fonte celular mais óbvia para a obtenção de células- β é a própria ilhota pancreática, pois suas células constituintes compartilham muitas etapas de desenvolvimento. Já foi demonstrado que, após injúria e ablação total das células- β , células- α podem se converter em células- β *in vivo* pela superexpressão induzida de *Pax4* (THOREL et al., 2010), mecanismo que pode ser mimetizado quimicamente através da inibição de *Arx*, um repressor de *Pax4*, com tratamento de ácido gama aminobutírico (GABA) ou Artemisinina (AL-HASANI et al., 2013; BEN-OTHTMAN et al., 2017). Também é possível converter outros tipos celulares endócrinos em células- β , como ocorre com as células- δ quando a injúria causa ablação das células- β (CHERA et al., 2014). As ilhotas pancreáticas adultas também contém uma população distinta de células que expressam Nestina, um marcador de células-tronco neuronais. As células Nestina-positivas foram isoladas de pâncreas adultos, murinos e humanos, preservam capacidade proliferativa e podem ser diferenciadas *in vitro* em células endócrinas (MARIA-ENGLER et al., 2004; ZULEWSKI, 2008).

A identificação de ASCs pancreáticas apresenta a vantagem de possibilitar um transplante autólogo, com a possibilidade de indução da expansão compensatória *in vivo*, porém, além de sua própria existência ser questionável, essas células possuem menor capacidade de proliferação e a baixa taxa de reparo pancreático *in vivo* indica que não sejam uma boa fonte de obtenção celular para a terapia de reposição. Por esses motivos, diversos grupos de pesquisa buscam utilizar outros tipos de ASCs mais abundantes e ubiquamente presentes no organismo, o que é o caso das células-tronco mesenquimais (*Mesenchymal Stem Cells*, MSCs), as quais são rotineiramente isoladas e expandidas a partir do estroma de

medula óssea, do tecido adiposo e do cordão umbilical (MOSNA; SENSEBÉ; KRAMPERA, 2010). As características que definem as MSCs são a capacidade de aderir ao plástico, de se diferenciar em gordura, cartilagem e osso, assim como a presença de alguns marcadores de superfície, como CD73, CD90 e CD105. Porém, as populações de MSCs já estabelecidas são heterogêneas, com diferentes taxas de proliferação e presença de marcadores celulares e epigenéticos diversos, sendo as variações observadas tanto entre populações celulares obtidas a partir de um mesmo tecido quanto em populações celulares de um mesmo doador (DOMÍNGUEZ-BENDALA; RICORDI, 2012). Partindo dessa perspectiva, ainda não foi estabelecido um método otimizado para a diferenciação de MSCs que resulte em células- β maduras e os esforços nesse sentido podem ser dispersos pela tentativa de utilizar diferentes fontes de MSCs, cada qual com diferentes tendências a se diferenciarem em células- β . Além disso, MSCs e células- β não compartilham a mesma origem embriológica, o que limita a aplicabilidade as MSCs (DOMÍNGUEZ-BENDALA; RICORDI, 2012). Dessa forma, apenas sucesso parcial é reportado na diferenciação de MSCs de diferentes fontes, incluindo MSCs obtidas a partir de tecido pancreático acinar e ductal, gordura, fluido amniótico, sangue de cordão umbilical e placenta, medula óssea, endométrio e até mesmo de ilhotas pancreáticas, em células produtoras de insulina (DOMÍNGUEZ-BENDALA; RICORDI, 2012). Atualmente, acredita-se que as MSCs encontrem maior aplicabilidade por fornecerem um microambiente imuno-modulatório e pró-angiogênico favorável para o sucesso do enxerto de outros tipos celulares (ABDI et al., 2008; WU et al., 2007). Isso ocorre devido à secreção, por estas células, de diversos agentes tróficos, como fator de crescimento nervoso, fator de crescimento de fibroblastos básico, fator de crescimento endotelial vascular, fator neurotrófico derivado de cérebro, fator de crescimento de insulina-1 e fator de crescimento de hepatócitos (XU et al., 2008b). Resultados favoráveis são observados no co-transplante

de ilhotas pancreáticas com MSCs (BALL et al., 2007; FANG et al., 2009; JOHANSSON et al., 2008; LEE et al., 2008; NOORT et al., 2002), o mesmo sendo esperado para as IPCs derivadas de SCs.

As ESCs e as iPSCs, chamadas de células-tronco pluripotentes (Pluripotent Stem Cells, PSCs), possuem características semelhantes, incluindo a morfologia, a expressão de genes de pluripotência, o perfil do ciclo celular, a capacidade de auto-renovação, a capacidade de induzir a formação de teratomas e de se diferenciar em qualquer tipo celular do organismo adulto, incluindo em células- β pancreáticas, através dos mesmos protocolos (ABDELALIM et al., 2014). Atualmente, busca-se viabilizar a aplicação clínica de iPSC através de tecnologias de reprogramação celular livres de transgenes, o uso de células mais acessíveis, como as células sanguíneas, e o desenvolvimento de protocolos de expansão e diferenciação adequados para a prática clínica e em larga escala.

Para fins de transplante, as ESCs permitem o transplante alogênico, o que pode causar a ativação do sistema imune, demandando o uso de imunossuppressores. Outros problemas relacionados ao uso de ESCs são as questões de cunho ético e o risco de câncer, que decorre da contaminação das células diferenciadas transplantadas com células indiferenciadas. O transplante autólogo de células- β obtidas a partir de iPSC diminui o risco de rejeição imune. Entretanto, as iPSC são obtidas através de manipulação gênica, incluindo a expressão de oncogenes, como *c-Myc*. De maneira geral, as iPSCs são consideradas a mais importante ferramenta para a Medicina Regenerativa do DM, porém, estudos adicionais *in vitro* e *in vivo* são necessários para determinar a segurança e a estabilidade dessas células. Atualmente, os quatro testes clínicos aprovados para o tratamento de DM utilizando PSCs são baseados em ESCs (MARTIN, 2017).

2.1.3. Protocolos para diferenciação β -pancreática

A obtenção de células β -pancreáticas a partir de PSCs, pela agregação de ESCs em estruturas esferóides chamadas de corpos embrióides (CEs), de forma a ativar a diferenciação, mimetizando os estágios iniciais da embriogênese, e pela posterior seleção de células Nestina-positivas, foi inicialmente descrita em 2001 (LUMELSKY et al., 2001). Apesar de estudos posteriores demonstrarem que, diferentemente do que se acreditava, Nestina ser dispensável no desenvolvimento natural de células β -pancreáticas (TREUTELAAR et al., 2003), a estratégia de seleção de células Nestina-positivas, seguida da expansão, diferenciação e maturação em células produtoras de insulina, é capaz de gerar agregados de IPCs, que secretam insulina em resposta a glicose, porém, em níveis insuficientes para a reversão do diabetes em camundongos diabetizados. Essa estratégia foi aprimorada em 2004 pela dissociação dos CEs e cultivo das células individualizadas, de forma a maximizar a exposição ao meio de diferenciação, que passou a conter os fatores neuronais N2 e B27 e nicotinamida (SEGEV et al., 2004). Ao final do protocolo, as células expressam diversos marcadores pancreáticos e são capazes de processar pro-insulina em insulina (SEGEV et al., 2004). Os protocolos passaram então a utilizar fatores de crescimento, como Activina A e BMP4 para dirigir a diferenciação de culturas de CEs em endoderme definitiva (PHILLIPS et al., 2007). Após o transplante das progenitoras pancreáticas obtidas através desse método em camundongos diabéticos, as células mantiveram sua assinatura molecular, mas não foram capazes de restaurar a normoglicemia dos camundongos (PHILLIPS et al., 2007).

A partir de 2006, a diferenciação em células pancreáticas endócrinas passou a ser feita em cultura de monocamada por diferenciação direta, através de estágios específicos para a obtenção de endoderme definitiva, endoderme do tubo intestinal, endoderme pancreática e, finalmente, progenitoras endócrinas (D'AMOUR et al., 2006). As progenitoras endócrinas

eram então diferenciadas em células produtoras de insulina, porém, muitas ainda expressavam mais de um tipo hormonal, sugerindo que ainda eram imaturas. Muitos grupos passaram então a buscar condições de cultivo livres de soro fetal bovino (SFB) (JIANG et al., 2007a, 2007b), de forma a permitir a adaptação do protocolo de diferenciação para uso clínico em humanos, e a substituição de fatores de crescimento recombinantes por pequenas moléculas, de forma a reduzir os custos do protocolo (BOROWIAK et al., 2009; CHEN et al., 2009).

Como as células derivadas de PSCs até então ainda eram células endócrinas imaturas, um novo padrão de diferenciação foi estabelecidos na literatura, no qual se passou a utilizar a maturação *in vivo* de progenitoras pancreáticas em células- β funcionalmente maduras (BASFORD et al., 2012; KROON et al., 2008; MATVEYENKO et al., 2010; REZANIA et al., 2012; SCHULZ et al., 2012; SHIM et al., 2007). As hESCs passaram a ser diferenciadas em endoderme pancreática e implantadas em camundongos normais para que, de 3 a 6 meses pós-implante, fossem obtidas células endócrinas maduras capazes de secretar insulina em resposta à glicose. Posteriormente, demonstrou-se a possibilidade de maturar progenitoras pancreáticas em células similares às β -pancreáticas pela maturação em camundongos diabéticos, uma abordagem clinicamente mais relevante (REZANIA et al., 2012).

Apesar de gerar células- β maduras, a maturação *in vivo* não é uma estratégia viável do ponto de vista prático e clínico e a obtenção de células β -pancreáticas maduras *in vitro* continuou a ser de grande interesse para a comunidade científica. Um grande avanço na área de diferenciação de PSCs em células produtoras de insulina foi obtido em 2014, quando dois grupos de pesquisa independentemente, foram capazes de estabelecer culturas de células- β maduras e mono-hormonais *in vitro* a partir de PSCs. Rezania *et al* descreveram um protocolo de sete etapas para a diferenciação de PSCs em células- β *in vitro* (REZANIA et al.,

2014), sendo que as células resultantes são capazes de produzir a mesma quantidade de insulina que ilhotas humanas, sendo capazes de reverter o diabetes 40 dias pós-implante em camundongos diabéticos. Ao mesmo tempo, Pagliuca *et al* descreveram um protocolo capaz de gerar, *in vitro*, bilhões de células similares à células- β maduras, a partir de PSCs (PAGLIUCA *et al.*, 2014). Essas células- β são muito similares às células- β maduras, apesar de não serem idênticas ao nível transcricional, sendo capazes de responder ao estímulo de glicose em camundongos diabetizados. Esse estudo inovador, envolvendo uso de biorreatores para cultivo em larga escala, pode fornecer uma poderosa plataforma de alto rendimento para obtenção de células- β , visando à reversão do diabetes.

Nos últimos anos, a diferenciação de PSCs em células-produtoras de insulina se aproximou muito de seu objetivo principal, a obtenção de células- β maduras, em larga escala e a partir de um protocolo viável para a prática clínica. Entretanto, ainda são observadas discrepâncias entre as células- β obtidas a partir de PSC e as células- β adultas humanas, como: o processamento ineficiente de insulina devido aos níveis elevados de pro-insulina endógena, a diminuição do fluxo de Ca^{2+} , bem como diferenças no perfil de expressão genético, demonstrando que ainda há espaço para otimização dos protocolos de diferenciação (AGHAZADEH; NOSTRO, 2017). Além disso, os protocolos atuais de diferenciação se baseiam em estudos de *high-throughput* para determinar quais fatores contribuem para a diferenciação de células β -pancreáticas, de forma que ainda não foram esclarecidos quais mecanismos moleculares promovem a maturação das células- β .

O conhecimento acerca dos mecanismos moleculares que dirigem a organogênese pancreática estabelece os fundamentos para a existência da terapia de reposição tecidual para pacientes diabéticos. Trabalho realizado no nosso laboratório, comparou o perfil de expressão gênica de IPCs com o de mESCs utilizando análise por DNA microarray (SILVA,

2008). Este trabalho revelou mais de 1.870 genes diferencialmente expressos durante o processo de diferenciação, entre os quais o gene *Thioredoxin interacting protein (Txnip)*, que foi um dos genes mais reprimidos durante a diferenciação de mESCs em IPCs.

2.1.4. *Thioredoxin interacting protein (TXNIP)*

A proteína TXNIP foi originalmente nomeada como proteína regulada positivamente por Vitamina D3 (*Vitamin D upregulated protein-1, VDUP-1*), pois foi identificada na linhagem celular HL-60 tratada com Vitamina D3 (1,25-dihidroxicolecalciferol, metabólito ativo da Vitamina D) (CHEN; DELUCA, 1994; NISHIYAMA et al., 1999). Porém, estudos posteriores mostraram que o promotor de *TXNIP* não possui elementos consenso de resposta à Vitamina D3 e a transcrição de *TXNIP* induzida por Vitamina D3 não foi confirmada em outros tipos celulares (LUDWIG et al., 2001). Posteriormente, a proteína TXNIP foi identificada como uma das proteínas que interagem com Tiorredoxina (TXN), levando a ser nomeada Proteína de ligação a TXN-2 (*thioredoxin-binding protein-2, TBP-2*) (SHALEV, 2014), porém, atualmente, a designação TXNIP é predominante. Em ilhotas humanas isoladas expostas à glicose, *TXNIP* é o gene que tem a expressão mais fortemente induzida, com aumento de 10 vezes em seus níveis de expressão (SHALEV et al., 2002).

A transcrição de *Txnip* regulada por glicose em células- β é mediada por um elemento de resposta a carboidrato (*cis-acting carbohydrate response element, ChoRE*), que atua em cis, sendo altamente conservado entre diversas espécies na região proximal ao promotor de *Txnip* (MINN; HAFELE; SHALEV, 2005) (Figura 4). O estímulo de glicose leva ao recrutamento do fator de transcrição conhecido como proteína de ligação ao elemento de resposta a carboidrato (*carbohydrate response element-binding protein, ChREBP*) para *ChoRE* (CHAMOLSTAD et al., 2009). Uma vez associada à *ChoRE*, ChREBP forma heterodímeros com MLX

(*Max-like protein X*), possibilitando a interação com p300, que atua como co-ativador e estimula a acetilação de Histona H4, através de sua atividade histona acetiltransferase, promovendo a ocupação do promotor de *Txnip* por RNA polimerase II, sendo que, dessa forma, glicose induz a expressão de *Txnip* (CHA-MOLSTAD et al., 2009) (Figura 4). O mesmo mecanismo de regulação é observado com o fator de transcrição MondoA, homólogo de ChREBP, em outros tipos celulares (STOLTZMAN et al., 2008). Já o fator de transcrição Foxo1 (*Forkhead boxO1 transcription factor*) compete pela ligação a *ChoRE* com ChREBP, de forma a inibir a transcrição de *Txnip* induzida por glicose (KIBBE et al., 2013).

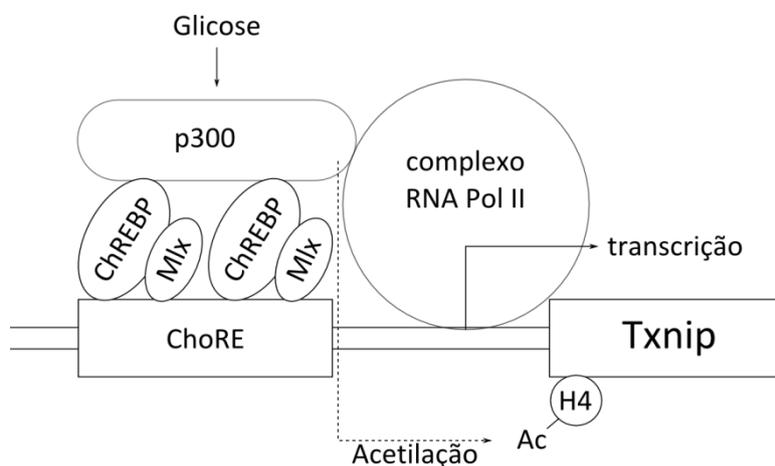


Figura 4: Representação esquemática do complexo de ativação induzido por glicose no promotor de *Txnip*. Glicose induz a ligação de heterodímeros de ChREBP-Mlx a ChoRE, de forma a recrutar p300 para o promotor. Através de sua atividade histona acetiltransferase, p300 estimula a acetilação de histona H4 e promove a ocupação do promotor pelo complexo de RNA polimerase II, resultando na transcrição de *Txnip*. Adaptado de CHA-MOLSTAD et al., 2009.

TXNIP humana é uma proteína de 46-kDa ubiqüamente expressa, com 391 resíduos de aminoácidos e codificada na região 1q21 do cromossomo 21 de humanos. TXNIP é altamente conservada entre espécies, sendo que a de camundongos apresenta 94% de homologia com a proteína humana, contendo 395 aminoácidos, sendo localizada em uma região do cromossomo 3 correspondente à sequência 1q21 humana (CHEN; DELUCA, 1994; NISHIYAMA et al., 1999). A sequência humana de TXNIP indica a presença de dois domínios do tipo arrestina e dois motivos PPxY no carboxi-terminal, sendo estruturalmente

classificada como membro da família das α -arrestinas (PATWARI et al., 2006). TXNIP possui uma ponte dissulfeto intra-molecular entre as cisteínas 63 e 247, o que permite uma interação eficiente com TXN (PATWARI et al., 2006). Por troca de ponte dissulfeto, a cisteína 247 de TXNIP forma uma ponte dissulfeto com a cisteína 32 do sítio catalítico de TXN reduzida, o que suprime a função antioxidante de TXN (PATWARI et al., 2006) (Figura 5). A capacidade de se ligar a TXN torna TXNIP um membro singular da família de α -arrestinas, pois é o único membro com domínio de ligação a TXN (PATWARI et al., 2006).

Inicialmente, acreditava-se que a função de TXNIP se devia principalmente à inibição da atividade de TXN e ao aumento do estresse oxidativo intracelular. O sistema TXN é composto por NADPH (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), TXN redutase e TXN, sendo um sistema antioxidante essencial para a proteção de células contra o estresse oxidativo através de sua atividade dissulfeto redutase. Em células de mamíferos, existem duas isoformas de TXN: TXN 1 (TXN1) é principalmente localizada no citoplasma, podendo ser translocada para o núcleo e TXN 2 (TXN2) é localizada apenas em mitocôndrias (TANAKA et al., 2000). TXNIP interage com TRX1 no citoplasma, impedindo a redução de proteínas oxidadas, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo e susceptibilidade à apoptose, e TXNIP também é translocada para a mitocôndria, onde se liga à TRX2 causando disfunção mitocondrial (YOSHIHARA et al., 2014) (Figura 5). TRX2 se liga à ASK1 (*Apoptosis signal regulating kinase 1*), uma importante MAPKKK (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*), e, assim, impede a fosforilação e ativação de ASK1 (SAXENA; CHEN; SHALEV, 2010) (Figura 5). O aumento da ligação TXNIP-TXN2 reduz a interação entre ASK1-TXN2 e induz a ativação de ASK1, causando liberação de citocromo C da mitocôndria, clivagem de caspase 3 e apoptose (SAXENA; CHEN; SHALEV, 2010) (Figura 5). Da mesma forma que ocorre no citoplasma, a translocação de TXNIP para a mitocôndria também aumenta o acúmulo de

espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS), causando ativação do NLRP3 (*NOD-like receptor Protein-3*) (ABDERRAZAK et al., 2015; ZHOU et al., 2010). Uma vez ativado, NLRP3 forma um grande complexo proteico chamado *inflammasome* que é responsável pela ativação de caspase-1 e caspase-5, o que culmina com a ativação proteolítica de citocinas pró-inflamatórias e indução de apoptose (ABDERRAZAK et al., 2015; ZHOU et al., 2010). Como um inibidor de TXN, TXNIP possui propriedades anti-proliferativas e pró-apoptóticas. De fato, a indução da expressão de *TXNIP* torna diferentes tipos celulares mais susceptíveis ao estresse oxidativo e à apoptose (JUNN et al., 2000; WANG; DE KEULENAER; LEE, 2002), inclusive células- β (MINN; HAFELE; SHALEV, 2005).

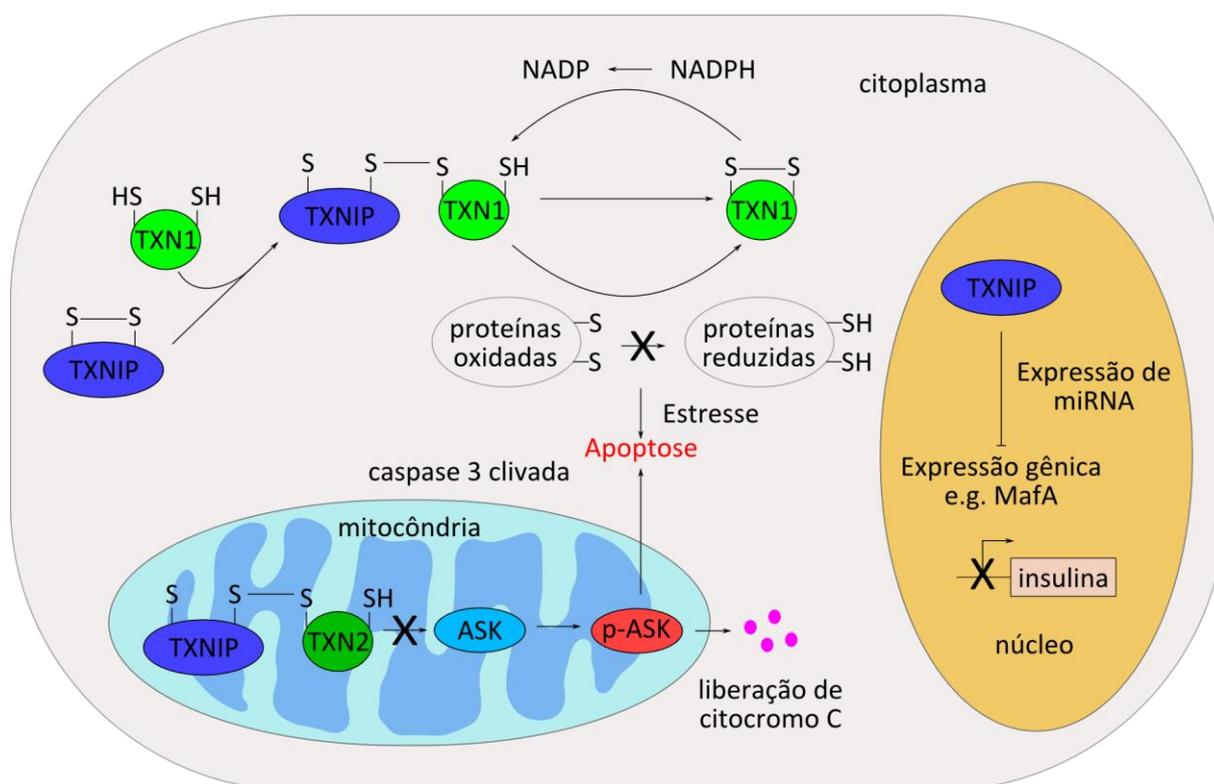


Figura 5: Representação esquemática das funções celulares de TXNIP. No citoplasma, TXNIP se associa e inibe TXN1 e assim interfere com a habilidade de TXN1 de reduzir proteínas oxidadas, resultando em estresse oxidativo e aumento da susceptibilidade a apoptose. TXNIP também entra na mitocôndria e interage com TXN2, liberando ASK1 de sua inibição por TRX2 e permitindo a fosforilação e ativação de ASK1. Isso, por sua vez, leva à liberação de citocromo C das mitocôndrias, clivagem da caspase-3 e apoptose. TXNIP também atua no núcleo e modula a expressão de diversos genes alvos, incluindo importantes fatores de transcrição de células- β , como MafA, o que resulta na redução da transcrição de insulina e na perda de função as células- β . Adaptado de SHALEV, 2014.

TXNIP também se localiza no núcleo e afeta a expressão gênica através da regulação da expressão de microRNAs (miRNAs) (XU et al., 2013) (Figura 5). De fato, em células β -pancreáticas, a expressão de TXNIP inibe a produção de insulina através da indução da expressão de miR-204, o qual funciona através da inibição de *MafA*, fator de transcrição que se liga à regiões regulatórias próximas ao promotor de insulina e ativa sua transcrição (XU et al., 2013). TXNIP também regula negativamente a expressão de miR-124A, um microRNA que tem, como alvo direto, *FoxA2*, um fator de transcrição que regula a expressão de polipeptídeo amiloide de ilhotas (do inglês, islet amyloid polypeptide, IAPP) (JING et al., 2014). IAPP se agrega em fibrilas insolúveis, encontradas em ilhotas de indivíduos com DM2, e promove inflamação e citotoxicidade de células- β (KAPURNIOTU, 2001). Além disso, TXNIP também induz a expressão de miR-200 em células β -pancreáticas. Esse microRNA inibe o fator de transcrição *Zeb1* (*zinc finger E-box-binding homeobox 1*), resultando em apoptose de células- β (FILIOS et al., 2014). É interessante notar que a expressão de miR124A, miR-200 e miR-204 é alterada na condição diabética de forma consistente com o aumento de expressão de TXNIP (FILIOS et al., 2014).

Independentemente de sua propriedade de ligação a TXN, TXNIP regula a absorção de glicose em tecidos periféricos, como músculo e gordura, atuando como um interruptor sensível à glicose e à insulina (Figura 6A). A indução da expressão de *TXNIP* diminui a captação de glicose estimulada por insulina e, de forma oposta, a inibição de *TXNIP* estimula a captação de glicose estimulada por insulina (PARIKH et al., 2007). Além disso, a expressão de *TXNIP* é induzida por glicose e inibida por insulina nos tecidos adiposo e muscular de humanos (PARIKH et al., 2007), assim como em células β -pancreáticas (SHAKED et al., 2009). A sinalização de insulina estimula a captação de glicose em tecidos periféricos, facilitando o “reabastecimento” pós-prandial. Por outro lado, o excesso intracelular de glicose induz

TXNIP, reduzindo a captação de glicose. Esse mecanismo pode servir como um interruptor que evita a absorção e o metabolismo excessivos de glicose, atribuindo à *TXNIP* a função de regulador fisiológico da homeostase de glicose em humanos (MUOIO, 2007) (Figura 6A).

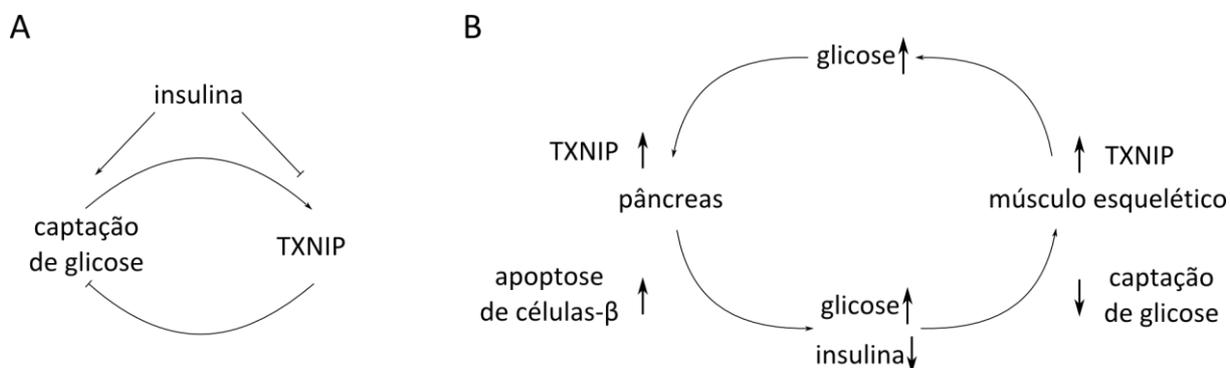


Figura 6: Representação esquemática de modelos de regulação e ação de *TXNIP*. (A) Glicose induz e insulina suprime a expressão de *TXNIP* em diversos tipos celulares. Além disso, a expressão induzida de *TXNIP* reduz a captação de glicose, enquanto a inibição de *TXNIP* aumenta a captação de glicose. Esse mecanismo sugere que *TXNIP* seja um interruptor homeostático, sensível à insulina e à glicose, que regula a captação de glicose em tecidos periféricos. (B) *TXNIP* atua na glucotoxicidade em células-β e impede a captação de glicose em tecidos periféricos, como músculo esquelético e tecido adiposo. A deficiência de insulina e a hiperglicemia podem aumentar os níveis de *TXNIP* no músculo, resultando na captação periférica de glicose defeituosa. As células β-pancreáticas são inicialmente capazes de compensar e secretar mais insulina, mas, eventualmente, a compensação falha. A hiperglicemia resultante pode até elevar a expressão de *TXNIP* pelas células-β, induzindo apoptose, diminuindo a produção de insulina e, dessa forma, estabelecendo um ciclo vicioso que está relacionado ao desenvolvimento de doenças como o DM2. Adaptado de PARIKH et al., 2007.

Na verdade, a expressão de *TXNIP* é fortemente relacionada ao estado da fosforilação oxidativa mitocondrial. A deleção de *TXNIP* causa reprogramação do metabolismo celular, promovendo a glicólise aeróbica, sendo que células com deficiência em *TXNIP* apresentam aumento da captação de glicose e acúmulo de lactato (YU et al., 2010). Inibidores da fosforilação oxidativa reprimem a transcrição de *TXNIP* indiretamente por aumentarem a velocidade da glicólise. O aumento do fluxo glicolítico diminui os níveis de importantes intermediários, como, por exemplo, glicose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, que deveriam contribuir para a função dos fatores de transcrição *ChREBP* e *MondoA*, sugerindo que a expressão de *TXNIP* está fortemente relacionada ao fluxo glicolítico (YU et al., 2010). *TXNIP* também pode inibir a glicólise por diminuir a expressão de importantes enzimas glicolíticas

através da inibição da expressão do fator de transcrição induzido por hipóxia (*hypoxia-induced transcription factor*, HIF1- α) (FARRELL et al., 2010). HIF1- α é responsável pelo aumento no metabolismo glicolítico por aumentar a transcrição de enzimas glicolíticas (CANTLEY et al., 2010). A relação entre a velocidade da glicólise e a transcrição de *TXNIP* pode explicar alguns fenômenos relacionados à expressão de *TXNIP*. A maioria das células cancerígenas apresentam altas taxas de glicólise. A maior parte do piruvato produzido por glicólise, ao invés de levar à produção de ATP, através do ciclo do ácido tricarboxílico na mitocôndria, que é muito mais eficiente em produção energética, é fermentado a lactato mesmo quando oxigênio está presente e o ciclo do ácido tricarboxílico e a fosforilação oxidativa estão funcionais. Esse fenômeno é chamado de glicólise aeróbica ou de efeito Warburg (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009), não sendo completamente compreendido. De fato, a expressão de *TXNIP* em muitas linhagens cancerígenas é fortemente inibida (BUTLER et al., 2002). É importante notar que células-tronco pluripotentes (PSCs) dependem preferencialmente do metabolismo glicolítico (RYALL et al., 2015), em consequência, são observadas mudanças no estado glicolítico quando há conversão de células somáticas em iPSC ou de PSCs em células diferenciadas (RYALL et al., 2015).

Além disso, em células hepáticas expostas à glicose, o influxo de glicose culmina no acúmulo de metabólitos que ativam os fatores de transcrição ChREBP e MLX (WU et al., 2013). Esses fatores induzem a expressão de *TXNIP*, o qual irá induzir a internalização de GLUT1, suprimindo a captação de glicose (WU et al., 2013). *TXNIP* também suprime a transcrição de *GLUT1* causando diminuição de GLUT1 a longo prazo e redução da captação de glicose (WU et al., 2013). Em contraste, quando em condições de escassez energética, a proteína quinase ativada por AMP (*AMP-activated protein kinase*, AMPK) é ativada,

catalizando a fosforilação de TXNIP e bloqueando a endocitose de GLUT1, que é dependente de TXNIP (WU et al., 2013). AMPK monitora o estado energético celular em resposta a variações nutricionais, a baixa oferta energética resulta em ativação de AMPK, o que culmina na supressão do consumo e aumento da produção de ATP, de forma a restaurar a homeostase energética celular (MIHAYLOVA; SHAW, 2011). AMPK também regula a ação dos fatores de transcrição ChREBP e MLX através da translocação nuclear dependente de fosforilação e, assim, regula, indiretamente, os níveis de *TXNIP* (KAWAGUCHI et al., 2002). A fosforilação causa a degradação de TXNIP dependente de proteassomo, promovendo o aumento prolongado da captação de glicose e permitindo às células utilizar glicose como fonte energética (WU et al., 2013). De maneira geral, TXNIP atua como um regulador do influxo de glicose, reforçando seu papel como regulador da homeostase celular.

Em células- β , a expressão de *TXNIP* é altamente regulada. De fato, *TXNIP* foi inicialmente identificado como o gene mais induzido na resposta de ilhotas humanas expostas à glicose (SHALEV et al., 2002), dado que foi posteriormente corroborado por outros estudos (MINN; HAFELE; SHALEV, 2005). TXNIP causa aumento de estresse oxidativo e a indução da expressão de *TXNIP* em células- β promove apoptose (MINN et al., 2005; MINN; HAFELE; SHALEV, 2005). Por outro lado, a inibição de *TXNIP* promove a sobrevivência de células- β quando estas são expostas a altas concentrações de glicose (CHEN et al., 2008b, 2010). Desta forma, TXNIP é considerado o link entre glucotoxicidade e apoptose de células- β (CORBETT, 2008; SHALEV, 2008, 2014). TXNIP também regula o aspecto mais crucial da função β -pancreática, ou seja, a produção de insulina, através da indução da expressão de miR-204 e da inibição de MafA (XU et al., 2013). Vale notar que o aumento na expressão de miR-204 e a diminuição de MafA e de insulina não foram observados apenas *in vitro* em

resposta à superexpressão de *TXNIP* em linhagens de células- β e em ilhotas humanas primárias, mas também em diversos modelos murinos de diabetes (SHALEV, 2014).

A expressão de *Txnip* é elevada em modelos murinos de DM, com grande impacto na função de células- β . A análise de ilhotas isoladas de camundongos obesos resistentes à insulina e diabéticos, revela aumento de quase 10 vezes na expressão de *Txnip* em camundongos obesos diabéticos, quando comparados com controles normoglicêmicos magros (CHEN et al., 2008a). Também foi observado que pacientes com deficiência na regulação de glicose apresentam níveis elevados de TXNIP plasmático e que os níveis de TXNIP se correlacionam com a extensão da disfunção das células β -pancreáticas (ZHAO et al., 2015). Sendo assim, TXNIP exerce diversas funções com grande impacto na sobrevivência e função de células β -pancreáticas, assim como no desenvolvimento e progressão de DM1 e DM2, doenças marcadas pela perda ou diminuição de função das células- β .

Uma linhagem de camundongo mutante HcB-19/*Txnip*^{-/-}, portadora de uma mutação espontânea em *Txnip*, foi identificada inicialmente como um modelo de Hiperlipidemia combinada familiar (do inglês, *Familial combined hyperlipidemia*, FCH), a forma mais comum de desordem genética que causa aumento de lipídeos plasmáticos (CASTELLANI et al., 1998). O gene *Txnip* nos camundongos HcB-19/*Txnip*^{-/-} possui uma mutação inativadora *nonsense* no éxon 2, códon 97, que resulta em redução dramática nos níveis de mRNA e de proteína (BODNAR et al., 2002). O modelo apresenta hipoglicemia e níveis plasmáticos elevados de insulina, triglicerídeos, corpos cetônicos e ácidos graxos (HUI et al., 2004; SHETH et al., 2005). Estudos posteriores revelaram que TXNIP não está associado com FCH em humanos. Diferentemente dos animais normais, o mutante HcB-19/*Txnip*^{-/-} apresenta aumento de três vezes em seus níveis de insulina quando em jejum e razão peptídeo-C/insulina normal, sugerindo que a hiperinsulinemia se deve ao aumento da secreção de insulina e indicando

que a deficiência em *Txnip* possui um papel nas células β -pancreáticas (HUI et al., 2004). Surpreendentemente, os níveis de expressão da proteína Txn e de sua atividade não são discerníveis entre o modelo deficiente em *Txnip* e seu controle, sugerindo que as perturbações metabólicas causadas pela deficiência de *Txnip* dependem de outras interações (SHETH et al., 2005).

Os camundongos HcB-19/*Txnip*^{-/-} são obesos, porém, apresentam baixa glicemia e são resistentes ao diabetes induzido por estreptozotocina (CHEN et al., 2008a). Quando cruzados com camundongos obesos, resistentes à insulina e diabéticos, os duplo-mutantes são ainda mais obesos, porém, não apresentam variação nos níveis de apoptose de células- β , sendo protegidos do diabetes e apresentando aumento de três vezes na massa de células β -pancreáticas (CHEN et al., 2008b). Camundongos com deleção de *Txnip* específica em células- β também tem aumento na massa de células- β e são protegidos contra diabetes (CHEN et al., 2008b). Foi sugerido que a inibição de *Txnip* evita a apoptose de células- β (CHEN et al., 2008b), porém, posteriormente, foi demonstrado que o modelo HcB-19/*Txnip*^{-/-} não desenvolve hiperglicemia quando recebe doses padrão de estreptozotocina, contudo, apesar da massa de células- β permanecer maior nos camundongos HcB-19/*Txnip*^{-/-} quando comparados com o controle normal, a diminuição relativa no número de ilhotas pancreáticas foi igual ou maior nos animais com deficiência em *Txnip* quando tratados com estreptozotocina (MASSON et al., 2009). Além disso, uma segunda dose de estreptozotocina foi capaz de induzir hiperglicemia nesses animais (MASSON et al., 2009). De forma consistente, células β -pancreáticas ISN1, nas quais a expressão de *Txnip* foi inibida, são mais sensíveis à morte celular induzida por exposição direta a estreptozotocina ou a um coquetel de citocinas inflamatórias (MASSON et al., 2009). Esses dados indicam que *Txnip* funciona

como um regulador da massa de células- β e que a resistência relativa do modelo HcB-19/Txnip^{-/-} ao diabetes se deve ao aumento na massa inicial de células- β .

2.1.5. Estudo da organogênese pancreática utilizando o modelo *zebrafish*

Compreender os mecanismos que dirigem o aumento da massa inicial de células- β e, assim, os mecanismos normais de desenvolvimento β -pancreático que serão mimetizados na diferenciação β -pancreática, requer o estudo da organogênese pancreática. O *zebrafish* (*Danio rerio*), popularmente conhecido como peixe paulistinha, se tornou um modelo atraente para explorar questões relacionadas ao desenvolvimento inicial de vertebrados (Figura 7). A fertilização externa, o rápido desenvolvimento, a permeabilidade e a transparência óptica dos embriões de *zebrafish* tornam esse um modelo particularmente útil para recapitular os processos dinâmicos de organogênese (LIU, 2007).

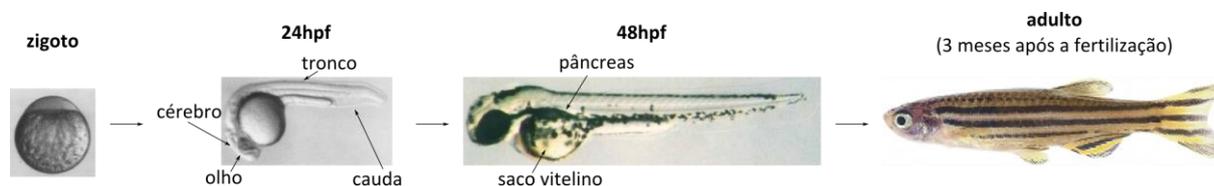


Figura 7: Imagem de *zebrafish* (*Danio rerio*), também conhecido como peixe paulistinha, em diferentes fases do desenvolvimento (hpf, horas após a fertilização, do inglês, *hours post fertilization*). Adaptado de BIO-ATLAS., 2018.

Assim como em mamíferos, o pâncreas de *zebrafish* consiste de um componente exócrino e um endócrino, com as funções endócrinas sendo bem conservadas em termos de perfil hormonal, receptores hormonais, assim como reguladores de transcrição (MCGONNELL; FOWKES, 2006). O pâncreas de *zebrafish* também se desenvolve a partir da endoderme do intestino anterior, emergindo como dois brotos separados (FIELD et al., 2003) (Figura 8). O broto dorsal emerge ao redor de 24h após a fertilização (*hours post fertilization*, hpf) e origina, exclusivamente, as células endócrinas, de forma que apenas uma ilhota

principal é formada (Figura 8). O broto ventral emerge em 32hpf originando as células exócrinas, assim como algumas células endócrinas (Figura 8). A população de células- β do broto ventral se expande por proliferação e neogênese a partir de precursoras endócrinas associadas aos ductos pancreáticos. Essas células se de-laminam e migram para contribuir com a ilhota principal (DONG et al., 2007, 2008; ZECCHIN et al., 2004). Sendo assim, a diferenciação de células- β derivadas de precursoras endócrinas associadas aos ductos pancreáticos é equivalente à segunda transição pancreática, que ocorre durante a formação do pâncreas de mamíferos. Os brotos dorsal e ventral se fundem em 50hpf e formam o pâncreas maduro que consiste da ilhota principal envelopada pelo tecido exócrino (TEHRANI; LIN, 2011) (Figura 8). Entretanto, diferentemente de humanos e camundongos, *zebrafish* possui duas cópias do gene *Txnip*: *Txnip A* e *Txnip B*, sendo que ambos codificam proteínas com domínios ativos preservados e influenciam de forma similar o metabolismo de glicose do embrião (HUANG; LINSEN, 2015). Dessa forma, o *zebrafish* é um modelo interessante para analisar o impacto na expressão de *Txnip* na organogênese pancreática.

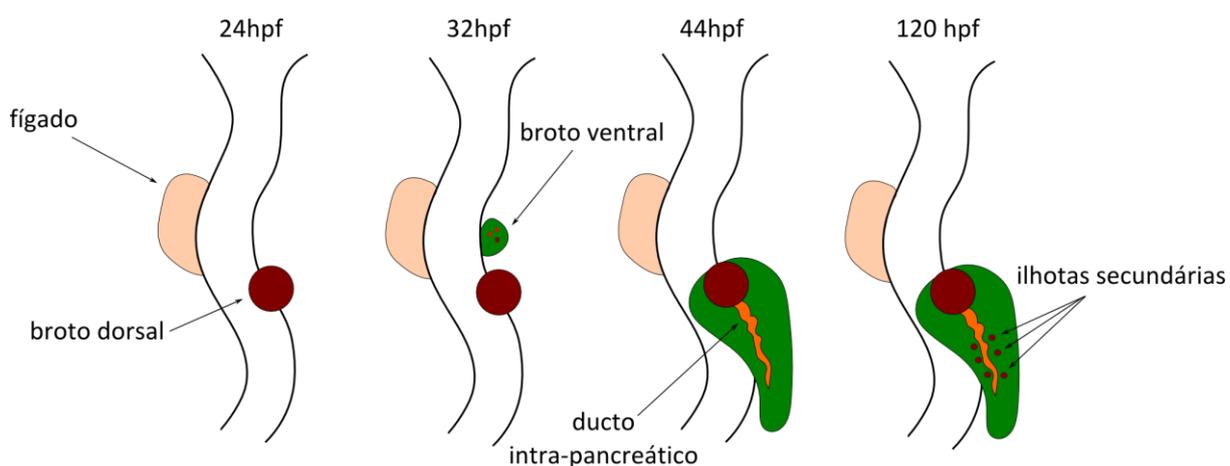


Figura 8: Representação esquemática do desenvolvimento pancreático de zebrafish.

Nos últimos anos, TXNIP se tornou conhecido como um regulador-chave do metabolismo de glicose e de lipídios, tendo sido demonstrada sua influência na regulação metabólica via múltiplas ações. A expressão de *Txnip* é elevada em diversos modelos

roedores de Diabetes, com ou sem obesidade. Além disso, foram detectadas variações genéticas e epigenéticas em *TXNIP* associadas com desordens metabólicas crônicas, como diabetes e hipertensão. Inclusive, algumas drogas anti-hiperglicemiantes, utilizadas no tratamento de DM, regulam negativamente a expressão de *TXNIP*, como a metformina (CHAI et al., 2012) e a exenatida (CHEN et al., 2006a). Diversas drogas bloqueadoras de canais de cálcio, como a droga anti-hipertensiva verapamil, também reduzem a expressão de *Txnip* *in vitro* e *in vivo*, através da exclusão de ChREBP do núcleo e inibição da ocupação do promotor de *Txnip* (XU et al., 2012). *TXNIP* é altamente regulado em células- β , exercendo diversas funções com grande impacto na funcionalidade e na sobrevivência de células- β e, além disso, está relacionado à regulação da massa de células- β , tornando-se, portanto, um interessante alvo a ser analisado durante a diferenciação β -pancreática e a organogênese do pâncreas endócrino.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto é avaliar a influência do gene *Txnip* na diferenciação de IPCs a partir de mESCs, elucidar os mecanismos moleculares através dos quais seu produto gênico influencia a organogênese pancreática e validar, *in vivo* (zebrafish), os resultados obtidos, visando melhor compreender o desenvolvimento de células- β e viabilizar uma alternativa terapêutica para pacientes DM1.

2.2.2. Objetivos específicos

- a) Reproduzir o protocolo de diferenciação de mESCs em IPCs e validar a expressão diferencial do gene *Txnip* ao longo das diferentes etapas do protocolo;
- b) Estabelecer ferramentas para induzir e inibir a expressão do gene *Txnip* em linhagens celulares;
- c) Validar as ferramentas de indução e inibição da expressão de *Txnip* em linhagens de células- β pancreáticas;
- d) Diferenciar mESCs geneticamente modificadas, para a superexpressão ou inibição do gene *Txnip*, em IPCs e caracterizar, molecular- e funcionalmente, as células obtidas ao final do protocolo de diferenciação;
- e) Padronizar o modelo de *zebrafish* através da inibição da expressão do gene *Txnip*;
- f) Caracterizar morfológica- e molecularmente a influência da inibição do gene *Txnip* no desenvolvimento pancreático endócrino de *zebrafish*.

2.3. Materiais e Métodos

2.3.1. Estudo funcional do gene Thioredoxin-interacting protein (*Txnip*)

Em trabalho anterior realizado pelo nosso grupo (SILVA, 2008), foi analisada a expressão diferencial de genes em células-tronco embrionárias murinas que foram submetidas à diferenciação em células produtoras de insulina, denominadas IPCs (*insulin producing cells*) (LUMELSKY et al., 2001). Mais de 1.000 genes foram identificados como sendo regulados negativamente (inibidos). Pesquisamos referências dos 30 genes mais reprimidos utilizando Bancos de Dados do NCBI, como OMIM e Unigene, além de publicações indicando possível relação entre esses genes e a embriogênese pancreática.

2.3.2. Cultivo de células

Todo o trabalho de cultivo celular foi realizado em frascos plásticos adequados. As condições de pH e de temperatura de cultivo foram mantidas próximas às condições fisiológicas através da incubação das células em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Foram estabelecidos estoques celulares congelados em meio contendo 10% de dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich) e soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e mantidos em reservatórios contendo nitrogênio líquido.

2.3.2.1. Fibroblastos embrionários de camundongo inativados

Os fibroblastos embrionários de camundongo (*mouse embryo fibroblasts*, MEFs) foram cultivados em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco) suplementado com 10% SFB e 10µg/mL ciprofloxacina (Bayer), expandidos e congelados até serem irradiados. Os fibroblastos foram expandidos até, no máximo, a quinta passagem, para serem, então, irradiados com raios gama (45 greys). Os fibroblastos inativados por radiação foram

cultivados em bandejas gelatinizadas com o mesmo meio de cultura utilizado para os fibroblastos, até o descongelamento das mESCs.

2.3.2.2. Células-tronco embrionárias murinas (mESCs)

A linhagem de mESCs USP4 foi gentilmente cedida pela Professora Doutora Lygia da Veiga Pereira, do Instituto de Biociências da USP (IB – USP). Essas células foram cultivadas sobre uma camada de fibroblastos embrionários inativados com radiação gama (conforme descrito no tópico 2.3.2.1) e em meio de cultura para mESCs: DMEM suplementado com 15% de soro fetal bovino qualificado para o cultivo de células-tronco (Hyclone), 2mM L-glutamina (Ajinomoto), 1X aminoácidos não essenciais (MEM Non-Essential aminoacids, Gibco), 1×10^3 U/ml fator inibidor de leucemia murina (*murine leukemia inhibitory factor*, mLIF, Chemicon), 0.1mM β -mercaptoetanol (Gibco) e 10ug/mL ciprofloxacina (Bayer).

2.3.2.3. Diferenciação de mESC em células produtoras de insulina (IPCs)

A indução da diferenciação de mESCs em IPCs foi realizada conforme previamente descrito (LUMELSKY et al., 2001). Inicialmente, a partir de culturas de mESCs (estágio de mESCs) e através da técnica de cultura em gotas suspensas, corpos embrióides (CEs) foram formados, contendo de 400 a 600 células em 25 μ l de meio de cultivo para mESCs sem mLIF. Após quatro dias de cultivo, os CEs foram transferidos para bandejas de cultivo revestidas com gelatina e incubados por mais 24h (estágio de CEs). Em seguida, o meio de cultivo foi substituído por um meio de seleção de células nestina-positivas: 50% DMEM, 50% HamF12, 1X Insulina-Transferrina-Selênio (ITS, Life Technologies) e 8mg/ml fibronectina (Life Technologies). Os CEs permaneceram neste meio de cultivo para seleção de células Nestina-positivas por sete dias (estágio de seleção).

As células foram então tripsinizadas e plaqueadas a uma densidade de 2.4 células/cm² em bandejas aderentes tratadas com Laminina-1 (Life Technologies) e Poliornitina (Sigma-Aldrich), na presença de meio de cultura para expansão de células progenitoras endócrinas: DMEM 50%, 50% HamF12, 1x suplemento N2 (Life Technologies), 1x suplemento B27 (Life Technologies), suplementado com 50ng/ml de bFGF (R&D systems). Essas condições foram mantidas por sete dias (estágio de expansão).

As células foram então diferenciadas em IPCs utilizando-se o mesmo meio de cultivo do estágio anterior, de expansão celular, porém sem a suplementação com bFGF e adicionando 10mM de nicotinamida (Sigma-Aldrich) (estágio de IPCs). Após cada protocolo de diferenciação, as células foram coradas com Ditizona (Sigma-Aldrich).

2.3.2.4. Células de insulinoma de camundongo

Como controle positivo para células- β , foi utilizada a linhagem celular MIN-6 (*Mouse insulinoma 6*) de insulinoma murino, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero, do Instituto de Biociências da Unicamp (IB-Unicamp). Estas células foram cultivadas em RPMI-1460 (Gibco) suplementado com 10% SFB, 50 μ g/ml de ampicilina e 50 μ g/ml de estreptomicina.

2.3.3. Análise de expressão gênica

2.3.3.1. Extração de RNA total

O RNA total de culturas celulares foi obtido utilizando-se o método de extração por Fenol-Clorofórmio (Trizol, Invitrogen). Foram adicionados 500 μ L do reagente Trizol às amostras de culturas celulares e, em seguida, adicionou-se 200 μ L de clorofórmio (Merck). As amostras foram agitadas vigorosamente e incubadas por 15min a 4°C. Após centrifugação a

12.000g, por 15min, a 4°C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e um volume igual de isopropanol (Merck) foi adicionado. As amostras foram incubadas a -20°C por meia hora, novamente centrifugadas a 12.000g por 15min, a 4°C, e os sobrenadantes foram descartados. Foi realizada a lavagem do precipitado branco com 1mL de etanol absoluto (Merck). Após centrifugação a 12.000g, por 15min, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o etanol residual foi evaporado. O precipitado foi então dissolvido e homogeneizado em 30µL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore). A partir de 2µL de cada uma das amostras, foi estimada a concentração de RNA total, através de leitura espectrofotométrica a 260/280nm, no espectrofotômetro NanoDrop-1000 (NanoDrop Technologies). As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento de produção das fitas de cDNA.

