

Microencapsulação de Células β , Uma Abordagem Terapêutica em Progresso

Joana Fernandes, Domingos Ferreira, Bruno Sarmento

Departamento de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, Portugal

Resumo

A última década tem sido caracterizada por uma intensa actividade na investigação e desenvolvimento com o objectivo de reduzir e prevenir as consequências da diabetes. Uma das alternativas propostas tem visado a encapsulação de células β com o objectivo final de promover o seu transplante. Contudo, o transplante deste tipo de células ainda não é aplicado em grande escala devido à necessidade de uso crónico de imunossuppressores para evitar a rejeição mas que pode ser ultrapassado pelo imunisolamento das células numa membrana semi-permeável, que as proteja das células citotóxicas do sistema imune do hospedeiro. Uma microencapsulação com sucesso requer elevado número de células e viabilidade, controlo da função das células e manutenção da função por longa duração. A cavidade peritoneal é o local habitualmente apontado para alojar as células encapsuladas embora não disponha do grau de vascularização requerido. Um factor crucial para a longevidade limitada pode ser o aporte insuficiente de nutrientes e oxigénio às células e a barreira física que a micropartículas onde as células estão encapsuladas pode interferir, não apenas com uma óptima nutrição do transplante imunisolado mas também com a performance funcional dos transplantes. Alguns dos argumentos mais convincentes para a bioencapsulação são a eliminação da necessidade de protocolos imunomodulatórios ou fármacos imunossuppressores e permitir libertação a longo prazo de agentes terapêuticos, quer localmente quer de modo sistémico. A tecnologia de microencapsulação de células tem pois um enorme potencial clínico no tratamento de várias doenças, nomeadamente na diabetes.

Abstract

The last decade has been characterized by active development of research work to reduce and prevent diabetes consequences. Efforts have been made to develop alternative systems that would mimic and/or replace important physiological functions like grafting of therapeutic cells for final transplantation. However, it is not yet clinically applied on a large scale due to the necessity to use life-long immunosuppression for preventing rejection but it can be bypassed by immunisolating cells in semi-permeable membranes to protect donor cells against antibodies and cytotoxic cells of the host immune system. Successful microencapsulation requires high cell number and viability, control of cell function and maintenance of function for extended duration. The peritoneal cavity is one site available to carry a graft with the size of an encapsulated transplant but does not have the required degree of vascularization. A crucial factor in the limited longevity may be the lack of sufficient supply of nutrients and oxygen to the islets and the physical barrier of the microparticle that can interfere, not only with optimal nutrition of the cells but also with the functional performance of the grafts. Some of the most convincing arguments for bioencapsulation are related with the absence of immunomodulatory protocols or immunosuppressive drugs and permit the long-term *de novo* delivery of therapeutic agents in either a local or systemic manner. Cell microencapsulation has, thus, enormous clinical potential for the treatment of a wide range of diseases, namely diabetes.

NOVOS DISPOSITIVOS PARA TRANSPLANTE DE CÉLULAS

A última década tem sido caracterizada por uma intensa actividade na investigação e desenvolvimento com o objectivo de reduzir e prevenir as consequências da diabetes. Tais estudos têm visado, essencialmente, fármacos de libertação prolongada em formas farmacêuticas *per os*, pesquisa de fármacos com acção prolongada para administração parenteral (por exemplo insulina de acção sustentada) e metodologias de implantação de células vivas ⁽¹⁾. Todas elas estão associadas por uma metodologia de desenvolvimento de tipos de micropartículas comum que consigam mimetizar e/ou substituir funções fisiológicas importantes. Têm sido propostas

formulações como hidrogeles, micropartículas, lipossomas entre outros sistemas de alta tecnologia, assim como implantes e nanopartículas ⁽²⁻⁷⁾.

O transplante de células terapêuticas para o tratamento de doenças como deficiências hormonais ou proteicas ainda não é aplicado em grande escala devido à necessidade de uso crónico de imunossuppressores que evitem a sua rejeição. Contudo, a necessidade da utilização de imunossuppressores pode ser ultrapassada pelo imunisolamento das células secretoras de proteínas ou hormonas numa membrana semi-permeável, que proteja as células dadoras de anticorpos e células citotóxicas do sistema imune do hospedeiro. Este imunisolamento por encapsulação não só permite que o transplante ocorra com sucesso na ausência de imunossupressão ^(8,9) como também se possam utilizar células de origem não humana, i.e. xenotransplantes, sendo uma alternativa ao fornecimento limitado de tecidos dadores ⁽¹⁰⁾.

A ideia de transplantar células β em diabéticos tem sido desde sempre bastante atractiva ⁽¹¹⁾. As complicações mais graves inerentes à doença são devidas à fraca mimetização que as injeções de insulina conferem, pois a precisão da

Correspondência:

Joana Fernandes

Departamento de Tecnologia Farmacêutica

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Rua Aníbal Cunha 164

4050-047 Porto Portugal

Tel : +351 222078949

Fax +351 222073977

E-mail: joanachico@gmail.com

concentração de insulina produzida pelo organismo à dieta do próprio indivíduo é claramente diferente da obtida por estas injecções. O primeiro método documentado foi a encapsulação de um grupo de células β em pequenas micropartículas biodegradáveis, posteriormente injectadas na corrente sanguínea. Idealmente, estas micropartículas fluem para o fígado onde se fixam, sendo capazes de fornecer insulina a todo o organismo. No entanto, verificou-se a dificuldade de reter as micropartículas a nível do fígado e testaram-se alguns dispositivos de controlo remoto, mas que se revelaram pouco eficazes. Assim, o procedimento aplicado seguidamente foi o de transplantar um pequeno grupo de ilhéus a nível sub-dérmico ⁽¹²⁾. Esta técnica falhou em grande parte devido às grandes doses de imunossuppressores, nomeadamente ciclosporina, rampamicina e FK506 para evitar a rejeição. O método mais recente consiste em transplantar um grupo de ilhéus encapsulados na cavidade abdominal ⁽¹³⁾. Este método permite a ligação das cápsulas ao sistema circulatório, funcionando praticamente como um novo órgão. Os vasos sanguíneos ligados às cápsulas transportam nutrientes para o interior destas, libertando-as de resíduos e transportando insulina ⁽¹⁴⁾.

Apesar de todos estes métodos e avanços, os problemas relacionados com a diabetes ainda estão por solucionar numa grande parte. Este trabalho pretende sublinhar as maiores conquistas realizadas a nível do desenvolvimento da terapêutica de transplante e modificação de células, colocando estes métodos como a solução ideal para acabarem as complicações verificadas na diabetes.

A abordagem mais evidente seria o implante de tecido pancreático modificado para restabelecer o controlo fisiológico normal. Os transplantes pancreáticos foram inicialmente praticados em 1960, por Chang ⁽¹¹⁾, que idealizou o uso de uma membrana polimérica ultra fina que revestisse as células transplantadas, de modo a estas estarem “imunoprotectas”. A este conceito denominou “células artificiais” por bioencapsulação, que foi implementado para imobilizar ilhéus no xenotransplante 20 anos mais tarde com sucesso. As células β microencapsuladas quando implantadas em ratos, corrigiram o seu estado diabético por várias semanas ⁽⁸⁾. O objectivo principal não é apenas a independência da insulina, mas também a redução da incidência e severidade das complicações do diabético. O principal problema associado ao transplante pancreático é a rejeição, que mais uma vez requer uma terapêutica contínua de imunossuppressores ⁽¹⁵⁾. Actualmente, este requisito restringe muito o transplante apenas a doentes que necessitem simultaneamente de um transplante renal, até que melhores imunossuppressores estejam disponíveis.

