

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

SISTEMA GERADOR DE MICROCÁPSULAS DE ALGINATO

TATIANA AZEVEDO BASTIAN BRESSEL

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira

PORTO ALEGRE

2007

i. INSTITUIÇÕES, FONTES FINANCIADORAS:

Este trabalho foi realizado no Centro de Terapia Gênica e no laboratório de Genética Molecular do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), PRONEX e FIPE-HCPA.

ii. DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, em especial a minha mãe, meus irmãos e o meu marido Rafael. Sem o apoio, carinho e tolerância deles, este projeto não teria se concretizado.

Quero dedicar também a todos os pesquisadores brasileiros, que mesmo perante as dificuldades monetárias, burocráticas e demais advindas de uma pesquisa num país em desenvolvimento, não desistem de seus sonhos e projetos e continuam batalhando, pesquisando e produzindo material científico de qualidade internacional.

Espero que este trabalho sirva de base e incentivo para mais pesquisas nesta área e que com isto, um número maior de pacientes possam usufruir dos benefícios de terapias gênicas, terapias celulares, transplante de células e uma entrega de fármacos de forma mais eficiente e controlada.

iii. AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, profa. Maria Luiza Saraiva Pereira, que aceitou o desafio de me orientar nesta área tão distinta da sua linha de pesquisa.

Ao Dr. Michael Dornish que muito me ensinou sobre alginato, técnicas de encapsulação e que gentilmente me cedeu material para estudo após contato pessoal durante o Society For Biomaterials Meeting, em Pittsburgh, EUA.

À profa. Elisabeth O. Cirne Lima, que juntamente com a doutoranda Ana Helena Paz, muito me ensinaram sobre cultura de células, pela ajuda, incentivo e amizade que surgiram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores da Engenharia de Materiais da UFRGS, Maria Madalena de Camargo Forte e Flávia Monteiro pela ajuda, idéias, e ensinamentos sobre polímeros e biopolímeros.

Ao físico Daniel L. Baptista, pelas discussões, estudos e idéias sobre dinâmica de fluídos, geração de turbulência e equação de Navier-Stokes.

À doutoranda Melissa Camassola, pelo apoio, incentivo, ensinamentos sobre dosagens enzimáticas e, sobretudo a amizade.

Aos colegas do Hospital de Clínicas que se tornaram amigos, incentivaram e ajudaram ao longo desta pesquisa; especialmente, Ana Ayala, Patrícia Lopez e Cristina Kath.

À empresa LIFEMED que gentilmente emprestou uma bomba de infusão modelo LF 2001 e alguns equipos para serem utilizados neste projeto.

Ao Serviço de Engenharia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, especialmente ao Alex, pelo apoio, empréstimo de materiais e auxílio nos testes de precisão das bombas de infusão.

Ao Serviço de Tornearia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo auxílio e desenvolvimento das hastas metálicas utilizadas nos experimentos.

Ao coordenador administrativo do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, Elmo Cardoso, que sempre auxiliou de forma amigável e prestativa as questões mais diversas surgidas ao longo de meu mestrado e doutorado neste programa.

À minha família, especialmente a minha mãe e meus irmãos pela ajuda, idéias, e apoio ao longo da minha vida.

Ao meu marido Rafael, que muito ajudou com idéias e soluções do projeto, e por todo o carinho, amor, amizade e apoio durante este doutorado.

Aos meus queridos amigos que ao longo destes anos me apoiaram, incentivaram e promoveram momentos agradáveis e descontraídos que muito ajudaram a superar as dificuldades encontradas no caminho.

iv. SUMÁRIO

	Página
i. INSTITUIÇÕES, FONTES FINANCIADORAS	2
ii. DEDICATÓRIA	3
iii. AGRADECIMENTOS	4
iv. SUMÁRIO	6
v. LISTA DE ABREVIATURAS	7
vi. RESUMO	8
vii. ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Biomateriais	10
1.2. Terapia Gênica	11
1.2.1. Transferência de células encapsuladas	12
1.2.2. Microencapsulação de células em alginato	14
1.3. Alginato - Referência histórica	16
1.3.1. Fontes de obtenção – Algas Pardas	16
1.3.2. Estrutura química e física do alginato	17
1.3.3. Obtenção de géis de alginato	20
1.4. Dinâmica de fluídos	23
1.4.1. Tensão superficial	23
1.4.2. Hidrodinâmica	24
1.5 Células BHK	28
2. OBJETIVOS	29
2. Objetivo Geral	29
2.2. Objetivos específicos	29
3. CAPITULO 1 - ARTIGO	30
ARTIGO	31
4. DISCUSSÃO	52
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

v. LISTA DE ABREVIATURAS

BHK – rim de hamster bebê

β -gal – beta-galactosidase

blocos M – ácido β -D-manurônico (M)

blocos G – ácido α -L-gulurônico (G)

CNTF – fator ciliar neurotrófico

D-MEM – meio de cultura Dulbecco modificado por Eagle

4-MUG – 4-metil-umbeliferil-galactosídeo

4-MU – 4-metil-umbeliferona

PBS – tampão fosfato salino

PGA – propileno glicol alginato

SNC – sistema nervoso central

vi. RESUMO

Uma abordagem alternativa para a terapia gênica somática é a entrega da proteína terapêutica através da implantação de células geneticamente modificadas com capacidade de superexpressar o gene de interesse. Os mecanismos de encapsulação foram projetados para proteger as células da rejeição do organismo hospedeiro e para prevenir que as células modificadas se espalhassem, ao mesmo tempo em que permite a secreção protéica. As esferas de alginato formam uma estrutura semi-permeável conveniente para a injeção *in vivo*. Neste estudo, um protocolo laboratorial eficaz foi otimizado para gerar micro cápsulas de alginato de cálcio com forma e tamanho uniformes, contendo células viáveis. A encapsulação de células *baby hamster kidney* (BHK) em esferas de alginato foi executada utilizando um dispositivo simples montado com um cilindro de ar comprimido e uma bomba peristáltica. O fluxo de 100 mL/h da solução contendo as células e o fluxo de 10 L/min de ar comprimido geraram as melhores cápsulas em relação ao tamanho e a uniformidade das esferas. As células se mantiveram viáveis em cultura por quatro semanas, sem apresentar sinais de necrose, e a difusão protéica foi observada durante estas quatro semanas. Os resultados destes estudos *in vitro* demonstram claramente que o micro isolamento de células BHK em alginato, utilizando este dispositivo simples, pode prover um ambiente capaz de preservar as células vivas e viáveis. Além disso, as células encapsuladas sob as condições descritas nesse trabalho, possibilitam a difusão de β -gal mesmo após quatro semanas de tratamento, tornando-se assim potencialmente compatíveis com a entrega de proteína terapêutica.

vii. ABSTRACT

An alternative approach to somatic gene therapy is to deliver the therapeutic protein by implanting genetically modified cells that could overexpress the gene of interest. Microencapsulation devices were designed to protect cells from host rejection and prevent the foreign cells from spreading while allowing protein secretion. Alginate beads form a semi-permeable structure that is suitable for *in vivo* injection. In this study we report an effective laboratory protocol to generate calcium alginate microcapsules, following optimization of uniformly shaped and sized particles that contain viable cells. Encapsulation of baby hamster kidney (BHK) cells in alginate beads was performed using a simple device assembled with a cylinder of compressed air and a peristaltic pump. Cell suspension flow of 100 mL/h and air jet flow of 10 L/min allowed best size and shape uniformity of beads. Cells were maintained viable in culture for 4 weeks, with no signs of necrosis, and protein diffusion was observed during these weeks. Results of these *in vitro* studies clearly demonstrated that microisolation of BHK cells in alginate using a simple assembly device could provide an environment that is capable of preserving live and viable cells. In addition, encapsulated cells under the conditions described were able to secrete β -galactosidase even after four weeks of treatment, thus becoming potentially compatible with therapeutic protein delivery.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biomateriais

O desenvolvimento de veículos apropriados para a entrega de novas macromoléculas surgiu da indústria biotecnológica como uma mudança significativa para os cientistas. Peptídeos, proteínas, oligonucleotídeos e genes são componentes instáveis que necessitam serem protegidos da degradação no ambiente biológico. Além disso, a sua eficácia é altamente limitada pela sua dificuldade de atravessar barreiras biológicas e atingir o sítio alvo. De tal maneira, o futuro destas moléculas como agentes terapêuticos depende claramente do desenvolvimento de veículos apropriados para realizar a entrega no corpo (Janes *et al*, 2001). Diversas estratégias têm sido exploradas para o desenvolvimento destes veículos, dentre elas o biomaterial tem despertado interesse especial.

Biomaterial é, por definição, todo o material, natural ou não, utilizado em aplicações biomédicas que impliquem interações com sistemas biológicos. Existem quatro grupos principais de materiais que podem ser utilizados nesta área: polímeros, cerâmicos, metais e compósitos. Como característica imprescindível, estes materiais devem ser biocompatíveis, ou seja, devem atender ao requisito de funcionalidade para o qual foram projetados, não estimulando ou provocando o mínimo de reações alérgicas ou inflamatórias. Embora este conceito não seja muito preciso, é consenso que a funcionalidade está associada à aplicação a que se destina, de tal modo que um material biocompatível para uma dada função pode ser inadequado se usado em outras aplicações (Babensee *et al*, 1998).

Pela multiplicidade de temas abordados na investigação científica dos biomateriais e a necessidade de inúmeras pesquisas, é necessária uma colaboração entre a biologia, a bioquímica, a química, a medicina, a farmácia e as engenharias. Esta interdisciplinaridade dificulta a sua introdução em muitos planos de estudo do ensino superior onde seria de extrema importância. Para suprir esta carência, diversas associações e sociedades foram criadas internacionalmente visando abordar as várias vertentes do tema. Entre elas, uma que vem se destacando nos últimos anos devido aos seus encontros anuais com um grande número de participantes internacionais é a “Society For Biomaterials”.

Os polímeros vêm sendo usados em aplicações biomédicas há mais de 50 anos. A flexibilidade de se projetar e selecionar polímeros com características únicas capazes de se adequarem a diferentes situações garantiu uma diversidade de aplicações deste tipo de material como biomaterial. Dentre os biopolímeros, os biodegradáveis vêm se destacando mais recentemente, os quais podem ser usados na substituição temporária de tecidos (enquanto estes se regeneram) ou como meio para liberação controlada de fármacos. Um biopolímero de especial interesse é o alginato (Hurteaux *et al*, 2005).

1.2. Terapia gênica

A terapia gênica tem por objetivo introduzir modificações genéticas nas células dos pacientes para reverter o fenótipo patológico. É um processo destinado a tratar ou remediar doenças pela modificação genética das células de um paciente. O material genético pode ser transferido diretamente para as células do paciente (terapia gênica *in vivo*) ou as células são removidas do paciente, modificadas por inserção do material genético e transplantadas de volta ao paciente (terapia gênica *ex vivo*) (Strachan & Read, 1999). Entretanto, existem

algumas barreiras na terapia gênica que ainda necessitam serem ultrapassadas. Uma destas barreiras é a segurança do método em relação à mutagênese insercional e o alto potencial imunogênico da utilização de vetores virais. Com o objetivo de ultrapassar esta barreira, foi desenvolvida uma técnica de terapia gênica que utiliza células geneticamente modificadas encapsuladas em fibras semipermeáveis, prevenindo o contato celular e a resposta imune (Bachoud-Levi *et al*, 2000).

1.2.1. Transferência de células encapsuladas

Os vetores ideais para terapia gênica de doenças que afetam o sistema nervoso central (SNC) devem ultrapassar a barreira hematoencefálica. Além disso, a expressão estável do transgene é necessária para a correção da doença genética por um prazo longo.

A tecnologia de transferência celular é uma área em crescimento com grande impacto para doenças genéticas degenerativas que afetam o SNC. A administração direta de células encapsuladas elimina a necessidade de atravessar a barreira hematoencefálica. A manutenção estável das linhagens celulares isoladas dos tecidos pode simular diretamente a reposição enzimática sem a necessidade de injeções repetidas. O uso de fibras semipermeáveis permite a passagem de fluido contendo nutrientes e fatores secretados, mas previne o contato celular e a resposta imune (figura 1).

A implantação de construtos de polímeros contendo células combina conceitos de biomateriais e transplante de células (Babensee *et al*, 1998). A utilização destas macrocápsulas preenchidas com determinadas células começou em 1964. Nesta época, Chang comunicou a encapsulação de células em uma gota, gerando microcápsulas semipermeáveis (Chang, 1964). Posteriormente, Sun desenvolveu o método utilizando

microcápsulas de alginato-poli-lisina-alginato contendo ilhotas de Langerhans (Sun, 1988). Em 1991, foram realizados experimentos de transplante de ilhotas de Langerhans para o tratamento de diabetes em ratos (Lacy *et al*, 1991) e de células PC12 liberando dopamina para o tratamento da doença de Parkinson em porquinhos-da-índia (Aebischer *et al*, 1991a), entre outros.

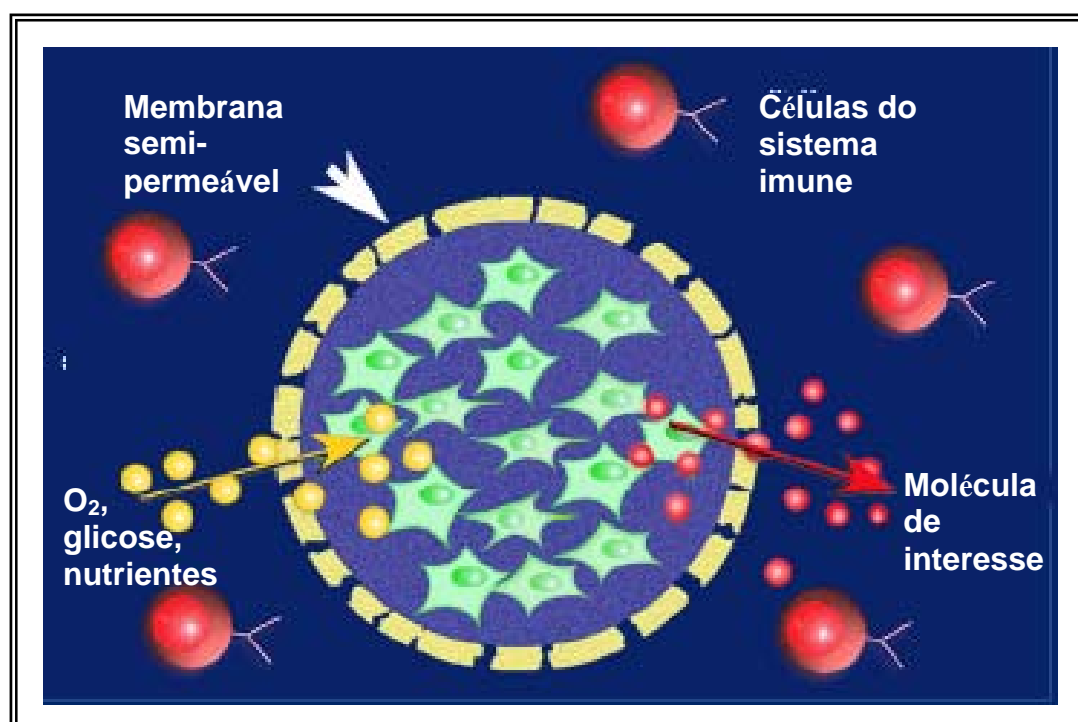


Figura 1: Secção transversal esquemática do mecanismo de encapsulação celular (adaptado de Déglon, 2003)

A resposta imune às células encapsuladas é aparentemente dependente do sítio de implantação. O sistema nervoso central foi identificado como o local de menor resposta imune (Widner, 1993). Os mecanismos de reconhecimento e resposta imune no sistema nervoso central não são completamente conhecidos. O impacto da implantação de construtos contendo células xenogênicas no sistema nervoso central de hospedeiros ainda deve ser elucidado (Babensee *et al*, 1998; Babensee, 2006).