2.3.3.2. Síntese de cDNA

Alíquotas de 1 µg de RNA total foram utilizadas na síntese de fitas simples de cDNA por transcrição reversa, utilizando-se a enzima Super Script III (Invitrogen). Cada amostra de RNA foi submetida à uma reação contendo 0,5µL de Oligo dT (0,5 µg/µl) (Invitrogen), 0,5µL de *primers* randômicos (100ng/µL) (Invitrogen) e 1µL de dNTPs (10mM) (Invitrogen) para um volume final de 12µL. As amostras foram incubadas a 75°C por 10min para desnaturação das moléculas e, em seguida, foram adicionados 2µL de DTT (0,1 mol/L) (Invitrogen), 0,5µL de RNase OUT (40U/µL) (Invitrogen), 1µL da enzima Super Script III (Invitrogen), 2µL do tampão da enzima e 2,5µL de água ultrapura para um volume final de 20µL. A reação foi incubada por 10min, a 25°C, e, em seguida, por 2h a 50°C e 10min a 72°C. Após a adição de 1µL de RNase H (5 U/µL) a cada reação, as amostras foram incubadas a 37°C por 30min, para degradação do RNA, seguida de incubação a 72°C, por 10min, para a inativação da enzima RNase H.

2.3.3.3. *Primers* utilizados e determinação de eficiência

Os *primers* utilizados foram determinados através do software Primer Express, versão 3.0 (Applied Biosystems) e avaliados pela ferramenta *online* Primer-BLAST (NCBI) (Tabela 1). Para o cálculo da eficiência dos *primers*, foram realizadas reações de amplificação contendo *primers* na concentração de 600nM e, como molde, uma mistura de cDNAs diluídos em série (1:30, 1:60, 1:120, 1:240, 1:480). A análise da regressão linear dos valores de Cts em função do logaritmo da respectiva diluição fornece o coeficiente angular da reta (a, em $y=ax+b$), que é utilizado para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos *primers*, utilizando-se a fórmula: $Ef=10^{-(1/\text{coeficiente angular})}$.

Tabela 1: Sequência de *primers* utilizados.

Gene	Sequência <i>forward</i>	Sequência <i>reverse</i>
Hprt	CCGACCGTTCTGTCATGTC	CATAACCTGGTTCATCATCACTAATCA
Ins1	TAAAGCTGGTGGGCATCCA	GCACCAACAGGGCCATGT
Ins2	AGGACCCACAAGTGGCACAA	GATCTACAATGCCACGCTTCTG
MafA	CTGAGCGGCGTCGAGGACAG	TCGACCTGATGAAGTTCGAGGTGA
Ngn3	GCACTCAGCAAAAAGCGAAGA	GCCGAGTTGAGGTTGTGCAT
Pdx1	TCCAAAACCGTCGCATGAA	CAATCTTGCTCCGGCTCTTC
Txnip	CCTACAGGTGAGAACGAGATGGT	TCGAAGCCGAACCTGTAICTCATAT

2.3.3.4. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Para as reações de qRT-PCR, foi utilizado o reagente SYBR Green Dye (Applied Biosystems). Cada reação de qRT-PCR foi preparada com 3µL de cDNA 30 vezes diluído, 3µL do conjunto de *primers* (*forward* e *reverse*) e 6µL do reagente SYBR Green Dye. Os experimentos de qRT-PCR foram realizados no aparelho Real-Time PCR 7300 (Applied Biosystems), seguindo um ciclo de desnaturação inicial de 10min a 95°C e 40 ciclos de amplificação (30seg de desnaturação a 95°C e 1min de anelamento e extensão a 60°C). O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados foram realizados pelo programa computacional GeneAmp 5700 (Applied Biosystems). Na análise dos dados, estabeleceu-se

um valor arbitrário de corte na fase exponencial da amplificação do gene. Assim, foi obtido o valor de *threshold cycle* (Ct) da amostra, que representa o número de ciclos necessários para que a amostra atinja o valor de corte. Os resultados foram calculados utilizando-se o método $\Delta\Delta C_t$, sendo utilizado o gene *Hprt* como controle endógeno. A especificidade do sinal foi confirmada através da análise das curvas de dissociação do produto amplificado.

2.3.4. Análise da secreção de insulina ou de peptídeo-C

As IPCs obtidas a partir de três diferenciações distintas foram submetidas ao teste de secreção de insulina ou peptídeo-C frente ao estímulo de glicose. Peptídeo-C é um polipeptídeo curto que conecta as cadeias A e B da molécula de pró-insulina, sendo assim, a secreção de peptídeo-C é diretamente proporcional à secreção de insulina. Como controle positivo para células- β , foi utilizada a linhagem celular MIN-6. Soluções Krebs-Henseleit (Sigma-Aldrich) suplementadas com 0,2% albumina (Grifols) e contendo baixa (2,8mM) ou alta (16,7mM) concentração de glicose foram utilizadas. Para a realização do ensaio, o sobrenadante da cultura celular foi descartado e as células foram incubadas por 1h a 37°C em solução contendo baixa concentração de glicose. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com tampão fosfato sem Ca^{2+} e sem Mg^{2+} (PBSA) e incubadas por mais 1h, a 37°C em solução contendo baixa concentração de glicose. O sobrenadante obtido foi armazenado a -20°C. O procedimento foi repetido, porém, as células foram então incubadas por 1h a 37°C em solução contendo alta concentração de glicose. As soluções incubadas também foram armazenadas a -20°C para posterior análise do conteúdo de insulina ou de peptídeo-C secretado pelas células. As amostras foram dosadas através de ensaios de imuno-adsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) utilizando-se kits comerciais para

detecção de peptídeo-C ou insulina (ELISA kit, Millipore), de acordo com as instruções do fabricante.

2.3.5. Modulação da expressão do gene *Txnip*

Para realizar o estudo funcional do gene *Txnip*, foram estabelecidas ferramentas para superexpressar ou inibir a expressão desse gene. O trabalho com células-tronco e com extensos protocolos de diferenciação demanda um sistema de entrega de transgene eficiente e estável. A técnica de transfecção lentiviral ocorre em qualquer estágio do ciclo celular e resulta na modificação estável do genoma das células alvo, além de permitir a aplicação em diferentes linhagens de células de mamíferos. Dessa forma, para a condução dos ensaios funcionais do gene *Txnip*, selecionamos a técnica de transdução lentiviral para entrega dos transgenes. Foram estabelecidos vetores lentivirais específicos para a inibição ou a superexpressão de *Txnip*, seguido da produção de partículas lentivirais.

2.3.5.1. Inibição da expressão do gene *Txnip*

A inibição da expressão do gene *Txnip* foi realizada através da técnica de RNA de interferência ou shRNA (*short hairpin RNA*), utilizando-se o vetor pLKO_IPTG_3xLacO (*Mission inducible lentiviral shRNA plasmids*, Sigma-Aldrich). Esse vetor induzível contém três cópias do repressor Lac, permitindo o controle temporal da expressão do gene de interesse. Analisamos três sequências específicas para inibir a expressão de *Txnip* em células MIN-6 e selecionamos duas sequências que apresentaram maior eficiência de inibição, denominadas shRNA 1 (TRCN0000178160 5' CCGGGCAGAAGATCAGACCATCCATCTCGAGATGGATGGTCTGATCTTCTGCTTTTTTG 3') e shRNA 2 (TRCN0000181578 5' CCGGGCAGGAAATGAAGCATCTGTAAGTACAGATGCTTCATTT CCTGCTTTTTTG 3'). Como

controle negativo, foi utilizado o mesmo vetor, porém contendo uma sequência de shRNA não relacionada a qualquer gene (shRNA NT: *non-target control shRNA plasmid*, Sigma-Aldrich).

2.3.5.2. Superexpressão do gene *Txnip*

A sequência codificadora do gene *Txnip* foi adquirida a partir do vetor pCMV-SPORT6 contendo o cDNA completo correspondente ao gene *Txnip* (TransOmic). A região codificadora foi obtida por digestão do vetor comercial com a enzima HindIII (New England Biolabs), seguida do tratamento com a enzima Klenow (New England Biolabs) e subsequente restrição com a enzima PstI (New England Biolabs). O vetor de expressão utilizado foi o pLV-eGFP, um vetor bistrônico contendo o promotor CMV (Citomegalovírus), que expressa a proteína verde fluorescente (*enhanced green fluorescent protein* (EGFP)) de maneira concomitante ao transgene de interesse. O vetor pLV-eGFP foi linearizado por co-digestão com as enzimas EcoRV e PstI (New England Biolabs) e utilizado numa reação de ligação com a sequência do transgene pela enzima T4 ligase (New England Biolabs), gerando o vetor pLV-Txnip. A sequência da construção foi confirmada por sequenciamento de Sanger. Como controle negativo, foi utilizado o vetor pLV-Controle, sem a introdução do transgene.

2.3.5.3. Produção de partículas lentivirais

Para a produção de partículas lentivirais, células da linhagem HEK293T foram semeadas em bandejas de seis poços na presença de 10% SFB em DMEM, 16 a 24h antes da transfecção. A mistura dos DNAs plasmidiais para a produção de partículas lentivirais foi feita na proporção indicada por Tiscornia et al. (TISCORNIA; SINGER; VERMA, 2006), junto com o reagente de lipofecção (Lipofectamine 2000, Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. As coletas de sobrenadante contendo partículas lentivirais foram realizadas após

24 e 48h. Os sobrenadantes de cada coleta foram centrifugados a 10.000xg por 5min à temperatura ambiente para eliminar restos celulares e, em seguida, congelados a -80°C.

2.3.5.4. Transdução lentiviral

Para a transdução das células MIN-6, cerca de 4×10^4 células em suspensão em meio RPMI-1460 contendo 10% SFB foram transduzidas com 100µl do meio condicionado contendo as partículas virais, na presença de polibreno na concentração final de 10µg/ml. Baseado em produções anteriores, estima-se que o título seja da ordem de 10^7 UFC (unidades formadoras de colônia)/ml. Considerando-se este título, a MOI (*Multiplicity of Infection*) para a condição empregada seria de aproximadamente 20. Após a adição do meio condicionado, a suspensão de células contendo partículas virais foi semeada em bandejas de 24 poços. A transdução de mESCs foi realizada utilizando-se o mesmo método descrito anteriormente, porém partindo-se de 1×10^3 células por poço, utilizando-se 500uL de meio condicionado contendo partículas virais (MOI de aproximadamente 100) em meio de cultivo para mESCs.

Após 72h de transdução viral, as células (MIN-6 ou mESCs) foram selecionadas por sete dias na presença de puomicina (3µg/ml) (Thermo Fisher Scientific), no caso das transduções com partículas lentivirais para inibição de *Txnip*. As células (MIN-6 ou mESCs) eGFP positivas transduzidas com partículas lentivirais para superexpressão de *Txnip* foram selecionadas 48h após a transdução através da técnica de FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) em um citômetro FACSAria II (BD Bioscience). Em ambos os casos, superexpressão ou inibição, foram estabelecidas culturas mistas estáveis.

2.3.6. Curva de crescimento

As células MIN-6 geneticamente modificadas foram semeadas na densidade de 5×10^4 células/cm² em bandejas de 12 poços. Foram realizadas coletas diariamente, em triplicata, após o plaqueamento, utilizando-se de tripsina para remover as células da superfície. Para a contagem de células utilizou-se um contador de células automático (Innovatis, CASY technology), de acordo com instruções do fornecedor.

2.3.7. Ensaio de apoptose

As células MIN-6 geneticamente modificadas foram semeadas na densidade de 10^5 células/cm² em bandejas de seis poços. As células foram submetidas ao careciamento de soro por 24h, em meio RPMI-1460 contendo 0,1% SFB. As células carenciadas foram tratadas com um coquetel de citocinas contendo: 4ng/mL Tnf- α (Peprtech), 2ng/mL Ifn- γ (Peprtech) e 0,4ng/mL Il-1 β (Peprtech). As células foram coletadas 24h após o tratamento através de incubação por 30min com solução de Versene a 4°C. Para análise de apoptose, as células foram marcadas com iodeto de propídeo (PI, Life technologies) e com Anexina-V (Annexin-V FITC, Life technologies). Quando em processo de apoptose, as células externalizam fosfatidilserina através de sua membrana plasmática, a qual é marcada com anexina V. As células apoptóticas também perdem integridade da membrana em um processo posterior de morte, o que permite a internalização do PI e sua intercalação ao DNA. As células marcadas foram submetidas à análise por citometria de fluxo em um citômetro FACSAria II (BD Bioscience).

2.3.8. Índice de produção de insulina

Para estimar o índice de produção de insulina das células MIN-6 geneticamente modificadas, as células foram semeadas na densidade celular de 10^6 células/cm² e cultivadas em condições padrão por dois dias. As células foram então coletadas, marcadas com a sonda fluorescente Newport Green (Life Technologies) e analisadas por citometria de fluxo em um citômetro FACSAria II (BD Bioscience).

2.3.9. Análise de expressão proteica

Extratos proteicos foram obtidos a partir de culturas de IPCs em solução de lise contendo inibidores de protease e de fosfatase (10mM TRIS pH 7,5; 150mM NaCl; 5mM EDTA; 1mM EGTA; 1mM DTT; 1% NP-40; 0,1% SDS; 1% desoxicolato; 1mM Na₃VO₄; 25mM NaF, inibidor de fosfatase (Sigma-Aldrich) e inibidor de protease (GE Healthcare)) a 4°C. As amostras foram centrifugadas a 20.000g por 30min e o sobrenadante, correspondente ao extrato proteico, foi quantificado pelo método colorimétrico de Bradford (Bradford Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Inc), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) para compor uma curva-padrão. As amostras foram armazenadas a -80°C.

Para os experimentos de Western Blotting, 30µg de cada extrato proteico foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). O padrão proteico utilizado compreendia padrões de massas moleculares de 10-250kDa (Dual Color Standards, BioRad). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (BioRad) por transferência úmida, em tampão de transferência (0,3% de Tris p/v, Glicina 1,44% p/v, SDS 0,1% v/v e metanol 20% v/v), sob 100V, a 4°C por 2h. As membranas foram bloqueadas incubando-as em solução de bloqueio (*Tris-buffered saline* (TBS) contendo 5% de leite desnatado em pó ou albumina bovina sérica (BSA) e 0,1% de

Tween 20 (Sigma-Aldrich)), à temperatura ambiente por 1h. Os seguintes anticorpos foram utilizados: rabbit anti-Txnip (1:1000, Abcam), rabbit anti-Pdx1 (1:1000, Abcam), mouse anti- α -Tubulina (1:4000, Sigma-Aldrich), anticorpos secundários conjugados com Horseradish Peroxidase (HRP) (Vector Laboratories).

A detecção da proteína de interesse foi realizada por imunorreação. Primeiramente, a membrana foi incubada *overnight*, sob agitação a 4°C, com solução de bloqueio contendo o anticorpo primário, conforme sugestão de diluição do fabricante. As membranas foram lavadas três vezes, por 5min cada, com solução de lavagem (TBS contendo 0,05% de Tween 20) e incubadas por 1h à temperatura ambiente, com anticorpo secundário apropriado, conjugado à peroxidase. As membranas foram lavadas três vezes com solução de lavagem e reveladas utilizando-se sistema quimioluminescente (Clarity Western ECL Blotting Substrates, BioRad). A intensidade das bandas obtidas foi registrada utilizando-se o sistema ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Entre dois ensaios de Western Blot que utilizaram a mesma membrana de nitrocelulose, foi feita a remoção dos anticorpos da imunorreação de detecção inicial utilizando-se tampão de *stripping* (1,5% glicina (Ajinomoto), 0,1% SDS (LGC Biotecnologia), 1% Tween 20, pH 2,2) e duas incubações de 5min. Em seguida, a membrana foi novamente bloqueada e procedeu-se com nova imunorreação.

2.3.10. Avaliação do desenvolvimento pancreático de *zebrafish*

Todas as linhagens de *zebrafish* (*Danio rerio*) utilizadas foram mantidas em condições padrão de laboratório, em um sistema de circulação contínua de água, a qual é mantida entre 26 e 28,5°C, pH entre 6,8 e 7,5, condutividade de 300 a 1,500 μ S, salinidade de 0,5 a 1g/L e oxigenação acima de 6,0mg/L. As seguintes linhagens mutantes e transgênicas foram utilizadas: *liger*^{s430} (*hnf1ba*^{s430}), Tg(NeuroD:eGFP), Tg(Nkx2.2aD:eGFP), Tg(Tp1:eGFP),

Tg(insulin:dsRed; glucagon:eGFP). Os embriões foram obtidos a partir de acasalamentos naturais e os estágios de desenvolvimento foram determinados de acordo com horas após fertilização (*hours post fertilization*, hpf).

2.3.10.1. Obtenção de morfantes para o gene *Txnip*

Embriões de *zebrafish* no estágio de desenvolvimento de uma célula receberam injeções de diferentes quantidades de morfolinós Txnip A (MO Txnip A: 5'-ACTCAACCATG AGGAACTCACCAGC-3'), Txnip B (MO Txnip B: 5'-ACTAAGCACCTAGAGATTTAGCATT-3') ou controle padrão (MO Controle: 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3') (0,5 - 4 ng) (Gene Tools). O RNA total de 20 larvas coletadas 48hpf foi isolado e utilizado para a síntese de cDNA (conforme descrito nas seções 2.3.3.1 e 2.3.3.2), visando à determinação da eficiência de inibição obtida. Para determinar a expressão gênica de *Txnip*, foi utilizada a técnica de PCR transcrição reversa (RT-PCR) com a enzima iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) e os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídeo. A quantificação por densitometria relativa foi realizada utilizando-se o *software* ImageJ 1.x. (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

2.3.10.2. Imunofluorescência confocal

Imunofluorescência foi realizada com embriões de *zebrafish* em diferentes estágios de desenvolvimento. Os embriões foram incubados por 1min em solução para permeabilização (PBSA e 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)) e lavados duas vezes com PBSA. Os embriões foram então fixados por 2h em solução de fixação (0,1M Pipes, 1,0mM MgSO₄, 2mM EGTA, 4% formaldeído (Sigma-Aldrich), pH 7). Em seguida, foram realizadas três lavagens com PBSA e o saco vitelino dos embriões foi removido com o auxílio de pinças. Os embriões foram então bloqueados com solução de 5% BSA em PBSA *overnight* a 4°C, sob agitação. Os

anticorpos primários foram diluídos de acordo com recomendações do fabricante e incubados overnight a 4°C sob agitação. Os embriões foram novamente lavados e incubados com anticorpos secundários fluorescentes adequados por 2h à temperatura ambiente. Os seguintes anticorpos foram utilizados: guinea pig anti-insulina (1:500; Biomeda), guinea pig anti-pdx1 (1:200), rabbit anti-prox-1 (1:200; Millipore), anticorpos secundários conjugados com fluoróforos Alexa e DAPI (Sigma-Aldrich). Os embriões foram novamente lavados, posicionados com o intestino voltado para cima e laminae foram montadas utilizando-se glicerol (Sigma-Aldrich). Embriões em diferentes estágios de desenvolvimento foram processados por microscopia confocal. Foram coletados Z-stacks (passos de 0,77µm; 400x aumento) dos pâncreas inteiros com fatias ópticas capturadas a uma profundidade focal de 1,6µm. As amostras foram analisadas em microscópio confocal Zeiss 710 (Zeiss) e as células foram contadas utilizando-se o *plugin counter* do programa ImageJ 1x.

2.3.10.3. Marcação celular com EdU

Embriões vivos foram incubados com 10mM 5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU, Invitrogen) por 30min, lavados com PBSA a 4°C e retornaram para condições padrão de desenvolvimento até 56hpf. Os embriões foram então fixados em solução de fixação (0,1M PIPES, 1.0mM MgSO₄, 2mM EGTA, 4% formaldeído (Sigma-Aldrich), pH 7). A detecção do EdU foi feita com o kit Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Imaging Kit (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante. Após o desenvolvimento da reação de detecção de EdU, os embriões foram incubados em solução de bloqueio e procedeu-se com o protocolo de imunofluorescência descrito no item 2.3.10.2.

2.3.10.4. Análise de expressão gênica

Da mesma forma descrita no tópico 2.3.3, o RNA total de 20 embriões por grupo foi extraído pelo método de Fenol-Clorofórmio e utilizado para a análise de expressão gênica utilizando-se os *primers* da Tabela 2.

Tabela 2: Sequência de primers utilizados

Gene	Sequência <i>forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
Ins	GGTCGTGTCCAGTGTAAGCA	GGAAGGAAACCCAGAAGGGG
MafA	CTCATCGAGCAGCGACAACA	CCCAAACCTCAGCAAGAACTGA
Pdx1	ACCATCTCCCATTTCGTGG	CTCGACCATATAAGGGCCTGTC

2.3.10.5. Obtenção de mutantes para o gene *Txnip*

Através do sistema CRISPR/Cas9 (Conjunto de Repetições Palindrômicas Regularmente Espaçadas, do inglês, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, associado à enzima Cas9) foram obtidas linhagens de *zebrafish* mutantes para o gene *Txnip*, seguindo protocolo publicado (JAO; WENTE; CHEN, 2013). Regiões genômicas alvo para a enzima Cas9, dentro da sequência do primeiro éxon de *Txnip A* e *Txnip B*, foram identificadas utilizando-se a ferramenta pública ZiFiT Targeter Version 4.2 (SANDER et al., 2007) (Tabela 3). Os *primers* complementares e reversos correspondentes aos RNAs guias (gRNAs) foram adquiridos como *primers* convencionais (Integrated DNA Technologies). Para preparar os gRNAs, cada par de *primer* foi anelado utilizando-se o termociclador (Applied Biosystems) e clonado em posição adjacente ao promotor T7 de RNA polimerase em vetor de expressão apropriado (pT7-gRNA vector, Addgene). Os gRNAs foram sintetizados utilizando-se o kit comercial MEGashortscript T7 Transcription Kit (Ambion), seguindo instruções do fabricante. Embriões de *zebrafish* no estágio de desenvolvimento de uma célula receberam injeções de 50pg de gRNA e 400pg de *S. pyogenes* pCas9 nuclease recombinante (*S.p.* Cas9 Nuclease 3NLS, Integrated DNA Technologies). A eficiência de mutagênese e os primeiros peixes *founders* (F0) foram identificados utilizando-se o ensaio *Surveyor* (Surveyor Mutation Detection Kits,

Integrated DNA Technologies), de acordo com instruções do fabricante. A digestão dos produtos foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 3%.

Tabela 3: Regiões genômicas alvo para a enzima Cas9, correspondentes à sequência do gRNA

Gene	Região Alvo 1	Região Alvo 2
Txnip A	CGATGACAAAAAGAGTGA	CTGGAAAGGTTTTGGTGG
Txnip B	CCGGGCGGGTGATCGTGG	AGGTGGCGGAGCTGCTGA

A genotipagem dos portadores de mutação na geração seguinte (F1) foi realizada por amplificação através de PCR da região alvo dos gRNAs e sequenciamento do produto de reação. O DNA genômico foi extraído por corte da nadadeira caudal e lise com Proteinase K (New England Biolabs) em tampão de lise (50mM KCl, 2,5mM MgCl₂, 10mM Tris-Cl pH 8,0, 4,5% NP-40, 4,5% Tween, 0,1% gelatina, 20µg/ml Proteinase K). O material obtido a partir da lise (10µL) foi utilizado em reações de PCR com os *primers* listados na Tabela 4. Os produtos de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 3% ou de poliacrilamina 15% para discriminar produtos de amplificação selvagem de produtos de amplificação mutados por CRISPR/Cas9. As reações de sequenciamento foram obtidas para amostras potencialmente positivas (Eton Bioscience).

Tabela 4: Sequência de primers utilizados

Gene	Sequência <i>forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
Txnip A	CGAGCCTGGAGTGTGTGATTA	GTCGGAGGTGACCAGAGTGA
Txnip B	AACGTAATGGTGAGCTTGTTC	GTCTCCGCCGTCAAAGTGT

2.3.11. Análise estatística

A significância das diferenças observadas nos dados experimentais foi avaliada através do programa Prism v6.01 (GraphPad). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0.05$. A barra de erro nos gráficos mostra o erro padrão da média (*standard error of the mean, SEM*).

2.4. Resultados

2.4.1. Seleção do gene *Txnip* para análise funcional

Em trabalho anterior, realizado pelo nosso grupo (SILVA, 2008), foi analisada a expressão diferencial de genes em células-tronco embrionárias murinas, as quais foram submetidas à diferenciação em células produtoras de insulina ou IPCs (*insulin producing cells*), com base no protocolo de LUMELSKY et al., 2001. Mais de 1.000 genes foram identificados como sendo regulados negativamente nas IPCs, quando comparadas com as mESCs indiferenciadas. Com o objetivo de analisar a rede de genes que dirige a diferenciação β -pancreática, pesquisaram-se referências dos 30 genes mais inibidos e, dentre os genes analisados, foi selecionado o gene *Txnip* como o candidato mais interessante para a condução de uma análise funcional. O gene *Txnip* foi o décimo terceiro gene mais reprimido durante a diferenciação β -pancreática (SILVA, 2008), sendo o primeiro da lista a ter função relacionada à sobrevivência de células- β pancreáticas descrita na literatura.

A diferenciação de mESC em IPCs foi realizada e imagens representativas de cada estágio do protocolo de diferenciação estão representados na Figura 9. mESC indiferenciadas proliferaram como colônias sobre uma camada de fibroblastos embrionários de camundongos (*mouse embryo fibroblastos*, MEF) inativados (Figura 9A). Essas colônias apresentaram características de culturas celulares pluripotentes, como refringência e contornos bem definidos. Estruturas esferóides chamadas de corpos embrióides (CEs), foram obtidas (Figura 9B), de forma a ativar a diferenciação mimetizando os estágios iniciais da embriogênese, e submetidos à seleção de células Nestina-positivas (Figura 9C). Após a expansão de progenitoras pancreáticas (Figura 9D), foi observada proliferação celular gerando agregados (Figura 9E). Ao final do protocolo de diferenciação, foi possível corar as IPCs obtidas com Ditizona (Figura 9F), um corante utilizado para determinar a pureza de

preparações de ilhotas pancreáticas humanas (RICORDI et al., 1990), uma vez que se coordena aos íons zinco necessários para a formação de hexâmeros de insulina dentro das células- β , marcando, portanto, as células- β insulina-positivas em vermelho.

Os níveis de insulina secretados pelas IPCs incubadas na presença de baixa concentração de glicose (2,8mM) foram quantificados e comparados com os níveis de insulina secretados pelas células MIN-6 incubadas nas mesmas condições. Apesar de serem capazes de secretar insulina, as IPCs o fazem em níveis mais baixos do que o controle positivo MIN-6 (Figura 9G). Para confirmar a inibição do gene *Txnip* ao longo do protocolo de diferenciação, foi realizada a análise de sua expressão através da técnica de qRT-PCR ao longo do protocolo de diferenciação. Observou-se que, ao longo do protocolo de diferenciação β -pancreática, ocorre a redução exponencial na expressão do gene *Txnip* (Figura 9H). No primeiro estágio do protocolo de diferenciação, a expressão do gene *Txnip* é 6.262 ± 0.779 vezes maior do que no último estágio do protocolo de diferenciação.

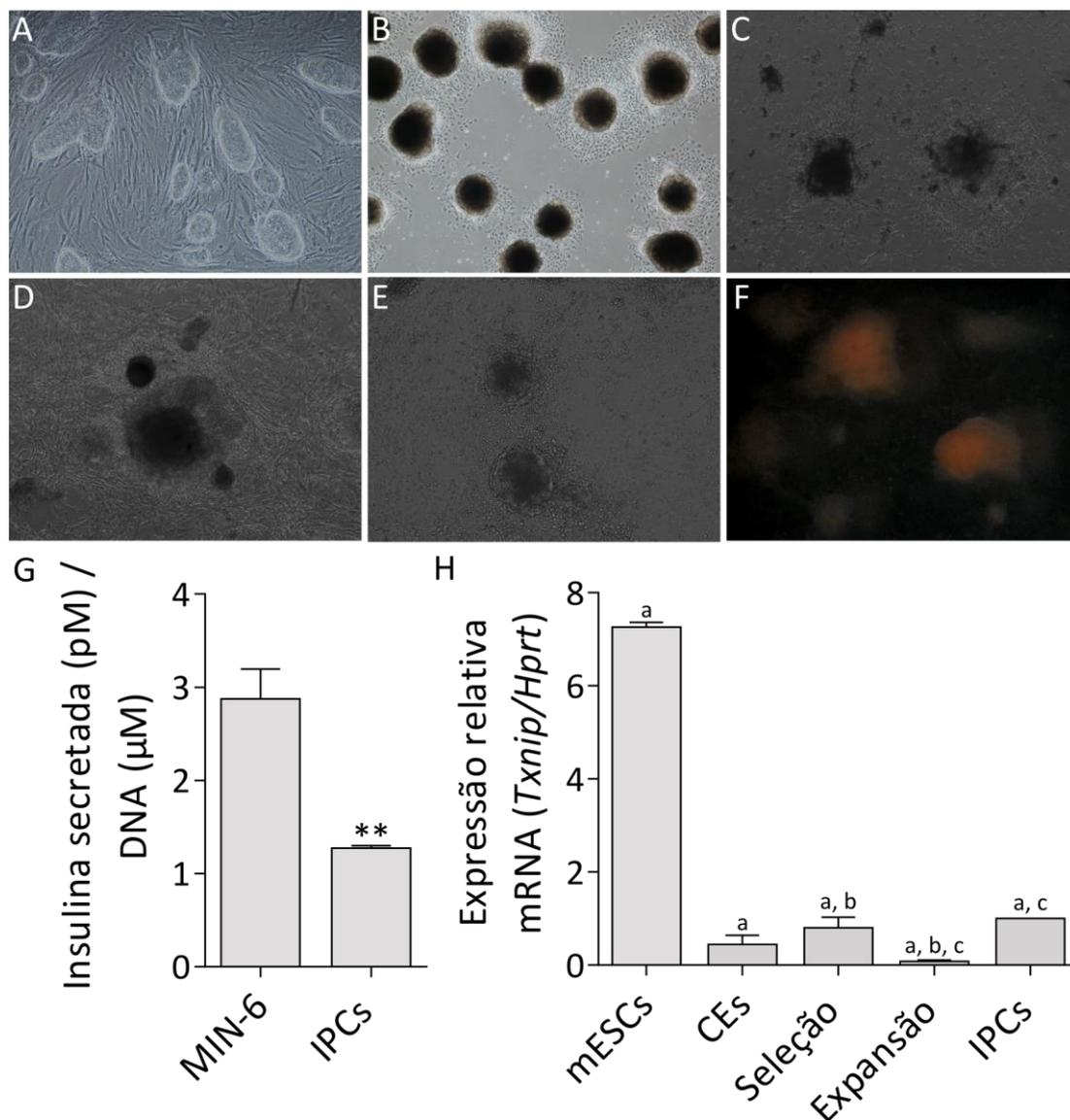


Figura 9: Diferenciação de mESCs em IPCs. (A-F) Imagens obtidas ao longo do protocolo de diferenciação: (A) Colônias de mESCs cultivadas sobre camada de fibroblastos embrionários murinos inativados; (B) Corpos Embrionários (CEs); (C) Seleção de células Nestina-positivas; (D) Expansão de células progenitoras pancreáticas; (E) IPCs e (F) IPCs coradas com Ditizona. Aumento de 100x. (G) Níveis de insulina secretados por IPCs e células MIN6 incubadas com a mesma concentração de glicose (2,8mM) (Teste t. ** = $p < 0,05$. $n = 3$). (H) Expressão do gene *Txnip* ao longo do protocolo de diferenciação. qRT-PCR. O gene *Hprt* foi utilizado como controle de expressão constitutiva (One-way ANOVA. a = mESCs contra outros estágios = $p < 0,001$ b = seleção contra expansão = $p < 0,05$ c = expansão contra IPCs = $p < 0,05$. $n = 3$).

2.4.2. Estudo funcional do gene *Txnip* em células β -pancreáticas murinas

Para realizar um estudo funcional do gene *Txnip* ao longo do protocolo de diferenciação β -pancreática em células produtoras de insulina, ferramentas foram

estabelecidas para inibir e superexpressar a expressão de *Txnip*. Essas ferramentas foram validadas na transdução de células β -pancreáticas murinas da linhagem MIN-6.

Para obter a inibição do gene *Txnip*, três partículas lentivirais foram obtidas e utilizadas em transduções independentes da linhagem MIN-6. Duas sequências de shRNA foram utilizadas para promover a inibição do gene *Txnip* (shRNA 1 e 2) e uma sequência *non-target* foi utilizada como controle negativo (shRNA NT). As imagens apresentadas na Figura 10A indicam que não houve variação no aspecto morfológico entre as linhagens geneticamente modificadas. Foi obtida redução significativa do gene *Txnip* para ambas as linhagens de MIN-6 geneticamente modificadas com as sequências de shRNA para inibição de *Txnip*, MIN-6 shRNA 1 e 2, em relação ao controle MIN-6 shRNA NT (Figura 10B). Quanto à funcionalidade celular, utilizando um marcador fluorescente (NewPort Green[®]) capaz de quelar íons zinco, que são fundamentais para a estrutura quaternária da insulina, foi possível verificar que a inibição de *Txnip* aumenta os índices de produção de insulina pelas células β -pancreáticas (Figura 10C).

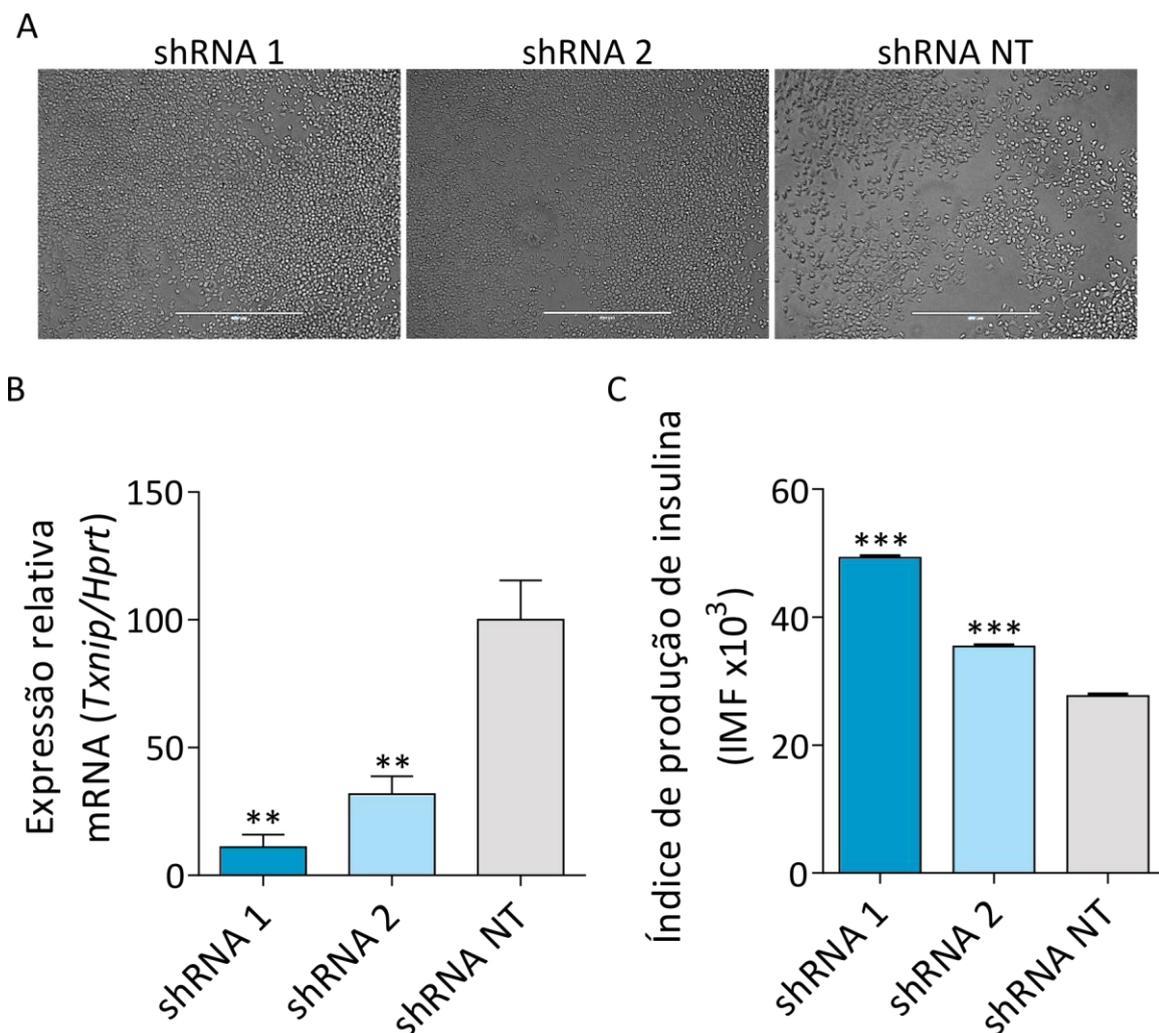


Figura 10: Inibição do gene *Txnip* em células MIN6. (A) Imagens das linhagens geradas a partir de células MIN6 geneticamente modificadas para perda de expressão do gene *Txnip*, MIN6 shRNA 1 e shRNA 2, e respectivo controle, MIN6 shRNA NT. Aumento de 40x. (B) Análise por qRT-PCR dos níveis de expressão do gene *Txnip* nas linhagens de MIN6 geneticamente modificadas. O gene *Hprt* foi utilizado como controle de expressão constitutiva (One-way ANOVA. ** = $p < 0,01$. $n = 3$). (C) Índice de produção de insulina determinado com o marcador Newport Green e detecção por citometria de fluxo. Resultados representados por intensidade média de fluorescência (IMF) (One-way ANOVA. *** = $p < 0,001$. $n = 3$).

A inibição do gene *Txnip* levou à alteração do perfil de proliferação e diminuição do tempo de dobramento celular (Figura 11A e B). Foi realizado um ensaio de indução de apoptose para verificar se a inibição da expressão de *Txnip* é capaz de modular a resposta celular ao tratamento com um coquetel de citocinas. As citocinas inflamatórias $Il-1\beta$, $lfn-\gamma$ e $Tnf-\alpha$ estão relacionadas com perda de viabilidade pós-implante de ilhotas pancreáticas e com a reação imune decorrente do efeito citotóxico direto de Estreptozotocina sobre

células- β (BASTA et al., 2004; O'BRIEN et al., 1996; VOS et al., 2003). Apesar do tratamento com citocinas induzir a morte celular, não foi observada redução nos níveis de apoptose (Figura 11C) e de necrose (Figura 11D) após tratamento das linhagens geneticamente modificadas com o coquetel de citocinas, portanto, a inibição de *Txnip* não foi capaz de proteger as células β -pancreáticas do estímulo de morte.

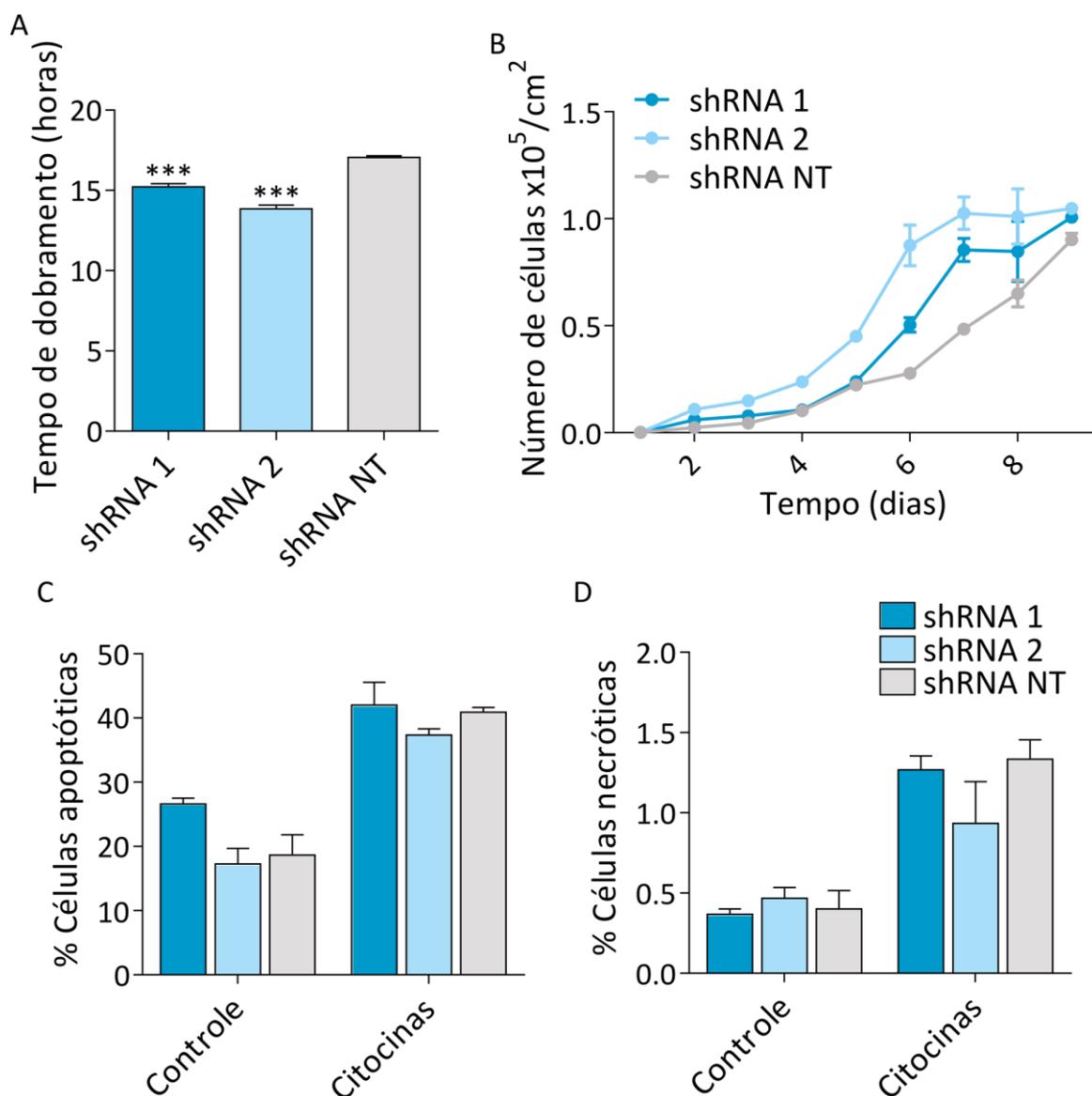


Figura 11: Análise das linhagens MIN6 geneticamente modificadas para inibição da expressão do gene *Txnip*. (A-B) Ensaio de crescimento celular. (A) Tempo de dobramento das linhagens geneticamente modificadas (One-way ANOVA. *** = $p < 0,001$. $n = 3$), referente à curva de crescimento representada em (B). (C-D) Ensaio de morte celular induzida por tratamento com coquetel de citocinas, marcação com Anexina V e iodeto de propídeo e detecção por citometria de fluxo. (C) Percentual de células apoptóticas. (D) Percentual de células necróticas. (Two-way ANOVA. Diferenças estatisticamente não significativas $n=3$).

A superexpressão do gene *Txnip* não gerou alterações morfológicas na linhagem de MIN-6 (Figura 12A) e atingiu $3,28 \pm 0,06$ vezes o nível de expressão da linhagem controle (Figura 12B). Não houve variação nos índices de produção de insulina pelas células geneticamente modificadas com aumento da expressão de *Txnip* (Figura 12C).

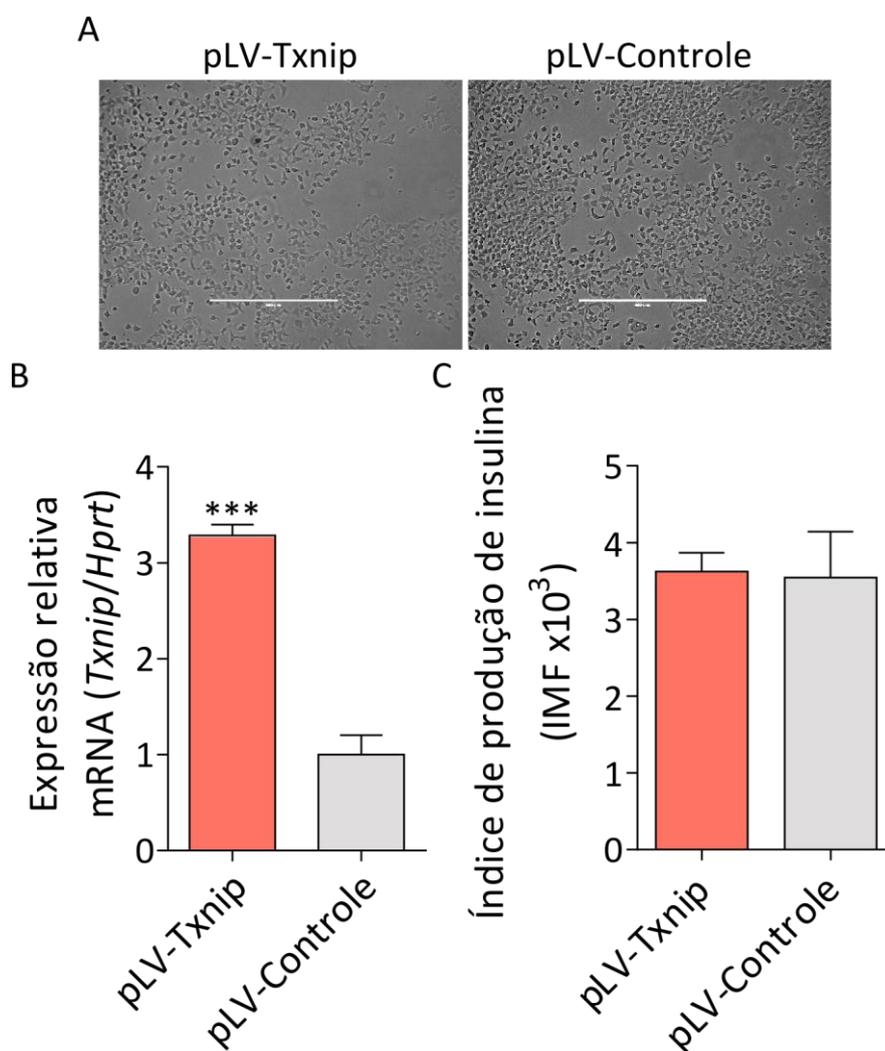


Figura 12: Superexpressão do gene *Txnip* em células MIN6. (A) Imagens das linhagens de MIN6 geneticamente modificadas para aumento de expressão do gene *Txnip*, MIN6 pLV-*Txnip*, e respectivo controle, MIN6 pLV-Controle. Aumento de 40x. (B) Análise por qRT-PCR dos níveis de expressão do gene *Txnip* nas linhagens de MIN6 geneticamente modificadas. O gene *Hprt* foi utilizado como controle de expressão constitutiva (Teste t. *** = $p < 0,001$. $n = 3$). (C) Índice de produção de insulina determinado com o marcador Newport Green e detecção por citometria de fluxo. Resultados representados por intensidade média de fluorescência (IMF) (Teste t. Diferenças estatisticamente não-significativas. $n=3$).

O aumento na expressão de *Txnip* levou à variação do perfil de proliferação e ao aumento do tempo de dobramento celular (Figura 13A e B). Através da análise de morte

celular, foi possível observar que a linhagem superexpressando *Txnip* já apresenta níveis elevados de apoptose (Figura 13C) e de necrose (Figura 13D), mesmo na ausência do tratamento com citocinas.

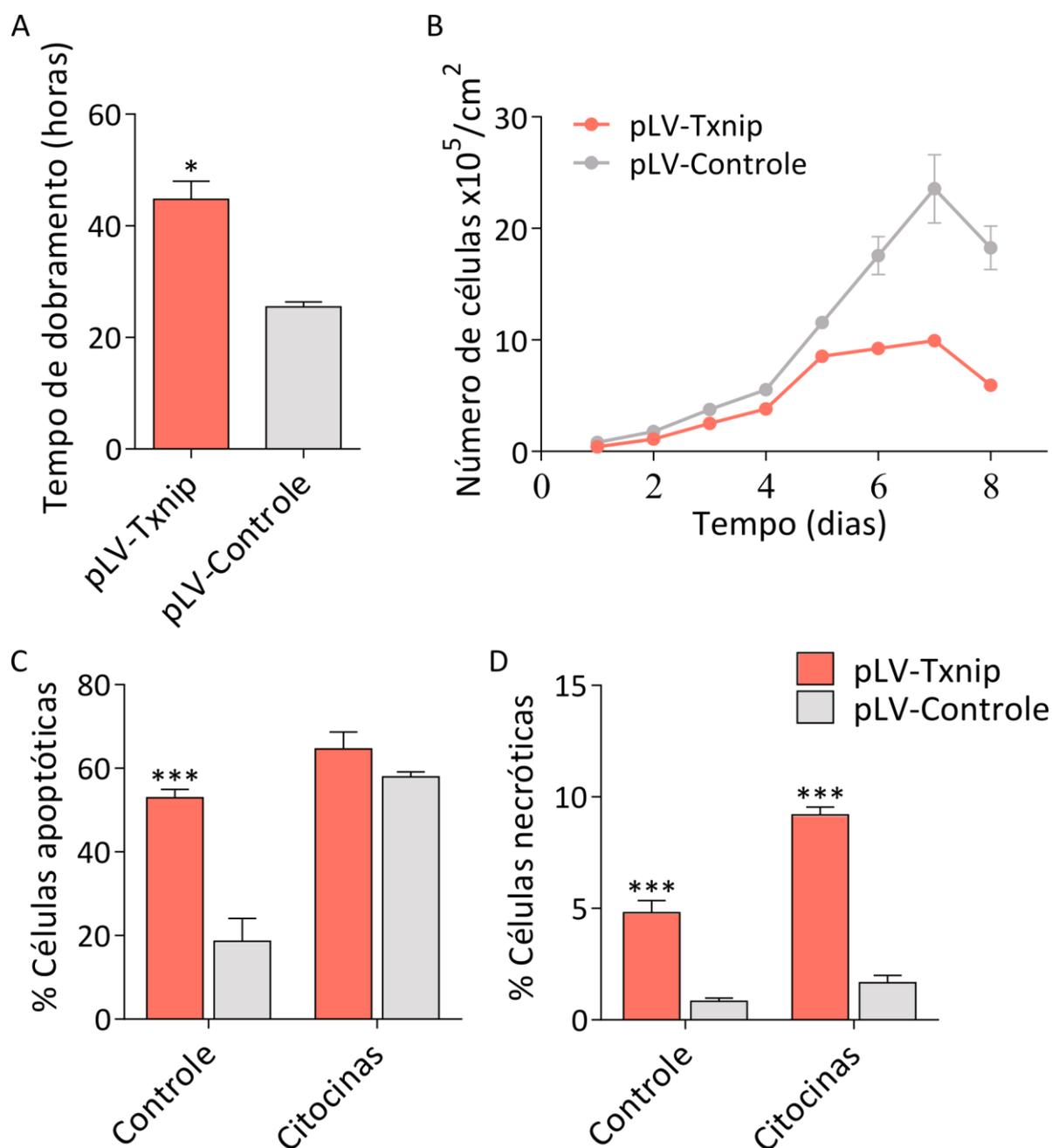


Figura 13: Análise das linhagens MIN6 geneticamente modificadas para aumento de expressão do gene *Txnip*. (A-B) Ensaio de crescimento celular. (A) Tempo de dobramento das linhagens geneticamente modificadas (Test t. * = $p < 0,05$, $n = 3$), referente à curva de crescimento representada em (B). (C-D) Ensaio de morte celular induzida por tratamento com coquetel de citocinas, marcação com Anexina V e iodeto de propídio e detecção por citometria de fluxo. (C) Percentual de células apoptóticas. (D) Percentual de células necróticas. (Two-way ANOVA. *** = $p < 0,001$, $n = 3$).

