

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

**ENCAPSULAMENTO DE CÉLULAS MIN-6 COMO SISTEMA DE PRODUÇÃO E
SECREÇÃO DE INSULINA**

Everton Cristian Moraes

Porto Alegre, fevereiro de 2021.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

**ENCAPSULAMENTO DE CÉLULAS MIN-6 COMO SISTEMA DE PRODUÇÃO E
SECREÇÃO DE INSULINA**

Everton Cristian Moraes

Tese realizada sob a orientação do Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos e coorientação do Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Junior, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Materiais.

Tese de Doutorado

Porto Alegre, fevereiro de 2021.

CIP - Catalogação na Publicação

Morais, Everton Cristian
Encapsulamento de Células MIN-6 como Sistema de
Produção e Secreção de Insulina / Everton Cristian
Morais. -- 2021.
93 f.
Orientador: João Henrique Zimnoch dos Santos.

Coorientador: Paulo Ivo Homem de Bittencourt
Junior.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Porto Alegre,
BR-RS, 2021.

1. Encapsulamento de células K-562 e MIN-6. 2.
Terapia celular. 3. Diabetes. I. Zimnoch dos Santos,
João Henrique, orient. II. Homem de Bittencourt
Junior, Paulo Ivo, coorient. III. Título.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos pela orientação em todas as etapas da minha vida acadêmica, pelo acolhimento desde os tempos da iniciação científica quando bati na porta do laboratório.

Ao Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr., por ter respondido ao meu email, ter me aceitado no laboratório (sem me conhecer) e permitido que o Fiscel fosse minha segunda casa por um bom tempo.

Aos colegas do laboratório K-112 (ex-K-106), especialmente à Sílvia, à Cristiane e à Jussânia, pelos vários auxílios ao longo da pesquisa.

Aos colegas do Fiscel, Inês, Helena, Marcela, Rossana, Rita, Carlos e Jorge, pela amizade e pelos vários momentos de alegria pelos quais passamos juntos.

À Inês pelo apoio e incentivo ao longo desses anos.

A Cristiane, que me ensinou a trabalhar na sala de cultura de células e que me inspira como profissional.

À Heleninha, minha mestra imediata no laboratório, por todos os ensinamentos teóricos e práticos sobre cultura de células, e pela disposição em estar sempre pronta a ajudar.

Ao LNLS pelas análises de SAXS.

À CAPES pela bolsa.

À minha mãe pelo amor e carinho, bem como pela compreensão quando o doutorado ficava em primeiro plano.

Ao meu pai, que já nos deixou há alguns anos, de quem herdei qualidades como honestidade; a saudade deixada, contudo, ainda não consigo administrar.

Às minhas irmãs Mêmora e Gabriela, por todo apoio.

Aos meus sobrinhos amados Arthur, Isabella e Gustavo, a quem dedico essa tese.

Sumário

Resumo	
Abstract	
Índice de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Esquemas	
Lista de Abreviaturas	
1. Introdução.....	4
2. Revisão Bibliográfica.....	8
2.1. Principais Materiais de Encapsulamento Celular.....	8
2.1.1. Alginato de Sódio.....	8
2.1.2. Quitosana.....	9
2.1.3. Agarose.....	10
2.1.4. Polietilenoglicol (PEG).....	10
2.1.5. Colágeno.....	11
2.1.6. Celulose.....	11
2.2. Células Encapsuladas.....	12
3. Objetivos.....	22
3.1. Objetivo Geral.....	22
3.2. Objetivos Específicos.....	22
4. Parte Experimental.....	23
4.1. Materiais e Reagentes.....	23
4.2. Procedimentos de Preparação e Avaliação dos Hidrogéis.....	24
4.3. Cultivo das Células.....	24
4.4. Encapsulamento Celular.....	25
4.4.1. Encapsulamento das Células K-562 e MIN-6.....	25
4.4.2. Encapsulamento de Eritrócitos.....	26
4.5. Caracterização dos Materiais.....	27
4.5.1. Análise Textural e Morfológica.....	27
4.5.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).....	27
4.5.1.2. Espalhamento de Raios X em Baixo Ângulo (SAXS).....	27
4.5.1.3. Dispersão de Luz Dinâmica (DLS).....	27
4.5.1.4. Potencial Zeta.....	28

4.5.2. Análise Estrutural.....	28
4.5.2.1. Espectroscopia de Transmissão no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	28
4.6. Eficiência do Encapsulamento.....	28
4.6.1. Determinação da Eficiência do Encapsulamento.....	28
4.6.2. Viabilidade Celular.....	30
4.6.2.1. Ensaio com <i>Trypan Blue</i>	30
4.6.2.2. Ensaio com MTT.....	30
4.7. Diferenciação Eritroide das Células K-562.....	30
4.7.1. Coleta de Sangue (Projeto Comitê de Ética nº 33445).....	31
4.7.2. Determinação Espectrofotométrica de Hemoglobina de Eritrócitos.....	31
4.7.2.1. Método Drabkin Modificado.....	31
4.7.2.2. Método da Óxido Nítrico Sintase.....	32
4.7.3. Determinação Espectrofotométrica de Hemoglobina das Células K-562.....	32
4.8. Secreção de Insulina.....	33
4.9. Ensaio de Desintegração dos Hidrogéis com Células MIN-6.....	33
4.10. Análise Estatística.....	33
5. Resultados e Discussão.....	34
5.1. Encapsulamento das Células K-562.....	34
5.1.1. Estudo do Processo de Encapsulamento das Células K-562.....	34
5.1.2. Determinação da Eficiência de Encapsulamento das Células K-562.....	36
5.1.3. Análise Textural e Morfológica.....	37
5.1.3.1. Natureza das Matrizes.....	37
5.1.4. Análise Estrutural.....	43
5.1.5. Estudos de Viabilidade e Diferenciação Celular.....	45
5.1.5.1. Ensaio com <i>Trypan Blue</i>	46
5.1.5.2. Ensaio com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).....	47
5.1.5.3. Diferenciação Eritroide.....	49
5.1.6. Ensaio de Desintegração dos Hidrogéis com Células K-562.....	54
5.2. Encapsulamento das Células MIN-6.....	56
5.2.1. Estudo do Processo de Encapsulamento das Células MIN-6.....	56
5.2.2. Determinação da Eficiência de Encapsulamento das Células MIN-6.....	58

5.2.3. Análise Textural e Morfológica.....	59
5.2.3.1. Natureza das Matrizes.....	59
5.2.4. Análise Estrutural.....	62
5.2.5. Estudos de Viabilidade Celular.....	66
5.2.5.1. Ensaio com <i>Trypan Blue</i>	67
5.2.5.2. Ensaio com MTT.....	68
5.2.6. Secreção de Insulina.....	69
5.2.7. Ensaio de Desintegração dos Hidrogéis com Células MIN-6.....	70
6. Capítulo IV - CONCLUSÕES.....	74
7. REFERÊNCIAS.....	76

Lista de Figuras

Figura 1. Viabilidade celular pós-encapsulamento. Microscopia com contraste de fase durante coloração com *Trypan blue*. (a) Células K-562, ampliação 40X; (b) células K-562 encapsuladas em alginato 3 %, ampliação 40X; (c) cápsulas de alginato 3 %/ quitosana 0,4 % com células K-562, ampliação 40X; (d) células viáveis com células K-562 em alginato 3 %/quitosana 0,4 %, ampliação 400X; (inserção mostra a mesma célula em detalhes) no filtro de interferência. Células viáveis (brilhantes) e mortas (azul opaco) são indicadas com setas. As barras de escala indicam o tamanho real nas ampliações originais.

Figura 2. Aspecto morfológico das diferentes preparações de cápsulas por microscopia eletrônica de varredura. (a) ALG 1 %, (b) ALG 1,5 %, (c) ALG 2 % e (d) ALG 3 %.

Figura 3. Curvas de espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS) plotadas como $I \times q$. (a) ALG 3 % e (b) ALG 3 %/QUI 0,4 %.

Figura 4. Espectros de FTIR. (a) Quitosana, alginato de sódio e ALG 3 %/QUI 0,4 %; (b) ALG 3 %/SIL e alginato de sódio.

Figura 5. Porcentagem de células K-562 após encapsulamento. Para as comparações entre grupos por ANOVA de dois fatores, $p < 0,05$. (a) Diferença de ALG 1 % em relação aos sistemas ALG 2 % e ALG 3 %; (b) diferença de ALG 1,5 % em relação às matrizes ALG 2 % e ALG 3 %; (c) diferença entre ALG 3 %/SIL e os sistemas ALG 2 % e ALG 3 % e (d) diferença entre ALG 3 %/QUI 0,4 % e as matrizes ALG 2 % e ALG 3 %.

Figura 6. Curvas de viabilidade do ensaio MTT. Células livres e encapsuladas: (a) ALG 1 %, (b) ALG 1,5 %, (c) ALG 2 %, (d) ALG 3 %, (e) ALG 3 %/QUI 0,4 % e (f) ALG 3 %/SIL.

Figura 7. Diferenciação fisiológica de células K-562 com hemina. Microscopia de contraste com interferência diferencial de células K-562 diferenciadas com hemina após encapsulamento. (a) Células K-562 sem hemina, (b) células K-562 após 48 horas de tratamento com hemina 80 μM , (c) células K-562 em alginato 2 % após 48 horas de tratamento com hemina 600 μM , (d) células K-562 em ALG 3 %/QUI 0,4 % após 48 horas de tratamento com hemina 600 μM e (e) células K-562 em ALG 3 %/SIL após 48 horas de tratamento com hemina 600 μM . As barras de escala incam as ampliações originais.

Figura 8. Curvas de desintegração dos sistemas durante 24 horas. (a) ALG 1 %, (b) ALG 1,5 %, (c) ALG 2 %, (d) ALG 3 %, (e) ALG 3 %/QUI 0,4 % e (e) ALG 3 %/SIL.

Figura 9. Viabilidade celular pós-encapsulamento. Microscopia com contraste de fase durante coloração com *Trypan blue*. (a) Células MIN-6 encapsuladas em ALG 2 %, ampliação 40X; (b) células MIN-6 encapsuladas em ALG 2 %/AGA 1 %, ampliação 40X; (c) células MIN-6

encapsuladas em ALG 2 %/AMI 1 %, ampliação 40X; (d) células MIN-6 encapsuladas em ALG 2 %/CEL 1 %, ampliação 40X; (e) células MIN-6 encapsuladas em ALG 2 %/GEL 1 %, ampliação 40X; (f) células MIN-6 encapsuladas em ALG 2 %/GEL 1 %/PEG 5 mg/mL, ampliação 40X; (g) células MIN-6 encapsuladas em ALG 2 %/GLI 1 %, ampliação 40X; (h) células MIN-6 encapsuladas em ALG 2 %/QUI 0,4 %, ampliação 40X; (i) células MIN-6 encapsuladas em ALG 2 %/QUI 0,4 %/SIL ampliação 40X. Células viáveis (brilhantes) são indicadas com setas. As barras de escala indicam o tamanho real nas ampliações originais.

Figure 10. Espectros de FTIR. (a) ALGGELPEG, (b) gelatina, (c) PEG e (d) alginato.

Figura 11. Ensaio com *Trypan Blue*. Comparação da viabilidade dos sistemas nos diferentes tempos.

Figura 12. Ensaio com MTT. Comparação da viabilidade celular de cada sistema em relação ao tempo.

Figura 13. Concentração de insulina das diversas combinações de células MIN-6 encapsuladas.

As diferenças foram comparadas com ANOVA unidirecional e os valores de P são mostrados.

a) Para a diferença entre ALG e ALGCEL ($P = 0,0158$); b) para a diferença entre ALG e ALGGLI ($P = 0,6227$); c) para a diferença entre ALGQUII e ALGQUISIL ($P < 0,0001$).

Figura 14. Curvas de desintegração dos sistemas ao longo de 24 horas. (a) ALG, (b) ALGAGA, (c) ALGCEL, (d) ALGQUI, (e) ALGQUISIL, (f) ALGGEL, (g) ALGGELPEG, (h) ALGGLI e (i) ALGAMI.

Figura 15. Dendograma dos casos de sistemas investigados.

Lista de Esquemas

Esquema 1. Representação esquemática da interação entre as cadeias de alginato e o íon divalente Ca^{2+} . Adaptado da referência 22.

Esquema 2. Estrutura da quitosana.

Esquema 3. Estrutura da agarose.

Esquema 4. Estrutura do polietilenoglicol a partir de unidades etilenoglicol.

Esquema 5. Estrutura dos principais aminoácidos do colágeno: glicina, prolina e hidroxiprolina.

Esquema 6. Estrutura da celulose.

Esquema 7. Etapas de síntese, caracterização e viabilidade celular dos hidrogéis com células K-562 e dos hidrogéis com células MIN-6.

Esquema 8. (I) (a), (b) e (c) Processo de síntese das cápsulas de alginato (1 %, 1,5 %, 2 % e 3 %).

Esquema 9. Apresentação e modo de contagem das células na câmara de Neubauer. Disponível em: https://www.google.com.br/search?q=c%C3%A2mara+de+neubauer+desenho&hl=ptBR&gbv=2&prmd=ivns&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjQ04e9jaXhAhWzI7kGHX1dBy8Q_AUIBQ. Acessado em 29/03/2019.

Esquema 10. Ensaio de diferenciação eritroide das células K-562.

Esquema 11. Reações de (a) hidrólise e (b) polimerização.

Esquema 12. (I) (a) Dissociação do grupo COO do alginato e protonação do grupo NH_2 da quitosana em meio ácido. (I) (b) Reação entre o grupo aniônico do alginato e o grupo catiônico da quitosana. (II) (a) Representação esquemática da ligação alginato/íons Ca^{2+} e (II) (b) do complexo iônico alginato/quitosana.

Esquema 13. Encapsulamento de células K-562 a partir da interação entre o grupo carboxila do alginato e o grupo amino da quitosana.

Esquema 14. Possíveis interações entre alginato e matrizes de funcionalização.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Aplicações de células encapsuladas em matrizes de alginato de sódio.

Tabela 2. Aplicações do encapsulamento de células em agarose.

Tabela 3. Aplicações do encapsulamento celular em matrizes à base de colágeno.

Tabela 4. Encapsulamento de células em PEG e aplicações terapêuticas.

Tabela 5. Encapsulamento de ilhotas pancreáticas e células beta para o tratamento do diabetes melito.

Tabela 6. Funcionalização das matrizes de alginato com diferentes materiais.

Tabela 7. Eficiência de encapsulamento dos sistemas ($n = 3$).

Tabela 8. Dados de tamanho médio e potencial zeta das partículas.

Tabela 9. Raio de giro (R_g) e declividade (P) das curvas correspondentes aos sistemas.

Tabela 10. Principais bandas de FTIR de quitosana e alginato. Resolução 4 cm^{-1} .

Tabela 11. Determinação de hemoglobina de eritrócitos encapsulados (Método Drabkin).

Tabela 12. Determinação de hemoglobina de eritrócitos encapsulados (Método da óxido nítrico sintase).

Tabela 13. Concentração de hemoglobina e percentual de células benzidina-positivas nos diferentes sistemas de encapsulamento.

Tabela 14. Valores percentuais da eficiência do encapsulamento dos sistemas.

Tabela 15. Tamanho médio da partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta.

Tabela 16. Principais bandas de FTIR das matrizes de encapsulamento 4 cm^{-1} .

Tabela 17. Principais deslocamentos das bandas do alginato nos sistemas.

Lista de Abreviaturas

DLS - Dispersão de Luz Dinâmica

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

FT-IR - Espectroscopia de Transmissão no Infravermelho com Transformada de Fourier

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

PEG - Polietilenoglicol

PLL - Poli-L-lisina

PLO - Poli-L-ornitina

RGD - ácido arginina-glicina aspártico

SAXS - Espalhamento de Raios X em Baixo Ângulo

SEM - Microscopia Eletrônica de Varredura

TEOS - Tetraetoxissilano

Resumo

A substituição das ilhotas pancreáticas disfuncionais de Langerhans é o último recurso terapêutico para muitos pacientes com diabetes melito tipo 1 com controle metabólico instável. O transplante de ilhotas pancreáticas cadavéricas, via perfusão pela veia porta, ganhou considerável atenção como opção de tratamento terapêutico avançado, com potencial de reestabelecer naturalmente a produção regulada de insulina. Todavia, é limitado pela disponibilidade de ilhotas funcionais de qualidade aceitável, que geralmente são necessárias para alcançar a independência de insulina. Além disso, o transplante de células requer imunossupressão sistêmica para prevenir a rejeição, o que representa riscos adicionais ao paciente. Nesse sentido, o encapsulamento de células produtoras de insulina em matrizes puras e híbridas de alginato é uma alternativa. Dessa forma, este estudo tem por objetivo investigar as potencialidades e limitações do processo de encapsulamento de células MIN-6, a fim de obter um sistema de produção e secreção de insulina. No presente estudo, células da linhagem eritroleucêmica K-562 foram encapsuladas em alginato de sódio pela técnica de extrusão. Os sistemas produzidos foram constituídos de alginato nas concentrações 1 %, 1,5 %, 2 % e 3 %, como estratégia de avaliação da potencialidade de encapsular células MIN-6, um modelo de linhagem de camundongo secretora de insulina, em matrizes puras e funcionalizadas de alginato. Os sistemas foram constituídos de alginato 2 % combinado com outras matrizes, saber: agarose (ALGAGA), amido (ALGAMI), celulose (ALGCEL), gelatina (ALGGEL), gelatina/polietilenoglicol (ALGELPEG), glicina (ALGGLI), quitosana (ALGQUI) e quitosana/sílica (ALGQUISIL). Os materiais resultantes foram caracterizados por dispersão de luz dinâmica, medições de potencial zeta e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. A degradação do hidrogel também foi avaliada. A fisiologia e a viabilidade celular foram avaliadas pela técnicas de Trypan blue, MTT e capacidade de secreção de insulina. A maioria dos sistemas encapsulados mostrou-se monomodal. O tamanho médio das cápsulas esteve na faixa entre 1060 nm e 4880 nm. As células encapsuladas exibiram taxas de viabilidade e desempenho bioquímico que permitem culturas celulares prolongadas. Em todos os sistemas as células MIN-6 permaneceram viáveis após 24 horas, principalmente ALGAGA, ALGAMI, ALGCEL e ALGELPEG, cuja viabilidade permaneceu acima de 60 %. Todas as matrizes secretaram quantidades fisiológicas de insulina (1 a 11 ng/mL) e apresentaram integridade das cápsulas superior a 90 %, exceto ALGGELPEG. ALGCEL apresentou a maior eficiência de

encapsulamento (85 %). De acordo com o conjunto de resultados aqui discutidos, ALGAGA, ALGCEL e ALGQUI podem ser sistemas promissores para terapia celular.

Abstract

Replacement of dysfunctional pancreatic islets of Langerhans is the last therapeutic resource for many type 1 diabetes mellitus patients with unstable metabolic control. The transplantation of cadaveric pancreatic islets, via perfusion through the portal vein, has gotten considerable attention as an option for advanced therapeutic treatment. It has the potential to restoring the regulation of insulin production in a natural way. However, it is limited by the availability of functional islets of acceptable quality, which are in general necessary to achieve insulin independence. In addition, cell transplantation requires systemic immunosuppression to prevent rejection, which poses additional risks to the patient. In this sense, the encapsulation of insulin-producing cells in pure and hybrid alginate matrices is an alternative. Thus, this study aims to investigate the potential and the limitations of the MIN-6 cells encapsulation process, in order to obtain an insulin production and secretion system. In the present study, human erythroleukemia-derived K-562 cells were encapsulated in sodium alginate by extrusion technique. The produced systems were composed of alginate in 1 %, 1.5 %, 2 % and 3 % concentrations, as a strategy to evaluate the potential of encapsulating MIN-6, a mouse model of insulin-secreting lineage, in bare and functionalized alginate matrices. The systems were composed of 2 % alginate combined with other matrices, namely: agarose (ALGAGA), cellulose (ALGCEL), chitosan (ALGCHI), gelatine (ALGGEL), glycine (ALGGLY), polyethyleneglycol (PEG) (ALGGELPEG), silica (ALGCHISIL) and starch (ALGSTA). The resulting materials were characterized by dynamic laser scattering, zeta potential measurements and Fourier transform infrared spectroscopy. Hydrogel degradation was also evaluated. Cell physiology and viability were assessed by Trypan blue and MTT technique and insulin secretion capacity. Most of the systems were shown to be monomodal. Capsules mean size lay in the range between 1060 nm and 4880 nm. Encapsulated cells exhibited rates of viability and biochemical performance that allow prolonged cell cultures. In all systems, MIN-6 cells remained viable after 24 hours, mainly ALGAGA, ALGAMI, ALGCEL and ALGGELPEG, whose viability remained above 60 %. All matrices secreted physiological insulin amounts (1 to 11 ng/mL) and had capsule integrity greater 90 %, except ALGGELPEG. ALGCEL showed the highest encapsulation efficiency (85 %). According to the results, ALGAGA, ALGCEL and ALGQUI can be systems for cell therapy.

1 – INTRODUÇÃO

A terapia celular é um campo de pesquisa multidisciplinar em que polímeros, biomateriais, química de superfície e engenharia encontram-se com a biologia, a imunologia e a medicina¹. A técnica baseia-se no conceito de imobilização de células em uma matriz cercada por uma membrana semipermeável e biocompatível, protegendo as células da resposta imunológica e permitindo a entrada de nutrientes². Por outro lado, essa membrana funciona também como um suporte para promover a proliferação celular e controlar a liberação de agentes terapêuticos.

O transplante de tecidos e células a partir de doadores vivos e cadavéricos pode representar a única chance terapêutica para alguns pacientes. Por exemplo, a substituição de ilhotas pancreáticas de Langerhans, não saudáveis, é a maneira mais eficaz de restaurar a homeostase da glicose em pacientes com diabetes melito tipo 1, com controle metabólico instável. Nesse sentido, é necessário o estudo de condições ideais para manter ilhotas pancreáticas e células beta em cultura, evitando condições estressantes desfavoráveis até o momento do transplante celular³⁻⁵. Assim, o emprego de células beta encapsuladas⁶ tem sido utilizado como potencial alternativa para a produção de células secretoras de insulina viáveis, em proliferação quando em condições de cultura e em quantidades suficientes às necessárias à eficácia terapêutica.

O material celular encapsulado resultante pode ser injetado, enxertado ou implantado em pacientes. Aplicações da terapia celular referem-se ao encapsulamento de células para tratamento de diversas doenças, como diabetes tipo 1⁶⁻⁸, doenças neurológicas² e doenças hepáticas², além do seu emprego na engenharia tecidual⁸. Alguns estudos empregaram a terapia celular para a produção de cartilagem a partir do encapsulamento de condrócitos em agarose⁹ e células-tronco para reparo ósseo¹⁰. Outros trabalhos encapsularam células beta em matrizes como alginato de sódio⁶ e ilhotas pancreáticas em polietilenoglicol¹¹, para tratamento do diabetes, bem como o encapsulamento de ilhotas pancreáticas em sílica¹² e em alginato/sílica¹³.