Entre as várias potenciais soluções para minimizar os problemas de rejeição está a pegilação [ligação de polietileno glicol (PEG) a uma proteína]. Assim sendo, um dos modos de assegurar citoprotecção dos ilhéus num xenotransplante é modificar os ilhéus pancreáticos de suínos adultos com PEG ⁽¹⁶⁾. Podem-se utilizar também derivados funcionais de PEG, como monosuccimidil PEG (MSPEG) e disuccimidil PEG (DSPEG), promovendo a citoprotecção e o isolamento,

purificação e modificação dos ilhéus. Assim, utilizando derivados de PEG os resultados sugerem uma significativa citoprotecção *in vitro* e *in vivo* contra os efeitos citotóxicos de um transplante ⁽¹⁷⁾. A capacidade dos grupos succimidil reagirem selectivamente com os grupos amino da albumina sob condições fisiológicas pensa-se ser benéfica em todo o processo. Outro sistema alternativo seria a própria modificação nos ilhéus isolados de suínos adultos, requerendo uma modificação genética combinada com uma alteração na sua superfície. Assumindo uma alteração da superfície da célula com derivados de PEG, consegue-se evitar, com sucesso, a ligação dos anticorpos aos antígenos de superfície ⁽¹⁷⁾. As modificações covalentes das células e tecidos com PEG conseguem diminuir significativamente o reconhecimento imunológico de outros tecidos alogénicos. Adicionalmente até poderá aumentar a indução de tolerância. Assim sendo, os investigadores “camuflaram” os locais antigénicos, carga da membrana de superfície, atenuação da interacção receptor-ligando e célula-célula. Como consequência da “imunocamuflagem” induzida pelo PEG, verifica-se uma fraca estimulação aloreactiva das células T. Este efeito parece induzir uma resposta apoptótica das células reactivas, resultando numa eliminação clonal e indução de um estado de pró-tolerância ⁽¹⁷⁾.

MICROENCAPSULAÇÃO

Para além das limitações tecnológicas e biológicas, também questões de índole ética, política e de regulamentação se colocam. Para o sucesso consistente desta prática clínica tem de se considerar uma fonte funcional de células, uma membrana biocompatível, mecânica e quimicamente estável, com um valor de *cut-off* que ofereça imunoprotecção do implante, *performance* funcional, biosegurança e longo prazo de viabilidade do transplante ^(13,18,19).

Na optimização de técnicas de microencapsulação de células β , tem-se utilizado e explorado vários tipos de polímeros (naturais e sintéticos). O desafio inerente aos biomateriais utilizados na encapsulação de células prende-se com a necessidade de polímeros terem aprovação clínica. Actualmente, o alginato (AG) apresenta as melhores propriedades intrínsecas como material de eleição na encapsulação, tanto como matriz única como adicionalmente revestidas em multicamadas com outros materiais ⁽²⁰⁾. Este sistema parece ser suficiente para fornecer protecção imunológica, no caso de modelos alogénicos. O mesmo não ocorre a nível dos materiais para micropartículas para modelos xenogénicos, que permanecem um desafio. Tal facto deve-se ao AG ser demasiado poroso para oferecer protecção imune conveniente ao implante ⁽¹³⁾. A resposta a estímulos dos ilhéus não foi afectada pela técnica de encapsulação ou mesmo pela membrana. De facto, a resposta a estímulos dos ilhéus encapsulados parece melhorar com a encapsulação, durante o período de cultura celular. Adicionalmente, a membrana multicamada aparentemente não diminui a biocompatibilidade das micropartículas transplantadas. Assim sendo, estes dados sugerem que a abordagem de multicamadas tem algumas

vantagens comparativamente com a encapsulação em apenas um passo ⁽²⁰⁾. Também a aplicação clínica de micropartículas com policatões permanece controversa. Apesar de a poli-L-lisina (PLL) ter pouca probabilidade de sucesso devido à sua baixa biocompatibilidade ⁽²¹⁾, resultados promissores *in vivo* foram observados substituindo PLL por poli-L-ornitina (PLO) ⁽²²⁾ ou “poli(metileno-co-guanidina)” ⁽²³⁾.

Desenvolveram-se ainda esforços no sentido de identificar alternativas aos materiais, quer naturais quer sintéticos, para utilização na encapsulação de células. Estes esforços resultaram em polímeros polianiónicos, PEG fotopolimerizáveis para imobilizar células e AG modificados geneticamente com um elevado controlo da sua estrutura química ⁽¹³⁾. Mais recentemente, no parâmetro do controlo da permeabilidade surgiram membranas de silicone ⁽²⁴⁾. Esta fina membrana possui um diâmetro de poro extremamente uniforme de apenas alguns nanómetros, que proporciona um controlo rigoroso sobre difusão de imunoglobulinas e, portanto, uma maior protecção contra imunorejeição do transplante das células. Adicionalmente, a engenharia genética contribuiu para o desenvolvimento de células modificadas, de modo a terem maior viabilidade celular e serem capazes de fornecer e melhorar o abastecimento de produtos terapêuticos. Num estudo, “hybridoma cells” incluídas em micropartículas de sulfato de celulose mostraram níveis de anticorpos detectáveis no soro do ratinho até 4 meses após transplante ⁽²⁵⁾, indicando que esta abordagem poderá ser útil em terapêuticas baseadas em células ou “antibody-based gene”. A falta de células de cadáveres e células fetais apropriadas poderia ser obviada pela utilização de células estaminais. Assim que se tornem disponíveis fontes apropriadas de células estaminais, e se controle a sua diferenciação, estas células irão constituir a maior linha de produção de células para realização de dispositivos encapsulados ⁽¹³⁾. De qualquer modo, a microencapsulação será necessária para imunoisolamento das células estaminais, uma vez que há estudos que demonstram que as células estaminais embrionárias humanas diferenciadas expressam níveis elevados do complexo de histocompatibilidade *major* (MHC) “classe I proteínas”, que pode causar rejeição do transplante ⁽²⁶⁾.

Apesar destes avanços, continuam a surgir problemas relacionados com a modificação dos ilhéus. Os maiores obstáculos para um transplante de sucesso de ilhéus microencapsulados comprometem-se com a pobre difusão de nutrientes, fibrose local e uso de materiais desadequados, arriscando deste modo a biocompatibilidade. Os ilhéus utilizados deveriam dispersar-se homoganeamente no interior das partículas, de modo a maximizar a difusão de oxigénio e nutrientes ⁽¹⁷⁾.

Outro desafio que se coloca está relacionado com a produção homogénea de micropartículas, com excelente reprodutibilidade quer dentro do mesmo lote quer entre lotes diferentes ⁽¹³⁾. A adopção de máquinas automatizadas para microencapsulação resulta na melhoria da reprodutibilidade do tamanho, forma e morfologia.

Outro aspecto de relevância é a escolha do local de transplante. Para isso é necessário considerar parâmetros como

a segurança e possibilidade de retransplante (peritoneu, transplante subcutâneo) próxima da circulação ⁽²⁷⁾ (transplante intrahepático ou membranas que suportam a vascularização). Outro aspecto pertinente é a sobrevivência permanente das células encapsuladas do implante, que ainda não foi demonstrada. Alguns investigadores atribuem a falência do implante à falta de vascularização directa das células encapsuladas, com conseqüente necrose tecidual e morte ⁽¹³⁾. Para diminuir este problema, têm-se considerado diversos suportes sólidos pré-vascularizados para melhorar a nutrição das células encapsuladas ⁽²⁸⁾ (Figura 1). Contudo, a questão da vascularização permanece em aberto, uma vez que outros investigadores obtiveram resultados promissores com transplantes de micropartículas na cavidade peritoneal de grandes animais sem contacto directo com vasos sanguíneos ⁽²²⁾.