2.4.3. Diferenciação de mESC deficientes na expressão de *Txnip*

Para permitir a análise da função do gene *Txnip* ao longo da diferenciação β -pancreática, o gene foi inibido, de maneira estável, em linhagens de mESCs geneticamente modificadas. As mesmas partículas lentivirais avaliadas na linhagem MIN-6 foram utilizadas na transdução da linhagem de mESCs USP4, gerando as linhagens USP4 shRNA 1, 2 e NT (Figura 14A). A expressão de *Txnip* nas linhagens geneticamente modificadas atingiu valores menores do que 15% da expressão apresentada pela linhagem controle USP4 shRNA NT ($5,721\% \pm 5,5$ para USP4 shRNA 1 e $14,17\% \pm 2,2$ para USP4 shRNA 2) (Figura 14B). Dessa forma, a inibição da expressão de *Txnip* levou à modulação dos níveis proteicos de *Txnip* (Figura 14C).

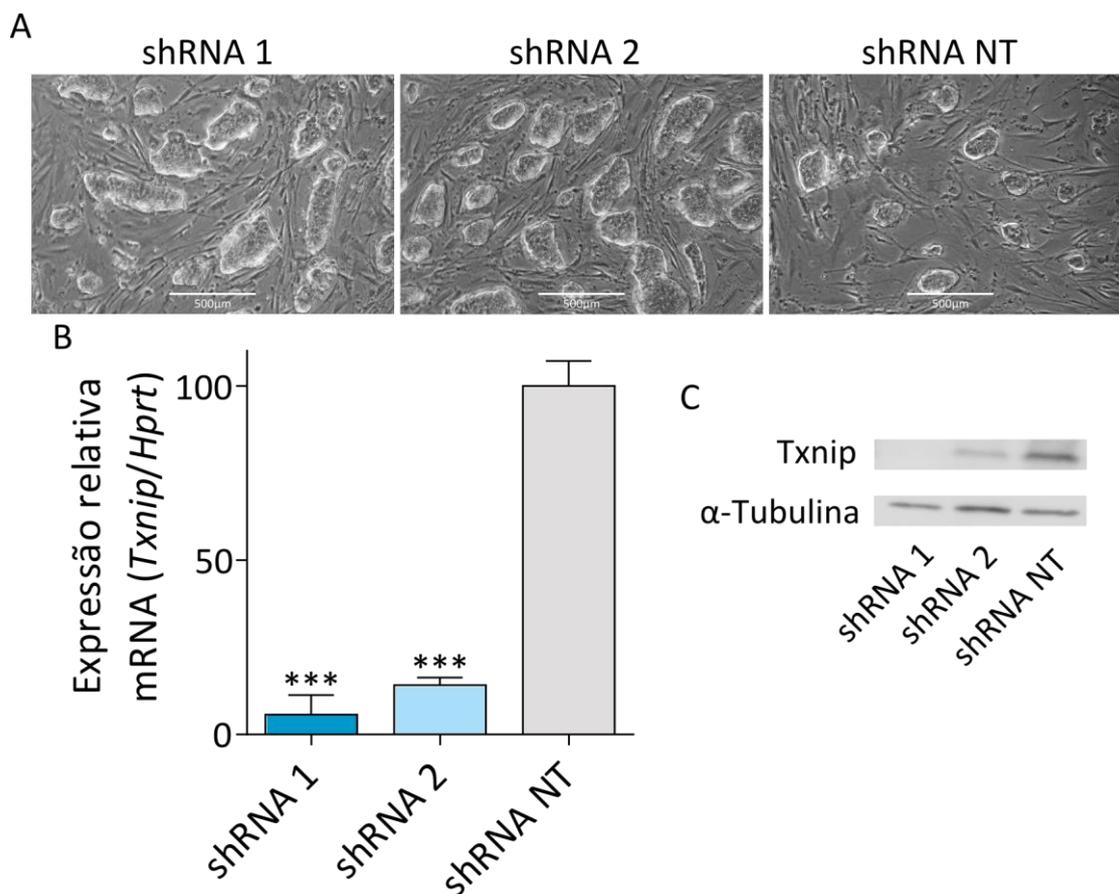


Figura 14: Inibição do gene *Txnip* em linhagens de mESCs. (A) Imagens das linhagens de mESCs geneticamente modificadas para diminuição da expressão do gene *Txnip*, mESCs shRNA 1 e shRNA 2, e respectivo controle, mESCs shRNA NT. Aumento de 100x. (B) Análise por qRT-PCR dos níveis de expressão do gene *Txnip* nas linhagens de mESCs geneticamente modificadas. O gene *Hprt* foi utilizado como controle de expressão constitutiva (One-way ANOVA. *** = $p < 0,001$. $n = 3$). (C) Análise por Western blot dos níveis proteicos de TXNIP. Alfa-Tubulina foi utilizada como controle endógeno de aplicação da amostra.

O protocolo de diferenciação foi reproduzido utilizando-se as linhagens de mESCs geneticamente modificadas pela inibição da expressão de *Txnip* (Figura 15). Assim como para as colônias de mESCs com inibição de *Txnip* (Figura 14A), os CEs obtidos apresentaram maior refringência, bordas bem definidas, com maior tamanho e forma circular bem definida. No estágio de seleção das células Nestina-positivas, a estrutura de CEs se manteve, uma clara evidência de maior número células progenitoras selecionadas neste estágio. Após um processo de dissociação celular, a proliferação celular durante o estágio de expansão gerou estruturas bem definidas as quais, no último estágio, geraram agregados celulares de IPCs.

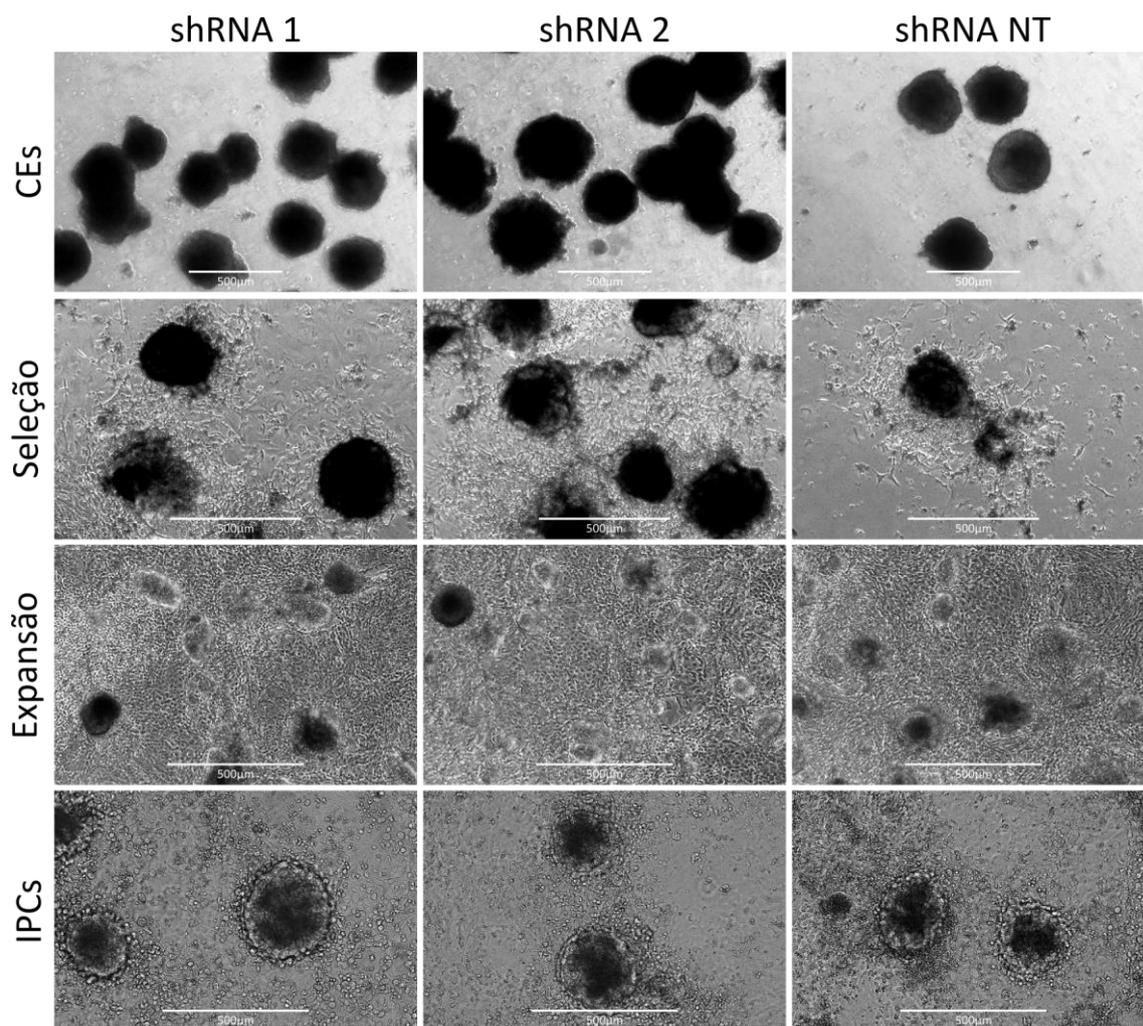


Figura 15: Imagens obtidas ao longo da diferenciação de linhagens de mESCs geneticamente modificadas para diminuição da expressão do gene *Txnip*. Aumento de 100x. Cada coluna representa uma linhagem celular diferente (mESCs shRNA 1, 2 ou NT) e cada linha representa um estágio diferente do protocolo de diferenciação β -pancreático (CEs, seleção de células Nestina-positivas, expansão de células progenitoras pancreáticas e IPCs).

Com a finalidade de caracterizar as células obtidas ao final do protocolo de diferenciação, foi avaliada a expressão de diferentes marcadores de diferenciação e de função β -pancreática. Conforme ilustrado na Figura 16A, a expressão do gene *Txnip* se manteve inibida ao longo do protocolo de diferenciação, mas, por outro lado, houve aumento nos níveis de expressão dos marcadores Insulina 1 (*Ins1*), Insulina 2 (*Ins2*), *MafA*, *Neurogenin-3* (*Ngn3*) e *Pancreatic and duodenal homeobox 1* (*Pdx1*). Corroborando esses resultados, houve aumento nos níveis proteicos de *Pdx1* e diminuição *Txnip* (Figura 16B).

Para determinar a capacidade das IPCs em secretar insulina de forma dependente de glicose, essas células foram avaliadas quanto à sua habilidade de secretar peptídeo-C em resposta a estímulos sequenciais de 1h com baixa (2,8mM) e alta (16,7mM) concentração de glicose. A curta duração da exposição à glicose é importante para que não ocorra indução da expressão de *Txnip* devido à metodologia, causando toxicidade celular (SHALEV et al., 2002). Peptídeo-C é um pequeno polipeptídeo que conecta as cadeias A e B da molécula de pro-insulina, sendo assim, a secreção de peptídeo-C é diretamente proporcional aos níveis de insulina secretados. A Figura 16C mostra a razão entre os níveis de peptídeo-C secretados em resposta ao estímulo de glicose (alta e baixa concentração), refletindo a responsividade de cada linhagem celular à glicose. Os resultados indicam que a inibição de *Txnip* aumenta a capacidade das IPCs de responder à glicose, sendo assim, frente ao estímulo de alta concentração de glicose, essas células foram capazes de responder apropriadamente e secretar mais insulina.

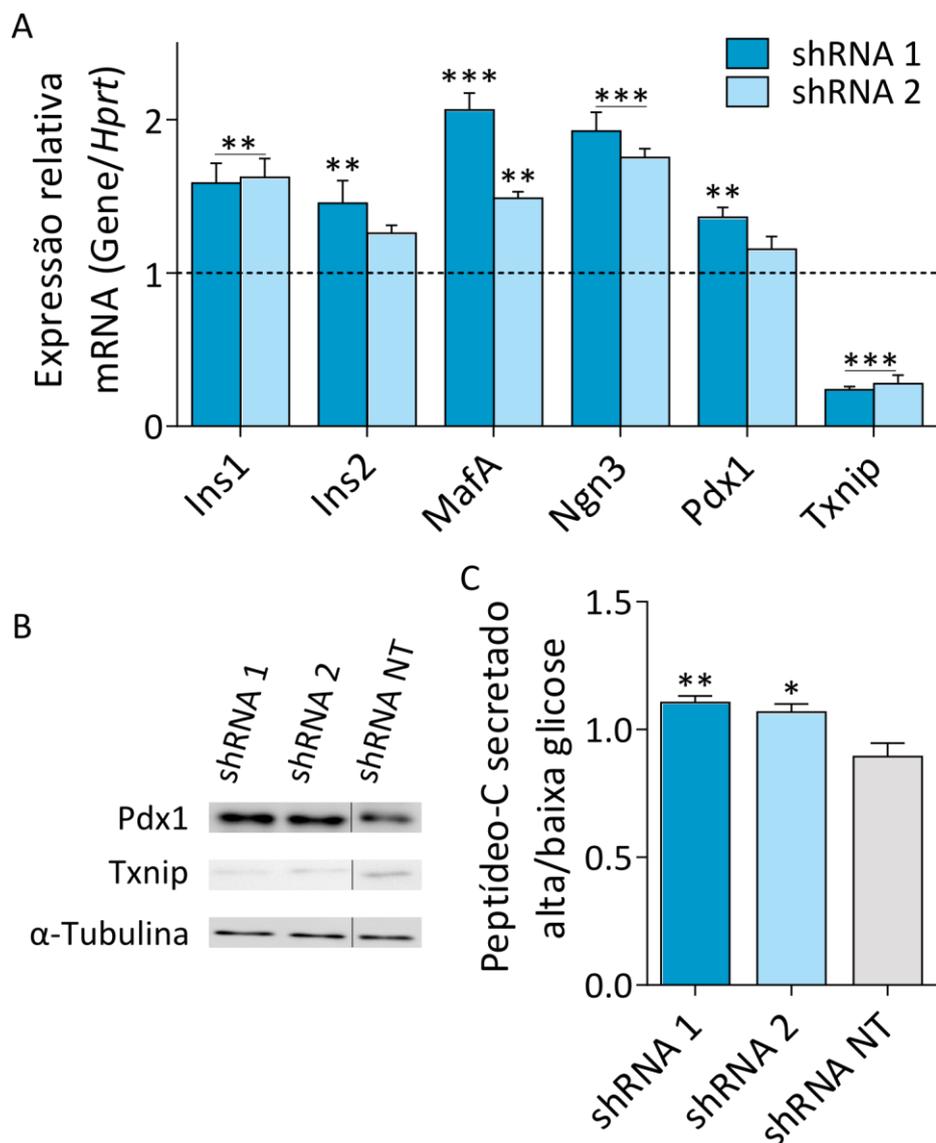


Figura 16: Análise funcional das IPCs obtidas a partir da diferenciação de linhagens mESCs geneticamente modificadas para diminuição da expressão do gene *Txnip*. (A) Análise por qRT-PCR dos níveis de expressão de marcadores genéticos associados com a diferenciação β -pancreática. O gene *Hprt* foi utilizado como controle de expressão constitutiva. A expressão gênica de cada linhagem foi normalizada em relação ao controle IPCs shRNA NT (linha tracejada). (One-way ANOVA. *** = $p < 0,001$. $n = 3$). (B) Análise por Western blot dos níveis proteicos de Txnip e Pdx1. Alfa-Tubulina foi utilizada como controle de aplicação da amostra. (C) Responsividade das IPCs geneticamente modificadas a diferentes concentrações de glicose. Razão entre os níveis de peptídeo-C secretado frente à alta/baixa concentração de glicose. Quantificação por ELISA (One-way ANOVA. ** = $p < 0,01$. * = $p < 0,05$. $n = 3$).

2.4.4. Diferenciação de mESC superexpressando *Txnip*

Utilizando as mesmas partículas lentivirais avaliadas na linhagem MIN-6, foi estabelecida uma linhagem de mESCs USP4 geneticamente modificada para superexpressar o gene *Txnip*, USP4 pLV-Txnip, e seu respectivo controle, USP4 pLV-Controle (Figura 17A). A

expressão de *Txnip* foi $4,55 \pm 0,902$ vezes maior na linhagem USP4 pLV-*Txnip* do que no controle (Figura 17B). Dessa forma, a superexpressão de *Txnip* levou à modulação dos níveis proteicos de *Txnip* (Figura 17C).

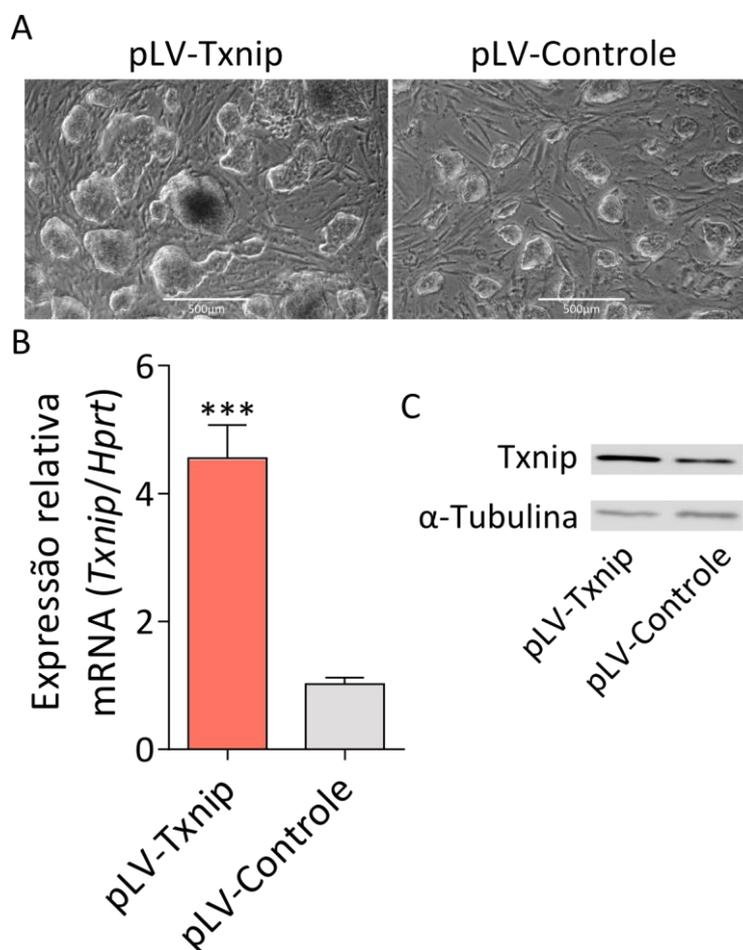


Figura 17: Superexpressão do gene *Txnip* em linhagens de mESCs. (A) Imagens das linhagens de mESCs geneticamente modificadas para aumento da expressão do gene *Txnip*, mESCs pLV-*Txnip*, e respectivo controle, mESCs pLV-Controle. Aumento de 100x. (B) Análise por qRT-PCR dos níveis de expressão do gene *Txnip* nas linhagens de mESCs geneticamente modificadas. O gene *Hprt* foi utilizado como controle de expressão constitutiva (Teste t. *** = $p < 0,001$. $n = 3$). (C) Análise por Western blot dos níveis proteicos de *TXNIP*. Alfa-Tubulina foi utilizada como controle de aplicação da amostra.

O protocolo de diferenciação foi reproduzido utilizando-se a linhagem de mESCs geneticamente modificada superexpressando *Txnip* (Figura 18). Alterações morfológicas já foram observadas nas colônias de mESCs com superexpressão de *Txnip* (Figura 17A), as quais eram menos definidas e com núcleos escuros. Os CEs obtidos não apresentaram bordas definidas e, no estágio de seleção das células Nestina-positivas, a estrutura de CEs foi

totalmente perdida, evidenciando-se um menor número de células progenitoras ao final desse estágio. Após o processo de dissociação celular, a proliferação celular no estágio de expansão não gerou estruturas definidas, sendo assim, no último estágio da diferenciação não foram obtidos agregados celulares de IPCs.

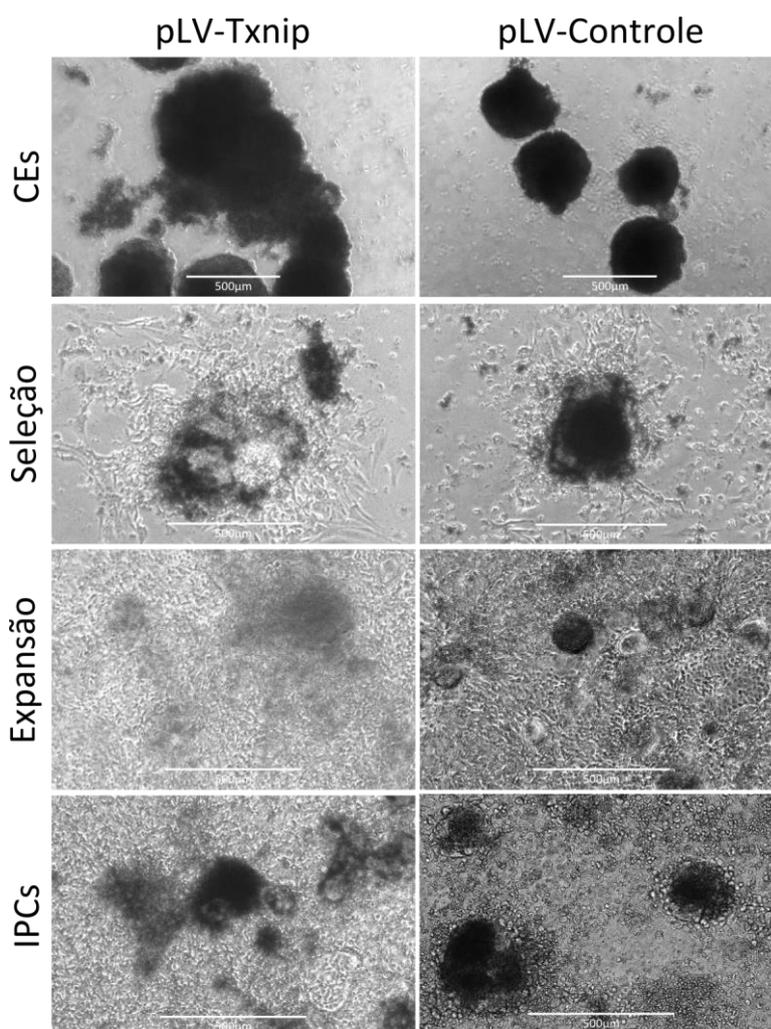


Figura 18: Imagens obtidas ao longo da diferenciação de linhagens de mESCs geneticamente modificadas para aumento da expressão do gene *Txnip*. Aumento de 100x. Cada coluna representa uma linhagem diferente (mESCs pLV-Txnip e pLV-Controle) e cada linha representa um estágio diferente do protocolo de diferenciação β -pancreático (CEs, seleção de células Nestina-positivas, expansão de células progenitoras pancreáticas e IPCs).

A expressão de diferentes marcadores de diferenciação e de função β -pancreática foi avaliada nas IPCs superexpressando *Txnip*. Conforme ilustrado na Figura 19A, a expressão do gene *Txnip* se manteve elevada ao longo do protocolo de diferenciação, porém, essa modulação de *Txnip* não resultou em variações estatisticamente significativas nos níveis de

expressão dos marcadores *Ins1*, *Ins2*, *MafA*, *Ngn3* e *Pdx1*. Da mesma forma, a superexpressão de *Txnip* não causou variações nos níveis proteicos de *Pdx1* (Figura 19B), nem na capacidade das IPCs de responder à glicose (Figura 19C).

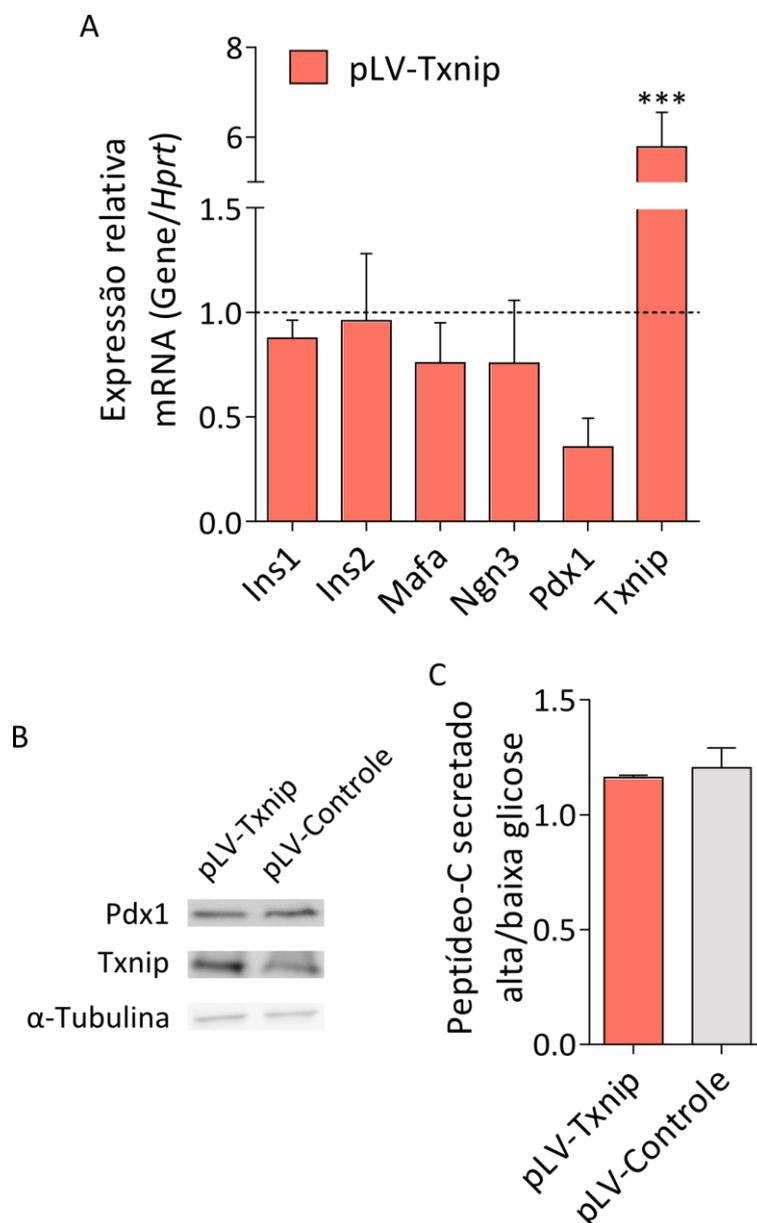


Figura 19: Análise funcional das IPCs obtidas a partir da diferenciação de linhagens mESCs geneticamente modificadas para aumento da expressão do gene *Txnip*. (A) Análise por qRT-PCR dos níveis de expressão de marcadores genéticos associados com a diferenciação β -pancreática. O gene *Hprt* foi utilizado como controle de expressão constitutiva. A expressão genética de cada linhagem foi normalizada em relação ao controle IPCs shRNA NT (linha tracejada). (Teste t. *** = $p < 0,001$. $n = 3$). (B) Análise por Western blot dos níveis proteicos de *Txnip* e *Pdx1*. Alfa-Tubulina foi utilizada como controle de aplicação da amostra. (C) Responsividade das IPCs geneticamente modificadas a diferentes concentrações de glicose. Razão entre os níveis de peptídeo-C secretado frente à alta/baixa concentração de glicose. Quantificação por ELISA (Teste t. Diferenças estatisticamente não significativas. $n = 3$).

2.4.5. Influência de *Txnip* no desenvolvimento pancreático de *zebrafish*

Para avaliar como a inibição do gene *Txnip* influencia a organogênese pancreática, o modelo animal de peixe paulistinha (*zebrafish*) foi utilizado. Amostras de RNA total de embriões de *zebrafish* em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletadas, tendo sido possível verificar que ambas as cópias de *Txnip* são expressas nos estágios em que ocorre o desenvolvimento pancreático (Figura 20).

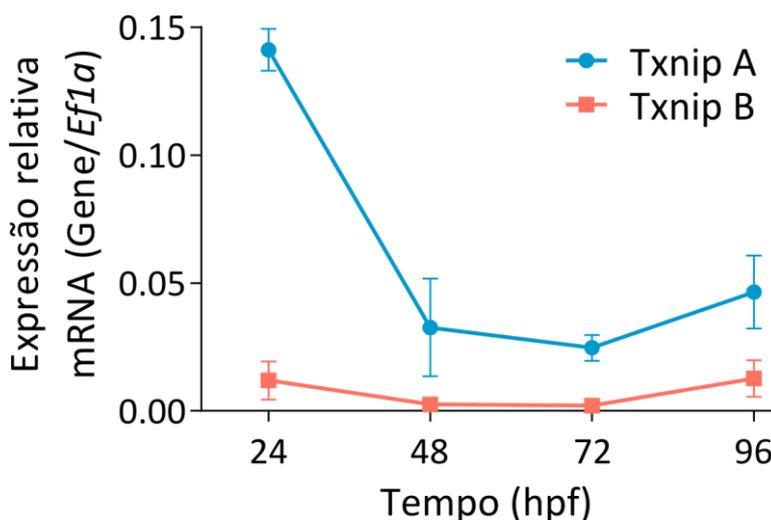


Figura 20: Análise por qRT-PCR da expressão das duas cópias do gene *Txnip*, *Txnip A* e *Txnip B*, durante o desenvolvimento de *zebrafish*. O gene *Ef1α* foi utilizado como controle de expressão constitutiva. n=3.

2.4.5.1. Inibição de *Txnip* em *zebrafish* utilizando morfolidos

Morpholidos são oligonucleotídeos utilizados para bloquear sequências específicas de RNA e, assim, obstruir/inibir processos celulares. Dessa forma, o uso de morfolidos permite bloquear a tradução, o *splicing*, a ação de micro-RNAs ou a atividade de ribozimas (SANDER et al., 2007). Neste projeto, foram obtidos morfolidos independentes para alterar o *splicing* do exon 3 de cada cópia de *Txnip* (Figura 21A). Após a injeção dos morfolidos, a eficiência de inibição foi avaliada (Figura 21B), verificando-se que o produto de PCR referente à banda selvagem de *Txnip* teve sua intensidade significativamente diminuída para ambos os mRNAs (68%±0.13 e 65%±0.065 redução para *Txnip A* e *B*, respectivamente) (Figura 21C).

Entretanto, os produtos de amplificação favorecidos não correspondem à forma truncada de *Txnip* predita. Não foram observados produtos de amplificação menores, devido à perda do éxon 3, mas, sim, produtos de amplificação alternativos maiores. Após sequenciar os produtos de amplificação alternativos, concluímos que o bloqueio do terceiro sítio de *splicing* favoreceu sítios de *splicing* alternativos e a inclusão de sequências intrônicas, levando a produtos de amplificação maiores (Figura 21D). Para ambos os mRNAs, um códon de parada é introduzido nas sequências de mRNAs truncados, o que resultará em perda da expressão proteica. As concentrações de morfolinós injetadas foram otimizadas para reduzir a expressão gênica sem alterar a morfologia geral dos embriões (Figura 21E).

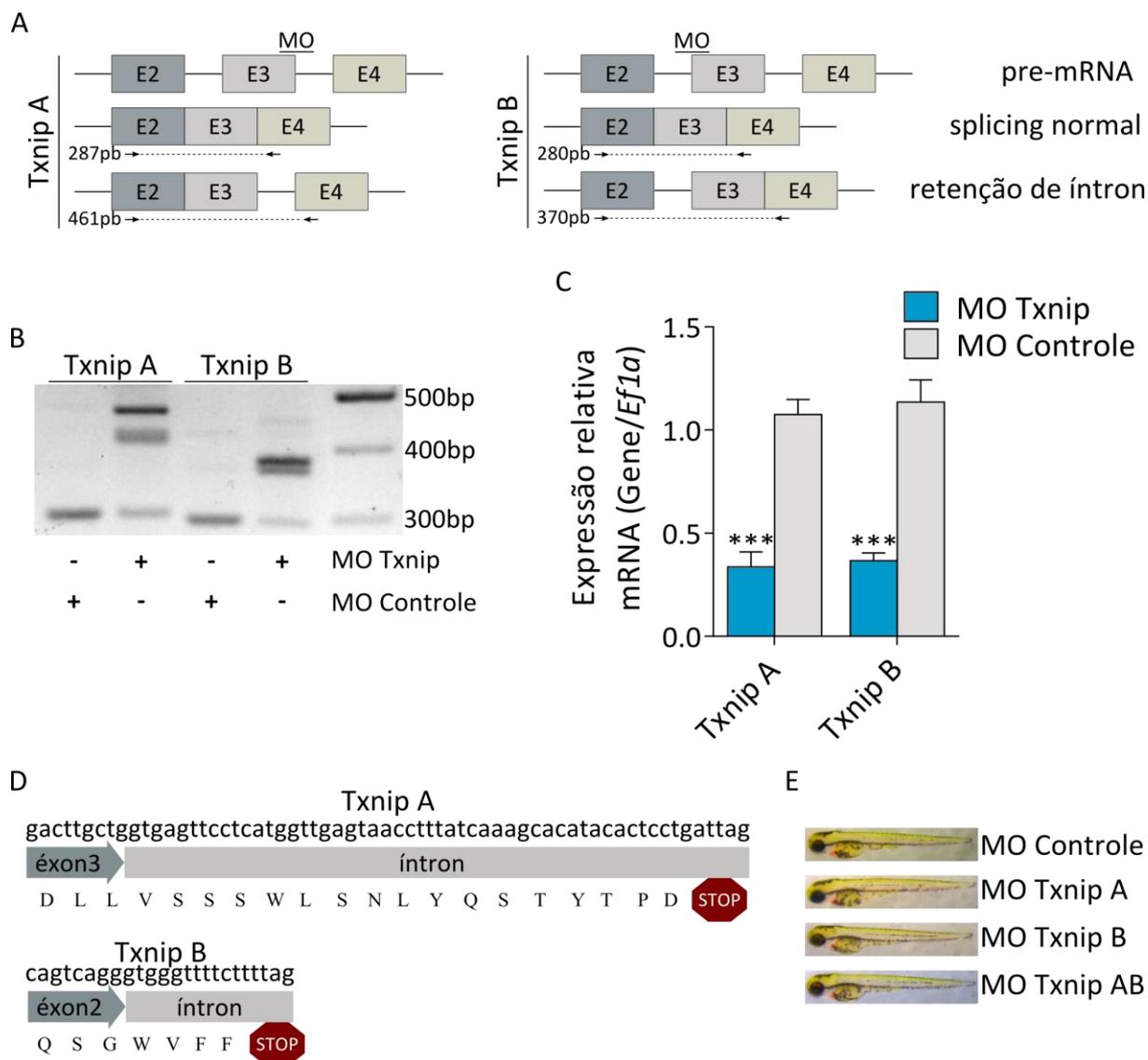


Figura 21: Inibição das duas cópias do gene *Txnip* em zebrafish utilizando a injeção de morfolinos em embriões. (A) Diagrama dos transcritos de *Txnip* representando a posição alvo dos morfolinos (MO), dos primers utilizados na validação por RT-PCR (setas) e os produtos de amplificação (linhas tracejadas). Os morfolinos foram desenhados para bloquear sítios de splicing nos limites entre éxon/íntron, causando falha no processo de splicing (inclusão de íntron) e tradução de sequências intrônicas. (B) Análise da eficiência de inibição por RT-PCR (com primers indicados em A) e visualização dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose 3%. É possível identificar os produtos para os transcritos truncados (MO Txnip A: 461bp; MO Txnip B: 370bp) e o produto de PCR menor correspondente aos transcritos resultantes de splicing normal (Txnip A: 287bp; Txnip B: 280bp). (C) A quantificação da expressão relativa de *Txnip A* e de *Txnip B* foi determinada por densitometria dos produtos de RT-PCR. O gene *Ef1 α* foi utilizado como controle de expressão constitutiva (Teste t. *** = $p < 0,001$. $n = 3$). (D) O sequenciamento dos transcritos gerados com o uso de morfolinos confirma a presença de sequências intrônicas e consequente inclusão de códons de parada prematuros na sequência proteica correspondente. (E) A injeção de morfolinos não causa variação morfológica geral dos embriões de *zebrafish*. Aumento de 10x.

2.4.5.2. Inibição de *Txnip* influencia o desenvolvimento do pâncreas endócrino

Embriões da linhagem repórter Tg(NeuroD:EGFP) foram injetados com morfolidos e se desenvolveram até 72hpf. O fator de transcrição *NeuroD* é um dos primeiros reguladores da especificação do pâncreas endócrino, sendo detectado em células precursoras endócrinas em 14hpf (KORZH et al., 1998). A quantidade de células EGFP positivas no pâncreas de cada morfante foi analisada por microscopia confocal e, conforme ilustrado na Figura 22A, houve um aumento na massa de células endócrinas detectadas nos morfantes injetados com MO *Txnip* A e MO *Txnip* B, em relação ao MO Controle. Foi possível quantificar esse aumento de células endócrinas quando cada gene foi inibido (Figura 22B). Além disso, a injeção de ambos os morfolidos, MO *Txnip* A e MO *Txnip* B, acentuou o aumento de células endócrinas. Por essa razão, optamos por conduzir os ensaios seguintes com morfantes duplos (morfantes injetados com MO *Txnip* A e MO *Txnip* B, referido como MO *Txnip* AB).

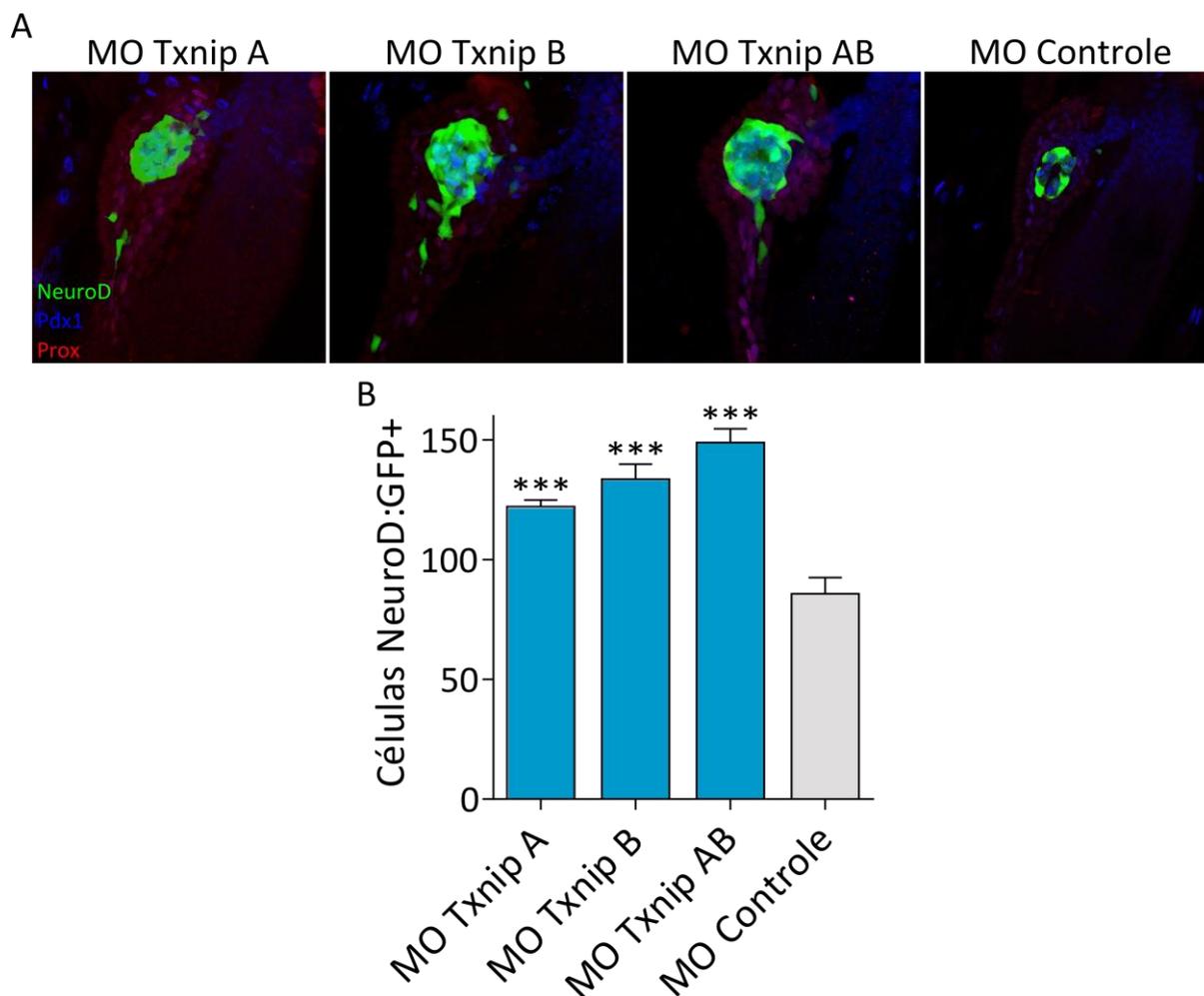


Figura 22: Avaliação das células endócrinas de embriões Tg(NeuroD:EGFP) morfantes de *zebrafish* com 72hpf. (A) Imagens z-stack confocal dos pâncreas morfantes. Além do repórter NeuroD:EGFP (verde), as amostras foram marcadas para Pdx1 (azul) e Prox (vermelho). (B) As células EGFP-positivas expressando *NeuroD* foram contadas (One-way ANOVA. *** = $p < 0,001$, $n = 10$).

Visando determinar em qual período do desenvolvimento pancreático a inibição de *Txnip* leva ao aumento de células endócrinas e se esse aumento se sustenta ao longo do desenvolvimento pancreático, uma análise da linhagem repórter Tg(NeuroD:EGFP) ao longo do tempo foi conduzida. O tecido pancreático de morfantes em diferentes estágios de desenvolvimento foi analisado por microscopia confocal (Figura 23A). Conforme ilustrado na Figura 23B, a população de células endócrinas EGFP-positivas expressando *NeuroD* se mantém similar em morfantes MO Controle e MO Txnip AB em 24hpf. Já em 48hpf há um pequeno aumento da população endócrina nos morfantes MO Txnip AB. A diferença entre

morfantes MO Txnip AB e MO Controle se acentua em 72hpf e permanece estável até 96hpf. A observação de células EGFP-positivas expressando *NeuroD* ao longo do pâncreas ventral e associadas ao ducto extra-pancreático (setas amarelas, Figura 23A) sugere que a inibição de *Txnip* induz a diferenciação endócrina fora da ilhota principal (círculos amarelos, Figura 23A).

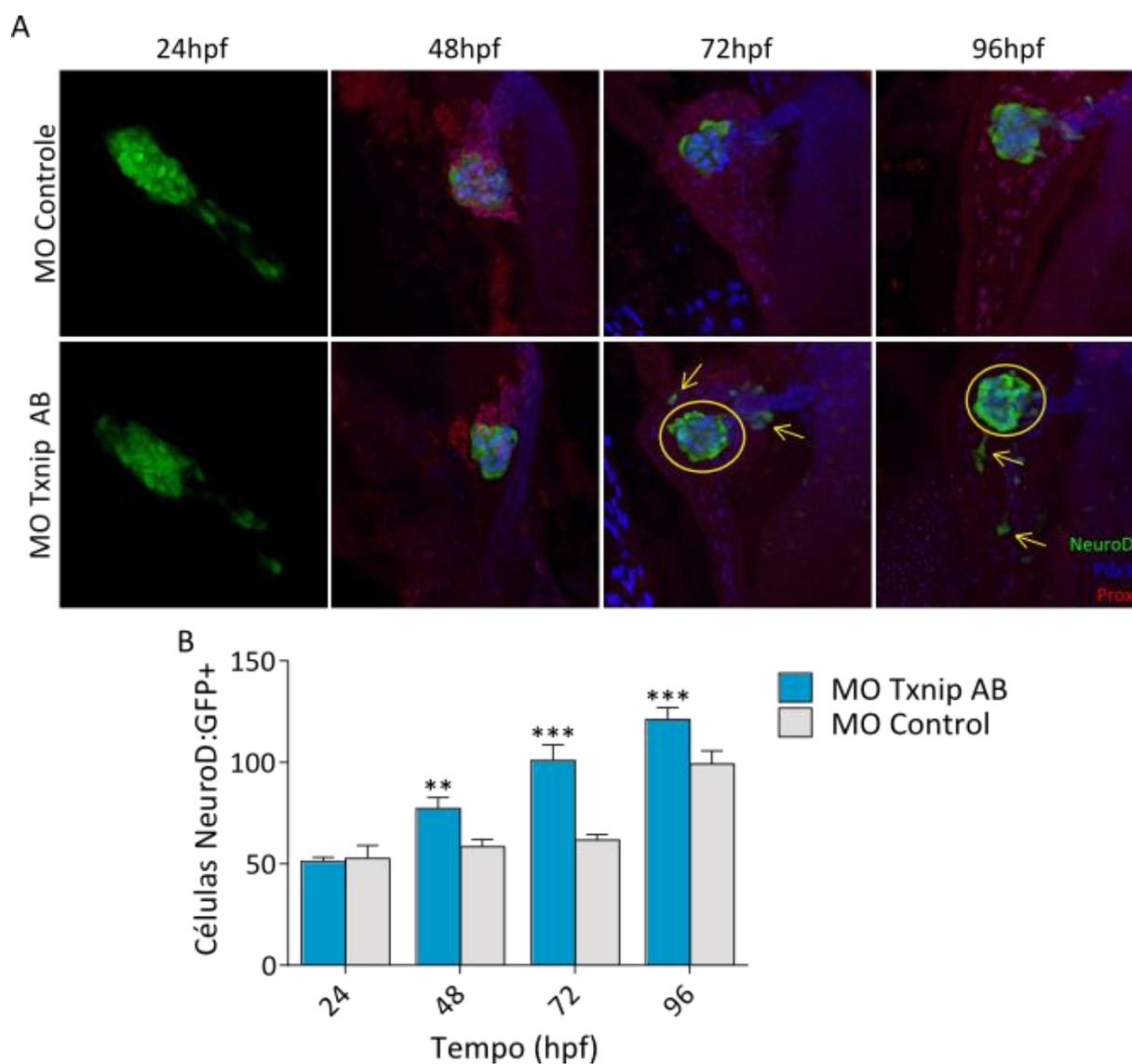


Figura 23: Avaliação das células endócrinas de embriões Tg(*NeuroD*:EGFP) morfantes de *zebrafish* ao longo do período de desenvolvimento pancreático. (A) Imagens z-stack confocal dos pâncreas morfantes em diferentes pontos de desenvolvimento. Além do repórter *NeuroD*:EGFP (verde), as amostras foram marcadas para *Pdx1* (azul) e *Prox* (vermelho). Círculos amarelos destacam a ilhota principal. Setas amarelas apontam para células endócrinas fora da ilhota principal. (B) As células EGFP-positivas expressando *NeuroD* foram contadas (One-way ANOVA. ** = $p < 0,01$ *** = $p < 0,001$. $n = 15$).

2.4.5.3. Células endócrinas pancreáticas induzidas pela inibição de *Txnip*

Para caracterizar as novas células endócrinas pancreáticas estimuladas pela inibição de *Txnip*, embriões da linhagem repórter Tg(insulin:dsRed; glucagon:EGFP) foram injetados com MO *Txnip* AB ou MO Controle e se desenvolveram até 72hpf. As amostras foram analisadas por microscopia confocal (Figura 24A). A Figura 24B mostra que a inibição de *Txnip* induz um número maior de células produtoras de insulina, entretanto, conforme ilustrado na Figura 24C, não houve variação na quantidade de células produtoras de glucagon entre os morfantes MO *Txnip* AB e MO Controle. Esse resultado sugere que, entre a população de células endócrinas induzidas pela inibição de *Txnip*, existe uma diferenciação preferencial em direção às células β -pancreáticas.

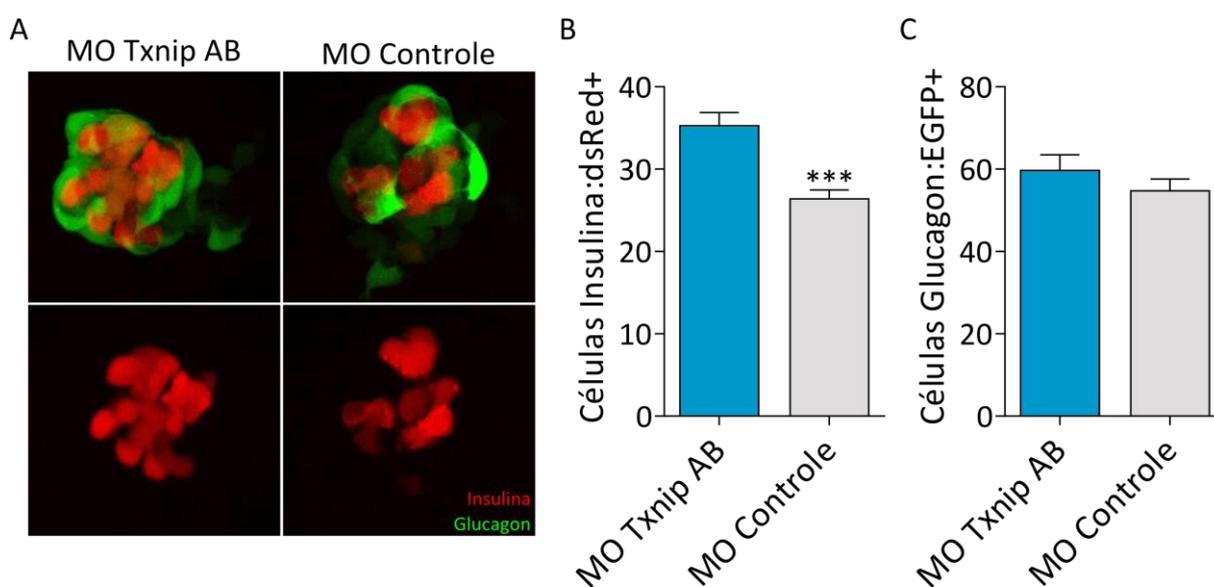


Figura 24: Caracterização das células endócrinas de *zebrafish* morfantes utilizando a linhagem Tg(insulin:dsRed; glucagon:EGFP). (A) Imagens z-stack confocal dos pâncreas morfantes. Dois repórteres são visualizados, Insulina:dsRed (vermelho) e Glucagon:EGFP (verde). (B) Contagem das células dsRed-positivas expressando insulina (Test t. *** = $p < 0,001$. $n = 15$). (C) Contagem das células EGFP-positivas expressando glucagon (Test t. Diferenças estatisticamente não significativas. $n = 15$).

2.4.5.4. Células progenitoras estimuladas pela inibição de *Txnip*

Inicialmente, para determinar a origem das células progenitoras endócrinas estimuladas pela inibição de *Txnip* a se diferenciarem em células produtoras de insulina e para descartar a possibilidade de proliferação celular dentro da ilhota principal ser a origem destas células, um ensaio de incorporação de EdU foi realizado. EdU é um análogo de timidina que pode ser incorporado durante a síntese de DNA. O ensaio de incorporação de EdU é um método que permite determinar, diretamente, a síntese de DNA e, indiretamente, a proliferação celular. Para avaliar o período de tempo durante o qual ocorre o maior aumento de células endócrinas, morfantes Tg(NeuroD:eGFP) foram desenvolvidos até 50hpf, incubados com EdU e desenvolvidos até 56hpf. Os pâncreas dos morfantes foram então analisados (Figura 25A) e o número de células duplamente marcadas, EGFP-positivas expressando NeuroD/EdU-positivas, foi contado. Conforme ilustrado na Figura 25B, a inibição de *Txnip* não causa variações na proliferação celular que ocorre dentro da ilhota principal.