Diversas doenças que afetam o sistema nervoso central já foram alvo de estudos desta tecnologia. As doenças mais pesquisadas, utilizando esta tecnologia, são a esclerose lateral amiotrófica, a doença de Huntington, a doença de Parkinson entre outras.

Esta tecnologia já está sendo aplicada a seres humanos em estudos clínicos de fase I/II para entrega de fator de crescimento ciliar neuronal (CNTF) na doença de Huntington (Bachoud-Levi *et al*, 2000) e na esclerose lateral amiotrófica (Zurn *et al*, 2000).

Como principal resultado do estudo clínico fase I na doença de Huntington, foi confirmada a segurança, a viabilidade e a tolerabilidade deste procedimento de terapia gênica (Bloch *et al*, 2004). Neste trabalho, os autores utilizaram células BHK modificadas geneticamente para sintetizar CNTF. Estas células transformadas foram encapsuladas em uma membrana semipermeável. Este tipo de cápsula foi implantada no ventrículo lateral direito de seis pacientes. A cada seis meses, a cápsula era recuperada e trocada por uma nova, sendo que o estudo foi realizado num período total de dois anos. Os autores não observaram sinal de toxicidade induzida pelo CNTF; entretanto, após a remoção da última cápsula, três pacientes desenvolveram depressão, provavelmente associada à falta de opção terapêutica futura. Apesar das cápsulas recuperadas estarem intactas, continham um número variável de células sobreviventes e a liberação de CNTF estava baixa em 13 dos 24 casos (Bloch *et al*, 2004). O mais importante deste trabalho foi a comprovação da segurança, da viabilidade e da tolerabilidade deste procedimento de terapia gênica, o que abriu novos caminhos para pesquisas em diversas áreas utilizando a tecnologia de encapsulação celular.

1.2.2. Microencapsulação de células em alginato

Muitas estratégias foram exploradas no desenvolvimento de veículos apropriados para o transplante de células geneticamente modificadas. Os polímeros biodegradáveis despertaram especial interesse de diversos pesquisadores, dentre estes polímeros, o alginato tem sido vastamente utilizado em pesquisas de transplantes de células, principalmente pela sua capacidade de formar redes tridimensionais. A tecnologia de encapsulação de células surgiu com a finalidade de facilitar o transplante de células geneticamente modificadas (Simpson *et al*, 2003).

O alginato apresenta propriedades importantes que tem sido bastante pesquisadas: resistência mecânica, porosidade, uniformidade do gel (Martinsen *et al*, 1989; Smidsrod, 1974; Skjak-Braek *et al*, 1989; Smidsord & Skjak-Braek, 1990; Martinsen *et al*, 1992; Thu *et al*, 1996a; Thu *et al*, 1996b; De Vos *et al*, 1996), biocompatibilidade (Soon-Shiong *et al*, 1992; Soon-Shiong *et al*, 1993; Klock *et al*, 1994, Babensee *et al*, 1998) e influência nas células encapsuladas (Constantinidis *et al*, 1999; Stabler *et al*, 2001).

O alginato tem sido utilizado para encapsular uma variedade de materiais biológicos, incluindo enzimas e células, tanto de origem bacteriana quanto de mamíferos. No campo da engenharia de tecidos, particularmente no desenvolvimento de um pâncreas bioartificial, o alginato é utilizado extensivamente para encapsular ilhotas (Soon-Shiong *et al*, 1993; Reach, 1993; Lim & Sun, 1980; Lanza & Chick, 1997a; Lanza & Chick, 1997b) e células β transformadas (Constantinidis *et al*, 1999; Constantinidis & Sambanis, 1995; Papas *et al*, 1997; Sambanis *et al*, 1994; Simpson *et al*, 2005). Para o tratamento da diabetes, existem trabalhos também com a encapsulação da insulina humana recombinante em alginato (Silva *et al*, 2006a).

Dentre os tipos celulares utilizados em microcápsulas de alginato temos as células PC12 para a liberação de dopamina (Winn *et al*, 1991; Aebischer *et al*, 1991b), hepatócitos

para doenças de fígado (Bruni & Chang, 1989; Cai *et al*, 1989; Dixit & Gitnick, 1995, Gao *et al*, 2005), tecidos da tireóide para hipoparatiroidismo (Fu & Sun, 1989; Hasse *et al*, 1994), células tronco embrionárias (Wang *et al*, 2005), entre outras.

1.3. Alginato - Referência histórica

O alginato é um polissacarídeo obtido das algas pardas. Em 1883, o químico inglês E. C. C. Standford descobriu uma nova substância obtida da maceração de algas pardas, a qual nomeou “*algin*” (Standford, 1883). No princípio, este termo foi utilizado para designar a substância *in situ* na planta, posteriormente, este termo foi diferenciado em ácido algínico, alginatos solúveis e compostos algínicos em geral.

1.3.1. Fonte de obtenção – Algas Pardas

As algas pardas formam um grupo particular que gera divergência entre os botânicos. A principal divergência é quanto a sua classificação taxonômica. No sentido *latu sensu* elas fazem parte do reino *Plantae*, divisão *Phaeophyta*. Entretanto, segundo Raven e colaboradores (Raven *et al*, 1996), *stricto sensu*, elas não estão catalogadas como vegetais verdadeiros e, sim, como protistas juntamente com as algas vermelhas e verdes.

As algas pardas constituem a principal matéria prima para a produção do alginato, que é um componente da parede celular destes seres. As algas pardas crescem em todas as regiões de águas frias do mundo, nos hemisférios norte e sul. Estas algas formam um grupo totalmente marinho, que compreende as algas marinhas mais conspícuas de águas temperadas. Da mesma forma que ocorre com as plantas e árvores terrestres, existe uma

variedade de cerca de 1.500 espécies que variam em tamanho, forma, assim como em percentagem e qualidade do alginato que produzem. As algas pardas dominam os costões rochosos em todas as regiões mais frias do mundo. Elas variam de tamanho, desde formas microscópicas até as maiores algas marinhas conhecidas. As maiores algas pardas da ordem *Laminariales* são chamadas *kelps*. Em águas claras, as algas pardas ocorrem desde o nível da maré baixa até uma profundidade de 20 a 30 metros; em costões com declividade suave, elas podem estender-se por 5 a 10 quilômetros da costa. Mesmo nos trópicos, onde as algas pardas são menos comuns, ocorrem imensas massas flutuantes de *Sargassum*, em áreas como o Mar de Sargaços, no Oceano Atlântico, a nordeste das ilhas do Caribe (Raven *et al*, 1996).

De interesse pela sua aplicação industrial podemos mencionar as espécies dos gêneros: *Lessonia* (*L. nigrescens*, *L. flavicans*, *L. trabeculata*), *Macrocystis Pyrifera*, *Durvillea Antártica*, *Laminaria* (*L. digitata*, *L. saccharina* e *L. cloustoni*), *Ascophyllum*, *Fucus*, etc. Estas algas são organismos fotossintéticos, apresentam altas taxas de crescimento e renovação anual, o que as fazem um recurso natural renovável de grande importância (McHugh, 1987).

1.3.2. Estrutura química e física do alginato

O alginato é um polissacarídeo linear constituído por unidades monoméricas, o ácido β -D-manurônico (M) e o ácido α -L-gulurônico (G). As formas para estes monômeros estão apresentadas na figura 2, salientando a estrutura tridimensional destas moléculas.

Estas unidades se agrupam em blocos seqüenciais MM, MG e GG (figura 3). As configurações espaciais que os blocos M e G adotam devido as diferentes ligações glicosídicas entre os carbonos C-1 e C-4 das unidades monoméricas, juntamente com a

proporção, distribuição e comprimento destes blocos, determinam as propriedades químicas e físicas da molécula de alginato. A composição química do alginato varia não só de acordo com a espécie de alga como também entre as diferentes partes de uma mesma planta (McHugh, 1987).

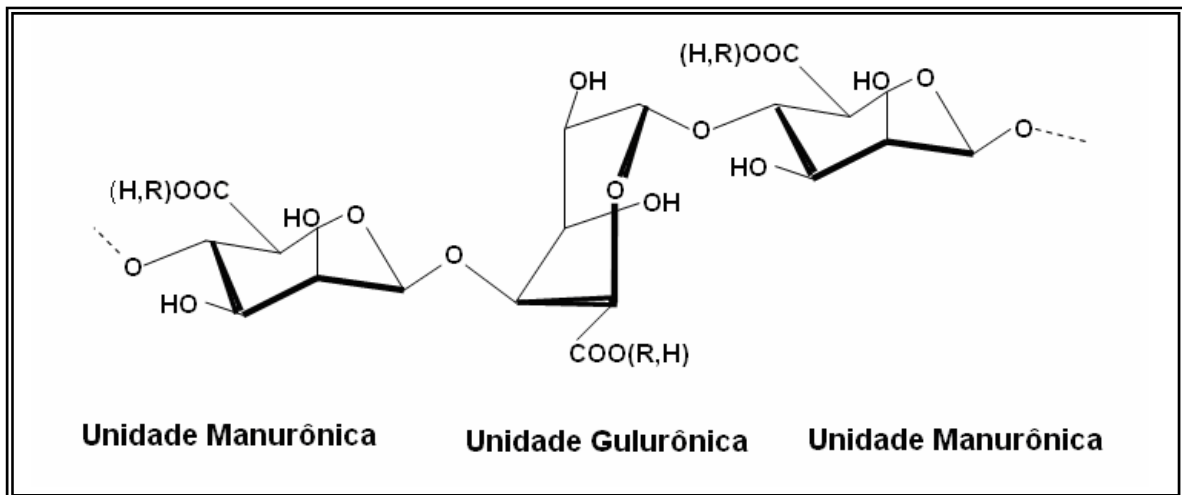


Figura 2. Unidades de alginato.

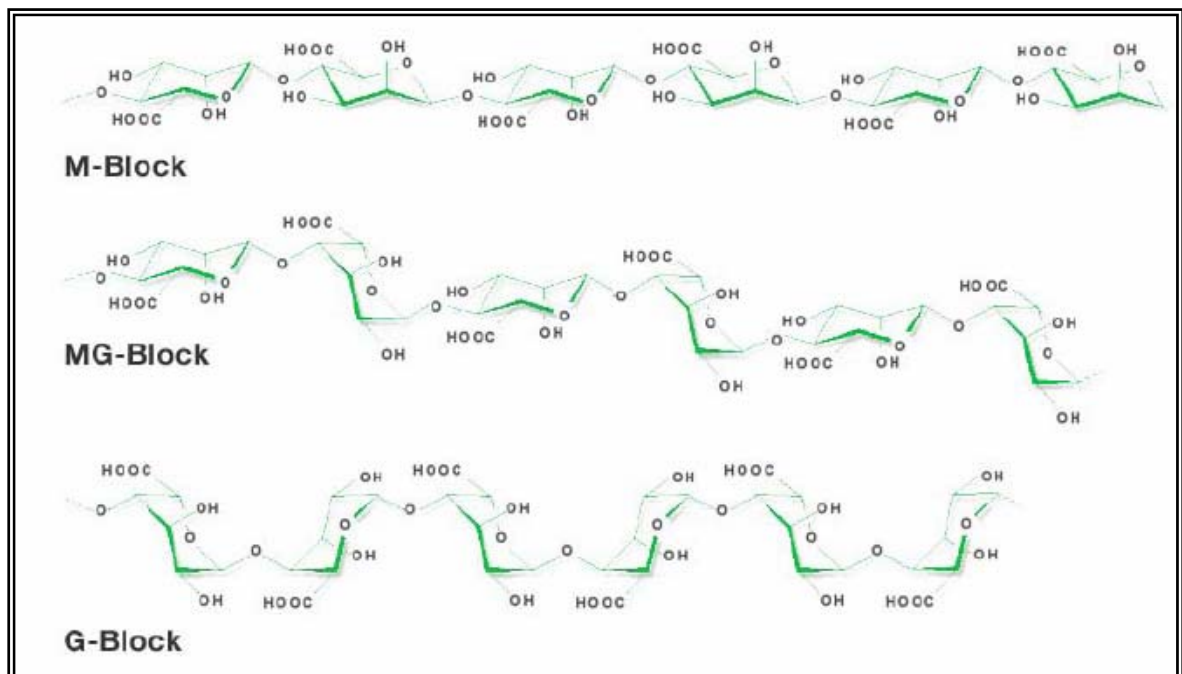


Figura 3. Estrutura dos blocos no alginato (Dornish, 2006).

Para formar um gel, o alginato deve conter um número suficiente de monômeros gulurônicos para poder reagir com um cátion (normalmente Ca^{+2}). Quando as cadeias de blocos G se alinham lado a lado formando um “berço” em forma de diamante, o qual tem a dimensão ideal para acomodar em seu interior um íon cálcio, gerando uma estrutura dimérica (figura 4).

Para explicar as propriedades gelificantes do alginato, Grant propôs o modelo “egg-box” em 1973 (figura 5). Neste modelo, o alginato modifica a sua forma linear ao reagir com íons de cálcio divalentes, gerando uma rede tridimensional, ampliando a possibilidade de mais íons de cálcio reagirem com o alginato, formando estruturas cada vez mais complexas (Grant *et al*, 1973). Em 2001, Braccini reavaliou o modelo “egg-box” utilizando bases moleculares (Braccini & Perez, 2001).