Novos exemplos de terapia celular também incluem a fabricação de hidrogéis à base de quitosana, para hospedar células-tronco mesenquimais, de modo a melhorar a regeneração da medula espinhal¹⁴, e o encapsulamento de cardiomioblastos em hidrogéis eletrocondutores, exibindo 98% de viabilidade¹⁵. A produção de materiais com finalidade terapêutica, por sua vez, exige que as matrizes de encapsulamento sejam biocompatíveis com o tipo celular, de modo a obter-se um sistema adaptável às condições fisiológicas e a garantir a viabilidade celular. Além disso, esse sistema deve ser eficiente, capaz de

produzir e liberar um determinado agente terapêutico, constituindo uma alternativa a outras terapias clínicas.

Em relação ao diabetes melito, a hiperglicemia causada pelo déficit do hormônio insulina, secretado pelas células beta pancreáticas ou pela resistência das células à insulina secretada pelo organismo¹⁶, pode ser superada através da terapia celular, por exemplo, encapsulando linhas celulares produtoras de insulina, incluindo HIT¹⁷, MIN-6¹⁸, β TC¹⁹, RIN²⁰ e INS-1²⁰, dentro de matrizes de alginato funcionalizadas. Todas as linhas são capazes de produzir e secretar insulina. A linhagem MIN-6 (provenientes de células de insulinoma de camundongo), por sua vez, revela a capacidade de secreção de insulina estimulada por glicose, semelhante à ilhota pancreática isolada, e tem sido amplamente utilizada como a linhagem celular específica das células β ¹⁸.

O alginato de sódio é uma das matrizes mais estudadas no encapsulamento celular, devido a uma combinação de uma série de características e propriedades, a saber: gelificação adequada, viscosidade em soluções aquosas, aprovação da FDA, disponibilidade, viabilidade econômica e alto nível de biocompatibilidade²¹⁻²⁴. Apesar de a grande maioria dos estudos empregar matrizes puras de alginato de sódio para bioencapsulamento, esse material apresenta a desvantagem de menor estabilidade a longo prazo em solução fisiológica²⁵. Essa limitação, no entanto, pode ser superada pela funcionalização de matrizes de alginato. Muitos métodos têm sido empregados para a preparação de hidrogéis funcionalizados, por exemplo, a reticulação química com agentes como glutaraldeído, genipina e carbodiimida²⁶. Contudo, a toxicidade celular de reticuladores químicos representa uma grande preocupação como matrizes de encapsulamento em terapia celular.

Outra possibilidade de matrizes refere-se ao uso de reticuladores catiônicos, como poli-L-lisina e poli-L-ornitina²⁷. Todavia, esses polímeros precisam ser revestidos com alginato, pois a exposição de seus resíduos leva à adesão de células inflamatórias à superfície da cápsula^{28, 29}, o que, por sua vez, aumenta o tempo de manipulação celular. Assim, uma alternativa apropriada é revestir as cápsulas com biopolímeros, como celulose, colágeno, agarose ou quitosana, bem como com materiais inorgânicos, como sílica. As matrizes à base de quitosana, por exemplo, têm recebido considerável atenção devido à sua biocompatibilidade, não toxicidade e biodegradabilidade. Além disso, seu processo de preparação é bastante simples, consistindo em uma modificação física, na qual o alginato é combinado com compostos orgânicos. Além disso, a sílica é uma matriz inorgânica que pode ser usada para revestir cápsulas de alginato. A presença de sílica

melhora a estabilidade da cápsula, enquanto controla as propriedades de difusão da membrana e permite imobilização e transplante celular eficiente³⁰. No entanto, existem poucos estudos explorando a funcionalização de alginato com sílica no contexto do encapsulamento celular.

Nesse sentido, é necessária uma investigação das matrizes de encapsulamento, de modo a obter informações acerca da influência da natureza e da concentração da matriz sobre a viabilidade e diferenciação de células terapêuticas, bem como da influência da combinação de matrizes sobre a viabilidade celular e liberação de agentes terapêuticos. Por esses motivos, o presente estudo promoveu, inicialmente, a obtenção de um modelo funcional, a partir do encapsulamento de células da linhagem eritroleucêmica K-562. A escolha das células K-562 como modelo deveu-se às características dessas células, a saber: capacidade de robustez e proliferação³¹ além da sua fácil manipulação (por serem linhagens celulares permanentes) que crescem em suspensão. Além disso, as células K-562 possuem baixos custos de manutenção. Essas características permitem o acompanhamento da viabilidade e proliferação celular durante o curso do cultivo celular, permitindo o estudo da influência das matrizes de encapsulamento na função celular e na possível toxicidade. Além disso, as células K-562 apresentam significado clínico, pois podem se diferenciar em células hematopoiéticas sob muitas condições fisiológicas³². Sob condições normais de crescimento, as células K-562 são multipotenciais e exibem padrões eritróide, megacariocítico ou granulocítico³³.

Essas propriedades permitem empregá-las como modelo funcional para investigar a manutenção da viabilidade e diferenciação celular no ambiente de encapsulamento, podendo fornecer informações sobre comportamento das células frente a diferentes matrizes, nas mais diversas aplicações da terapia celular: engenharia tecidual, como exemplo a produção de cartilagem e tecido ósseo, doenças neurológicas e cardíacas, insuficiência hepática, além do tratamento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como diabetes melito.

As doenças crônicas não transmissíveis são um dos maiores problemas de saúde pública do Brasil e do mundo. Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que são responsáveis por 71 % das 57 milhões de mortes ocorridas globalmente em 2016^{34, 35}. No Brasil, as DCNT são igualmente relevantes, tendo sido responsáveis, em 2016, por 74 % do total de mortes, com destaque para diabetes (5 %)³⁶. Em 2019, no conjunto das 27 capitais brasileiras, a frequência do diagnóstico médico para o diabetes melito foi de 7,4 %, sendo maior entre as mulheres (7,8 %) do que entre os homens

(7,1 %) ³⁷. A terapia medicamentosa do diabetes melito é representada, para o tipo I, pela administração de insulina, cujos tipos diferem em termos de início e duração de ação (ultrarrápida, rápida, intermediária e lenta), espécie de origem (humana, suína, bovina ou mistura de bovina/suína) e pureza. Já para o tipo II, o tratamento é realizado à base de fármacos antidiabéticos orais, como hipoglicemiantes, sensibilizadores de insulina e anti-hiperglicemiantes.

Contudo, o tratamento medicamentoso do diabetes melito, sobretudo do tipo I, apresenta desvantagens, como a necessidade de conservação da insulina em ambiente refrigerado, a administração diária e o risco de hipoglicemia associado e de ganho de peso associado. Nesse sentido, a terapia celular pode ser uma alternativa ao tratamento do diabetes melito, a partir do encapsulamento das células MIN-6 em matrizes de alginato combinadas com polissacarídeos naturais, polímeros orgânicos ou inorgânicos.

O escopo da presente tese investiga a viabilidade e a funcionalidade de células MIN-6, encapsuladas em matrizes híbridas de alginato, de forma a constituir sistemas de produção e secreção de insulina. O capítulo de Revisão Bibliográfica aborda as células mais comumente empregadas na terapia celular, bem como os principais materiais utilizados no encapsulamento. Após a explicitação da hipótese e objetivos da presente tese, o Capítulo da Parte Experimental descreve as condições metodológicas em termos do encapsulamento de células K-562 e células MIN-6, dos ensaios de viabilidade e diferenciação celular, bem como das técnicas de caracterização dos materiais. O Capítulo de Discussão e Resultados encontra-se estruturado sob duas partes: encapsulamento das Células K-562 e encapsulamento das Células MIN-6. Finalmente, o último capítulo descreve as principais conclusões obtidas na presente tese.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A terapia celular administração de células direcionadas a locais específicos do organismo, onde exercerão efeitos terapêuticos, foi, primeiramente, considerada como uma plataforma para suprir a falta de órgãos funcionais ou para promover a liberação sustentada de fatores terapêuticos. Com os avanços da engenharia tecidual e da medicina regenerativa, o potencial da terapia celular, por meio do encapsulamento de células, tem aumentado e a sua aplicabilidade ampliada³⁸.

Nesse sentido, os protocolos de terapia celular podem representar uma opção frente à escassez de doadores de órgãos e frente aos problemas relacionados ao reparo de tecidos lesados. Embora haja um número enorme de procedimentos cirúrgicos realizados a cada ano, para substituir ou reconstruir tecidos danificados por doenças crônicas/degenerativas, lesões, malformação congênita e câncer³⁹, há ainda uma grande lacuna entre a demanda de órgãos e tecidos de substituição, e os pacientes que, de fato, são transplantados³⁹. Dessa forma, a terapia celular, por meio do encapsulamento de células, pode ser uma alternativa aos transplantes, bem como a diversas doenças.

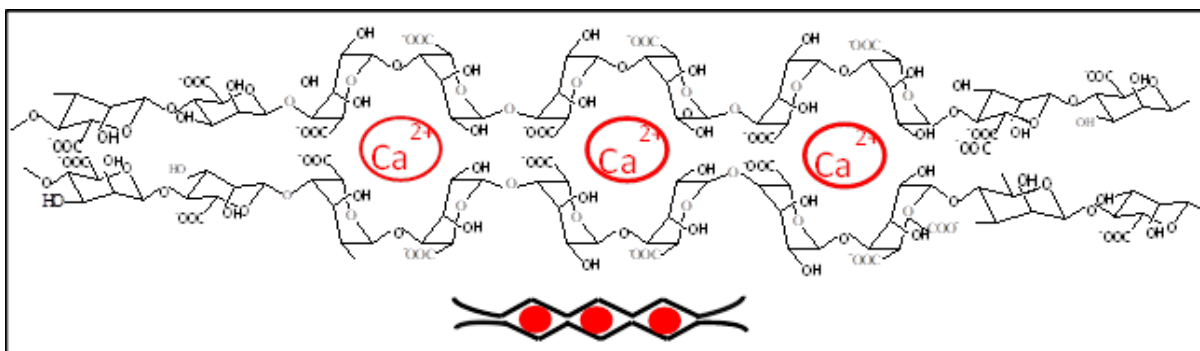
2.1 – PRINCIPAIS MATERIAIS DE ENCAPSULAMENTO CELULAR

Três principais classes de polímeros naturais são utilizados no encapsulamento de células: polissacarídeos, polipeptídeos e polinucleotídeos⁴⁰. Entre essas, os polissacarídeos são os mais comumente empregados⁴⁰. A razão para isso é, provavelmente, o fato de os mesmos permitirem condições brandas de encapsulamento e não interferirem na sobrevivência funcional das células^{41, 42}. Outra razão pertinente é a formação de hidrogéis pela maioria dos polissacarídeos⁴³. Hidrogéis são polímeros que absorvem água sem se dissolver e têm propriedades benéficas para o encapsulamento: eles são flexíveis e estáveis⁴⁴. Dentre os polissacarídeos utilizados destacam-se o alginato de sódio, a agarose, o colágeno, a quitosana, a celulose e o polietilenoglicol, a seguir descritos.

2.1.1 – Alginato de Sódio

O alginato de sódio é um polímero aniônico natural isolado de *Azotobacter vinelandii*, de várias espécies de *Pseudomonas* e de algas⁴⁵. O alginato mais comumente aplicado em processos de encapsulamento celular é aquele obtido a partir de algas marrons^{46, 47}. Trata-se de um polissacarídeo linear em que os resíduos 1,4'-β-D-ácido

manurônico (M) e α -L-ácido gulurônico (G) dispõem-se em diferentes sequências⁴⁰ (Esquema 1). Dois blocos G alinhados lado a lado formam um orifício com dimensão específica capaz de ligar seletivamente íons divalentes⁴⁰. Além dos cátions Ca^{2+} , Sr^{2+} ou Ba^{2+} , outros como Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} também formam géis, porém sua aplicação é evitada, pois podem ser tóxicos às células⁴⁸. A capacidade de formar géis depende exclusivamente dos cátions divalentes⁴⁹. As ligações cruzadas ocorrem por meio da substituição dos íons Na^+ , provenientes das unidades G, com os íons divalentes, resultando numa associação de cadeias que constitui as zonas de junção do modelo “caixa de ovo” (Esquema 1)³⁹. Isso se refere ao fato de a cadeia de unidades de ácido gulurônico ser mostrada como um análogo dimensional de uma caixa de ovo ondulada com interstícios, em que os íons divalentes podem ser coordenados³⁹.

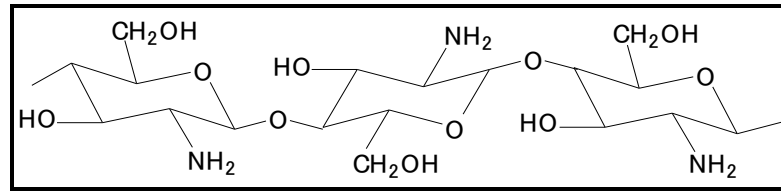


Esquema 1. Representação da interação entre as cadeias de alginato e o íon divalente Ca^{2+} . Adaptado da referência 49.

Os alginatos com maior conteúdo de ácido manurônico são preferidos em aplicações em que se buscam géis mais flexíveis. Já aqueles com maior teor de ácido gulurônico são preferíveis quando uma estrutura rígida é requerida⁴⁰. A formação do gel está associada à afinidade do alginato, sobretudo dos resíduos de ácido gulurônico ao cátion divalente⁵⁰. Os processos sol-gel são usualmente aplicados para produzir cápsulas de alginato. Esse método envolve a adição de uma solução de alginato, contendo as células terapêuticas, a uma solução com cátions divalentes, como Ca^{2+} , Sr^{2+} ou Ba^{2+} .

2.1.2 – Quitosana

A quitosana é um polícatión encontrado em conchas de crustáceos, fungos, insetos, anelídeos e moluscos⁴⁰. O Esquema 2 apresenta a estrutura da quitosana.

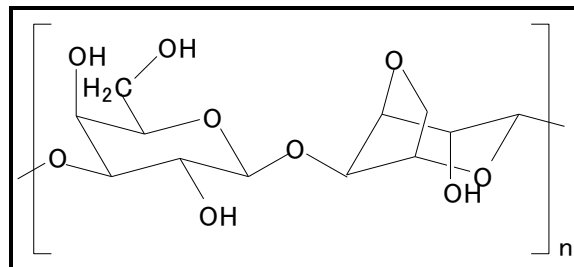


Esquema 2. Estrutura da quitosana.

Esse polissacarídeo é solúvel em soluções ácidas⁴⁹. Ao contrário do alginato e de outros materiais como agarose, a quitosana não tem sido intensivamente testada em aplicações de imunoproteção. Isso ocorre devido ao fato de ela não ser facilmente dissolvida em meios cujo pK seja superior a seis⁵¹. Além disso, por ser um policátion, possui propriedades mucoadesivas e exibe citotoxicidade celular⁵².

2.1.3 – Agarose

A agarose foi a primeira a ser utilizada no encapsulamento celular⁵³. É um polissacarídeo obtido do ágar e apresenta a estrutura abaixo (Esquema 3). A agarose permite o encapsulamento de células sob condições brandas e não interfere na sobrevivência celular⁵⁴. O gel imunoprotetor formado baseia-se em métodos de suspensão-gelificação à temperatura controlada⁴⁰.

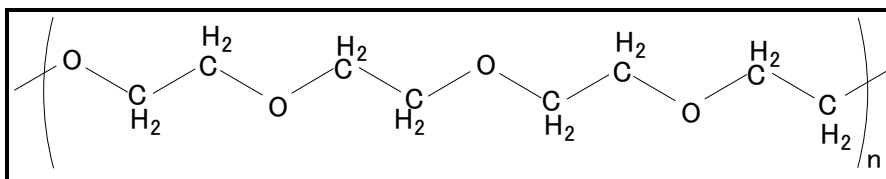


Esquema 3. Estrutura da agarose.

2.1.4 – Polietilenoglicol (PEG)

O polietilenoglicol é um poliéter composto por unidades de etilenoglicol (Esquema 4), que é produzido a partir da interação entre óxido de etileno e água, etilenoglicol ou oligômeros etilenoglicol, em uma reação catalisada por ácidos ou bases⁵⁵. Trata-se de um dos poucos polímeros sintéticos que permite o encapsulamento celular, pois a sua síntese não emprega solventes agressivos: geralmente utiliza água, etilenoglicol ou etanol no processo de síntese. Hidrogéis de polietilenoglicol apresentam vantagens em

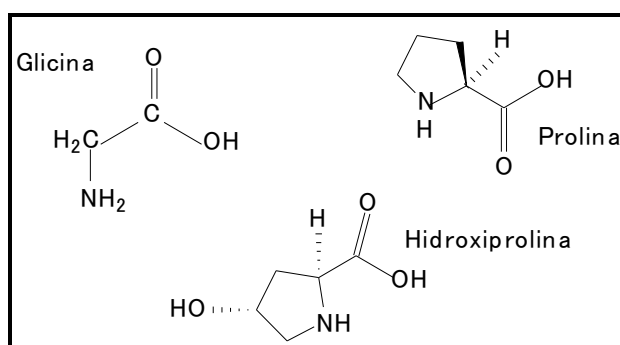
relação a outras moléculas sintéticas que formam hidrogéis: esses têm, por exemplo, elevado conteúdo de água⁴⁰.



Esquema 4. Estrutura do polietilenoglicol a partir de unidades etilenoglicol.

2.1.5 – Colágeno

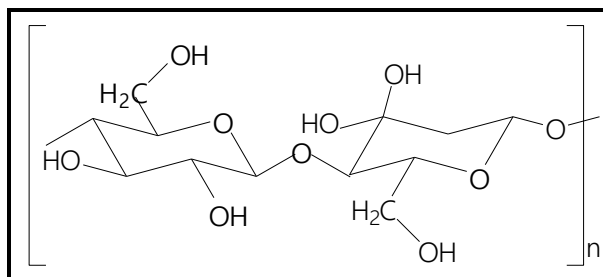
Os hidrogéis de colágeno podem ser preparados em geometrias diferentes⁵⁶. De todos os tipos, o colágeno tipo I é o mais comumente empregado em encapsulamento, por conta da sua abundância e por apresentar menor potencial de reações alérgicas⁴⁰. Sua aplicação como matriz de encapsulamento está limitada, devido às fracas propriedades mecânicas, ao baixo tempo de estabilidade e à dificuldade de controle da permeabilidade⁵⁴. O Esquema 5 mostra os principais aminoácidos do colágeno.



Esquema 5. Estrutura dos principais aminoácidos do colágeno: glicina, prolina e hidroxiprolina.

2.1.6 – Celulose

A celulose é o componente estrutural da parede celular primária de plantas verdes, muitas formas de algas e oomicetos⁵⁷. É um polissacarídeo que consiste em uma cadeia linear de unidades ligadas de D-glicose β (1 \rightarrow 4) (Esquema 6). É biodegradável, porém a degradação da celulose em animais e humanos pode ser limitada, devido à ausência de hidrolase que degrada a ligação β (1 \rightarrow 4) em mamíferos⁵⁷.



Esquema 6. Estrutura da celulose.

2.2 – CÉLULAS ENCAPSULADAS

O alginato é um dos materiais mais empregados para encapsulamento de células⁴⁰. Originalmente, foi introduzido para encapsular ilhotas pancreáticas para tratamento do diabetes⁴¹. Desde então, é aplicado também para encapsular outras células, como células endócrinas e células recombinantes para a liberação de produtos de gene terapêutico⁵⁸, como fator de crescimento e fator de coagulação humano IX^{59, 60}. A Tabela 1 apresenta aplicações de células a partir do seu encapsulamento em matrizes de alginato.

Tabela 1. Aplicações de células encapsuladas em matrizes de alginato de sódio.

Material	Tipo celular	Aplicação	Referência
Alginato	Células-tronco da mucosa olfatória humana	Regeneração de nervos	61
Alginato	Células-tronco mesenquimais	Regeneração óssea	62
Alginato	Células de Leydig	Investigação da viabilidade celular	63
Alginato/laponita	Células-tronco	Regeneração endodôntica	64
Alginato	Células de mamífero	Aplicações biomédicas	65
Alginato	Células do plexo coroide de porco	Tratamento da doença de Parkinson	66
Alginato	Células-tronco mesenquimais	Tratamento da osteoartrite	67
Alginato	Condrócitos (células ATDC5)	Engenharia tecidual (reparo de cartilagem)	68
Alginato	Fibroblastos e células endoteliais de veia umbilical humana	Engenharia tecidual	69
Alginato	Células pré-osteoblásticas (linhagem MC3T3-E1)	Engenharia tecidual	70
Alginato/gelatina	Cardiomioblastos	Tratamento de doenças cardiovasculares	71
Alginato/matacrilato	Fibroblastos	Aplicações de engenharia biomédica	72
Alginato/matriz extracelular	Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano	Osteogênese	10
Alginato/colágeno	Células-tronco pluripotentes	Neurogênese	73
Alginato/gelatina/fibrina	Células HepG2	Engenharia tecidual	74
Alginato/quitosana	Células-tronco mesenquimais da medula óssea	Engenharia tecidual	75
Alginato/gelatina	Condrócitos	Produção de cartilagem	76
Alginato/gelatina/celulose	Células-tronco mesenquimais	Engenharia tecidual	77

De acordo com a Tabela 1, observa-se grande emprego do alginato na engenharia tecidual. A grande maioria dos trabalhos utiliza matrizes puras de alginato para encapsular células-tronco^{61, 62 e 67}, células de Leydig⁶³, células de mamífero⁶⁵, células do plexo coroide de porco⁶⁶, condrocitos⁶⁸, fibroblastos⁶⁹ e células pré-osteoblásticas⁷⁰, visando a aplicações na regeneração de nervos e cartilagem, em osteogênese, no tratamento da doença de Parkinson e da osteoartrite e outras. Poucos trabalhos funcionalizam o alginato para a engenharia tecidual. Exemplos incluem a funcionalização com laponita⁶⁴, gelatina^{71, 76},

matriz extracelular¹⁰, metacrilato⁷², colágeno⁷³, gelatina/fibrina⁷⁴, gelatina/celulose⁷⁷ e quitosana⁷⁵, encapsulando, células-tronco, cardiomioblastos, fibroblastos e condrócitos.

A Tabela 2 mostra os principais tipos celulares encapsulados em agarose.

Tabela 2. Aplicações do encapsulamento de células em agarose.