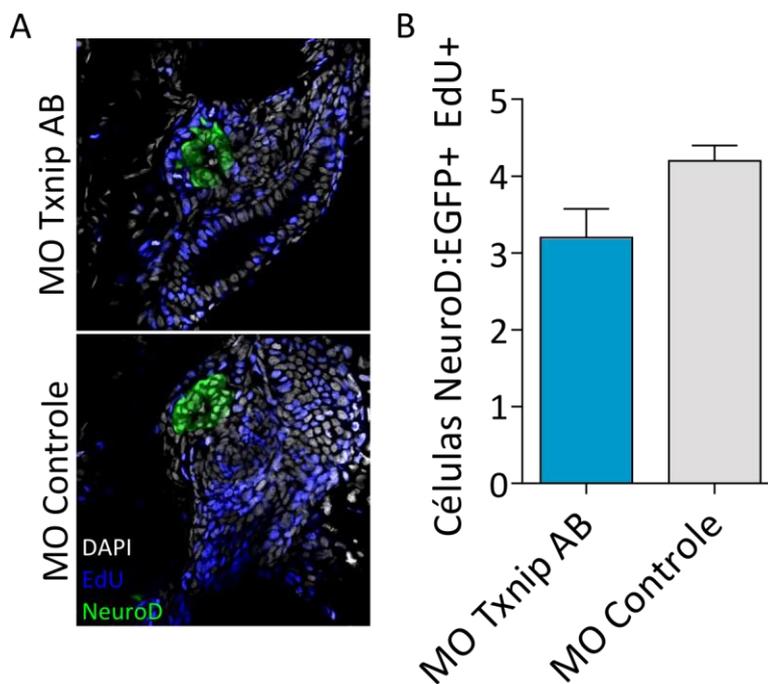


Figura 25: Avaliação da proliferação celular através de ensaio de incorporação de EdU em morfantes Tg(NeuroD:EGFP) com 56hpf. (A) Imagens z-stack confocal dos pâncreas morfantes. Além do repórter NeuroD:EGFP (verde), as amostras foram marcadas para a incorporação de EdU (azul) e os núcleos celulares com DAPI (branco). (B) As células duplamente positivas para NeuroD:EGFP e EdU foram contadas (Test t. Diferenças estatisticamente não significativas. n = 5).

Para determinar se o ducto intra-pancreático é a fonte de progenitoras endócrinas estimuladas pela inibição de *Txnip*, a integridade do ducto intra-pancreático foi avaliada. Um elemento responsivo a Notch, o promotor do gene *Epstein Barr Virus terminal protein 1* (*Tp1*) foi utilizado na linhagem repórter Tg(*Tp1*:EGFP) (PARSONS et al., 2009). O pâncreas dos morfantes Tg(*Tp1*:EGFP) com 72hpf foi analisado, não tendo sido possível capturar qualquer mudança morfológica ou perda de integridade intra-pancreática entre as amostras (Figura 26).

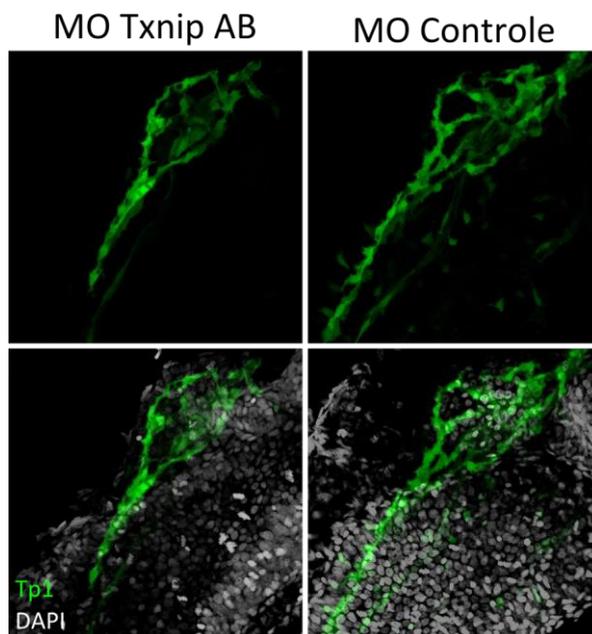


Figura 26: Avaliação das células progenitoras influenciadas pela inibição de *Txnip*. Análise da estrutura dos ductos intra-pancreáticos de morfantes Tg(Tp1:EGFP). Imagens z-stack confocal dos pâncreas morfantes. Além do repórter Tp1:EGFP (verde), os núcleos celulares foram marcados com DAPI (branco).

Para analisar o efeito da inibição de *Txnip* sobre as células progenitoras endócrinas presentes no ducto extra-pancreático, morfantes da linhagem Tg(Nkx2.2aD:eGFP) foram avaliados. A linhagem repórter Tg(Nkx2.2aD:eGFP) expressa EGFP sob o controle de um fragmento do promotor de Nkx2.2a, o qual contém elementos regulatórios necessários para a expressão de Nkx2.2a em células precursoras endócrinas, assim como em células diferenciadas do ducto pancreático, porém, o fragmento do promotor é silencioso em células diferenciadas da ilhota principal (PAULS et al., 2007). Conforme ilustrado na Figura 27, morfantes MO *Txnip* AB apresentam um número significativamente maior de células do ducto extra-pancreático duplamente marcadas, sendo EGFP-positivas, expressando Nkx2.2a, e insulina-positivas. Esse resultado sugere que o ducto extra-pancreático contém células progenitoras que podem ser estimuladas pela inibição de *Txnip* a se diferenciarem em células endócrinas.

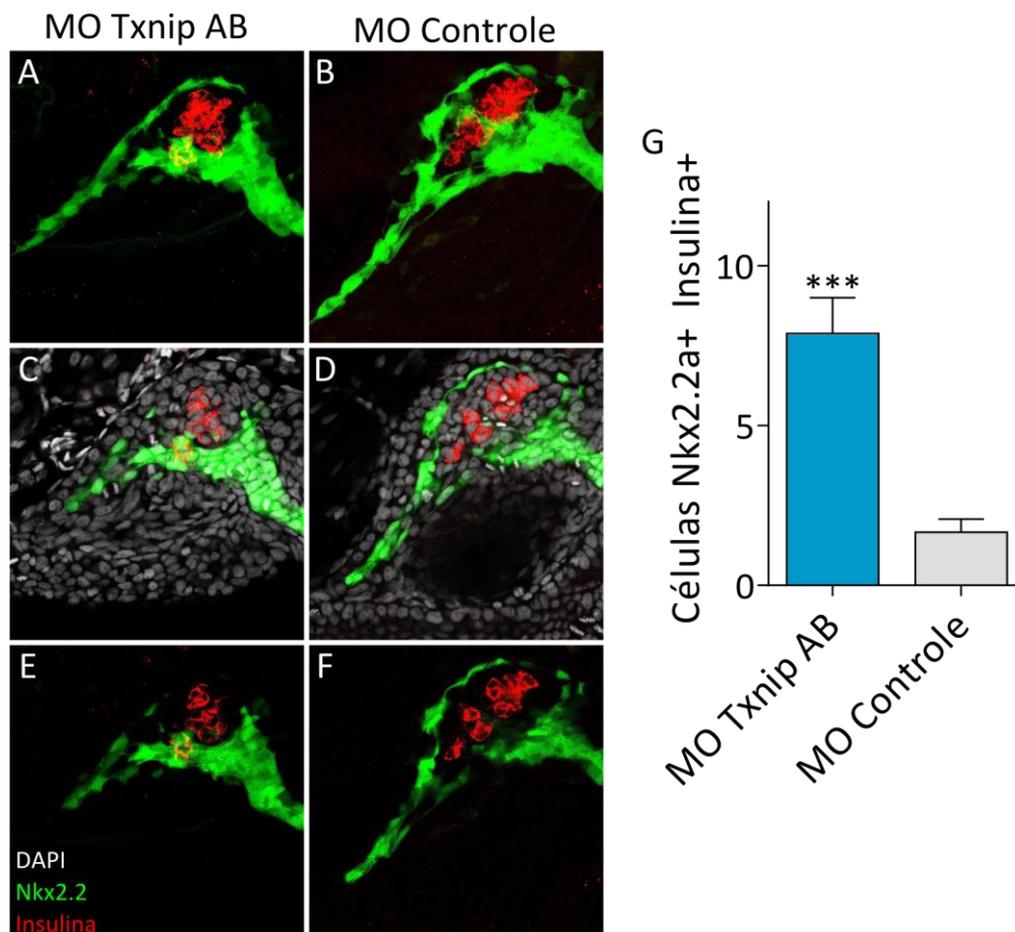


Figura 27: Avaliação das células progenitoras influenciadas pela inibição de *Txnip*. Análise da estrutura do ducto extra-pancreático dos morfantes Tg(Nkx2.2aD:EGFP). (A-F) Representação dos pâncreas morfantes. (A-D) Imagens z-stack confocal. Além do repórter Nkx2.2aD:EGFP (verde), as amostras foram marcadas para insulina (vermelho) e os núcleos celulares foram marcados com DAPI (branco). (E-F) Representação de plano bidimensional destacando a co-localização da marcação para insulina (vermelho) e para Nkx2.2 (verde). (G) As células duplamente positivas para Nkx2.2aD:EGFP e insulina foram contadas (Test t. *** = $p < 0,001$. n = 10).

Visando elucidar os mecanismos moleculares iniciados pela inibição de *Txnip* e responsáveis pelo aumento no número de células endócrinas produtoras de insulina nos morfantes MO Txnip AB, a expressão genica de alguns marcadores pancreáticos foi avaliada. A Figura 28 demonstra que a expressão de *Ins*, *Pdx-1* e de *MafA* foi maior nos morfantes MO Txnip AB.

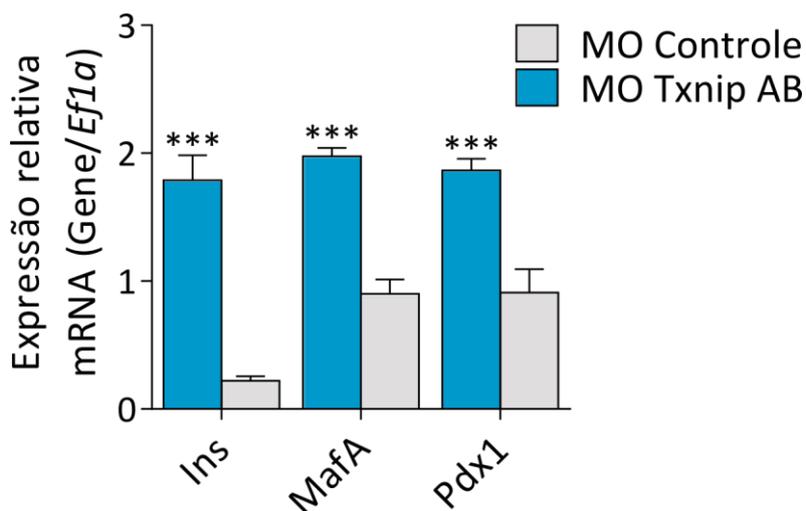


Figura 28: Análise por qRT-PCR de marcadores genéticos associados à diferenciação β -pancreática em amostras obtidas a partir de morfantes MO Txnip AB e MO Controle. O gene *Ef1 α* foi utilizado como controle de expressão constitutiva (Test t. *** = $p < 0,001$. $n = 3$).

2.4.5.5. Efeito da inibição de *Txnip* em modelo de diabetes em *zebrafish*

O Diabetes do tipo MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) é uma forma rara de diabetes causada por mutação genética única. Mutações do gene *Hepatocyte nuclear factor-1 β* (*Hnf1 β*) causam a forma de MODY conhecida como MODY5. Esse gene codifica para um fator de transcrição importante para o desenvolvimento normal de células- β , rins, trato renal e útero. A linhagem de *zebrafish* conhecida como Liger^{s430} (*Hnf1 β a*^{s430}) é um modelo mutante hipomorfo para *Hnf1 β a*, que recapitula as doenças pancreáticas observadas em humanos portadores de mutações heterozigotas em HNF1 β (LANCMAN et al., 2013). O mutante Liger^{s430} foi utilizado para determinar o potencial da inibição de *Txnip* em recuperar o fenótipo diabético. Embriões Liger^{s430}, com o repórter *Ptf1a*:EGFP, foram injetados com MO Controle e MO Txnip AB e se desenvolveram até 72hpf. O fator de transcrição *Ptf1a* é expresso nas primeiras células precursoras pancreáticas, sendo posteriormente restrito a células acinares, onde ativa, diretamente, genes responsáveis pela diferenciação exócrina (KRAPP et al., 1996). Através de microscopia confocal, observamos que a inibição de *Txnip* não é capaz de recuperar a morfologia do pâncreas exócrino do modelo de MODY5, pois a

área correspondente às células EGFP-positivas expressando *Ptf1a* permanece restrita, independente da condição experimental (Figura 29A-B). Entretanto, a inibição de *Txnip* é capaz de restaurar quantitativamente as células produtoras de insulina (Figura 29D).

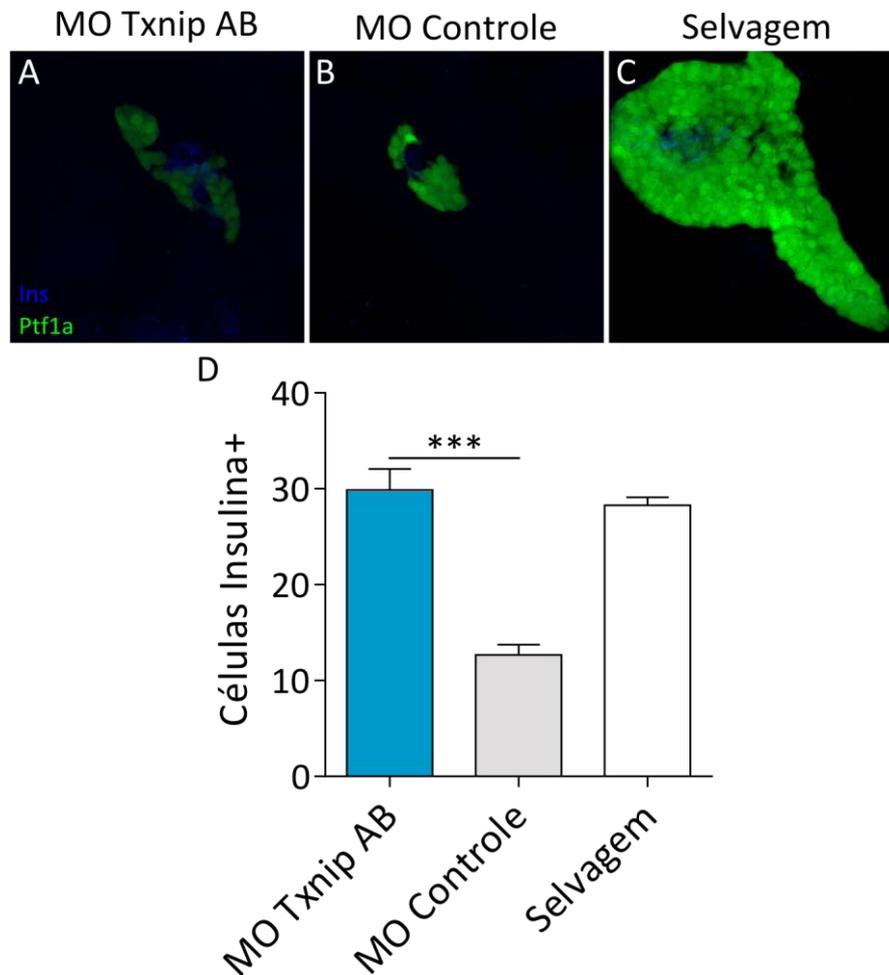


Figura 29: Estrutura pancreática do modelo mutante *zebrafish* Ligers430 (*hnf1bas430*) de MODY-5. (A-C) Imagens z-stack confocal dos pâncreas (A-B) Ligers430 morfantes e (C) de pâncreas selvagem normal. Além do repórter *Ptf1a:EGFP* (verde), as amostras foram marcadas para insulina (azul). (D) As células insulina-positivas foram quantificadas (One-way ANOVA. *** = $p < 0,01$. $n = 15$).

2.4.6. Obtenção de mutantes para *Txnip*

De forma a induzir a deleção de parte da sequência genômica de *Txnip A* e *Txnip B* em linhagens de *zebrafish*, foram obtidos gRNA para dirigir a nucleasse Cas9 para a sequência do primeiro éxon de *Txnip A* e *Txnip B*. Cada gRNA, associado à Cas9 recombinante, foi injetado em embriões no estágio de uma célula. A eficiência de mutagênese e a identificação dos F0

mutantes foram realizadas através do ensaio Surveyor. A enzima Surveyor é uma nucleasse que reconhece e cliva DNA em regiões com *mismatches* devidas a polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms, SNPs*) ou pequenas deleções e inserções. A região alvo dos gRNAs foi amplificada por PCR, o produto de reação foi submetido à digestão com a enzima Surveyor e avaliado por eletroforese em gel de agarose, de forma a detectar mutações no DNA. A Figura 30 mostra que a enzima Surveyor foi capaz de clivar apenas os produtos de PCR de amostras que foram injetadas com gRNA e que o sistema CRISPR/Cas9 foi capaz de mutar a sequência genômica de *Txnip A* e *Txnip B*.

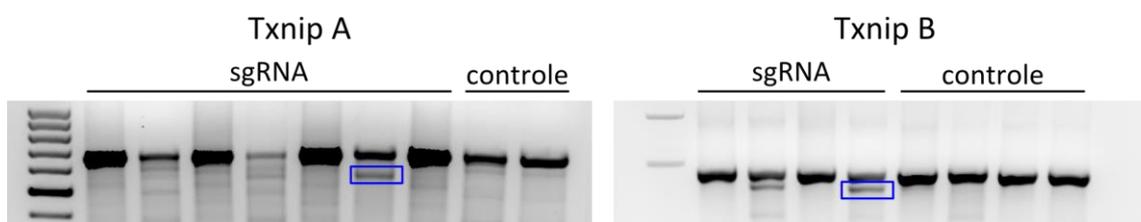


Figura 30: Imagens representativas de eletroforese em gel agarose de ensaios Surveyor demonstrando a ocorrência de mutações obtidas pelo sistema CRISPR/Cas9. O DNA de 10 embriões F0 injetados com gRNA/Cas9 foram obtidos e os produtos de amplificação por PCR referentes ao gene *Txnip* foram analisados pelo ensaio Surveyor. No gel, os produtos de amplificação são sempre seguidos pelos produtos de digestão com a enzima Surveyor. Os retângulos azuis destacam produtos de digestão causados pela digestão que a enzima Surveyor promove em sequências mutadas, demonstrando a obtenção de mutantes F0 heterozigotos para *Txnip*.

Os *zebrafish founders* F0 foram cruzados e desenvolvidos até a idade adulta. Para identificar a próxima geração de portadores da mutação induzida com o sistema CRISPR/Cas9 (F1), a região alvo dos gRNAs foi amplificada por PCR e o produto foi analisado por eletroforese em gel. A Figura 31 mostra que é possível identificar F1 utilizando eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida. As amostras com mutações severas têm um perfil de amplificação por PCR que difere do padrão selvagem. As reações de sequenciamento foram obtidas apenas para amostras potencialmente positivas.

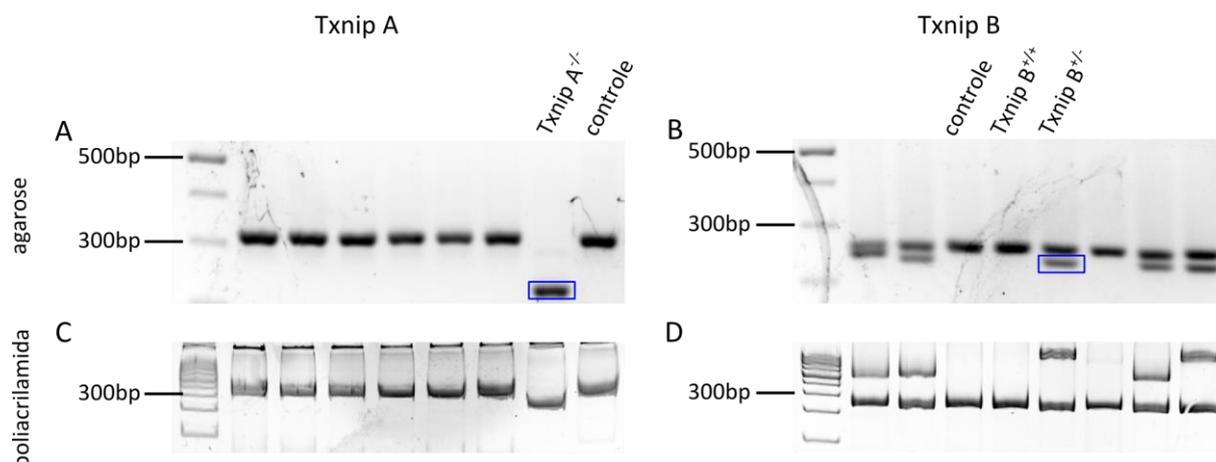


Figura 31: Imagens representativas de eletroforese em gel de produtos de amplificação por PCR referentes ao gene *Txnip*, partindo de amostras de peixes F1. As mesmas amostras foram analisadas em gel de (A e B) agarose e em gel de (C e D) poliacrilamida. Os retângulos azuis destacam produtos de PCR de mutantes severos que diferem do produto de amplificação dos embriões selvagens (controle). Os possíveis genótipos obtidos são destacados nos exemplos: homocigoto mutado (*Txnip A^{-/-}*), homocigoto não mutado (*Txnip B^{+/-}*) ou heterocigoto (*Txnip B^{+/-}*).

Entre as amostras selecionadas por eletroforese, três mutantes F1 foram identificados para *Txnip A* e para *Txnip B*. Os F1 apresentam deleções, inserções ou polimorfismos na sequência de *Txnip A* e *B*, as quais desencadeiam mutações de *frameshift* ou *missense*, levando à perda de expressão de proteína (Figura 32 e Figura 33 e Tabela 5). Os mutantes F1 foram cruzados com linhagens de *zebrafish* selvagem, a fim de expandir a população, estabelecer linhagens de *zebrafish* mutantes para *Txnip* e eliminar qualquer possível mutação *off-target*. Os mutantes F1 também foram cruzados entre si, isto é, entre mutantes *Txnip A* e *Txnip B*, para estabelecer uma linhagem mutante dupla. A análise do desenvolvimento pancreático de mutantes obtidos por CRISPR/Cas9 para *Txnip A* e *Txnip B* deve corroborar e complementar os resultados obtidos com os morfantes de *Txnip*.

Tabela 5: Sequência proteica referente às sequências genômicas estabelecidas para os mutantes CRISPR F1.

Gene	Mutante	Mutação	Sequência proteica
Txnip A		Controle	MVAMTKRVKVF EIAFN D P SKTFYCSGDKVAGKVLVE
	1	Frameshift	MVAMTKRVKVF EIAFN DPWRSRR Stop
	2	Frameshift	MVAMTKRGE GGDQTEVKFFLSKKKRHVS
	3	Frameshift	LVPPTPPSPPL Stop
Txnip B		Controle	MGVLTKKPKAF EVQMSDPNKIAYS GGDKVAGR VIVEVAEL
	1	Missense	MSDPNKIAYS GGDKVAGR VKVSAVEL
	2	Frameshift	MSDPNKIAYS GGDKDTYRWRSC Stop
	3	Frameshift	MSDPNKIAYS GGD RWRSC Stop

2.5. Discussão

TXNIP é descrito como um fator pro-apoptótico em células- β , sendo induzido por glicose e atuando na toxicidade induzida por glicose em células- β (SHALEV, 2014). O camundongo Hcb-19/Txnip^{-/-} deficiente em Txnip apresenta níveis elevados de insulina, sendo protegido contra Diabetes induzido por estreptozotocina (CHEN et al., 2008a). Porém, a diminuição relativa na massa de células- β induzida por doses padrão de estreptozotocina foi igual ou superior àquela do camundongo controle e o modelo deficiente em Txnip não está protegido contra diabetes induzido por doses maiores de estreptozotocina (MASSON et al., 2009). No modelo Hcb-19/Txnip^{-/-}, a determinação da massa de células- β antes do tratamento com Estreptozotocina, indica que a deficiência de Txnip é capaz de induzir o aumento na massa de células- β mesmo em condições normais (MASSON et al., 2009) e que a resistência relativa do modelo murino deficiente em Txnip ao Diabetes pode estar relacionada a esse aumento inicial da massa de células- β . O conhecimento atual acerca da função de *Txnip* o aponta como um fator determinante na sobrevivência e na função de células- β , porém, ainda é necessário determinar qual o envolvimento deste gene com o desenvolvimento β -pancreático. Devido à sua influência na função de células- β e sua expressão diferencial ao longo da diferenciação β -pancreática de mESCs, observada por nós anteriormente (SILVA, 2008), no presente trabalho, buscou-se elucidar se a inibição de *Txnip* pode induzir aumento da massa de células- β e se esse efeito pode ser utilizado em favor da diferenciação de mESCs em IPCs e, ainda, se é conservado *in vivo*, no modelo de *zebrafish*.

Nos últimos anos, diversos protocolos para a diferenciação de PSCs foram estabelecidos, buscando mimetizar a organogênese pancreática através da utilização de coquetéis de moléculas que atuam sobre vias de sinalização intracelulares específicas. Recentemente, dois grupos de pesquisa demonstraram, independentemente, a possibilidade

de induzir a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas (hESCs) em IPCs com níveis de secreção de insulina similares àqueles observados para ilhotas pancreáticas humanas (PAGLIUCA et al., 2014; REZANIA et al., 2014). Entretanto, o conhecimento acerca da função e da heterogeneidade das células- β e das culturas de IPCs derivadas a partir de células-tronco é limitado. Além disso, diversos grupos continuam a somar forças no esforço de aperfeiçoar os protocolos de diferenciação, pois ainda é proibitivamente cara a reprodução do *status quo* (JOHNSON, 2016). Por outro lado, é possível empregar os protocolos anteriores para gerar células similares a células- β para estudos de desenvolvimento, permitindo responder questões que não demandam células completamente funcionais para serem respondidas.

O protocolo utilizado no presente trabalho (LUMELSKY et al., 2001) é considerado controverso, pois gera IPCs expressando não apenas marcadores de células- β maduras, mas, também, uma mistura de fenótipos pancreáticos (BOYD et al., 2008), resultando em baixa razão de peptídeo-C/insulina, sugerindo que o conteúdo de insulina é constituído por uma mistura de síntese *de novo* e de absorção do meio de cultura (RAJAGOPAL et al., 2003). Além disso, as IPCs são defectivas em ensaios de secreção de insulina induzida por glicose, pois essas células secretam insulina em resposta à baixa concentração de glicose, porém, são incapazes de secretar insulina em níveis significativamente maiores em resposta ao estímulo com alta concentração de glicose (BOYD et al., 2008). Sendo assim, esse protocolo não é ideal para a obtenção de IPCs funcionais e exige aprimoramento adicional, característica que nos levou à avaliação do potencial de modulação da expressão do gene *Txnip* em melhorar o protocolo de diferenciação β -pancreática.

O protocolo de diferenciação foi reproduzido para diferenciar mESCs em IPCs (Figura 9). Para elucidar a identidade das células, as IPCs foram marcadas com Ditizona, mostrando

que as células possuíam reservas intracelulares de insulina. De fato, as IPCs obtidas foram capazes de secretar insulina (Figura 9G), entretanto, em níveis mais baixos do que a linhagem celular MIN6, a qual apresenta secreção de insulina induzida por glicose de modo similar à de ilhotas pancreáticas isoladas (ISHIHARA et al., 1993, p. 6; MIYAZAKI et al., 1990). Estudos utilizando insulina marcada radioativamente no meio de cultivo mostraram que IPCs obtidas através deste protocolo são capazes de sintetizar insulina *de novo*, porém, a insulina secretada por essas IPCs é uma mistura de insulina sequestrada do meio de cultura e insulina de síntese *de novo* (PAEK; MORGAN; LYSAGHT, 2005). Dessa forma, os níveis de insulina secretados pelas IPCs podem refletir tanto a produção de insulina *de novo* quanto a absorção da mesma a partir do meio de cultura, que é rico em insulina. A quantificação de peptídeo-C seria uma forma mais acurada de medição. Como apenas a forma madura da molécula de insulina é adicionada ao meio de cultivo, a presença de peptídeo-C indica que ocorreu a produção *de novo* de insulina (RAIKWAR; ZAVAZAVA, 2009). Demonstramos que as IPCs obtidas são capazes de armazenar e secretar insulina, porém, os níveis detectados não se comparam aos níveis secretados pelo controle positivo da linhagem MIN6. Além disso, não foi demonstrado se as IPCs são capazes de produzir insulina *de novo* ou se absorveram seu conteúdo a partir do meio de cultivo rico em insulina.

A expressão do gene *Txnip* atingiu níveis mais elevados de expressão no estágio de expansão de mESCs, quando comparado com qualquer outro estágio do protocolo de diferenciação (Figura 9H). As PSCs dependem preferencialmente do metabolismo glicolítico (RYALL et al., 2015) e sabe-se que o aumento no fluxo glicolítico diminui os níveis de intermediários importantes para a indução da expressão de *Txnip* (YU et al., 2010). Dessa forma, a manutenção da pluripotência deveria estar relacionada com baixos níveis de expressão de *Txnip*. Acreditamos que o comprometimento das células pluripotentes com o

programa pancreático seja o fator determinante para a redução da expressão de *Txnip*. Após a drástica redução de expressão que segue a primeira etapa do protocolo de diferenciação, há apenas um pequeno aumento relativo na expressão de *Txnip* durante a etapa de seleção de células Nestina-positivas, quando ocorre morte de outros tipos celulares, corroborando dados da literatura que apontam *Txnip* como um regulador de apoptose (ZHOU; CHNG, 2013). A diminuição relativa na expressão de *Txnip* nas progenitoras pancreáticas pode se dever ao papel de *Txnip* na sobrevivência de células- β ou ao provável papel de *Txnip* no comprometimento de progenitoras com o perfil pancreático.

Visando validar as ferramentas de modulação gênica estabelecidas, células β -pancreáticas murinas da linhagem MIN6 foram transduzidas com as diferentes partículas lentivirais obtidas para inibir ou induzir a expressão de *Txnip*. As partículas lentivirais contendo as sequências de shRNA 1 e shRNA 2 foram eficientes na inibição do gene *Txnip* (Figura 10B), o que induziu aumento no índice de produção de insulina pelas células MIN6 (Figura 10C), corroborando dados da literatura (RANI et al., 2010). Além disso, o potencial proliferativo dessas células foi aumentado, com diminuição significativa do tempo de dobramento celular (Figura 11A-B).

Variações na massa de células- β são dependentes do balanço entre a taxa de morte e a taxa de proliferação (ou neogênese), portanto, avaliamos se o tratamento com citocinas afeta a taxa de apoptose de células MIN6 de forma diferencial entre as linhagens geneticamente modificadas. As citocinas pró-inflamatórias Tnf- α , Il-1 β e Ifn- γ são relacionadas com a disfunção e a destruição de células- β , que ocorrem no DM1, sendo que a combinação dessas citocinas é amplamente utilizada para mimetizar as condições do DM1 *in vitro* (EIZIRIK; COLLI; ORTIS, 2009; THOMAS et al., 2009). Porém, o aumento da proliferação celular não foi refletido na diminuição de apoptose entre as linhagens geneticamente

modificadas com inibição de *Txnip* (Figura 11C-D). Apesar do tratamento com citocinas induzir a morte celular, foi observada apenas uma tendência estatisticamente não significativa em reduzir os níveis de apoptose (Figura 11C) e nenhuma variação nos níveis de necrose (Figura 11D) induzidos pelo coquetel de citocinas, portanto, a inibição de *Txnip* não foi capaz de proteger as células β -pancreáticas do estímulo de morte. Esse resultado condiz com a observação de que células ISN1 de insulinoma de rato tratadas com RNA de interferência para inibição de *Txnip*, assim como ilhotas pancreáticas isoladas do modelo Hcb-19/*Txnip*^{-/-}, quando tratadas diretamente com Estreptozotocina ou com um coquetel de citocinas, não são mais resistentes à apoptose do que seus respectivos controles (MASSON et al., 2009). Além disso, os resultados obtidos indicam que o aumento do potencial proliferativo induzido pela inibição de *Txnip* é causado pelo aumento da taxa de proliferação celular e não pela diminuição da taxa de morte.

Com relação à superexpressão de *Txnip* na linhagem MIN6, a partícula lentiviral induziu aumento significativo na expressão do gene, porém, de apenas $3,28 \pm 0,06$ vezes o nível de expressão da linhagem controle (Figura 12B), não havendo variação nos índices de produção de insulina (Figura 12C). Houve, sim, variação do perfil de proliferação e aumento do tempo de dobramento celular (Figura 13A e B). Além disso, observou-se que a superexpressão de *Txnip* leva ao aumento dos índices de apoptose (Figura 13C) e de necrose (Figura 13D), mesmo na ausência do tratamento com citocinas. De fato, em diversos tipos celulares, a expressão de *Txnip* está relacionada com a inibição da proliferação celular e/ou com a indução de apoptose (CHEN et al., 2006b; HAN et al., 2003; MINN; HAFELE; SHALEV, 2005; SCHULZE et al., 2002; WANG; DE KEULENAER; LEE, 2002; WANG et al., 2006). Porém, a indução da expressão de *Txnip* em células- β pancreáticas também está relacionada com a perda da capacidade de secretar insulina em resposta a estímulos de glicose, relação esta

que não foi observada nas linhagens de MIN6 superexpressando *Txnip* obtidas neste trabalho (Figura 12C). Uma possível explicação para esta discrepância seria o nível relativamente baixo de indução da expressão de *Txnip*. A literatura descreve níveis de expressão de *Txnip* que alcançam até 23,7 vezes a expressão de células controle (RANI et al., 2010). As construções lentivirais para expressão de *Txnip* obtidas no presente trabalho não foram capazes de induzir níveis mais altos de expressão de *Txnip* em linhagens de MIN6. Além disso, altos níveis de expressão de *Txnip*, que induzem grande perda celular por apoptose, tornariam o trabalho de diferenciação de mESCs inviável. Dessa forma, optamos por induzir aumento na expressão de *Txnip*, porém, sem maior comprometimento da viabilidade celular.

As observações realizadas com a modulação da expressão do gene *Txnip* em MIN6 corroboram dados da literatura, confirmando a eficiência das ferramentas obtidas e fornecendo evidências de que *Txnip* pode atuar no desenvolvimento e/ou proliferação de células- β . Para determinar a influência de *Txnip* no protocolo de diferenciação β -pancreática, linhagens de mESCs submetidas à inibição ou superexpressão de *Txnip* foram obtidas. As linhagens de mESCs nas quais a expressão de *Txnip* foi inibida apresentaram proliferação mais intensa e formação de agregados celulares bem estruturados, com limites bem definidos, durante a expansão de mESCs (Figura 14A), a formação de CEs e de IPCs (Figura 15). Além disso, durante a seleção de células progenitoras Nestina-positivas, um menor nível de perda celular foi observado, indicando a obtenção de maior rendimento durante o protocolo de diferenciação β -pancreático e apontando para a deficiência de *Txnip* como um fator indutor da formação de massa β -pancreática. Os fatores de transcrição *Pdx1*, *Ngn3* e *MafA* participam do processo natural de diferenciação de células β -pancreáticas. É possível transdiferenciar células exócrinas pancreáticas e células epiteliais do ducto biliar hepático

em IPCs através da indução da expressão desses fatores de transcrição (AKINCI et al., 2012, 2013; BANGA et al., 2012; KOBLAS et al., 2016). A inibição de *Txnip* não apenas induziu maior expressão desses fatores de transcrição, como, também, aumentou a expressão de marcadores de função β -pancreática (Figura 16A). Se o padrão observado de expressão gênica pode ser atribuído a um único tipo celular dentre as IPCs obtidas ou a todas as células nessa população é uma questão que ainda deve ser respondida, porém, a deficiência de *Txnip* foi capaz de induzir a expressão de um conjunto-chave de fatores de reprogramação. A expressão do fator progenitor endócrino *Ngn3* é descrita como sendo muito mais alta durante o desenvolvimento embrionário, sendo, esse gene, essencial para a manutenção de células progenitoras do pâncreas endócrino e acreditava-se que era inibido em células maduras (DESGRAZ; HERRERA, 2009; JOHANSSON et al., 2007; SZABAT et al., 2012). Atualmente, sabe-se que há baixa expressão de *Ngn3* em ilhotas humanas e de camundongos (DROR et al., 2007). O aumento na expressão de *Ngn3* indica que houve a indução de mais células progenitoras e, considerando as novas evidências, o aumento de expressão de *Ngn3* não indica, necessariamente, a persistência de IPCs imaturas no estágio final de diferenciação β -pancreática.

Para determinar se as IPCs são capazes de produzir insulina *de novo* ou se elas apenas absorvem insulina do meio de cultivo, foi realizada a quantificação de peptídeo-C secretado. A inibição de *Txnip* foi capaz de melhorar a resposta das IPCs ao estímulo de glicose (Figura 16C). IPCs imaturas podem meramente secretar toda a insulina de seu citoplasma após o estímulo com baixa concentração de glicose e não ter reserva de insulina para secretar após um novo estímulo, mesmo que este seja feito com maior concentração de glicose (BOYD et al., 2008). Alternativamente, o número de IPCs utilizado pode ser determinante para a sensibilidade à insulina dessas células, uma ideia que é sustentada por ensaios de estímulo

de glicose com ilhotas pancreáticas que apresentam sensibilidade à glicose defeituosa quando o número de células é baixo (BOYD et al., 2008). No entanto, quando um número maior de ilhotas é utilizado, a capacidade normal de detecção de glicose é restaurada (BOYD et al., 2008). De qualquer forma, foi possível demonstrar que a inibição de *Txnip* ao longo do protocolo de diferenciação β -pancreática gera IPCs com resposta ao estímulo de glicose mais adequada, seja pelo aumento do número de células diferenciadas ou pela promoção de IPCs mais maduras.

A linhagem de mESCs superexpressando *Txnip* apresentou proliferação menos intensa e as IPCs não foram obtidas como agregados celulares (Figura 18). *Txnip* inibe a proliferação celular através da ativação de sinais apoptóticos, sendo descrito como um gene supressor tumoral que, normalmente, é silenciado por mecanismos genéticos e epigenéticos em células cancerígenas (ZHOU; CHNG, 2013). Essas observações sugerem que a superexpressão de *Txnip* pode induzir um menor número de células- β ou até um processo de diferenciação pancreática menos eficiente, com grande perda celular devida à apoptose. A superexpressão induzida de *Txnip* não foi suficiente para induzir variações estatisticamente significativas na expressão de marcadores de diferenciação e de função β -pancreática (Figura 19A). Da mesma forma, o aumento de expressão de *Txnip* induziu apenas uma tendência à diminuição dos níveis de peptídeo-C secretado, porém, essa diminuição não foi estatisticamente significativa (Figura 19C). Nós acreditamos que a superexpressão de *Txnip* induz a perda de células progenitoras e menor rendimento de IPCs. Porém, o nível de superexpressão obtido na linhagem mESCs USP4 pLV-*Txnip*, apesar de ser estatisticamente significativo e $4,55 \pm 0.9$ vezes superior àquele da linhagem controle (Figura 17), não foi suficiente para induzir fenótipos estatisticamente significativos, causando apenas tendências que condizem com a literatura e com a indução de perda de viabilidade e de função β -

pancreática devido à expressão elevada de *Txnip*. Por estas mesmas razões, acreditamos que linhagens expressando níveis mais elevados de *Txnip* foram inviáveis.

Como o protocolo utilizado não gera IPCs completamente funcionais, nós utilizamos o modelo de *zebrafish* para validar o potencial da inibição de *Txnip* em dirigir a diferenciação de células progenitoras para células- β . Diferentemente de humanos e camundongos, *zebrafish* possui duas cópias do gene *Txnip*, ou seja: *Txnip A* e *Txnip B*, sendo ambas expressas durante as primeiras 96hpf (Figura 20). Utilizando morfolinós, foi possível inibir a expressão de *Txnip A* e *Txnip B* (Figura 21) e analisar os efeitos desses genes ao longo do desenvolvimento pancreático. No desenvolvimento embrionário, *NeuroD* é um dos primeiros reguladores da especificação pancreática endócrina (KORZH et al., 1998) e a inibição de *Txnip* induziu o aumento no número de células expressando *NeuroD* no pâncreas de morfantes com 72hpf (Figura 22). É importante enfatizar o efeito cumulativo da inibição de *Txnip A* e *Txnip B* no aumento do número de células endócrinas, sugerindo que ambos possuem funções celulares similares. De fato, funções similares para ambas as cópias de *Txnip* foram descritas no metabolismo de glicose de embriões de *zebrafish* (AKINCI et al., 2013). Por esses motivos, nós optamos por conduzir os ensaios seguintes com morfantes duplos MO *Txnip AB*. Também observamos um aumento no número de células EGFP-positivas expressando *NeuroD* fora da ilhota principal nos morfantes MO *Txnip AB* (Figura 23A), sugerindo que a inibição de *Txnip* induz o aumento de células endócrinas através da estimulação de progenitoras endócrinas associadas aos ductos pancreáticos. Essas progenitoras podem se diferenciar e proliferar após a diferenciação da ilhota principal, durante a segunda onda de diferenciação pancreática (HESSELSON et al., 2009; PARSONS et al., 2009; WANG et al., 2011).

Apesar da tendência de aumentar a população endócrina fora da ilhota principal, a quantificação dessas células não foi estatisticamente significativa. Sabe-se que durante a formação secundária de células endócrinas, essas células se de-laminam e migram para contribuir com a ilhota principal (DONG et al., 2007, p. 1, 2008; ZECCHIN et al., 2004). Sendo assim, uma grande variabilidade é esperada entre as amostras no que se refere ao número de células endócrinas fora da ilhota principal, diminuindo a significância estatística dos dados. Entretanto, a inibição de *Txnip* induz um aumento no número de células EGFP-positivas expressando *NeuroD* apenas a partir de 24hpf (Figura 23A), quando a ilhota principal já está formada (FIELD et al., 2003), e, principalmente, entre 48-72hpf (Figura 23A), um período no qual as precursoras associadas aos ductos pancreáticos são estimuladas, corroborando a hipótese de que a inibição de *Txnip* causa aumento na população de células endócrinas durante a formação secundária. Além disso, a inibição de *Txnip* não causa variações de proliferação celular dentro da ilhota principal (Figura 25).

O sistema ductal derivado do broto pancreático ventral inclui o ducto extra pancreático, o qual conecta o pâncreas ao intestino, e uma rede ramificada de ductos na cauda do pâncreas conhecida como ductos intra-pancreáticos (KIMMEL et al., 2011). As células endócrinas da segunda onda de diferenciação se originam do ducto extra-pancreático, contribuindo para a expansão da ilhota principal, ou do ducto intra-pancreático, para formar pequenas ilhotas secundárias ao longo do pâncreas de *zebrafish* (CHEN et al., 2007; MORO et al., 2009; PARSONS et al., 2009; WANG et al., 2011). Os ductos intra-pancreáticos contêm células pancreáticas responsivas a Notch (*pancreatic Notch-responsive cells*, PNCs), uma população de progenitoras de células endócrinas e ductais, mas não de células acinares (KIMMEL et al., 2011; PARSONS et al., 2009). A via de sinalização de Notch mantém as células progenitoras pancreáticas em um estado proliferativo indiferenciado e

controla a indução de células, em estágios diferentes, para formar as linhagens pancreáticas (ZECCHIN et al., 2004). Para determinar se a inibição de *Txnip* impulsiona o aumento de células endócrinas através da diferenciação de progenitores pancreáticas PNCs, a integridade da rede de ductos intra-pancreáticos foi analisada. Como elemento responsivo a Notch, nós utilizamos o promotor do gene *Tp1* (Figura 26). Não foi possível identificar diferença morfológica alguma ou perda de integridade dos ductos intra-pancreáticos devido à inibição de *Txnip*. Uma abordagem mais adequada para determinar se as progenitoras endócrinas do ducto intra-pancreático são estimuladas pela inibição de *Txnip*, seria um ensaio de rastreamento celular com repórteres fluorescentes, os quais são capazes de identificar novas células endócrinas que, em algum ponto do desenvolvimento, expressaram marcadores de ducto intra-pancreático.

Foi descrito na literatura que células expressando *NeuroD* são encontradas ao longo do ducto extra-pancreático (DONG et al., 2007; KIMMEL et al., 2011). Ocasionalmente, as células ductais extra-pancreáticas NeuroD-positivas expressam baixos níveis de insulina, correspondendo a células- β recém-diferenciadas (KIMMEL et al., 2011). Camundongos com perda de expressão de *Nkx2.2* desenvolvem um pâncreas endócrino deficiente, nos quais as células- β são totalmente ausentes (PAULS et al., 2007). Quando o gene homólogo *Nkx2.2a* é inibido em *zebrafish*, ocorre a redução do número de células α e β (PAULS et al., 2007). O ducto extra-pancreático se origina a partir de células *Nkx2.2a*-positivas, as quais formam uma rede intercelular que circunda a ilhota principal e por um ducto de células interconectadas no centro da cauda pancreática (PAULS et al., 2007). Para analisar o efeito da inibição de *Txnip* sobre as células do ducto extra-pancreático, foi utilizada a linhagem *Tg(Nkx2.2aD:eGFP)*. Essa linhagem repórter expressa EGFP sob o controle de um fragmento do promotor de *Nkx2.2a*, permitindo a expressão de EGFP nas células precursoras

endócrinas, assim como nas células ductais diferenciadas, enquanto é silencioso em células endócrinas diferenciadas (PAULS et al., 2007). A dupla marcação de células ductais extra-pancreáticas EGFP-positivas expressando *Nkx2.2* e insulina nos morfantes MO *Txnip* AB, sugere que o ducto extra pancreático seja uma fonte de células progenitoras endócrinas estimuladas pela inibição de *Txnip* (Figura 27).

No modelo murino Hcb-19/*Txnip*^{-/-} deficiente em *Txnip*, os níveis proteicos e a atividade de TXN são similares entre o camundongo deficiente em *Txnip* e o camundongo selvagem, no estado alimentado ou em jejum, sugerindo que as perturbações metabólicas do modelo deficiente em *Txnip* devem envolver outras interações independentes de TXN (SHETH et al., 2005). Além disso, já foi sugerido que *Txnip* atua como um regulador transcricional (HAN et al., 2003). Essas observações indicam que *Txnip* modula a transcrição genética em células- β , reforçando seu provável papel na regulação do desenvolvimento embrionário dessas células. O fator de transcrição *MafA* ativa a transcrição de insulina, sendo fundamental para a função β -pancreática (EL KHATTABI; SHARMA, 2015). Importantes reguladores da formação e da função das células- β , como *Pdx-1* e *Nkx2.2*, se ligam, especificamente, a regiões regulatórias de *MafA* (RAUM et al., 2006). O padrão de expressão de *MafA* em pâncreas não é usual, pois nenhum outro fator de transcrição já caracterizado é expresso exclusivamente em células- β ou é induzido tanto na primeira como na segunda onda de formação de células- β durante a embriogênese (MATSUOKA et al., 2004). Foi descrito que *Txnip* controla a expressão de miR-204 (XU et al., 2013), o qual, por sua vez, pode regular fatores de transcrição chave para as células- β , como *MafA* e, assim, modula a função e a diferenciação celular. Foi possível quantificar o aumento da expressão de *MafA* nos morfantes MO *Txnip* AB, acompanhada da indução de expressão de *Insulina* e *Pdx1*

(Figura 28). Esses dados concordam com o aumento de expressão de *MafA* observado nas IPCs deficientes em *Txnip* (Figura 16A).

Os fatores de transcrição Nkx2.2 e NeuroD são críticos para o desenvolvimento β -pancreático. Nkx2.2 é essencial para a especificação dos tipos celulares que compõem a ilhota pancreática e para a função de células β -maduras (ANDERSON et al., 2009). NeuroD é crítico para a maturação e manutenção de células- β (ANDERSON et al., 2009). Ambos influenciam o desenvolvimento de células- β diretamente a jusante do fator progenitor endócrino *Ngn3* (ANDERSON et al., 2009). A atividade transcricional de Nkx2.2 é necessária para facilitar a ativação de NeuroD por *Ngn3* e para manter altos níveis de expressão de *NeuroD* no desenvolvimento de ilhotas de camundongos e de *zebrafish* e na maturação de células- β (ANDERSON et al., 2009). Nós hipotetizamos que a inibição de *Txnip* controla a expressão de miR-204, aumentando a expressão de *MafA*. No contexto de progenitoras pancreáticas expressando *Nkx2.2*, a expressão de *MafA* pode dirigir a diferenciação para IPCs.

A caracterização das novas células endócrinas de *zebrafish*, induzidas pela inibição de *Txnip*, ilustra a diferenciação preferencial em células β -pancreáticas (Figura 24), indicando que a inibição de *Txnip* representa uma abordagem interessante para promover aumento da massa de células- β . Outros experimentos são necessários para comprovar esta hipótese e estabelecer uma relação causal entre a inibição de *Txnip*, o controle da expressão de miR-204, o aumento de expressão de *MafA* e a indução de células- β durante o desenvolvimento pancreático. Porém, foi possível demonstrar que a inibição de *Txnip* é capaz de recuperar a massa de células β -pancreáticas do modelo mutante de MODY5 Liger^{s430} (Figura 29).

Os dados apresentados sugerem que a inibição de *Txnip* é capaz de aumentar a massa de células endócrinas e produtoras de insulina em *zebrafish* e de impulsionar a diferenciação

de mESCs em células- β mais maduras, aumentando o número e a qualidade das células progenitoras e das IPCs obtidas. Sendo assim, a inibição de *Txnip* constitui uma boa estratégia para aumentar o suprimento de IPCs para o tratamento de DM. Preocupações acerca da inibição terapêutica de *TXNIP* incluem qualquer potencial neoplásico devido à inibição de um fator pro-apoptótico. Entretanto, a deficiência sistêmica e a longo prazo de *Txnip*, como no modelo murino Hcb-19/*Txnip*^{-/-}, foi associada apenas com aumento no risco de desenvolvimento de carcinomas hepatocelulares tardios, sem aumento notável de leucemias, linfomas ou outros tumores como seria esperado em resposta à inibição de um gene supressor tumoral clássico (SHETH et al., 2006). Drogas bloqueadoras de canais de cálcio, como verapamil, são medicamentos orais que inibem a expressão de *TXNIP* em células- β (XU et al., 2012). À luz das evidências apresentadas neste trabalho, é possível especular a aplicabilidade dessa classe de medicamentos para aumentar a massa de IPCs obtidas a partir da diferenciação de células-tronco e até mesmo como tratamento preventivo e não-invasivo para indivíduos com alta susceptibilidade genética para desenvolver DM1.