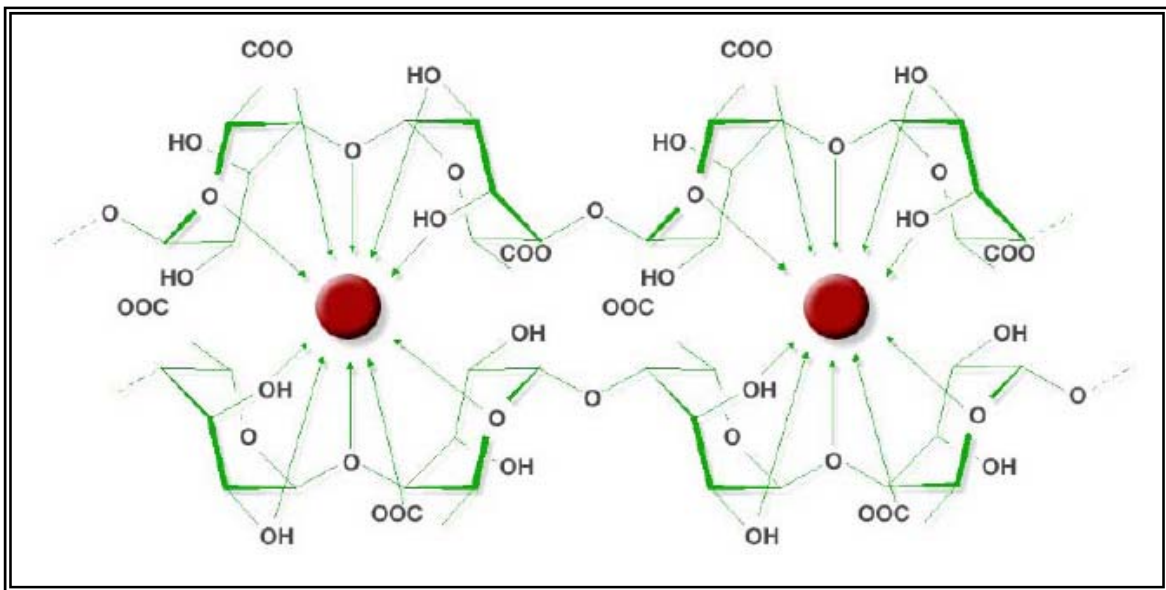


Figura 4. Sítio de ligação do cálcio nos blocos G (Dornish, 2006).

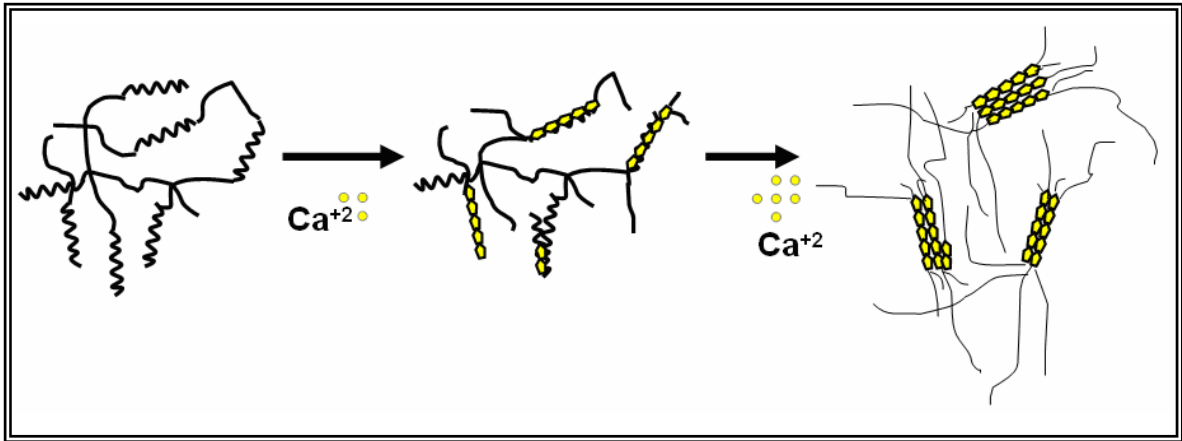


Figura 5. Modelo “egg-box” de gelificação do alginato.

1.3.3. Obtenção de géis de alginato

Para obter-se um gel de alginato, o alginato em pó deve ser hidratado formando uma solução de alginato (na concentração desejada). Quando esta solução entrar em contato com uma outra solução hipercatiônica (normalmente com Ca^{+2}) os blocos MM, MG e GG irão formar redes tridimensionais, gelificando então a solução de alginato.

De acordo com o modelo do “egg-box”, podemos verificar a importância das unidades G na gelificação do alginato. O alginato contendo uma maior fração de blocos GG possui uma habilidade maior de formar géis mais resistentes, enquanto que o alginato rico em blocos MM formarão géis mais frágeis (Dornish, 2006) (figura 6).

Os fatores que influenciam na gelificação do alginato são (Dornish, 2006; Liew *et al*, 2006)):

- Composição e distribuição seqüencial de blocos M/G;
- Concentração do alginato;
- Presença de impurezas;

- Concentração do material biológico (células ou outros);
- Concentração dos íons gelificantes;
- Concentração dos íons não gelificantes;
- Tamanho da gota.

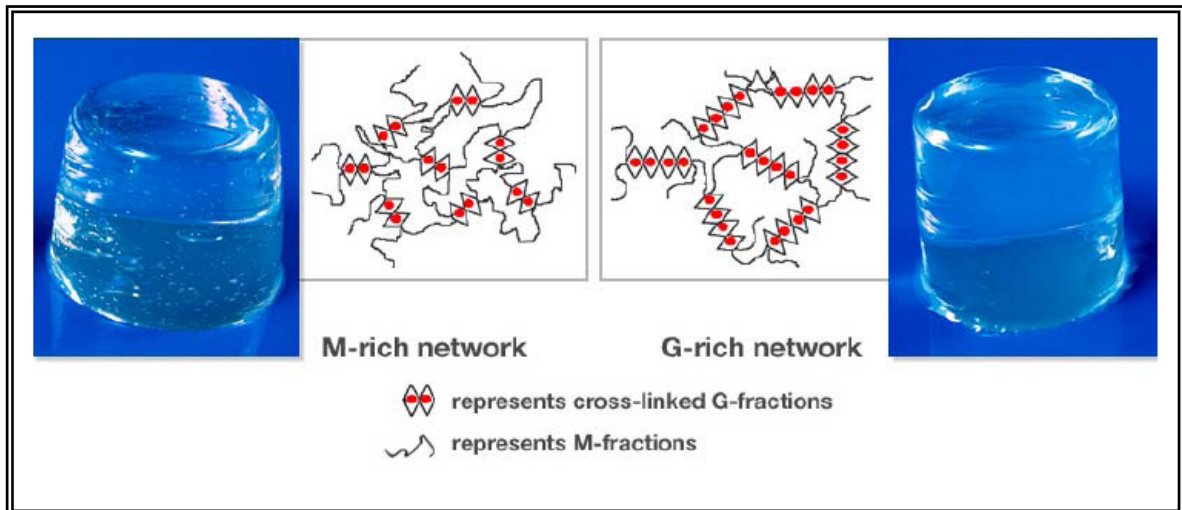


Figura 6. Resistência dos géis de alginato de acordo com a sua composição (Dornish, 2006).

Quanto à questão da composição e distribuição seqüencial de blocos M/G do alginato, podemos controlar optando por adquirir um alginato com a composição mais adequada à necessidade de géis mais sólidos ou mais flexíveis. A presença de impurezas também é algo manejável na escolha do produto a ser utilizado. As concentrações de alginato e de íons gelificantes são obtidas durante o preparo das soluções. Observando-se todos estes aspectos que influenciam na gelificação do alginato, podemos verificar que um dos itens mais importantes neste trabalho é o tamanho da gota. Os demais itens foram facilmente identificados e trabalhados de modo a obtermos a formação de gel idealizada. De acordo com diversos trabalhos, sabemos que as esferas menores (>1mm) tornam-se mais organizadas, obtendo um fluxo enzimático entre meio externo e interno melhor e que

a sobrevivência celular dentro das esferas é melhor quando estas são de diâmetro menor (Simpson *et al*, 2006, Babensee, 2006).

Para obter esferas pequenas (>1mm) necessitamos de gotas muito pequenas, algo bastante complexo, visto que a solução de alginato contendo células é extremamente viscosa. Existe no mercado internacional uma máquina, dispositivo com a função de gerar pequenas esferas de alginato garantindo forma e tamanho das esferas conforme desejado (figura 7). Entretanto, este aparelho possui um custo relativamente alto, principalmente se levarmos em conta a questão de importação.

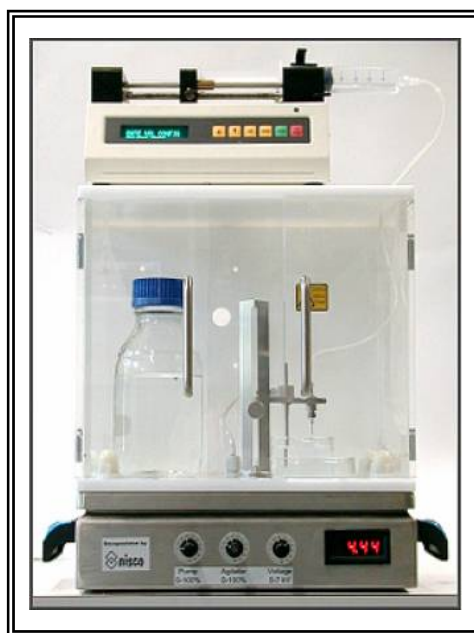


Figura 7. Electrostatic bead generator - NovaMatrix™ (referência eletrônica)

Em 2002, Fizman e colaboradores publicaram uma forma de encapsular células utilizando um encapsulador montado com equipamentos comuns de laboratórios ou hospitais (figura 8). Os autores afirmaram a possibilidade de se obter esferas de alginato com tamanho e forma uniformes utilizando o método descrito (Fizman *et al*, 2002). Reproduzimos o método no laboratório, entretanto, não obtivemos esferas de alginato uniformes.

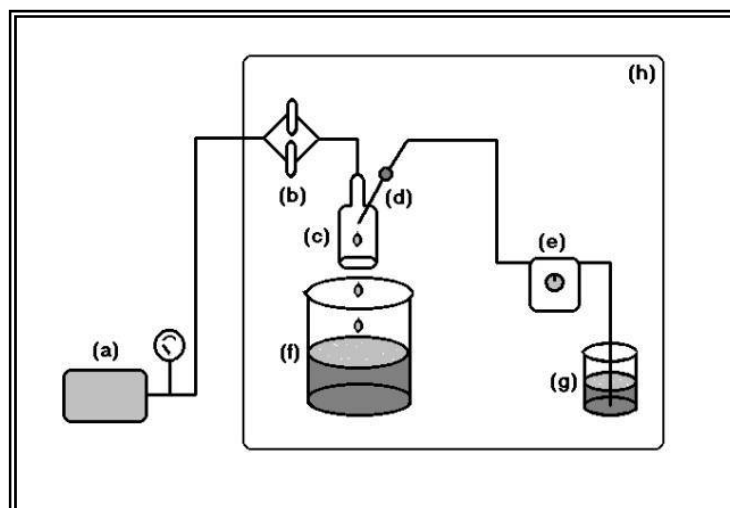


Figura 8. Encapsulador proposto por Fizman e colaboradores (Fizman *et al*, 2002): (a) compressor de ar, (b) filtros de 0,22mm, (c) câmara formadora de bolhas, (d) agulha 27 ½ G, (e) bomba peristáltica, (f) solução contendo CaCl₂, (g) suspensão de alginato de sódio contendo células, (h) capela de fluxo laminar.

1.4. Dinâmica de Flúidos

Como a tecnologia desenvolvida aplica-se diretamente a flúidos, faremos uma breve revisão dos principais conceitos de física sobre o assunto. Esta revisão foi baseada no projeto “ensino de Física a distância” desenvolvido por Carlos Bertulani (Bertulani, 2005).

1.4.1. Tensão Superficial:

De acordo com o princípio de Arquimedes, uma agulha de aço afunda na água. Porém, se colocarmos uma agulha cuidadosamente sobre a superfície da água, ela pode flutuar devido à tensão superficial.

Uma maneira de se pensar na tensão superficial é em termos de energia. Quanto maior for a superfície, maior será a energia que está acumulada nela. Para minimizar a

energia, a maioria dos fluídos assume formas com a menor área de superfície. Esta é a razão pela qual pequenas gotas de água são redondas. Uma esfera tem a menor área possível para um dado volume.

1.4.2. Hidrodinâmica:

A equação de Bernoulli implica que, se um fluído estiver escoando em um estado de fluxo contínuo, então a pressão depende da velocidade do fluído. Quanto mais rápido o fluído estiver se movimentando, tanto menor será a pressão à mesma altura no fluído.

Fluídos reais, como o ar, a água e o sangue, não obedecem perfeitamente a equação de Bernoulli. Situações reais, como o efeito da tensão superficial e da viscosidade, não podem ser descritos pela equação de Bernoulli.

O fluído em um tubo sofre forças de atrito. Existe atrito com as paredes do tubo e com o próprio fluído (devido a viscosidade deste fluído), convertendo parte da energia cinética em calor. As forças de atrito que impedem as diferentes camadas do fluído de escorregar entre si são chamadas de viscosidade. A viscosidade é uma medida da resistência de movimento do fluído.

A equação que governa o movimento de um fluído dentro de um tubo é conhecida como equação de Poiseuille, a qual relaciona o caudal (Q) de um tubo cilíndrico transportando um líquido viscoso com um raio (R), comprimento (l), pressão (P) e coeficiente de viscosidade (η).

$$Q = \frac{P \pi R^4}{8l\eta}$$

Ela leva em consideração a viscosidade, embora ela realmente só é válida para escoamento não-turbulento (escoamento laminar). A coisa mais importante a ser observada nesta equação é que a taxa de escoamento é fortemente dependente do raio do tubo.

Sob todas as circunstâncias em que se pode checar experimentalmente, a velocidade de um fluido real diminui para zero próximo da superfície de um objeto sólido. Uma pequena camada de fluido próximo às paredes de um tubo possui velocidade zero. A velocidade do fluido aumenta com a distância às paredes do tubo. Se a viscosidade de um fluido for pequena ou o tubo possuir um grande diâmetro, uma grande região central irá fluir com velocidade uniforme. Para um fluido de alta viscosidade, a transição acontece ao longo de uma grande distância e em um tubo de pequeno diâmetro a velocidade pode variar através do tubo (figura 9).

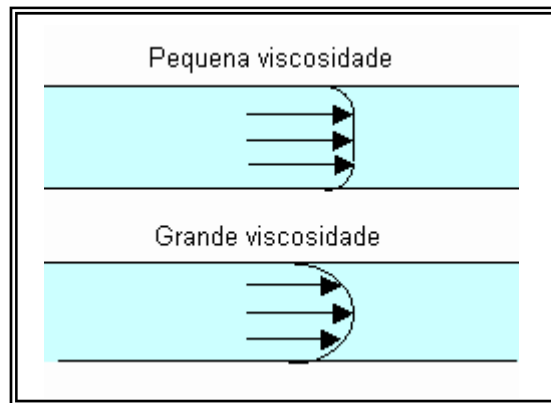


Figura 9. Fluidos de diferentes viscosidades fluindo em tubos (Bertulani, 2007).