Material	Tipo celular	Aplicação	Referência
Fibrina – agarose	Condrócitos	Engenharia tecidual	78
Agarose	Condrócitos	Engenharia tecidual	79
Agarose	Células-tronco cardíacas	Terapia de emergência para isquemia cardiopática	80
Agarose	Células de mamíferos	Terapia celular	81
Agarose	Condrócitos	Produção de cartilagem	82
Agarose – PEG	Condrócitos	Engenharia tecidual	83
Agarose – hidroxiapatita	Células endoteliais e fibroblastos	Engenharia tecidual	84
Agarose - celulose	Condrócitos	Engenharia tecidual	85

PEG = polietilenoglicol

Com base na Tabela 2, as principais aplicações do encapsulamento celular em agarose referem-se ao seu emprego na engenharia tecidual, utilizando matrizes puras de agarose. A técnica é utilizada para encapsular células-tronco⁸⁰ e condrócitos^{78, 79 e 82}, produzindo cartilagens e viabilizando o tratamento de problemas cardíacos. A funcionalização da agarose é pouco comum. Alguns estudos integraram PEG e celulose à agarose, para produção de cartilagem a partir de condrócitos^{83, 85}, além de células endoteliais⁸⁴ e fibroblastos⁸⁴ em agarose com hidroxiapatita.

Em relação às matrizes de colágeno, alguns estudos empregaram materiais funcionalizados com quitosana⁸⁷, alginato⁹¹, PEG⁹², fibrina⁹³, fibras de seda⁹⁴ e ácido hialurônico⁹⁷, sendo dirigidos à engenharia tecidual, utilizando células-tronco. Outros trabalhos empregaram matrizes puras de colágeno, encapsulando neurônios⁸⁶, células-tronco^{88 e 98}, condrócitos^{89, 96}, fibroblastos⁹⁰ e cardiomiócitos⁹⁹ para fins de engenharia tecidual. (Tabela 3).

Tabela 3. Aplicações do encapsulamento celular em matrizes à base de colágeno.

Material	Tipo celular	Aplicação	Referência
Colágeno tipo I	Neurônios	Engenharia tecidual neuronal	86
Quitosana/colágeno	Células-tronco mesenquimais humanas	Infarto agudo do miocárdio	87
Colágeno tipo I	Células-tronco de tecido adiposo humano	Osteogênese	88
Colágeno	Condrócitos	Engenharia tecidual	89
Colágeno	Fibroblastos	Engenharia tecidual	90
Colágeno/alginato	Células-tronco mesenquimais humanas	Medicina regenerativa	91
Colágeno/PEG	Células intersticiais valvulares	Osteogênese	92
Colágeno/fibrina	Células-tronco mesenquimais humanas	Engenharia tecidual óssea	93
Fibras de seda – colágeno	Células-tronco mesenquimais humanas	Engenharia tecidual	94
Colágeno tipo I	Células de feocromocitoma de rato (PC12) e células endoteliais da aorta de rato	Aplicações de engenharia tecidual	95
Colágeno tipo I e colágeno tipo II	Condrócitos	Engenharia tecidual (condrogênese)	96
Colágeno – ácido hialurônico	Células-tronco mesenquimais humanas	Engenharia tecidual	97
Colágeno	Células-tronco mesenquimais humanas	Engenharia tecidual (condrogênese)	98
Colágeno	Cardiomiócitos	Engenharia tecidual	99

PEG = polietilenoglicol

A Tabela 4 apresenta o encapsulamento celular com PEG.

Tabela 4. Encapsulamento de células em PEG e aplicações terapêuticas.

Material	Tipo celular	Aplicação	Referência
PEG	Condrócitos	Engenharia tecidual (produção de cartilagem)	100
Alginato/PEG	Células Hela	Sistema de cultivo de células	101
PEG	Células-tronco mesenquimais	Engenharia tecidual	102
PEG	Células-tronco de cordão umbilical humano	Engenharia tecidual (produção de endotélio vascular)	103
PEG – heparina/PEG – ácido hialurônico	Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo	Engenharia tecidual	104
PEG	Células primárias de glândulas salivares	Engenharia tecidual (regeneração de glândulas salivares)	105
PEG	Cardiomioblastos (linhagem PS50P)	Engenharia tecidual (reparo de miocárdio)	106

PEG = polietilenoglicol

De acordo com a Tabela 4, as principais aplicações referem-se ao encapsulamento celular a partir de matrizes puras de PEG, para fins de engenharia tecidual, utilizando, basicamente, os mesmos tipos celulares anteriores (condrócitos¹⁰⁰ e células-tronco^{102, 103}), além de células primárias de glândulas salivares¹⁰⁵ e cardiomioblastos¹⁰⁶. Observam-se matrizes funcionalizadas com alginato, heparina e ácido hialurônico, para encapsulamento, respectivamente, de células Hela¹⁰¹ (sistema de cultivo de células) e células-tronco¹⁰⁴ para a engenharia tecidual. Outros polímeros sintéticos com aplicações biomédicas referem-se a álcool polivinílico, polietersulfona, poliuretano, polipropileno, sulfato de poliestireno sódico, poliacrilato e AN69⁴⁰ (copolímero de acrilonitrila e metalil sulfonato de sódio com alta capacidade de adsorção).

Além de alginato de sódio, agarose, colágeno e celulose, a quitosana é um polímero natural também empregado em aplicações terapêuticas. Contudo, seu uso no encapsulamento de células é restrito. Há dois trabalhos que produziram, respectivamente, microcápsulas à base de sericina – alginato – quitosana e à base de alginato – quitosana galactosilada, para encapsular hepatócitos^{107 e 108}, como alternativa ao tratamento da insuficiência hepática. Outros estudos encapsularam condócitos em matriz de goma gelana com carboximetilquitosana¹⁰⁹, e fibroblastos em quitosana – alginato, contendo nanotubos de haloisita¹¹⁰. Ambos tiveram por objetivo aplicações em engenharia tecidual.

Outros polímeros naturais, como celulose e xantana, têm seu uso na terapia celular. A primeira foi aplicada, combinada com alginato, no encapsulamento de células olfatórias¹¹¹, para tratamento de injúrias da medula espinhal e, puramente, no encapsulamento de células epiteliais citotóxicas^{112, 113}, para tratamento de câncer pancreático^{114, 115}, bem como para encapsular linhagens celulares produtoras de insulina (HIT-T15)¹¹⁶, além de células renais embrionárias e células de hibridoma^{117, 118}. Já a xantana foi utilizada para encapsular condrócitos.

A técnica de encapsulamento, por sua vez, não se limita a matrizes naturais. É possível a conjugação de materiais de natureza inorgânica com sistemas biológicos^{12 e 13}. Aplicações da técnica sol-gel foram utilizadas na produção de sistemas, contendo folículos ovarianos¹¹⁹, para produção e secreção de hormônios, e para engenharia tecidual com fibroblastos em matrizes de sílica/álcool polivinílico¹²⁰.

Conforme anteriormente apresentado, matrizes de alginato são as mais empregadas na técnica de encapsulamento. Contudo, há a desvantagem de o mesmo ser instável em condições fisiológicas, o que acarreta o risco de rápida desintegração da matriz, deixando as células vulneráveis ao sistema imunológico e inviabilizando a cinética de liberação de agentes terapêuticos. A maioria dos estudos explora o encapsulamento de células-tronco, condrócitos e fibroblastos nessas matrizes, para fins de engenharia tecidual.

Dentre as doenças crônicas, o diabetes melito, caracterizado por um nível elevado de glicose sanguínea, devido à produção inadequada de insulina e/ou à resistência à insulina, afeta 415 milhões de pessoas em todo o mundo (estima-se um aumento para 642 milhões em 2040)¹²¹. Nesse sentido, outras opções de tratamento, além da administração diária de insulina e hipoglicemiantes, são relevantes. Dessa forma, o transplante de ilhotas pancreáticas cadavéricas, via perfusão pela veia porta, ganhou considerável atenção como opção de tratamento terapêutico avançado, com potencial de reestabelecer naturalmente a produção regulada de insulina. Todavia, é limitado pela disponibilidade de ilhotas funcionais de qualidade aceitável, que geralmente são necessárias para alcançar a independência de insulina. Além disso, o transplante de células requer imunossupressão sistêmica para prevenir a rejeição, o que representa riscos adicionais ao paciente.

Por essas razões, a terapia celular, por meio do encapsulamento de ilhotas pancreáticas ou células beta, pode ser uma alternativa ao tratamento do diabetes melito. A Tabela 5 apresenta os materiais empregados no encapsulamento de ilhotas pancreáticas.

Tabela 5. Encapsulamento de ilhotas pancreáticas e células beta para o tratamento do diabetes melito.

Material	Tipo celular	Aplicação	Referência
Colágeno/alginato	Ilhotas pancreáticas	Tratamento do diabetes tipo 1	122
Ácido hialurônico/ Alginato	Células de rato Ins 1E	Tratamento do diabetes tipo 1	123
Pectina/alginato	Ilhotas pancreáticas	Tratamento do diabetes tipo 1	124
Alginato – fibrina	Ilhotas pancreáticas de porco	Tratamento do diabetes tipo 1	125
Agarose	Ilhotas pancreáticas de porco	Tratamento do diabetes	126
Agarose	Ilhotas pancreáticas	Tratamento do diabetes	127
Alginato	Ilhotas pancreáticas	Tratamento do diabetes	128
PEG	Células- β pancreáticas MIN-6	Tratamento do diabetes	129
Alginato	Ilhotas pancreáticas	Tratamento do diabetes tipo 1	130
PEG – heparina	Ilhotas pancreáticas com células-tronco mesenquimais	Tratamento do diabetes tipo 1	131

PEG = polietilenoglicol

Na literatura, a terapia celular para o tratamento do diabetes refere-se ao encapsulamento de ilhotas pancreáticas, células beta e células produtoras de insulina em matrizes puras de PEG¹²⁹, alginato^{128, 130} e agarose^{126, 127}, bem como em PEG funcionalizado com heparina¹³¹. Além disso, há estudos que encapsularam ilhotas em alginato funcionalizado com pectina¹²⁴, fibrina¹²⁵ e colágeno¹²². Outro estudo encapsulou células secretoras de insulina (Ins 1E) em alginato combinado com ácido hialurônico¹²³. Esses estudos não apresentaram diferenças em termos de interação entre as matrizes encapsuladoras e as células, de modo que foi observada a sobrevivência celular em todas as matrizes.

Outros trabalhos empregaram a tecnologia biosil, que consiste no encapsulamento de células a partir de uma camada de sílica sol-gel, depositada sobre a superfície celular. Dois estudos utilizaram esse método para encapsular ilhotas pancreáticas^{12 e 13}. Ratos diabéticos receberam ilhotas encapsuladas e mantiveram a glicemia em níveis normais. A restauração da glicemia por um período longo (aproximadamente 60 dias) também indicou a viabilidade das ilhotas.

De um modo geral, poucos trabalhos promoveram a integração de materiais na produção de sistemas biológicos, como, por exemplo, o revestimento de cápsulas de alginato com outros polímeros. Considerando-se a instabilidade fisiológica do alginato, devido à troca de íons Ca^{2+} por íons Na^+ , a combinação dessa matriz com outros materiais aumenta a estabilidade mecânica do alginato. Desse modo, a sua integração com outras matrizes promove a obtenção de cápsulas mais estáveis, o que propicia, quando em meio fisiológico, uma maior sobrevivência do sistema e, conseqüentemente, melhora a eficácia do tratamento, favorecendo a produção e a liberação do agente terapêutico em taxas controladas.

Por essas razões, o encapsulamento de células produtoras de insulina, como as células β de insulinoma de camundongo (MIN-6), na busca de uma estratégia de proteção dessas células à imunossupressão, torna-se necessário. Assim, é fundamental a obtenção prévia de um modelo funcional, a partir do encapsulamento de células da linhagem eritroleucêmica K-562, a fim de investigar o comportamento das células em termos de viabilidade e diferenciação, frente ao ambiente de encapsulamento. Nesse trabalho, optamos por empregar essa linhagem, dada sua capacidade de diferenciação celular, uma vez que é utilizada em modelos de diferenciação eritroide e megacariocítica, permitindo, por isso, avaliar a manutenção do potencial de diferenciação celular em condições de encapsulamento. Além disso, com base nas características dessas células, como robustez, elevado potencial de proliferação e de diferenciação, além da facilidade de manipulação, a presente linhagem possui um perfil adequado para obter informações acerca de viabilidade, funcionalidade e diferenciação em condições de encapsulamento.

As células K-562 pertencem a uma linhagem eritroleucêmica humana, que foi isolada de um paciente com leucemia mieloide crônica. Há um estudo que encapsulou células K-562 em alginato/poli-L-lisina, com o objetivo de obter um modelo celular de encapsulamento, para observar proliferação, crescimento e metabolismo¹³². Já as células MIN-6 constituem uma linhagem derivada de células beta de insulinoma de camundongo. Na literatura, há dois estudos que encapsularam células MIN-6, respectivamente em quitosana/alginato¹³³ e em alginato combinado com aminopropil-silicato¹³⁴.

Dessa forma, surgiu-nos alguns questionamentos: é possível encapsular células β de insulinoma de camundongo (MIN-6) em diferentes matrizes, empregando células da linhagem eritroleucêmica K-562 como modelo funcional de encapsulamento?

Polissacarídeos naturais de agarose, amido, celulose, gelatina e quitosana, que possuem boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixo custo, foram combinados

ao alginato, além da glicina, do polietilenoglicol (PEG) e da sílica^{13, 40, 71, 75, 101, 135 e 136}. Possivelmente, as interações estabelecidas entre os compostos foram ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. O processo consistiu na mistura do alginato com esses materiais, constituindo um método simples e acessível. Agarose, amido, celulose, gelatina, glicina, quitosana e PEG, quando combinados com o alginato, estabilizam-no, melhorando a estabilidade fisiológica, a fixação e a proliferação celular e, permitindo, com isso, a produção e secreção de insulina. Além disso, a integração dessas matrizes ao alginato dificulta o vazamento de células, o qual pode ser favorecido pela porosidade do alginato⁴⁰.

A quitosana, polícatión cuja estrutura possui grupos amino, foi empregada para estabilizar o alginato por meio da neutralização das cargas negativas dos grupos carboxílicos¹³⁷, sendo também integrada entre o alginato e a sílica para evitar a repulsão entre as cargas negativas do alginato, em pH 7, e dos grupos silanóis da sílica³⁰. Comparativamente aos materiais orgânicos, a sílica apresenta vantagens relacionadas às suas propriedades intrínsecas, como estabilidade física e química em relação a solventes e pH, além da flexibilidade do método sol gel. A gelatina e a glicina foram combinadas ao alginato, pois devido à falta de motivos apropriados no alginato, as células encapsuladas podem ligar-se fracamente, necessitando da adição de aminoácidos ou proteína¹³⁸. Em relação à gelatina, destaca-se a presença de um motivo específico (arginina-glicina-aspartato) que melhora o comportamento funcional da célula⁷¹.

O PEG foi integrado à gelatina, que resulta da degradação do colágeno, cujos principais aminoácidos são glicina, prolina e hidroxiprolina. Com essa combinação, é possível imitar aspectos da matriz extracelular, favorecendo a sobrevivência e a função das células encapsuladas⁴⁰.

Dessa forma, será possível avaliar o potencial de liberação de insulina a partir de células MIN-6 encapsuladas em matrizes puras de alginato e combinadas com agarose, amido, celulose, gelatina, gelatina/PEG, glicina, quitosana e quitosana/sílica? Até que ponto a natureza da matriz afeta a viabilidade celular? É possível combinar matrizes orgânicas e inorgânicas sem comprometer a viabilidade celular?

Os materiais empregados no encapsulamento celular, para aplicações biomédicas, referem-se a diversos tipos celulares. Exemplos incluem células olfatórias, que foram encapsuladas em alginato/celulose e mantiveram-se viáveis por 20 dias¹³⁶. O percentual de encapsulamento para a matriz pura de alginato foi entre 7 % e 24 %, aumentando para cerca de 34 % ao ser combinado com celulose. Outro estudo encapsulou cardiomioblastos

em alginato com gelatina durante 7 dias⁷¹, havendo melhora da viabilidade. A proliferação celular, todavia, foi reduzida com o encapsulamento. Já células-tronco e células HeLa (linhagem celular humana) foram encapsuladas, respectivamente, em alginato funcionalizado com quitosana⁷⁵, e em PEG¹⁰¹, mantendo-se ambas viáveis por 15 dias após encapsulamento. Período maior de viabilidade (27 dias) foi observado com células renais encapsuladas em alginato/agarose. Além disso, ilhotas pancreáticas encapsuladas em alginato e sílica não modificaram sua capacidade de produzir insulina e manterem-se sensíveis à estimulação da glicose¹³.

Dessa maneira, de acordo com os resultados da literatura, as matrizes empregadas na funcionalização do alginato, de modo a obter-se materiais híbridos, geraram sistemas eficientes, os quais mantiveram as células viáveis por períodos longos e promoveram proliferação celular. Com base nessas conclusões, o presente estudo busca melhorar a estabilidade mecânica do alginato em solução fisiológica, combinando-o com agarose, amido, celulose, gelatina, gelatina/PEG, glicina, quitosana e quitosana/sílica, a fim de investigar a influência da natureza da matriz sobre a viabilidade celular, e obter, com isso, combinações promissoras, de modo a garantir a produção de um material de boa estabilidade e permeabilidade adequada, permitindo o fluxo de oxigênio e nutrientes e mantendo as células MIN-6 viáveis e funcionais.

A hipótese da presente tese é que o encapsulamento de células β de insulinoma de camundongo (MIN-6) em matrizes de alginato, combinadas com agarose, amido, celulose, gelatina, gelatina/PEG, glicina, quitosana e quitosana/sílica é capaz de constituir um sistema de produção e secreção de insulina, como alternativa ao tratamento do diabetes e aos transplantes de células pancreáticas.

3 – OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo é investigar as potencialidades e limitações do processo de encapsulamento de células MIN-6, a fim de obter um sistema de produção e liberação de insulina.

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar matrizes biocompatíveis, não tóxicas e com porosidade adequada, de modo a manter a viabilidade celular.
- Avaliar a manutenção da capacidade de diferenciação celular e da atividade metabólica de células MIN-6 nas condições de encapsulamento.
- Avaliar o efeito da funcionalização de matrizes sobre a viabilidade celular.
- Correlacionar características estruturais da cápsula com a atividade metabólica das células MIN-6.

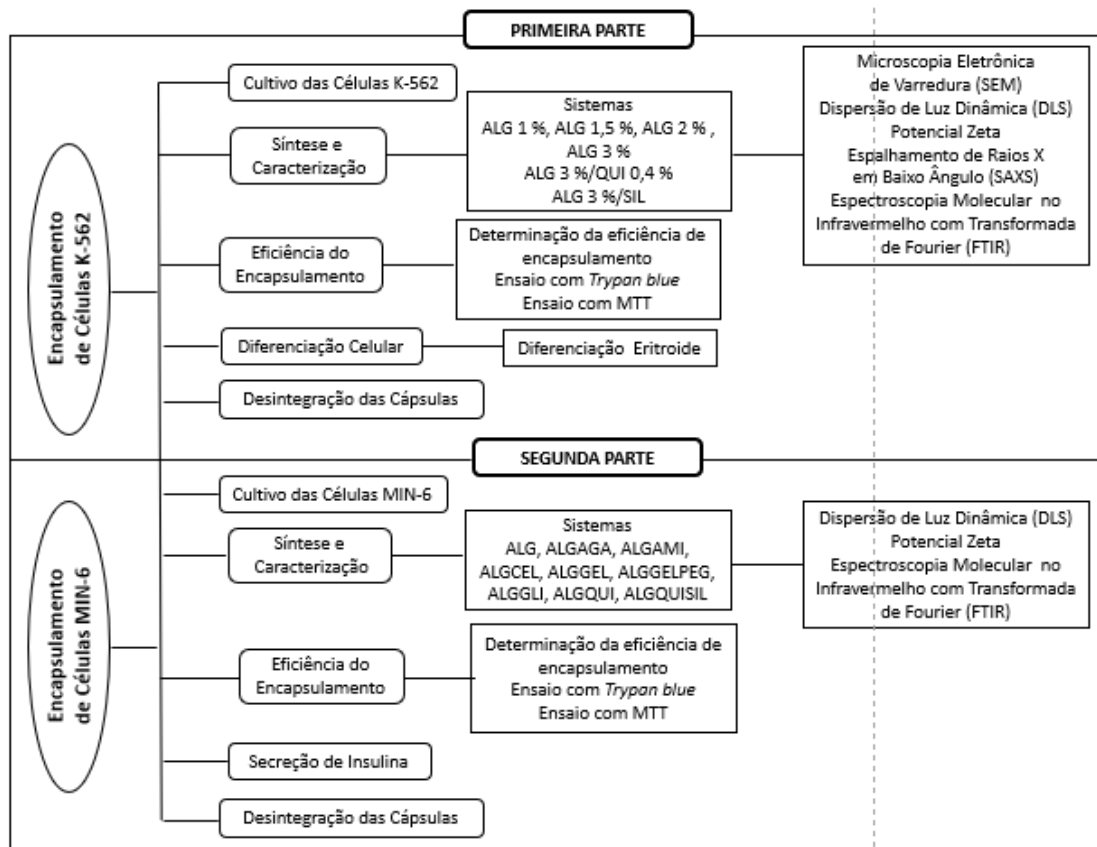
4 – PARTE EXPERIMENTAL

4.1 – MATERIAIS E REAGENTES

Células K-562 (ATCC[®] CCL-243[™]); células MIN-6 (provenientes de insulinoma de ratos transgênicos C57BL/6) (ATCC[®] CRL-11506[™]) (Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil); meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha); bicarbonato de sódio P.A. (Casa da Química Indústria e Comércio LTDA, Diadema, Brasil); soro fetal bovino (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA); penicilina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha); estreptomicina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil); tripsina - 0,5 % - EDTA 10 × (Life Technologies Corporation, Nova Iorque, USA); agarose (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha); alginato de sódio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha); celulose (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany); gelatina (Gelita, Eberbach, Alemanha); glicina (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha); hidrogel de amido de milho liofilizado; polietilenoglicol 20000 (PEG) (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Alemanha); quitosana (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha); cloreto de cálcio dihidratado (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, Brasil); tetraetilortossilicato (TEOS) (Shinetsu, Tóquio, Japão); corante Trypan blue 0,4% (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA); brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromide (MTT) (CCK8, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil); dimetil sulfoxido (DMSO, Quimis, St. Louis, USA); cloreto de hemina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha); 3,3'-diaminobenzidina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha); peróxido de hidrogênio P.A. (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, Brasil); kit ELISA ultrasensitiva para insulina de rato (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) foram empregados como recebidos.