2.6. Conclusões

O modelo Hcb-19/*Txnip*^{-/-} deficiente em *Txnip* forneceu novas evidências sugerindo que *Txnip* pode atuar como um regulador da massa de células- β e que a resistência relativa desse modelo ao diabetes induzido por estreptozotocina se deve ao aumento inicial na massa de células- β . Nesse estudo, mESCs geneticamente modificadas nos permitiram verificar que a modulação de *Txnip* na diferenciação β -pancreática pode induzir variações fenotípicas nas IPCs obtidas. A inibição de *Txnip* promove a diferenciação de IPCs com maior expressão de marcadores de células- β e mais responsivas ao estímulo de glicose. Além disso, o modelo de *zebrafish* nos permitiu elucidar *in vivo* o papel de *Txnip* durante a organogênese pancreática, revelando que a inibição de *Txnip* é capaz de aumentar a massa de células- β durante o desenvolvimento pancreático através do estímulo de células presentes no ducto extra-pancreático. A inibição de *Txnip* controla a expressão de miRNAs, como o miR-204, aumentando a expressão de fatores de transcrição fundamentais, como MafA. Acreditamos que, em *zebrafish*, a expressão de MafA, induzida pela inibição de *Txnip*, no contexto de progenitoras pancreáticas expressando Nkx2.2, fator de transcrição necessário para ativação de *NeuroD* por Ngn3, pode induzir maior massa de células- β . Da mesma forma, em PSCs, a inibição de *Txnip* pode dirigir a diferenciação de forma a se obter IPCs mais similares a células- β maduras. Ao estabelecer conhecimentos acerca dos mecanismos moleculares que dirigem a organogênese e a diferenciação β -pancreática, o presente trabalho contribui para o estabelecimento de uma terapia de reposição tecidual para pacientes diabéticos.

3. Capítulo 2:

Desenvolvimento de biomaterial inovador para microencapsulamento celular

3.1. Introdução

Após o transplante de ilhotas pancreáticas, o sistema imune inato (que predomina nos primeiros 2-3 dias) e o sistema imune adaptativo iniciam uma resposta para a destruição do enxerto (GIBLY et al., 2011). Inicialmente, o sistema imune do hospedeiro é ativado pelo trauma cirúrgico e pela introdução de células não autólogas. O componente inato responde através da ativação de macrófagos e neutrófilos, causando inflamação no microambiente do enxerto e recrutando células adicionais do sistema imune, iniciando uma cascata de secreção de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio que causam danos às ilhotas. Antígenos liberados pelas ilhotas são identificados e fagocitados por células apresentadoras de antígenos (*antigen-presenting cells*, APCs), que processam esses antígenos em pequenos peptídeos e os apresentam, em sua superfície, associados a moléculas do antígeno leucocitário humano (*Human leukocyte antigen*, HLA). Esse complexo, reconhecido como exógeno, ativa linfócitos T auxiliares CD4+, os quais, por sua vez, ativam linfócitos T citotóxicos CD8+, os quais, eventualmente, destroem as ilhotas pancreáticas (GIBLY et al., 2011). Além disso, também pode ocorrer a recorrência do processo autoimune diabético, causando a destruição seletiva de células- β produtoras de insulina, presentes no enxerto (BURKE et al., 2011).

Dessa forma, reações auto- e alo- imunes influenciam a sobrevivência de ilhotas pancreáticas transplantadas em pacientes portadores de DM1 e demandam o uso crônico de drogas imunossupressoras visando à aceitação do enxerto pelo sistema imunológico. No entanto, a terapia imunossupressora crônica está associada a diversos efeitos colaterais, que incluem feridas bucais, problemas gastrointestinais, hipertensão, dislipidemia, anemia, maior susceptibilidade a infecções, câncer e toxicidade sistêmica, como nefrotoxicidade (SHAPIRO; POKRYWCZYNSKA; RICORDI, 2017). Além disso, alguns agentes

imunossupressores, como a cortisona, são diabetogênicos, portanto, a exposição crônica a essas drogas causa perda de funcionalidade do enxerto (PEPPER et al., 2013).

As complicações da imunossupressão, que é necessária para a sobrevivência do enxerto de ilhotas pancreáticas e a prevenção das complicações em longo prazo do DM, não são um risco aceitável para pacientes portadores de diabetes, limitando, assim, sua aplicação como terapia clínica. As situações aceitáveis para realização de transplantes clínicos de ilhotas pancreáticas associadas a um regime imunossupressor são limitadas aos pacientes diabéticos que requerem um transplante renal e, conseqüentemente, imunossupressão. Existem também pacientes para os quais a insulino terapia não é capaz de controlar o DM. Nestes casos, os riscos da imunossupressão são menores do que a progressão contínua das complicações secundárias ao DM, tornando os pacientes bons candidatos a um transplante de ilhotas associado à imunossupressão.

3.1.1. Microencapsulamento de células

O uso de drogas imunossupressoras pode ser evitado quando as ilhotas pancreáticas são envelopadas em membranas imunoprotetoras, o que é chamado de encapsulamento de células. Essas membranas protegem as ilhotas pancreáticas dos elementos efetores do sistema imune hospedeiro, prevenindo, assim, a rejeição do enxerto, preservando a integridade morfológica e funcional das células encapsuladas. O encapsulamento de células pode ser aplicado em diversas modalidades: macrocápsulas, microcápsulas e cápsulas de recobrimento de superfície (nanocápsulas). Nas macrocápsulas, as células vivas são envelopadas em câmaras de difusão relativamente grandes e semipermeáveis. As macrocápsulas podem ser dispositivos intravasculares, cuja maior desvantagem é o risco de trombose e a necessidade de uso de anticoagulantes, ou extra-vasculares, nos quais as

células são envelopadas em câmaras semipermeáveis e implantadas sob a pele ou na cavidade peritoneal, sem acesso direto à vasculatura. O macroencapsulamento está associado a um pequeno procedimento cirúrgico de implante, permitindo sua fácil substituição em caso de falha no enxerto, porém, as macrocápsulas apresentam uma proporção superfície-volume relativamente grande, o que implica na necessidade de grandes quantidades de nutrientes para construir um gradiente de difusão adequado para a entrada dos nutrientes, o que prejudica a nutrição ideal das células (DE VOS et al., 2014). O encapsulamento por recobrimento de superfície está associado a um risco maior de resposta imune contra o enxerto, pois a distância entre as ilhotas e o meio externo é reduzida, permitindo o acesso mais fácil dos elementos do sistema imune ao enxerto. Essa técnica vem ganhando mais espaço com o aprimoramento das membranas de recobrimento, entretanto, a maioria dos grupos de pesquisa se concentra no desenvolvimento de microcápsulas (DE VOS et al., 2014).

O microencapsulamento de células foi desenvolvido em 1964 por Thomas M. S. Chang, que sugeriu o uso do encapsulamento de células para o transplante visando à reposição de células em diversas doenças (CHANG, 1964). Ilhotas pancreáticas podem ser inseridas individualmente em cápsulas esféricas de polímero biocompatível, de 200 a 1.000µm de diâmetro, que fornecem proteção contra ataques do sistema imune do receptor. O enxerto gerado por microencapsulamento é pequeno, com uma proporção superfície-volume adequada, mantendo, assim, boa difusão de nutrientes e metabolitos (CALAFIORE; BASTA, 2014). Além disso, cada ilhota estará protegida individualmente, de forma que, em caso de perda de integridade, apenas algumas ilhotas serão destruídas.

No microencapsulamento, as células são imobilizadas dentro de membranas poliméricas e não citotóxicas, que constituem barreiras imunoprotetoras. A membrana deve

ser biocompatível, mecanicamente estável, com poros que permitam difusão passiva de produtos e nutrientes (Figura 34). Especificamente, a membrana deve ser discriminativa em termos de difusão molecular, permitindo a troca de nutrientes e produtos metabólicos de baixo peso molecular, como glicose, oxigênio e insulina, ao mesmo tempo em que cria uma barreira para efetores do sistema imune hospedeiro, fornecendo um ambiente adequado para a sobrevivência das células e a secreção de seus produtos terapêuticos (Figura 34). O sistema imunológico usa uma infinidade de mecanismos para rejeitar enxertos, a maioria dos quais depende de contatos célula-célula e de macromoléculas efetoras, portanto, a resistência ao contato e à difusão constitui o fundamento da estratégia de imunoproteção por microencapsulamento. Os polímeros mais utilizados para o microencapsulamento de células são: o polietileno glicol, polivinil álcool, poliuretano, polietersulfona, polipropileno, poliacrilato, agarose, quitosana, celulose, colágeno, xantana e alginato. Atualmente, considera-se que apenas o alginato de sódio foi suficientemente estudado de forma a qualificá-lo como seguro para aplicação em humanos (DE VOS et al., 2014).

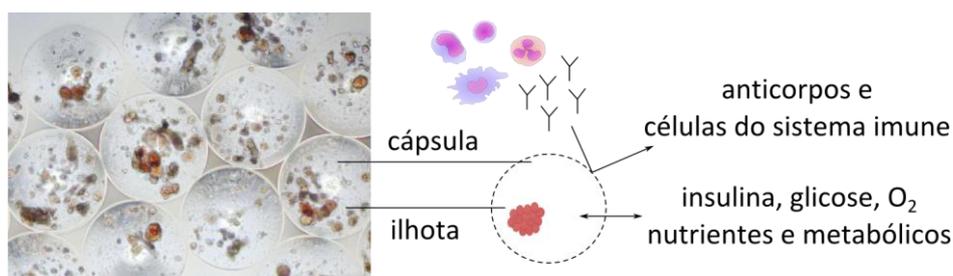


Figura 34: Imagem de microcápsulas envolvendo ilhotas pancreáticas de rato coradas com Ditizona e representação esquemática da função das microcápsulas, que permitem a troca de metabolitos e nutrientes e impede a entrada de anticorpos e células do sistema imune na cápsula.

3.1.2. Alginato de sódio

O alginato de sódio é um polissacarídeo aniônico isolado a partir de algas marrons e algumas bactérias, sendo amplamente utilizado para o microencapsulamento de células devido à sua abundância, propriedades de gelificação e biocompatibilidade (SCHARP;

MARCHETTI, 2014). O alginato de sódio é um copolímero não-ramificado de ácido gulurônico (G) e ácido manurônico (M) (Figura 35). O alginato é composto por blocos-G, blocos-M e blocos-MG (Figura 35), os quais podem ser encontrados em razões e em pesos moleculares variáveis nas diferentes preparações, o que confere diferentes propriedades ao alginato (PAREDES JUÁREZ et al., 2014). A maior abundância de G confere ao copolímero maior rigidez e resistência, já as unidades de M fornecem maior flexibilidade ao alginato.

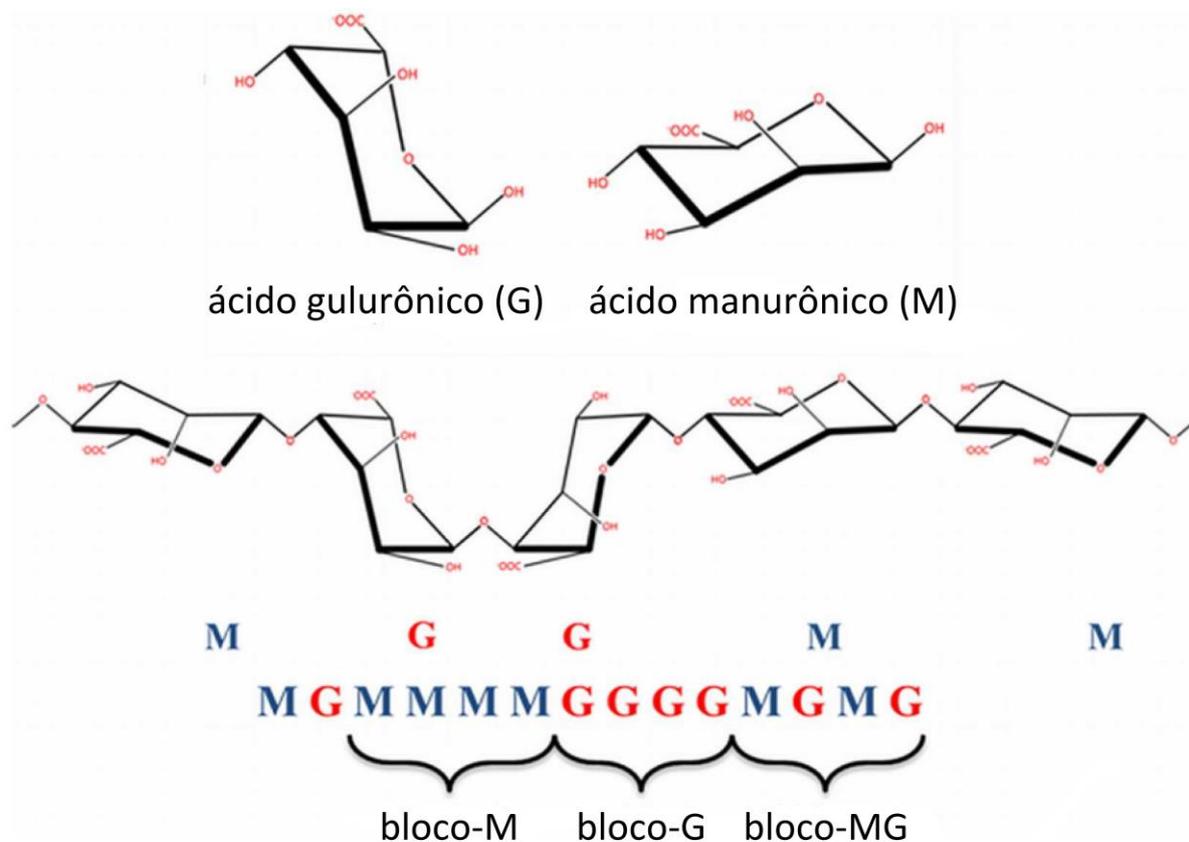


Figura 35: Estrutura química do alginato. Copolímero não-ramificado de ácido α -L-gulurônico (G) e ácido β -D-manurônico (M) com variações na composição e na sequência dos resíduos. Adaptado de PAREDES JUÁREZ et al., 2014.

Para encapsular ilhotas pancreáticas em alginato de sódio, as ilhotas são misturadas com o alginato e colocadas numa bomba de ejeção para a formação de micro gotas, contendo as ilhotas, por extrusão da mistura através de uma agulha e coleta das micro gotas em uma solução contendo cátions divalentes, chamada de solução de gelificação, de forma a polimerizar rapidamente a gota e formar a cápsula que contém as ilhotas pancreáticas

(Figura 36). Nesse processo, ocorre a associação das unidades de alginato com os cátions, criando uma malha interconectada e rígida (Figura 36C). A rigidez e a elasticidade do polímero também são determinadas pelas propriedades químicas do cátion utilizado, como: número atômico, raio iônico, força iônica e afinidade química pelo alginato. A ligação aos íons é altamente seletiva e a afinidade depende fortemente da composição do alginato. Especificamente, cátions bário (Ba^{2+}) se associam a blocos-G e -M, cálcio (Ca^{2+}) se liga a blocos-G e -MG, estrôncio (Sr^{2+}) se liga apenas a blocos-G (PAREDES JUÁREZ et al., 2014). A quantidade de blocos e a concentração de cátions determinam o grau de ligações cruzadas, assim, determinam, também, a rigidez, a resistência, e a permeabilidade da cápsula, logo, determinam as propriedades imunoprotetoras da membrana. Foi demonstrado que o uso de cátions bário para induzir a polimerização do alginato gera uma malha com permeabilidade seletiva ideal para imunoprotoger as ilhotas pancreáticas, permitindo a troca de metabólitos e nutrientes (DUVIVIER-KALI et al., 2001).

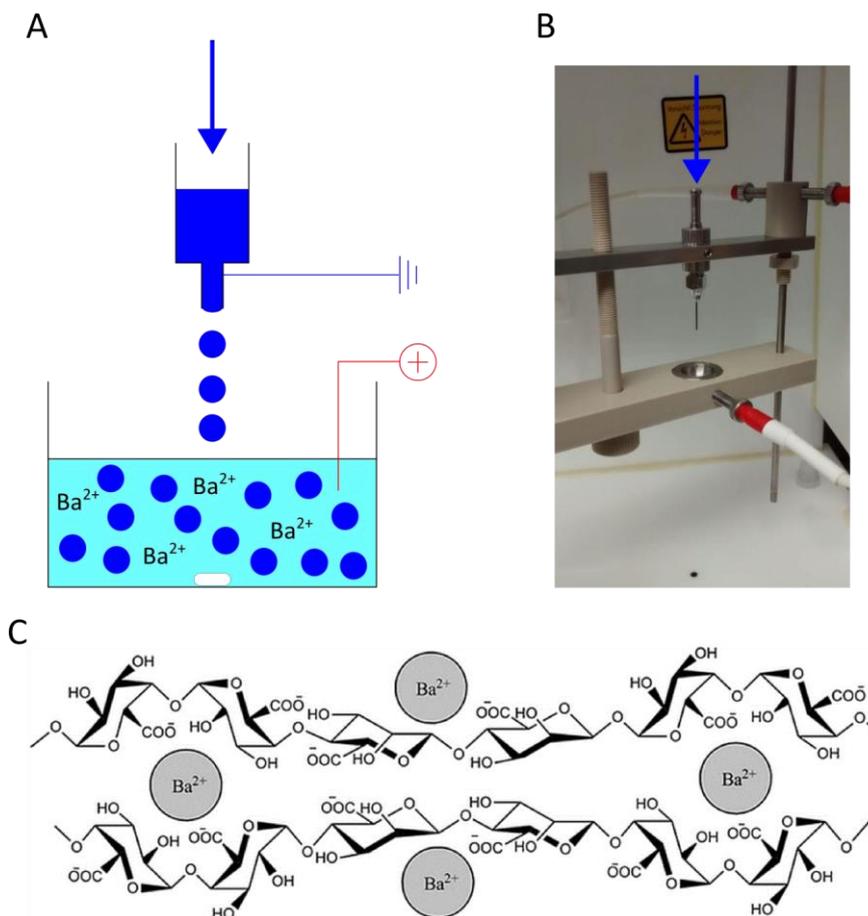


Figura 36: Produção de microcápsulas. (A) Esquema ilustrativo do processo de produção de microcápsulas através do gotejamento em solução contendo íons Ba^{2+} (solução de gelificação). A agulha de extrusão e a solução de gelificação são eletricamente carregadas. As cápsulas produzidas são mantidas separadas umas das outras através de agitação fornecida por agitador e barra magnética (bastão branco). (B) Detalhe da unidade de encapsulamento eletrostática. A seta azul indica a direção do fluxo de biomaterial que será extrusado pela agulha. O potencial eletrostático estabelecido entre a agulha e o eletrodo em anel, forma as gotas de biomaterial, que são direcionadas através do orifício do eletrodo para a solução de gelificação. (C) Na solução de gelificação, as microcápsulas são formadas através da interação entre os íons Ba^{2+} e as cadeias de alginato. O Ba^{2+} se liga a blocos-G e -M. Adaptado de PAREDES JUÁREZ et al., 2014.

3.1.3. Eficiência do transplante de ilhotas pancreáticas encapsuladas

Um grande número de estudos pré-clínicos utilizando ilhotas alogênicas ou xenogênicas encapsuladas e transplantadas em modelos animais imunocompetentes de diabetes, incluindo roedores, cães e porcos, foram realizados nas últimas três décadas (SCHARP; MARCHETTI, 2014). Esses estudos mostraram que, nas melhores condições experimentais, o enxerto de ilhotas pancreáticas microencapsuladas é, de fato, capaz de

reverter a hiperglicemia por períodos de tempo variáveis, embora a correção não seja definitiva. (CALAFIORE; BASTA, 2014; SCHARP; MARCHETTI, 2014). A maioria desses testes pré-clínicos utilizaram microcápsulas de alginato implantadas intraperitonealmente e apresentaram complicações variadas, como: reações inflamatórias, aumento do tamanho do enxerto e deposição fibrótica na superfície das capsulas, com consequente insuficiência no suprimento de oxigênio e nutrientes e morte das ilhotas encapsuladas (CALAFIORE; BASTA, 2014). Na verdade, em modelos murinos, cerca de 60% das ilhotas implantadas morrem nas primeiras semanas após o transplante devido à reação inflamatória (DE VOS et al., 2014).

O transplante de ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas em diferentes biomateriais em pacientes de DM1 não-imunossuprimidos também foi avaliado em alguns testes clínicos, nos quais a maioria dos implantes foi realizado na cavidade intraperitoneal, utilizando anestesia local e cirurgia laparoscópica. Não foram observadas reações adversas em relação ao procedimento de enxerto, nem evidência de sensibilização imune do paciente, indicando que as microcápsulas impediram a detecção de antígenos estranhos pelo hospedeiro, apesar da falta de tratamento imunossupressor (BASTA et al., 2011; CALAFIORE et al., 2006; TUCH et al., 2009). Em termos de resultado metabólico, os pacientes apresentaram declínio do consumo diário de insulina exógena, porém, os benefícios metabólicos foram parciais e transitórios (BASTA et al., 2011; CALAFIORE et al., 2006; TUCH et al., 2009). Outro trabalho demonstrou que ilhotas de porco encapsuladas sobrevivem em paciente humano por até 10 anos após o transplante (ELLIOTT et al., 2007). Esses resultados demonstraram a segurança e a viabilidade do encapsulamento de células em longo prazo *in vivo*, porém, também destacam as limitações no procedimento de encapsulamento das ilhotas pancreáticas, pois os testes em humanos não eliminaram a necessidade de suplementação com insulina exógena e os resultados metabólicos alcançados foram

marginais. Espera-se que melhorias na formulação das microcápsulas auxiliem na obtenção de um resultado metabólico mais adequado, sem demandar o uso de maior massa de ilhotas pancreáticas ou, ainda, permitindo atingir a normoglicemia através de enxertos menores.

As ilhotas pancreáticas são agrupamentos de células muito sensíveis, que demandam fatores nutricionais, hormônios e componentes de matriz extracelular (MEC) para estabelecer um microambiente adequado. O encapsulamento de ilhotas pancreáticas é uma abordagem que visa proteger as ilhotas encapsuladas da recorrência autoimune do DM1, bem como da destruição imune do alo-enxerto ou do xeno-enxerto. Porém, existem outras causas, não imunes, de destruição de ilhotas encapsuladas. Estas causas incluem: a oxigenação inadequada, reações inflamatórias agudas ao implante, acúmulo de proteínas e isolamento do implante devido à presença de macrófagos e outras células na superfície, intolerância das ilhotas pancreáticas ao encapsulamento e perda de componentes da matriz extracelular durante o isolamento das ilhotas pancreáticas (SCHARP; MARCHETTI, 2014).

3.1.4. Matriz extracelular (MEC)

A MEC é um complexo dinâmico de diferentes moléculas, que serve como um arcabouço e que também regula diversos processos celulares, como: a proliferação, a diferenciação e a migração de células, além de também modular e atenuar respostas inflamatórias (ARROYO; IRUELA-ARISPE, 2010). Quanto à localização e composição, existem dois tipos principais de MEC: a matriz intersticial, que circunda e fornece um arcabouço estrutural às células, e a membrana basal, uma forma especializada de MEC, que separa o tecido epitelial ou endotelial do tecido conectivo. Além de prover suporte estrutural às células, é a membrana basal que atua na sinalização celular, sendo o componente mais importante do microambiente das ilhotas pancreáticas (WANG; ROSENBERG, 1999).

O processo de isolamento das ilhotas pancreáticas, baseado na digestão mecânica e enzimática do órgão total, não é controlável de forma a apenas liberar as ilhotas pancreáticas do tecido exócrino, uma vez que o processo também danifica muitos componentes da membrana basal que circunda as ilhotas e interconectam as células endócrinas, afetando a função das ilhotas pancreáticas, que entram em diferentes processos de morte como necrose e apoptose, principalmente *anoikis*, uma forma de morte celular programada que ocorre quando células dependentes de ancoragem são desassociadas da MEC circundante (LLACUA; FAAS; VOS, 2018). A restauração da MEC pode reduzir a morte celular e aumentar a sobrevivência dos enxertos de ilhotas pancreáticas isoladas. Foi demonstrado o potencial da suplementação da cultura de ilhotas pancreáticas pós-isolamento com elementos de MEC em aumentar a sobrevivência e a função do enxerto (CHENG et al., 2011; WANG; ROSENBERG, 1999; WEBER; HAYDA; ANSETH, 2008). Cada órgão apresenta uma MEC de composição única. As moléculas mais abundantes na MEC de ilhotas pancreáticas são: colágeno VI, fibronectina e laminina (VAN DEIJNEN et al., 1992).

3.1.5. Laminina

As isoformas de laminina (850kDa) compõem uma família de glicoproteínas extracelulares. As lamininas são heterotrímeros cruciformes compostos de três cadeias de polipeptídios α , β , e γ , as quais são unidas por ligações dissulfeto (Figura 37A). No genoma humano, 11 genes codificam cinco subunidades α , três subunidades β e três subunidades γ (AUMAILLEY, 2013). As isoformas de laminina são nomeadas de acordo com as cadeias que as compõem. Assim, a laminina-111 (ou laminina-1), por exemplo, é composta pelas cadeias $\alpha 1$, $\beta 1$ e $\gamma 1$. A estrutura cruciforme das moléculas de laminina é assimétrica, havendo um braço longo, de aproximadamente 77nm, contendo um grande domínio globular em sua

extremidade e três braços curtos, sendo dois de 34nm e um de 48nm, também contendo domínios globulares na extremidade (AUMAILLEY, 2013) (Figura 37A). Entre o centro da cruz e as extremidades dos braços curtos existem domínios globulares adicionais (AUMAILLEY, 2013). As extremidades C-terminal das moléculas de laminina interagem com proteínas ancoradas na membrana plasmática de células, principalmente receptores como as integrinas, transmitindo, assim sinais bioquímicos e mecânicos entre redes moleculares intracelulares e extracelulares (Figura 37A). As extremidades N-terminais das moléculas de laminina estão envolvidas principalmente em interações com outras moléculas de MEC presentes na membrana basal, dessa forma, a laminina é parte integral da complexa rede de moléculas extracelulares fundamentais para a arquitetura e fisiologia da membrana basal (Figura 37A). Além disso, lamininas interagem com pequenas moléculas, como fatores de crescimento e citocinas, de forma a sequestra-las, armazena-las e regular sua distribuição, ativação e apresentação às células do sistema imune e inflamatório (AUMAILLEY, 2013). Dessa forma, as isoformas de laminina organizam a estrutura tecidual e fornecem sinais extracelulares que controlam diversos fenômenos biológicos.

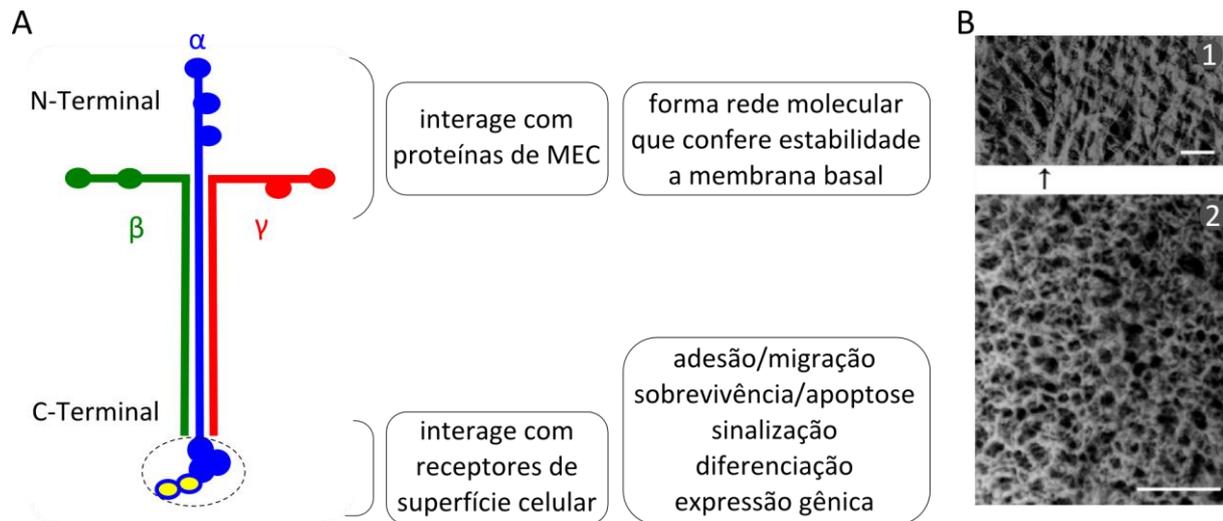


Figura 37: Estrutura da laminina. (A) Modelo representativo da estrutura da laminina e mapeamento das suas principais funções. O braço curto da laminina (N-terminal) está envolvido com a função estrutural na membrana basal, enquanto a terminação do braço longo (C-terminal) está envolvida com interações celulares. (B) Análise, por microscopia eletrônica, do polímero de laminina (polilaminina), induzido através de acidificação do meio, revela a organização em polígonos. A seta indica a transição de camada simples para camada dupla de polímero. As barras de escala indicam 100nm em (1) e 200nm em (2). Adaptado de (BARROSO et al., 2008).

Laminina induz a expressão de fatores de transcrição e hormônios específicos de ilhotas pancreáticas, como PDX-1 (*pancreatic and duodenal homeobox 1*), insulina, glucagon, somatostatina e Glut-2 (LEITE et al., 2007). Nosso grupo demonstrou que a adição de laminina ao meio de cultura de ilhotas humanas, contendo o hormônio prolactina, induz maior secreção de insulina frente ao estímulo de glicose (LABRIOLA et al., 2007). Além disso, a partir do material-base Biodritina, composta de alginato de sódio e sulfato de condroitina, um composto presente na MEC que oferece uma maior estabilidade mecânica às microcápsulas (CAMPOS-LISBÔA et al., 2008), nosso laboratório desenvolveu e patenteou um novo biomaterial, pela adição de laminina, chamado Bioprotect[®], para o microencapsulamento de ilhotas pancreáticas e outros tipos celulares (CAMPANHA RODRIGUES et al., 2013; SOGAYAR, MARI C et al., [s.d.]). Foi demonstrado que a adição de laminina gera modulação gênica, proteica e funcional de ilhotas pancreáticas microencapsuladas, proporcionando normoglicemia, por período de tempo prolongado, em

animais diabéticos (CAMPANHA RODRIGUES et al., 2013). Entretanto, observou-se que 198 dias após o transplante de ilhotas encapsuladas com Bioprotect em camundongos diabéticos, 40% dos animais retornaram à hiperglicemia e que 65% das cápsulas de Bioprotect, recuperadas do grupo de animais hiperglicêmicos, apresentava mais da metade da área tomada por células aderidas (RODRIGUES, 2012). Dessa forma, espera-se que melhorias na formulação das microcápsulas, que evitem a ativação da resposta inflamatória e perda da viabilidade do enxerto, auxiliem na obtenção de um resultado metabólico mais adequado, permitindo até atingir a normoglicemia através de enxertos menores.

3.1.6. Polilaminina

As funções atribuídas às isoformas de laminina dependem, diretamente, da organização supramolecular da laminina, a qual é determinada pelas interações entre as moléculas de laminina e entre laminina e outras macromoléculas. Os polímeros de laminina formados *in vivo* ocorrem devido à interação dos braços longos da molécula de laminina com receptores de membrana, de forma a conectar o polímero à superfície celular, deixando o braço curto das moléculas livres para interagirem e formarem uma folha hexagonal contínua (LI et al., 2005), inclusive, esse tipo de estrutura é encontrada em associação com corpos embrióides (LOHIKANGAS; GULLBERG; JOHANSSON, 2001). Estudos *in vitro* sobre os efeitos da laminina na função celular são feitos utilizando matrizes artificiais, preparadas por adsorção da proteína na superfície de materiais para cultura celular. Assume-se que a laminina adsorvida formará uma rede molecular que retém as propriedades das matrizes de laminina encontradas *in vivo*. Porém, a polimerização de laminina não corresponde à agregação aleatória de proteínas, sendo um processo de montagem bem definido,

envolvendo interações de domínios específicos da proteína (SCHITTNY; YURCHENCO, 1990; YURCHENCO; CHENG, 1993).

A laminina pode se auto-polimerizar na ausência de células, demonstrando que a informação necessária para a formação de polímeros de laminina está contida na própria proteína (YURCHENCO et al., 1985). Inicialmente, polímeros de laminina foram obtidos *in vitro* em condições específicas, em soluções acima de concentrações críticas ou associados a bicamadas de lipídeos negativamente carregados (KALB; ENGEL, 1991; YURCHENCO et al., 1985). O grupo da Profa. Dra. Tatiana Coelho-Sampaio (Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ) desenvolveu um polímero artificial de laminina, chamado de polilaminina (PLn), obtido através de acidificação do meio, sem a necessidade de manter altas concentrações proteicas ou de fornecer superfícies lipídicas (Figura 37B). A acidificação do meio torna positiva a carga superficial dos domínios globulares do braço longo da laminina, impedindo que interajam entre si e favorecendo a interação dos braços curtos. Dessa forma, a matriz obtida é formada pelas interações entre as terminações do braço curto de laminina, enquanto os braços longos ficam livres no plano ortogonal, gerando um polímero artificial com a mesma estrutura hexagonal planar encontrada *in vivo* (BARROSO et al., 2008) (Figura 37B).

Medidas de espalhamento de luz mostram que a polimerização ocorre instantaneamente, no primeiro minuto após a diluição da laminina em tampão pH 4, e não envolve desnaturação proteica ou precipitação isoelétrica (FREIRE; COELHO-SAMPAIO, 2000). Foi demonstrado que a estrutura da polilaminina é mantida por interações eletrostáticas entre as terminações dos braços curtos da laminina e que essa estrutura é estável em diferentes meios de cultivo celular, em ampla faixa de temperatura e em longo prazo, demonstrando sua aplicabilidade para uso biomédico e como substrato de suporte

para *delivery* de células (FREIRE et al., 2012). Além disso, a injeção de polilaminina é capaz de promover a neuroproteção devido à inibição do processo inflamatório que ocorre após lesão na medula espinal de camundongos (MENEZES et al., 2010). Esses resultados não são observados com a injeção de laminina, demonstrando que o efeito biológico da laminina requer sua organização em uma estrutura supramolecular adequada (MENEZES et al., 2010). O mecanismo da ação da polilaminina não é completamente compreendido, mas envolve interferência com a liberação inicial de sinais inflamatórios e diminuição dos níveis de proteína C reativa no soro de animais tratados, sugerindo que a polilaminina possui propriedades anti-inflamatórias sistêmicas (MENEZES et al., 2010).

A qualidade da composição intracapsular contribui para a sobrevivência e a funcionalidade das células encapsuladas e, além disso, contribui para a prevenção de respostas inflamatórias contra o enxerto. A MEC regula diversos processos celulares, como proliferação, diferenciação e migração de células. A polilaminina, especificamente, é capaz de modular e atenuar respostas inflamatórias em camundongos, propriedade que pode beneficiar o encapsulamento de ilhotas pancreáticas por evitar a perda inicial de massa do enxerto, que chega a 60% no implante de ilhotas encapsuladas em camundongos quimicamente diabetizados (DE VOS et al., 2014).

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo geral

Este trabalho visa gerar um biomaterial inovador para o encapsulamento de células, que seja capaz de reter as propriedades anti-inflamatórias da polilaminina e atenuar a resposta do sistema imune do receptor ao implante.

3.2.2. Objetivos específicos

- a) Desenvolver um novo biomaterial através da adição de polilaminina ao material-base Biodritina e comparar sua funcionalidade à do Bioprotect, que contem laminina não polimerizada;
- b) Demonstrar a aplicabilidade do novo biomaterial para a produção de microcápsulas mecânica e termicamente estáveis;
- c) Encapsular ilhotas pancreáticas utilizando o novo biomaterial;
- d) Avaliar a capacidade das microcápsulas do novo biomaterial em modular a funcionalidade *in vitro* de ilhotas pancreáticas microencapsuladas através da análise dos níveis de secreção de insulina e da expressão gênica e proteica das células encapsuladas;
- e) Avaliar a biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* das microcápsulas;
- f) Testar o potencial imunoprotetor *in vitro* das microcápsulas contendo ilhotas pancreáticas;
- g) Determinar se o novo biomaterial é capaz de modular e atenuar respostas inflamatórias ao implante de microcápsulas em camundongos imunocompetentes.

3.3. Materiais e Métodos

3.3.1. Produção de microcápsulas

O biomaterial Biodritina (CAMPOS-LISBÔA et al., 2008) foi preparado pela mistura de alginato de sódio ultra purificado (Lgv Pronova Up, New Matrix) e de sulfato de condroitina (Kin Master), diluídos em solução de cloreto de sódio 0,15M para a concentração final de 1,2% e de 0,325%, respectivamente. O biomaterial Bioprotect® foi preparado pela adição de 10µg de laminina 1 (Invitrogen) a cada 1ml de Biodritina.

Para incorporar Polilaminina (Pln) e gerar o novo biomaterial, Bioprotect-Pln, um tampão de polimerização foi preparado com acetado de sódio 20mM e cloreto de sódio 1mM a pH 4,0. A polimerização da laminina ocorre instantaneamente após sua diluição em tampão ácido (FREIRE; COELHO-SAMPAIO, 2000), sendo assim, os polímeros são formados em solução, decantados, já no estado associado, e, então, incorporados ao biomaterial. Em uma alíquota de laminina-1 foi adicionado o tampão de polimerização, a 37°C, para a concentração final de laminina-1 de 50µg/mL. Esta suspensão foi cuidadosamente homogeneizada e centrifugada a 4°C, por 20min a 2.000 RCF (*relative centrifugal force*). A polilaminina obtida foi lavada com tampão fosfato sem Ca²⁺ e sem Mg²⁺ (PBSA) e novamente centrifugada. Em seguida, o sobrenadante foi completamente removido e o precipitado de polilaminina foi homogeneizado na mistura de alginato de sódio e sulfato de condroitina, para a concentração final de lamina-1 de 10µg/ml.

As microcápsulas foram obtidas utilizando-se uma unidade de encapsulamento eletrostática (Encapsulation Unit VARV1, Nisco), através da aplicação de uma diferença de potencial entre a agulha de extrusão do biomaterial e um eletrodo em anel (Figura 36). Os diferentes biomateriais foram infundidos no instrumento a uma velocidade de 10mL/h, utilizando-se uma bomba de seringa (Single-Syringe Infusion Pump, Cole-Parmer) e 7kV

foram aplicados à agulha pela qual o biomaterial foi extrusado (diâmetro interno de 0,7mm). O potencial eletrostático estabelecido entre a agulha e o eletrodo em anel, forma gotas de biomaterial que são direcionadas, através do orifício do eletrodo, para a solução de gelificação. A solução de gelificação é composta por 20mM de cloreto de bário (Sigma Aldrich) e 20mM de ácido N-2-hidroxietilpiperazine-N'-S-etanosulfônico (HEPES, Sigma Aldrich) e também é eletricamente carregada. Nesta solução, as microcápsulas são formadas através da interação entre os íons Ba^{2+} e as cadeias de alginato (Figura 36). O aparelho possui um agitador magnético posicionado em sua base, de forma a manter as cápsulas produzidas separadas umas das outras, durante a gelificação, através da agitação fornecida por uma barra magnética. Ao final do processo de produção, as microcápsulas foram mantidas por 5min na solução de gelificação e, então, lavadas três vezes com solução de cloreto de sódio 0,15M.

Para encapsular ilhotas pancreáticas isoladas, a suspensão celular foi homogeneizada nas soluções dos diferentes biomateriais na proporção de 8.000 ilhotas de rato ou IEQs humanas por mL de biomaterial e os mesmos passos descritos acima foram seguidos para a produção de microcápsulas contendo células.

3.3.2. Imunofluorescência indireta

Cápsulas produzidas a partir dos diferentes biomateriais (Biodritina, Bioprotect ou Bioprotect-Pln) foram submetidas à imunofluorescência indireta em suspensão, com marcação para Laminina-1. As cápsulas foram incubadas em solução de bloqueio contendo 10% de albumina humana (Griffols) em tampão fosfato (PBS) por 30min a 37°C. O anticorpo anti-laminina 1 (Sigma-Aldrich) foi diluído (1:250) em PBS e incubado com as cápsulas por 4h a 37°C. As cápsulas foram então lavadas três vezes e incubadas com anticorpo secundário

marcado com o fluoróforo Alexa Fluor 633 (Life Technologies) por 2h a 37°C. Após lavar as cápsulas três vezes, a marcação fluorescente foi observada ao microscópio de fluorescência confocal (TCS SP5 AOBS, Leica). Foram coletados Z-stacks (passos de 1,54µm; 200x magnificação), com fatias ópticas capturadas a uma profundidade focal de 3,2µm.

3.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As microcápsulas foram fixadas em glutaraldeído (Sigma-Aldrich) 2,5% solubilizado em PBSA por 1h e lavadas três vezes com PBSA. A seguir, foram incubadas em OsO₄ 1% em PBSA por 1h, novamente lavadas três vezes com PBSA, sequencialmente desidratadas em etanol nas concentrações de 50%, 70%, 95% e 100% v/v e armazenadas em etanol 100%. As amostras foram então secas em aparelho de ponto crítico (K850 Critical Point Dryer, Quorum Technologies Ltd) contendo CO₂, coletadas em fita adesiva condutora de cobre (3M) e recobertas com ouro no aparelho Desk II Sputter Coater (Denton Vacuum) em 180 segundos de exposição. A análise por MEV foi realizada em aparelho JSM-6460 LV (Scanning microscope, JEOL) na voltagem de 20kV.

3.3.4. Testes de estabilidade das microcápsulas

A estabilidade térmica e mecânica das microcápsulas de Bioprotect ou de Bioprotect-Pln foi avaliada em cinco ensaios *in vitro*. Em todos os ensaios foram avaliadas variações de diâmetro e do número de cápsulas rompidas. Após a produção, 100 cápsulas de cada formulação tiveram seu diâmetro determinado em microscópio de contraste de fase com a ajuda de uma objetiva acoplada a uma rede micrométrica, compondo o controle experimental (Tempo 0). Ao final de cada ensaio, outras 100 cápsulas foram avaliadas.

O teste de temperatura avaliou a estabilidade térmica das microcápsulas, 0,5 mL de microcápsulas de cada formulação foram incubadas em solução 0,15M de cloreto de sódio (Sigma-Aldrich) e mantidas por 1h e 24h, a 37 ou 40°C. No teste rotacional, 0,5 mL de microcápsulas foram mantidos em solução 0,15M de cloreto de sódio em agitação a 150 rotações por minuto (RPM) por 30 dias a 37°C. O teste osmótico consistiu em manter 0,5 mL de cápsulas incubadas em água destilada por 30 dias a 37°C. No teste de cultura, 0,5mL de cápsulas foram incubadas por 30 dias em condições de cultivo celular: meio de cultivo RPMI-1460 (Gibco) contendo 10% soro fetal bovino (SFB, Cultilab), a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Por fim, um teste misto foi realizado, no qual 0,5mL de cápsulas foram incubadas em condições de cultivo celular e em agitação a 150 RPM por 30 dias.

3.3.5. Cultivo celular

Todo o trabalho de cultivo celular foi realizado em frascos plásticos adequados (cultivo em suspensão para ilhotas pancreáticas e cultivo aderente para as demais linhagens celulares). Os valores de pH e de temperatura de cultivo foram mantidos próximos às condições fisiológicas através da incubação das células em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Foram estabelecidos estoques das linhagens celulares em meio contendo 10% de dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich) e SFB, os quais foram mantidos em reservatórios contendo nitrogênio líquido.

3.3.5.1. Isolamento e cultivo de ilhotas pancreáticas de rato

Todos os procedimentos experimentais realizados com animais seguiram protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal do Instituto de Química da USP (CEUA-IQ-USP). Ratos Wistar e camundongos Balb/C foram mantidos no Biotério de

Experimentação do Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL) da Faculdade de Medicina da USP, em ambiente com temperatura e luminosidade controladas, em gaiolas e com livre acesso à comida e água.

Ilhotas pancreáticas foram obtidas a partir de pâncreas extraídos de ratos Wistar machos. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (75mg/Kg do animal) (Dopalen, Ceva) e xilazina (10mg/kg do animal) (Anasedan, Ceva). Após antissepsia com solução de povidona iodada (Rioquímica) foi realizada tricotomia abdominal e laparotomia mediana ventral. O ducto pancreático foi então clampeado próximo à sua comunicação com o duodeno e uma cânula foi inserida na sua porção adjacente ao fígado. Com o auxílio da cânula, 10mL de solução 0,17mg/mL da enzima colagenase (Liberase RI, Roche) foram infundidos no pâncreas do animal. Em seguida, o animal foi exsanguinado através do corte de vasos mesentéricos e o pâncreas foi cuidadosamente extraído, lavado em PBSA gelado e, após a remoção de linfonodos e do excesso de gordura, cortado em pedaços menores e mantido no gelo até o momento da digestão enzimática.

A digestão enzimática dos pâncreas foi realizada em tubos cônicos, com temperatura controlada por banho-maria a 37°C, por 20min. O material digerido foi processado pela passagem através de uma malha de 800µm e lavado em meio de cultura RPMI-1640. O material recuperado foi centrifugado por 1min a 1.000 RPM, o sedimento foi homogeneizado em 10mL de Ficoll (Sigma Aldrich) com densidade de 1,110 g/cm³ e um gradiente descontínuo de densidade foi formado pela adição de três outras camadas de Ficoll (densidades 1,096, 1,069 e 1,037 g/cm³), de forma a induzir a separação das ilhotas do restante do tecido pancreático. Após centrifugação por 15min a 2000RPM, as ilhotas purificadas foram visualizadas entre as camadas de densidade 1,096 e 1,069 g/cm³ e coletadas. As ilhotas purificadas foram lavadas e cultivadas em meio CMRL 1066 (Mediatech-

Cellgro) contendo 10% SFB. Através da coloração com Ditizona (Sigma-Aldrich) e observação sob microscópio invertido (Nikon Corporation), foi realizada a contagem da quantidade de ilhotas obtidas por procedimento e a avaliação da pureza. Ditizona é um corante utilizado para determinar a pureza de preparações de ilhotas pancreáticas humanas (RICORDI et al., 1990) e em caméras de diabéticos foram monitoradas, uma vez que se coordena aos íons zinco necessários para a formação de hexâmeros de insulina dentro das células- β , marcando, portanto, as células- β insulina-positivas em vermelho. O número total de ilhotas pôde, então, ser obtido e seus tamanhos aferidos, com a ajuda de uma objetiva acoplada à uma rede micrométrica.

3.3.5.2. Isolamento e cultivo de ilhotas pancreáticas humanas

As ilhotas pancreáticas humanas foram obtidas a partir de pâncreas de doadores humanos falecidos, após consentimento livre e esclarecido (TCLE), de acordo com protocolo previamente aprovado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e segundo as normas da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. O ducto pancreático de Wirsung foi canulado para que fosse infundida uma solução enzimática contendo colagenase e protease neutra (Collagenase & Neutral Protease, Serva). Após a perfusão da mistura enzimática, o pâncreas é fragmentado em pedaços grandes, os quais são colocados em câmara de digestão contendo enzimas e mantido sob agitação até que ocorra a separação das ilhotas do tecido exócrino pancreático. Amostras de material digerido foram retiradas ao longo da digestão do pâncreas e coradas com ditizona. A digestão foi interrompida quando mais de 50% das ilhotas estavam livres do tecido acinar. O material obtido na digestão foi submetido a um processo de centrifugação em gradiente contínuo de Ficoll, utilizando o processador de células COBE® 2991 (Caridian BCT), o qual possibilita a obtenção de ilhotas purificadas. As

ilhotas pancreáticas isoladas foram mantidas em cultura em meio CMRL-1066, contendo 5,6mM de glicose e 0,5% de albumina humana. O mesmo procedimento utilizado para contar e avaliar o grau de pureza das ilhotas pancreáticas de rato foi utilizado para as ilhotas humanas, porém, as ilhotas humanas foram contadas através de um método que normaliza o tamanho das ilhotas para 150 μ m, cuja unidade é denominada Índice de Equivalentes de Ilhotas (IEQ).

3.3.5.3. Linhagem RAW264.7 de macrófagos murinos

A linhagem celular de macrófagos murinos RAW264.7 (TIB-71, American Type Culture Collection, ATCC) foi mantida em meio de cultura DMEM (LGC Biotecnologia) suplementado com 10% SFB. O meio de cultura foi trocado a cada três dias e as culturas foram tripsinizadas para subcultivo quando atingiam 90% da densidade de saturação.

3.3.6. Análise da secreção de insulina

As ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas com Bioprotect ou Bioprotect-Pln foram cultivadas em condição padrão por 48h e submetidas ao teste de secreção de insulina frente ao estímulo de glicose. Soluções Krebs-Henseleit (Sigma-Aldrich) suplementadas com 0,2% albumina (Griffols) e contendo baixa (2,8mM) ou alta (16,7mM) concentração de glicose foram utilizadas. Para a realização do ensaio, cinco ilhotas pancreáticas foram selecionadas, o sobrenadante da cultura celular foi descartado e as células foram incubadas por 1h a 37°C em solução contendo baixa concentração de glicose. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBSA e incubadas por mais 1h, a 37°C em solução contendo baixa concentração de glicose. O sobrenadante obtido foi armazenado a -20°C. O procedimento foi repetido, porém, as células foram então incubadas por 1h a 37°C em

solução contendo alta concentração de glicose. As soluções incubadas também foram armazenadas a -20°C para posterior análise do conteúdo de insulina secretado pelas células. As amostras foram dosadas através de ensaios de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), utilizando-se kits comerciais para detecção de insulina (ELISA kit, Millipore), de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.7. Análise do perfil de expressão gênica

3.3.7.1. Extração de RNA total

O RNA total de amostras contendo 1.000 ilhotas de rato encapsuladas com Bioprotect ou Bioprotect-Pln, cultivadas em condição padrão por 48h, foi obtido utilizando-se o método de extração por Fenol-Clorofórmio (Trizol, Invitrogen). Foram adicionados $500\mu\text{L}$ do reagente Trizol às amostras de culturas celulares e, em seguida, adicionou-se $200\mu\text{L}$ de clorofórmio (Merck). As amostras foram agitadas vigorosamente e incubadas por 15 minutos a 4°C . Após centrifugação a 12.000g , por 15min, a 4°C , o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e um volume igual de isopropanol (Merck) foi adicionado. As amostras foram incubadas a -20°C por meia hora, novamente centrifugadas a 12.000g por 15min, a 4°C e os sobrenadantes foram descartados. Foi realizada a lavagem do precipitado branco com 1mL de etanol absoluto (Merck). Após centrifugação a 12.000g , por 15min, a 4°C , o sobrenadante foi descartado e o etanol residual foi evaporado. O precipitado foi então dissolvido e homogeneizado em $30\mu\text{L}$ de água ultrapura (Milli-Q, Millipore). A partir de $2\mu\text{L}$ de cada amostra foi estimada a concentração de RNA total, através de leitura espectrofotométrica a 260/280nm, no espectrofotômetro NanoDrop-1000 (NanoDrop Technologies). As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento de produção das fitas de cDNA.

3.3.7.2. Síntese de cDNA

Alíquotas de 1µg de RNA total foram utilizadas na síntese de fitas simples de cDNA por transcrição reversa, utilizando-se a enzima Super Script III (Invitrogen). Cada amostra de RNA foi submetida à uma reação contendo 0,5µL de Oligo dT (0,5 µg/µl) (Invitrogen), 0,5µL de *primers* randômicos (100 ng/µL) (Invitrogen) e 1µL de dNTPs (10 mM) (Invitrogen) para um volume final de 12µL. As amostras foram incubadas a 75°C por 10min para desnaturação das moléculas e, em seguida, foram adicionados 2µL de DTT (0,1 mol/L) (Invitrogen), 0,5 µL de RNase OUT (40 U/µL) (Invitrogen), 1 µL da enzima Super Script III (Invitrogen), 2µL do tampão da enzima e 2,5µL de água ultrapura para um volume final de 20µL. A reação foi incubada por 10min, a 25°C, e, em seguida, por 2h a 50°C e 10min a 72°C. Após a adição de 1µL de RNase H (5 U/µL) a cada reação, as amostras foram incubadas a 37°C por 30min, para degradação do RNA, seguida de incubação a 72°C, por 10min, para a inativação da enzima RNase H.