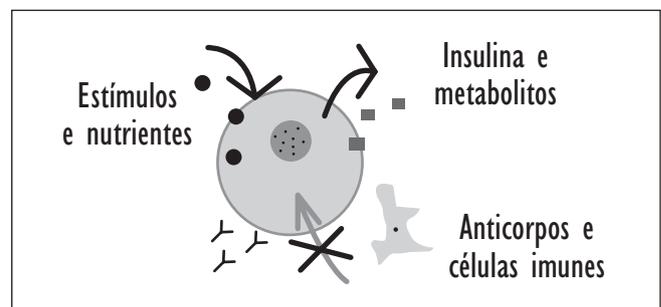


Figura 1 - Microencapsulação de células. Os nutrientes, o oxigénio e os estímulos externos atravessam a membrana, o que não acontece com anticorpos e células do sistema imune. (Adaptado de 13).

Com os avanços neste tipo de tecnologia, as autoridades regulamentares tem adaptado gradualmente as suas normas de modo a acomodarem novas abordagens terapêuticas. Nos EUA, por exemplo, todos os estudos de transplantes de ilhéus (e presumivelmente todos os estudos clínicos futuros de encapsulação de células) são regulamentados pela US Food and Drug Administration (FDA), sob submissão de um novo dispositivo de investigação. Para já, a nível europeu, as *guidelines* serão as da FDA, por falta de regulamentação específica nesta área. Recentemente, a Farmacopeia dos US e o Formulário Nacional incluíram uma nova categoria terapêutica baseada em produtos celulares ⁽²⁹⁾, constituindo por si só um passo significativo na aceitação e encorajamento desta tecnologia e de ensaios clínicos. A maior preocupação ética no uso de células microencapsuladas é demonstrar inequivocamente a biosegurança, baseada em protocolos e procedimentos *standard*, de modo a tratar os pacientes com esta nova tecnologia. Assim, é necessário evitar estudos em que coloquem os pacientes em risco desnecessário, para além de aumentar as expectativas injustamente ⁽¹³⁾.

Considerações Relativas às Propriedades das Cápsulas

Um requisito crítico para o sucesso do desenvolvimento da técnica de encapsulação de células é a relação estreita entre as propriedades da cápsula e *performance* das células encap-

suladas. As propriedades desejadas da cápsula dependem obviamente da sua aplicação em particular. Apesar dos critérios de *performance* esperados serem satisfeitos (por exemplo, restituição da normoglicemia em modelos diabéticos) é essencial comprovar que as propriedades da cápsula contribuem para o sucesso da sua *performance*. Isto irá facilitar uma abordagem mais racional às tecnologias de encapsulação de células e conduzir a um nível superior estes tipos de dispositivos ⁽¹⁸⁾. Daí a importância da identificação de todos os aspectos e propriedades das cápsulas para melhorar a *performance* das células encapsuladas. Algumas das propriedades mais importantes prendem-se com a permeabilidade e “mass weight cut-off” das cápsulas, propriedades mecânicas, imunoprotecção e biocompatibilidade ⁽¹⁸⁾.

Um parâmetro pertinente na caracterização das cápsulas, especialmente para as microcápsulas, é a distinção entre uma propriedade típica (por exemplo, secreção de uma proteína típica de uma população de cápsulas) e a distribuição dessa propriedade entre a população de cápsulas (por exemplo, secreção de uma proteína das cápsulas individualmente). A investigação das propriedades das cápsulas é rotineiramente realizada num grupo de cápsulas, mas a caracterização das propriedades da população pode dar importantes dados relativos a: propriedades “ideais” das cápsulas, interrelação entre as propriedades das cápsulas e propriedades indesejáveis das cápsulas ⁽¹⁸⁾.

A caracterização da população de cápsulas é essencial não só para assegurar um processo de produção reprodutível mas também para caracterizar o produto médico projectado em tecidos.

Permeabilidade e “Mass Weight Cut-Off” (MWCO)

A sobrevivência das células encapsuladas baseia-se em última instância no equilíbrio óptimo entre a permeabilidade da cápsula (que determina o suprimento de nutrientes essenciais e a remoção de metabolitos tóxicos) e a MWCO (que determina o limite máximo de tamanho para o transporte molecular). O transporte molecular através das cápsulas das membranas espera-se que seja efectuado através de poros, no entanto, está disponível pouca informação acerca do tamanho de poros incluídos nas membranas das cápsulas. A taxa de permeação de diferentes espécies moleculares é determinada como uma medida do tamanho de poro relativo. As avaliações das propriedades de transporte através da cápsula têm sido relativamente directas para macrocápsulas onde o grande volume das membranas dos dispositivos facilita a caracterização. Por outro lado, têm sido adoptadas numerosas técnicas para as propriedades de transporte de diferentes tipos de micropartículas ⁽¹⁸⁾.

Propriedades Mecânicas

A avaliação das propriedades mecânicas das cápsulas é importante, não apenas para determinar a durabilidade das cápsulas durante a produção e manuseamento, mas também como indicador da integridade das membranas das cápsulas. Apesar

de tudo, as propriedades mecânicas das cápsulas têm sido reconhecidas como factor limitante para aplicações *in vivo* ⁽³⁰⁾ e têm sido realizados numerosos estudos para melhorar a resistência das cápsulas, valores esses reportados em apenas alguns casos ⁽¹⁸⁾. Em alguns estudos ^(31,32), tem sido projectada a espessura da membrana da cápsula e utilizada como medida de resistência da cápsula. A maioria dos trabalhos nesta área é realizada com células microencapsuladas.

VIABILIDADE DAS CÉLULAS ENCAPSULADAS IN VIVO E IN VITRO

Relativamente à disponibilidade de ilhéus pancreáticos, os ilhéus humanos estão disponíveis em quantidades muito pequenas e os ilhéus de porcos podem ter limitações na qualificação para transplantes humanos. Assim, um objectivo muito importante é o desenvolvimento de condições de cultura de células e métodos de proliferação de ilhéus humanos (potencialmente uma fonte de células produtoras de insulina ilimitada) para a encapsulação e transplante em doentes diabéticos. Este processo inicia-se com pâncreas de cadáveres dadores. Depois, os ilhéus são extraídos por digestão da collagenase, seguidos de um gradiente de separação por densidade. Estabeleceram-se métodos analíticos e limites aceitáveis para assegurar a integridade de diversos parâmetros de isolamento de ilhéus incluindo: quantidade, pureza, viabilidade, função e esterilidade. O conteúdo dos ilhéus em células β é avaliado por microscopia do complexo Zn-insulina contido nestas mesmas células ⁽³⁰⁾. As interações célula-célula revelaram-se necessárias para recriar a estrutura na sua totalidade e competências funcionais dos ilhéus proliferados, uma vez que a utilização de um meio nutricional definido, troca de gases e nutrientes apropriada e uma variedade de suplementos hormonais não se mostraram suficientes. Enquanto que algumas funções celulares (ex. proliferação, respiração, transcrição de genes) se processam em isolamento, a regulação destas funções depende das interações existentes entre as células. As células vizinhas no tecido representam o microambiente natural umas para as outras. O estado agregado nos ilhéus que proliferaram dá uma organização melhorada e forma uma “unidade secretora efectiva”. Os ilhéus humanos que proliferaram são cultivados para re-associarem as células individuais em agregados e subsequentemente formarem estruturas tipo “pseudo-órgão” de ilhéus ⁽³⁰⁾.

A re-diferenciação celular e maturação têm de ocorrer antes da agregação, tornando os “pseudo-ilhéus” secretores de insulina. As células β são sensíveis a factores de crescimento e de diferenciação. Desenvolveu-se um meio definido de maturação e as experiências foram realizadas para otimizar o ambiente para totalizar a maturação. Evoluíram-se métodos para manterem estes ilhéus em cultura tempo suficiente para proporcionarem uma alternativa de transplante. Os “pseudo-ilhéus” ficam em quarentena para o teste final de esterilidade, para além do tempo adicional para a logística e preparação da cirurgia de transplante ⁽³⁰⁾. Um princípio importante no desenvolvimento funcional e projecção de

tecidos diferenciados é a interacção tridimensional entre células adjacentes. Estas interacções ocorrem nas junções das membranas das células, com as matrizes extracelulares e através de sinais químicos solúveis. É essencial alcançar as relações tridimensionais espaciais das células entre si e entre a matriz extracelular. Adicionalmente, a cultura deve ser mantida num ambiente com pouca turbulência e baixo corte para diminuir os danos nas células e permitir a colocalização das células e/ou material da matriz para se formarem as junções celulares⁽³⁰⁾.