4.2 – PROCEDIMENTOS DE PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS HIDROGÉIS

O Esquema 7 representa o processo global de obtenção, caracterização e viabilidade dos hidrogéis com células K-562 e dos hidrogéis com células MIN-6.



Esquema 7. Etapas de síntese, caracterização e viabilidade celular dos hidrogéis com células K-562 e dos hidrogéis com células MIN-6.

De acordo com o Esquema 7, o processo de encapsulamento das células K-562 e MIN-6 dividiu-se em três etapas: cultivo das células, síntese e caracterização dos materiais e eficiência do encapsulamento.

4.3 – CULTIVO DAS CÉLULAS

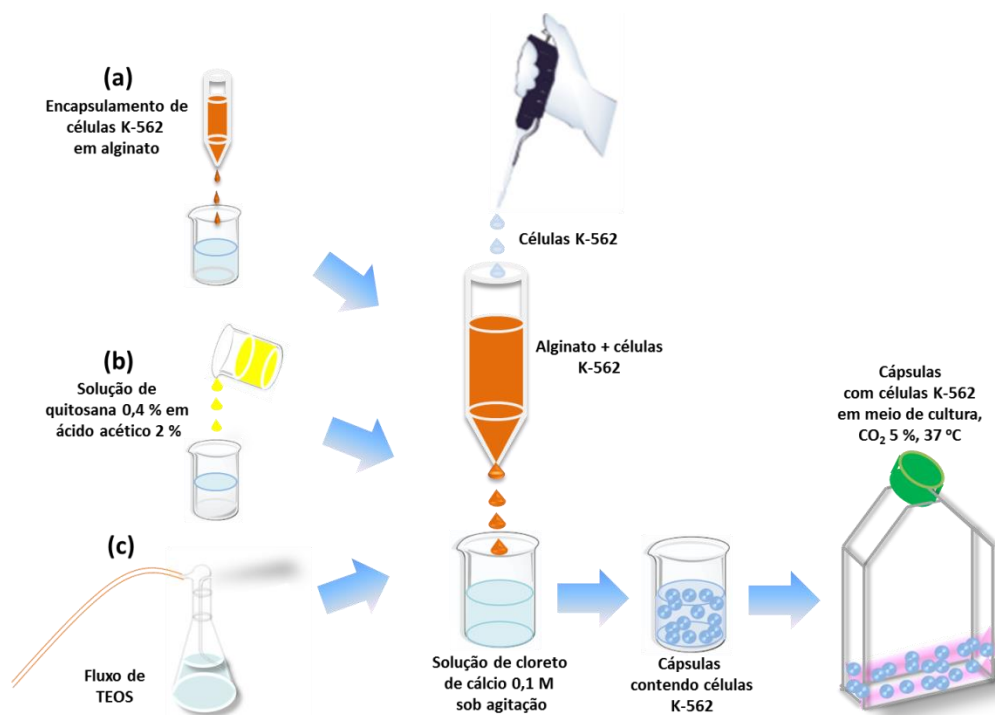
As células K-562 (ATCC® CCL-243™) (passagens 8 a 10) foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino 10 %, bicarbonato de sódio 2 g L⁻¹, L-glutamina, penicilina 100 UI mL⁻¹ e estreptomicina µg mL⁻¹, em uma atmosfera umidificada com CO₂ 5 % a 37 °C. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de extrusão com *Trypan blue*, e todas as culturas utilizadas apresentaram 95 % de viabilidade. A cultura com 1 × 10⁶ células viáveis mL⁻¹ foi utilizada para encapsulamento

em diferentes matrizes. As células MIN-6 (ATCC[®] CRL-11506[™]) (passagens 53 a 58) foram cultivadas nas mesmas condições empregadas para as células K-562. A cultura com 1×10^6 células viáveis mL^{-1} , após tripsinização com tripsina 0,5 % – EDTA 5,3 mM (1:10), foi utilizada para encapsulamento em diferentes matrizes.

4.4 – ENCAPSULAMENTO CELULAR

4.4.1 – Encapsulamento das Células K-562 e MIN-6

O encapsulamento das células K-562 foi realizado com alginato de sódio 1 %, 1,5 %, 2 % e 3 % por meio da técnica de extrusão. A uma solução aquosa de alginato de sódio (10 mL) foi adicionado 1 mL de suspensão celular (1 a 3×10^6 células viáveis mL^{-1}), agitando-se levemente por 1 minuto. Em seguida, essa solução foi lentamente gotejada sobre uma solução de CaCl_2 0,1 M (20 mL), sob agitação a temperatura ambiente. As cápsulas formadas foram centrifugadas, lavadas com solução tampão-fosfato (PBS) (pH 7,4) e armazenadas em meio de cultura RPMI 1640 a 37°C e CO_2 5 %. O Esquema 8 (a) apresenta o processo de encapsulamento com alginato de sódio.



Esquema 8. (I) (a), (b) e (c) Processo de síntese das cápsulas de alginato (1 %, 1,5 %, 2 % e 3 %).

Para obtenção do sistema alginato 3 %/quitosana 0,4 %, o processo de síntese foi similar àquele de obtenção de cápsulas de alginato. Uma solução de quitosana 0,4 % (20 mL) foi misturada à solução de CaCl₂ 0,1 M. O Esquema 8 (b) mostra o processo de encapsulamento com alginato/quitosana. Da mesma forma, as células foram encapsuladas em alginato 3 %/sílica, expondo as cápsulas a um fluxo de TEOS (Esquema 8 (c)).

Em relação ao encapsulamento das células MIN-6, o processo de obtenção das cápsulas de alginato 2 % foi análogo ao das células K-562. Porém, o alginato de sódio foi combinado, na proporção 1:1, com agarose 1 %, amido 1 %, celulose 1 %, gelatina 1 %, glicina 1 % e quitosana 0,4 %. O sistema alginato 2 %/gelatina 1 % foi, ainda, imerso em uma solução de PEG 5 mg/mL, e o sistema alginato 2 %/quitosana 0,4 %, submetido a um fluxo de TEOS.

A Tabela 6 mostra os sistemas obtidos a partir da funcionalização do alginato 2 %, para o encapsulamento das células MIN-6, designados como ALGXXX, em que XXX refere-se à matriz de funcionalização, seguida da concentração.

Tabela 6. Funcionalização das matrizes de alginato com diferentes materiais.

SISTEMA	MATERIAL DE FUNCIONALIZAÇÃO
ALGAGA	Agarose
ALGAMI	Amido
ALGCEL	Celulose
ALGGEL	Gelatina
ALGGELPEG	Gelatina/polietilenoglicol (PEG)
ALGGLI	Glicina
ALGQUI	Quitosana
ALGQUISIL	Quitosana/Sílica

4.4.2 – Encapsulamento de Eritrócitos

O sangue heparinizado (200 µL) foi centrifugado a 370 × g por 10 minutos a 4 °C. Removeu-se o sobrenadante, e a massa de hemácias foi adicionada a 3 mL de alginato de sódio nas concentrações 1,5 %, 2 %, 3 %, 5 %, 8 % e 10 %. Essas soluções foram gotejadas em uma solução de CaCl₂ 0,1 M, sob agitação a temperatura ambiente. A hemoglobina produzida pelos eritrócitos encapsulados foi determinada espectrofotometricamente. As medidas foram realizadas em triplicata.

4.5 – CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

4.5.1 – Análise Textural e Morfológica

4.5.1.1 – Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

Experimentos de SEM foram realizados em um microscópio JEOL (Tóquio, Japão) modelo JSM/6060 no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CEME, Porto Alegre, Brasil). Os materiais foram fixados inicialmente em uma fita de carbono e então revestidos com ouro através de técnicas convencionais. A voltagem de aceleração empregada foi 10 kV.

4.5.1.2 – Espalhamento de Raios X em Baixo Ângulo (SAXS)

Experimentos de SAXS foram realizados na linha de luz D11A do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil), utilizando um comprimento de onda = 1,488 nm e um detector Pilatus 300 K. O feixe incidente foi detectado em duas distâncias amostra-detector diferentes (994, 2 e 2245,7 mm). A intensidade de espalhamento $I(q)$ foi plotada como uma função do módulo de vetor de espalhamento, em que θ é o ângulo de espalhamento. Um pó de behenato de prata foi utilizado como padrão para calibrar a distância amostra-detector, o detector de inclinação e a posição do feixe direto. Os padrões SAXS foram acumulados por 1 a 60 segundos, dependendo da quantidade e concentração da amostra. Os padrões de espalhamento isotrópico foram medidos radialmente. Os perfis de dispersão $I(q)$ vs. q foram ajustados, usando a rotina de avaliação Irena implementada no Igor Pro Software (WaveMetrics, Portland, USA). Um ajuste multi-nível unificado foi utilizado para descrever um ou dois níveis de organização estrutural, evidente nos dados de espalhamento.

4.5.1.3 – Dispersão de Luz Dinâmica (DLS)

Experimentos dinâmicos de dispersão de luz (DLS) foram empregados para investigar a distribuição do tamanho das partículas. Partículas de alginato e de alginato combinado com agarose, amido, celulose, gelatina, gelatina/PEG, glicina, quitosana e quitosana/sílica foram dispersas em água Milli-Q (10 mg mL^{-1}) e submetidas a ultrassom por 30 minutos. Medidas de DLS foram feitas à temperatura ambiente em um equipamento Malvern Zetasizer- Nano ZS90. Foram preparadas três amostras independentes, e as distribuições de tamanho médio foram fornecidas. Os experimentos foram realizados no Instituto de Química da UFRGS (IQ, Porto Alegre, Brasil).

4.5.1.4 – Potencial Zeta

As medidas de potencial zeta foram realizadas em um analisador zeta PALS (Brookhaven Instruments). O software do analisador de potencial zeta versão 3.18 foi utilizado para coletar os dados. Em um experimento típico, 10 mg da amostra foram, primeiramente, diluídos em 1 mL de água Milli-Q e então a solução foi filtrada através de filtros de seringa VertiPure NYLON (13 mm, 0,45 μm , 100/filtro pK). Em seguida, a amostra filtrada foi introduzida em cuvetes de poliestireno (quadrados, 10 mm, 4,5 mL, claros de quatro lados). O instrumento automaticamente calculou o potencial zeta da mobilidade eletroforética. Os experimentos foram realizados no Instituto de Química da UFRGS (IQ, Porto Alegre, Brasil).

4.5.2 – Análise Estrutural

4.5.2.1 – Espectroscopia de Transmissão no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros foram registrados à temperatura ambiente em um espectrofotômetro Bomem MB-102, acumulando 36 varreduras na resolução 4 cm^{-1} . Esse estudo foi restrito à região do infravermelho médio de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} . As amostras foram analisadas pelo modo de transmissão, como pastilhas preparadas a partir da diluição da amostra em KBr, utilizando-se um pastilhador e uma prensa hidráulica manual. Os experimentos foram realizados no Instituto de Química da UFRGS (IQ, Porto Alegre, Brasil).

4.6 – EFICIÊNCIA DO ENCAPSULAMENTO

Todos os experimentos de eficiência do encapsulamento foram realizados no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS (ICBS, Porto Alegre, Brasil).

4.6.1 – Determinação da Eficiência do Encapsulamento

Uma mistura de suspensão celular/*Trypan blue* (1:1) (15 μL) foi adicionada à câmara de Neubauer, procedendo-se à contagem do número total de células (Equação 1). Em seguida, procedeu-se ao processo de síntese das cápsulas. Imediatamente após o encapsulamento, para remoção das células não encapsuladas e eliminação do cálcio residual, as cápsulas foram lavadas com PBS (pH 7,4), procedendo-se ao rompimento. O número de células foi novamente contado.

$$N^{\circ} \text{ de } \frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{N^{\circ} \text{ total de células contadas} \times 10^4 \times \text{fator de diluição}}{N^{\circ} \text{ de quadrados contados}} \quad (\text{Eq. 1})$$

O Esquema 9 mostra a câmara de Neubauer e o modo de contagem das células. De acordo com o Esquema 9 (A), observa-se a vista superior da câmara de Neubauer, com o canal transversal que separa as grades de contagem. Em 9 (B), é mostrada a grade de contagem, dividida em nove quadrantes, sendo os quadrantes extremos subdivididos em 16 quadrados e nos quais contam-se as células. Em 9 (C), observa-se o modo zigue-zague de contagem das células no sentido esquerda à direita. A vista lateral da câmara de Neubauer, com canal transversal e local de introdução da amostra coberta por lamínula pode ser observada em 9 (D). A eficiência do encapsulamento foi determinada com base na equação 2:

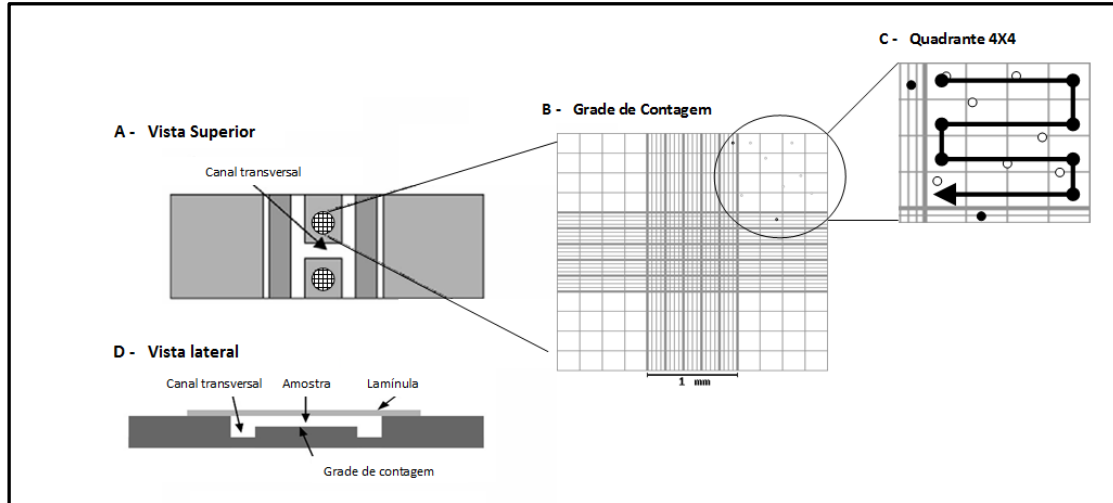
$$EE = \frac{N}{N^{\circ}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

em que:

EE = Eficiência do Encapsulamento

N = Número de células liberadas a partir das cápsulas

N^o = Número total de células



Esquema 9. Apresentação e modo de contagem das células na câmara de Neubauer.

Disponível

em: https://www.google.com.br/search?q=c%C3%A2mara+de+neubauer+desenho&hl=ptBR&gbv=2&prmd=ivns&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjQ04e9jaXhAhWzI7kGHX1dBy8Q_AUIBQ.

Acessado em 29/03/2019.

4.6.2. – Viabilidade Celular

4.6.2.1 – Ensaio com *Trypan Blue*

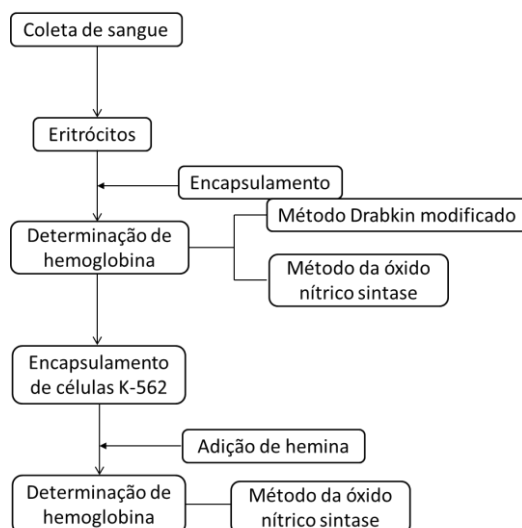
As cápsulas foram dissolvidas em 10 mL de PBS (pH 7,4), à temperatura ambiente e sob agitação durante 10 minutos. Em seguida, essa suspensão foi centrifugada por 5 minutos a $370 \times g$ ($g = rcf =$ força centrífuga relativa). A solução sobrenadante foi removida, e o precipitado foi suspenso em 1 mL de meio de cultura RPMI 1640. Posteriormente, 45 μ L de meio de cultura RPMI 1640 e 45 μ L de *Trypan blue* foram adicionados a 10 μ L da suspensão celular encapsulada, homogeneizando-se. Uma alíquota de 15 μ L do homogeneizado foi aplicada à câmara de Neubauer, procedendo-se à contagem do número de células viáveis. As cápsulas foram mantidas a 37 °C e CO₂ 5 %. Procedeu-se à contagem das células K-562 nos tempos 30 minutos, 1, 2, 4 e 6 horas. Para as células MIN-6 encapsuladas, a contagem foi realizada nos tempos 30 minutos, 6, 12 e 24 horas. Os experimentos foram feitos em triplicata de acordo com a equação 1.

4.6.2.2 – Ensaio com MTT

As cápsulas com células foram cultivadas em placa de 6 poços, contendo meio de cultura RPMI 1640, soro fetal bovino e antibióticos, como descrito acima. A viabilidade celular foi avaliada espectrofotometricamente, usando o reagente de óxido redutase do tipo MTT WST-8 [2-(2-metóxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazólio, sal monossódico] (CCK8, Sigma), seguindo as instruções do fabricante. Primeiramente, uma solução estéril de MTT (5 mg mL⁻¹) foi preparada em PBS (pH 7,4). Em seguida, 20 μ L dessa solução foram adicionados ao meio com as cápsulas, sendo incubadas a 37 °C e CO₂ 5 %, por 24 horas, até a formação dos cristais de formazan, após ação das óxido redutases celulares NAD(P)H dependentes. Posteriormente, cerca de 500 μ L da suspensão de cápsulas contendo os sais de formazan foram centrifugados. Os cristais foram dissolvidos em 200 μ L de DMSO, e a absorbância foi determinada em 570 nm, após 2, 4, 6, 12 e 24 horas de incubação das células K-562 encapsuladas. Para as cápsulas com células MIN-6, a análise foi iniciada após 4 horas de exposição ao MTT. As análises foram feitas em triplicata.

4.7 – DIFERENCIAÇÃO ERITROIDE DAS CÉLULAS K-562

O Esquema 10 descreve o ensaio de diferenciação eritroide das células K-562. Os experimentos foram realizados no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS (ICBS, Porto Alegre, Brasil).



Esquema 10. Ensaio de diferenciação eritroide das células K-562.

De acordo com o Esquema 10, eritrócitos provenientes de sangue heparinizado foram submetidos ao processo de encapsulamento para determinação espectrofotométrica de hemoglobina, por meio dos métodos de Drabkin modificado e da Óxido Nítrico Sintase. O emprego dessas técnicas para quantificação de hemoglobina, a partir de eritrócitos, serviu como estudo prévio para sua determinação, quando produzida pelas células K-562, de modo a fornecer informações acerca do método mais eficiente para a quantificação de hemoglobina.

4.7.1 – Coleta de Sangue (Projeto Comitê de Ética nº 33445)

Os eritrócitos utilizados nos experimentos de diferenciação eritroide foram provenientes de camundongos machos e fêmeas da linhagem B6.129F2/J (Projeto Comitê de Ética nº 33445). Os animais foram mortos pelo método de decapitação, após serem anestesiados com 30 μL de cetamina 10 % (120 mg Kg^{-1}) e 10 μL de xilozina 2 % (10 mg Kg^{-1}). O sangue obtido foi coletado em frasco tipo eppendorf com heparina.

4.7.2 – Determinação Espectrofotométrica de Hemoglobina de Eritrócitos

4.7.2.1 – Método Drabkin Modificado¹³⁹

As cápsulas formadas foram centrifugadas a $370 \times g$ a 4°C e colocadas em contato com o reagente de Drabkin ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5,3 μM + KCN 7,7 μM + KH_2PO_4 1,02 μM + água Milli-Q, pH = 7,4) por 5 minutos, empregando-se as diluições 1:10 e 1:20. Procedimento semelhante foi realizado após dissolução das cápsulas em PBS (pH 7,4).

Em seguida, a concentração de hemoglobina liberada na solução foi determinada em 540 nm, empregando-se a equação 3:

$$C \text{ (mM)} = \frac{A \times \text{Fator de diluição}}{44} \quad \text{(Eq. 3)}$$

As medidas de absorvância (A) foram realizadas a temperatura ambiente, em um espectrofotômetro UV/UV-visível Ultrospec 2000, na faixa de 190 a 1100 nm.

4.7.2.2 – Método da Óxido Nítrico Sintase¹⁴⁰

Após rompimento das cápsulas em PBS 0,1 M (pH 7,4), à suspensão adicionou-se uma alíquota de EDTA 0,5 mM diluído em solução tris-base 50 mM (1:20), sob agitação a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a $370 \times g$ a 4 °C. O sobrenadante foi removido, e a partir dele a concentração de hemoglobina foi determinada em 405 nm e 421 nm.

4.7.3 – Determinação Espectrofotométrica de Hemoglobina das Células K-562

A solução de heme (cloreto férrico de heme-protoporfirina de hemoglobina bovina) 600 µM foi preparada com 39,12 mg de heme, adicionando-se 0,3 mL de NaOH 1 N, 2,5 mL de meio de cultura RPMI 1640 e 0,35 mL de HCl 1 N. Outras concentrações foram obtidas por uma série de diluições com PBS (pH 7,4). Após 24 e 48 horas de incubação a 37 °C e CO₂ 5 %, as células hemoglobina-positivas foram detectadas pela reação específica de 100 µL de suspensão celular com 8 µL de solução de benzidina, composta por benzidina 1 % e ácido acético glacial 15 %, acrescida de 2 µL de peróxido de hidrogênio, como descrito¹³⁶. As células foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente, e o percentual de células benzidina-positivas foi determinado por análise microscópica na câmara de Neubauer. Para a diferenciação das células K-562 encapsuladas nos diferentes sistemas, o mesmo procedimento foi realizado. Após o rompimento das cápsulas em tampão-fostato, a frequência de células diferenciadas foi detectada pela reação descrita. Medidas foram feitas em triplicata.

Adicionalmente, a hemoglobina produzida pelas células K-562 foi determinada espectrofotometricamente por uma técnica alternativa, baseada na diferença de absorção máxima do comprimento de onda (λ) entre oxihemoglobina (421 nm; $\epsilon = 20,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e metahemoglobina (405 nm; $\epsilon=20,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), cujo coeficiente de

absorção é $\epsilon_{421-405} = 77.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em uma modificação do método da Óxido Nítrico Sintase descrito anteriormente. O mesmo método foi aplicado para os sistemas encapsulados, e a hemoglobina foi determinada após rompimento das cápsulas em PBS (pH 7,4). As medidas foram feitas em triplicata.