3.3.7.3. *Primers* utilizados e determinação de sua eficiência

Os *primers* utilizados foram desenhados através do *software* Primer Express, versão 3.0 (Applied Biosystems) e avaliados pela ferramenta *online* Primer-BLAST (NCBI). Para o cálculo da eficiência dos *primers*, foram realizadas reações de amplificação contendo *primers* na concentração de 600 nM e, como molde, uma mistura de cDNAs diluídos em série (1:30, 1:60, 1:120, 1:240, 1:480). A análise da regressão linear dos valores de Cts em função do logaritmo da respectiva diluição fornece o coeficiente angular da reta (a, em $y=ax+b$), que é utilizado para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos *primers*, utilizando-se a fórmula: $Ef=10^{-(1/\text{coeficiente angular})}$.

Tabela 6: Sequência dos *primers* utilizados.

Gene	Sequência <i>forward</i>	Sequência <i>reverse</i>
Insulina 1	CCCTAAGTGACCAGCTACAATCATAG	TTTGACAAAAGCCTGGGCAGGCTT
Bcl-xl	CAGACCCAGTGAGTGAGCAG	CCGGTTGCTCTGAGACATTT
Bcl-2	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	ACAGTTCCACAAAGGCATCC
Mcp-1	AGCCAACCTCTCACTGAAGCC	TGGGGCATTAACTGCATCTGG
Hsp70	TTGACAAGAGCATGGCAGTC	AGTTGCCCACTGGATTAACG
Bax	CAAGAAGCTGAGCGAGTGTC	GAAGTTGCCGTCTGCAAACA
Caspase 3	TGGACAGCAGTTACAAAATGGA	GCGAGCTGACATTCCAGTG
Hprt	GTCCCAGCGTCGTGATTAGC	TCATGACATCTCGAGCAAGTCTTT

3.3.7.4. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Para as reações de qRT-PCR, foi utilizado o reagente SYBR Green Dye (Applied Biosystems). Cada reação de qRT-PCR foi preparada com 3µL de cDNA 30 vezes diluído, 3µL do conjunto de *primers* (*forward* e *reverse*) e 6µL do reagente SYBR Green Dye. Os experimentos de qRT-PCR foram realizados no aparelho Real-Time PCR 7300 (Applied Biosystems), seguindo um ciclo de desnaturação inicial de 10min a 95°C e 40 ciclos de amplificação (30seg de desnaturação a 95°C e 1min de anelamento e extensão a 60°C). O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados foram realizados pelo programa computacional GeneAmp 5700 (Applied Biosystems). Na análise dos dados, estabeleceu-se um valor arbitrário de corte na fase exponencial da amplificação do gene. Assim, foi obtido o valor de *threshold cycle* da amostra, que representa o número de ciclos necessários para que a amostra atinja o valor de corte. Os resultados foram calculados utilizando-se o método $\Delta\Delta C_t$, sendo utilizado o gene *Hprt* como controle endógeno. A especificidade do sinal foi confirmada através da análise das curvas de dissociação do produto amplificado.

3.3.8. Análise de expressão proteica

Extratos proteicos foram obtidos a partir de amostras contendo 1.000 ilhotas de rato encapsuladas com Bioprotect ou Bioprotect-Pln, cultivadas em condição padrão por 48h, em

solução de lise contendo inibidores de protease e de fosfatase (10mM TRIS pH 7,5; 150mM NaCl; 5mM EDTA; 1mM EGTA; 1mM DTT; 1% NP-40; 0,1% SDS; 1% desoxicolato; 1mM Na₃VO₄; 25mM de NaF, inibidor de fosfatase (Sigma-Aldrich) e inibidor de protease (GE Healthcare)) a 4°C. As amostras foram centrifugadas a 20.000g por 30min e o sobrenadante, correspondente ao extrato proteico, foi quantificado pelo método colorimétrico de Bradford (Bradford Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Inc), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) para compor uma curva-padrão. As amostras foram armazenadas a -80°C.

Para os experimentos de Western Blotting, 30µg de cada extrato proteico foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). O padrão proteico utilizado compreendia padrões de massas moleculares de 10-250 kDa (Dual Color Standards, BioRad). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (BioRad) por transferência úmida, em tampão de transferência (0,3% de Tris m/v, Glicina 1,44% m/v, SDS 0,1% m/v e metanol 20% v/v), sob 100V, a 4°C por 2h. As membranas foram bloqueadas incubando-as em solução de bloqueio (Tris-buffered saline (TBS) contendo 5% de leite desnatado em pó ou albumina bovina sérica (BSA) e 0,1% de Tween 20 (Sigma-Aldrich)), à temperatura ambiente por 1h. Os seguintes anticorpos foram utilizados: rabbit anti-Xiap, rabbit anti-Bax, rabbit anti-Bcl-2 (1:400, Cell Signaling), mouse anti-α-Tubulina (1:4.000, Sigma-Aldrich) e anticorpos secundários conjugados com Horseradish Peroxidase (HRP) (Vector Laboratories).

A detecção da proteína de interesse foi realizada por imunorreação. Primeiramente, a membrana foi incubada *overnight*, sob agitação a 4°C, com solução de bloqueio contendo o anticorpo primário. As membranas foram lavadas três vezes, por 5min cada, com solução de lavagem (TBS contendo 0,05% de Tween 20) e incubadas por 1h à temperatura ambiente,

com anticorpo secundário apropriado conjugado à peroxidase. As membranas foram lavadas três vezes com solução de lavagem e reveladas utilizando sistema quimioluminescente (Clarity Western ECL Blotting Substrates, BioRad). A intensidade das bandas obtidas foi registrada utilizando-se o sistema ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Entre dois ensaios de Western Blot que utilizaram a mesma membrana de nitrocelulose, foi feita a remoção dos anticorpos da imunorreação de detecção inicial utilizando-se tampão de *stripping* (1,5% glicina (Ajinomoto), 0,1% SDS (LGC Biotecnologia), 1% Tween 20, pH 2,2) e duas incubações de 5min. Em seguida, a membrana foi novamente bloqueada e procedeu-se com nova imunorreação.

3.3.9. Ensaios de biocompatibilidade das microcápsulas *in vitro*

A biocompatibilidade imunológica das microcápsulas de Bioprotect e Bioprotect-PIIn foi comparada através do cultivo de 10^6 células da linhagem RAW264.7 de macrófagos murinos com 100 cápsulas vazias de cada formulação. A incubação das microcápsulas com os macrófagos foi mantida por 9h. Como controle positivo para ativação dos macrófagos, 10^6 células foram cultivadas com 2, 1 ou 0,125 μ g/mL de lipopolissacarídeo (LPS). Macrófagos não expostos a cápsulas nem a LPS foram utilizados como controle negativo de ativação. Em seguida, a expressão das citocinas *Il-1 β* e *Tnf- α* foi quantificada por qRT-PCR, de acordo com os procedimentos descritos no item 3.3.7.

Tabela 7: Sequencia de primers utilizados

Gene	Sequência <i>forward</i>	Sequência <i>reverse</i>
<i>Hprt</i>	GTCCCAGCGTCGTGATTAGC	TCATGACATCTCGAGCAAGTCTTT
<i>Il-1β</i>	AGTTGACGGACCCCAAAGA	GGACAGCCAGGTCAAAGG
<i>Tnf-α</i>	CCACGCTCTTCTGTCTACTGAACTT	TGAGAGGGAGGCCATTTGG

3.3.10. Avaliação do potencial imunoprotetor *in vitro* das microcápsulas

O potencial imunoprotetor *in vitro* das microcápsulas foi avaliado através do cultivo de 10^6 células da linhagem RAW264.7 de macrófagos murinos com 100 cápsulas de Bioprotect ou de Bioprotect-PIn contendo o mesmo número de ilhotas pancreáticas humanas. A incubação das microcápsulas com os macrófagos foi mantida por 9h. Como controle positivo para ativação dos macrófagos, 10^6 macrófagos foram cultivados com ilhotas pancreáticas nuas em número correspondente às condições experimentais. Macrófagos não expostos a cápsulas nem a ilhotas pancreáticas foram utilizados como controle negativo de ativação. Em seguida, a expressão das citocinas *Il-1 β* e *Tnf- α* foi quantificada por qRT-PCR, conforme procedimento descrito no item 3.3.7.

3.3.11. Avaliação da biocompatibilidade das microcápsulas *in vivo*

Para avaliar a biocompatibilidade das microcápsulas *in vivo*, 200 μ L de cápsulas de Bioprotect ou de Bioprotect-PIn foram implantadas na região intraperitoneal de camundongos Balb/C imunocompetentes com aproximadamente oito semanas de vida. Os animais foram anestesiados com o anestésico inalatório isoflurano (Cristália) 1 a 2,5% tendo, como veículo, o gás oxigênio. Através de uma pequena incisão ventral (<0,5cm) as microcápsulas de Bioprotect ou Bioprotect-PIn foram inseridas com cateter de calibre 14G. O peritônio foi suturado com Catgut 5.0 e a pele com Nylon 6.0. Após o processo cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas aquecidas e observados até que estivessem se movimentando e comendo normalmente. Injeções intramusculares de Meloxicam (Movatec, Boehringer), na dose de 1mg/Kg do animal, foram administradas durante as primeiras 48h após a cirurgia, com intervalo de 24h de administração. As microcápsulas foram recuperadas 7 ou 30 dias após o implante. Para isso, os animais foram anestesiados com ketamina

(0,1mg/g do animal) e xilazina (0,01mg/g do animal) e submetidos à lavagem peritoneal com 6ml de solução de cloreto de sódio 0,15M. Ao final do procedimento, os camundongos foram eutanasiados por *overdose* de anestésicos. O número de células presentes no lavado peritoneal foi determinado através de câmara de Neubauer e um total de 100 microcápsulas aleatoriamente selecionadas foram analisadas sob microscópio de contraste de fase. O diâmetro das cápsulas foi determinado, assim como a presença de células aderidas à superfície das cápsulas, e esse crescimento pericapsular foi classificado de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8: Classificação do crescimento pericapsular em microcápsulas recuperadas de camundongos imunocompetentes.

Crescimento pericapsular				
Classificação	Limpa	Leve	Moderado	Severo
% de área afetada	Zero	<25%	25-75%	>75%

Em outro conjunto de ensaios, microcápsulas de Biodritina, de Bioprotect ou de Bioprotect-Pln foram implantadas na região intraperitoneal de camundongos Balb/C imunocompetentes com aproximadamente oito semanas de vida e recuperadas, de acordo com o procedimento descrito acima. Após sete dias do implante, os animais foram submetidos à lavagem peritoneal com 6ml de solução de cloreto de sódio 0,15M e amostras de sangue foram colhidas dos camundongos e centrifugadas à 1,831RCF por 3min para obtenção do plasma. Os níveis proteicos das citocinas Interleucina-6 (Il-6), Interleucina-10 (Il-10), proteína quimiotática de monócitos-1 (Mcp-1), Interferon- γ (Ifn- γ), Fator de Necrose Tumoral- α (Tnf- α) e Interleucina-12p70 (Il-12p70) foram quantificados, em amostras de lavado peritoneal e de plasma, por citometria de fluxo. Foi utilizado imunoensaio baseado em micropartículas de fluorescência e tamanho conhecidos, conjugadas a anticorpos, que, através de um citômetro de fluxo, quantifica simultaneamente vários analitos, método este

que é chamado de Cytometric Bead Array (CBA). Foi utilizado um kit comercial, de acordo com as instruções do fabricante (CBA Mouse Inflammation Kit, Becton, Dickinson and Company, BD).

3.3.12. Análise estatística

A significância das diferenças observadas nos dados experimentais foi avaliada através do programa Prism v6.01 (GraphPad). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$. A barra de erro nos gráficos mostra o erro padrão da média (*standard error of the mean, SEM*).

3.4. Resultados

3.4.1. Produção de microcápsulas

Utilizando os biomateriais Bioprotect e Bioprotect-Pln, foi possível produzir microcápsulas, não tendo sido observado variação no diâmetro ou na forma entre as cápsulas produzidas com cada um destes biomateriais (Figura 38).

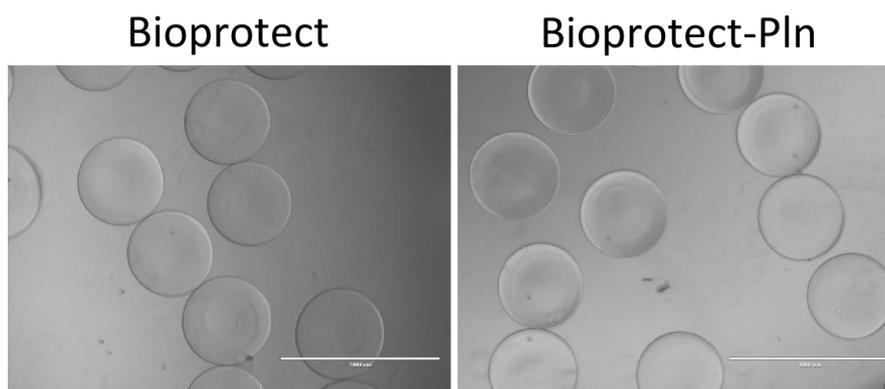


Figura 38. Imagens de cápsulas produzidas com Bioprotect ou com Bioprotect-Pln (100x).

A presença de laminina nas microcápsulas foi confirmada por imunofluorescência indireta (Figura 39). Foi possível detectar a presença de laminina nas cápsulas produzidas com Bioprotect ou com Bioprotect-Pln, mas não naquelas produzidas com Biodritina, biomaterial que não contém laminina em sua composição. As cápsulas de Bioprotect-Pln exibem distribuição irregular de laminina, enquanto aquelas de Bioprotect possuem uma distribuição mais homogênea em sua superfície. A visão da seção transversal mediana das cápsulas demonstra que a técnica utilizada permite detectar apenas a laminina presente na superfície das cápsulas, não tendo sido possível internalizar os anticorpos e assim detectar a laminina presente no interior de cápsulas integras (Figura 39C-D). Além disso, não houve variação na fluorescência de cápsulas armazenadas durante sete dias.

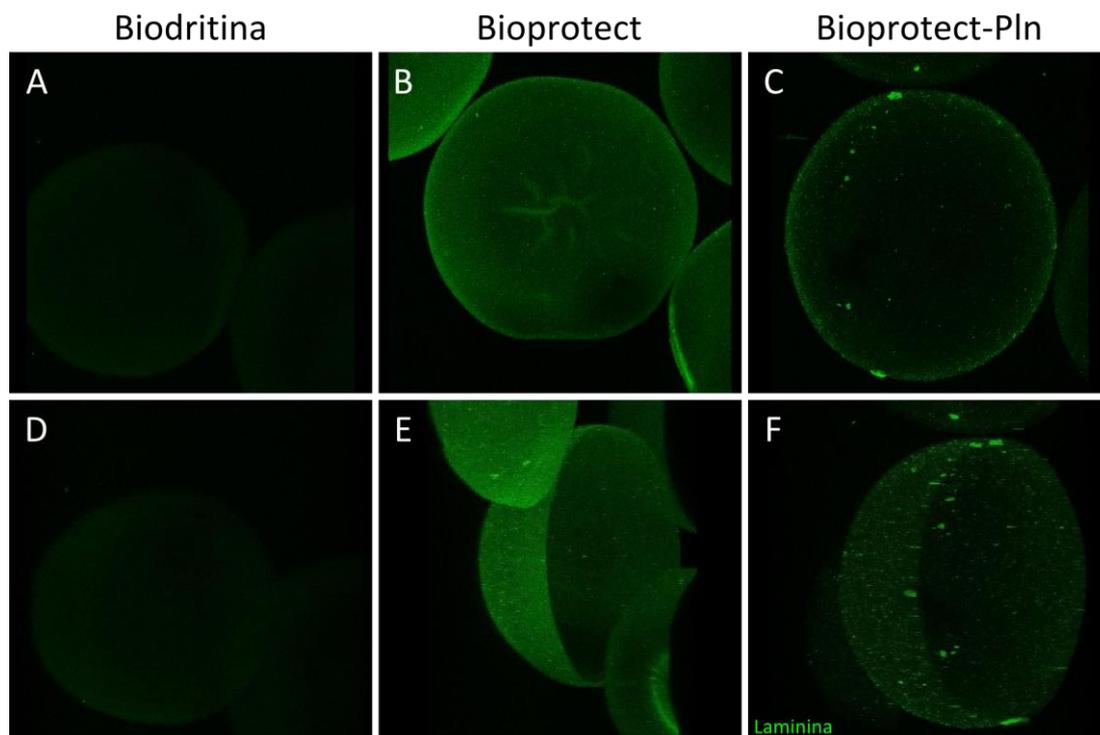


Figura 39: Detecção de laminina em microcápsulas compostas por diferentes biomateriais. As cápsulas foram produzidas com Biodritina, que funciona como controle negativo por não possuir laminina em sua composição (A, D), Bioprotect (B, E) ou Bioprotect-Pln (C, F). Imunofluorescência indireta com marcação para laminina. (A-C) Reconstrução tridimensional obtida por microscopia confocal e (D-F) visão da seção transversal mediana (200x).

As características morfológicas das microcápsulas, como deformações e irregularidades na superfície, foram analisadas através de MEV. A Figura 40 mostra que as microcápsulas apresentam estrutura esférica sem evidência de deformações significativas na superfície. Contudo, no aumento de 10.000x, foi possível identificar diferenças entre a textura das microcápsulas confeccionadas com os diferentes biomateriais.

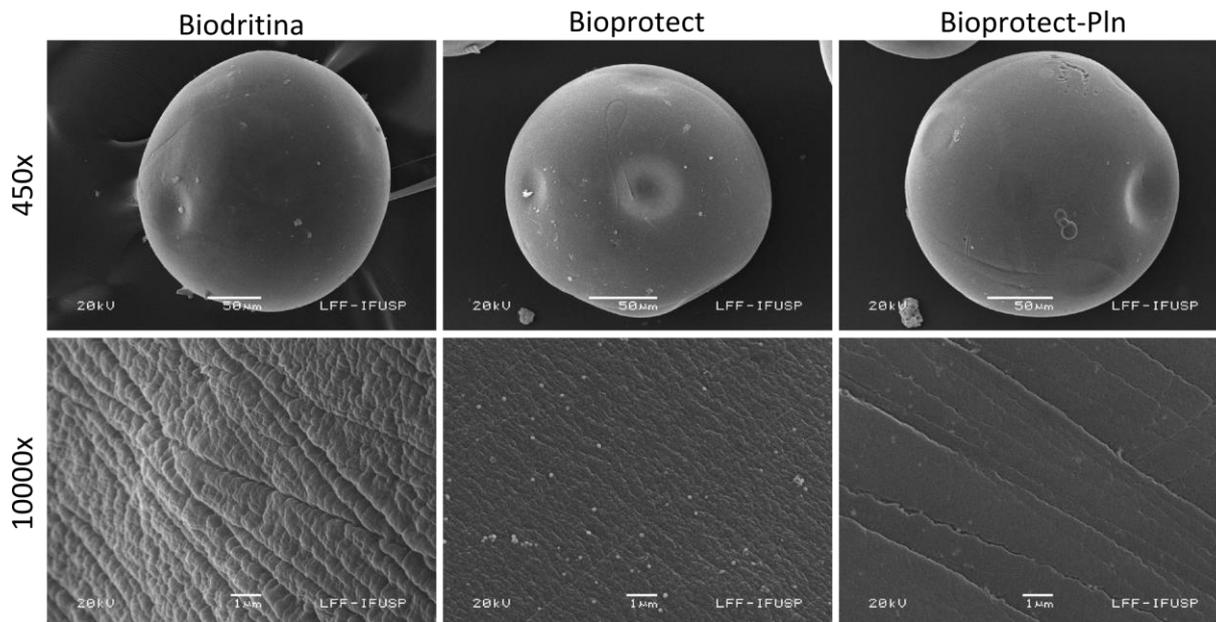


Figura 40: Imagens obtidas por MEV de microcápsulas produzidas com Biodritina, Bioprotect e Bioprotect-Pln. Aumentos de 450x e de 10000x.

3.4.2. Avaliação da estabilidade mecânica e térmica das microcápsulas

Para avaliar se a nova formulação Bioprotect-Pln possui estabilidade mecânica e térmica desejáveis e compatíveis com a estabilidade das microcápsulas produzidas com Bioprotect, as microcápsulas foram cultivadas *in vitro* e desafiadas contra diferentes condições de estresse térmico, osmótico e mecânico. Ao final de cada teste, a integridade física e o diâmetro das microcápsulas foram avaliados. Não houve variação de diâmetro entre as microcápsulas produzidas com Bioprotect ou com Bioprotect-Pln em nenhum dos testes realizados (Figura 41), assim como também não foi observado número relevante de microcápsulas rompidas ($0,667\% \pm 0,19$ e $0,467\% \pm 0,16$ de microcápsulas rompidas nas condições Bioprotect e Bioprotect-Pln, respectivamente).

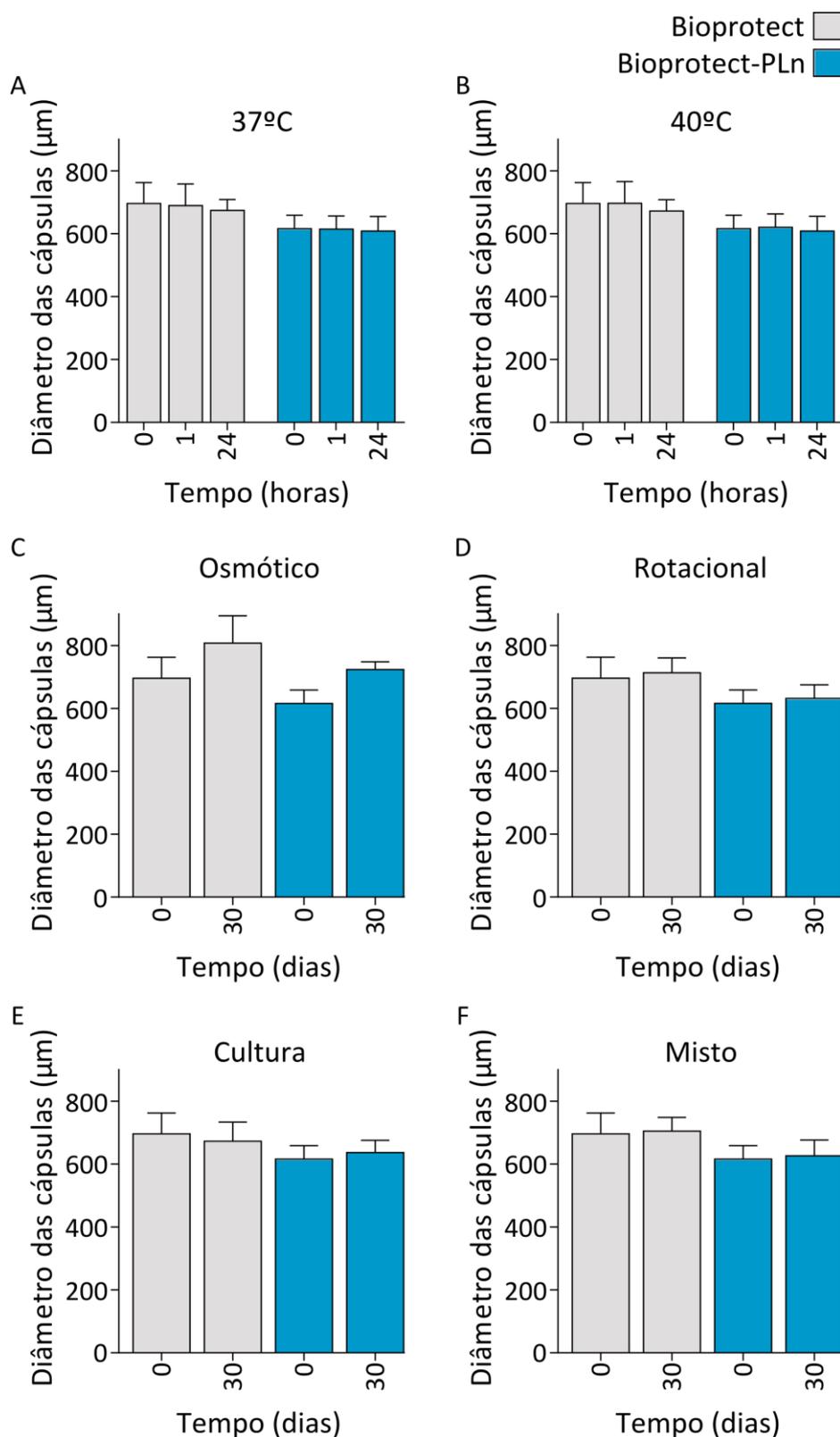


Figura 41: Variação de diâmetro (μm) das microcápsulas submetidas aos seguintes testes: (A-B) Temperatura, incubação em NaCl 0,9% a (A) 37°C (B) ou 40°C por até 24h; (C) Osmótico, incubação em água destilada por 30 dias; (D) Rotacional, incubação em NaCl 0,9% sob agitação (150RPM) a 37°C por 30 dias; (E) Cultura, incubação em meio de cultivo RPMI-1640 contendo 5% SFB a 37°C por 30 dias; (F) Misto, incubação em meio de cultivo RPMI-1640 contendo 5% SFB sob agitação (150 RPM) a 37°C por 30 dias (One-way ANOVA. Diferenças estatisticamente não-significativas. $n = 3$).

3.4.3. Encapsulamento de ilhotas pancreáticas

Ilhotas pancreáticas foram isoladas e encapsuladas utilizando os biomateriais Bioprotect e Bioprotect-PIn (Figura 42). As cápsulas produzidas são uniformes, independentemente do biomaterial utilizado.

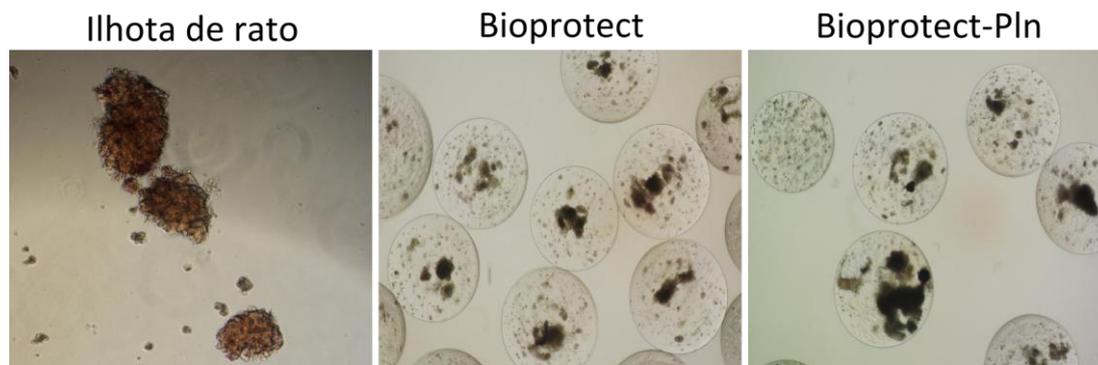


Figura 42: Imagens representativas de ilhotas pancreáticas isoladas a partir de pâncreas de ratos coradas com Ditizona (200x) e microencapsuladas com Bioprotect ou Bioprotect-PIn (100x).

3.4.4. Funcionalidade *in vitro* de ilhotas pancreáticas microencapsuladas

Para avaliar o efeito dos diferentes biomateriais sobre a funcionalidade das ilhotas pancreáticas encapsuladas, diferentes ensaios *in vitro* foram realizados. Inicialmente, a capacidade das ilhotas pancreáticas humanas nuas, encapsuladas com Bioprotect ou Bioprotect-PIn, de secretar insulina em resposta ao estímulo de glicose foi avaliada. Para cada condição, cinco ilhotas encapsuladas foram selecionadas e desafiadas com baixa e alta concentração de glicose. Após cada estímulo, o nível de secreção de insulina foi determinado. Quando as ilhotas são incubadas em baixa concentração de glicose, não há diferença estatisticamente significativa no nível de insulina secretada entre os grupos avaliados (Figura 43). O estímulo com alta concentração de glicose, apesar de induzir níveis estatisticamente maiores de secreção de insulina em todas as condições avaliadas, induz níveis de secreção de insulina diferentes entre as ilhotas encapsuladas com os biomateriais

em estudo e as ilhotas nuas (Figura 43). A presença da cápsula pode constituir uma barreira para o estímulo de glicose ou para a secreção de insulina, de forma a induzir diminuição da capacidade de resposta das ilhotas encapsuladas, ou seja, diminuição da razão entre os níveis de insulina secretados em resposta aos estímulos de glicose alto e baixo, independentemente do biomaterial utilizado (Figura 43).

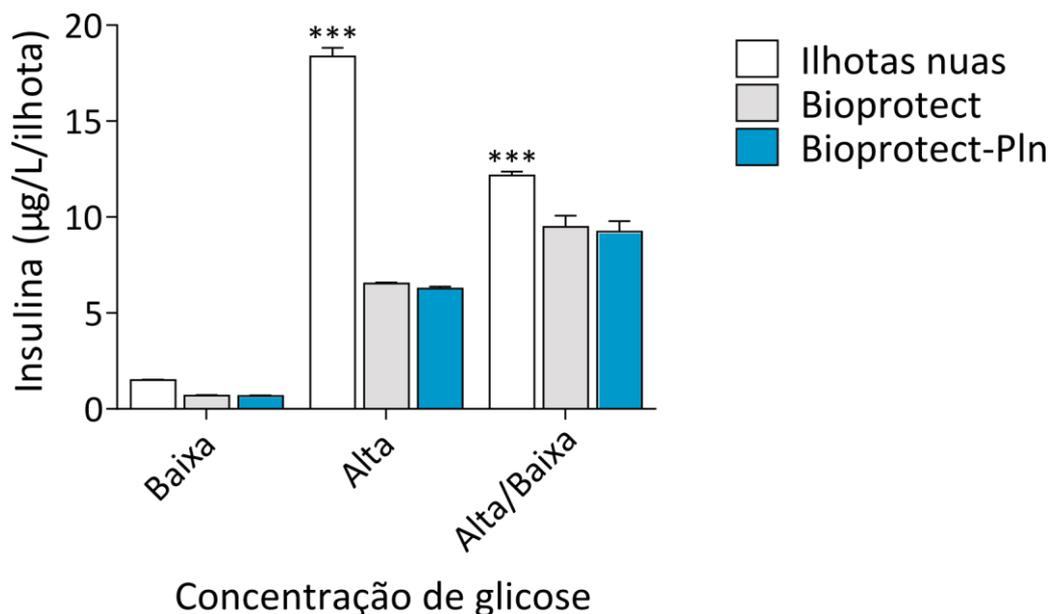


Figura 43: Níveis de insulina (ug/L/ilhota) secretados por ilhotas pancreáticas humanas nuas, encapsuladas com Bioprotect ou encapsuladas com Bioprotect-Pln, após o estímulo com diferentes concentrações de glicose (One-way ANOVA. *** = $p < 0,001$. $n = 3$).

As ilhotas pancreáticas de rato microencapsuladas foram avaliadas quanto à possível modulação da expressão de genes associados à apoptose (pro-apoptóticos: *Bax* e *Caspase 3*; anti-apoptóticos: *Bcl-2* e *Bcl-xl*), ao estresse (*Hsp70* e *Mcp-1*) e à função celular (*Insulina I*), induzida pelos diferentes biomateriais. As ilhotas encapsuladas com Bioprotect-Pln apresentaram aumento estatisticamente significativo na expressão dos genes anti-apoptóticos *Bcl-2* e *Bcl-xl* e mantiveram os níveis de expressão do gene associado à função celular *Insulina I* (Figura 44). Observou-se apenas uma tendência à diminuição da expressão de genes relacionados à atividade pró-apoptótica e ao estresse celular (Figura 44).

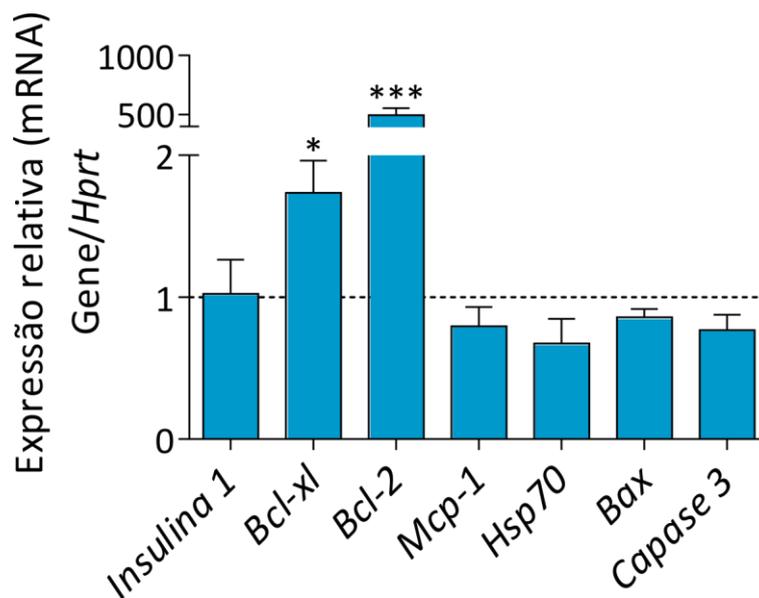


Figura 44: Expressão de genes relacionados à apoptose, estresse e função celular em amostras de ilhotas pancreáticas de rato microencapsuladas com Bioprotect-Pln e mantidas em cultura por 48h. A expressão genica foi normalizada em relação à condição de ilhotas pancreáticas de rato encapsuladas com Bioprotect (linha pontilhada). O gene *Hprt* foi utilizado como controle de expressão constitutiva (One-way ANOVA. * = $p < 0,05$. *** $p < 0,001$. $n = 3$).

Por fim, foi avaliada a modulação proteica causada pelo microencapsulamento de ilhotas pancreáticas de rato com Bioprotect ou Bioprotect-Pln. Após 48h de cultura, as ilhotas pancreáticas microencapsuladas com Bioprotect-Pln apresentaram tendência de aumento nos níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2 em relação às ilhotas microencapsuladas com Bioprotect (Figura 45). Entretanto, os níveis das proteínas Xiap e Bax permaneceram similares nas duas condições (Figura 45).

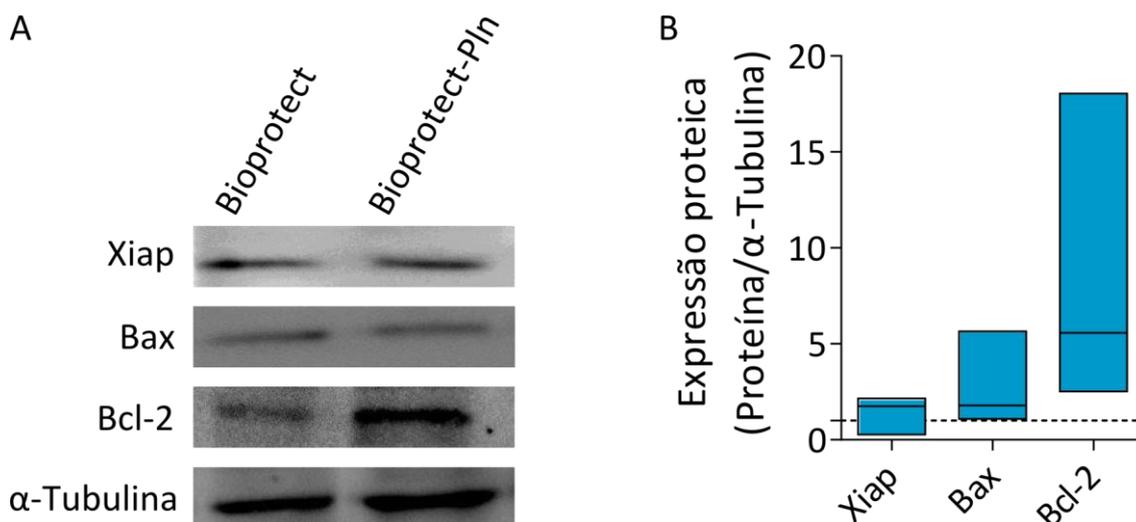


Figura 45: Modulação proteica em ilhotas pancreáticas de rato microencapsuladas com Bioprotect ou Bioprotect-Pln e cultivadas por 48h. (A) Imagens representativas de membranas de Western Blot marcadas com diferentes anticorpos (anti-Xiap, -Bax, -Bcl-2, - α -Tubulina). (B) Quantificação relativa dos níveis proteicos por densitometria das membranas de Western Blot. Linha tracejada representa as ilhotas pancreáticas microencapsuladas com Bioprotect (Teste t. Diferenças estatisticamente não significativas. n=3).

3.4.5. Avaliação da biocompatibilidade *in vitro* das microcápsulas

A biocompatibilidade das microcápsulas foi inicialmente avaliada *in vitro* através do cultivo de macrófagos com microcápsulas vazias, seguida da quantificação da expressão do mRNA das citocinas *Il-1 β* e *Tnf- α* . Os macrófagos incubados com as microcápsulas produzidas com Bioprotect ou com Bioprotect-Pln apresentaram expressão similar do mRNA das citocinas avaliadas entre si e em comparação com os macrófagos não ativados. Além disso, a expressão de ambas as citocinas foi significativamente reduzida quando em comparação com os macrófagos incubados com diferentes concentrações de LPS (Figura 46).

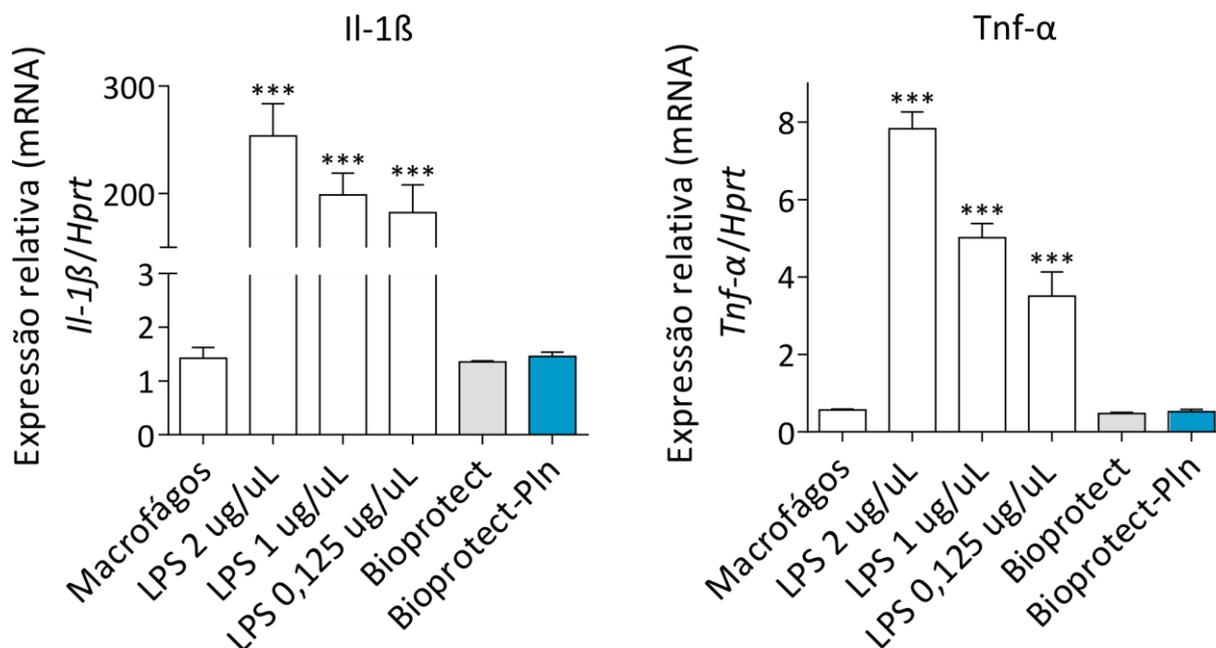


Figura 46: Níveis de expressão gênica das citocinas: (A) *Il-1β* e (B) *Tnf-α*, apresentados por macrófagos incubados com microcápsulas de Bioprotect ou Bioprotect+Pln por 9h. Diferentes concentrações de LPS foram utilizadas como controle positivo. Macrófagos não expostos a qualquer biomaterial foram utilizados como controle. O gene *Hprt* foi utilizado como controle de expressão constitutiva (One-way ANOVA. *** = $p < 0,001$. $n = 3$).

3.4.6. Avaliação do potencial imunoprotetor das microcápsulas *in vitro*

A capacidade das microcápsulas de imunoproteger ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas foi avaliada em um ensaio de ativação de macrófagos *in vitro*, seguida da quantificação da expressão do mRNA das citocinas *Il-1β* e *Tnf-α*. Os macrófagos foram incubados por 9h com ilhotas pancreáticas humanas nuas, ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas com Bioprotect ou ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas com Bioprotect-Pln. A expressão de ambas as citocinas pelos macrófagos permaneceu inalterada quando macrófagos foram cultivados sozinhos ou na presença de ilhotas pancreáticas encapsuladas com Bioprotect ou Bioprotect-Pln, entretanto, a exposição dos macrófagos a ilhotas pancreáticas nuas induziu aumento significativo da expressão de *Il-1β* e *Tnf-α* (Figura 47).

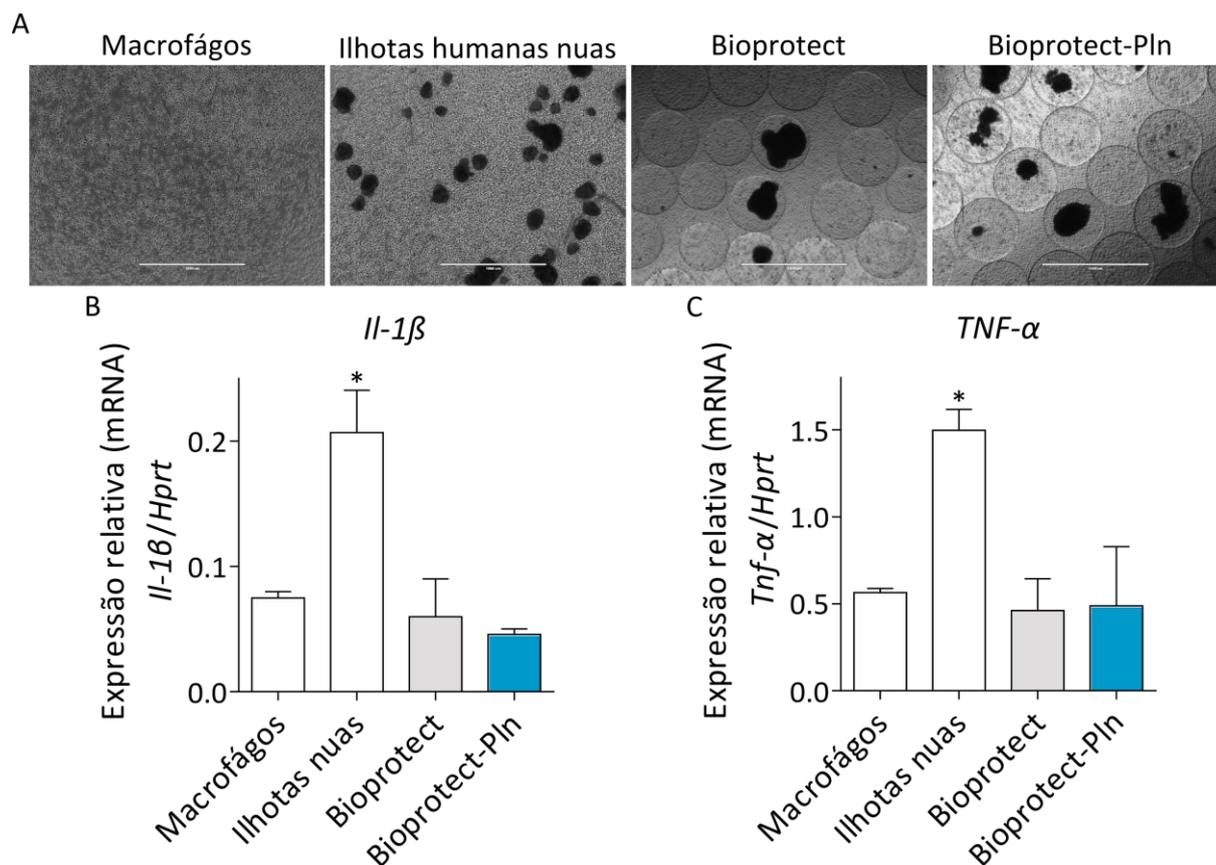


Figura 47: Avaliação do potencial imunoprotetor das microcápsulas. (A) Imagens representativas das condições de cultivo. Macrófagos RAW264 foram cultivados por 9h sozinhos, em combinação com ilhotas pancreáticas humanas nuas ou encapsuladas com Bioprotect ou com Bioprotect-Pln (100x). (B-C) Expressão gênica de (B) *Il-1 β* e (C) *Tnf- α* por macrófagos RAW264 cultivados sozinhos ou co-incubados com ilhotas pancreáticas humanas nuas ou com ilhotas pancreáticas humanas encapsuladas com Bioprotect ou Bioprotect-Pln. O gene *Hprt* foi utilizado como controle de expressão constitutiva (One-way ANOVA. * = $p < 0,05$. n = 3).

3.4.7. Avaliação da biocompatibilidade das microcápsulas *in vivo*

A biocompatibilidade das microcápsulas foi avaliada *in vivo* através do implante intraperitoneal de microcápsulas vazias de Bioprotect ou Bioprotect-Pln em camundongos imunocompetentes. As cápsulas foram recuperadas através de lavado peritoneal 7 ou 30 dias pós-implante para avaliar a existência e a extensão do crescimento pericapsular, assim como o diâmetro das microcápsulas recuperadas. Pelo menos 95% do volume de cápsulas implantadas foi recuperado em todas as lavagens peritoneais. Os diâmetros das cápsulas recuperadas também foram determinados, sendo que até sete dias pós-implante, não foi detectada variação alguma entre os grupos, entretanto, um aumento significativo no

diâmetro das microcápsulas foi observado aos 30 dias pós-implante (Figura 48D). O inchaço das microcápsulas representa, em média, um aumento de 15% no diâmetro, não havendo diferença entre os biomateriais testados.

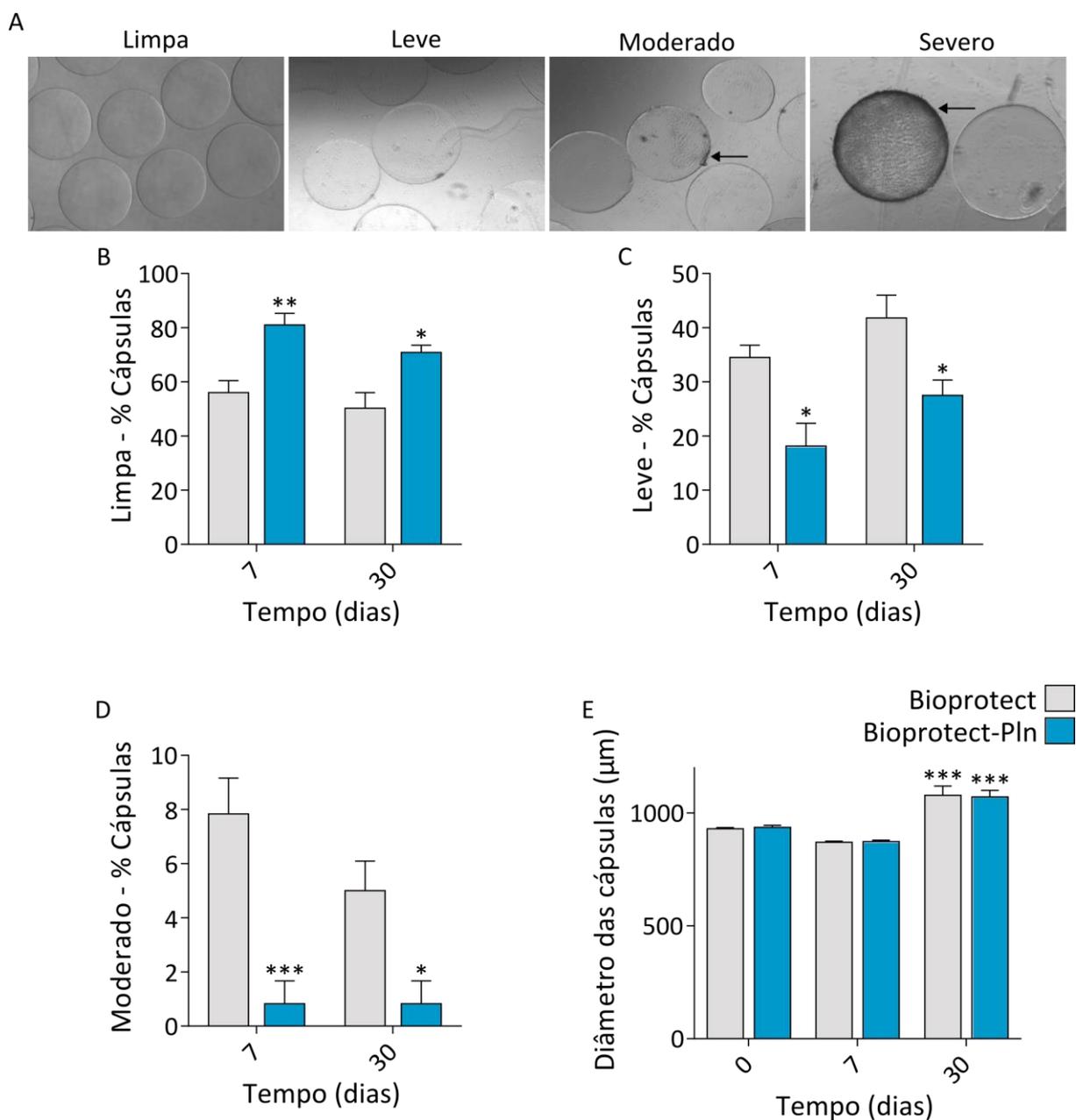


Figura 48: Avaliação da biocompatibilidade das microcápsulas *in vivo*. (A) Imagens representando microcápsulas consideradas limpas ou com crescimento pericapsular pequeno, moderado ou severo. As setas indicam os locais afetados. (B-D) Porcentagem de microcápsulas recuperadas 7 e 30 dias após o implante, sendo consideradas limpas (B), com crescimento pericapsula leve (C) ou moderado (D). (Two-way ANOVA. *** = $p < 0,001$ ** = $p < 0,01$ * = $p < 0,05$. $n = 6$). (E) Variação no diâmetro das microcápsulas recuperadas 7 e 30 dias pós-implante (Two-way ANOVA. *** = $p < 0,001$. $n = 6$).

O crescimento pericapsular foi classificado de acordo com os critérios estabelecidos na Tabela 8 e na Figura 48A. Observou-se um aumento no percentual de cápsulas de Bioprotect-Pln limpas recuperadas e a redução do percentual de cápsulas de Bioprotect-Pln com crescimento pericapsular leve e moderado recuperadas em todos os períodos de tempo analisados (Figura 48A-D). Cápsulas com crescimento pericapsular classificado como severo não foram significativamente representadas. Além disso, mesmo entre as cápsulas consideradas “limpas” sob microscopia de luz, a análise por MEV revelou uma clara diferença no crescimento pericapsular entre as cápsulas de BioProtect-Pln, quando comparada com as cápsulas BioProtect (Figura 49).