Se um fluido estiver fluindo suavemente através de um tubo, ele está em um estado de escoamento laminar. Se um fluido com escoamento laminar flui em torno de um obstáculo, ele exerce uma força de arraste sobre o obstáculo. As forças de fricção aceleram o fluido para trás (contra a direção do escoamento) e o obstáculo para frente (na direção do fluido).

Nem todo o escoamento é laminar. Em um escoamento turbulento, o fluido gira erráticamente. A velocidade em um dado ponto pode mudar em valor e direção. O surgimento de um escoamento turbulento depende da velocidade do fluido, da sua viscosidade, da sua densidade e do tamanho do obstáculo que ele encontra. Um único número, chamado de número de Reynolds, pode ser usado para prever o surgimento da turbulência.

Quando há turbulência, a equação de Bernulli não é válida. Ela foi deduzida igualando-se as forças de pressão necessárias para mudar a energia potencial e a energia cinética ordenada do fluido. Sob turbulência, o fluido ganha energia cinética desordenada.

A descrição matemática básica de dinâmica de fluidos desenvolvida por Euler (1741) foi corrigida para incluir as forças de viscosidade por Navier (1827) e Stokes (1945). A equação de Navier-Stokes para a velocidade (v) de um fluido no ponto (r) e tempo (t) é simplesmente a equação de Newton para uma partícula do fluido:

$$\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v} = -\nabla p + \eta \nabla^2 \mathbf{v}$$

Ela iguala a aceleração de uma partícula do fluido (o lado esquerdo) com a força agindo devida ao gradiente de pressão p (por unidade de volume) e à viscosidade do fluido n (por unidade de volume). Em princípio, teríamos que resolver esta equação para compreender todos os fenômenos de turbulência (Riley, 2006).

Somente recentemente os cientistas puderam obter uma visão mais profunda dos padrões observados em escoamento turbulento sob diferentes circunstâncias. O estudo do caos está ajudando na compreensão e na abertura de novos caminhos de pesquisa em muitos fenômenos de turbulência. Milhares de pesquisadores em todo mundo estão tentando encontrar soluções e modelos que nos ajudem a entender o fenômeno de turbulência por aproximações da equação de Navier-Stokes.

A figura abaixo mostra o fluxo de ar passando por um cilindro a medida que a velocidade do ar aumenta e, portanto, o número de Reynolds aumenta. As três primeiras partes da figura mostram o escoamento laminar em pequenas velocidades, já na quarta parte da figura podemos verificar o surgimento de vórtices de turbulência. Na quinta parte da figura podemos observar que uma região turbulenta se forma. As linhas de força se separam do cilindro e envolvem a camada de turbulência (figura 10).

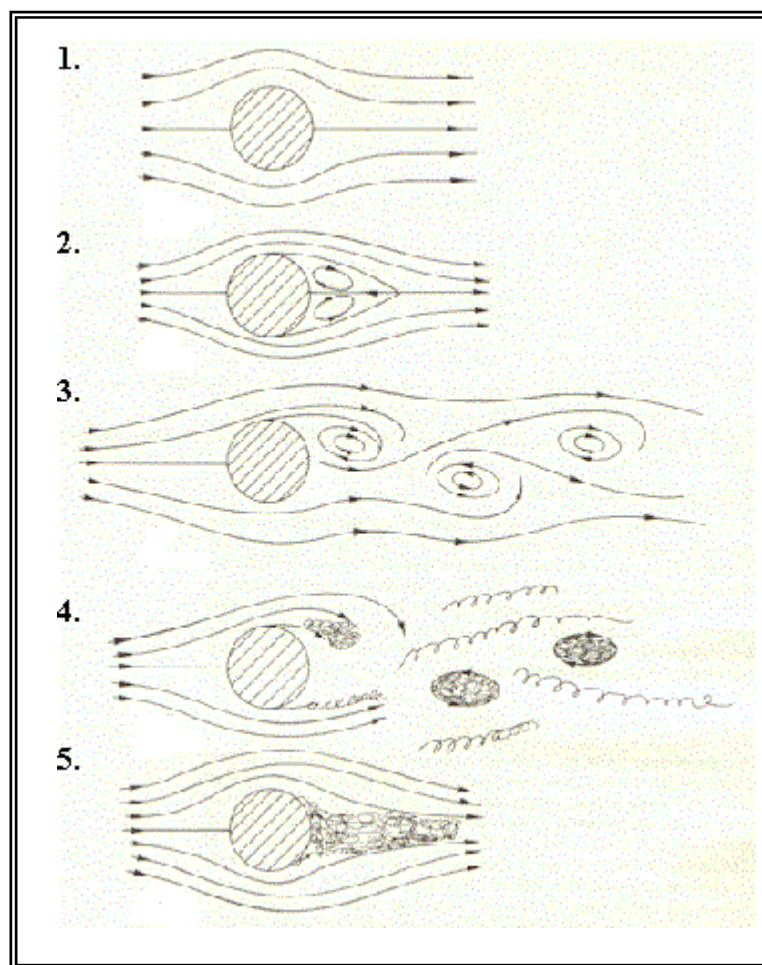


Figura 10. Fluxo de ar passando por um cilindro com diferentes velocidades (Bertulani, 2007): (1, 2 e 3) escoamento laminar em pequenas velocidades, (4) surgimento de vórtices de turbulência, (5) uma região turbulenta se forma, as linhas de força se separam do cilindro e envolvem a camada de turbulência.

1.5. Células BHK

Para testar a tecnologia desenvolvida foi necessária a utilização de uma linhagem celular. As células de rim de hamster bebê (BHK - *baby hamster kidney*) têm sido bastante utilizadas em diversos experimentos de liberação enzimática ou de fatores de crescimento. Essas células se mostraram muito eficientes para a secreção de fator de crescimento ciliar neuronal (CNTF), tanto que estão sendo utilizadas encapsuladas, em estudos de fase clínica I/II para a doença de Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica (Bachoud-Levi *et al*, 2000; Zurn *et al*, 2000).

Baseando-se nos resultados dos estudos clínicos fase I para doença de Huntington, optamos por utilizar esta linhagem celular, já que mesmo quando utilizadas em humanos é verificada a segurança e tolerabilidade (Bloch *et al*, 2004). As pesquisas demonstraram também que estas células tiveram uma boa adaptação, sobrevivência dentro de construtos (tanto alginato quanto outros polímeros).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Desenvolver um processo confiável de encapsulação de células em alginato de sódio utilizando equipamentos disponíveis do laboratório;

2.2. Objetivos Específicos:

- a) Obter cápsulas, esferas de alginato com diâmetro inferior a 1 mm;
- b) Obter esferas de tamanho e forma regulares;
- c) Verificar a viabilidade das células dentro das esferas de alginato;
- d) Verificar a liberação da enzima β -galactosidase através das cápsulas de alginato.

3. CAPÍTULO 1 – ARTIGO

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de um artigo, o qual foi aceito para publicação na *Genetics and Molecular Biology*.

GENERATING ALGINATE MICROCAPSULE: AN EFFECTIVE DEVICE

Tatiana A. B. Bressel^{1,2} ; Ana Helena Paz³ ; Guilherme Baldo⁴ ; Elizabeth O. Cirne Lima⁵ ;
Ursula Matte⁴ ; Maria Luiza Saraiva-Pereira^{1,2,6}

¹ Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

² Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

³ Gastroenterology Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Gene Therapy Centre, Research Centre, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵ Veterinary Pathology Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁶ Biochemistry Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Running title: Alginate microcapsule generation

Keywords: Alginate, microcapsule, drug delivery, controlled release.

Corresponding Author

Maria Luiza Saraiva-Pereira, PhD
Serviço de Genética Médica
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350
90035-903 – Porto Alegre – RS
Brazil
Tel: + 55 51 2101-8011
Fax: + 55 51 2101-8010
e-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

An alternative approach to somatic gene therapy is to deliver the therapeutic protein by implanting genetically modified cells that could overexpress the gene of interest. Microencapsulation devices were designed to protect cells from host rejection and prevent the foreign cells from spreading while allowing protein secretion. Alginate beads form a semi-permeable structure that is suitable for *in vivo* injection. In this study, we report an effective laboratory protocol to generate calcium alginate microcapsules, following optimization of uniformly shaped and sized particles that contain viable cells. Encapsulation of baby hamster kidney (BHK) cells in alginate beads was performed using a simple device assembled with a cylinder of compressed air and a peristaltic pump. Cell suspension flow of 100 ml/h and air jet flow of 10 L/min allowed best size and shape uniformity of beads. Cells were maintained viable in culture for 4 weeks, without signs of necrosis, and protein diffusion was observed during these weeks. Results of these *in vitro* studies clearly demonstrated that microisolation of BHK cells in alginate using a simple assembly device could provide an environment that is capable of preserving live cells. In addition, encapsulated cells under the conditions described were able to secrete an active enzyme even after four weeks of treatment, thus becoming potentially compatible with therapeutic protein delivery.

1. INTRODUCTION

An alternative approach to cell therapy and somatic gene therapy is to deliver therapeutic proteins by implanting genetically modified cells that could overexpress a gene of interest. This is usually achieved by transducing stable cell lines. These cells are immortal and can sustain protein synthesis for long periods, if adequate transgenes are used. The problem is graft rejection in non-autologous transplantation and the tumorigenic potential of such cells (Babensee *et al*, 1998).

In order to solve these problems, it is important to design microencapsulation devices to protect cells from host rejection and preventing tumor spread while allowing protein secretion. This is a potentially cost-effective method of *in vivo* heterologous protein delivery has been used in many studies (Bachoud-Levi *et al*, 2000; Barsoum *et al*, 2003; Friso *et al*, 2005; Dusseault *et al*, 2005).

Whole cell immobilization by entrapment is a widely used, simple technique. Matrices of different polysaccharides, such as calcium alginate, Chitosan, among others, appear to be a promising alternative for improving drug delivery (Janes *et al*, 2001; Adinarayana *et al*, 2005; Kim *et al*, 2005). The most widely used encapsulation compound may be sodium alginate (Weber *et al*, 2004).

On the contrary of most other polysaccharide gels, alginate gels can develop and set at constant temperature. This unique property is particular useful in applications involving fragile materials, such as cells or tissue that have a low tolerance for high temperatures

(Martinsen *et al*, 1989). Alginate also has some useful characteristics that can be applied for pharmaceutical purposes. In particular, the formation of a net-like lattice between cations and alginate in the gel is responsible for the slow release of embedded drugs. This property can be useful for the development of alginate-based drug delivery systems (Kim *et al*, 2005; Murata *et al*, 2004).

Derived from brown algae and bacteria, alginates are a family of unbranched polysaccharides with properties that vary widely depending on their composition (Keshaw *et al*, 2005). Alginates are copolymers of β -D-mannuronic acid (M) and α -L-guluronic acid (G), which are able to function as thermally stable gelling agents. Monomers can appear in homopolymeric blocs of consecutive G-residues (G-blocks), consecutive M-residues (M-blocks), alternating M and G-residues (MG-blocks), or randomly organized blocks. G-blocks form stable cross-linked junctions with divalent cations (e.g. Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , among others), leading to a three-dimensional gel network. Gel formation occurs when divalent cations take part in the interchain ionic binding between guluronic acid blocks (G-blocks) in the polymer chain, giving rise to a three dimensional network. Such binding zones between the G-blocks are often referred to as “egg-boxes” (Simpson *et al*, 2003). This leads to a semi-permeable structure in which encapsulated cells are protected against exposure to the host’s immune system, even allowing influx of oxygen and nutrients as well as release of therapeutic proteins. Such particles allow *in vitro* high-density cell culture, and are suitable for *in vivo* intra-tissue injection (Fiszman *et al*, 2002).

Cells immobilized in alginate gels are viable during long-term culture due to the mild environment of the gel network. For most uses, and in particular those involving

immobilization of living cells, microcapsules are utilized. Small beads/capsules (<1 mm) present the advantage of a high surface/volume ratio, allowing good transport of essential nutrients, and are also less fragile. Diffusion limitations in larger beads may limit cell survival by shortage of essential substances such as oxygen supply and other nutrients. At this bead size, these substances do not reach the bead core leading to cell death because they are used to nourish peripheral cells.

Bead size and shape are crucial and must be carefully controlled. Therefore, it is also necessary to have a suitable methodology to produce small beads under controlled conditions.

The large-scale applicability of such techniques requires cost-effective, reliable methods of microcapsule generation. In research protocols, the optimization of alginate bead production in terms of shape and size uniformity is also crucial.

Here we report the optimization of a system for generating alginate beads with a uniform shape and size containing viable cells. A cost-effective protocol generated calcium alginate microcapsules, and cell viability, alginate toxicity, and protein diffusion rate were evaluated.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Cell culture

Baby hamster kidney (BHK) cells (CCL-10, American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA)), obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank, were cultured as a monolayer in T25-ml flasks at 37°C and 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM – GIBCO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, CULTILAB, Campinas, SP, Brasil). Serial runs were made using trypsin (1 g trypsin; 250 ml PBS and 0.02% EDTA – GIBCO, USA) every 2-3 days. BHK cells were harvested from monolayer cultures using trypsin-EDTA, and resuspended in complete medium containing 1.5% (w/v) low viscosity sodium alginate (SIGMA) at a final concentration of 1×10^5 cells/ml.

2.2 Device assembly and cell encapsulation

An effective device assembled in our laboratory produced air jet-driven droplet generation. We used a compressed air cylinder equipped with a flow meter connected to an 80 cm PVC tubing. A regular 25-gauge stainless steel injection needle was inserted at a 45° angle until the tip reached the middle of the air tubing end. The needle was then connected to the administration set (LIFEMED model EQL P) that was attached to a peristaltic pump (LIFEMED model LF2001). BHK cells from the culture described above (cultured as a monolayer in T25-ml flasks at 37°C and 5% CO₂ in D-MEM supplemented with 10% fetal bovine serum) were suspended in complete medium (D-MEM supplemented with 10% fetal bovine serum) containing 1.5% (w/v) low viscosity sodium alginate solution at a final concentration of 1×10^5 cells/ml, were inserted in the container bag (BAXTER model AZB1322 Viaflex), which was then placed 50 cm above the peristaltic pump. Cell

suspension was driven at different flow rates by the pump. Airflow was also variable during the experiments. A Becker containing 125 mM CaCl₂ solution was placed 3 cm below the needle tip. Alginate beads were formed immediately after dropping into the Becker. The whole system, except the compressed air cylinder, was assembled inside a laminar flow hood to ensure sterility (Figure 1).

2.3 Encapsulated cells

Alginate beads with BHK cells were gently washed twice with water (MiliQ), and then transferred to 6-well plates containing Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) to cover the beads. These capsules were incubated under regular culture conditions (as described above). The culture medium was changed every 2 days, and the capsules were maintained in culture for 4 weeks.

2.4 Bead size measure

Beads obtained were analyzed with a magnifying glass support and measured with a pachymeter.