PROTECÇÃO IMUNE

A avaliação da capacidade de protecção imune de uma cápsula é crítica para qualquer tecnologia de encapsulação de células projectadas para transplante de tecidos. Ao contrário da permeabilidade e avaliação mecânica, as técnicas para avaliar a protecção imune são comuns quer para tecidos micro que macroencapsulados. Os requisitos de uma membrana para protecção imune estão relacionados com a sua permeabilidade e estão principalmente dependentes da incompatibilidade hospedeiro-dador: alogénico *versus* xenogénico⁽¹⁸⁾. Para um tecido alogénico, onde não existem imunoglobulinas reactivas para o transplante e a via directa de discriminação “self-nonself” é dominante, o acesso das células reactivas do hospedeiro ao tecido transplantado será necessariamente evitado. Por outras palavras, a membrana terá de actuar como uma barreira celular. A via indirecta, onde antígenos do transplante estimulam sistemicamente as células T CD4, é secundária e menos significativa para os alo-transplantes. Na prática, contudo, as células imunes do hospedeiro são limitadas à exposição das células encapsuladas devido à falha inevitável de uma fracção de cápsulas. A via directa pode ser activada neste caso, resultando numa expansão clonal das células T específicas do transplante. Ainda não é claro o modo como uma população de células activadas irá afectar o tecido encapsulado em cápsulas intactas⁽¹⁸⁾. No entanto, uma preocupação inerente é a produção local de agentes infamatórios e citotóxicos como IL-1 β , IFN- γ e TNF- α . Pode-se medir a citotoxicidade *in vitro* destes agentes contra as células encapsuladas durante a execução das técnicas de cultura celular^(33,34), apesar de a duração e dose de exposição à citoquina, serem críticos para mimetizar condições *in vivo*. O complemento pode ser activado pelo contacto com células e é importante avaliar se o complemento activado resulta numa lise das células encapsuladas significativa⁽³⁵⁾. Assim sendo, se a via directa do reconhecimento imune ou complemento for activada por propriedades inadequadas das cápsulas, o desenvolvimento destas para implantes alogénicos será necessário para haver requerimentos de permeabilidade mais restritos. Para tecidos xenogénicos, o transporte membranar de anticorpos xenoreactivos (quer pré-existentes, quer surgidos após transplante) e componentes do complemento, que aparentemente são citotóxicos para tecidos xenogénicos mesmo na ausência de imunoglobulinas⁽³⁶⁾, terão de ser necessariamente prevenidos. A permeabilidade difusa a anti-

corpos é directamente avaliada. É preferível criar um dissipador de anticorpos no interior das cápsulas durante o seguinte teste (por exemplo, utilizando partículas de proteína A⁽³⁷⁾, ou outros tecidos específicos para o anticorpo escolhido⁽³⁸⁾) para incrementar a força motriz para o transporte. Espera-se que a permeação da membrana a moléculas de elevado peso molecular seja lenta e a avaliação da protecção imune, sob condições de difusão de agentes citotóxicos facilitadas, forneça uma rigidez adicional ao teste. A permeação das proteínas individuais do complemento pode ser similarmente avaliada pela utilização de proteínas purificadas. Contudo, será preferível a avaliação da permeação da “actividade” do complemento. Tal pode-se facilmente alcançar em cultura na presença de anticorpos reactivos às células encapsuladas. Para minimizar quaisquer alterações na actividade do complemento *per se* deve-se tomar cautela uma vez que a actividade do complemento perde-se entre 1-5 dias em cultura⁽¹⁸⁾. A protecção contra os componentes celulares do sistema imune também pode ser executada pela utilização de uma cultura de uma mistura de linfócitos com células encapsuladas. É possível quantificar, por exemplo, os perfis de proliferação celular ou produção de citoquinas mesmo na ausência de contacto célula-célula (a resposta do hospedeiro a tecidos xenogénicos será mais forte neste teste comparada a uma resposta alogénica)⁽³⁹⁾. A combinação destes testes *in vitro* permite não apenas a projecção de cápsulas apropriadas mas também ajuda a elucidar a potência relativa de diferentes vias de resposta imune contra as células encapsuladas. Não obstante, a avaliação final da protecção imune virá de estudos *in vivo*. A correlação entre resultados *in vivo* e *in vitro* é benéfica para avaliar a importância relativa de uma técnica *in vitro* em particular. Por exemplo, apesar de se observar a permeação das IgG em cápsulas de agarose e AG (podendo levar a projectar MWCO para excluir tais proteínas), estas cápsulas permeáveis a Ig-G eram xenoprotectoras *in vivo*. No entanto, apenas a avaliação *in vivo* pode clarificar a importância de diferentes observações *in vitro*⁽¹⁸⁾.

AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE: RESPOSTA DO HOSPEDEIRO

Usualmente, um sistema inteiramente biocompatível é considerado como um sistema produzido com membranas que obtém não mais do que uma reacção mínima como um corpo estranho que é⁽¹⁸⁾. A resposta do hospedeiro é um potencial problema para a implementação clínica desta tecnologia. A consequência directa de uma membrana não-biocompatível é o crescimento fibrótico à superfície que interfere com o transporte de moléculas e suprimentos de sangue oxigenado. Os parâmetros mais importantes que influenciam a reacção do hospedeiro ou biocompatibilidade do transplante são a morfologia exterior da cápsula, os materiais aplicados e o método de implantação cirúrgico. Em praticamente todos os casos, pensa-se que a resposta dos tecidos do hospedeiro ao implante cirúrgico destes dispositivos limita a *performance* dos mesmos. A reacção do hos-

pedeiro é similar à observada após o implante de qualquer dispositivo médico ⁽¹⁸⁾.

Após a inserção do dispositivo, a resposta do hospedeiro é iniciada por uma reacção inflamatória aguda causada pela ruptura de vasculatura do mesmo. Plaquetas activadas, leucócitos polimorfonucleares, componentes humorais do soro, matriz extracelular, fragmentos de células estão inicialmente presentes no material de interface do hospedeiro. Os macrófagos são recrutados para o local e medeiam todo o processo de limpeza e cicatrização iniciais. Finalmente, as células derivadas do mesênquima mediam a produção de matriz e neovascularização que rodeia todo o processo. A última fase da reacção é mediada pela migração de células que são primariamente fibroblásticas e em caso de implantes do sistema nervoso central incluem microglia e astrócitos ⁽¹⁸⁾. A resposta específica do tecido do hospedeiro, incluindo o tamanho da zona reactiva, a preparação e disponibilidade de vasculatura e composição parênquima/matriz determina a utilidade clínica destes dispositivos, incluindo biomassa sustentável e fluxo terapêutico. Vários estudos reportaram que o tamanho e extensão da reacção do hospedeiro podem ser reduzidos pela administração local de anti-inflamatórios esteróides e não esteróides (AINES) ⁽⁴⁰⁾. Fármacos como a dexametasona ou o naproxeno podem evitar a reacção fibrótica infligida após a implantação do dispositivo. O uso de AINES pode-se tornar mais comum, uma vez que a sua aplicação não está associada aos efeitos indesejados que acompanham fármacos imunossuppressores.