4.8 – SECREÇÃO DE INSULINA

As células MIN-6 foram encapsuladas em matrizes puras e funcionalizadas de alginato 2 % e mantidas por 24 horas em meio de cultura RPMI-1640, a 37 °C e CO₂ 5 %. Após esse período, alíquotas de 50 µL do meio de cultura foram coletadas, e a liberação de insulina foi determinada, usando o kit de ELISA para insulina de rato ultrasensitiva (Kaimann). As medidas foram feitas em triplicata. Os experimentos foram realizados no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS (ICBS, Porto Alegre, Brasil).

4.9 – ENSAIO DE DESINTEGRAÇÃO DOS HIDROGÉIS

Para medir a degradação dos materiais, os hidrogéis (1 mL) foram pesados imediatamente após a síntese. Em seguida, foram incubados em 3 mL de PBS (pH 7,4) a 37 °C, sob agitação, em uma Incubadora Shaker Novatecnica (60 rpm). Determinou-se o peso de cada amostra após 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas do encapsulamento. Antes de cada pesagem, o excesso de PBS (pH 7,4) foi removido por centrifugação. A degradação foi calculada a partir da proporção de pesos das amostras nos diferentes intervalos de tempo em relação ao peso dos hidrogéis logo após encapsulamento. Os experimentos foram realizados no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS (ICBS, Porto Alegre, Brasil).

4.10 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3). As análises estatísticas foram realizadas, usando a análise de variância ANOVA (GraphPad Prism 6.01). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – ENCAPSULAMENTO DAS CÉLULAS K-562

5.1.1 – Estudo do Processo de Encapsulamento das Células K-562

As células da linhagem eritroleucêmica K-562 foram encapsuladas em alginato de sódio nas concentrações 1, 1,5, 2 e 3 %. A faixa 1 % a 3 % é usualmente empregada para preparação de suspensões de células viáveis em dispersões coloidais aquosas de alginato³⁹. Aqui serão apresentados os resultados dos hidrogéis em termos de percentual de encapsulamento, morfologia e estrutura. Posteriormente, os resultados de viabilidade e diferenciação celular (eritroide) serão discutidos.

A Figura 1 apresenta imagens de células K-562 em um ensaio de viabilidade com o corante *Trypan blue* (Figura 1a), células K-562 encapsuladas em alginato 3% (Figura 1b) e em alginato funcionalizado com quitosana 0,4 % (Figuras 1c e 1d).

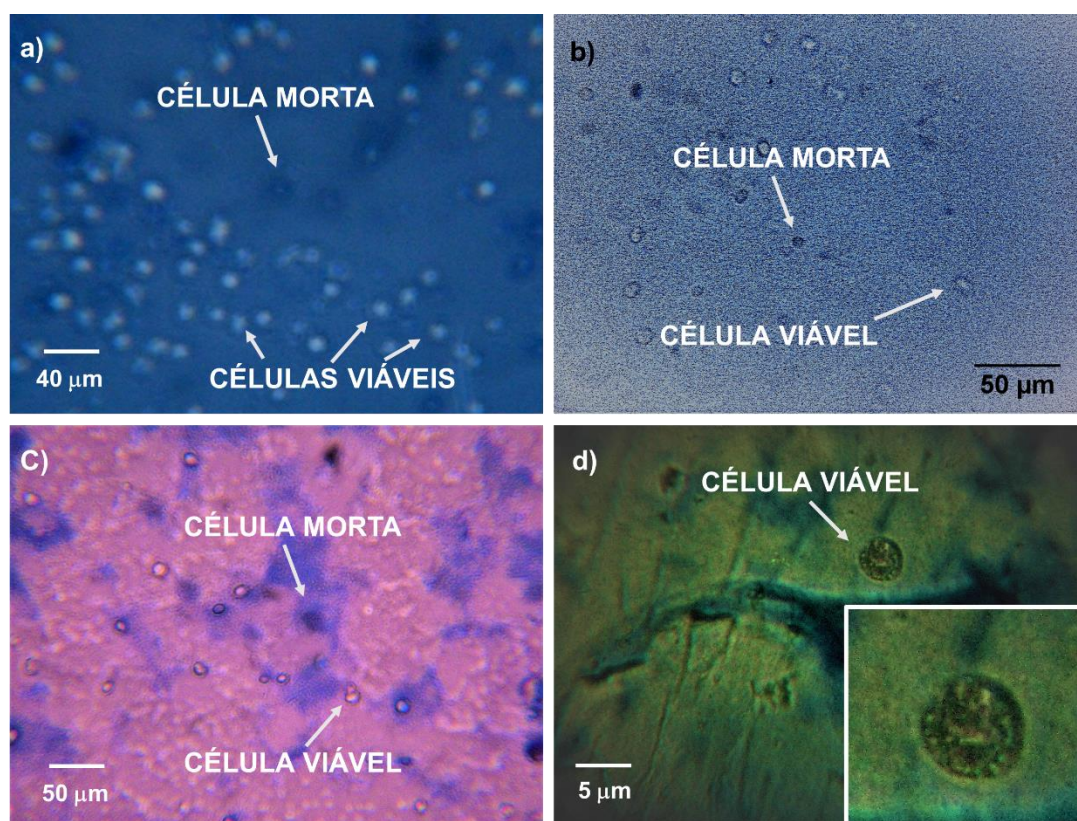


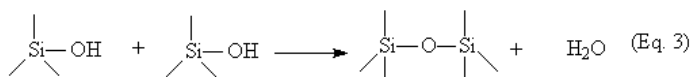
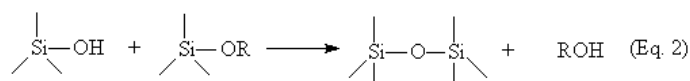
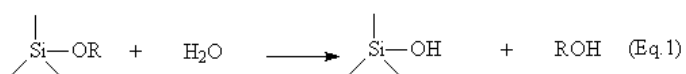
Figura 1. Viabilidade celular pós-encapsulamento. Microscopia com contraste de fase durante coloração com *Trypan blue*. (a) Células K-562, ampliação 40X; (b) células K-562 encapsuladas em alginato 3 %, ampliação 40X; (c) cápsulas de alginato 3 %/ quitosana 0,4 % com células K-562, ampliação 40X; (d) células viáveis com células K-562 em alginato 3 %/ quitosana 0,4 %, ampliação 400X; (inserção mostra a mesma célula

em detalhes) no filtro de interferência. Células viáveis (brilhantes) e mortas (azul opaco) são indicadas com setas. As barras de escala indicam o tamanho real nas ampliações originais.

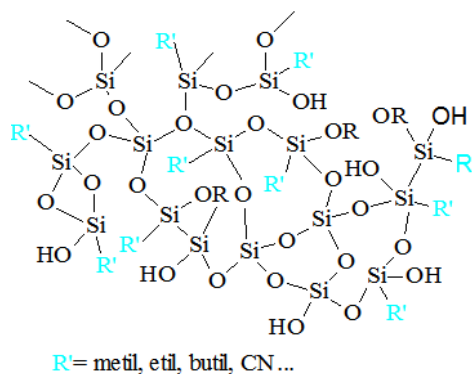
Como indicado na Figura 1, as células coradas com *Trypan blue* representam células mortas, uma vez que suas membranas não se romperam para expulsar o corante. Por outro lado, as células branqueadas são viáveis, devido à manutenção de sua membrana intacta e à capacidade de expelir o *Trypan blue*, isto é, não houve a internalização do corante¹⁴¹. Quitosana na concentração 0,4 % foi empregada para revestir as cápsulas de alginato 3 %. O complexo iônico alginato/quitosana ocorre entre o grupo aniônico do alginato (COO⁻) e o grupo catiônico protonado da quitosana (NH₃⁺)¹⁴².

Comparativamente aos géis orgânicos, os géis de sílica apresentam vantagens importantes relacionadas às suas propriedades intrínsecas, como maior estabilidade mecânica, estabilidade física e química em relação a solventes, pH, luz e degradação microbiana, além da flexibilidade do processo sol-gel (porosidade e modificação química com emprego de alcóxidos organicamente modificados)¹⁴³. Dessa maneira, sílica pode ser associada ao alginato, de modo a fortalecer a matriz orgânica biocompatível.

Nesse sentido, foram encapsuladas células K-562 em alginato 3 %, com formação de uma camada de sílica, a partir de um fluxo de TEOS. Esse processo ocorre por meio do método sol-gel, em que os grupos silanóis do organossilano hidrolisam através da água presente na solução de alginato (Esquema 11 (a)), seguindo à polimerização com a formação de sílica (Esquema 11 (b)).



(a)



(b)

Esquema 11. Reações de (a) hidrólise e (b) polimerização.

O sistema resultante (ALG 3 %/SIL) manteve a permeabilidade das cápsulas ao oxigênio e aos nutrientes, bem como a viabilidade celular. Além disso, o etanol produzido no processo não gerou toxicidade para as células, possivelmente devido à baixa concentração.

5.1.2 – Determinação da Eficiência de Encapsulamento das Células K-562

A eficiência de encapsulamento é definida pela concentração de material incorporado (ingredientes ativos, fármacos, fragrâncias, proteínas, pesticidas, dentre outros), detectada na formulação sobre a concentração inicial¹⁴⁴. Em relação ao encapsulamento de células, a eficiência refere-se ao número final de células, obtido após rompimento do sistema, sobre o número inicial de células livres. A eficiência de encapsulamento das células K-562 nos sistemas produzidos foi determinada. De acordo com a literatura, a faixa de eficiência de encapsulamento é bastante variável. Por exemplo o encapsulamento de fibroblastos em alginato foi de 95,56 %¹⁴⁵. Em outros trabalhos, porém, como no caso do encapsulamento de células β em alginato funcionalizado, ele foi entre 18 % e 20 %¹⁴⁶. Em relação às células K-562, há um estudo na literatura, encapsulando-as em alginato/poli-L-lisina, com o objetivo de obter um modelo celular de encapsulamento, a fim de observar proliferação e características de crescimento e metabolismo¹³². A eficiência de encapsulamento, porém, não foi determinada.

A Tabela 7 mostra o percentual de eficiência de encapsulamento das células K-562 nas matrizes puras e funcionalizadas de alginato.

Tabela 7. Eficiência de encapsulamento dos sistemas (n = 3).

Sistema	Eficiência de encapsulamento (%)
ALG 1 %	8,9 ± 1,6
ALG 1,5 %	37 ± 2,0
ALG 2 %	60 ± 1,7
ALG 3 %	28 ± 1,5
ALG 3 %/QUI 0,4 %	31 ± 0,6
ALG 3 %/SIL	20 ± 1,0

ALG 1 % = alginato 1 %; ALG 1,5 % = alginato 1,5 %; ALG 2 % = alginato 2 %; ALG 3 % = alginato 3 %; ALG 3 %/QUI 0,4 % = alginato 3 % + quitosana 0,4 %; ALG 3 %/SIL = alginato 3 % + sílica

Com base na Tabela 7, verifica-se a eficiência de encapsulamento dos sistemas. A eficiência de encapsulamento foi entre 8,9 % e 60 %. Entre as matrizes de alginato, o teor 2 % foi o que apresentou o maior percentual de encapsulamento (60 %), possivelmente por ser essa a concentração de maior estabilidade, ao contrário das cápsulas 1 %, cujo percentual foi apenas 8,9 %. Os sistemas à base de alginato 3 % (ALG 3 % e ALG 3 %/QUI 0,4 %) apresentaram valores similares (28 % e 31 %, respectivamente), demonstrando que a quitosana não interfere na eficiência de encapsulamento, quando comparada ao alginato puro. Para a matriz ALG 3 %/SIL (20 %), é possível que o percentual de células encapsuladas poderia ser maior, revestindo o alginato, primeiramente, com um polícatión, como poli-L-lisina ou quitosana. Como no processo de polimerização os silanóis tornam-se mais ácidos, adquirindo uma carga negativa, e o alginato é negativamente carregado em pH 7 (o potencial zeta apresentou um valor negativo), nenhuma interação eletrostática significativa poderia ser observada. Dessa maneira, a incorporação de um polícatión pode gerar uma sílica positiva e, conseqüentemente, uma matriz mais estável.

5.1.3 – Análise Textural e Morfológica

5.1.3.1 – Natureza das Matrizes

A fim de investigar a natureza textural e morfológica dos materiais empregados no encapsulamento foram utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (SEM), determinação do tamanho da partícula (DLS), potencial zeta e espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS).

Como ponto de partida, em uma primeira abordagem, investigamos quatro possíveis concentrações de alginato puro (não funcionalizado), como componente da

estrutura das cápsulas, analisadas por microscopia eletrônica de varredura. Como mostrado na Figura 2, as preparações contendo alginato 3 % levaram à formação de partículas de tamanho mais homogêneo e que não foram tão pequenas e irregulares quanto aquelas da concentração 1 %, bem como as de alginato 1,5 %, nem irregulares como no caso do alginato 2 % (Figura 2c). Assim, observa-se que o conteúdo de alginato influencia no tamanho e na morfologia das partículas: concentrações mais altas (2 % - 3 %) tendem a formar partículas maiores e com morfologia menos irregular.

No presente trabalho, as matrizes à base de alginato de sódio foram codificadas como ALG, seguida da respectiva concentração do material (1, 1,5, 2 e 3 %). Os materiais contendo alginato 3 %, que foram revestidos com quitosana 0,4 % e sílica, foram designados, respectivamente, como ALG 3 %/QUI 0,4 % e ALG 3 %/SIL.

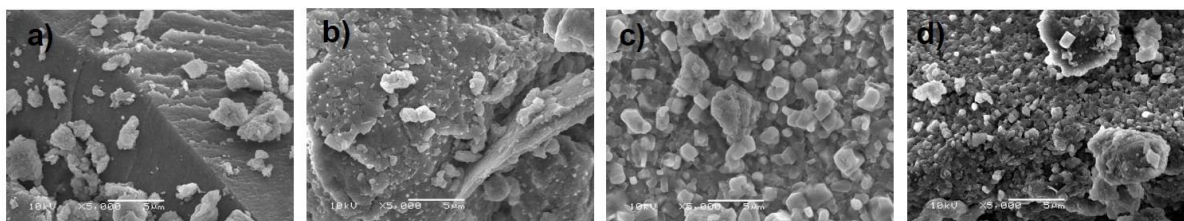
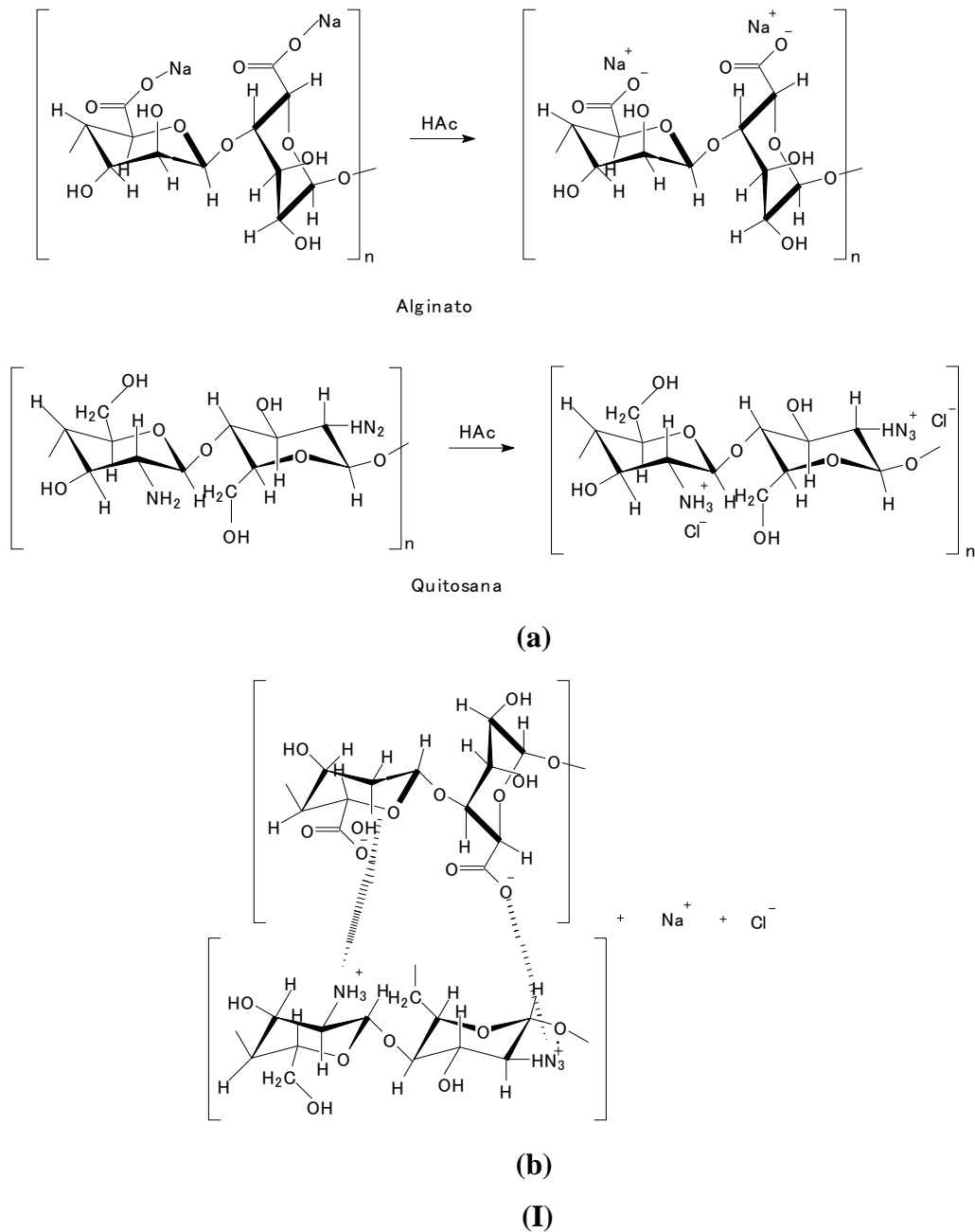


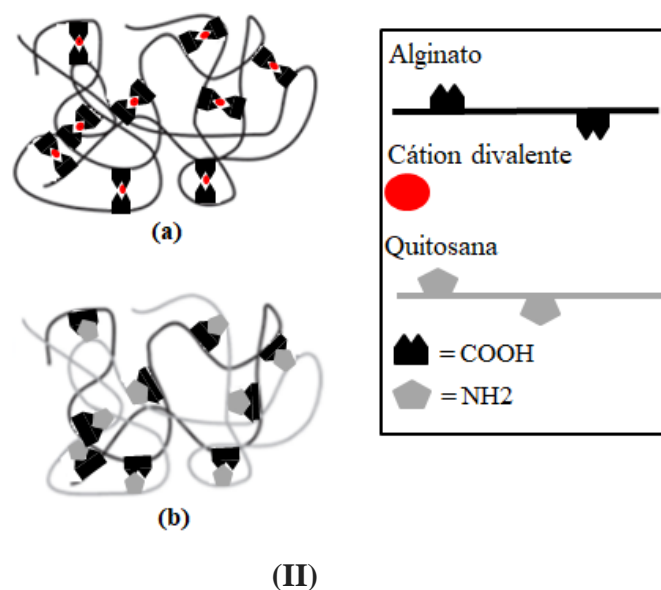
Figura 2. Aspecto morfológico das diferentes preparações de cápsulas por microscopia eletrônica de varredura. (a) ALG 1 %, (b) ALG 1,5 %, (c) ALG 2 % e (d) ALG 3 %. ALG 1 % = alginato 1 %; ALG 1,5 % = alginato 1,5 %; ALG 2 % = alginato 2 %; ALG 3 % = alginato 3 %

O diâmetro médio dos sistemas permaneceu na faixa de 415 nm a 4130 nm. De acordo com dados da literatura, sistemas à base de alginato e alginato com tripsina apresentam partículas com diâmetro na faixa de 185 nm a 920 nm em diferentes pHs¹⁴⁷. Já matrizes de alginato com quitosana apresentam partículas com diâmetro médio de 80 nm e são monodais¹⁴⁸.

De acordo com a Tabela 8, o aumento do teor de alginato foi proporcional ao tamanho das partículas. O menor tamanho das partículas de ALG 3 %/QUI 0,4 %, quando comparado ao ALG 3 %, pode ser explicado pelo fato de que as cadeias poliméricas mais curtas do alginato se difundem mais facilmente por entre as cadeias mais longas da quitosana, devido às fortes interações eletrostáticas iônicas e à complexação dos polímeros, formando uma rede mais densa¹⁴⁹. O Esquema 12 (I) (a) refere-se à dissociação do grupo COO do alginato e à protonação do grupo NH₂ da quitosana em meio ácido. Já o Esquema 12 (I) (b) refere-se à formação do complexo alginato/quitosana. A ligação entre os grupos aniônico e catiônico ocorre por meio de

ligações de hidrogênio. Os grupos amino (NH_2) e hidroxila (OH^-) da quitosana podem atuar como doadores de elétrons. No Esquema 12 (II) (a) e (II) (b) são esquematizadas, respectivamente, as interações alginato/ Ca^{2+} e alginato/quitosana.





Esquema 12. (I) (a) Dissociação do grupo COO do alginato e protonação do grupo NH₂ da quitosana em meio ácido. (I) (b) Reação entre o grupo aniônico do alginato e o grupo catiônico da quitosana. (II) (a) Representação esquemática da ligação alginato/íons Ca²⁺ e (II) (b) do complexo iônico alginato/quitosana.

O sistema ALG 3 % apresentou partículas de maior tamanho médio. Contudo, o maior tamanho das partículas de ALG 3 %/SIL pode ser devido à elevada área específica das partículas de sílica, permitindo um número maior de interações entre a sílica e o alginato. Na literatura, um estudo empregou partículas de sílica funcionalizada com aminoácidos, apresentando tamanho médio de 500 nm¹⁵⁰.

Tabela 8. Dados de tamanho médio das partículas e potencial zeta das partículas.

Sistema	Tamanho médio da partícula (nm)	Potencial zeta (mV)
ALG 1 %	414	-15,9
ALG 1,5 %	429	-20,8
ALG 2 %	1995	-27,7
ALG 3 %	4129	-17,9
ALG 3 %/QUI 0,4 %	533	-22,5
ALG 3 %/SIL	3061	-11,5

ALG 1 % = alginato 1 %; ALG 1,5 % = alginato 1,5 %; ALG 2 % = alginato 2 %; ALG 3 % = alginato 3 %; ALG 3 %/QUI 0,4 % = alginato 3 % + quitosana 0,4 %; ALG 3 %/SIL = alginato 3 % + sílica

Em relação ao potencial zeta (Tabela 8), observa-se um aumento dos valores com a concentração de alginato de 1 % a 2 %, sugerindo uma maior estabilidade. Por outro

lado, o alginato 3 % e o revestido com sílica exibiram valores menores. A diminuição dessas magnitudes decorre, possivelmente, do estabelecimento de interações eletrostáticas durante o processo de encapsulamento, com aglomeração do sistema e comprometimento da eficiência do processo.