2.5 Cell viability

Cell viability was determined using the trypan blue method. At the end of every week, beads from 3 wells were collected and centrifuged (3 min, 1.000 rpm). One ml of 40 mM sodium citrate solution was added to the pellet to bring cells back to solution, and another spin was carried out. Cells were then stained with trypan blue solution, and counted in a

Neubauer chamber. Cell viability was estimated comparing the number of live cells to the total number of cells. Results were expressed as percentage of viable cells.

2.6 Protein diffusion

BHK cells usually secrete the beta-galactosidase enzyme in measurable quantities. This enzyme was then chosen to evaluate protein diffusion. Enzyme activity was measured in the culture medium from 3 different wells at the end of every week for four weeks. Enzyme activity was determined as described by Suzuki (1977), using the artificial substrate 4-methyl-umbelliferyl- β -D-galactoside (MUG). Fluorescence was measured in a Hitachi F-2000 spectrofluorometer using 460-nm and 355-nm as emission and excitation filters, respectively.

3. RESULTS

Cross-linked alginate polysaccharide polymers formed solid spherical beads containing embedded cells. To encapsulate BHK cells, we used the assembled system outlined in Figure 1.

Different air jet flows and peristaltic pump rates were tested. Air jet flow was set to 5, 10, or 15 L/min and cell suspension flow of 100 and 180 mL/h. As observed by Fizman (2002) microbead diameter decreases with increasing air jet flow (Figure 2). Particles shape changed with the rate of peristaltic pump. Lower flow rates (100 ml/h) are necessary to obtain uniform solid spherical beads containing embedded cells.

We successfully obtained beads with a diameter smaller than 1 mm. We observed the biggest bead diameter using an air jet flow of 5 L/min (beads size 1.15 ± 0.05 mm). On the other hand, we generated the smallest bead diameter with an air jet flow of 15 L/min (bead size 0.4 ± 0.05 mm). A bead size of 0.6 ± 0.05 mm was obtained using a 10 L/min air jet flow.

Incorporation of cells into alginate beads was demonstrated, as shown by figure 3. During the study period, encapsulated cells were kept viable in culture for 4 weeks, as seen by trypan blue exclusion assay. We did not observe any sign of necrosis in capsules during the study period. There is no significant difference in the shape of beads during the time of the experiment; this indicates that bead shape was preserved. Longer-lasting gel integrity is critical to prolong cell growth control.

Cell viability was evaluated for 4 weeks and results are shown in figure 2. During the four-week period, cell viability was maintained above 90%. Moreover, the total number of cells increased during the period analyzed, indicating that cells were replicating inside the alginate beads. Protein diffusion was estimated comparing number of cells against β -galactosidase activity released to culture medium, as can be observed in figure 4. Degree of beta-galactosidase synthesis in culture is higher when cells are encapsulated. We had compared similar number of growing cells and beta-galactosidase activity was 14.5 mmol/h/mL in culture and 0.7 nmol/h/mL in encapsulated cells. As the number of cells increased, so did the protein activity detected in the medium, probably reflecting an increase in the amount of protein secreted.

4. DISCUSSION

We presented an efficient method to microencapsulate cultured cells, using regular equipment and disposable supplies available in a molecular biology and biochemistry laboratory. A key difference between the microencapsulation method presented here and those previously published (Simpson *et al*, 2003; Weber *et al*, 2004; Dusseault, *et al*, 2005; and others) is cost-effectiveness, since it is unnecessary to acquire a special device. Generally, low-price devices for cells encapsulation in alginate can cost at least five times more than the amount spent for the device outlined in this study.

Comparing the device described here to that described by Fiszman and co-workers in 2002, our device does not use the half blister chamber, generating more uniform microcapsules. A half-blister chamber allows the formation of circular laminar flow or turbulence, producing irregular droplets. This is due to the bigger diameter shown by the half blister chamber compared to air tubing, creating transient low-pressure zones, and a decrease in linear air speed. In this condition, airflow changes the course in the direction of lower pressure areas inducing the formation of circular laminar flow or even turbulence. The phenomena involving turbulent flows are generally described by the complex Navier-Stokes equation (Riley, 2006). Considering the production of more uniform beads, the best results in our study were obtained introducing the needle at a 45° angle into the air tubing.

Another important feature is the use of a compressed air cylinder instead of an air compressor. Airflow is more uniform in the compressed air cylinder since air is affected by the internal pressure inside the cylinder whereas the air compressor works with intermittent

power and less uniform flow. Once the air leaves the cylinder, flow is regulated by a flow meter, providing a uniform flow rate.

The methodology described here was able to generate BHK-encapsulated cells that produced β -galactosidase within the bead and the protein was able to cross the lattice network as shown by enzyme activity determined in the culture medium.

In most applications, involving immobilization of live cells or other biological materials, shape and size of beads are critical. In a bioartificial construct, encapsulating cells in small-diameter beads is useful to reduce mass transfer resistance caused by the encapsulation material, allowing greater oxygen and nutrient availability for cells located inside these beads. Further, shape is essential to guarantee gelling uniformity, avoiding incomplete alginate gel formation (Keshaw *et al.*, 2005).

Here we report on an effective laboratory method to generate calcium alginate microcapsules with the optimization of bead generation to obtain uniformly shaped and sized particles containing viable cells. Results of these *in vitro* studies clearly demonstrate that micro isolation of BHK cells in alginate using a simple assembly device can provide an environment that is compatible with the maintenance of living cells.

Finally, although long-term studies have to be carried out, experiments performed proved to be an effective, reliable, and cost-effective methodology to produce calcium alginate microcapsules containing cells. Therefore, the methodology can be modified for other applications, and widely employed by research groups worldwide.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to LIFEMED for technical assistance, and for supplying a volumetric infusion pump LF2001 and administration sets.

This work was supported by CNPq, SCT-RS and FIPE/HCPA .

REFERENCES

Adinarayana K, Jyothi B and Ellaiah P (2005). Production of Alkaline Protease With Immobilized Cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in Various Matrices by Entrapment Technique, *AAPS PharmSciTech* 6 (3): E391-E397.

Babensee JE, Anderson JM, McIntire LV and Mikos AG (1998). Host response to tissue engineered devices, *Advanced Drug Delivery Reviews* 33: 111-139.

Bachoud-Levi AC, Deglon N, Nguyen JP, Bloch J, Bourdet C, Winkel L, Remy P, Goddard M, Lefaucheur JP, Brugieres P, Baudic S, Cesaro P, Peschanski M and Aebischer P (2000). Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulate BHK cell line engineered to secret human CNTF, *Hum. Gen. Ther.* 10; 11 (12): 1723-1732.

Barsoum SC, Milgram W, Mackay W, Coblenz C, Delaney KH, Kwiecien JM, Kruth S and Chang PL (2003). Delivery of recombinant gene product to canine brain with the use of microencapsulation, *J. Lab. Clin. Med* 142 (1): 399-413.

Dusseault J, Leblond FA, Robitaille R, Jourdan G, Tessier J, Ménard M, Henley N and Hallé JP (2005). Microencapsulation of living cells in semi-permeable membranes with covalently cross-linked layers, *Biomaterials* 26: 1515-1522.

Fizman GL, Karara AL, Finocchiaro LME and Glikin GC (2002). A laboratory scale device for microencapsulation of genetically engineered cells into alginate beads, *E. J. Biotechnology* 5 (3): 279-283.

Friso A, Tomanin R, Alba S, Gasparotto N, Puicher EP, Fusco M, Hortelano G, Muenzer J, Marin O, Zacchello F and Scarpa M (2005). Reduction of GAG storage in MPS II mouse model following implantation of encapsulated recombinant myoblasts, *J. Gene. Med.* 7 (11): 1482-1491.

Janes KA, Calvo P and Alonso MJ (2001). Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules, *Adv. Drug Delivery Reviews* 47:83-97.

Keshaw H, Forbes A and Day RM (2005). Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass, *Biomaterials* 26: 4171-4179.

Kim YJ, Park HG, Yang YL, Yoon Y, Kim S and Oh E (2005). Multifunctional Drug Delivery System Using Starch-Alginate Beads for Controlled Release, *Biol. Pharm. Bull* 28 (2): 394 – 397.

Martinsen A, Jinno D, Kofuji K and Kawashima S (1989). Alginate as immobilization material: I Correlations between chemical and physical properties of alginate beads. *Biotechnol Bioeng* 33: 79-89.

Murata Y, Jinno D, Kofuji K and Kawashima S (2004). Properties of calcium-induced gel beads prepared with alginate and hydrolysates, *Chem Pharm Bull* 52: 605-607.

Riley, N (2006) *The Navier-Stokes Equations : A Classification of Flows And Exact Solutions*, Cambridge University Press, 196 pp.

Simpson NE, Grant SC, Blackband SJ and Constantinidis I (2003). NMR properties of alginate microbeads, *Biomaterials* 24: 4941-4948.

Suzuki, K (1977). Globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease) and GM1 gangliosidosis. In: Glew, R. H. & Peters, S. P., eds. *Practical enzymology of the sphingolipidoses*. New York, Alan R. Liss.

Weber W, Rinderknecht M, Baba MD, Glutz FN, Aibel D and Fussenegger M (2004). CellMAC: a novel technology for encapsulation of mammalian cells in cellulose sulfate/pDADMAC capsules assembled on a transient alginate/Ca²⁺ scaffold, *J. Biotechnology* 114: 315-326.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Diagram of the microcapsule generator. a) container bag (BAXTER model AZB1322 Viaflex) with low sodium alginate viscosity 1.5% (w/v) containing BHK cell suspension (2×10^5 cell/mL); b) administration sets (LIFEMED model EQL P); c) LIFEMED volumetric infusion pump (model LF2001); d) regular stainless steel injection - 25 gauge needle; e) Becker containing 125 mM CaCl_2 solution; f) compressed air cylinder; g) flow meter; h) 80-cm PVC tubing i) laminar flow hood; j) support.

Figure 2: Shape and size of particles obtained with different air jet flows and peristaltic pump rates. a) size of beads = 1.15 ± 0.05 mm; peristaltic pump rate 100mL/h and airflow 5L/min; b) size of beads = 1.15 ± 0.05 mm; peristaltic pump rate 180mL/h and airflow 5L/min; c) size of beads = 0.6 ± 0.05 mm; peristaltic pump rate 100mL/h and airflow 10L/min; d) size of beads = 0.6 ± 0.05 mm; peristaltic pump rate 180mL/h and airflow 10L/min; e) size of beads = 0.4 ± 0.05 mm; peristaltic pump rate 100mL/h and airflow 15L/min; f) size of beads = 0.4 ± 0.05 mm; peristaltic pump rate 180mL/h and airflow 15L/min.

Figure 3. Microcapsule containing BHK cells maintained *in vitro* for 4 weeks. a) alginate gel; b) BHK cells.

Figure 4. BHK-encapsulated cell count and β -galactosidase activity in the culture medium. Cells were encapsulated using peristaltic pump rate 100 mL/h and airflow 15 L/min. Beads size were 0.4 ± 0.05 mm.

Figure 1.

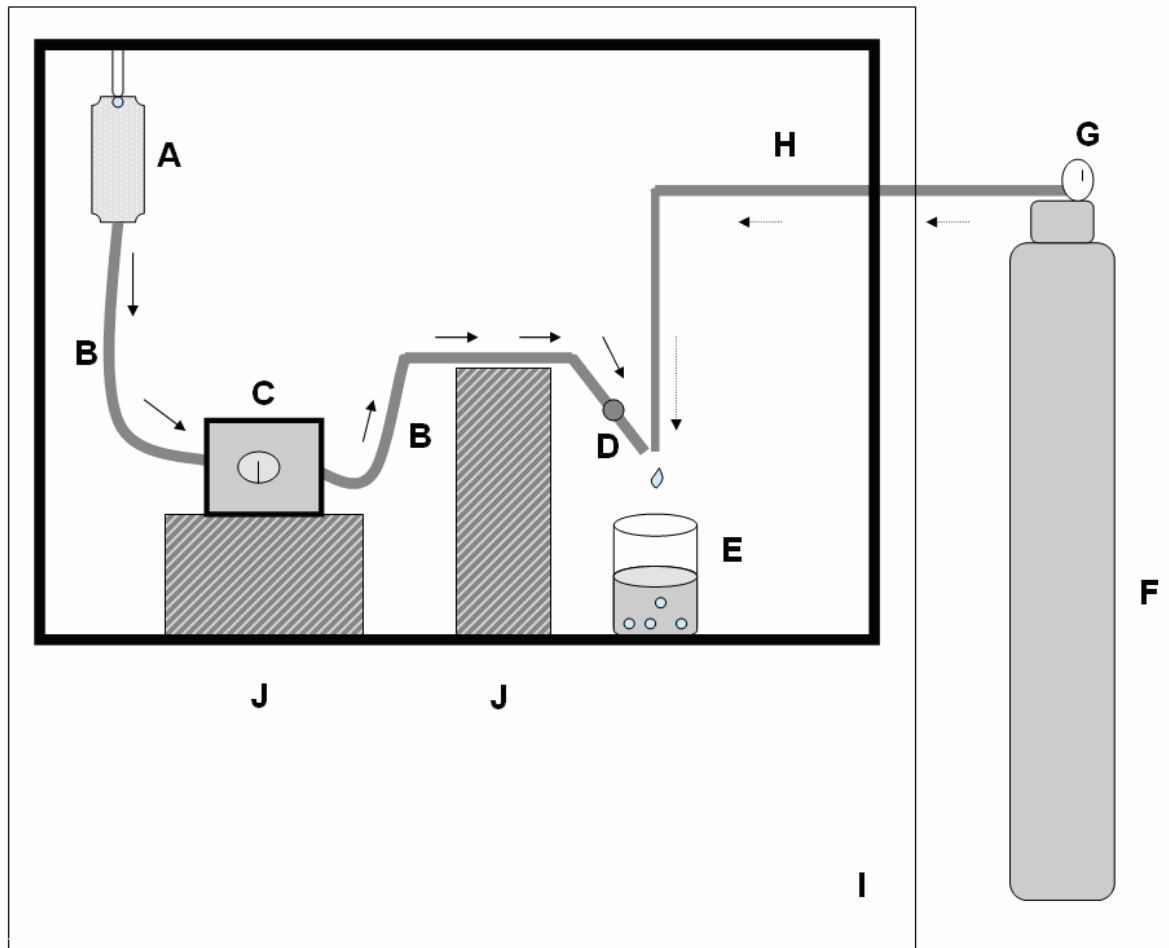


Figure 2.