Um aspecto importante da avaliação da biocompatibilidade é a produção de entidades citotóxicas pelas células do hospedeiro em resposta ao material da cápsula. Este material pode-se apresentar por si só como uma matriz sólida em que as células do hospedeiro interagem directamente ou como produtos de degradação difusa. Desenvolveram-se estudos detalhados sobre a natureza das moléculas citotóxicas relativamente a ilhéus pancreáticos que incluíram pequenas espécies reactivas como radicais de oxigénio e aldeídos ⁽⁴¹⁾, assim como citocinas proteicas ⁽⁴²⁾. As pequenas espécies reactivas podem não ser o maior problema, uma vez que serão produzidas a certa distância das células encapsuladas e é provável que mesmo antes de atingirem estas células sejam dissipadas. Não se sabe contudo como é que tais espécies são capazes de alterar a estrutura da membrana. As citocinas, por outro lado, são estáveis e é provável que consigam permear a membrana da cápsula. A avaliação da produção de citocinas pode ser executada por macrófagos no espaço peritoneal, local geralmente utilizado para implantação, e células mononucleares do sangue ⁽¹⁸⁾. A escolha dos macrófagos é justificada pelo facto de serem o maior tipo de células envolvidas na resposta celular no peritôneo ⁽⁴³⁾. Outros tipos de células, como neutrófilos e linfócitos também são activados e podem aumentar a concentração local com um conjunto único de citocinas.

Para elucidar a importância relativa da resposta de citocinas, é necessário correlacionar as observações *in vitro* com a resposta de citocinas actual *in vivo*. É difícil quantificar a concentração em proteínas no local de implante e

está associada com variações resultantes do processo de extracção. Uma abordagem alternativa, é a quantificação do nível de expressão de citocinas, usando o método de hibridização *in situ*, ou ensaio de reacção da cadeia de polimerase transcriptase reversa ⁽¹⁸⁾. O último ensaio é atractivo devido à sua natureza semi-quantitativa. É utilizada para investigar a expressão de TGF- β (potente proteína promotora de fibrose) no local de implantação das cápsulas. Será importante utilizar esta técnica para avaliar o efeito dos parâmetros das cápsulas na produção de citocinas assim como tempo decorrido e espectro de produção de citocinas. É também importante demonstrar que a expressão de genes resulta de uma resposta funcional, ou seja, os níveis de expressão de citocinas estão correlacionados com os níveis de citocinas locais ou com a resposta fibrótica observada. Caso contrário, os níveis de mRNA intracelulares poderão não ser uma resposta “funcional”.

A neovascularização é outra etapa crítica da qual depende o sucesso da terapia por encapsulação. Vários estudos indicam que a microarquitECTURA exterior da membrana e não necessariamente a superfície química desta, exerce uma profunda influência na resposta de neovascularização ^(44,45). As membranas com poros à superfície, que permitem a colonização por células do hospedeiro sem induzir uma dispersão significativa das células, resultam, geralmente, na formação de estruturas vasculares muito próximas da interface hospedeiro-material. Os dispositivos de encapsulação que utilizam esta estrutura são capazes de suportar densidades elevadas de células. Esta importante descoberta foi conseguida pela utilização de membranas de encapsulação microporosas que não eram eficazes a protegerem os xenotransplantes da rejeição sem imunossupressão. Esta descoberta inspirou o desenvolvimento de um dispositivo de imunoisolamento composto por uma arquitectura bilaminar ou composta com um escudo exterior capaz de neovascularização por microarquitECTURA dirigida e uma membrana interior que era utilizada quer para isolamento físico quer para imunoisolamento. A utilização de uma membrana interior microporosa permitiu transplantes de alotransplantes de alta densidade celular, onde o uso de uma membrana interior de ultrafiltração permitiu transplante de xenotransplantes com baixa densidade celular. Os resultados do estudo indicam que o fluxo difusivo de uma barreira e não a proximidade da vasculatura do hospedeiro determinam a sustentabilidade da densidade celular no interior da câmara de encapsulação ⁽¹⁸⁾. A presença de um elevado grau de vasos sanguíneos próximos da membrana de encapsulação pode não ser necessariamente um requisito desejável. Por exemplo, em situações clínicas, onde se tenta alcançar uma libertação sustentada de um agente bioactivo potente para aplicação local poderá ser desvantajoso dispersar ou diluir o agente libertado na circulação sistémica. Considerando a aplicação de células encapsuladas que libertam um factor de crescimento na regeneração de um nervo específico ou fornecem o suporte trófico para um local profundo no cérebro. Nestes casos, deseja-se reter o agente num nível de elevada concentração local extracelular. Em certas aplicações, a terapia poderá ser

necessária por um curto período de tempo, após o que, poderá ser desejável retirar esse mesmo implante. Nestas circunstâncias, um elevado nível de integração de tecido do hospedeiro e a neovascularização poderão complicar o processo de recuperação ⁽¹⁸⁾.

A BIODISPONIBILIDADE DAS CÉLULAS EM CÁPSULAS E LOCAIS DE IMPLANTE

É fundamental, para a aplicação clínica, encontrar um local onde os ilhéus encapsulados se encontrem em estreito contacto com a corrente sanguínea. Infelizmente, tal local é difícil de encontrar uma vez que dever-se-ia combinar a capacidade de aceitar um grande volume de transplante na vizinhança dos vasos sanguíneos. A cavidade peritoneal é o único local disponível para alojar um transplante com o tamanho de um transplante de células encapsuladas, mas não dispõe do grau de vascularização requerido. Para transplantar noutros locais é necessário reduzir o tamanho do implante.

Na maioria dos tecidos, a distância máxima de difusão para uma transferência efectiva de oxigénio e nutrientes dos capilares para as células é de 200µm. A ausência de movimentos de convecção no interior da cápsula induz um gradiente-nutriente da superfície da cápsula para o centro dos ilhéus. Assim sendo, um tamanho reduzido da cápsula permitiria um melhor abastecimento de nutrientes às células e oferece a vantagem de um decréscimo exponencial do volume total de implante ⁽¹⁰⁾. A aplicação de tecnologias recentes de formação de uma nova gota, como um “electrostatic pulse generator”, permitiu a produção de partículas de AG com tamanhos de 185µm de diâmetro que é um quarto do tamanho convencional das cápsulas 800µm. Existe contudo um aspecto negativo na diminuição do tamanho das cápsulas. Com esta redução o número de cápsulas contendo ilhéu parcialmente protuberantes aumentará proporcionalmente. Tal, obviamente, aumentará o número de cápsulas afectadas por uma resposta inflamatória. Para reduzir o número de células pode-se reduzir o número de ilhéus por volume de AG. Tem-se mostrado que cada tamanho de cápsulas tem uma densidade óptima de ilhéus, experimentalmente determinada ⁽¹⁰⁾. Normalmente, tal facto está associado com uma ligeira diminuição no número de cápsulas vazias. Isto, contudo, tem de ser aceite para manter o número de ilhéus protuberantes ao mínimo.

As cápsulas pequenas podem ser implantadas intraperitonealmente num sistema de suporte sólido para ilhéus pancreáticos. Este local permite o implante de elevado número de ilhéus, que podem ser rapidamente recuperados e projectados como tal uma vez que é altamente vascularizado. Tem-se mostrado em ratos que os ilhéus têm melhores taxas de

sobrevivência e funcionalidade nestes dispositivos ⁽²⁷⁾ mas com ilhéus encapsulados a sobrevivência não é tão permanente. Isto ilustra o envolvimento de outros factores para além do aporte insuficiente de nutrientes na falha dos implantes de ilhéus microencapsulados. Mostrou-se, por exemplo, que os ilhéus pancreáticos secretam citocinas quando em stress. Ilhéus pancreáticos imunoisolados sob stress (adicionando IL-1β e TNF-α) produzem citocinas MCP-1, MIP, óxido nítrico (NO) e IL-6 que são bem conhecidas por contribuir para recrutamento e activação de células inflamatórias ^(46,47). Estas experiências mostraram a difusão exterior das citocinas derivadas do transplante e a sua mudança de actividade das células para secretarem citocinas num ciclo vicioso de activação como consequência (Figura 2).