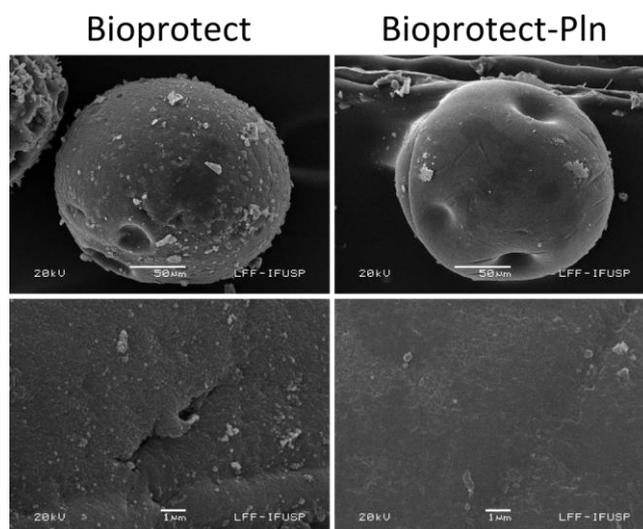


Figura 49: Avaliação da biocompatibilidade das microcápsulas *in vivo*. Imagens obtidas por MEV de microcápsulas de Bioprotect ou Bioprotect-Pln explantadas de camundongos imunocompetentes 7 dias após o implante. Aumentos de 450x e de 10000x.

Os lavados peritoneais obtidos ao recuperar as cápsulas implantadas em camundongos imunocompetentes também foram avaliados. Foi observada a diminuição do número de células associadas ao lavado peritoneal de animais que receberam microcápsulas de Bioprotect-Pln em relação ao lavado peritoneal de animais que receberam microcápsulas de Bioprotect (Figura 50). Além disso, não houve variação entre o número de células infiltradas

na cavidade peritoneal do grupo Sham e do grupo que recebeu cápsulas Bioprotect-Pln (Figura 50).

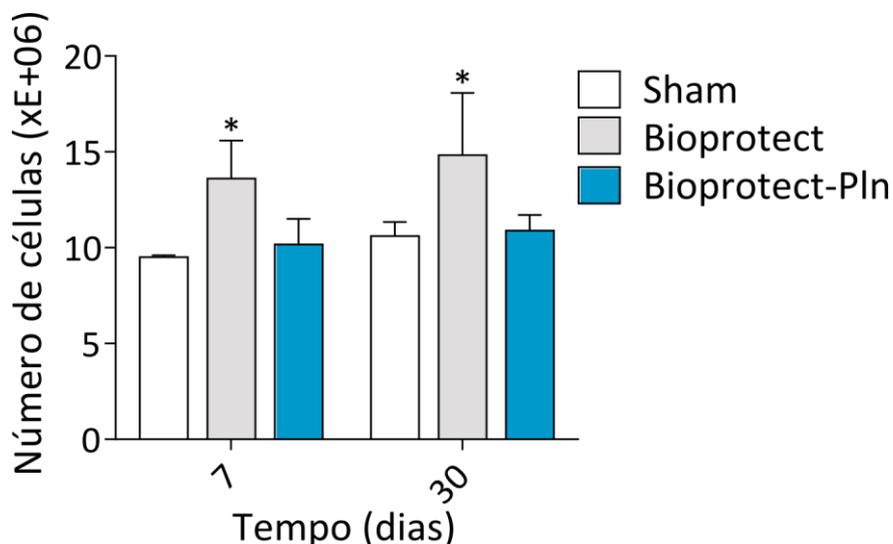


Figura 50: Avaliação da biocompatibilidade das microcápsulas *in vivo*. Número de células infiltradas na cavidade intraperitoneal. Animais Sham não receberam cápsulas (Two-way ANOVA. ** = $p < 0,05$. $n = 6$).

Em ensaio independente, a resposta inflamatória às microcápsulas *in vivo* foi adicionalmente caracterizada através da quantificação de citocinas no lavado peritoneal e no soro de camundongos 7 dias após o implante das microcápsulas vazias. Nessas amostras, foi quantificado o nível proteico das citocinas Il-12p70, Tnf- α , Mcp-1, Il-10, Il-6 e Ifn- γ . Foi observada redução estatisticamente significativa nos níveis das citocinas Il-12p70, Tnf- α , Mcp-1 e Ifn- γ no lavado peritoneal dos camundongos que receberam cápsulas de Bioprotect-Pln em relação aos camundongos que receberam cápsulas de Bioprotect (Figura 51). Nas amostras de soro, foi observada redução estatisticamente significativa das citocinas Il-12p70 e Tnf- α (Figura 52).

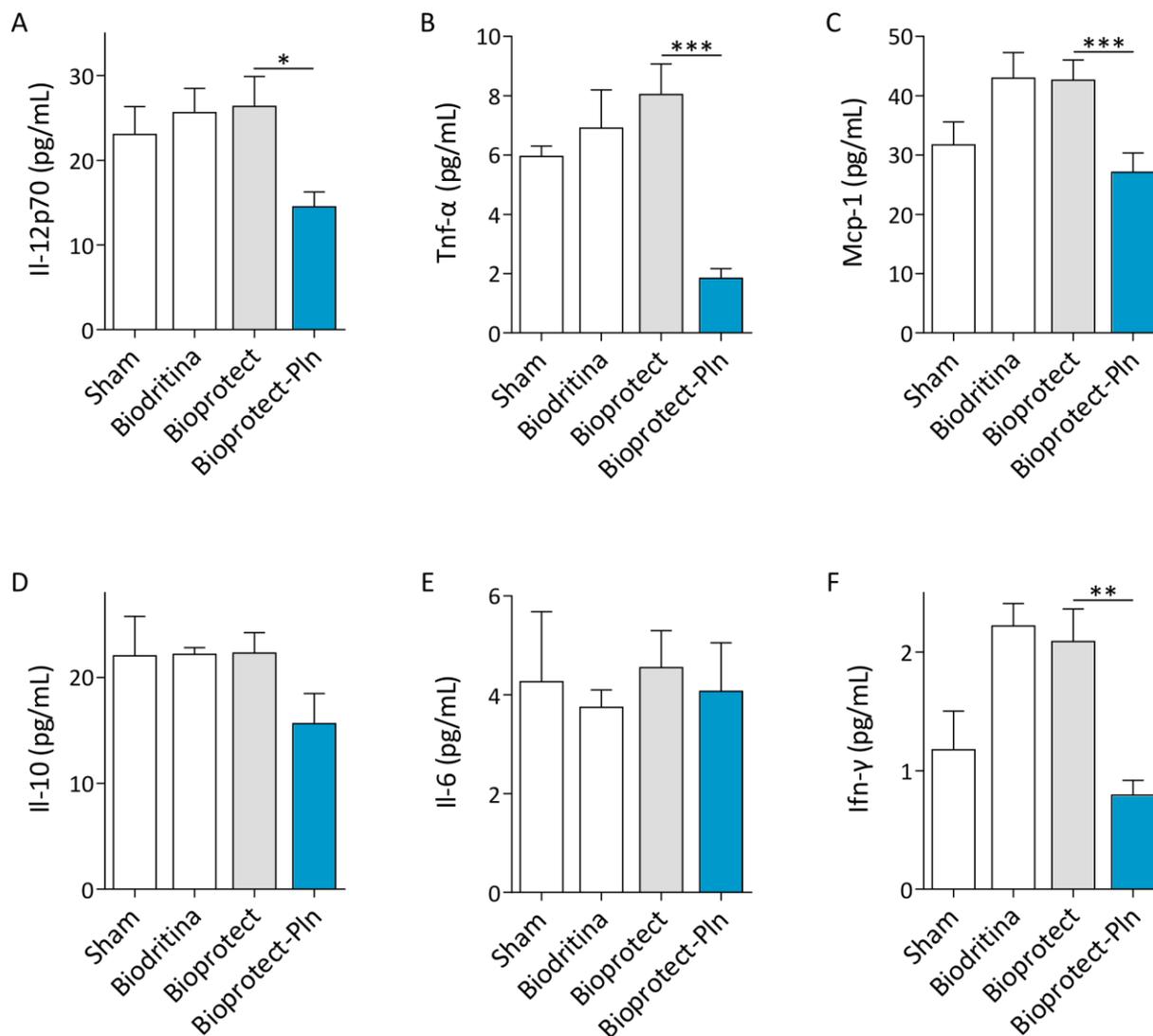


Figura 51: Avaliação da biocompatibilidade das microcápsulas *in vivo*. Quantificação dos níveis de citocinas IL-12p70, Tnf- α , Mcp-1, IL-10, IL-6 e Ifn- γ no lavado peritoneal de camundongos transplantados com cápsulas de Biodritina, Bioprotect ou Bioprotect-Pln. Camundongos Sham passaram pelo procedimento cirúrgico, porém, não receberam cápsulas. (One-way ANOVA. * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$ *** = $p < 0,001$. n=9).

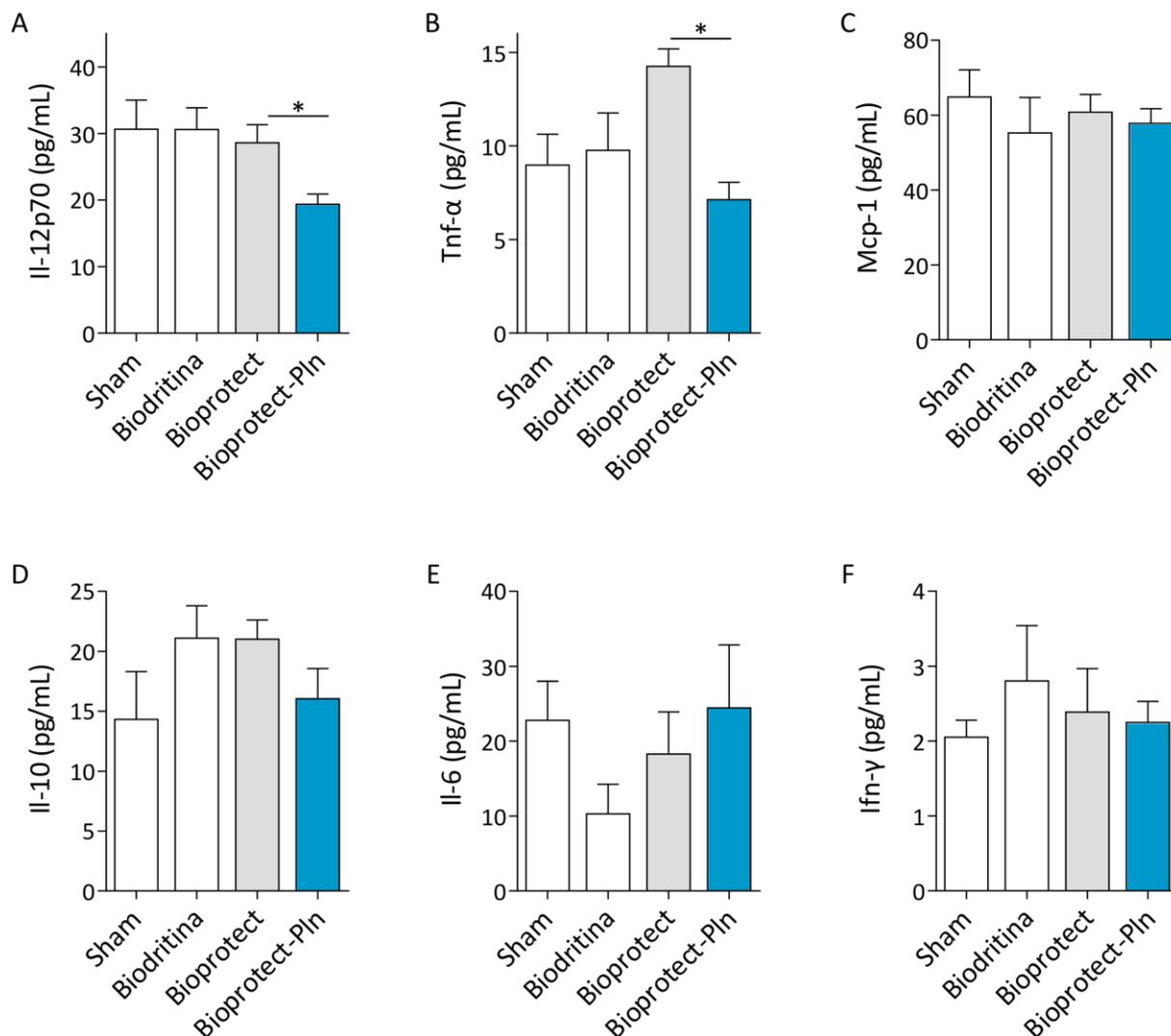


Figura 52: Avaliação da biocompatibilidade das microcápsulas *in vivo*. Quantificação dos níveis de citocinas Il-12p70, Tnf- α , Mcp-1, Il-10, Il-6 e Ifn- γ no soro de camundongos transplantados com cápsulas de Biodritina, Bioprotect ou Bioprotect-Pln. Camundongos Sham passaram pelo procedimento cirúrgico, porém, não receberam cápsulas. (One-way ANOVA. * = $p < 0,05$. $n = 9$).

Nesse ensaio, o número de células infiltradas no lavado peritoneal dos camundongos que passaram pelo processo cirúrgico também foi avaliado, seguindo a mesma tendência observada na Figura 50, ou seja, houve diminuição do número de células associadas ao lavado peritoneal de animais que receberam microcápsulas de Bioprotect-Pln em relação ao lavado peritoneal de animais que receberam microcápsulas de Bioprotect (Figura 53). Além disso, não houve variação entre o número de células infiltradas na cavidade peritoneal do grupo Sham e o grupo que recebeu cápsulas Bioprotect-Pln, tendo sido possível, também,

observar que cápsulas de Biodritina, as quais não possuem laminina nem polilaminina em sua composição, induzem aumento significativo no número de células infiltradas na cavidade peritoneal (Figura 53).

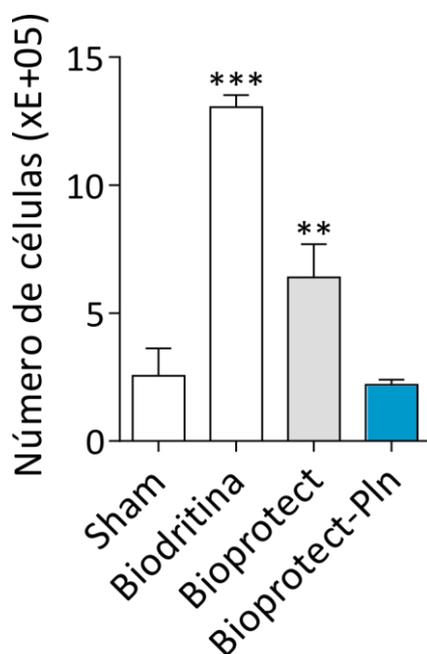


Figura 53: Avaliação da biocompatibilidade das microcápsulas *in vivo*. Número de células infiltradas na cavidade intraperitoneal. Camundongos Sham passaram pelo procedimento cirúrgico, porém, não receberam cápsulas. (One-way ANOVA. ** = $p < 0,01$ *** = $p < 0.001$. $n=9$).

3.5. Discussão

Apesar dos estudos sobre isolamento de ilhotas pancreáticas a partir de órgãos doados ou da diferenciação de células-tronco em células produtoras de insulina apresentarem progresso exponencial, a necessidade de imunossupressão ao longo de toda a vida dos indivíduos transplantados representa um risco que contraria os benefícios do transplante. O protocolo de Edmonton impactou profundamente o campo de transplante de ilhotas pancreáticas por introduzir um regime imunossupressor otimizado, mas, ainda assim, são descritas perdas recorrentes de viabilidade do enxerto devido à rejeição imune, autoimunidade ou exposição crônica a imunossupressores diabetogênicos.

Nesse cenário, o microencapsulamento se torna uma opção terapêutica interessante por prover a oportunidade de inserir células em um ambiente imunoprotegido e funcional. Já foi demonstrada a segurança e a viabilidade do encapsulamento de ilhotas pancreáticas em longo prazo em pacientes de DM1, porém, o resultado metabólico obtido foi limitado, pois os testes em humanos não eliminaram a necessidade de suplementação com insulina exógena e os resultados metabólicos alcançados foram marginais. Além das cápsulas atuarem como uma barreira para o sistema imune, aumentando a viabilidade celular e eliminando a necessidade de imunossupressão, elas também podem atuar como um fator terapêutico para reverter uma das principais razões para a perda de viabilidade do enxerto de ilhotas pancreáticas isoladas, ou seja, a falta de componentes de MEC. A adição de componentes de MEC à malha capsular representa uma abordagem terapêutica promissora.

Para os ensaios realizados neste trabalho, utilizou-se, como material-base, a Biodritina, a qual é composta de alginato de sódio e sulfato de condroitina, numa formulação validada através de diversos experimentos de estabilidade e biocompatibilidade realizados por nosso grupo (CAMPOS-LISBÔA et al., 2008). Para a formulação da Biodritina e de todos os demais

biomaterias estudados neste trabalho, foi utilizado alginato de sódio ultrapuro, com 60% de G, e o sulfato de condroitina, com níveis de pureza adequados para testes pré-clínicos. O biomaterial Bioprotect também foi desenvolvido em nosso grupo e sua estabilidade, biocompatibilidade e funcionalidade no encapsulamento de ilhotas pancreáticas foram demonstradas (CAMPANHA RODRIGUES et al., 2013; RODRIGUES, 2012). A presença de laminina no biomaterial gera modulação gênica, proteica e funcional de ilhotas pancreáticas microencapsuladas, proporcionando normoglicemia em animais diabéticos por período de tempo prolongado.

Entretanto, observou-se que 198 dias após o transplante de ilhotas encapsuladas com Bioprotect em camundongos diabéticos, 40% dos animais retornaram à hiperglicemia (RODRIGUES, 2012). Ao recuperar as microcápsulas implantadas, o índice de liberação de insulina das ilhotas presentes nas cápsulas não foi diferente entre os grupos normoglicêmico e hiperglicêmico quando submetidas à baixa concentração de glicose. Porém, quando estimuladas com alta concentração de glicose, somente ilhotas microencapsuladas obtidas de animais normoglicêmicos apresentaram uma secreção de insulina significativamente aumentada, o que sugere que tais células foram capazes de manter uma resposta funcional mais preservada, quando comparadas ao grupo hiperglicêmico. No grupo de animais hiperglicêmicos, 65% das cápsulas de Bioprotect apresentava mais da metade da área tomada por crescimento pericapsular (RODRIGUES, 2012). Já no grupo que permaneceu normoglicêmico, a porcentagem ficou em torno de 40%, mostrando que a manutenção da normoglicemia está relacionada à resposta inflamatória desencadeada pelo implante. Dessa forma, espera-se que melhorias na formulação das microcápsulas que evitem a ativação de resposta inflamatória e perda de viabilidade do enxerto auxiliem na obtenção de um resultado metabólico mais adequado.

As funções atribuídas às isoformas de laminina dependem, diretamente, da organização supramolecular da laminina, que ocorre, naturalmente, como um polímero *in vivo*. O polímero artificial chamado de polilaminina é formado através da polimerização de laminina *in vitro*, sendo homogêneo, estável e similar às membranas encontradas *in vivo*, apresentando, também, propriedades anti-inflamatórias e neurogênicas (BARROSO et al., 2008; FREIRE; COELHO-SAMPAIO, 2000; MENEZES et al., 2010). Foi demonstrado que a polilaminina é estável nas condições de temperatura, força iônica, pressão e cultivo celular explorada neste estudo (FREIRE et al., 2012). No presente trabalho, Bioprotect foi utilizado como base de comparação para a produção de um novo biomaterial no qual laminina foi substituída por polilaminina, Bioprotect-PIn, o que pode somar às vantagens já conferidas pela presença de laminina.

Foi possível incorporar a polilaminina ao novo biomaterial (Figura 38), denominado Bioprotect-PIn, e confirmar a presença da laminina no biomaterial mesmo após a manipulação para a produção de polilaminina, incorporação desta ao biomaterial e produção de microcápsulas (Figura 39). Observamos que a distribuição da marcação fluorescente não é uniforme nas cápsulas de Bioprotect-PIn, diferentemente do que é observado para as cápsulas de Bioprotet (Figura 39), indicando a ocorrência de polimerização de laminina e incorporação nas cápsulas de Bioprotect-PIn. Além disso, a fluorescência foi observada apenas nas bordas das cápsulas, devido à restrição de tamanho imposta pelos poros das capsulas aos anticorpos utilizados (Figura 39E-F).

As características morfológicas das microcápsulas foram adicionalmente estudadas por MEV, tendo sido possível observar diferenças entre a textura das microcápsulas produzidas com os diferentes biomaterias (Figura 40). Nas imagens obtidas com aumento de 10.000x é possível observar que a superfície das cápsulas de Bioprotect-PIn apresenta textura menos

rugosa e mais homogênea, em comparação com os biomateriais Bioprotect e Biodritina (Figura 40), confirmando a existência de diferenças estruturais entre as microcápsulas. A inflamação é um conjunto de fenômenos bioquímicos, morfológicos e fisiológicos que visam minimizar, destruir e eliminar a causa de uma agressão e induzir a reparação tecidual. A natureza e as características morfológicas de um biomaterial determinam como o organismo receptor irá identifica-lo e reagir imunológica e inflamatória à sua presença. A presença de deformidades e irregularidades na superfície das microcápsulas ocasiona a ativação de resposta inflamatória contra o enxerto, a adesão de células à sua superfície e formação de fibrose, alterando a permeabilidade a nutrientes e ao oxigênio, além de desencadear a liberação de fatores pró-inflamatórios capazes de danificar as células encapsuladas (DE GROOT; SCHUURS; VAN SCHILFGAARDE, 2004). Dessa forma, constatou-se que a superfície das cápsulas de Bioprotect-Pln é mais adequada ao transplante de células encapsuladas.

A estabilidade das microcápsulas de alginato e a prevenção de quebras são parâmetros importantes para garantir a função do enxerto de ilhotas pancreáticas encapsuladas. É comum ocorrer inchaço das cápsulas, atribuído ao aumento da higroscopicidade do material devido à troca química entre o cátion Ba^{2+} utilizado na polimerização e o Na^{+} presente nas soluções salinas de lavagem e armazenamento, o que causa diminuição da interação entre as cadeias de alginato. Os testes de estabilidade utilizados neste estudo são comumente aplicados em análises de estabilidade de microcápsulas (THU et al., 1996a, 1996b; ZIMMERMANN et al., 2007), cobrindo diversos parâmetros que podem variar *in vitro* e *in vivo*, como: a temperatura, a manutenção em diferentes meios de cultivo, diferentes pressões osmóticas e estresse mecânico. Variações estatisticamente significativas de tamanho e no número de cápsulas rompidas não foram identificadas nos testes de

estabilidade térmica e mecânica realizados (Figura 41). O inchaço das microcápsulas não é desejado, podendo estar relacionado ao aumento de permeabilidade, permitindo o acesso de anticorpos e outros componentes do sistema imune, assim como o rompimento das cápsulas (DARRABIE; KENDALL; OPARA, 2008). Os ensaios realizados visam demonstrar a resistência do biomaterial a diferentes formas de estresse, demonstrando a resistência das microcápsulas ao processo de produção e manipulação, assim como permitindo prever o comportamento dessas estruturas após o implante, sendo que, os resultados obtidos demonstraram que a incorporação de polilaminina não altera a estabilidade mecânica ou térmica do biomaterial.

Após verificarmos que é possível utilizar Bioprotect-Pln no encapsulamento de ilhotas pancreáticas (Figura 42), foram realizados ensaios de cultura de ilhotas pancreáticas encapsuladas visando avaliar se há modulação funcional de ilhotas pancreáticas encapsuladas com o biomaterial contendo polilaminina. O período de 48h de cultivo foi utilizado, pois corresponde ao período máximo de cultivo pré-implante das ilhotas pancreáticas. O ensaio de secreção de insulina em resposta ao estímulo de glicose foi realizado visando garantir que os processos de isolamento, purificação e encapsulamento não induzem perda de funcionalidade das ilhotas pancreáticas isoladas e verificar se o uso de diferentes biomateriais para o encapsulamento é capaz de modular essa propriedade-chave das ilhotas pancreáticas. Os dados obtidos demonstram que ilhotas humanas encapsuladas são capazes de secretar insulina e de responder adequadamente a diferentes concentrações de glicose (Figura 43). Quando estimuladas com baixas concentrações de glicose, independentemente da presença de cápsula ou do biomaterial utilizado, os níveis de secreção de insulina foram os mesmos em todas as condições, o que não se repete quando as ilhotas são encapsuladas e estimuladas com altas concentrações de glicose. Observa-se

que, independente do biomaterial utilizado, o encapsulamento das ilhotas pancreáticas diminui os níveis de insulina secretada em resposta a altos níveis de glicose, o que se reflete na capacidade de resposta das ilhotas pancreáticas (Figura 43). Porém, dada a observação de que ilhotas pancreáticas encapsuladas com Bioprotect são capazes de reverter, por longos períodos de tempo, o diabetes induzido em camundongos, pode-se esperar que ilhotas pancreáticas encapsuladas com Bioprotect-PIn apresentem capacidade similar, visto que as ilhotas encapsuladas com Bioprotect-PIn secretam níveis comparáveis de insulina àqueles secretados por ilhotas encapsuladas com Bioprotect, independentemente da concentração de glicose presente no meio de cultura.

O encapsulamento de ilhotas pancreáticas de rato com Bioprotect-PIn promoveu modulação gênica nas ilhotas pancreáticas encapsuladas, quando comparadas com as ilhotas encapsuladas com Bioprotect (Figura 44). Genes associados com o processo de apoptose, como *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Bax* e *Caspase 3*, foram avaliados por serem relacionados ao processo de morte observado em ilhotas recentemente transplantadas. O processo apoptótico pode ser desencadeado pela via intrínseca ou extrínseca, convergindo na ativação de proteases da família das Caspases (THOMAS; BIDEN, 2009; ZIMMERMANN; BONZON; GREEN, 2001). Na via extrínseca, a ativação de receptores de morte facilita o recrutamento e a clivagem de Caspases, como a Caspase 3. A via intrínseca (também conhecida como via mitocondrial ou via regulada por Bcl-2) pode ser iniciada por diferentes estímulos, incluindo hipóxia, restrição de nutrientes e espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo associada com a liberação de citocromo C da membrana mitocondrial por membros apoptóticos da família de Bcl-2 (*Bak* e *Bax*), os quais deixam o controle de moléculas anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-xl) e ativam caspases efetoras. Nesse contexto, Bad é um ligante capaz de inibir proteínas anti-apoptóticas e de promover a morte celular programada. As cápsulas contendo polilaminina

são capazes de modular a expressão de genes associados à apoptose, indicando proteção contra morte celular programada. Ocorre aumento de expressão de genes anti-apoptóticos, Bcl-xl e Bcl-2, e tendência à diminuição da expressão genes pro-apoptóticos (Figura 44).

Genes associados com o estresse celular, como Mcp1 e Hsp70 também foram avaliados. Mcp1 é um membro da família das quimiocinas, segregado por vários tipos de células, cuja função mais conhecida é o forte recrutamento e a ativação de macrófagos (MELZI et al., 2010). A família das *Heat Shock Proteins* (HSP) é induzida por estresse celular, como variações de temperatura, hipóxia, isquemia, desbalanço osmótico, metais pesados e citocinas (como *Il-1 β* e *Tnf- α*) (LAI; CHEN; LINN, 2009; RADLOFF; DELLING; GERCKEN, 1998; SATOH; KIM, 1995; SMOYER et al., 2000). Chaperonas HSP70 são ativadas em momentos críticos, pois mantém a homeostase proteica no citosol, mediando a renaturação de proteínas desnaturadas (LAI; CHEN; LINN, 2009; MULTHOFF, 2007; SALUJA; DUDEJA, 2008). A incorporação de polilaminina às microcápsulas foi suficiente para induzir uma tendência de diminuição nos genes Mcp1 e Hsp70 (Figura 44). Esses resultados sugerem o potencial da nova formulação Bioprotect-Pln em promover um ambiente menos estressante para as ilhotas pancreáticas encapsuladas, em comparação com o Bioprotect.

A expressão de *Insulina I* também foi avaliada. Modelos murinos de células- β sintetizam moléculas de insulina codificadas por dois genes diferentes, com 90% de homologia. Normalmente os níveis de Insulina I são mais altos do que os de Insulina II (KAKITA; GIDDINGS; PERMUTT, 1982). As cápsulas de Bioprotect-Pln não induziram aumento estatisticamente significativo nos níveis de expressão de *Insulina I* (Figura 44), resultado compatível com aquele observado ao se quantificar e comparar os níveis de insulina secretados quando ilhotas são encapsuladas com Bioprotect ou Bioprotect-Pln e desafiadas com diferentes concentrações de glicose (Figura 43). Para melhor caracterizar a contribuição

da polilaminina para a viabilidade de ilhotas encapsuladas com Bioprotect-Pln, foram analisados os níveis proteicos de alguns marcadores já avaliados por qRT-PCR. Foi observada apenas tendência de aumento na expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 devido ao encapsulamento com o novo biomaterial, porém, não foi possível detectar variação estatisticamente significativa nos níveis de nenhuma das proteínas avaliadas (Bcl-2, Bax e Xiap, potente inibidor das caspases efetoras que impede a finalização do processo apoptótico) (Figura 45). A modulação de moléculas associados ao estresse celular e à apoptose e a manutenção dos níveis de expressão de moléculas associadas à função celular sugerem que as cápsulas de Bioprotect-Pln podem proteger células encapsuladas contra perda de viabilidade e de função, num período pré-transplante, que é crítico para a manutenção da massa do enxerto.

Apesar do procedimento cirúrgico para implante das microcápsulas ser minimamente invasivo, ele induz uma resposta inflamatória associada ao processo de restauração do tecido (BABENSEE et al., 1998). Além disso, o implante peritoneal de biomateriais pode causar uma reação conhecida como reação a corpo estranho (*foreign body reaction*, FBR), a qual é inicialmente uma resposta inflamatória estéril aguda, sendo, subsequentemente sobreposta com uma resposta fibrótica crônica (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008). As características principais do processo de FBR incluem o acúmulo de macrófagos na interface tecido-implante e a deposição de densa camada de matriz colagenosa que isola o implante. As consequências clínicas da FBR incluem dor, cicatrizes e, para alguns biomateriais, a falha do enxerto devido ao desenvolvimento de fibrose (MALIK et al., 2011). A membrana utilizada no encapsulamento de células não deve estimular a ativação do sistema imune do organismo receptor, ou seja, deve ser biocompatível. Idealmente, as microcápsulas não devem gerar a formação de tecido fibrótico, a ativação de macrófagos e nem estimular a

liberação de citocinas e agentes citotóxicos (GIN et al., 1990; MILLER; ANDERSON, 1988). Além disso, o biomaterial deve prover permeabilidade adequada para a troca de nutrientes e metabólitos e apresentar estabilidade adequada para resistir *in vivo* (ŘÍHOVÁ, 2000).

Um método simples e sensível foi desenvolvido por Juste *et al* em 2005 e reproduzido no presente trabalho, com o objetivo de avaliar a biocompatibilidade de diferentes biomateriais baseando-se nas interações entre macrófagos e a superfície de microcápsulas (JUSTE et al., 2005). São os macrófagos que respondem logo após o transplante de células encapsuladas e liberando algumas citocinas inflamatórias, como Il-1 β e Tnf- α , que são diretamente associadas com a apoptose e a necrose do enxerto (BASTA et al., 2004; VOS et al., 2003). Neste trabalho, não foram utilizados macrófagos intraperitoneais para avaliar o processo inflamatório causado pelas microcápsulas *in vitro*, pois o próprio processo de obtenção e manipulação gera grande variabilidade nos experimento (VOS et al., 2003). Dessa forma, optamos pelo uso da linhagem celular RAW264.7 de macrófagos murinos, que não é reativa aos processos de cultivo e manipulação, sendo, entretanto, capaz de secretar níveis consistentes de citocinas após ativação. É importante considerar que discrepâncias entre os níveis de mRNA transcrito, a tradução deste mensageiro, a secreção e atividade proteica podem ocorrer. Não só o mRNA pode ser degradado ou segregado da maquinaria de tradução, como a função da proteína pode ser regulada por modificações pós-traducionais ou pela presença de inibidores. Assim, os testes de quantificação da expressão do mRNA de citocinas não visam inferir o impacto que essas citocinas podem ter sobre as células, mas é utilizada como uma forma de avaliar a capacidade dos diferentes biomateriais de ativar a resposta de macrófagos.

Cápsulas vazias foram incubadas com macrófagos de forma a demonstrar se há ativação dos macrófagos pelos biomateriais e se os biomateriais possuem

biocompatibilidade comparável. Observamos que os biomateriais Bioprotect e Bioprotect-Pln induzem expressão similar das citocinas *Il-1 β* e *Tnf- α* pelos macrófagos e que os níveis de expressão de citocinas são similares aos níveis apresentados pelo controle negativo de ativação (Figura 46). Além disso, os níveis de expressão de ambas as citocinas avaliadas foi estatisticamente reduzido quando comparados aos níveis expressos por macrófagos tratados com diferentes concentrações de LPS (Figura 46). LPS é um componente da membrana plasmática de bactérias gram-negativas, sendo descrito como um potente ativador de monócitos e macrófagos (MENG; LOWELL, 1997). As citocinas *Il-1 β* e *TNF- α* são dois dos principais efetores de dano às ilhotas encapsuladas e transplantadas (CETKOVIC-CVRLJE; EIZIRIK, 1994; GYSEMANS et al., 2000; XENOS et al., 1994) Os resultados obtidos indicam que o novo biomaterial Bioprotect-Pln não só apresenta biocompatibilidade *in vitro* similar à do Bioprotect, como, também, que ambos os biomateriais não induzem aumento de expressão de citocinas *Il-1 β* e *Tnf- α* , diferentemente do tratamento com LPS, sugerindo que os dois biomateriais não desencadeiam ativação de resposta inflamatória por macrófagos *in vitro*.

A expressão de citocinas também foi avaliada quando macrófagos foram expostos a ilhotas pancreáticas nuas, encapsuladas com Bioprotect ou encapsuladas com Bioprotect-Pln, demonstrando, assim, o potencial imunoprotetor das diferentes cápsulas. Os níveis de expressão de *Il-1 β* e *Tnf- α* permaneceram similares quando macrófagos não foram expostos a células ou quando foram expostos a células encapsuladas com Bioprotect ou Bioprotect-Pln, sendo que, os níveis de expressão de citocinas foram estatisticamente elevados quando macrófagos foram expostos a ilhotas pancreáticas nuas (Figura 47). O microencapsulamento pode ser utilizado para o transplante de células de origem alogênica ou xenogênica. Para a imunoproteção de células alogênicas, a prevenção do contato célula-célula entre as ilhotas

pancreáticas implantadas e as células do sistema imune do receptor é suficiente para evitar a rejeição (DUVIVIER-KALI et al., 2001). Entretanto, quando há diferenças maiores de histocompatibilidade entre doador e receptor, como ocorre no caso de transplante xenogênico (ANDERSON; KIRK, 2013), epítomos altamente imunorreativos das células xenogênicas podem ser liberados da cápsula, culminando na ativação do sistema imune do receptor e na liberação de citocinas deletérias que se difundem pela cápsula, prejudicando as células encapsuladas (PAREDES JUÁREZ et al., 2014). Observamos que o encapsulamento, com Bioprotect ou Bioprotect-PIn, é capaz de imunoprotoger ilhotas pancreáticas humanas, prevenindo a ativação dos macrófagos de camundongo pelas células encapsuladas e mantendo a expressão de citocinas a níveis similares aos do controle não ativado, mesmo no contexto de xenogenicidade.

Os resultados obtidos *in vitro* estabeleceram um bom precedente para que a biocompatibilidade do novo biomaterial fosse avaliada *in vivo*. A escolha do sítio de implante é fundamental para a eficiência do transplante, sendo necessário levar em consideração fatores como a possibilidade de retirada do implante, a proximidade a regiões vascularizadas e a necessidade de se evitar sítios muito susceptíveis a estresses químicos e físicos (SCHARP; MARCHETTI, 2014). O transplante intra-hepático, próximo à circulação, é utilizado no transplante de ilhotas nuas, porém é inviável para ilhotas microencapsuladas devido ao grande volume do enxerto e o risco de embolia devida à obstrução de pequenos vasos pelas ilhotas encapsuladas. A melhor alternativa é a cavidade peritoneal, por ser um sítio de fácil acesso e por acomodar o volume do enxerto de ilhotas microencapsuladas. Tanto nos experimentos em animais quanto nos ensaios clínicos, a cavidade peritoneal é o sítio de implante mais utilizado.

Após o implante na cavidade peritoneal de camundongos imunocompetentes, cápsulas de Bioprotect ou de Bioprotect-Pln foram recuperadas 7 ou 30 dias após o implante e foram avaliadas quanto a variações de diâmetro e o crescimento pericapsular no enxerto. A maior parte do volume de cápsulas implantadas foi facilmente recuperada, indicando que não houve adesão das mesmas aos órgãos e que estas estavam soltas na cavidade intraperitoneal, sendo facilmente recuperadas por lavagem. Dados da literatura descrevem que normalmente 80-100% das cápsulas recuperadas de implantes similares ao realizado neste trabalho não apresentam crescimento pericapsular (DARRABIE; KENDALL; OPARA, 2008; DE VOS et al., 1997; DE VOS; DE HAAN; VAN SCHILFGAARDE, 1997; DUVIVIER-KALI et al., 2001), sendo assim, o resultado obtido com o biomaterial Bioprotect-Pln, em que em média $81 \pm 10,6\%$ das microcápsulas foram recuperadas sem crescimento pericapsular (Figura 48B), consideradas limpas, é satisfatório, em comparação ao observado na literatura. O aumento no percentual de cápsulas de Bioprotect-Pln limpas, que foram recuperadas e a redução no percentual de cápsulas de Bioprotect-Pln recuperadas que apresentavam crescimento pericapsular leve e moderado, em relação aos implantes de cápsulas de Bioprotect, indica que Bioprotect-Pln possui biocompatibilidade superior ao Bioprotect. O diâmetro das capsulas permaneceu constante até os sete primeiros dias pós-implante e, apesar do aumento significativo no diâmetro observado aos 30 dias pós-implante (Figura 48D), não houve diferença significativa entre os biomateriais testados.

As células inflamatórias peritoneais participam na defesa contra danos na cavidade abdominal, porém, a produção excessiva de citocinas por essas células é um fator importante que contribui para a resposta inflamatória sistêmica, podendo causar falência múltipla de órgãos (MALIK et al., 2011) . Corroborando a observação, por microscopia de luz e por MEV, de que o crescimento pericapsular é menor em cápsulas de Bioprotect-Pln

(Figura 48 Figura 49), observamos que houve uma diminuição do número de células associadas ao lavado peritoneal de animais que receberam microcápsulas de Bioprotect-Pln em relação ao lavado peritoneal de animais que receberam microcápsulas de Bioprotect (Figura 50 e Figura 53). Além disso, não houve variação entre o número de células infiltradas na cavidade peritoneal do grupo Sham e o grupo que recebeu cápsulas Bioprotect-Pln, tendo sido possível, também, observar que cápsulas de Biodritina induzem aumento significativo no número de células infiltradas na cavidade peritoneal (Figura 53). Os resultados obtidos demonstram que o implante das microcápsulas é capaz de aumentar a resposta inflamatória peritoneal associada ao procedimento cirúrgico, pois há aumento no número de células associadas ao lavado peritoneal dos animais que receberam cápsulas de Biodritina e de Bioprotect em relação ao controle Sham (Figura 53), porém, as cápsulas de Bioprotect-Pln são capazes de diminuir esse processo inflamatório, mantendo o número de células infiltradas no peritônio em níveis similares àqueles da condição Sham (Figura 53).

Uma vez que macrófagos, e outras células do sistema imune, como neutrófilos e basófilos, sejam ativados pelo processo de inflamação desencadeado pelo implante de microcápsulas, essas células liberam citocinas bioativas na vizinhança do enxerto, de forma a promover a cicatrização da ferida (BEUSCHER; GÜNTHER; RÖLLINGHOFF, 1990; DINARELLO, 2009; PARAMESWARAN; PATIAL, 2010). Entretanto, algumas dessas citocinas são destrutivas para o enxerto. Foi demonstrado que o principal dano aos enxertos é devido à resposta inflamatória inespecífica (ALEJANDRO et al., 1986; NAGATA et al., 1990) e, apesar do processo inflamatório durar menos de duas semanas, até 60% das ilhotas pancreáticas encapsuladas podem ser perdidas nesse período (DE VOS et al., 2014). No geral, as microcápsulas de alginato possuem uma permeabilidade que permite a entrada de moléculas de peso molecular (PM) abaixo 100kDa (DE VOS et al., 1997). Como consequência,

a maioria das microcápsulas não protege contra moléculas bioativas da resposta imune inata. A única estratégia para prevenir os danos causados por essas moléculas é evitar a ativação do sistema imune do receptor (PAREDES JUÁREZ et al., 2014). Algumas das principais citocinas envolvidas na reação inflamatória contra células encapsuladas são IFN- γ (PM 31,8kDa), IL-12 (PM 75kDa), TNF- α (PM 51,9kDa), IL-6 (PM 21,7kDa), IL-10 (PM 37,6kDa) e algumas quimiocinas, como MCP-1 (PM 26,2kDa) (AO et al., 2006). Essas citocinas possuem um papel central na cascata de ativação de macrófagos e massa molecular aparente abaixo do limite inferior de permeabilidade das cápsulas.

As citocinas são consideradas um grupo de proteínas e glicoproteínas solúveis, secretadas em resposta a um sinal de estresse. Para as ilhotas pancreáticas, as citocinas TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , e IL-6 são as citocinas pró-inflamatórias mais proeminentes, contribuindo para a ativação de células do sistema imune e para a apoptose das células-beta (PADGETT et al., 2013). Além de observarmos a redução estatisticamente significativa dos níveis das citocinas Tnf- α e Ifn- γ no lavado peritoneal dos camundongos que receberam cápsulas de Bioprotect-PIn, em relação aos camundongos que receberam cápsulas de Bioprotect, também observamos redução nos níveis da citocina Il-12p70 (Figura 51). A citocina Il-12 é um heterodímero das subunidades Il-12p35 e Il-12p40, que compõem a citocina ativa Il-12p70. Il-12 é produzida por diversas células do sistema imune, inclusive macrófagos, e atua induzindo a produção de Ifn- γ e a ativação da imunidade inata (GEE et al., 2009).

Também foi observada a redução nos níveis da quimiocina Mcp-1 no lavado peritoneal de camundongos que receberam cápsulas de Bioprotect-PIn (Figura 51). As quimiocinas constituem um grupo de citocinas cuja função é atrair células para locais de inflamação. A quimiocina Mcp-1 é segregada por vários tipos de células e sua função mais conhecida é o forte recrutamento e a ativação de macrófagos (MELZI et al., 2010). Foi demonstrado que

pacientes que receberam preparações de ilhotas associadas a níveis elevados de MCP-1 não atingiram independência de insulina em longo prazo (PIEMONTI et al., 2002). Altos níveis de MCP-1 no sítio de implante atraem macrófagos, os quais, quando ativados pela reação de inflamação, causam destruição do enxerto (PIEMONTI et al., 2002).

Nas amostras de soro dos camundongos submetidos ao procedimento cirúrgico de implante das microcápsulas de Bioprotect-PIn, foi observada redução estatisticamente significativa das citocinas Il-12p70 e Tnf- α (Figura 52). Esses resultados demonstram a existência de uma resposta sistêmica em relação ao processo cirúrgico e ao implante das microcápsulas em camundongos imunocompetentes, e, além disso, demonstram que o biomaterial Bioprotect-PIn possui propriedade anti-inflamatória capaz de atenuar a produção de citocinas associadas a esse processo inflamatório.

Os resultados obtidos *in vivo* indicam que o enxerto de cápsulas produzidas com o biomaterial Bioprotect-PIn induz menor crescimento pericapsular no enxerto, menor infiltração de células na cavidade peritoneal e menor produção de citocinas pró-inflamatórias, indicando que a presença de polilaminina na malha capsular induz uma resposta anti-inflamatória que pode beneficiar a manutenção do enxerto e preservar a funcionalidade das ilhotas pancreáticas. Esse resultado está de acordo com os testes de funcionalidade realizados *in vitro* com ilhotas pancreáticas encapsuladas com Bioprotect-PIn. A presença de polilaminina induziu a expressão de moléculas anti-apoptóticas pelas células encapsuladas com Bioprotect-PIn.

Diversos estudos demonstraram a habilidade de microcápsulas contendo ilhotas pancreáticas em restabelecer a normoglicemia em diferentes modelos animais diabéticos e imunocompetentes e em humanos. O número de relatos é grande, assim como as variadas taxas de sucesso apresentadas, reforçando os desafios inerentes ao desenvolvimento dessa

tecnologia. O procedimento cirúrgico para implante das microcápsulas, apesar de ser minimamente invasivo, induz uma resposta inflamatória que causa a falha do enxerto devido ao desenvolvimento de fibrose e isolamento. Em modelos murinos, cerca de 60% das ilhotas implantadas morrem nas primeiras semanas após o transplante devido à reação inflamatória (DE VOS et al., 2014). Os resultados obtidos com o biomaterial Bioprotect comprovam que é possível reverter o diabetes utilizando ilhotas pancreáticas microencapsuladas, porém, que 40% dos animais retornam à hiperglicemia, com perda de funcionalidade do enxerto associada à uma resposta inflamatória inadequada ao implante (RODRIGUES, 2012). Essas observações reforçam a necessidade de se obter um biomaterial que, além de fornecer uma barreira para o sistema imune do receptor, também minimize a resposta inflamatória associada ao implante. Para a obtenção de microcápsulas funcionais e biocompatíveis, o biomaterial não deve impedir o funcionamento das células microencapsuladas, deve proteger as células microencapsuladas do sistema imune e não deve ativar o sistema imune do receptor, características comprovadas para o Bioprotect-Pln. Desta forma, este trabalho demonstrou que o biomaterial Bioprotect-Pln retém o potencial anti-inflamatório da polilaminina, sendo capaz de diminuir a resposta inflamatória associada ao implante de microcápsulas em camundongos imunocompetentes, sendo funcional e biocompatível.

3.6. Conclusões

O encapsulamento de células visa compatibilizar o ambiente intracapsular de forma a promover a sobrevivência das ilhotas encapsuladas e evitar o contato com o sistema imune do receptor. A qualidade da composição capsular, além de contribuir para a sobrevivência e a funcionalidade das células encapsuladas, também pode evitar a resposta inflamatória contra o enxerto, que é uma das principais causas para a perda de funcionalidade. No presente trabalho, polilaminina, um polímero de laminina que possui a estrutura de matrizes encontradas *in vivo* e propriedades anti-inflamatórias, foi incorporado à malha capsular, de forma a substituir a laminina não polimerizada do Bioprotect. As cápsulas produzidas com o biomaterial desenvolvido, Bioprotect-Pln, são térmica- e mecanicamente estáveis e biocompatíveis, além de serem capazes de imunoproteger e de preservarem os níveis de secreção de insulina de ilhotas pancreáticas humanas *in vitro*, em relação ao controle encapsulado com Bioprotect. Quando encapsuladas com Bioprotect-Pln, as ilhotas pancreáticas de rato apresentaram modulação gênica, sugerindo proteção contra apoptose. A polilaminina é capaz de modular e atenuar respostas inflamatórias em camundongos. De fato, quando cápsulas vazias de Bioprotect-Pln são implantadas em camundongos, ocorre menor isolamento do enxerto devido a crescimento pericapsular, menor infiltração de células na cavidade peritoneal e menor produção de citocinas pró-inflamatórias, tanto no sítio de implante quanto sistemicamente. Os resultados obtidos indicam que a presença de polilaminina na malha capsular induz uma resposta anti-inflamatória, que pode beneficiar a manutenção do enxerto, diminuindo a apoptose das células encapsuladas e preservando a funcionalidade das ilhotas pancreáticas, de forma a diminuir a perda de massa do enxerto e, com isso, diminuir a massa de ilhotas pancreáticas necessárias para manter a normoglicemia ou ainda, induzir uma resposta metabólica melhor e prolongada.

4. Conclusões gerais

A oferta limitada de pâncreas de doadores falecidos e a necessidade de imunossupressão crônica dos receptores são fatores que limitam a aplicabilidade do transplante de ilhotas pancreáticas em pacientes de DM1. O uso de imunossupressores está relacionado a diversos efeitos colaterais, inclusive à perda de funcionalidade do enxerto. Alternativas que dispensem o uso de imunossupressores em associação ao transplante de ilhotas pancreáticas eliminam o risco de imunossupressão crônica e permitem que o transplante também seja indicado para pacientes jovens (menores de 18 anos de idade) e àqueles com DM1 mais estável.

Neste trabalho, um biomaterial inovador foi desenvolvido contendo um polímero de laminina (polilaminina, PLn). A produção de microcápsulas biocompatíveis e estáveis com um componente de membrana extracelular visa preservar a funcionalidade das células microencapsuladas devido ao menor nível de processo inflamatório e estabelecer um ambiente imunoprotegido para o encapsulamento de ilhotas pancreáticas e células produtoras de insulina, eliminando a necessidade de imunossupressão associada ao transplante de IPCs. Os resultados obtidos indicam que a presença de polilaminina na malha das cápsulas de Bioprotect-PLn induz uma resposta anti-inflamatória que pode beneficiar a manutenção do enxerto, diminuindo a apoptose das células encapsuladas, preservando a funcionalidade das ilhotas pancreáticas e podendo contribuir para diminuir a perda de massa do enxerto devido à resposta inflamatória associada ao procedimento de implante. Com isso, acreditamos que será possível induzir uma resposta metabólica prolongada ou, ainda, diminuir a massa de ilhotas pancreáticas necessárias para manter a normoglicemia. Os efeitos biológicos atribuídos a laminina dependem da formação de uma estrutura supramolecular adequada, o polímero utilizado neste trabalho é organizado em uma

estrutura planar-poligonal, similar à estrutura encontrada em matrizes de laminina associadas a corpos embrióides, o que também torna esse polímero atraente para o encapsulamento de células obtidas a partir da diferenciação de células-tronco embrionárias.

Quando a questão da tolerância imune for contornada e a terapia de reposição for estendida a um número maior de pacientes, haverá um aumento dramático na demanda por IPCs. Dessa forma, será fundamental identificar fontes ilimitadas e financeiramente viáveis de IPCs, como as IPCs derivadas de células-tronco. Neste trabalho, o mecanismo molecular que dirige o processo de diferenciação de mESCs em IPCs foi analisado visando aprimorar o processo de diferenciação. Linhagens de mESCs geneticamente modificadas nos permitiram verificar que a inibição de *Txnip* na diferenciação β -pancreática pode induzir IPCs com maior expressão de marcadores de células- β e que são mais responsivas ao estímulo de glicose. Além disso, o modelo de *zebrafish* nos permitiu elucidar *in vivo* o papel de *Txnip* durante a organogênese pancreática, revelando que a inibição de *Txnip* é capaz de aumentar a massa de células- β durante o desenvolvimento pancreático através do estímulo de células presentes no ducto extra-pancreático. Ao estabelecer conhecimentos acerca dos mecanismos moleculares que dirigem a organogênese pancreática e a diferenciação β -pancreática, o presente trabalho contribui para a identificação de fontes virtualmente ilimitadas e financeiramente viáveis de IPCs.

O DM é uma desordem metabólica que irá afetar 629 milhões de pessoas em 2045, das quais, 10% terá DM1. Além de representar um grande encargo financeiro sobre os indivíduos e suas famílias, devido ao custo da insulina e outros medicamentos essenciais, o DM1 também tem um grande impacto econômico sobre o Sistema de Saúde e a economia nacional. Lidar com esta epidemia global é uma tarefa monumental que exigirá um conhecimento crescente da doença e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais

eficazes. Atualmente, o transplante de ilhotas pancreáticas é visto como a terapia celular mais promissora para atingir independência de insulina em pacientes de DM1. Porém, a aplicabilidade desse transplante ainda é limitada. Este trabalho contribuiu para elucidar os mecanismos moleculares que podem aprimorar o processo de diferenciação de PSCs em IPCs, estabelecendo uma fonte alternativa de células para a terapia de reposição, e, também, estabeleceu um biomaterial inovador que diminui a resposta inflamatória ao implante das microcápsulas, sendo capaz de imunoprotéger células microencapsuladas. Desta forma, este trabalho contribui para o estabelecimento da terapia de reposição celular para pacientes de DM1.