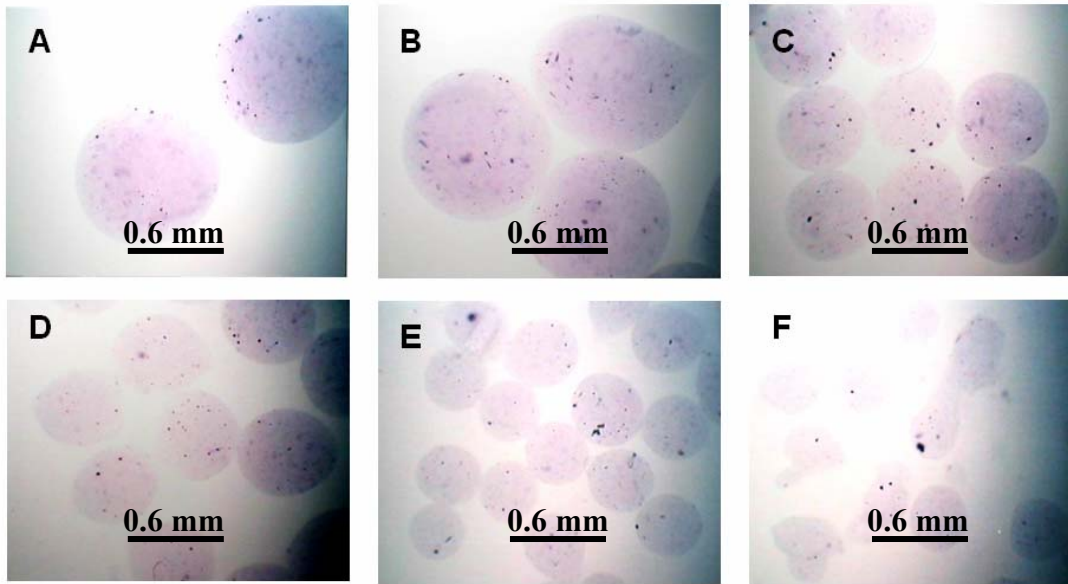


Figure 3.

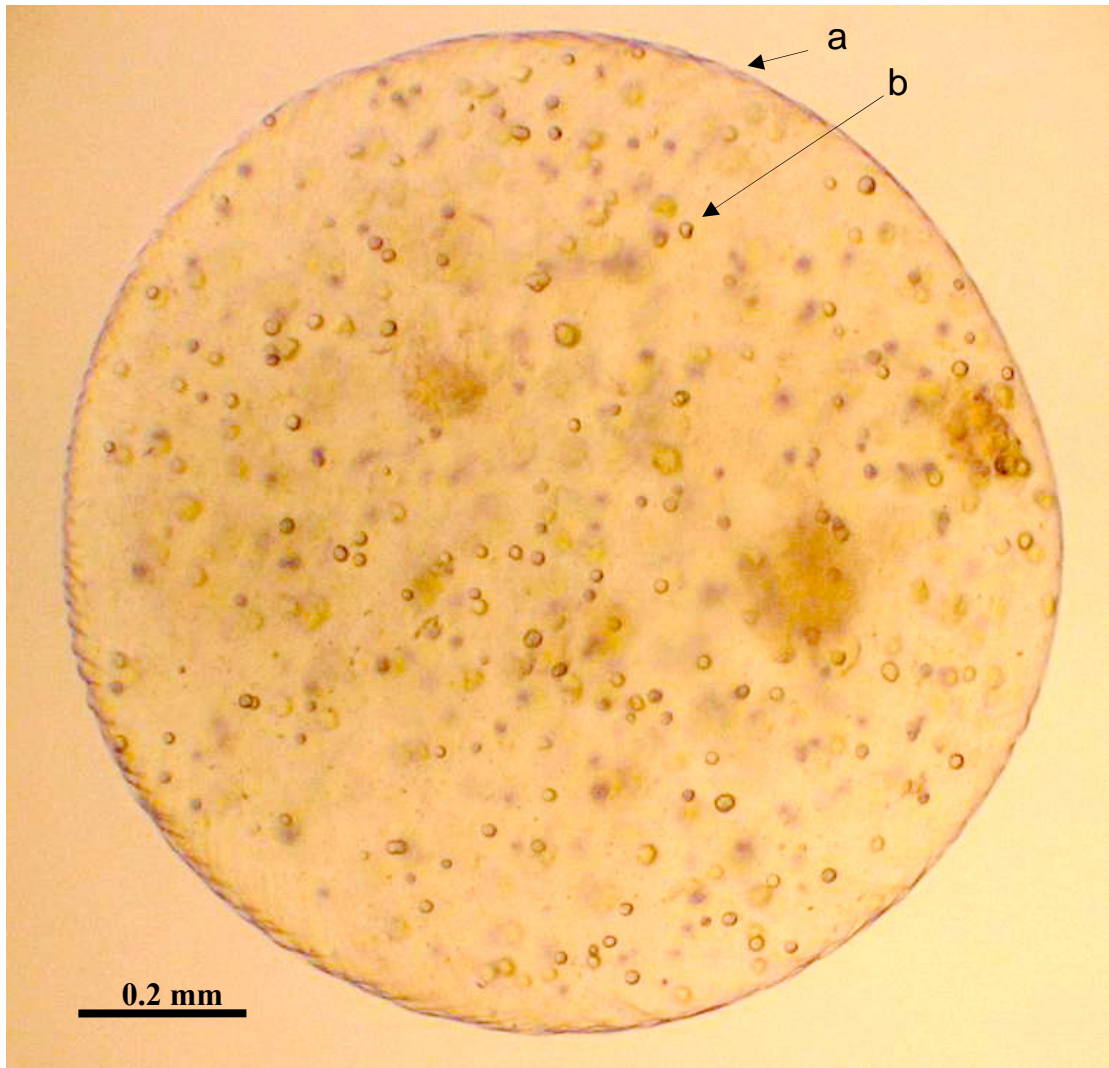
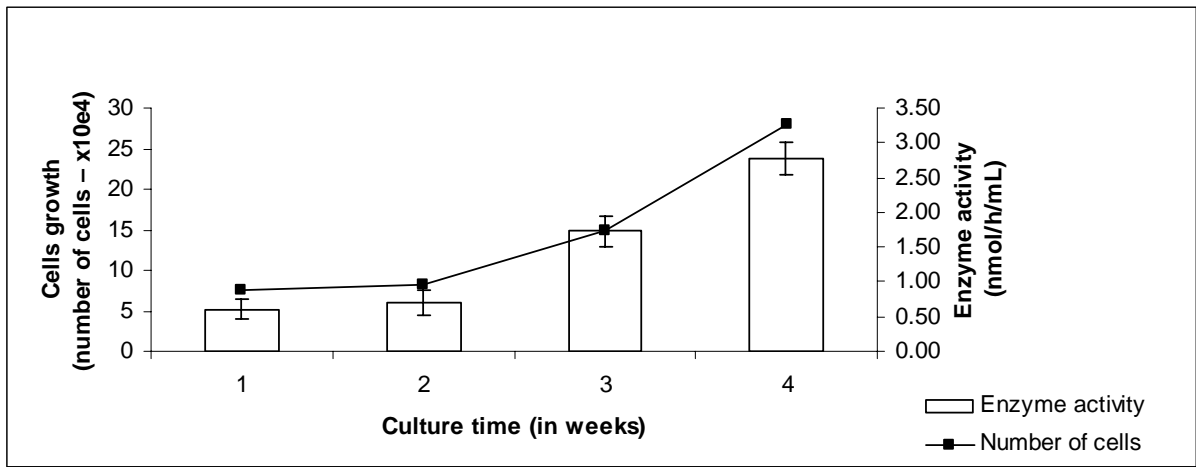


Figure 4.



4. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um mecanismo confiável de encapsulação de células em alginato de sódio utilizando equipamentos existentes no laboratório. A grande diferença entre o nosso método de encapsulação e o descrito na maioria dos trabalhos publicados (Simpson *et al*, 2003; Weber *et al*, 2004; Dusseault *et al*, 2005; entre outros) é a produção de um sistema eficiente com um baixo custo, visto que não é necessário nenhum equipamento específico. A vantagem econômica para montar este encapsulador (no caso de não possuir nenhum destes equipamentos no laboratório) é que o modelo de menor custo disponível no mercado custa 5 vezes mais do que adquirir estes equipamentos para montar o mecanismo proposto.

Primeiramente, montamos um sistema gerador de cápsulas de alginato de sódio baseado no modelo descrito por Fizman (Fizman *et al*, 2002). Para isto utilizamos uma bomba de infusão, um cilindro de ar comprimido (no lugar do compressor de ar), filtros de ar, mangueiras, seringa, copos de Becker, a câmara formadora de bolhas (“half blister chamber”) e uma capela de fluxo laminar. Optamos pela utilização de um cilindro de ar comprimido no lugar do compressor de ar, pois, além do mesmo estar disponível no laboratório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sabíamos que com ele conseguiríamos um fluxo de ar constante. Utilizando um compressor de ar, o fluxo não seria constante, visto que os compressores utilizam uma fonte intermitente. Acoplado ao cilindro colocamos um fluxômetro para testar variadas taxas de fluxo de ar.

Para criar a câmara formadora de bolhas utilizamos alguns materiais disponíveis no laboratório e outros gentilmente cedidos pelo setor de tornearia do Hospital de Clínicas de

Porto Alegre. Foram utilizados um copo de coleta de urina, uma ponteira de micropipeta, duas hastes metálicas, uma agulha e um copo de Becker (figura 11).



Figura 11. Fotografia salientando a construção da câmara formadora de bolhas.

Esta câmara foi construída utilizando um copo de Becker, um copo de coleta de urina que fica suspenso sob o copo de Becker pela utilização de hastes metálicas. No centro do copo de coleta de urina foi posicionada uma ponteira de micropipeta e num ângulo de 45° uma agulha.

O mecanismo encapsulador proposto por Fizman (Fizman *et al*, 2002) foi montado e testado em nosso laboratório; entretanto, mesmo utilizando as mesmas condições descritas pelos autores, não foi possível a obtenção esferas de alginato uniformes. Foi possível observar que, neste mecanismo, existia um ponto específico onde o fluxo de ar juntamente com a solução contendo alginato, não seguia uma direção única, provavelmente indicando o surgimento de vórtices de turbulência. O ponto onde isto ocorria era na câmara formadora de bolhas (figura 12). Esta câmara possui um diâmetro maior (S_2) que o tubo de ar que chega nela (S_1) (figura 12a). Levando em conta a equação de Poiseuille (descrita no item 1.4.2), sabemos que a taxa de escoamento laminar é fortemente dependente do raio do tubo (S). Esta diferença de diâmetros (ou raios dos tubos) cria zonas de baixa pressão transitórias (figura 12b) e diminui a velocidade linear (V) do ar ($S_1V_1 = S_2V_2$). Nestas condições, o fluxo de ar muda o curso e direção para as áreas de baixa pressão (figura 12c) induzindo a formação de fluxo laminar circular e até turbulência. Este fluxo laminar

circular ou mesmo a turbulência acaba gerando gotas de tamanhos e formas irregulares. O fenômeno de geração de fluxos turbulentos pode ser explicado pela equação de Navier-Stokes (item 1.4.2 desta tese).

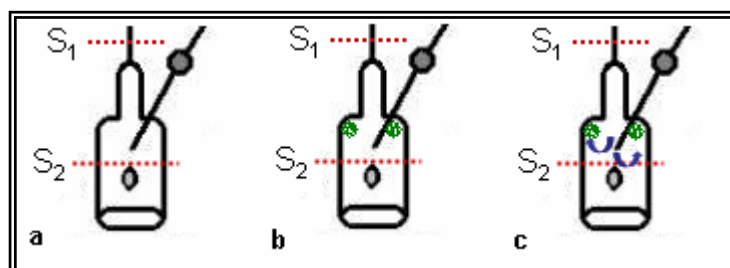


Figura 12: Detalhe da câmara formadora de bolhas

a) diâmetro da câmara formadora de bolhas(S_2) maior que o diâmetro do tubo de ar (S_1); b) a diferença de diâmetros cria zonas de baixa pressão transitórias (detalhe em verde); c) setas indicam a mudança de curso e direção do fluxo de ar para as zonas de baixa pressão induzindo a formação de fluxo de ar laminar circular e até turbulência.

Para evitar a formação de fluxo laminar circular ou mesmo turbulência constatamos que o diâmetro do tubo, por onde passava o ar, não poderia sofrer alterações. Com base nesta conclusão, eliminamos a câmara formadora de bolhas do sistema. Inserimos a agulha, por onde fluía a solução de alginato de sódio contendo as células, diretamente na mangueira onde fluía o ar comprimido. Diversos testes foram realizados com a agulha inserida na mangueira de ar. Tanto o ângulo de inserção da agulha quanto o posicionamento do orifício da agulha foram modificados. O posicionamento do orifício da agulha foi testado, girando-se a agulha já inserida na mangueira. A agulha é feita a partir de um tubo e a sua ponta é produzida através de um corte angular neste tubo, gerando uma extremidade pontiaguda e perfurante. Desta forma, o corte da agulha poderia ficar virado para baixo, para cima ou para um dos lados. Este teste foi importante para verificar se o posicionamento influenciava no tamanho das cápsulas.

Todos os testes foram realizados utilizando diferentes fluxos de ar comprimido e diferentes fluxos da solução de alginato de sódio contendo as células. As cápsulas obtidas foram analisadas com o auxílio de uma lupa e medidas com um paquímetro. Verificamos que o melhor ângulo de inserção da agulha na mangueira de ar era de 45°, observando que o orifício da agulha fosse posicionado voltado para baixo (figura 13).

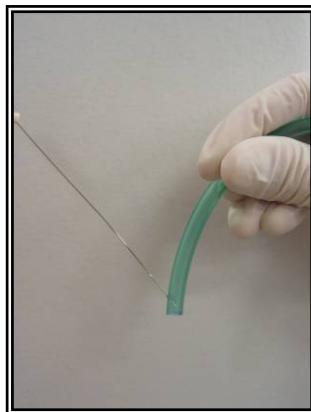


Figura 13: Fotografia salientando o ângulo de inserção da agulha na mangueira de ar.

Após a definição das variáveis, inserção da agulha e posicionamento do orifício da agulha, começamos a realização de testes com diferentes fluxos de ar e diferentes fluxos da solução de alginato de sódio contendo as células. Os fluxos de ar testados foram de 15 L/min, 10 L/min e 5 L/min. Os fluxos da bomba de infusão testados foram 100 mL/h e 180 mL/h. Os resultados destes testes mostraram que o fluxo de ar é responsável pela definição do tamanho das cápsulas (tabela 1). Quanto maior o fluxo de ar, menores serão as cápsulas. Por outro lado, o fluxo da bomba de infusão define a uniformidade das cápsulas. Quanto maior a vazão da bomba de infusão, menos uniformes serão as cápsulas. Portanto, para obtenção cápsulas de uniformes, a infusão deve ser lenta.