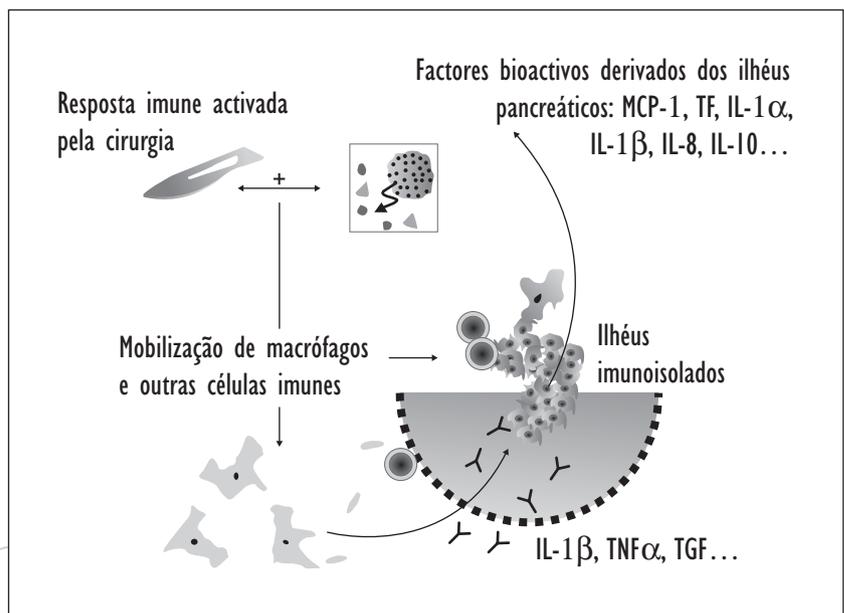


Figura 2 - Ciclo vicioso de activação causando uma falência de 60% dos ilhéus no período imediato após transplante. Os ilhéus libertam citocinas que actuam em concertação com as citocinas do sistema imune libertadas pela indução da cirurgia no recrutamento e activação de células inflamatórias da vizinhança do transplante (Adaptado de 10).

A iniciação deste ciclo vicioso de activação tem de ser requerida no período imediato após transplante, ou seja, a resposta dos tecidos associada à cirurgia de implante. O passo inicial na resposta dos tecidos não está relacionado com o implante de cápsulas estranhas, mas sim o procedimento cirúrgico requerido para a implantação ^(48,49). Apesar do transplante de células encapsuladas na cavidade peritoneal apenas requerer uma cirurgia menor, o procedimento está associado com estragos no tecido e libertação de proteínas bioactivas como o fibrinogénio, trombina, histamina e fibronectina. Estes factores têm efeitos quimotáticos nas células inflamatórias e induzem o influxo de elevado número de granulócitos, basófilos, mastócitos, macrófagos ao peritoneu logo após os primeiros dias após implante ⁽¹⁰⁾. Particularmente, é importante verificar a presença de “mast cells” e macrófagos nos primeiros dias após implante uma vez que estas células são potentes produtores de factores bioactivos como IL-1β, TNF-α, TGF-β, e histamina que irão

activar células inflamatórias na vizinhança de material “estranho” e, mais importante, estimular as células das cápsulas a produzirem citocinas derivadas do transplante. Após 2 semanas, basófilos e granulócitos desaparecem gradualmente do local de transplante enquanto que os macrófagos e alguns fibroblastos permanecem ligados a uma porção de 2-10% das cápsulas ⁽⁴⁹⁾. Estes macrófagos ligados permanecem activos e portanto, contribuem para o ciclo vicioso e prejudicial de activação.

CONTROLO METABÓLICO DE TRANSPLANTES DE ILHÉUS MICROENCAPSULADOS

Qualquer nova terapia para o tratamento da diabetes deveria providenciar uma regulação minuto-a-minuto dos níveis de glucose de modo a melhorar a qualidade de vida dos pacientes e evitar os efeitos laterais das terapias com insulina ⁽¹⁰⁾.

Um aspecto favorável à microencapsulação sobre os sistemas de encapsulação é a sua forma esférica que oferece melhores capacidades de difusão devido à razão superfície/volume. *In vitro*, a libertação de insulina dos ilhéus micro-encapsulados em cápsulas até 800µm, tem-se verificado ser igual se não idêntica aos perfis de libertação de ilhéus não encapsulados ⁽⁵⁰⁾. As cápsulas como tal, parecem não ter qualquer influência na cinética de libertação da insulina. Contudo, *in vivo*, existe um pequeno atraso do *uptake* da insulina dos ilhéus encapsulados na circulação sistémica. Isto é causado pela falta de acesso vascular directo devido à presença de uma barreira física da cápsula que interfere com a vascularização directa ⁽¹⁰⁾. Quando se testaram os transplantes através de uma prova de glucose oral e intravenosa, descobriu-se que a tolerância à glucose é mais adequada, ilustrada pelos níveis de HbA1c e os níveis de glucose máxima de apenas 8,3mM, mas o aumento dos níveis de insulina nunca foram observados. O peptídeo-C é libertado em concentrações equimolares com a insulina, mas não é tão rapidamente absorvido pelos órgãos abdominais e não sofre extracção hepática. Existe, pois, uma resposta induzida pela glucose por parte dos ilhéus encapsulados ao aumento do peptídeo-C na circulação sistémica ⁽⁵¹⁾.

ENSAIOS CLÍNICOS

A rejeição imune após transplante de ilhéus pancreáticos não encapsulados tem permanecido o maior obstáculo para um tratamento com sucesso da diabetes tipo I, apesar da utilização de fármacos imunossupressores com todos os seus potenciais efeitos secundários severos. A encapsulação contornou a necessidade destes fármacos devido a envolver as células vidas transplantadas numa membrana semi-permeável que as protege do sistema imune do hospedeiro. Infelizmente, a aplicação clínica de dispositivos de encapsulação ainda prematuros foi travada pela sua fragilidade mecânica, área de superfície limitada e necessidade de um procedimento cirúrgico mais elaborado. Apesar das novas tecnologias de microencapsulação dispensarem a maioria

destes parâmetros, nem todas as membranas semi-permeáveis podem formar um sistema imunoprotector biocompatível e mecanicamente estável que permita oxigenação suficiente das células assim como difusão adequada da insulina. As microcápsulas esféricas de AG-PLL podem agora proporcionar uma grande área de superfície, melhor nutrição e fornecimento de oxigénio, porosidade precisa, protecção máxima na falha da membrana e serem directamente injectadas na cavidade peritoneal. Num estudo recente, testou-se a eficácia terapêutica de microcápsulas de AG-PLL no transplante de células humanas produtoras de insulina num paciente diabético, um homem de 38 anos de idade, caucasiano com diabetes insulino-dependente à 30 anos. Injectaram-se ilhéus encapsulados (10.000 ilhéus/kg) directamente na cavidade peritoneal através de uma incisão de 2 cm. A secreção de insulina das células encapsuladas foi detectada após 24h da injeção e continuou por mais de 58 meses. O paciente mostrou melhorias significativas na qualidade de vida incluindo uma diminuição dos sintomas de neuropatia periférica dos seus membros inferiores, um aumento dos níveis de energia e capacidade de caminhar mais, uma melhoria generalizada da sua saúde e sem efeitos adversos ⁽³⁰⁾. Também recentemente estes estudos efectuaram-se pela primeira vez em humanos não imunossuprimidos ⁽⁵²⁾. A primeira evidência de funcionamento metabólico do transplante conjuntamente com uma falta de resposta imune do hospedeiro aos ilhéus encapsulados é deveras encorajadora, apesar da restrição da procura de cadáveres dadores de órgãos direccionar para fontes alternativas de ilhéus, com especial atenção para ilhéus de suínos recém-nascidos, se sobrepor aos tecidos humanos num futuro próximo. Para além disso, o tempo de semi-vida das células em cápsulas é um parâmetro crítico que requer reflexão uma vez que na maioria dos estudos a longevidade das células tinha uma duração limite em vez da biocompatibilidade adequada das cápsulas.