Com base nos dados de DLS e potencial zeta, a eficiência de encapsulamento tende a aumentar o tamanho das partículas e do potencial zeta.

A estrutura multi-escala de partículas fractais pôde ser estudada pela técnica de Espalhamento de Raios X em Baixo Ângulo (SAXS)¹⁵¹, que investiga as diferenças nas densidades eletrônicas do material através do perfil de intensidade de espalhamento de Raios X. Por meio da análise das curvas de SAXS (Figura 3), que correspondem aos sistemas ALG 3 % e ALG 3 %/QUI 0,4 %, foi possível observar duas regiões. No primeiro nível (alto ângulo; $q > 0,1 \text{ \AA}^{-1}$), pode-se observar uma região de Guinier, que permite determinar o tamanho da partícula espalhadora (R_g). No segundo nível, situado a baixos valores de q ($q < 0,02 \text{ \AA}^{-1}$), é possível observar uma lei de potência que permite o cálculo da dimensão fractal dos agregados, formados a partir da agregação das partículas primárias, em que o expoente P pode assumir valores não inteiros entre 1 e 4 e está relacionado à dimensão fractal da partícula¹⁵².

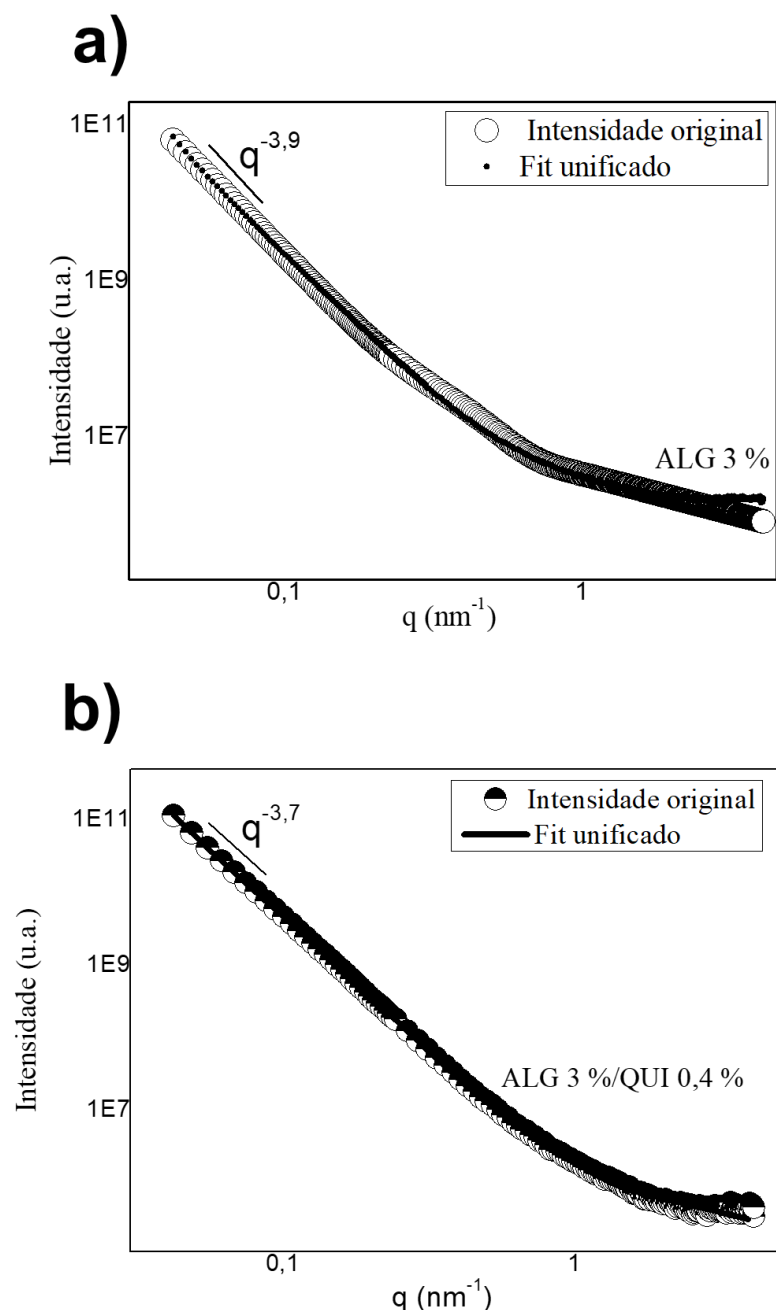


Figura 3. Curvas de espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS) plotadas como $I \times q$. (a) ALG 3 % e (b) ALG 3 %/QUI 0,4 %. **ALG 1 %** = alginato 1 %; **ALG 1,5 %** = alginato 1,5 %; **ALG 2 %** = alginato 2 %; **ALG 3 %** = alginato 3 %; **ALG 3 %/QUI 0,4 %** = alginato 3 % + quitosana 0,4 %; **ALG 3 %/SIL** = alginato 3 % + sílica

De acordo com a Tabela 9, todos os sistemas apresentaram dois níveis. Os valores de R_g mantiveram-se na faixa de 3,4 nm a 5,1 nm, observando-se um aumento do R_g com o teor de alginato. Isso ocorre, possivelmente, em função da agregação e associação lateral das partículas, proporcionais à concentração de alginato¹⁵³. Além disso, sistemas com R_g maiores geraram partículas com diâmetro maior, favorecendo o encapsulamento das células. Já os sistemas ALG 3 %/QUI 0,4% e ALG 3 %/SIL apresentaram R_g

menores, sugerindo que o efeito da interação alginato/quitosana e alginato/sílica promoveu uma diminuição do raio de giro. Em relação ao nível da lei das potências, todos os sistemas apresentaram valores de P na faixa de 3,7 a 3,9, indicando, portanto, uma tendência a partículas primárias esféricas.

Tabela 9. Raio de giro (Rg) e declividade (P) das curvas correspondentes aos sistemas.

Sistema	Rg nível 1 (nm)	P nível 2 (nm)
ALG 1 %	4,8	3,9
ALG 1,5 %	5,0	3,8
ALG 2 %	5,1	3,9
ALG 3 %	5,1	3,8
ALG 3 %/QUI 0,4 %	3,4	3,7
ALG 3 %/SIL	3,5	3,8

ALG 1 % = alginato 1 %; ALG 1,5 % = alginato 1,5 %; ALG 2 % = alginato 2 %; ALG 3 % = alginato 3 %; ALG 3 %/QUI 0,4 % = alginato 3 % + quitosana 0,4 %; ALG 3 %/SIL = alginato 3 % + sílica

Em suma, os dados de Rg corroboram a eficiência de encapsulamento. Observa-se uma tendência de sistemas mais eficientes, aqueles constituídos por teores mais elevados de alginato, sendo esses os que apresentaram Rg maiores. Todavia, as matrizes funcionalizadas com quitosana e sílica mostraram Rg menores e menor eficiência de encapsulamento (31 % e 20 %, respectivamente). Desse modo, o valor de Rg influencia o processo de encapsulamento, de modo que as matrizes funcionalizadas, em função das interações entre os polímeros, exibem valores de Rg menores.

5.1.4 – Análise Estrutural

A estrutura dos materiais foi investigada através de FTIR. A Figura 4 mostra as principais bandas da (a) quitosana, alginato de sódio e ALG 3 %/QUI 0,4 %. O sistema ALG 3 %/QUI 0,4 % apresentou bandas centradas em 1600 cm^{-1} e em 1413 cm^{-1} , que correspondem, respectivamente, à vibração do estiramento assimétrico e simétrico COO^- das moléculas de alginato¹⁵⁴. Esta banda foi deslocada em relação à molécula de alginato, sugerindo interação entre este polímero e a quitosana, possivelmente por meio de ligações de hidrogênio, conforme mostrado no Esquema 13. Em (b), é mostrado o sistema ALG 3 %/SIL. Nesse sistema, a camada de sílica mascarou o alginato, apresentando uma banda centrada aproximadamente em 1640 cm^{-1} , atribuída

à deformação da água¹⁵⁴. Em 800 cm^{-1} a banda corresponde ao estiramento simétrico ($\nu_{s(\text{Si-O})}$) da ligação Si – O da rede de sílica¹⁵⁵. Em 956 cm^{-1} detecta-se a deformação ($\delta_{\text{Si-O-H}}$) do grupo silanol¹⁵⁵.

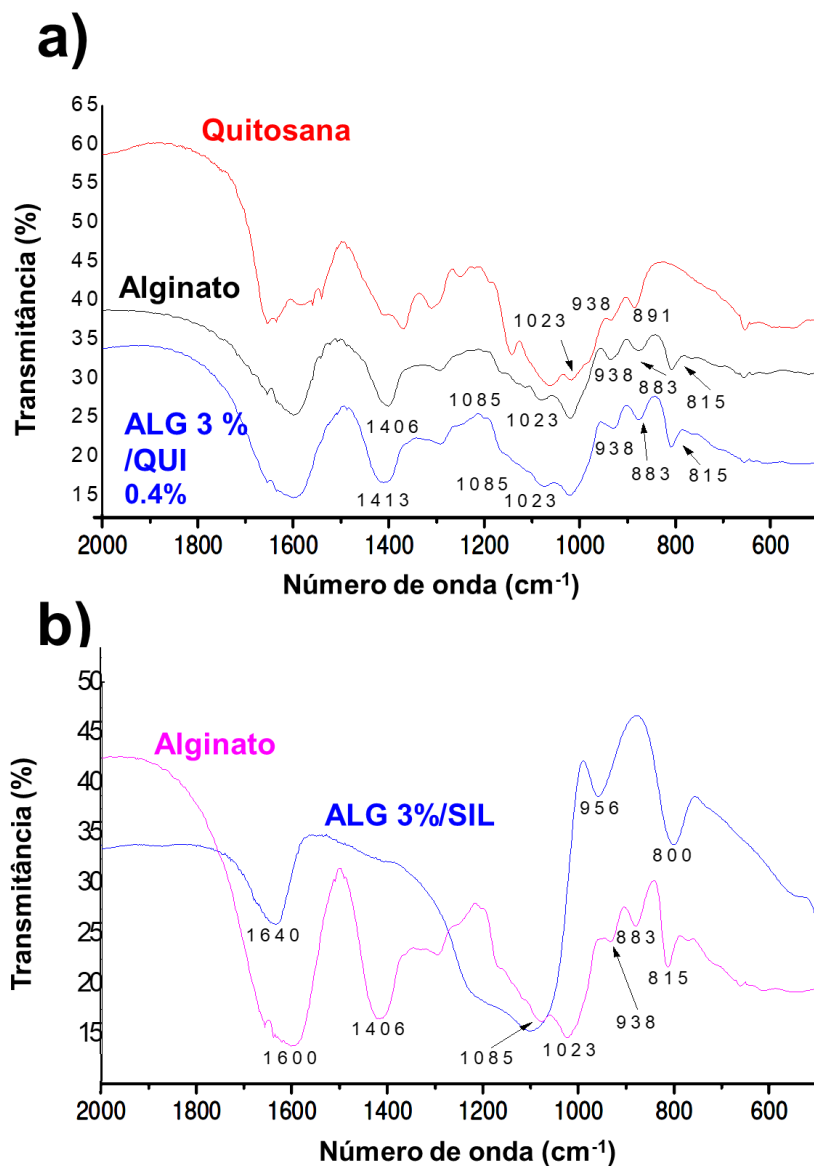


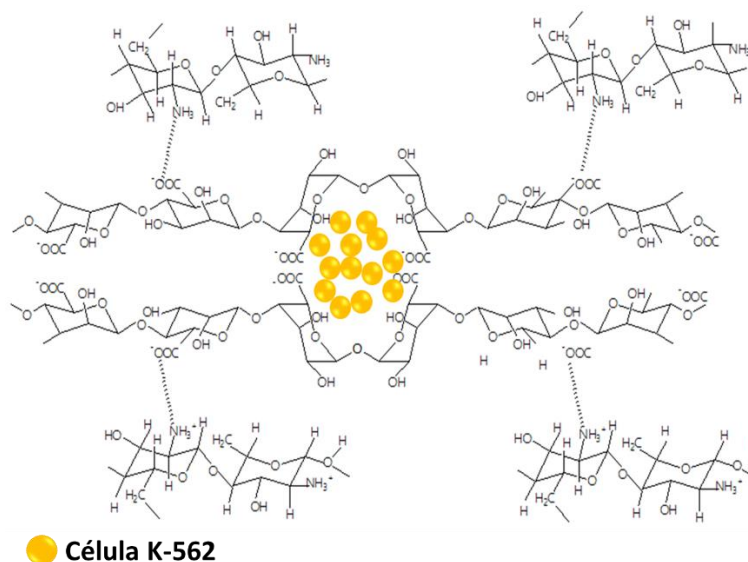
Figura 4. Espectros de FTIR. (a) Qitosana, alginato de sódio e ALG 3 %/QUI 0,4 %; (b) ALG 3 %/SIL e alginato de sódio. ALG 3 %/QUI 0,4 % = alginato 3 % + quitosana 0,4 %; ALG 3 %/SIL = alginato 3 % + sílica

De acordo com a Tabela 10, em 1085 cm^{-1} e em 1023 cm^{-1} observam-se picos referentes à vibração do estiramento C–O–C do alginato; já em 938 cm^{-1} bandas de estiramento C–O do alginato e da quitosana; a deformação da ligação C–H do ácido β -manurônico do alginato em 883 cm^{-1} . Na molécula de quitosana, a deformação da ligação C–H se encontra em 938 cm^{-1} . Finalmente, em 815 cm^{-1} observou-se um pico

correspondente à vibração do estiramento assimétrico C–O das moléculas de ácido β -manurônico do alginato.

Tabela 10. Principais bandas de FTIR de quitosana e alginato¹⁵⁴. Resolução 4 cm^{-1} .

	Número de onda (cm^{-1})			$\Delta\nu(\text{cm}^{-1})$
	Quitosana	Alginato	ALG 3%/QUI 0,4%	
$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$	-----	1600	1600	
$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$	-----	1406	1413	+7
$\nu(\text{C-O-C})$	-----	1085	1085	
$\nu(\text{C-O-C})$	1023	1023	1023	
$\nu(\text{C-O})$	938	938	938	
$\delta_{\text{C-O}}$	-----	883	883	
$\delta(\text{C-H})$	-----	815	815	



Esquema 13. Encapsulamento de células K-562 a partir da interação entre o grupo carboxila do alginato e o grupo amino da quitosana.

5.1.5 – Estudos de Viabilidade e Diferenciação Celular

A avaliação da viabilidade celular é importante para determinar a segurança de materiais empregados no encapsulamento celular. No presente estudo, a viabilidade das células K-562 encapsuladas foi investigada por meio dos ensaios com reagente *Trypan Blue*¹⁴¹ e *MTT*¹⁵⁶.

5.1.5.1 – Ensaio com *Trypan Blue*

As células K-562 foram avaliadas em termos de viabilidade após 30 minutos, 1, 2, 4 e 6 horas do encapsulamento, por meio do ensaio com *Trypan Blue*. Essa técnica consiste na contagem manual do número de células na câmara de Neubauer, utilizando o reagente *Trypan blue*. Esse corante é excluído do citoplasma de células viáveis. As células mortas, porém, são incapazes de excluí-lo e aparecem azuis¹⁴¹.

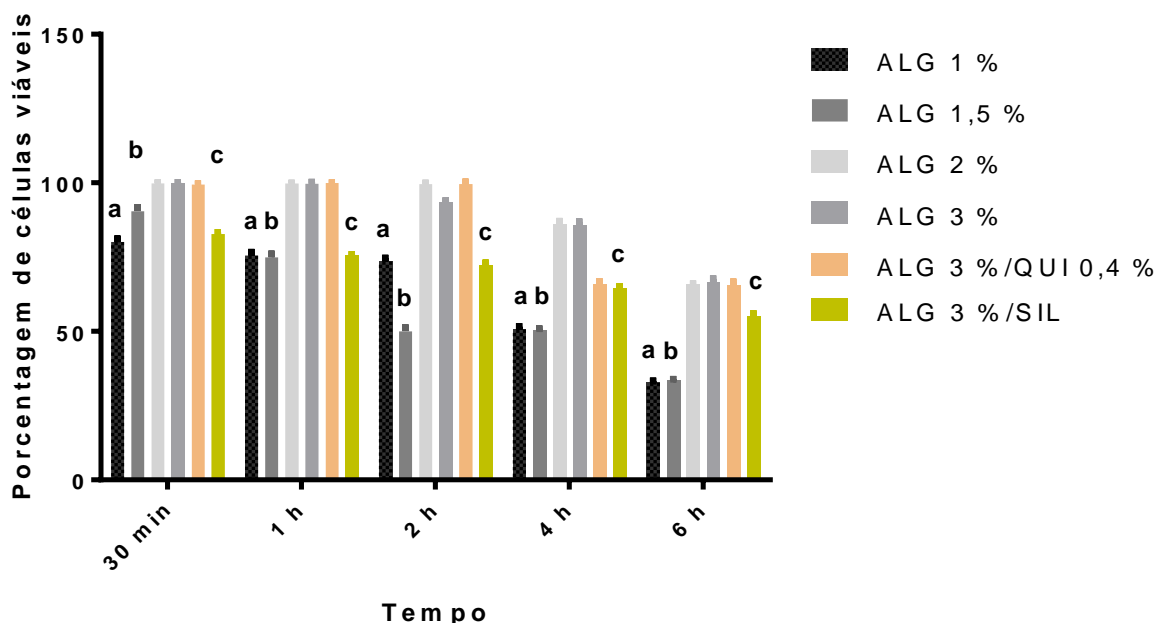


Figura 5. Porcentagem de células K-562 após encapsulamento. Para as comparações entre grupos por ANOVA de dois fatores, $p < 0,05$. **(a)** Diferença de ALG 1 % em relação aos sistemas ALG 2 % e ALG 3 %; **(b)** diferença de ALG 1,5 % em relação às matrizes ALG 2 % e ALG 3 %; **(c)** diferença entre ALG 3 %/SIL e os sistemas ALG 2 % e ALG 3 % e **(d)** diferença entre ALG 3 %/QUI 0,4 % e as matrizes ALG 2 % e ALG 3 %. **ALG 1 %** = alginato 1 %; **ALG 1,5 %** = alginato 1,5 %; **ALG 2 %** = alginato 2 %; **ALG 3 %** = alginato 3 %; **ALG 3 %/QUI 0,4 %** = alginato 3 % + quitosana 0,4 %; **ALG 3 %/SIL** = alginato 3 % + sílica

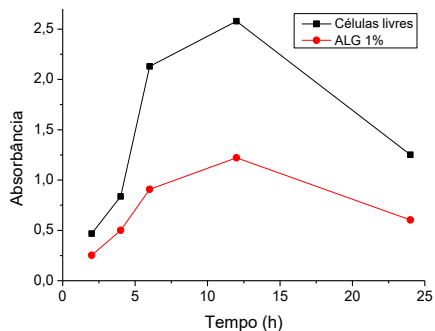
O percentual de viabilidade das células em condições de encapsulamento foi superior a 30 %, após 6 horas para todos os sistemas. Observou-se uma redução da viabilidade ao longo do tempo. Os sistemas ALG 2 %, ALG 3 % e ALG 3 %/QUI 0,4 % mantiveram viabilidade acima de 90 % após 2 horas, sendo superior a 60 % depois de 6 horas de cultivo. Esses resultados sugerem que sistemas com maior teor de alginato ou com matrizes de alginato funcionalizadas, como alginato com quitosana, constituem ambientes mais propícios à viabilidade celular. Concentrações na faixa de 2 % a 3 %

podem permitir um maior controle no fluxo de entrada de nutrientes e oxigênio, bem como de saída de produtos de excreção, o que é evidenciado pela taxa de viabilidade. Na literatura, a viabilidade das células K-562 é referida em um estudo com encapsulamento em alginato/poli-L-lisina, empregando a coloração com hematoxilina e eosina¹³². Após 4 dias, o percentual de viabilidade foi 19 %.