Tabela 1 – Experimentos com diferentes fluxos de ar comprimido e fluxos de infusão

Fluxo da bomba de Infusão	Fluxo do ar comprimido	Tamanho das esferas
100 mL/h	5 L/min	1,15 +/- 0,05 mm
180 mL/h	5 L/min	1,15 +/- 0,05 mm
100 mL/h	10 L/min	0,6 +/- 0,05 mm
180 mL/h	10 L/min	0,6 +/- 0,05 mm
100 mL/h	15 L/min	0,4 +/- 0,05 mm
180 mL/h	15 L/min	0,4 +/- 0,05 mm

Após a constatação da importância da vazão da bomba de infusão para a obtenção de cápsulas uniformes, resolvemos testar bombas de marcas diferentes. Uma bomba de infusão da marca BBRAUM foi obtida junto ao Serviço de Engenharia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Através de contato com a empresa LIFEMED, uma bomba de infusão modelo LF2001 assim como os equipos foram gentilmente cedidos para serem testados. Novos experimentos foram realizados utilizando as mesmas taxas de infusão nas diferentes bombas. A variação da uniformidade das cápsulas era maior quando utilizávamos a bomba de infusão da marca BBRAUM do que a da marca LIFEMED. Esta diferença de resultados pode ser devido ao fato que a bomba da marca BBRAUM era mais antiga e, provavelmente, com maior uso prévio, ou pode ser simplesmente devido a diferenças na precisão de infusão das bombas. Como esta diferença influenciava na uniformidade das cápsulas, os experimentos foram continuados utilizando a bomba de infusão da marca LIFEMED. A utilização das bombas foi de acordo com as instruções dos fabricantes. Uma das orientações de grande importância, pela influência no resultado, é a altura que deve ser colocada a bolsa ou frasco de soro em relação à bomba de infusão. Nos experimentos realizados, a distância de 50 cm se mostrou muito importante na precisão de infusão da bomba.

Outro teste realizado foi a definição da distância da ponta da agulha até a solução hipercatiônica. No mecanismo proposto por Fizman e colaboradores, a distância utilizada foi de 4-5 cm (Fizman *et al*, 2002). Nesse trabalho, distâncias de 2 até 10 cm foram testadas, sendo observado que a maior distância (10 cm) propiciava a formação de esferas menos uniformes. De acordo com os nossos resultados, a melhor distância observada para a formação das cápsulas mais uniformes era de 3 cm.

Com a definição das variáveis descritas acima, começamos os testes de viabilidade celular e liberação de enzima, os quais foram realizados utilizando células BHK. Estas células foram mantidas em cultura em meio D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Gibco®, USA) até atingir confluência, quando foram tripsinizadas e diluídas numa solução de 1,5% (p/v) de alginato de sódio (Sigma®). O número de células foi contado em câmara de Neubauer e ajustado para as concentrações finais de 1×10^5 e 2×10^5 células/mL. As cápsulas foram produzidas utilizando o fluxo de ar de 15 L/min e o fluxo da solução de alginato de sódio contendo as células foi de 100 mL/h. As cápsulas produzidas pelo contato com a solução hipercatiônica de cloreto de cálcio 125 mM apresentavam um diâmetro de $400 \mu\text{m} \pm 0,50 \mu\text{m}$. Estas cápsulas foram lavadas 3 vezes com solução de PBS e então foi adicionado o meio D-MEM para a sua manutenção. O estudo foi conduzido por 28 dias com as cápsulas sendo mantidas numa estufa com 5% de CO_2 a 37°C . O meio de cultura foi trocado 2 vezes por semana. Ao final de cada semana, 3 poços foram utilizados para contagem das células, viabilidade celular e dosagem enzimática.

O número de células e a viabilidade foram realizados da seguinte maneira: as cápsulas coletadas de 3 poços foram centrifugadas a uma baixa rotação (1000 rpm por 3 minutos) e então era adicionado sobre as cápsulas uma solução de citrato de sódio 40 mM.

A solução ficou em contato com as cápsulas por 5 minutos para permitir a destruição das mesmas e as células foram então centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, ressuspendidas em 300 µL PBS e a contagem foi realizada utilizando o teste de azul de trypan sobre uma câmara de Neubauer.

A viabilidade celular foi calculada através da relação entre o número de células vivas pelo número total de células (vivas e mortas) e os resultados expressos em porcentagem (tabela 2).

Tabela 2 – Número de células e a viabilidade celular durante 4 semanas

Semana	Número de células por mL	Viabilidade Celular
1 ^a	6,9 x 10 ⁴	94,90%
2 ^a	9,6 x 10 ⁴	94,40%
3 ^a	1,5 x 10 ⁵	91,23%
4 ^a	2,6 x 10 ⁵	93,43%

Através de outros estudos desenvolvidos no nosso laboratório, foi observado que a enzima beta-galactosidase (β -gal) era secretada em quantidades mensuráveis pelas células BHK, sendo, portanto, a enzima de escolha para a verificação de difusão protéica.

A verificação da atividade enzimática no meio de cultura foi realizada ao final de cada semana por espectroscopia de fluorescência utilizando o substrato artificial 4-metil-umbeliferil-galactosídeo (4-MUG) com a produção da 4-metil-umbiliferona (4-MU), que pode ser detectada fluorimetricamente utilizando os comprimentos de onda 355 nm (excitação) e 460 nm (emissão). Os resultados foram expressos em nmol/h/mL.

Em 1988, Chicheportiche e colaboradores afirmaram que a viabilidade celular é dependente da eficiência da transferência dos nutrientes e oxigênio. A difusão dos nutrientes para dentro da esfera e a difusão da molécula terapêutica para fora da esfera são

umentadas com a redução do tamanho da cápsula (Chicheportiche & Reach, 1988). De acordo com Simpson e colaboradores, num construto bioartificial é vantajoso encapsular as células em esferas de menor diâmetro (800-900 μm) para reduzir a resistência da transferência de massa imposta pelo material encapsulador e também para aumentar a disponibilidade de oxigênio e nutrientes para as células mais internas (Simpson *et al*, 2003). Baseados nestes relatos, optamos por fazer os testes com o fluxo de ar de 10 e 15 L/min, visando a obtenção de esferas com 600 e 400 μm , respectivamente. Com estes diâmetros, obtivemos uma maior proporção de superfície em relação ao volume, o que facilita o transporte de oxigênio e nutrientes.

A concentração de células já foi descrita como outro fator crucial para o sucesso da implantação do construto. O primeiro relato de que a concentração de células influenciaria na sobrevivência e resposta imunológica foi em 1998 por Babensee (Babensee *et al*, 1998). Em 2003, Schneider e colaboradores confirmaram o relato de Babensee (Schneider *et al*, 2003). Estes autores demonstraram que a maior densidade de células resultava numa baixa sobrevivência. As análises morfológicas demonstraram que a resposta imune do hospedeiro contra a cápsula ocorreu devido a liberação de proteínas de estresse, oligonucleossomos, citocinas, entre outros. Assim, as células necrosadas podem induzir a maturação das células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas (Schneider *et al*, 2003; Babensee, 2006). Conforme estudos anteriores publicado por Babensee em 2005, o alginato sozinho não promove a maturação de células dendríticas (Babensee & Paranjpe, 2005). Desta forma, os autores concluíram que a densidade celular e a necrose são parâmetros críticos que determinam a tolerância imunológica de cápsulas contendo células (Schneider *et al*, 2003; Babensee, 2006). Baseado nestes estudos, optamos por realizar os experimentos utilizando baixas concentrações celulares, as quais variaram entre

1×10^5 células e 2×10^5 células. Chegamos nestes valores após verificar o sucesso de experimentos com células encapsuladas em diversas publicações e após contato, por correio eletrônico, com os seguintes pesquisadores: Tetsuro Shingo (Okayama University – Japan), Denis Poncelet (Bioencapsulation Research Group – France), Nicolas Bouche (Swiss Federal Institute of Technology) e Patrick Aebischer (Surgical Research and Gene Therapy Center, Lausanne University Medical School – Switzerland).

Os testes com concentrações celulares diferentes foram úteis para avaliar a influência da matriz extracelular sobre o crescimento das células encapsuladas. Alguns trabalhos descreveram esta influência sobre determinados tipos celulares (Coger *et al*, 1997; Constantinidis *et al*, 1999; Stabler *et al*, 2001; Simpson *et al*, 2004; Simpson *et al*, 2005). De acordo com Simpson e colaboradores, o padrão de crescimento dependente de alginato foi observado em células β TC3 e coincide com o aumento lento da atividade metabólica em alginato com altas taxas de ácido gulurônico, ao contrário do alginato contendo altas taxas de ácido manurônico (Simpson *et al*, 2005). Esses autores sugerem que a resposta de comportamento celular ocorre devido a diferença de maleabilidade da rede de gel de alginato formado.

Em 2006, Li e colaboradores publicaram um trabalho comparando a estabilidade e biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* de dois tipos de microcápsulas de alginato. As microcápsulas de alginato variavam na estrutura do alginato devido a diferentes soluções hipercatiônicas utilizadas para a formação das cápsulas. Foram testados o alginato-poli-lisina-alginato (APA) que gelificou utilizando uma solução hipercatiônica contendo Ca^{2+} e o Ba-alginato-poli-lisina-alginato (ABA) que gelificou utilizando uma solução hipercatiônica contendo Ba^{2+} . Para os testes, os pesquisadores utilizaram três tipos celulares diferentes: células HK-2, células Cos-7 e células HL-60. Conforme os resultados

obtidos por Li e colaboradores, não foi observada diferença na biocompatibilidade destes dois tipos de microcápsulas (APA e ABA) quando implantadas na cavidade peritoneal de ratos. Estes autores também constataram que a microencapsulação não afeta a proliferação celular ou o aumento da quantidade de células Cos-7 e HK-2. A única diferença observada foi a resistência mecânica que era maior nas cápsulas de ABA do que nas de APA (Li *et al*, 2006).

De acordo com os resultados obtidos nos nossos testes, o alginato de sódio utilizado, com viscosidade de 2% (Sigma®), não prejudica o crescimento nem a sobrevivência das células BHK nas cápsulas utilizando concentrações de 1×10^5 e 2×10^5 células. As duas concentrações testadas não apresentaram diferenças quanto a sobrevivência nem ao crescimento celular. As células BHK se proliferam bem nesta estrutura maleável, elástica formada pelo alginato de sódio.

Alguns estudos utilizando concentrações maiores já foram realizados por outros grupos de pesquisa. Keshaw e colaboradores utilizaram uma concentração de 1×10^6 células (fibroblastos) encapsuladas em alginato de sódio com vidro bioativo e verificaram boa sobrevivência por 17 dias, apesar da ocorrência de uma redução do número de células viáveis a partir do 6º dia. Neste trabalho, os autores salientaram a necessidade de estudos em longo prazo para caracterizar melhor a sobrevivência celular nestas cápsulas (Keshaw *et al*, 2005). Outro estudo utilizando uma concentração maior de células foi descrito por Ross e colaboradores. A pesquisa foi realizada *in vitro* e *in vivo*. A concentração utilizada foi de 5×10^7 células (fibroblastos), em alginato. Aos 7 dias de experimento *in vitro*, a viabilidade constatada foi de 94%, em 28 dias foi de 63% e em 56 dias foi de 38%. Entretanto, no experimento *in vivo*, a viabilidade observada no 56º dia foi de 65% (Ross *et al*, 2000). Apesar do experimento *in vivo* ter demonstrado uma melhor viabilidade celular,

podemos comparar o resultado *in vitro* destes autores com o nosso experimento. A viabilidade observada por eles, utilizando uma maior concentração de células (5×10^7) aos 28 dias foi de 63%, um resultado bem menor do que o observado em nosso experimento (93,43% no 28º dia) utilizando uma concentração menor de células (1×10^5).

Como a verificação da atividade enzimática no meio de cultura foi realizada ao final de cada semana, constatamos uma crescente atividade enzimática ao longo das semanas. A média dos valores de atividade de β -galactosidase foi de 0,599 nmol/h/mL em 7 dias, 0,704 nmol/h/mL em 14 dias, 1,726 nmol/h/mL em 21 dias e 2,774 nmol/h/mL em 28 dias. Este aumento da atividade foi proporcional ao aumento do número de células. Portanto, para a enzima β -galactosidase, o alginato não foi uma barreira na difusão protéica. No caso da utilização de uma outra enzima, outros estudos de difusão deverão ser realizados, visto que a difusão é dependente do tamanho e da forma da proteína. Quanto maior for a proteína, maior será a resistência à difusão.

A difusão protéica também pode ser controlada modificando a rigidez do alginato. Conforme Kim e colaboradores, o alginato pode funcionar como um sistema de liberação de drogas multifuncional e o controle da liberação pode ser realizado usando apenas a rigidez das esferas de alginato. No trabalho publicado por estes autores em 2005, os resultados demonstraram que as cápsulas contendo L-fenilalanina (modelo de droga peptídica) podem ter a taxa de liberação controlada variando apenas a rigidez das camadas de alginato; quanto maior a rigidez, mais lentamente será a difusão (Kim *et al.*, 2005).

Um processo semelhante para o controle de liberação de drogas, publicado por Hurteaux e colaboradores, é a utilização de uma membrana de propileno glicol alginato (PGA) envolvendo a esfera de alginato de sódio. Utilizando esta metodologia, os autores conseguiram uma taxa de liberação de soro-albumina humana oito vezes menor que a

esfera de alginato sem a membrana de PGA (Hurteaux *et al*, 2005). Este dado é muito importante não apenas para a liberação mais lenta de drogas, mas também quando houver uma necessidade de microcápsulas com uma resistência mecânica ou química maior. Experimentos testando a resistência mecânica e/ou química são bastante explorados por diversos autores (Dusseault *et al*, 2005; Keshawet *al*, 2005).

Os resultados *in vitro* de nosso trabalho demonstram claramente que o microisolamento de células BHK em alginato de sódio provê um ambiente compatível com a manutenção de células vivas e difusão de moléculas protéicas. Este dado é semelhante aos resultados obtidos por Wang e colaboradores em 2005. Estes pesquisadores publicaram um trabalho onde encapsularam células tronco embrionárias em microcápsulas de alginato. Eles verificaram que estas células tronco embrionárias mantinham a característica de células multipotentes, mesmo quando mantidas em cultura por um tempo prolongado (22 dias). Os autores concluíram que as microcápsulas de alginato proporcionam um microambiente apropriado que promoveu a manutenção das células tronco embrionárias, preservando a sua característica multipotente. Além disto, o microambiente desempenha um importante papel no processo de proliferação e diferenciação das células tronco embrionárias (Wang *et al*, 2005).

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O objetivo geral do trabalho foi alcançado, aperfeiçoamos a metodologia de encapsulamento de células em alginato de sódio utilizando equipamentos disponíveis no laboratório, através de um mecanismo confiável e reprodutível.

Conforme os objetivos específicos do trabalho, obtivemos:

- Cápsulas com diâmetro inferior a 1 mm;
- As esferas obtidas possuíam tamanho e formas regulares;
- A viabilidade das células dentro das cápsulas de alginato de sódio nos mostrou que o alginato não é tóxico para as células BHK e que a concentração celular utilizada foi adequada, visto que o número de células cresceu ao longo das 4 semanas do experimento;
- A atividade enzimática medida no meio de cultura acompanhou o crescimento celular, mostrando que a enzima β -galactosidase consegue difundir pela esfera de alginato de sódio.