CONCLUSÕES FINAIS

Há uns anos atrás poder-se-ia assumir com os dispositivos extravasculares que um sistema biocompatível na sua totalidade poderia ser alcançado com membranas que não obtivessem mais do que uma reacção mínima a um elemento estranho, uma vez que o crescimento à superfície da membrana interfere com uma difusão óptima dos nutrientes e metabolitos ⁽⁵³⁻⁵⁵⁾. Agora continuam a verificar-se limitações funcionais e de sobrevivência do transplante quando se encapsulam ilhéus pancreáticos para o tratamento da diabetes tipo I. Dos estudos dirigidos para a identificação dos factores causais da falha das células encapsuladas, tornou-se claro que a resposta imune aos biomateriais não é a única causa da falha dos transplantes. Os factores não relacionados com o material das cápsulas são de igual importância para a sobrevivência e longevidade do tecido encapsulado. A activação do sistema imune induzido pela cirurgia no período imediato após implante é uma reacção com profundos efeitos nefastos para os ilhéus encapsulados ⁽¹⁰⁾. Esta resposta imediata não está relacionada directamente com a

rejeição ou auto-imunidade e requer estudos mais aprofundados para arranjar meios para impedir este efeito.

A encapsulação de células depende, tal como outros tecidos projectados, na utilização de polímeros para controlar a comportamento das células antes e após implantação. Uma microencapsulação com sucesso requer 1.) elevado número de células e viabilidade, 2.) controlo da função das células (através da matriz extracelular, por exemplo) e 3.) manutenção da função por longa duração. Uma massa de células adequada deverá ser transplantada num volume e forma pequeno e apropriado ⁽⁵⁶⁾. As limitações de difusão devem ser minimizadas para assegurar um fornecimento nutritivo adequado, efluxo de metabolitos e disponibilidade de produtos. O comportamento da célula deverá ser controlado através de matrizes extracelulares apropriadas e pela percepção do efeito *in situ* gerado pelas citoquinas. Finalmente, o comportamento celular deverá ser contínuo durante semanas ou meses e requer o controlo da resposta do hospedeiro. E mesmo que a membrana de encapsulação previna as IgG de entrar em contacto com as células, os antigénios libertados pelas células podem influenciar (adversamente) a *performance* do sistema.

O transplante de ilhéus pancreáticos pode representar uma solução para a terapia da diabetes tipo I, como demonstrado pelos resultados promissores obtidos em ensaios clínicos com alotransplantes ⁽⁵⁷⁾. Estes mostraram, até agora, o restabelecimento da normoglicemia em 70% dos pacientes transplantados após 2 anos da data do transplante. Contudo, o fornecimento de ilhéus continua a ser um problema, dependendo da disponibilidade limitada de dadores de órgãos humanos, enquanto que a terapia imunossupressora está associada a efeitos adversos a longo-prazo. Para solucionar estes retrocessos, têm-se investigado quer novas fontes de tecidos para dadoras de ilhéus quer estratégias inovadoras. As reacções imunológicas, assim como ocorrências não imunes, como inflamação ou mesmo apoptose, são as principais causas de falha do transplante ⁽⁵⁸⁾. Dados clínicos recentes demonstraram que o sucesso do transplante de ilhéus humanos é largamente devido às características das células a implantar (com especial atenção para o número e viabilidade) ⁽⁵⁷⁾.

A tecnologia de microencapsulação de células tem um enorme potencial clínico para o tratamento de várias doenças. Para já as dificuldades mantêm-se, algumas delas serão um verdadeiro desafio para a ciência. A análise breve dos obstáculos essenciais, conjuntamente com o aumento da colaboração internacional, deverá impulsionar esta tecnologia para um caminho metódico e controlado trazendo-a para uma proximidade maior da realidade clínica. Alguns dos argumentos mais convincentes para a bioencapsulação são a eliminação da necessidade de protocolos imunomodulatórios ou fármacos imunossupressores e permitir libertação a longo-prazo de produtos terapêuticos quer localmente quer de modo sistémico ⁽⁵⁹⁾.

BIBLIOGRAFIA

1. Vilesov AD, Zhuravsky EP, Vilessova MS, Netchaeva EA, Ayzenshtadt NI, Stankevich RP, Isidorov RV. New-types of apparatus for producing microcapsules and microgranules. *International Journal of Pharmaceutics* 2002; 242, 101-106.
2. Willoughby C, Batterbury M, Kaye SB. Collagen corneal shields. *Survey of Ophthalmology* 2002; 47, 174-82.
3. Taylor M, Tanna S, Taylor P, Adams G. The delivery of insulin from aqueous and non-aqueous reservoirs governed by a glucose sensitive gel membrane. *Journal of Drug Target* 1995; 209-16.
4. Kawakami S, Mukai T, Yamamura K, Nakamura J, Sakaeda T, Nakashima M. Controlled release and ocular absorption of tilisolol utilizing ophthalmic insert-incorporated lipophilic prodrugs. *Journal of Controlled Release* 2001; 19, 255-63.
5. Gupta A, Majumdar D, Maitra A. Ketorolac entrapped in polymeric micelles: preparation, characterisation and ocular anti-inflammatory studies. *International Journal of Pharmaceutics* 2000; 19, 1-14.
6. le Broulais C, Zia H, Sado P, Needham T, Leverage R. Ophthalmic drug delivery systems recent advances. *Progress in Retinal and Eye Research* 1998; 17, 33-58.
7. Liu J, Lu Y. Accelerated color change of gold nanoparticles assembled by DNAs for simple and fast colorimetric Pb²⁺ detection. 2004; 126(39), 12298-305.
8. Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 1980; 210, 908-909.
9. de Vos P, de Haan B, Wolters G, Strubbe J, van Schilfgaarde R. Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets. *Diabetologia* 1997; 40, 262-70.
10. de Vos P, Faas MM, Strand B, Calafiore R. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials* 2006; 27, 5603-5617.
11. Chang TMS. Semipermeable microcapsules. *Science* 1964; 146, 524-525.
12. Hou QP, Bae YH. Biohybrid artificial pancreas based on macrocapsule device. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1999; 35, 271-287.
13. Orive G, Hernandez RM, Gascon AR, Calafiore R, Chang TM, De Vos P, Hortelano G, Hunkeler D, Lacic I, Shapiro AM, Pedraz JL. Cell encapsulation: promise and progress. *Nature Medicine* 2003; 9, 104-7.
14. Baum R. Diabetes Treatment: Encapsulated Cells Make Insulin in Patient. *Chemical and Engineering News* 1994; 21, 4-5.
15. Halle I, Landry D, Fournier A, Beauvry M, Leblon F. Method for the quantification of Alginate in microcapsules. *Cell Transplantation* 1993; 2, 429-36.
16. Xie D, Smyth C, Eckstein C, Bilbao C, Mays J, Eckhoff E. Cytoprotection of PEG-modified adult porcine pancreatic islets for improved xenotransplantation. *Biomaterials* 2005; 26, 403-12.
17. Adams G, Wang N, Cui Y. Future alternative therapies in a quest to halt aberrations in diabetes *mellitus*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2005; 59, 296-301.
18. Uludag H, de Vos P, Tresco PA. Technology of mammalian cell encapsulation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2000; 42, 29-64.
19. de Vos P, van Hoogmoed CG, van Zanten J, Netter S, Strubbe JH, Busscher HJ. Long-term biocompatibility, chemistry, and function of microencapsulated pancreatic islets. *Biomaterials* 2003; 24, 305-312.
20. Schneider S, Feilen PJ, Slotty V, Kampfner D, Preuss S, Berger S, Beyer J, Pommersheim R. Multilayer capsules: a promising