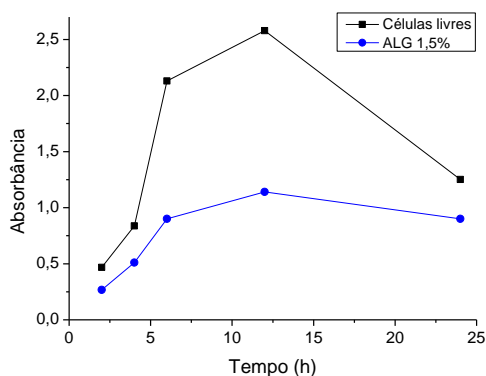
5.1.5.2 – Ensaio com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

A função celular primária é a respiração e outras atividades de NAD(P)H oxidorredutase. Portanto, as células encapsuladas foram submetidas ao ensaio com MTT. Esse teste é usado especificamente para avaliar a função mitocondrial de células viáveis, ao medir a atividade de desidrogenases celulares, que convertem o MTT, por meio de agentes redutores celulares, em um composto insolúvel de coloração violeta (formazan)¹⁵⁶. Se as desidrogenases não estiverem ativas por conta de efeitos citotóxicos, esse composto não será formado. A viabilidade é evidenciada pela mudança de coloração do meio (amarelo) em função da formação dos cristais de formazan (violeta).

a)



b)



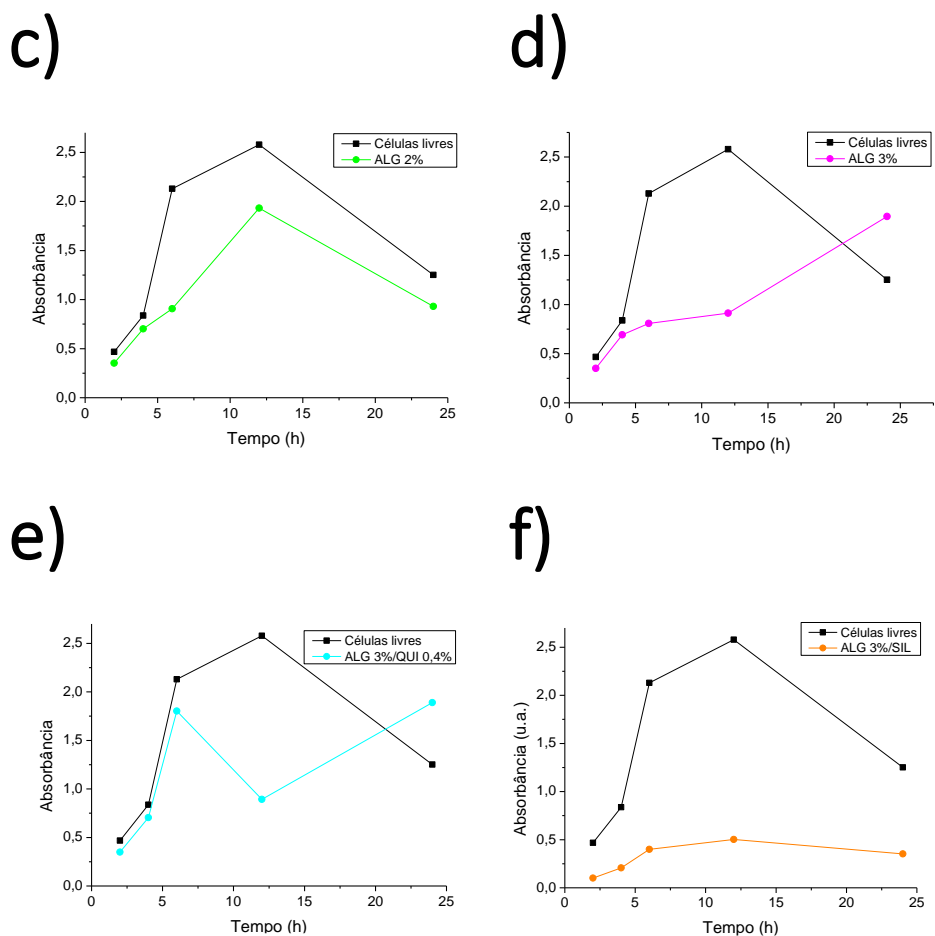


Figura 6. Curvas de viabilidade do ensaio MTT. Células livres e encapsuladas: (a) ALG 1 %, (b) ALG 1,5 %, (c) ALG 2 %, (d) ALG 3 %, (e) ALG 3 %/QUI 0,4 % e (f) ALG 3 %/SIL. ALG 1 % = alginato 1 %; ALG 1,5 % = alginato 1,5 %; ALG 2 % = alginato 2 %; ALG 3 % = alginato 3 %; ALG 3 %/QUI 0,4 % = alginato 3 % + quitosana 0,4 %; ALG 3 %/SIL = alginato 3 % + sílica

Como mostrado na Figura 6, as células encapsuladas apresentaram valores crescentes de absorbância, até 12 horas de exposição ao reagente MTT, com exceção do sistema ALG 3 %/QUI 0,4 %. Esses valores crescentes da absorbância sugerem um aumento gradual na atividade mitocondrial, viabilidade celular e, possivelmente, proliferação celular aumentada. Entre 12 e 24 horas, porém, a absorbância diminuiu, indicando uma redução da viabilidade durante o ensaio (Figuras 6a a 6c e 6g). Essa diminuição pode ser atribuída a fatores como formação de agregados celulares que dificultam a transferência de oxigênio, levando à morte celular. Para ALG 3 % e ALG 3 %/QUI 0,4 %, todavia, a partir de 12 horas a absorbância permaneceu em ascensão, indicando um efeito proliferativo.

Já em relação aos demais materiais (ALG 1 %; ALG 1,5 % e ALG 3 %/SIL), a faixa de absorvância permaneceu, aproximadamente, entre 0,3 e 1. Esses dados reforçam os resultados obtidos com a técnica do *Trypan Blue*, sugerindo, novamente, que a tendência de concentrações menores de alginato, além da sua integração à sílica, não é capaz de manter a viabilidade das células nas condições do encapsulamento. Nota-se que, embora as partículas do sistema ALG 3 %/SIL tenham apresentado tamanho favorável (Tabela 8) e boa estabilidade frente à desintegração (como será mostrado abaixo na Figura 8), apenas a preparação ALG 3 %/QUI 0,4 % (Figura 6e) alcançou um bom comportamento em termos de fisiologia celular. Esses dados reforçam os resultados obtidos no ensaio com *Trypan blue* (Figura 5), sugerindo, novamente, que concentrações mais baixas de alginato ou sua combinação com sílica não são capazes de manter alta viabilidade celular nas condições de encapsulamento. Contudo, não se pode negligenciar que, considerando-se a menor eficiência de encapsulamento observada para as preparações ALG 1 % e ALG 3 %/SIL (Tabela 7), implicando menor número de células encapsuladas, o que, por sua vez, representa menos enzimas mitocondriais para reduzir o MTT, isso poderia ser refletido nos baixos valores de absorvância.

5.1.5.3 – Diferenciação Eritroide

De acordo com a Tabela 11, a hemoglobina produzida por eritrócitos encapsulados foi determinada pelo método Drabkin modificado. Observou-se uma diminuição do valor da concentração de hemoglobina (fator de diluição 10) com o aumento do teor de alginato (2 % a 8 %). Isso pode ser explicado, considerando que o maior conteúdo de alginato dificulta a liberação da hemoglobina, quando as cápsulas estão em contato com o reagente de Drabkin, até o seu total aprisionamento quando o teor de alginato chega a 8 %. Com fator de diluição 20, observou-se, todavia, um aumento proporcional do conteúdo de alginato com a concentração de hemoglobina, até um máximo de 5 %, a partir do qual a concentração diminuiu. Possivelmente, teores de alginato crescentes geram cápsulas mais estáveis, as quais exercem maior controle no fluxo de moléculas e minimizam limitações de difusão. Contudo, o aumento progressivo da concentração de alginato limita a liberação de hemoglobina. Além disso, verificou-se que a diluição 1:20 favoreceu sua liberação, obtendo-se concentrações mais elevadas (30 μ M).

Tabela 11. Determinação de hemoglobina de eritrócitos encapsulados (Método Drabkin).

Sistema	Diluição	Concentração (μM)
ALG 2 %	1:10	$20 \pm 8,8$
ALG 3 %	1:10	$11 \pm 0,98$
ALG 5 %	1:10	$4,2 \pm 13$
ALG 8 %	1:10	$0,29 \pm 0,13$
ALG 1,5 %	1:20	36 ± 31
ALG 2 %	1:20	$11 \pm 0,29$
ALG 3 %	1:20	$30 \pm 0,81$
ALG 5 %	1:20	$21 \pm 0,57$
ALG 8 %	1:20	$0,96 \pm 0,38$
Sangue	1:10	810 ± 32

ALG 1,5 % = alginato 1,5 %; ALG 2 % = alginato 2 %; ALG 3 % = alginato 3 %; ALG 5 % = alginato 5 %; ALG 8 % = alginato 8 %

O método da óxido nítrico sintase modificado, devido à grande avidéz do óxido nítrico pelos grupos heme da hemoglobina, baseia-se na oxidação da forma ferrosa para a forma férrica. Por isso, pode ser utilizado para determinação de hemoglobina de células eritroleucêmicas K-562. Esse método determinou valores maiores para hemoglobina, quando comparado ao Drabkin. Para sistemas com ALG 3 %, a concentração esteve na faixa de $170 \mu\text{M}$ a $220 \mu\text{M}$ (Tabela 12). Por essas razões, o método da óxido nítrico sintase foi adotado para quantificação de hemoglobina de células K-562.

Tabela 12. Determinação de hemoglobina de eritrócitos encapsulados (Método da óxido nítrico sintase).

Sistema	Diluição	Concentração (μM)
ALG 3% (405 nm)	1:10	$170 \pm 0,57$
ALG 3% (421 nm)	1:10	$220 \pm 0,0$
Sangue (405 nm)	1:10	$2.200 \pm 0,0$
Sangue (421 nm)	1:10	3.000 ± 35

ALG 3 % = alginato 3 %

As células K-562 são extensivamente utilizadas como modelo para diferenciação hematopoiética¹⁵⁷. Embora essa população constitua uma linhagem celular de eritroleucemia humana¹⁵⁸, ela apresenta baixa proporção de síntese de hemoglobina, já que

as células cancerígenas tendem a ser extremamente indiferenciadas. Entretanto, possuem capacidade de sofrer diferenciação eritroide quando tratada com diversos agentes, incluindo 1-β-D-citosina arabinosídeo, actinomicina D e hidroxureia^{159, 160}. Porém, a maioria desses compostos tem natureza química e pouca relevância fisiológica. Já moléculas fisiológicas, como hemina, eritropoietina, ácido butírico e fator de diferenciação eritroide são conhecidas por induzir aumento na síntese de hemoglobina de células K-562^{161, 162}.

Desse modo, com o objetivo de investigar a manutenção da capacidade de diferenciação das células K-562 encapsuladas, procedeu-se ao ensaio de diferenciação eritroide, empregando hemina como agente indutor. Quanto maior a quantidade de hemoglobina em resposta à hemina, melhor o status de diferenciação. De acordo com a Tabela 13, o percentual de células diferenciadas manteve-se em uma faixa de 39 % a 55 % para todos os sistemas. Na literatura, o emprego de outros agentes indutores, como eritropoietina, promoveu diferenciação eritroide na faixa de 6,2 % a 41,2 %¹⁶³. Com hemina, há um estudo em que o percentual de células diferenciadas foi de 58,6 %¹⁶⁴. De acordo com esses dados, é possível que a matriz encapsuladora não interfere na capacidade de diferenciação eritroide, uma vez que em todos os sistemas foi observada diferenciação das células encapsuladas.

Além disso, observou-se um aumento proporcional do número de células benzidina-positivas com a concentração de alginato. Possivelmente, esse efeito é decorrente da progressiva estabilidade das cápsulas, quando o teor de alginato aumenta. Para as matrizes híbridas (ALG 3 %/QUI 0,4 % e ALG 3 %/SIL), houve um decréscimo do percentual em relação ao ALG 3 %, comprometendo a diferenciação eritroide. Outro fator a ser considerado é a possibilidade de interações entre os materiais, o que pode ter interferido na diferenciação. A síntese de hemoglobina em células encapsuladas também foi quantificada pelo método da óxido nítrico sintase modificado, e a quantificação da hemoglobina foi determinada por medidas de absorção em 405 nm e 421 nm, conforme descrito na seção de métodos.

Tabela 13. Concentração de hemoglobina e percentual de células benzidina-positivas nos diferentes sistemas de encapsulamento.

Sistema	Diluição	Concentração (μM)	Células benzidina-positivas (%)
ALG 1 %	1:10	2.1 ± 0.3	44 ± 4.0
ALG 1,5 %	1:10	2.1 ± 0.3	45 ± 3.5
ALG 2 %	1:10	1.7 ± 0.2	55 ± 5.0
ALG 3 %	1:10	1.7 ± 0.2	53 ± 4.0
ALG 3 %/QUI 0,4 %	1:10	2.3 ± 0.1	41 ± 3.6
ALG 3 %/SIL	1:10	2.3 ± 0.2	39 ± 4.0

ALG 1 % = alginato 1 %; **ALG 1,5 %** = alginato 1,5 %; **ALG 2 %** = alginato 2 %; **ALG 3 %** = alginato 3 %; **ALG 3 %/QUI 0,4 %** = alginato 3 % + quitosana 0,4 %; **ALG 3 %/SIL** = alginato 3 % + sílica

De acordo com a Tabela 13, a concentração de hemoglobina produzida pelas células K-562 encapsuladas permaneceu entre 1,7 μM e 2,3 μM . Observou-se uma tendência de aumento da concentração de hemoglobina com o teor de alginato, sugerindo que teores na faixa de 2 % a 3 % promovem uma liberação mais eficiente de hemoglobina. Em relação aos sistemas híbridos, a concentração foi maior comparada aos alginatos 2 % e 3 %. Todavia, não houve uma diferença significativa, demonstrando que a integração do alginato a um segundo polissacarídeo ou matriz inorgânica, além de não interferir na diferenciação celular, mantém funcional o sistema (as células mantêm a capacidade de se diferenciarem), viabilizando a liberação de proteínas e agentes terapêuticos.

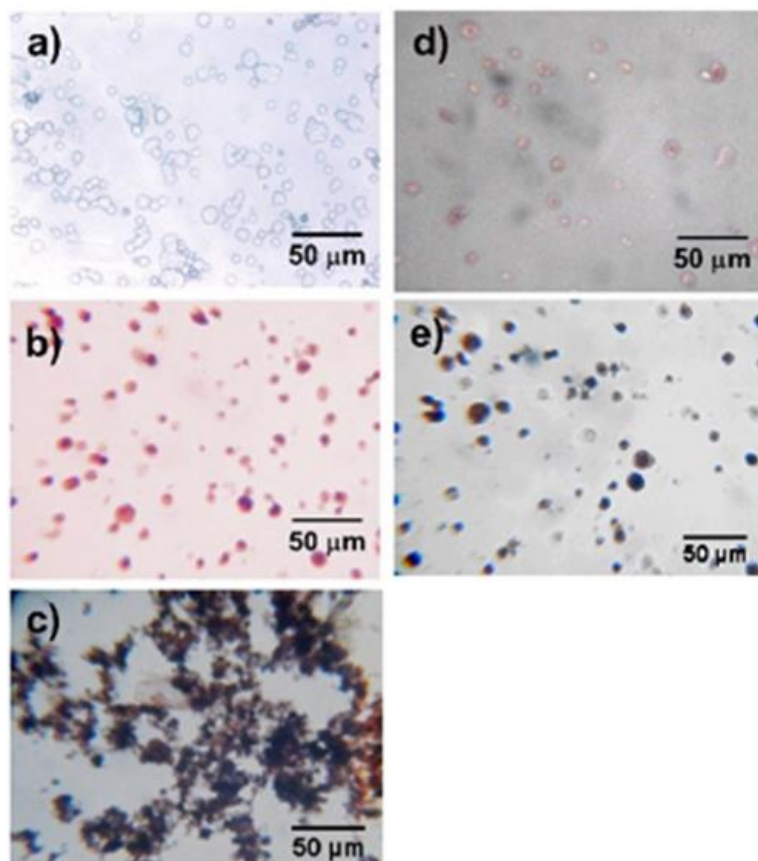


Figura 7. Diferenciação fisiológica de células K-562 com hemina. Microscopia de contraste com interferência diferencial de células K-562 diferenciadas com hemina após encapsulamento. (a) Células K-562 sem hemina, (b) células K-562 após 48 horas de tratamento com hemina 80 μM , (c) células K-562 em alginato 2 % após 48 horas de tratamento com hemina 600 μM , (d) células K-562 em ALG 3 %/QUI 0,4 % após 48 horas de tratamento com hemina 600 μM e (e) células K-562 em ALG 3 %/SIL após 48 horas de tratamento com hemina 600 μM . As barras de escala incam as ampliações originais.

A fim de obter mais informações sobre os efeitos de diferentes métodos de encapsulamento na diferenciação celular, cultivamos células K-562 não encapsuladas (livres), por 48 horas, em cultura na presença de cloreto de hemina 80 μM (Figura 7b). As micrografias mostram também células K-562 encapsuladas em alginato 2 %, após 48 horas de tratamento com hemina 600 μM (Figura 7c), em alginato 3 %/quitosana 0,4 % (Figura 7d) e em alginato 3 %/SIL (Figura 7e). Obviamente o tratamento com hemina induziu a diferenciação visível nas células (Figura 7a *versus* Figura 7b), que pode ser inferida a partir da coloração avermelhada, indicativa da presença de grande quantidade de hemoglobina. Por outro lado, o cultivo de células encapsuladas na presença de hemina

afeta, de modo diferente, o estado de diferenciação das células: alginato 3 %/quitosana 0,4 % (Figura 7d), de longe, produziu os melhores resultados quando comparados ao alginato 2 % (Figura 8c) ou 3 %/SIL (Figura 7e). Dessa forma, é possível garantir a manutenção da capacidade de diferenciação eritroide de células K-562 encapsuladas, a qual é bastante preservada em matrizes híbridas, como alginato/quitosana.

5.1.6 – Ensaio de Desintegração dos Hidrogéis com Células K-562 em PBS

O processo de desintegração das cápsulas foi investigado por um período de 24 horas.

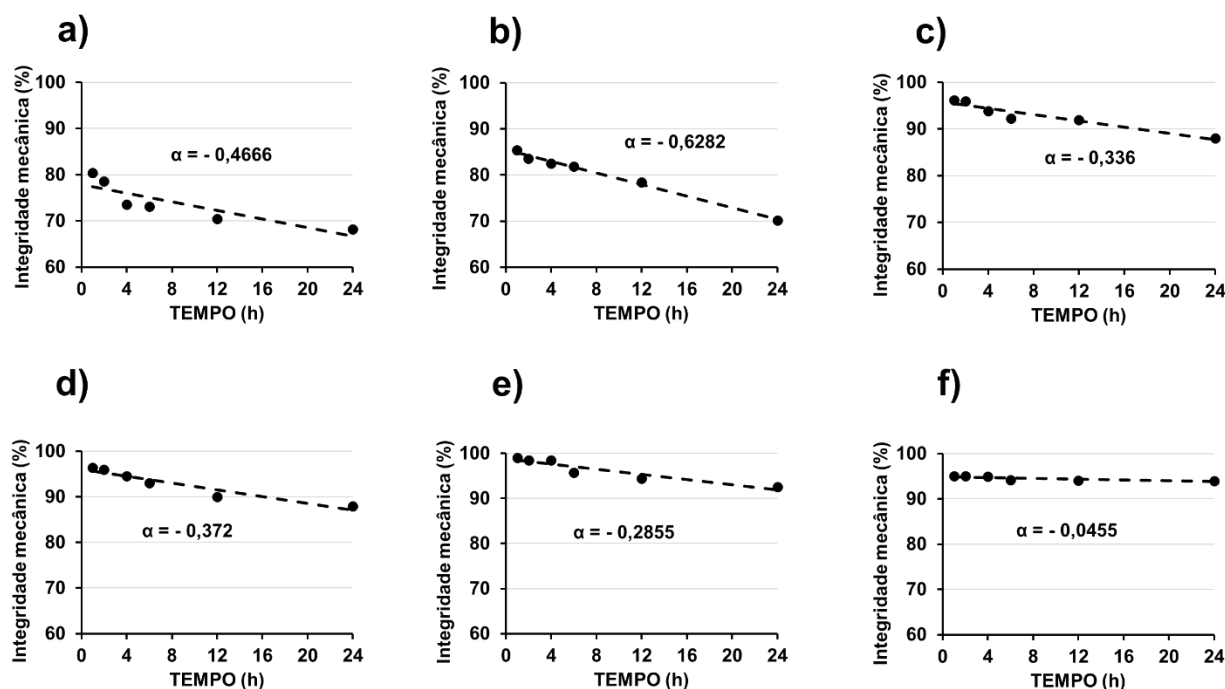


Figura 8. Curvas de desintegração dos sistemas durante 24 horas. (a) ALG 1 %, (b) ALG 1,5 %, (c) ALG 2 %, (d) ALG 3 %, (e) ALG 3 %/QUI 0,4 % e (e) ALG 3 %/SIL. ALG 1 % = alginato 1 %; ALG 1,5 % = alginato 1,5 %; ALG 2 % = alginato 2 %; ALG 3 % = alginato 3 %; ALG 3 %/QUI 0,4 % = alginato 3 % + quitosana 0,4 %; ALG 3 %/SIL = alginato 3 % + sílica. α = inclinação das retas.

A Figura 8 mostra uma representação linear dos sistemas. Observou-se uma desintegração gradual durante esse período. A porcentagem de integridade dos sistemas permaneceu entre 80 % e 94 %. Para sistemas com menor teor de alginato, o processo de desintegração das cápsulas foi mais rápido, mantendo um percentual de integridade de

apenas 68, 2 % e 70 %, respectivamente, para ALG 1 % e ALG 1,5 % após 24 horas, sugerindo possível instabilidade fisiológica do alginato em baixas concentrações. À medida que a concentração de alginato aumenta, a integridade aumenta (88 %) para ALG 2 % e ALG 3 %. O processo de desintegração é ainda mais lento, devido à funcionalização da matriz ALG 3 % com quitosana e sílica. Isso pode ser explicado pela estabilidade mecânica fornecida pelas matrizes combinadas ao alginato. Para ALG 3 %/QUI 0,4 % e ALG 3 %/SIL, a integridade permaneceu em 99 % e 94 %, respectivamente. De fato, as inclinações das curvas de porcentagem de integridade das cápsulas híbridas de alginato (Figuras 8e e 8f) diferem significativamente ($P = 0,0001$) daquelas das preparações restantes (Figuras 8a a 8d). Assim, a funcionalização do alginato é fundamental, a fim de aumentar sua estabilidade mecânica em meio fisiológico. Matrizes funcionalizadas podem permanecer estáveis por longos períodos.

Os resultados de caracterização podem explicar o comportamento dos sistemas em termos de viabilidade e diferenciação celular. Os resultados de DLS e SAXS sugeriram que as células encapsuladas em materiais com baixo conteúdo de alginato, permaneceram menos viáveis e menos diferenciadas, quando comparadas às células encapsuladas em matrizes com maior conteúdo de alginato. Esse fenômeno ocorre porque o tamanho das partículas influencia a viabilidade e a diferenciação celular. Assim, os sistemas formados por partículas maiores parecem oferecer ambientes favoráveis à manutenção das condições de viabilidade e do potencial de diferenciação. A técnica do potencial zeta mostrou que sistemas mais estáveis (maior conteúdo de alginato) foram mais viáveis e mantiveram a diferenciação celular. Além disso, o potencial zeta explicou a estabilidade com base na eficiência do encapsulamento: quanto mais estáveis os sistemas, mais eficientes os processos de encapsulamento. Assim, as técnicas de DLS, SAXS e potencial zeta mostraram que os sistemas formados por partículas maiores, tendem a ser mais estáveis, proporcionando condições adequadas para o fluxo de oxigênio e de nutrientes. Em relação às matrizes híbridas, além dos resultados potenciais de DLS, SAXS e potencial zeta, é importante considerar os efeitos das interações entre alginato/ quitosana e alginato/sílica. De acordo com os resultados obtidos, o ALG 3 % apresentou maiores viabilidade e percentual de diferenciação, quando comparado ao menor conteúdo de alginato. No entanto, o alginato, quando combinado com sílica, apresentou diferenciação reduzida. Possivelmente, as interações entre as matrizes podem estar influenciando o processo de encapsulamento e, conseqüentemente, o fluxo de oxigênio e de nutrientes, essenciais à sobrevivência celular.

A seguir, serão apresentados os resultados de caracterização, viabilidade celular, secreção de insulina e desintegração dos sistemas com células MIN-6 encapsuladas.