Estes resultados *in vitro* demonstram claramente que o microisolamento de células BHK em alginato de sódio, utilizando este simples mecanismo desenvolvido para o encapsulamento das células, provê um ambiente compatível com a manutenção de células vivas e difusão de moléculas protéicas.

Além dos objetivos alcançados, ainda verificamos que o mecanismo têm potencial para gerar cápsulas de diversos tamanhos (desde 0,4 a 1,15 milímetros) que podem ser utilizadas conforme as diferentes necessidades. Conforme a concentração de alginato utilizado, podemos obter esferas mais ou menos densas, gerando uma liberação de fármaco

ou proteína de forma mais lenta ou mais rápida, respectivamente. Estes dados vêm a somar com todo o potencial deste mecanismo desenvolvido.

O mecanismo de microencapsulação de células em alginato de sódio desenvolvido neste trabalho poderá ser muito útil para diversos pesquisadores de países em desenvolvimento como o Brasil, visto que o custo é extremamente baixo quando comparado com os equipamentos disponíveis no mercado. Este mecanismo pode ser utilizado para o avanço nas pesquisas que utilizam terapia celular, terapia gênica, liberação de enzimas, liberação de medicamentos, entre outros.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebischer P, Tresco PA, Winn SR, Greene LA, Jaeger CB (1991a) Long-term cross-species brain transplantation of a polymer-encapsulated dopamine-secreting cell line. *Exp. Neurol.* 111: 269-275.
- Aebischer P, Tresco PA, Sagen J, Winn SR (1991b) Transplantation of microencapsulated bovine chromaffin cells reduces lesion-induced rotational asymmetry in rats. *Brain Res.* 560: 43-49.
- Babensee JE, Anderson JM, McIntire LV, Mikos AG (1998) Host response to tissue engineered devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 33: 111-139.
- Babensee JE, Paranjpe A (2005) Differential levels of dendritic cell maturation on different biomaterials used in combination products. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 74: 503-510.
- Babensee JE (2006) The role players in the drama of anti-biomaterial immunity: the macrophage, the dendritic cell, the B cell and the T cell. Panel Discussion, durante o Society For Biomaterials Meeting, Pittsburgh, EUA, 27 de abril de 2006.
- Bachoud-Levi AC, Deglon N, Nguyen JP, Bloch J, Bourdet C, Winkel L, Remy P, Goddard M, Lefaucheur JP, Brugieres P, Baudic S, Cesaro P, Peschanski M, Aebischer P (2000) Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulate BHK cell line engineered to secrete human CNTF. *Hum. Gene Ther.* 10;11: 1723-1732.
- Bertulani, C A "Ensino de Física a Distância".
<http://www.if.ufrj.br/teaching/fis2/hidrodinamica/viscosidade.html> (03 de fevereiro de 2005).
- Bloch J, Bachoud-Levi AC, Deglon N, Lefaucheur JP, Winkel L, Palfi S, Nguyen JP, Bourdet C, Gaura V, Remy P, Brugieres P, Boisse MF, Baudic S, Cesaro P, Hantraye P, Aebischer P, Peschanski M (2004) Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum. Gene Ther.* 15: 968-975.
- Braccini I, Perez S (2001) Molecular basis of C (2+) – induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. *Biomacromolecules* 2: 1089-1096
- Bruni S, Chang TMS (1989) Hepatocytes immobilized by microencapsulation in artificial cells: effects on hyperbilirubemia in Gunn rats. *Biomater. Artif. Cells, Artif. Organs* 17: 403-411.
- Cai Z, Shi Z, Sherman M, Sun AM (1989) Development and evaluation of a system of microencapsulation of primary rat hepatocytes. *Hepatology* 10: 343-357.
- Chang TMS (1964) Semipermeable microcapsules. *Science* 146: 524-525.
- Chicheportiche D, Reach G (1988) In vitro kinetics of insulin release by microencapsulated rat islets: effect of size of microcapsules. *Diabetologia* 31: 54-57.
- Coger R, Toner M, Moghe P, Ezzel R, Yarmush ML (1997) Hepatocyte aggregation and reorganization of EHS matrix gel. *Tissue Eng.* 3: 375-390.
- Constantinidis I, Sambanis A (1995) Towards the development of artificial endocrine tissues: ³¹P NMR spectroscopic studies of immunoisolated, insulin-secreting AtT-20 cells. *Biotechnol. Bioeng.* 47: 431-443.
- Constantinidis I, Rask I, Long Jr RC, Sambanis A (1999) Effects of alginate composition on the metabolic, secretory, and growth characteristics of entrapped β TC3 mouse insulinoma cells. *Biomaterials* 20: 2019-2027.

- De Vos P, de Haan B, Wolters GHJ, van Schilfgaarde R (1996) Factors influencing the adequacy of microencapsulation of rat pancreatic islets. *Transplantation* 62: 888-893.
- Dégion N (2003). Nervous System Gene Therapy. Panel Discussion, durante o 11th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Edimburgh, UK, 14 a 17 de novembro de 2003.
- Dixit V, Gitnick G (1995) Transplantation of microencapsulated hepatocytes for liver function replacement" *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* 7: 343-357.
- Dornish M (2006) Alginate Technology Workshop. Durante o Society For Biomaterials Meeting, Pittsburgh, EUA, 26 de abril de 2006; apresentação cedida após contato pessoal com Dr. Michael Dornish.
- Dusseault J, Leblond FA, Robitaille R, Jourdan G, Tessier J, Ménard M, Henley N, Hallé JP (2005) Microencapsulation of living cells in semi-permeable membranes with covalently cross-linked layers. *Biomaterials* 26: 1515-1522.
- Fizman GL, Karara AL, Finocciaro LME, Glikin GC (2002) A laboratory scale device for microencapsulation of genetically engineered cells into alginate beads. *Electronic Journal of Biotechnology* 5: 279-283.
- Fu X-W, Sun AM (1989) Microencapsulated parathyroid cells as a bioartificial parathyroid *Transplantation* 47: 432-435.
- Gao Y, Jiang HC, Xu J, Pan SH, Li YD (2005) Microencapsulating hepatocytes. *Transplant. Proc.* 37: 4589-4593.
- Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC, Thom D (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Lett.* 32: 91-101.
- Hasse C, Schrezenmeier J, Stinner B, Schark C, Wagner PK, Neumann K, Rothmund M (1994) Successful allotransplantation of microencapsulated parathyroid in rats. *World. J. Surg.* 18: 630-634.
- Hurteaux R, Edwards-Lévy F, Laurent-MAquin D, Lévy MC (2005) Coating alginate microspheres with a serum albumin-alginate membrane: application to the encapsulation of a peptide. *Eur. J. Pharm. Sci.* 24: 187-197.
- Janes KA, Calvo P, Alonso MJ (2001) Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv. Drug Delivery Rev.* 47: 83-97.
- Keshaw H, Forbes A, Day RM (2005) Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass. *Biomaterials* 26: 4171-4179.
- Kim YJ, Park HG, Yang YL, Yoon Y, Kim S, Oh E (2005) Multifunctional drug delivery system using starch-alginate beads for controlled release. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 394-397.
- Klock G, Frank H, Houben R, Zekorn T, Horcher A, Siebers U, Wohrle M, Federlin K, Zimmermann U (1994) Production of purified alginates suitable for use in immunisolated transplantation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 638-643.
- Lacy PE, Hegre OD, Gerasimidi-Vazeou A, Gentile FT, Dionne KE (1991) Maintenance of normoglycemia in diabetic mice by subcutaneous xenografts of encapsulated islets. *Science* 254: 1782-1784.
- Lanza RP, Chick WL (1997a) Immunoisolation: at a turning point. *Immunol. Today* 18: 135-139.
- Lanza RP, Chick WL (1997b) Transplantation of encapsulated cells and tissues. *Surgery* 121: 1-9.

- Li HB, Jiang H, Wang CY, Duan CM, Ye Y, Su XP, Kong QX, Wu JF, Gou XM (2006) Comparison of two types of alginate microcapsules on stability and biocompatibility *in vitro* and *in vivo*. *Biomed. Mater.* 1: 42-47.
- Liew CV, Chang LW, Ching AL, Heng PW (2006) Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets. *Int. J. Pharm.* 309: 25-37.
- Lim F, Sun AM (1980) Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210: 908-910.
- Martinsen A, Skjak-Braek G, Smidsord O (1989) Alginate as immobilization material: I. Correlations between chemical and physical properties of alginate beads. *Biotechnol. Bioeng.* 33: 79-89.
- Martinsen A, Storro I, Sklak-Braek G (1992) Alginate as immobilization material: III> Difusional properties. *Biotechnol. Bioeng.* 39: 186-194.
- McHugh DJ (1987) Production, Properties and Uses of Alginates. In McHugh D. J. (ed.) "Production and utilization of products from seaweeds". Food & Agriculture Organization of UN, Rome, pp. 58-115.
- Novamatrix: http://www.novamatrix.biz/pdf/040318_132612-6/file/PIB%20-%20Electrostatic%20bead%20generator20040316.pdf (12 de novembro de 2004).
- Papas KK, Long Jr RC, Constantinidis I, Sambanis A (1997) Role of ATP and P_i in the mechanism of insulin secretion in the mouse insulinoma β TC3 cell line. *Biochem. J.* 326: 807-814.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (1996). "Biologia Vegetal". Quinta edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA. 728pp.
- Reach G (1993) Bioartificial pancreas. *Diabetic Med.* 10: 105-109.
- Riley N (2006). *The Navier-Stokes Equations: A Classification of Flows And Exact Solutions*. Cambridge: Cambridge University Press. 196 pp.
- Ross CJD, Ralph M, Chang PL (2000) Somatic Gene Therapy for a Neurodegenerative Disease Using Microencapsulated Recombinant Cells. *Exp. Neurol.* 166: 276-286.
- Sambanis A, Papas KK, Flanders PC, Long Jr RC, Kang H, Constantinidis I (1994) Towards the development of a biortificial pancreas: immunoisolation and NMR monitoring of mouse insulinomas. *Cytotechnology* 15: 351-363.
- Schneider BL, Schwenter F, Pralong WF, Aebischer P (2003) Prevention of the initial host immuno-inflammatory response determines the long-term survival of encapsulated myoblasts genetically engineered for erythropoietin delivery. *Molecular Therapy*, 7: 506-514.
- Silva CM, Ribeiro AJ, Figueiredo IV, Gonçalves AR, Veiga F (2006a) Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. *Int. J. Pharm.* 27: 1-10.
- Silva CM, Ribeiro AJ, Figueiredo M, Ferreira D, Veiga F. (2006b) Microencapsulation of hemoglobin in chitosan-coated alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *AAPS J.* 13: 903-913.
- Simpson NE, Grant SC, Blackband SJ, Constantinidis I (2003) NMR properties os alginate microbeads. *Biomaterials* 24: 4941-4948.
- Simpson NE, Stabler CL, Sambanis A, Constantinidis I (2004) The role of the CaCl₂-gulfuronic acid interaction on alginate encapsulated β TC3 cells. *Biomaterials* 25: 2603-2610.

- Simpson NE, Khkhlova N, Oca-Cossio JA, McFarlane SS, Simpson CP, Constantinidis I (2005) Effects of growth regulation on conditionally-transformed alginate-entrapped insulin secreting cell lines in vitro. *Biomaterials* 26: 4633-4641.
- Simpson NE, Grant SC, Gustavsson L, Peltonen VM, Blackband SJ, Constantinidis I (2006) Biochemical consequences of alginate encapsulation: A NMR study of insulin-secreting cells. *Biomaterials* 27: 2577-2586.
- Skjak-Braek G, Grasdale H, Smidsrod O (1989) Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. *Carbohydr. Polym.* 10: 31-54.
- Smidsrod O (1974) Molecular basis for some physical properties of alginate in gel state. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 57: 263-274.
- Smidsrod O, Skjak-Braek G (1990) Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.* 8: 71-78.
- Soon-Shiong P, Feldman E, Nelson R, Komtebedde J, Smidsrod O, Skjak-Braek G, Espevik T, Heintz R, Lee M (1992) Successful reversal of spontaneous diabetes in dogs by intraperitoneal microencapsulated islets. *Transplantation* 54: 769-774.
- Soon-Shiong P, Feldman E, Nelson R, Heintz R, Yao Q, Yao Z, Zheng T, Merideth N, Skjak-Braek G, Espervik T, Smidsrod O, Sandford P (1993) Long-term reversal of diabetes by the injection of immunoprotected islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5843-5847.
- Stabler C, Wilks K, Sambanis A, Constantinidis I (2001) The effects of alginate composition on encapsulated β TC3 cells. *Biomaterials* 22: 1301-1310.
- Standford ECC (1883) On Algin, a New Substance Obtained from Some of the Commoner Species of Marine Algae. *American Journal of Pharmacy*, 55.
- Strachan T & Read AP (1999). *Genética Molecular Humana*. 2ª edição. Porto Alegre: Artmed Editora LTDA.: 574pp.
- Sun, AM (1988) Microencapsulation of pancreatic islet cells: a bioartificial endocrine pancreas. *Methods Enzymol.*, 137: 575-580.
- Thu B, Bruheim P, Espevik T, Smidsrod O, Soon-Shiong P, Skjak-Braek G (1996a) Alginate polycation microcapsules. I. Interaction between alginate and polycation. *Biomaterials* 17: 1031-1040.
- Thu B, Bruheim P, Espevik T, Smidsrod O, Soon-Shiong P, Skjak-Braek G (1996b) Alginate polycation microcapsules. II. Some functional properties. *Biomaterials* 17: 1069-1079.
- Wang XL, Wang W, Ma J, Guo X, Yu XJ, Qiu ZW, Ma XJ (2005) Microenvironment effect of APA microcapsule on embryonic stem cell. *Sheng Li Xue Bao* 25; 57: 766-771.
- Weber W, Rinderknecht M, Baba MD, Glutz FN, Aubel D, Fussenegger M (2004) CellMAC: a novel technology for encapsulation of mammalian cells in cellulose sulfate/pDADMAC capsules assembled on a transient alginate/ Ca^{2+} scaffold, *J. Biotechnology* 114: 315-326.
- Widner H (1993) Immunologic aspects of intracerebral CNS tissue transplantation, in Springer ed.: *Restoration of Brain Function by Tissue Transplantation, Basic and Clinical Aspects of Neuroscience*, 5. pp. 63-74.
- Winn SR, Tresco PA, Zielinski B, Greene LA, Jaeger CB, Aebischer P (1991) Behavioral recovery following intrastriatal implantation of microencapsulated PC12 cells. *Exp. Neurol.* 113: 322-329.
- Zurn AD, Henry H, Schlupe M, Aubert V, Winkel L, Eilers B, Bachmann C, Aebischer P (2000) Evaluation of an intrathecal immune response in amyotrophic lateral sclerosis

patients implanted with encapsulated genetically engineered xenogeneic cells. *Cell Transplant.* 9: 471-484.