- microencapsulation system for transplantation of pancreatic islets. *Biomaterials* 2001; 22, 1961-1970.
21. Strand BL. Poly-L-lysine induces fibrosis on alginate microcapsules via the induction of cytokines. *Cell Transplantation* 2001; 10, 263-275.
 22. Calafiore R, Basta G, Luca G, Boselli C, Bufalari A, Bufalari A, Cassarani MP, Giustozzi GM, Brunetti P. Transplantation of pancreatic islets contained in minimal volume microcapsules in diabetic high mammals. *Annals of New York Academy of Sciences* 1999; 875, 219-32.
 23. Wang T. An encapsulation system for the immunoisolation of pancreatic islets. *Nature Biotechnology* 1997; 15, 358-362.
 24. Desai TA. Microfabrication technology for pancreatic cell encapsulation. *Expert. Opinion in Biological Therapy* 2002; 2, 633-646
 25. Pelegrin M. Systemic long-term delivery of antibodies in immunocompetent animals using cellulose sulphate capsules containing antibody-producing cells. *Gene Therapy* 1998; 5, 828-834.
 26. Drukker M. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; 99, 9864-9869.
 27. de Vos P, Hamel AF, Tatarkiewicz K. Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetologia* 2002; 45, 159-173.
 28. de Vos P, Marchetti P. Encapsulation of pancreatic islets for transplantation in diabetes: the untouchable islets. *Trends Molecular Medicine* 2002; 8, 363-366.
 29. US Pharmacopeia and National Formulary (Rockville M, 2002, 1046, 2762-2790).
 30. Soon-Shiong P. Treatment of type I diabetes using encapsulated islets. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1999; 35, 259-270.
 31. Ma X, Vacek I, Sun A. Generation of alginate-poly-L-lysine-alginate (APA) biomicrocapsules: the relationship between the membrane strength and the reaction conditions. *Artif. Cells Blood Subs. Immobilization Biotechnology* 1994; 22, 43-69.
 32. Lacic I, Brissova M, Anilkumar AV, Powers AC, Wang T. New capsule with tailored properties for the encapsulation of living cells. *Journal of Biomedical and Material Research* 1998; 39, 52-60.
 33. Zekorn T, Siebers U, Bretzel RJ, Renardy M, Planck H, Zschocke P, Federlin K. Protection of islets of Langerhans from interleukin-1 toxicity by artificial membranes. *Transplantation* 1990; 50, 391-394.
 34. Cole DR, Waterfall M, McIntyre M, Baird JD. Micro-encapsulated islet grafts in the BB/E rat: a possible role for cytokines in graft failure. *Diabetologia* 1992; 35, 231-237.
 35. Darquy S, Pueyo ME, Capron F, Reach G. Complement activation by alginate-polylysine microcapsules used for islet transplantation. *Artificial Organs* 1994; 18, 898-903.
 36. Asghar SS, Pasch MC. Complement as a promiscuous signal transduction device. *Laboratory Investigation* 1998; 78, 1203-1225.
 37. Lanza RP, Jackson R, Sullivan A, Ringeling J, McGrath C, Kuhlreiber W, Chick WL. Xenotransplantation of cells using biodegradable microcapsules. *Transplantation* 1999; 67, 1105-1111.
 38. Tse M, Uludag H, Sefton MV, Chang PL. Secretion of recombinant proteins from hydroxyethyl methacrylate-methyl methacrylate capsules. *Biotechnology and Bioengineering* 1996; 51, 271-280.
 39. Zekorn T, Endl U, Horcher A, Siebers U, Bratzel RG, Federlin K. Mixed lymphocyte islet culture for assessment of immunoprotection by islet microencapsulation. *Transplantation Proceedings* 1995; 27, 3362-3363.
 40. Lanza RP, Chick WL. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Agents Inhibition of Fibrotic Response to an Implanted Device. *Biohybrid Technologies* 1999, Patent number 5891477.
 41. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon VW, Strynadka K, Lakey JR, Rajotte RV. Human pancreatic islet beta-cell destruction by cytokines involves oxygen free radicals and aldehyde production. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996; 81, 3197-3202.
 42. Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes *mellitus*. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 1998; 14, 129-151.
 43. Yourtee DM, Tong PY, Eick JD, Zhuang WC, Cobb C, Bean TA, Kostoryz EL. In situ hybridization test for TNF-alpha: a simplified approach to confirming induction of the cytokine by biomaterials. *In Vitro Toxicology* 1997; 10, 245-251.
 44. Brauker JH, Carr-Brendel VE, Martinson LA, Crudele J, Johnston WD, Johnson RC. Neovascularization of synthetic membranes directed by membrane microarchitecture. *Journal of Biomedical Material Research* 1995; 29, 1517-1524.
 45. Padera RF, Colton CK. Time course of membrane microarchitecture-driven neovascularization. *Biomaterials* 1996; 17, 277-284.
 46. de Groot M, Keizer PPM, de Haan BJ, Schuurs TA, Leuvenink HGD, van Schilfgaarde R, de Vos P. Microcapsules and their ability to protect islets against cytokine-mediated dysfunction. *Transplantation Proceedings* 2001; 33, 1711-1712.
 47. de Vos P, De Haan B, van Zanten J, Faas M. Factors influencing functional survival of microencapsulated islets. *Cell Transplantation* 2004; 13, 515-24.
 48. Robitaille R, Dusseault J, Henley N, Desbiens K, Labrecque N, Halle J. Inflammatory response to peritoneal implantation of alginate-poly-L-lysine microcapsules. *Biomaterials* 2005; 26, 4119-27.
 49. de Vos P, Van Hoogmoed C, De Haan B, Busscher H. Tissue responses against immunoisolating alginate-PLL capsules in the immediate posttransplant period. *Journal of Biomedical Material Research A* 2002; 62, 430-7.
 50. de Haan BJ, Faas MM, de Vos P. Factors influencing insulin secretion from encapsulated islets. *Cell Transplantation* 2003; 12, 617-25.
 51. Tatarkiewicz K, Garcia M, Omer A, Van Schilfgaarde R, Weir GC, de Vos P. C-peptide responses after meal challenge in mice transplanted with microencapsulated rat islets. *Diabetologia* 2001; 44, 646-53.
 52. Calafiore R, Basta G, Luca G, Lemmi A, Montanucci MP, Calabrese G, Racanicchi L, Mancuso F, Brunetti P. Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type I diabetes: first two cases. *Diabetes Care* 2006; 29, 137-8.
 53. Soon-Shiong P, Otterlei M, Skjak-Bræk G, Smidsrod O, Heintz R, Lanza R. An immunological basis for the fibrotic reaction to implanted microcapsules. *Transplantation Proceedings* 1991; 23, 758-9.
 54. Zimmermann U, Klock G, Federlin K, Hannig K, Kowalski M, Bretzel R. Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis. *Electrophoresis* 1992; 13, 269-74.
 55. de Vos P, Wolters G, Fritschy W, Van Schilfgaarde R. Obstacles in the application of microencapsulation in islet transplantation. *International Journal of Artificial Organs* 1993; 16, 205-12.
 56. Sefton MV, May MH, Lahooti S, Babensee JE. Making microencapsulation work: conformational coating, immobilization gels and in vivo performance. *Journal of Controlled Release* 2000; 65, 173-186.
 57. Shapiro A, JRT L, EA R, Korbitt G, Toth E, Warnock G, Knetemann N, Rajotte R. Islet transplantation in seven patients with type I diabetes *mellitus* using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343(4), 289-90.
 58. Luca G, Basta G, Calafiore R, Rossi C, Giovagnoli S, Esposito E, Nastruzzi C. Multifunctional microcapsules for pancreatic islet cell entrapment: design, preparation and in vitro characterization. *Biomaterials* 2003; 24, 3101-14.
 59. Orive G, Hernandez RM, Gascon AR, Igartua M, Pedraz JL. Encapsulated cell technology: from research to market. *Trends in Biotechnology* 2002; 20, 382-7.