5. Referências bibliográficas

- ABDELALIM, E. M. et al. Pluripotent Stem Cells as a Potential Tool for Disease Modelling and Cell Therapy in Diabetes. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 10, n. 3, p. 327–337, 1 jun. 2014.
- ABDERRAZAK, A. et al. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biology*, v. 4, p. 296–307, 2015.
- ABDI, R. et al. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes*, v. 57, n. 7, p. 1759–1767, jul. 2008.
- AGHAZADEH, Y.; NOSTRO, M. C. Cell Therapy for Type 1 Diabetes: Current and Future Strategies. *Current Diabetes Reports*, v. 17, n. 6, p. 37, 1 jun. 2017.
- AKINCI, E. et al. Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a beta (β) cell character using Pdx1, Ngn3 and MafA. *The Biochemical Journal*, v. 442, n. 3, p. 539–550, 15 mar. 2012.
- AKINCI, E. et al. Reprogramming of various cell types to a beta-like state by Pdx1, Ngn3 and MafA. *PLoS One*, v. 8, n. 11, p. e82424, 2013.
- ALEJANDRO, R. et al. Natural history of intrahepatic canine islet cell autografts. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 78, n. 5, p. 1339–1348, nov. 1986.
- AL-HASANI, K. et al. Adult duct-lining cells can reprogram into β -like cells able to counter repeated cycles of toxin-induced diabetes. *Developmental Cell*, v. 26, n. 1, p. 86–100, 15 jul. 2013.
- ANDERSON, D. J.; KIRK, A. D. Primate models in organ transplantation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 3, n. 9, p. a015503, 1 set. 2013.
- ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology*, v. 20, n. 2, p. 86–100, abr. 2008.
- ANDERSON, K. R. et al. Cooperative Transcriptional Regulation of the Essential Pancreatic Islet Gene NeuroD1 (Beta2) by Nkx2.2 and Neurogenin 3. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 45, p. 31236–31248, 6 nov. 2009.
- AO, X. et al. Multiplexed cytokine detection in microliter microdialysis samples obtained from activated cultured macrophages. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 40, n. 4, p. 915–921, 3 mar. 2006.
- ARROYO, A. G.; IRUELA-ARISPE, M. L. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovascular Research*, v. 86, n. 2, p. 226–235, 1 maio 2010.
- ARTNER, I. et al. MafB is required for islet beta cell maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 10, p. 3853–3858, 6 mar. 2007.
- AUMAILLEY, M. The laminin family. *Cell Adhesion & Migration*, v. 7, n. 1, p. 48–55, 1 jan. 2013.
- BABENSEE, J. E. et al. Host response to tissue engineered devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 33, n. 1–2, p. 111–139, 3 ago. 1998.
- BALL, L. M. et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood*, v. 110, n. 7, p. 2764–2767, 1 out. 2007.
- BALLINGER, W. F.; LACY, P. E. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery*, v. 72, n. 2, p. 175–186, ago. 1972.
- BANGA, A. et al. In vivo reprogramming of Sox9+ cells in the liver to insulin-secreting ducts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 38, p. 15336–15341, 18 set. 2012.

- BANTING, F. G. et al. Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Canadian Medical Association Journal*, v. 12, n. 3, p. 141–146, mar. 1922.
- BANTING, F. G.; BEST, C. H. The internal secretion of the pancreas. *The Indian Journal of Medical Research*, v. 125, n. 3, p. 251–266, 1922.
- BARROSO, M. M. S. et al. Artificial Laminin Polymers Assembled in Acidic pH Mimic Basement Membrane Organization. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 17, p. 11714–11720, 25 abr. 2008.
- BASFORD, C. L. et al. The functional and molecular characterisation of human embryonic stem cell-derived insulin-positive cells compared with adult pancreatic beta cells. *Diabetologia*, v. 55, n. 2, p. 358–371, fev. 2012.
- BASTA, G. et al. Optimized parameters for microencapsulation of pancreatic islet cells: an in vitro study clueing on islet graft immunoprotection in type 1 diabetes mellitus. *Transplant Immunology*, v. 13, n. 4, p. 289–296, dez. 2004.
- BASTA, G. et al. Long-Term Metabolic and Immunological Follow-Up of Nonimmunosuppressed Patients With Type 1 Diabetes Treated With Microencapsulated Islet Allografts. *Diabetes Care*, v. 34, n. 11, p. 2406–2409, nov. 2011.
- BASTIDAS-PONCE, A. et al. Cellular and molecular mechanisms coordinating pancreas development. *Development*, v. 144, n. 16, p. 2873–2888, 15 ago. 2017.
- BEN-OTHTMAN, N. et al. Long-Term GABA Administration Induces Alpha Cell-Mediated Beta-like Cell Neogenesis. *Cell*, v. 168, n. 1–2, p. 73–85.e11, 12 jan. 2017.
- BEUSCHER, H. U.; GÜNTHER, C.; RÖLLINGHOFF, M. IL-1 beta is secreted by activated murine macrophages as biologically inactive precursor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 144, n. 6, p. 2179–2183, 15 mar. 1990.
- BIO-ATLAS. A Lifespan Atlas of the Zebrafish. Disponível em: <<http://bio-atlas.psu.edu/zf/index.php>>. Acesso em: 21 mar. 2018.
- BODNAR, J. S. et al. Positional cloning of the combined hyperlipidemia gene *Hyplip1*. *Nature genetics*, v. 30, n. 1, p. 110–116, jan. 2002.
- BONNER-WEIR, S. Islet growth and development in the adult. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 24, n. 3, p. 297–302, 6 jan. 2000.
- BOROWIAK, M. et al. Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, v. 4, n. 4, p. 348–358, 3 abr. 2009.
- BOUWENS, L.; PIPELEERS, D. G. Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. *Diabetologia*, v. 41, n. 6, p. 629–633, jun. 1998.
- BOYD, A. S. et al. A Comparison of Protocols Used to Generate Insulin-Producing Cell Clusters from Mouse Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS*, v. 26, n. 5, p. 1128–1137, 1 maio 2008.
- BURKE, G. W. et al. Recurrence of autoimmunity following pancreas transplantation. *Current Diabetes Reports*, v. 11, n. 5, p. 413–419, out. 2011.
- BURLISON, J. S. et al. *Pdx-1* and *Ptf1a* concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells. *Developmental Biology*, v. 316, n. 1, p. 74–86, 1 abr. 2008.
- BUTLER, L. M. et al. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 18, p. 11700–11705, 3 set. 2002.
- CALAFIORE, R. et al. Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes: first two cases. *Diabetes Care*, v. 29, n. 1, p. 137–138, jan. 2006.

- CALAFIORE, R.; BASTA, G. Clinical application of microencapsulated islets: Actual prospectives on progress and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews, Cell encapsulation and drug delivery*, v. 67–68, p. 84–92, 10 abr. 2014.
- CAMPANHA RODRIGUES, A. L. et al. Therapeutic Potential of Laminin-Biodritin Microcapsules for Type 1 Diabetes Mellitus. *Cell transplantation*, 20 nov. 2013.
- CAMPOS-LISBÔA, A. C. V. et al. Biodritin Microencapsulated Human Islets of Langerhans and Their Potential for Type 1 Diabetes Mellitus Therapy. *Transplantation Proceedings*, v. 40, n. 2, p. 433–435, mar. 2008.
- CANTLEY, J. et al. The hypoxia response pathway and β -cell function. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, v. 12 Suppl 2, p. 159–167, out. 2010.
- CASTELLANI, L. W. et al. Mapping a gene for combined hyperlipidaemia in a mutant mouse strain. *Nature Genetics*, v. 18, n. 4, p. 374–377, abr. 1998.
- CETKOVIC-CVRLJE, M.; EIZIRIK, D. L. TNF-alpha and IFN-gamma potentiate the deleterious effects of IL-1 beta on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine*, v. 6, n. 4, p. 399–406, jul. 1994.
- CHAI, T. F. et al. A potential mechanism of metformin-mediated regulation of glucose homeostasis: Inhibition of Thioredoxin-interacting protein (Txnip) gene expression. *Cellular Signalling*, v. 24, n. 8, p. 1700–1705, 1 ago. 2012.
- CHA-MOLSTAD, H. et al. Glucose-stimulated Expression of Txnip Is Mediated by Carbohydrate Response Element-binding Protein, p300, and Histone H4 Acetylation in Pancreatic Beta Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 25, p. 16898–16905, 19 jun. 2009.
- CHANG, T. M. SEMIPERMEABLE MICROCAPSULES. *Science (New York, N.Y.)*, v. 146, n. 3643, p. 524–525, 23 out. 1964.
- CHEN, J. et al. Exenatide inhibits beta-cell apoptosis by decreasing thioredoxin-interacting protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 346, n. 3, p. 1067–1074, 4 ago. 2006a.
- CHEN, J. et al. Exenatide inhibits beta-cell apoptosis by decreasing thioredoxin-interacting protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 346, n. 3, p. 1067–1074, 4 ago. 2006b.
- CHEN, J. et al. Thioredoxin-interacting protein: a critical link between glucose toxicity and beta-cell apoptosis. *Diabetes*, v. 57, n. 4, p. 938–944, abr. 2008a.
- CHEN, J. et al. Thioredoxin-interacting protein deficiency induces Akt/Bcl-xL signaling and pancreatic beta-cell mass and protects against diabetes. *The FASEB Journal*, v. 22, n. 10, p. 3581–3594, out. 2008b.
- CHEN, J. et al. Lack of TXNIP protects against mitochondria-mediated apoptosis but not against fatty acid-induced ER stress-mediated beta-cell death. *Diabetes*, v. 59, n. 2, p. 440–447, fev. 2010.
- CHEN, K. S.; DELUCA, H. F. Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochimica Et Biophysica Acta*, v. 1219, n. 1, p. 26–32, 13 set. 1994.
- CHEN, S. et al. Anatomical and histological observation on the pancreas in adult zebrafish. *Pancreas*, v. 34, n. 1, p. 120–125, jan. 2007.
- CHEN, S. et al. A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. *Nature Chemical Biology*, v. 5, n. 4, p. 258–265, abr. 2009.
- CHENG, J. Y. C. et al. Matrix components and scaffolds for sustained islet function. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, v. 17, n. 4, p. 235–247, ago. 2011.
- CHERA, S. et al. Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic δ -cells into insulin producers. *Nature*, v. 514, n. 7523, p. 503, 20 ago. 2014.

COLLABORATIVE ISLET TRANSPLANT REGISTRY (CITR). Collaborative Islet Transplant Registry, 2016.

COLLOMBAT, P. et al. The simultaneous loss of Arx and Pax4 genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the alpha- and beta-cell lineages in the mouse endocrine pancreas. *Development (Cambridge, England)*, v. 132, n. 13, p. 2969–2980, jul. 2005.

CORBETT, J. A. Thioredoxin-Interacting Protein Is Killing My β -cells! *Diabetes*, v. 57, n. 4, p. 797–798, 4 jan. 2008.

D'AMOUR, K. A. et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, v. 24, n. 11, p. 1392–1401, nov. 2006.

DARRABIE, M. D.; KENDALL, W. F.; OPARA, D. C. Effect of alginate composition and gelling cation on microbead swelling. *research-article*. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/02652040600687621%20>>. Acesso em: 24 fev. 2014.

DE GROOT, M.; SCHUURS, T. A.; VAN SCHILFGAARDE, R. Causes of limited survival of microencapsulated pancreatic islet grafts. *The Journal of Surgical Research*, v. 121, n. 1, p. 141–150, set. 2004.

DE VOS, P. et al. Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets. *Diabetologia*, v. 40, n. 3, p. 262–270, mar. 1997.

DE VOS, P. et al. Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews, Cell encapsulation and drug delivery*. v. 67–68, p. 15–34, 10 abr. 2014.

DE VOS, P.; DE HAAN, B.; VAN SCHILFGAARDE, R. Effect of the alginate composition on the biocompatibility of alginate-polylysine microcapsules. *Biomaterials*, v. 18, n. 3, p. 273–278, fev. 1997.

DEMCOLLARI, T. I.; CUJBA, A.-M.; SANCHO, R. Phenotypic plasticity in the pancreas: new triggers, new players. *Current Opinion in Cell Biology, Cell Differentiation and Development*. v. 49, p. 38–46, 1 dez. 2017.

DESGRAZ, R.; HERRERA, P. L. Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors. *Development (Cambridge, England)*, v. 136, n. 21, p. 3567–3574, nov. 2009.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 519–550, 2009.

DOMÍNGUEZ-BENDALA, J.; RICORDI, C. Present and future cell therapies for pancreatic beta cell replenishment. *World Journal of Gastroenterology*, v. 18, n. 47, p. 6876–6884, 21 dez. 2012.

DONG, P. D. S. et al. Fgf10 regulates hepatopancreatic ductal system patterning and differentiation. *Nature Genetics*, v. 39, n. 3, p. 397–402, mar. 2007.

DONG, P. D. S. et al. Graded levels of Ptf1a differentially regulate endocrine and exocrine fates in the developing pancreas. *Genes & Development*, v. 22, n. 11, p. 1445–1450, 1 jun. 2008.

DROR, V. et al. Notch signalling suppresses apoptosis in adult human and mouse pancreatic islet cells. *Diabetologia*, v. 50, n. 12, p. 2504–2515, dez. 2007.

DUVIVIER-KALI, V. F. et al. Complete Protection of Islets Against Allorejection and Autoimmunity by a Simple Barium-Alginate Membrane. *Diabetes*, v. 50, n. 8, p. 1698–1705, 8 jan. 2001.

EIZIRIK, D. L.; COLLI, M. L.; ORTIS, F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nature Reviews. Endocrinology*, v. 5, n. 4, p. 219–226, abr. 2009.

EL KHATTABI, I.; SHARMA, A. Proper activation of MafA is required for optimal differentiation and maturation of pancreatic β -cells. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 29, n. 6, p. 821–831, dez. 2015.

ELLIOTT, R. B. et al. Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after

- xenotransplantation. *Xenotransplantation*, v. 14, n. 2, p. 157–161, mar. 2007.
- EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, v. 292, n. 5819, p. 154–156, 9 jul. 1981.
- FANG, B. et al. Cotransplantation of haploidentical mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells and to reduce the risk of graft failure in two children with severe aplastic anemia. *Pediatric Transplantation*, v. 13, n. 4, p. 499–502, jun. 2009.
- FARRELL, M. R. et al. Thioredoxin-interacting protein inhibits hypoxia-inducible factor transcriptional activity. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 49, n. 9, p. 1361–1367, 15 nov. 2010.
- FIELD, H. A. et al. Formation of the digestive system in zebrafish. I. liver morphogenesis. *Developmental Biology*, v. 253, n. 2, p. 279–290, 15 jan. 2003.
- FILIOS, S. R. et al. MicroRNA-200 is induced by thioredoxin-interacting protein and regulates Zeb1 protein signaling and beta cell apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 52, p. 36275–36283, 26 dez. 2014.
- FIORETTO, P. et al. Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *The New England Journal of Medicine*, v. 339, n. 2, p. 69–75, 9 jul. 1998.
- FREIRE, E. et al. Biocompatibility and Structural Stability of a Laminin Biopolymer. *Macromolecular Bioscience*, v. 12, n. 1, p. 67–74, 2012.
- FREIRE, E.; COELHO-SAMPAIO, T. Self-assembly of Laminin Induced by Acidic pH. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 2, p. 817–822, 14 jan. 2000.
- GAO, N. et al. Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development. *Genes & Development*, v. 22, n. 24, p. 3435–3448, 15 dez. 2008.
- GEE, K. et al. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflammation & Allergy Drug Targets*, v. 8, n. 1, p. 40–52, mar. 2009.
- GIBLY, R. F. et al. Advancing islet transplantation: From engraftment to the immune response. *Diabetologia*, v. 54, n. 10, p. 2494–2505, 1 out. 2011.
- GIN, H. et al. Biocompatibility of polyacrylamide microcapsules implanted in peritoneal cavity or spleen of the rat. Effect on various inflammatory reactions in vitro. *Biomaterials, Artificial Cells, and Artificial Organs*, v. 18, n. 1, p. 25–42, 1990.
- GRUESSNER, A. C. 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). The review of diabetic studies: *RDS*, v. 8, n. 1, p. 6–16, 2011.
- GU, G.; BROWN, J. R.; MELTON, D. A. Direct lineage tracing reveals the ontogeny of pancreatic cell fates during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development*, v. 120, n. 1, p. 35–43, jan. 2003.
- GYSEMANS, C. A. et al. Early graft failure of xenogeneic islets in NOD mice is accompanied by high levels of interleukin-1 and low levels of transforming growth factor-beta mRNA in the grafts. *Diabetes*, v. 49, n. 12, p. 1992–1997, dez. 2000.
- HAN, S. H. et al. VDUP1 upregulated by TGF-beta1 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits tumor cell growth by blocking cell-cycle progression. *Oncogene*, v. 22, n. 26, p. 4035–4046, 26 jun. 2003.
- HAUMAITRE, C. et al. Lack of TCF2/vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 5, p. 1490–1495, 1 fev. 2005.
- HERING, B. J. et al. Phase 3 Trial of Transplantation of Human Islets in Type 1 Diabetes Complicated by Severe Hypoglycemia. *Diabetes Care*, v. 39, n. 7, p. 1230–1240, jul. 2016.

HESELSON, D. et al. Distinct populations of quiescent and proliferative pancreatic beta-cells identified by *HOTCre* mediated labeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 35, p. 14896–14901, 1 set. 2009.

HISAOKA, M.; HARATAKE, J.; HASHIMOTO, H. Pancreatic morphogenesis and extracellular matrix organization during rat development. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, v. 53, n. 3, p. 163–172, jul. 1993.

HUANG, Y.; LINSEN, S. E. V. Partial depletion of yolk during zebrafish embryogenesis changes the dynamics of methionine cycle and metabolic genes. *BMC genomics*, v. 16, p. 427, 4 jun. 2015.

HUI, T. Y. et al. Mice Lacking Thioredoxin-interacting Protein Provide Evidence Linking Cellular Redox State to Appropriate Response to Nutritional Signals. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 23, p. 24387–24393, 6 abr. 2004.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *Diabetes Atlas*. Disponível em: <<http://www.idf.org/diabetesatlas>>. Acesso em: 17 fev. 2015.

ISHIHARA, H. et al. Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia*, v. 36, n. 11, p. 1139–1145, nov. 1993.

JAO, L.-E.; WENTE, S. R.; CHEN, W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 34, p. 13904–13909, 20 ago. 2013.

JIANG, J. et al. Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, v. 25, n. 8, p. 1940–1953, ago. 2007a.

JIANG, W. et al. In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Research*, v. 17, n. 4, p. 333–344, abr. 2007b.

JING, G. et al. Thioredoxin-interacting protein promotes islet amyloid polypeptide expression through miR-124a and FoxA2. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 17, p. 11807–11815, 25 abr. 2014.

JOHANSSON, K. A. et al. Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types. *Developmental Cell*, v. 12, n. 3, p. 457–465, mar. 2007.

JOHANSSON, U. et al. Formation of composite endothelial cell-mesenchymal stem cell islets: a novel approach to promote islet revascularization. *Diabetes*, v. 57, n. 9, p. 2393–2401, set. 2008.

JOHNSON, J. D. The quest to make fully functional human pancreatic beta cells from embryonic stem cells: climbing a mountain in the clouds. *Diabetologia*, v. 59, n. 10, p. 2047–2057, 1 out. 2016.

JUNN, E. et al. Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 164, n. 12, p. 6287–6295, 15 jun. 2000.

JUSTE, S. et al. Effect of poly-L-lysine coating on macrophage activation by alginate-based microcapsules: assessment using a new in vitro method. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, v. 72, n. 4, p. 389–398, 15 mar. 2005.

KAKITA, K.; GIDDINGS, S.; PERMUTT, M. A. Biosynthesis of rat insulins I and II: evidence for differential expression of the two genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 79, n. 9, p. 2803–2807, maio 1982.

KALB, E.; ENGEL, J. Binding and calcium-induced aggregation of laminin onto lipid bilayers. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, n. 28, p. 19047–19052, 10 maio 1991.

KAPURNIOTU, A. Amyloidogenicity and cytotoxicity of islet amyloid polypeptide. *Biopolymers*, v. 60, n. 6, p. 438–459, 2001.

- KARAMANO, M. et al. Milestones in the history of diabetes mellitus: The main contributors. *World Journal of Diabetes*, v. 7, n. 1, p. 1–7, 10 jan. 2016.
- KASSEM, S. A. et al. Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. *Diabetes*, v. 49, n. 8, p. 1325–1333, 1 ago. 2000.
- KAWAGUCHI, T. et al. Mechanism for fatty acid “sparing” effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 6, p. 3829–3835, 8 fev. 2002.
- KELLY, W. D. et al. Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery*, v. 61, n. 6, p. 827–837, jun. 1967.
- KIBBE, C. et al. FOXO1 competes with carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) and inhibits thioredoxin-interacting protein (TXNIP) transcription in pancreatic beta cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 32, p. 23194–23202, 9 ago. 2013.
- KIMMEL, R. A. et al. Requirement for Pdx1 in specification of latent endocrine progenitors in zebrafish. *BMC biology*, v. 9, p. 75, 31 out. 2011.
- KOBLAS, T. et al. Reprogramming of Pancreatic Exocrine Cells AR42J Into Insulin-producing Cells Using mRNAs for Pdx1, Ngn3, and MafA Transcription Factors. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, v. 5, p. e320, 17 maio 2016.
- KOPP, J. L.; GROMPE, M.; SANDER, M. Stem cells versus plasticity in liver and pancreas regeneration. *Nature Cell Biology*, v. 18, n. 3, p. 238, mar. 2016.
- KORZH, V. et al. Expression of zebrafish bHLH genes *ngn1* and *nrd* defines distinct stages of neural differentiation. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, v. 213, n. 1, p. 92–104, set. 1998.
- KRAPP, A. et al. The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein. *The EMBO journal*, v. 15, n. 16, p. 4317–4329, 15 ago. 1996.
- KROON, E. et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nature Biotechnology*, v. 26, n. 4, p. 443–452, abr. 2008.
- LABRIOLA, L. et al. Beneficial effects of prolactin and laminin on human pancreatic islet-cell cultures. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 263, n. 1–2, p. 120–133, 15 jan. 2007.
- LAI, Y.; CHEN, C.; LINN, T. Innate immunity and heat shock response in islet transplantation. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 157, n. 1, p. 1–8, jul. 2009.
- LANCMAN, J. J. et al. Specification of hepatopancreas progenitors in zebrafish by *hnf1ba* and *wnt2bb*. *Development (Cambridge, England)*, v. 140, n. 13, p. 2669–2679, 1 jul. 2013.
- LEE, S.-T. et al. Effect of mesenchymal stem cell transplantation on the engraftment of human hematopoietic stem cells and leukemic cells in mice model. *International Journal of Hematology*, v. 87, n. 3, p. 327–337, abr. 2008.
- LEITE, A. R. et al. Fibronectin and laminin induce expression of islet cell markers in hepatic oval cells in culture. *Cell and Tissue Research*, v. 327, n. 3, p. 529–537, mar. 2007.
- LI, S. et al. Laminin-sulfatide binding initiates basement membrane assembly and enables receptor signaling in Schwann cells and fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, v. 169, n. 1, p. 179–189, 11 abr. 2005.
- LINGOHR, M. K.; BUETTNER, R.; RHODES, C. J. Pancreatic β -cell growth and survival – a role in obesity-linked type 2 diabetes? *Trends in Molecular Medicine*, v. 8, n. 8, p. 375–384, 1 ago. 2002.
- LIU, Y.-W. Interrenal Organogenesis in the Zebrafish Model. *Organogenesis*, v. 3, n. 1, p. 44–48, 2007.

LLACUA, L. A.; FAAS, M. M.; VOS, P. DE. Extracellular matrix molecules and their potential contribution to the function of transplanted pancreatic islets. *Diabetologia*, p. 1–12, 6 jan. 2018.

LUDWIG, D. L. et al. Cloning, genetic characterization, and chromosomal mapping of the mouse VDUP1 gene. *Gene*, v. 269, n. 1–2, p. 103–112, 16 maio 2001.

LUMELSKY, N. et al. Differentiation of Embryonic Stem Cells to Insulin-Secreting Structures Similar to Pancreatic Islets. *Science*, v. 292, n. 5520, p. 1389–1394, 18 maio 2001.

LYNN, F. C. et al. Sox9 coordinates a transcriptional network in pancreatic progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 25, p. 10500–10505, 19 jun. 2007.

MAGENHEIM, J. et al. Ngn3(+) endocrine progenitor cells control the fate and morphogenesis of pancreatic ductal epithelium. *Developmental Biology*, v. 359, n. 1, p. 26–36, 1 nov. 2011.

MALIK, A. F. et al. Inflammasome components Asc and caspase-1 mediate biomaterial-induced inflammation and foreign body response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 50, p. 20095–20100, 13 dez. 2011.

MARIA-ENGLER, S. S. et al. Co-localization of nestin and insulin and expression of islet cell markers in long-term human pancreatic nestin-positive cell cultures. *The Journal of Endocrinology*, v. 183, n. 3, p. 455–467, dez. 2004.

MARTIN, U. Therapeutic Application of Pluripotent Stem Cells: Challenges and Risks. *Frontiers in Medicine*, v. 4, 14 dez. 2017.

MASSON, E. et al. High β -cell mass prevents streptozotocin-induced diabetes in thioredoxin-interacting protein-deficient mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, v. 296, n. 6, p. E1251–E1261, jun. 2009.

MATSUOKA, T. et al. The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 9, p. 2930–2933, 2 mar. 2004.

MATVEYENKO, A. V. et al. Inconsistent formation and nonfunction of insulin-positive cells from pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells in athymic nude rats. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, v. 299, n. 5, p. E713–720, nov. 2010.

MCGONNELL, I. M.; FOWKES, R. C. Fishing for gene function – endocrine modelling in the zebrafish. *Journal of Endocrinology*, v. 189, n. 3, p. 425–439, 6 jan. 2006.

MELZI, R. et al. Role of CCL2/MCP-1 in islet transplantation. *Cell Transplantation*, v. 19, n. 8, p. 1031–1046, 2010.

MENEZES, K. et al. Poly(laminin), a polymeric form of laminin, promotes regeneration after spinal cord injury. *The FASEB Journal*, v. 24, n. 11, p. 4513–4522, 11 jan. 2010.

MENG, F.; LOWELL, C. A. Lipopolysaccharide (LPS)-induced Macrophage Activation and Signal Transduction in the Absence of Src-Family Kinases Hck, Fgr, and Lyn. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 185, n. 9, p. 1661–1670, 5 maio 1997.

MIHAYLOVA, M. M.; SHAW, R. J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature Cell Biology*, v. 13, n. 9, p. 1016–1023, 2 set. 2011.

MILLER, K. M.; ANDERSON, J. M. Human monocyte/macrophage activation and interleukin 1 generation by biomedical polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 22, n. 8, p. 713–731, ago. 1988.

MINN, A. H. et al. Gene expression profiling in INS-1 cells overexpressing thioredoxin-interacting protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 336, n. 3, p. 770–778, 28 out. 2005.

- MINN, A. H.; HAFELE, C.; SHALEV, A. Thioredoxin-interacting protein is stimulated by glucose through a carbohydrate response element and induces beta-cell apoptosis. *Endocrinology*, v. 146, n. 5, p. 2397–2405, maio 2005.
- MIYAZAKI, J. et al. Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology*, v. 127, n. 1, p. 126–132, jul. 1990.
- MORO, E. et al. Analysis of beta cell proliferation dynamics in zebrafish. *Developmental Biology*, v. 332, n. 2, p. 299–308, 15 ago. 2009.
- MOSNA, F.; SENSEBÉ, L.; KRAMPERA, M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells and Development*, v. 19, n. 10, p. 1449–1470, out. 2010.
- MULTHOFF, G. Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. *Methods (San Diego, Calif.)*, v. 43, n. 3, p. 229–237, nov. 2007.
- MUOIO, D. M. TXNIP Links Redox Circuitry to Glucose Control. *Cell Metabolism*, v. 5, n. 6, p. 412–414, 6 jun. 2007.
- NAGATA, M. et al. Destruction of islet isografts by severe nonspecific inflammation. *Transplantation Proceedings*, v. 22, n. 2, p. 855–856, abr. 1990.
- NAJARIAN, J. S. et al. Human islet transplantation: a preliminary report. *Transplantation Proceedings*, v. 9, n. 1, p. 233–236, mar. 1977.
- NISHIMURA, W. et al. A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic beta-cells. *Developmental Biology*, v. 293, n. 2, p. 526–539, 15 maio 2006.
- NISHIYAMA, A. et al. Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 31, p. 21645–21650, 30 jul. 1999.
- NOORT, W. A. et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Experimental Hematology*, v. 30, n. 8, p. 870–878, ago. 2002.
- O'BRIEN, B. A. et al. Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *The Journal of Pathology*, v. 178, n. 2, p. 176–181, fev. 1996.
- PADGETT, L. E. et al. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1281, p. 16–35, abr. 2013.
- PAEK, H. J.; MORGAN, J. R.; LYSAGHT, M. J. Sequestration and synthesis: the source of insulin in cell clusters differentiated from murine embryonic stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, v. 23, n. 7, p. 862–867, ago. 2005.
- PAGLIUCA, F. W. et al. Generation of Functional Human Pancreatic β Cells In Vitro. *Cell*, v. 159, n. 2, p. 428–439, 9 out. 2014.
- PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, v. 20, n. 2, p. 87–103, 2010.
- PAREDES JUÁREZ, G. A. et al. Immunological and Technical Considerations in Application of Alginate-Based Microencapsulation Systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 2, 6 ago. 2014.
- PARIKH, H. et al. TXNIP Regulates Peripheral Glucose Metabolism in Humans. *PLoS Medicine*, v. 4, n. 5, maio 2007.
- PARSONS, M. J. et al. Notch-responsive cells initiate the secondary transition in larval zebrafish pancreas. *Mechanisms of Development*, v. 126, n. 10, p. 898–912, out. 2009.

PATWARI, P. et al. The interaction of thioredoxin with Txnip. Evidence for formation of a mixed disulfide by disulfide exchange. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 31, p. 21884–21891, 4 ago. 2006.

PAUL GHALIOUNGUI. *The Ebers papyrus: A new English translation, commentaries and glossaries*. [s.l.] Academy of Scientific Research and Technology, 1987.

PAULS, S. et al. Function and regulation of zebrafish nkx2.2a during development of pancreatic islet and ducts. *Developmental Biology*, v. 304, n. 2, p. 875–890, 15 abr. 2007.

PEPPER, A. R. et al. Current status of clinical islet transplantation. *World Journal of Transplantation*, v. 3, n. 4, p. 48–53, 24 dez. 2013.

PERL, S. et al. Significant human beta-cell turnover is limited to the first three decades of life as determined by in vivo thymidine analog incorporation and radiocarbon dating. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 95, n. 10, p. E234-239, out. 2010.

PESHAVARIA, M. et al. Regulation of pancreatic beta-cell regeneration in the normoglycemic 60% partial-pancreatectomy mouse. *Diabetes*, v. 55, n. 12, p. 3289–3298, dez. 2006.

PHILLIPS, B. W. et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into the pancreatic endocrine lineage. *Stem Cells and Development*, v. 16, n. 4, p. 561–578, ago. 2007.

PIEMONTI, L. et al. Human Pancreatic Islets Produce and Secrete MCP-1/CCL2: Relevance in Human Islet Transplantation. *Diabetes*, v. 51, n. 1, p. 55–65, 1 jan. 2002.

PNS - Pesquisa Nacional de Saúde. Disponível em: <<https://www.pns.icict.fiocruz.br/index.php?pag=resultados>>. Acesso em: 12 set. 2017.

PURI, S. et al. Replication confers β cell immaturity. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, p. 485, 2 fev. 2018.

RADLOFF, M.; DELLING, M.; GERCKEN, G. Protein phosphorylation in alveolar macrophages after stimulation with heavy metal-coated silica particles. *Toxicology Letters*, v. 96–97, p. 69–75, ago. 1998.

RAIKWAR, S. P.; ZAVAZAVA, N. Insulin Producing Cells Derived from Embryonic Stem Cells: Are We There Yet? *Journal of cellular physiology*, v. 218, n. 2, p. 256–263, fev. 2009.

RAJAGOPAL, J. et al. Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science (New York, N.Y.)*, v. 299, n. 5605, p. 363, 17 jan. 2003.

RANI, S. et al. Decreasing Txnip mRNA and Protein Levels in Pancreatic MIN6 Cells Reduces Reactive Oxygen Species and Restores Glucose Regulated Insulin Secretion. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 25, n. 6, p. 667–674, 2010.

RAUM, J. C. et al. FoxA2, Nkx2.2, and PDX-1 regulate islet beta-cell-specific mafA expression through conserved sequences located between base pairs -8118 and -7750 upstream from the transcription start site. *Molecular and Cellular Biology*, v. 26, n. 15, p. 5735–5743, ago. 2006.

REZANIA, A. et al. Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice. *Diabetes*, v. 61, n. 8, p. 2016–2029, ago. 2012.

REZANIA, A. et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, v. advance online publication, 11 set. 2014.

RICORDI, C. et al. Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetologica Latina*, v. 27, n. 3, p. 185–195, set. 1990.

ŘÍHOVÁ, B. Immunocompatibility and biocompatibility of cell delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews, Cells as Drug Delivery Platforms*. v. 42, n. 1–2, p. 65–80, 20 ago. 2000.

RODRIGUES, A. L. C. Imunoproteção de ilhotas pancreáticas microencapsuladas em biomateriais inovadores e

- seu potencial terapêutico no diabetes mellitus tipo 1. text—[s.l.] Universidade de São Paulo, 8 maio 2012.
- RYALL, J. G. et al. Metabolic Reprogramming of Stem Cell Epigenetics. *Cell Stem Cell*, v. 17, n. 6, p. 651–662, 3 dez. 2015.
- SALUJA, A.; DUDEJA, V. Heat shock proteins in pancreatic diseases. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 23 Suppl 1, p. S42-45, mar. 2008.
- SANDER, J. D. et al. Zinc Finger Targeter (ZiFiT): an engineered zinc finger/target site design tool. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. Web Server issue, p. W599-605, jul. 2007.
- SATOH, J.; KIM, S. U. Cytokines and growth factors induce HSP27 phosphorylation in human astrocytes. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 54, n. 4, p. 504–512, jul. 1995.
- SAXENA, G.; CHEN, J.; SHALEV, A. Intracellular shuttling and mitochondrial function of thioredoxin-interacting protein. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 6, p. 3997–4005, 5 fev. 2010.
- SCHARP, D. W.; MARCHETTI, P. Encapsulated islets for diabetes therapy: History, current progress, and critical issues requiring solution. *Advanced Drug Delivery Reviews, Cell encapsulation and drug delivery*. v. 67–68, p. 35–73, 10 abr. 2014.
- SCHITTNY, J. C.; YURCHENCO, P. D. Terminal short arm domains of basement membrane laminin are critical for its self-assembly. *The Journal of Cell Biology*, v. 110, n. 3, p. 825–832, mar. 1990.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Comments and Opinion*. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nmeth.2089>>. Acesso em: 13 dez. 2017.
- SCHULZ, T. C. et al. A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS One*, v. 7, n. 5, p. e37004, 2012.
- SCHULZE, P. C. et al. Vitamin D3-upregulated protein-1 (VDUP-1) regulates redox-dependent vascular smooth muscle cell proliferation through interaction with thioredoxin. *Circulation Research*, v. 91, n. 8, p. 689–695, 18 out. 2002.
- SEGEV, H. et al. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, v. 22, n. 3, p. 265–274, 2004.
- SHAKED, M. et al. Insulin counteracts glucotoxic effects by suppressing thioredoxin-interacting protein production in INS-1E beta cells and in *Psammomys obesus* pancreatic islets. *Diabetologia*, v. 52, n. 4, p. 636–644, abr. 2009.
- SHALEV, A. et al. Oligonucleotide microarray analysis of intact human pancreatic islets: identification of glucose-responsive genes and a highly regulated TGFbeta signaling pathway. *Endocrinology*, v. 143, n. 9, p. 3695–3698, set. 2002.
- SHALEV, A. Lack of TXNIP protects beta-cells against glucotoxicity. *Biochemical Society Transactions*, v. 36, n. Pt 5, p. 963–965, out. 2008.
- SHALEV, A. Minireview: Thioredoxin-Interacting Protein: Regulation and Function in the Pancreatic β -Cell. *Molecular Endocrinology*, v. 28, n. 8, p. 1211–1220, ago. 2014.
- SHAPIRO, A. M. et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *The New England Journal of Medicine*, v. 343, n. 4, p. 230–238, 27 jul. 2000.
- SHAPIRO, A. M. J.; POKRYWCZYNSKA, M.; RICORDI, C. Clinical pancreatic islet transplantation. *Nature Reviews. Endocrinology*, v. 13, n. 5, p. 268–277, maio 2017.
- SHETH, S. S. et al. Thioredoxin-interacting protein deficiency disrupts the fasting-feeding metabolic transition. *Journal of Lipid Research*, v. 46, n. 1, p. 123–134, 1 jan. 2005.

- SHETH, S. S. et al. Hepatocellular carcinoma in Txnip-deficient mice. *Oncogene*, v. 25, n. 25, p. 3528–3536, 15 jun. 2006.
- SHIM, J. H. et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate. *Diabetologia*, v. 50, n. 6, p. 1228–1238, jun. 2007.
- SILVA, F. H. L. DA. Identificação de genes diferencialmente expressos durante diferenciação de células-tronco e caracterização de células progenitoras mesenquimais. text—[s.l.] Universidade de São Paulo, 25 abr. 2008.
- SMOYER, W. E. et al. Ischemic acute renal failure induces differential expression of small heat shock proteins. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, v. 11, n. 2, p. 211–221, fev. 2000.
- SOGAYAR, MARI C, M.-G., T. R. et al. Composição biopolimérica para o encapsulamento de células, método de produção de um composto biopolimérico para o encapsulamento de células, método para promover a citoproteção de células e uso de um composto bioplímérico para o encapsulamento de células, [s.d.].
- SOSA-PINEDA, B. et al. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature*, v. 386, n. 6623, p. 399–402, 27 mar. 1997.
- STOLTZMAN, C. A. et al. Glucose sensing by MondoA: Mlx complexes: a role for hexokinases and direct regulation of thioredoxin-interacting protein expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 19, p. 6912–6917, 13 maio 2008.
- SZABAT, M. et al. Maintenance of β -Cell Maturity and Plasticity in the Adult Pancreas. *Diabetes*, v. 61, n. 6, p. 1365–1371, jun. 2012.
- TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, v. 131, n. 5, p. 861–872, 30 nov. 2007.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, v. 126, n. 4, p. 663–676, 25 ago. 2006.
- TANAKA, T. et al. Redox regulation by thioredoxin superfamily; protection against oxidative stress and aging. *Free Radical Research*, v. 33, n. 6, p. 851–855, dez. 2000.
- TEHRANI, Z.; LIN, S. Endocrine pancreas development in zebrafish. *Cell Cycle*, v. 10, n. 20, p. 3466–3472, 15 out. 2011.
- TETA, M. et al. Very Slow Turnover of β -Cells in Aged Adult Mice. *Diabetes*, v. 54, n. 9, p. 2557–2567, 1 set. 2005.
- THOMAS, H. E. et al. Beta cell apoptosis in diabetes. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, v. 14, n. 12, p. 1389–1404, dez. 2009.
- THOMAS, H. E.; BIDEN, T. J. Bad News for β -Cell Apoptosis. *Diabetes*, v. 58, n. 8, p. 1725–1727, ago. 2009.
- THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, v. 282, n. 5391, p. 1145–1147, 6 nov. 1998.
- THOREL, F. et al. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature*, v. 464, n. 7292, p. 1149–1154, 22 abr. 2010.
- THU, B. et al. Alginate polycation microcapsules: I. Interaction between alginate and polycation. *Biomaterials*, v. 17, n. 10, p. 1031–1040, 1996a.
- THU, B. et al. Alginate polycation microcapsules: II. Some functional properties. *Biomaterials*, v. 17, n. 11, p. 1069–1079, jun. 1996b.
- TISCORNIA, G.; SINGER, O.; VERMA, I. M. Production and purification of lentiviral vectors. *Nature Protocols*, v. 1, n. 1, p. 241–245, jun. 2006.

- TREUTELAAR, M. K. et al. Nestin-lineage cells contribute to the microvasculature but not endocrine cells of the islet. *Diabetes*, v. 52, n. 10, p. 2503–2512, out. 2003.
- TUCH, B. E. et al. Safety and viability of microencapsulated human islets transplanted into diabetic humans. *Diabetes Care*, v. 32, n. 10, p. 1887–1889, out. 2009.
- VAN DEIJNEN, J. H. et al. Significance of the peri-insular extracellular matrix for islet isolation from the pancreas of rat, dog, pig, and man. *Cell and Tissue Research*, v. 267, n. 1, p. 139–146, jan. 1992.
- VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 22 maio 2009.
- VENTURINI, M. et al. Technique, complications, and therapeutic efficacy of percutaneous transplantation of human pancreatic islet cells in type 1 diabetes: the role of US. *Radiology*, v. 234, n. 2, p. 617–624, fev. 2005.
- VOS, P. DE et al. Association between macrophage activation and function of micro-encapsulated rat islets. *Diabetologia*, v. 46, n. 5, p. 666–673, 1 maio 2003.
- WANG, R. N.; KLÖPPEL, G.; BOUWENS, L. Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia*, v. 38, n. 12, p. 1405–1411, dez. 1995.
- WANG, R. N.; ROSENBERG, L. Maintenance of beta-cell function and survival following islet isolation requires re-establishment of the islet-matrix relationship. *Journal of Endocrinology*, v. 163, n. 2, p. 181–190, 11 jan. 1999.
- WANG, Y. et al. Genetic inducible fate mapping in larval zebrafish reveals origins of adult insulin-producing β -cells. *Development (Cambridge, England)*, v. 138, n. 4, p. 609–617, 15 fev. 2011.
- WANG, Y.; DE KEULENAER, G. W.; LEE, R. T. Vitamin D(3)-up-regulated protein-1 is a stress-responsive gene that regulates cardiomyocyte viability through interaction with thioredoxin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 29, p. 26496–26500, 19 jul. 2002.
- WANG, Z. et al. Thioredoxin-interacting protein (txnip) is a glucocorticoid-regulated primary response gene involved in mediating glucocorticoid-induced apoptosis. *Oncogene*, v. 25, n. 13, p. 1903–1913, 23 mar. 2006.
- WEBER, L. M.; HAYDA, K. N.; ANSETH, K. S. Cell–Matrix Interactions Improve β -Cell Survival and Insulin Secretion in Three-Dimensional Culture. *Tissue Engineering. Part A*, v. 14, n. 12, p. 1959–1968, dez. 2008.
- WILSON, M. E.; SCHEEL, D.; GERMAN, M. S. Gene expression cascades in pancreatic development. *Mechanisms of Development*, v. 120, n. 1, p. 65–80, jan. 2003.
- WU, N. et al. AMPK-Dependent Degradation of TXNIP upon Energy Stress Leads to Enhanced Glucose Uptake via GLUT1. *Molecular Cell*, v. 49, n. 6, p. 1167–1175, 28 mar. 2013.
- WU, Y. et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, v. 25, n. 10, p. 2648–2659, out. 2007.
- XENOS, E. S. et al. The role of nitric oxide in IL-1 beta-mediated dysfunction of rodent islets of Langerhans. Implications for the function of intrahepatic islet grafts. *Transplantation*, v. 57, n. 8, p. 1208–1212, 27 abr. 1994.
- XU, G. et al. Preventing β -Cell Loss and Diabetes With Calcium Channel Blockers. *Diabetes*, v. 61, n. 4, p. 848–856, abr. 2012.
- XU, G. et al. Thioredoxin-interacting protein regulates insulin transcription through microRNA-204. *Nature medicine*, v. 19, n. 9, set. 2013.
- XU, X. et al. Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell*, v. 132, n. 2, p. 197–207, 25 jan. 2008a.

- XU, Y.-X. et al. Mesenchymal stem cell therapy for diabetes through paracrine mechanisms. *Medical Hypotheses*, v. 71, n. 3, p. 390–393, set. 2008b.
- YOSHIHARA, E. et al. Thioredoxin/Txnip: Redoxosome, as a Redox Switch for the Pathogenesis of Diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 4, 9 jan. 2014.
- YU, F.-X. et al. Thioredoxin-interacting Protein (Txnip) Gene Expression. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 33, p. 25822–25830, 13 ago. 2010.
- YURCHENCO, P. D. et al. Laminin polymerization in vitro. Evidence for a two-step assembly with domain specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 260, n. 12, p. 7636–7644, 25 jun. 1985.
- YURCHENCO, P. D.; CHENG, Y. S. Self-assembly and calcium-binding sites in laminin. A three-arm interaction model. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 268, n. 23, p. 17286–17299, 15 ago. 1993.
- ZECCHIN, E. et al. Evolutionary conserved role of ptf1a in the specification of exocrine pancreatic fates. *Developmental Biology*, v. 268, n. 1, p. 174–184, 1 abr. 2004.
- ZHAO, Y.-C. et al. Relationship between thioredoxin-interacting protein (TXNIP) and islet β -cell dysfunction in patients with impaired glucose tolerance and hypertriglyceridemia. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, v. 8, n. 3, p. 4363–4368, 15 mar. 2015.
- ZHOU, J.; CHNG, W.-J. Roles of thioredoxin binding protein (TXNIP) in oxidative stress, apoptosis and cancer. *Mitochondrion*, v. 13, n. 3, p. 163–169, maio 2013.
- ZHOU, Q. et al. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature*, v. 455, n. 7213, p. 627–632, 2 out. 2008.
- ZHOU, R. et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nature Immunology*, v. 11, n. 2, p. 136–140, fev. 2010.
- ZIMMERMANN, H. et al. Physical and biological properties of barium cross-linked alginate membranes. *Biomaterials*, v. 28, n. 7, p. 1327–1345, mar. 2007.
- ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 92, n. 1, p. 57–70, out. 2001.
- ZOKA, A. et al. Altered Immune Regulation in Type 1 Diabetes. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2013, 2013.
- ZULEWSKI, H. Differentiation of embryonic and adult stem cells into insulin producing cells. *Panminerva Medica*, v. 50, n. 1, p. 73–79, mar. 2008.

ANEXO - Súmula curricular

Dados pessoais

Nome: Camila Leal Lopes da Silva

Data de nascimento: 08 de maio de 1990.

Naturalidade: Osasco, São Paulo

Formação acadêmica

- 2012-2018** Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica)
Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil
Orientadora: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2016-2017** Estágio de Pesquisa no Exterior
Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, California, Estados Unidos da América
Supervisão: Dr. Duc Dong
Orientadora: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2008-2012** Bacharelado em Química com habilitação em Química Forense
Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil
- 2006-2007** Técnico em Química
Escola Técnica Estadual Getúlio Vargas

Artigos publicados em periódicos

LEAL-LOPES, C., GRAZIOLI, G., MARES-GUIA, T., COELHO-SAMPAIO, T., SOGAYAR, M.C. Artificial laminin polymer incorporation into microcapsules reduces inflammatory response to transplantation. Em preparação.

LEAL-LOPES, C., LOJUDICE, F.H., DONG, D., SOGAYAR, M.C. Thioredoxin binding protein (Txnip) inhibition promotes stem cells differentiation into insulin producing cells. Em preparação.

LEAL-LOPES, C., MANTOVANI, M., SOGAYAR, M.C. Advanced Therapy Medicinal Products in Type I Diabetes Mellitus: technological and regulatory challenges. Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia. v. 6, n. 1, 2018.

LEAL-LOPES, C., VELLOSO, F.J.; CAMPOPIANO, J.C., SOGAYAR, M.C. CORREA, R.G. Roles of Commensal Microbiota in Pancreas Homeostasis and Pancreatic Pathologies. J Diabetes Res, v. 2015, p. 1-20, 2015.

DE ALBUQUERQUE, R.S., MENDES-JUNIOR, C.T., LUCENA-SILVA, N., LEAL-LOPES, C.; RASSI, D.M., VEIGA-CASTELLI, Luciana C.; FOSS-FREITAS, M.C., FOSS, M.C., DEGHAIDE, N.H.S., MOREAU, P.G.S, CASTELLI, E.C., DONADI, E.A. Association of HLA-G 3'-untranslated region variants with type 1 diabetes mellitus. *Human Immunology*, v. 77, p. 358-364, 2016.

Capítulos de livro publicados

LEAL-LOPES, C., VELLOSO, F.J., CORREA, R.G., SOGAYAR, M.C. Importância do microbioma para o pâncreas. Em *Microbioma, disbiose, probióticos e bacterioterapia*. 1ed. São Paulo: Manole, 2017, v. 1, p. 230-243.

Apresentação de trabalhos em eventos

13º Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo. Functional characterization of Thioredoxin interacting protein (Txnip) gene in the differentiation of embryonic stem cells into insulin-producing cells. 2018.

23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology and 44th Annual Meeting of Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology. Differentiation of murine embryonic stem cells into insulin-producing cells and functional characterization of thioredoxin-interacting protein gene in this process. 2015.

International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA), International Xenotransplantation Association (IXA) and Cell Transplant Society (CTS) Joint Congress. Biosafe: a novel biomaterial for pancreatic islets encapsulation and type 1 diabetes mellitus therapy. 2015.

I Latin American VIII Brazilian and I Argentine Congress of Stem Cells and Cell Therapy ABTCel. Alternative therapies for type 1 diabetes: From stem cells therapy to innovative biomaterials. 2014.

XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Alternative Therapies for Type 1 Diabetes: From Stem Cells Therapy to Innovative Biomaterials. 2014.

Rutgers Undergraduate Research Symposium. 3'-Untranslated region polymorphisms of the gene HLA-G and susceptibility to diabetes mellitus type 1. 2012.

19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo. Polimorfismos da região 3' não-traduzida do gene HLA-G e susceptibilidade ao Diabetes Mellitus do tipo 1. 2011.

18º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo. Polimorfismos da região 3' não-traduzida do gene HLA-G e susceptibilidade ao Diabetes Mellitus do tipo 1. 2010.

Prêmios e títulos

- 2018** Menção Honrosa. Apresentação oral. 13º Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo.
- 2015** Prêmio viagem. Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química (IQ) – USP.
- 2014** Melhor pôster. XLIII Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq.
- 2011** Prêmio viagem. 19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica (SIICUSP).
- 2011** Menção honrosa. 19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica (SIICUSP).

Monitoria em disciplinas

- 2017 QBQ5717 Biologia Molecular da Transformação Maligna. Pós-graduação. Departamento de Bioquímica. Instituto de Química (IQ) – USP.
- 2015 QBQ0215 Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo. Graduação. Departamento de Bioquímica. Instituto de Química (IQ) – USP.
- 2014 QBQ2453 Biologia Molecular. Graduação. Departamento de Bioquímica. Instituto de Química (IQ) – USP.
- 2014 QBQ5717 Biologia Molecular da Transformação Maligna. Pós-graduação. Departamento de Bioquímica. Instituto de Química (IQ) – USP.
- 2013 QBQ0215 Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo. Graduação. Departamento de Bioquímica. Instituto de Química (IQ) – USP.