5.2 – ENCAPSULAMENTO DAS CÉLULAS MIN-6

5.2.1 – Estudo do Processo de Encapsulamento das Células MIN-6

A linhagem celular de insulinoma de rato MIN-6 foi encapsulada em matrizes puras de alginato 2 % e combinadas com agarose 1 %, amido 1 %, celulose 1 %, gelatina 1 %, glicina 1 %, PEG 5 mg/mL, quitosana 0,4 % e sílica. A Figura 9 apresenta os sistemas produzidos a partir do encapsulamento das células MIN-6. Conforme já relatado, a funcionalização do alginato com outros polímeros é necessária, devido à maior estabilidade das cápsulas produzidas. Nesse sentido, o presente estudo combinou alginato com estruturas positivamente carregadas, como gelatina, glicina e quitosana. A existência de grupos carboxílicos no alginato é uma de suas vantagens em relação a essas moléculas, facilitando a modificação da sua estrutura pela combinação com as mesmas. A interação entre essas matrizes ocorre a partir da ligação do grupo carboxílico com o grupo amino da quitosana, da glicina e dos aminoácidos da gelatina.

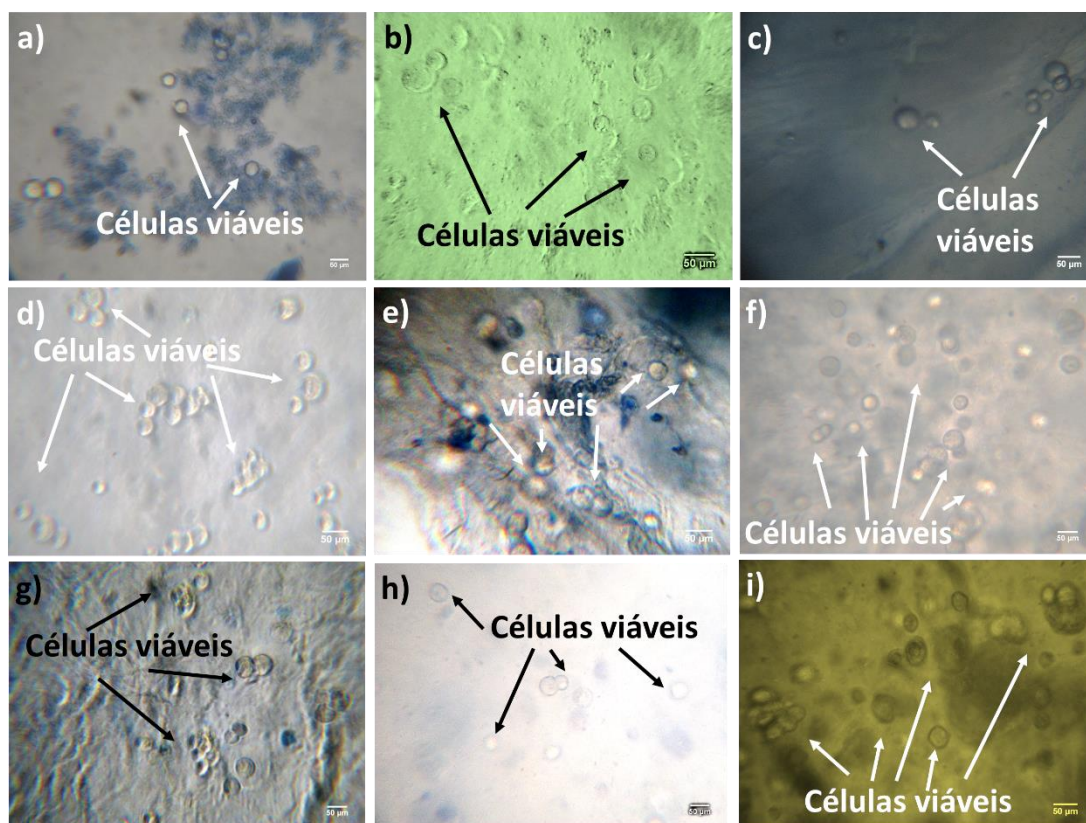


Figura 9. Viabilidade celular pós-encapsulamento. Microscopia com contraste de fase durante coloração com *Trypan blue*. (a) Células MIN-6 encapsuladas em ALG 2 %, ampliação 40X; (b) células MIN-6 encapsuladas em ALG 2 %/AGA 1 %, ampliação 40X; (c) células MIN-6 encapsuladas em ALG 2 %/AMI 1 %, ampliação 40X; (d) células MIN-6 encapsuladas em ALG 2 %/CEL 1 %, ampliação 40X; (e) células MIN-6 encapsuladas em ALG 2 %/GEL 1 %, ampliação 40X; (f) células MIN-6 encapsuladas em ALG 2 %/GEL 1 %/PEG 5 mg/mL, ampliação 40X; (g) células MIN-6 encapsuladas em ALG 2 %/GLI 1 %, ampliação 40X; (h) células MIN-6 encapsuladas em ALG 2 %/QUI 0,4 %, ampliação 40X; (i) células MIN-6 encapsuladas em ALG 2 %/QUI 0,4 %/SIL ampliação 40X. Células viáveis (brilhantes) são indicadas com setas. As barras de escala indicam o tamanho real nas ampliações originais. **ALG** = alginato; **ALGAGA** = alginato + agarose; **ALGAMI** = alginato + amido; **ALGCEL** = alginato + celulose; **ALGGEL** = alginato + gelatina; **ALGGELPEG** = alginato + gelatina + polietilenoglicol; **ALGGLI** = alginato + glicina; **ALGQUI** = alginato + quitosana e **ALGQUISIL** = alginato + quitosana + sílica

Além dos materiais catiônicos, as cápsulas de alginato 2 % foram também revestidas com polímeros, como agarose, amido e celulose. Alginato e agarose diferem em termos do mecanismo de gelificação, estabilidade química e porosidade¹⁶⁵. Além disso, a cinética de gelificação do alginato é mais rápida¹⁶⁵, permitindo sua combinação com a agarose. Outras vantagens do uso de agarose referem-se à presença de grupos ionizáveis em sua estrutura, capazes de interagir com outros polímeros. Em relação à celulose, propriedades como baixa densidade, elevada resistência mecânica, baixa toxicidade, bem como a presença de superfícies grandes e altamente reativas¹⁶⁶ apresentadas por esse polímero, sugerem sua aplicação como matriz de funcionalização. Além disso, a presença de grupos hidroxila fornecem à celulose propriedades reológicas únicas¹⁶⁷, influenciando, possivelmente, as interações com o alginato. Já em relação às aplicações do amido como matriz de funcionalização, sua combinação com alginato, além de aumentar a estabilidade mecânica do alginato, também aumenta a resistência de materiais termoplásticos de amido¹⁶⁸.

As cápsulas de alginato/gelatina foram ainda revestidas com PEG. As vantagens da combinação com PEG referem-se ao seu caráter hidrofílico, devido aos grupos hidroxila, e à sua solubilidade em água, favorecendo as interações entre os polímeros.

Adicionalmente a esses materiais, o presente estudo promoveu o encapsulamento das células MIN-6 em alginato combinado com sílica. O uso de materiais híbridos

inorgânicos-orgânicos apresenta vantagens do componente orgânico (alginato), como biocompatibilidade, elasticidade e flexibilidade, bem como vantagens do componente inorgânico (sílica), como resistência térmica, estabilidade química, além de ser biologicamente inerte. Contudo, devido à repulsão entre as cargas negativas dos grupos carboxílicos do alginato e dos grupos silanóis da sílica, um polímero catiônico como quitosana foi adicionado entre as matrizes orgânica e inorgânica.

5.2.2 – Determinação da Eficiência de Encapsulamento das Células MIN-6

A Tabela 14 apresenta a eficiência do encapsulamento das células MIN-6 nas matrizes alginato e alginato funcionalizado.

Tabela 14. Valores percentuais da eficiência do encapsulamento dos sistemas.

Sistema	Eficiência do Encapsulamento (%)
ALG	63
ALGAGA	65
ALGAMI	58
ALGCEL	85
ALGGEL	50
ALGGELPEG	75
ALGGLI	76
ALGQUI	69
ALGQUISIL	74

ALG = alginato; **ALGAGA** = alginato + agarose; **ALGAMI** = alginato + amido; **ALGCEL** = alginato + celulose; **ALGGEL** = alginato + gelatina; **ALGGELPEG** = alginato + gelatina + polietilenoglicol; **ALGGLI** = alginato + glicina; **ALGQUI** = alginato + quitosana e **ALGQUISIL** = alginato + quitosana + sílica

De acordo com os percentuais de encapsulamento, os sistemas produzidos encapsularam as células entre 50 % (ALGGEL) e 85 % (ALGCEL). Observou-se, de modo geral, um aumento da eficiência de encapsulamento com a combinação do alginato às demais matrizes. Em relação ao ALG, cujo percentual de encapsulamento foi 63 %, apenas os materiais ALGAMI e ALGGEL foram menos eficientes, encapsulando, respectivamente, 58 % e 50 %. Fatores como o menor tamanho da partícula do sistema ALGAMI (1056 nm) e o baixo valor de potencial zeta, no caso do sistema ALGGEL (0,0166 mV), podem justificar esse comportamento (dados de tamanho da partícula e

potencial zeta serão mostrados abaixo). De acordo com os resultados de DLS, observou-se uma tendência de sistemas com partículas maiores encapsularem mais eficientemente as células, ao passo que matrizes cujos diâmetros das partículas foram menores, exibiram eficiências mais baixas. Exemplos disso foram os sistemas ALG e ALGAMI, apresentando percentuais baixos de encapsulamento, respectivamente, 63 % e 58 %, e partículas relativamente pequenas.

5.2.3 – Análise Textural e Morfológica

5.2.3.1 – Natureza das Matrizes

A Tabela 15 mostra dados de tamanho da partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e diâmetro de poro dos sistemas.

Tabela 15. Tamanho médio da partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta.

Sistema	Tamanho médio da partícula (nm)	Índice de polidispersividade	Potencial zeta (mV)
ALG	1995	0,5	-27,7
ALGAGA	3445	0,6	-18,3
ALGAMI	1056	0,7	-25,7
ALGCEL	2373	0,7	-15,2
ALGGEL	2940	0,7	+0,0166
ALGGELPEG	4873	0,7	-8,51
ALGGLI	4353	0,5	+0,00318
ALGQUI	2643	0,9	-0,0269
ALGQUISIL	1656	0,5	-0,408

ALG = alginato; ALGAGA = alginato + agarose; ALGAMI = alginato + amido; ALGCEL = alginato + celulose; ALGGEL = alginato + gelatina; ALGGELPEG = alginato + gelatina + polietilenoglicol; ALGGLI = alginato + glicina; ALGQUI = alginato + quitosana e ALGQUISIL = alginato + quitosana + sílica

De acordo com a Tabela 15, o diâmetro médio dos sistemas permaneceu na faixa de 1056 nm (ALGAMI) a 4873 nm (ALGGELPEG). As partículas do sistema ALG apresentaram um tamanho de 1995 nm. Na literatura, partículas de alginato para encapsulamento de proteínas terapêuticas mostraram tamanho médio em torno de 3110 nm¹⁶⁹. Além disso, há um estudo que encapsulou doxorubicina em alginato, e as partículas apresentaram tamanho de 1395 nm¹⁷⁰.

No presente estudo, observou-se, de um modo geral, um aumento do tamanho médio dos materiais funcionalizados. Esse aumento foi influenciado pela natureza da matriz combinada ao alginato, bem como pelo número de polímeros adicionados a ele.

Isso ocorreu, por exemplo, com o sistema ALGGEL, cujo tamanho médio das partículas foi de 2940 nm. Outros fatores, como as interações entre as matrizes, a tensão superficial da solução de alginato, bem como a velocidade do fluxo de alginato e de agitação da solução de CaCl_2 , também podem ter influenciado no tamanho das partículas.

Na literatura, partículas de alginato/gelatina, visando ao encapsulamento de proteínas, mostraram diâmetro entre 826 nm e 895 nm¹⁷¹. Ao revestir alginato/gelatina com PEG, o sistema resultante, ALGGELPEG, passou a apresentar o maior tamanho de partícula (4873 nm). É possível que a adição de PEG aumente o tamanho das partículas, resultando na formação de partículas grandes. De acordo com um estudo, em que matrizes de alginato/PEG foram utilizadas como microtransportadores de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical, as partículas exibiram tamanho na faixa de 7000 nm a 19000 nm¹⁷². Segundo os autores, a adição de PEG pode diminuir o grau de reticulação dos materiais, resultando no aumento do tamanho das partículas. Para ALGAGA, ALGCEL e ALGGLI, o tamanho das partículas foi, respectivamente, 3445 nm, 2373 nm e 4353 nm. É possível que teores de agarose, celulose e glicina, respectivamente, tenham diminuído o grau de reticulação, resultando no aumento do tamanho das partículas. Na literatura, matrizes à base de alginato/agarose, para encapsulamento de sulfato férrico, produziram partículas com um diâmetro de 4933 nm¹⁷³. Em relação a partículas alginato/celulose, o tamanho manteve-se entre 70 nm e 100 nm, em um estudo que promoveu o encapsulamento de rifampicina¹⁷⁴. Já para alginato funcionalizado com glicina, o tamanho é reduzido para cerca de 79 nm, quando essa matriz é utilizada como adsorvente para remoção de íons cálcio¹⁷⁵.

Para o sistema ALGQUI, a reticulação do alginato com quitosana resultou em uma matriz cujo tamanho médio das partículas foi de 2643 nm. Nesse caso, o aumento do tamanho da partícula pode, também, ser explicado pela repulsão das cargas positivas, provenientes da quitosana, elevando o diâmetro das partículas. Na literatura, partículas à base de alginato e quitosana exibem tamanho médio de 3390 nm¹⁶⁹. Em relação ao sistema ALGQUISIL, o tamanho de partícula foi 1656 nm. Observa-se uma diminuição do tamanho, comparativamente ao ALGQUI. Nesse sentido, com a funcionalização desse sistema com sílica, é possível que a carga negativa dos silanóis propicie a neutralização do excesso de cargas positivas da quitosana, reduzindo o tamanho das partículas. Da mesma forma, o sistema ALG reduziu o tamanho das partículas a partir de sua funcionalização com amido (ALGAMI). Essa diminuição pode ter ocorrido devido a possíveis interações entre os polímeros. Em relação ao índice de polidispersividade (PDI),

os sistemas apresentaram valores que se mantiveram na faixa de 0,5 a 0,9, indicando uma tendência a uma distribuição não homogênea de tamanhos.

Em termos de potencial zeta, fator-chave na avaliação da estabilidade de dispersões coloidais¹⁷⁶, os sistemas exibiram valores entre -27,7 mV (ALG) e +0,00318 mV (ALGGLI), nos quais se observou um aumento desses potenciais com a funcionalização do alginato. A estabilidade dos sistemas coloidais está diretamente relacionada à magnitude do seu potencial zeta. Em geral, se o valor do potencial zeta das partículas for grande, o sistema é estável (o valor do potencial é maior que 30 mV ou menor que -30 mV)¹⁷⁶. Isso ocorre porque as repulsões eletrostáticas entre as partículas minimizam sua agregação. Por outro lado, se o potencial zeta da partícula for relativamente pequeno, o sistema aglomerará¹⁷⁷. O potencial zeta exibido por ALG deve-se à maior concentração de cargas negativas, provenientes dos grupos carboxílicos do alginato, indicando, por isso, grande estabilidade eletrostática, dada à repulsão entre essas cargas. Em relação às matrizes funcionalizadas, a incorporação de outros materiais levou à obtenção de potenciais zeta menores e menos negativos. A redução desses valores em relação ao ALG é devida, possivelmente, a interações eletrostáticas, durante o processo de produção, decorrentes entre grupos funcionais do alginato e da matriz adicionada, nos quais a carga das partículas exerce influência. Dentre essas matrizes combinadas, ALGAMI foi a que apresentou o valor mais negativo (-25,7 mV), seguida de ALGAGA, ALGCEL e ALGGELPEG, respectivamente, -18,3 mV, -15,2 mV e -8,51 mV. Os menores valores foram observados com ALGQUISIL, ALGQUI, ALGGEL e ALGGLI. Comparativamente ao ALG, nos sistemas contendo quitosana (ALGQUI e ALGQUISIL), os potenciais elevaram-se, devido a um possível acúmulo de cargas positivas oriundas da quitosana, sendo mais negativo para ALGQUISIL, por conta, possivelmente, da neutralização dessas cargas positivas pelos grupos silanóis. Fenômeno semelhante pode explicar o aumento do potencial zeta nos sistemas ALGGEL, ALGGELPEG e ALGGLI, devido, possivelmente, à neutralização com as cargas positivas dos aminoácidos (grupos amino) nos dois primeiros, e ao grupo amino da glicina em ALGGLI. Em relação ao ALGGELPEG, a adição de PEG ao sistema ALGGEL promoveu um aumento da estabilidade dessa matriz. De acordo com a literatura, o encapsulamento de células Hela em alginato/PEG, apresentou potencial zeta positivo (11,5 mV)¹⁰¹, comparado ao sistema ALGGELPEG (-8,51 mV). O valor positivo resultante do encapsulamento das células Hela é devido ao excesso de cargas positivas do grupo amino da gelatina e PEG. No

presente estudo, o valor de potencial zeta negativo para o sistema ALGGELPEG é resultado do predomínio de cargas negativas do alginato.

5.2.4 – Análise Estrutural

A Figura 10 retrata alguns exemplos dos espectros de FTIR resultantes. De acordo com a Figura 10, observam-se os espectros de (a) ALGGELPEG, (b) gelatina, (c) PEG e (d) alginato. As principais bandas e seus deslocamentos serão descritos e discutidos.

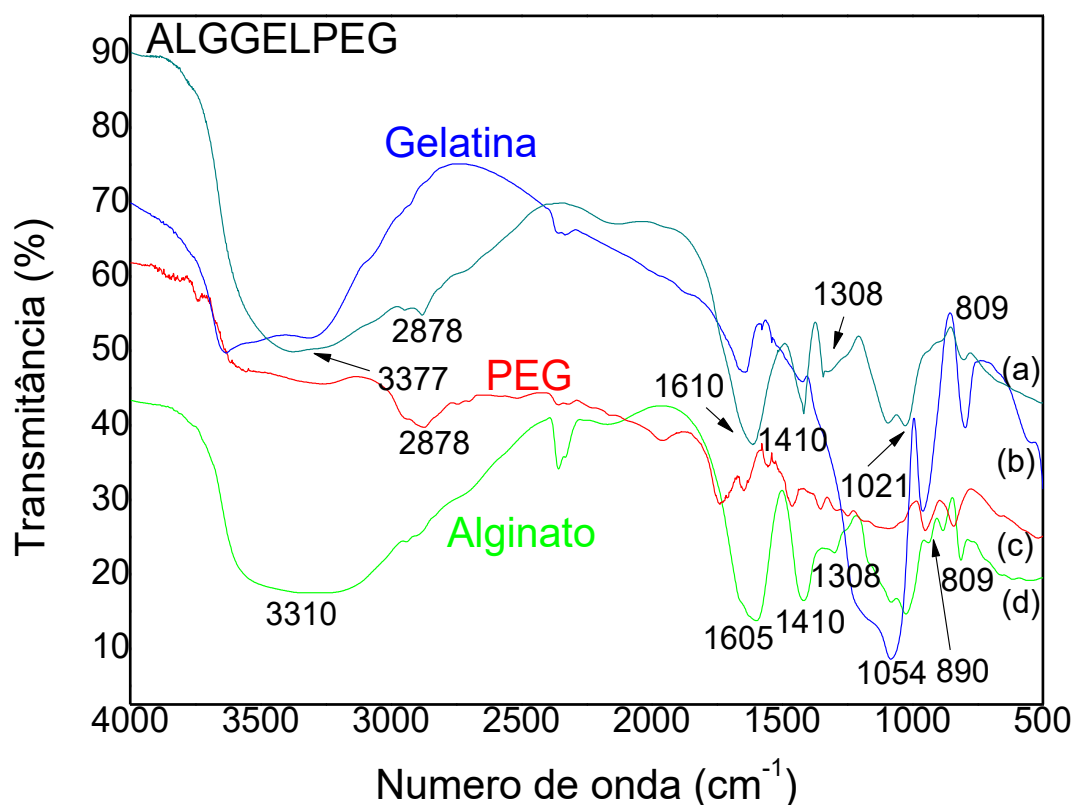


Figure 10. Espectros de FTIR. (a) ALGGELPEG, (b) gelatina, (c) PEG e (d) alginato. ALGGELPEG = alginato + gelatina + polietilenoglicol

A Tabela 16 mostra as principais bandas dos materiais empregados no encapsulamento das células MIN-6. A banda centrada em aproximadamente 3310 cm^{-1} refere-se à vibração do estiramento do grupo OH. Todos os sistemas funcionalizados apresentaram deslocamento dessa banda em relação ao ALG, sugerindo possíveis interações entre os materiais. Nos sistemas ALGGEL, ALGGELPEG, ALGGLI e ALGQUIISIL, a banda foi deslocada para 3377 cm^{-1} . Em ALGAGA, ALGAMI, ALGCEL e ALGQUI, o deslocamento ocorreu, respectivamente, para 3456 cm^{-1} , 3405 cm^{-1} , 3398 cm^{-1} e 3393 cm^{-1} . A banda em 1605 cm^{-1} , atribuída à vibração do estiramento

assimétrico do grupo carboxílico do alginato, foi deslocada para 1610 cm^{-1} em todos os sistemas. A banda em 1410 cm^{-1} , associada à vibração do estiramento simétrico do grupo carboxílico, e em 1308 cm^{-1} , atribuída à vibração de estiramento CH_2 , foram observadas em todos os sistemas. Em 1054 cm^{-1} , a banda correspondente ao estiramento C–O (ALG e ALGAGA) foi observada, deslocando-se para 102 cm^{-1} em outras matrizes. Em 890 cm^{-1} , é observada a deformação da ligação C–H das unidades de ácido manurônico do alginato, com exceção de ALGSTA, ALGCEL, ALGGEL e ALGGELPEG. Para ALGGLI, essa banda ocorreu em 900 cm^{-1} . Em 809 cm^{-1} , a vibração da banda de estiramento da ligação C–O das moléculas de ácido manurônico foi observada (ALGAMI não apresentou essa banda). Em relação às matrizes funcionalizadas, o sistema ALGAGA mostrou uma banda centrada em 2878 cm^{-1} , referindo-se ao estiramento C–H do grupo CH_2 .

Tabela 16. Principais bandas de FTIR das matrizes de encapsulamento 4 m⁻¹⁵⁴.

	Matriz de funcionalização								Sistema									
	Número de onda (cm ⁻¹)																	
	AGA	CEL	QUI	GEL	GLI	PEG	SIL	AMI	ALG	ALG AGA	ALG AMI	ALG CEL	ALG GEL	ALG GEL PEG	ALG GLI	ALG QUI	ALGQUI SIL	
$\nu_{(O-H)}$	3655	3563	3310	3294	3182	3294	----	3266	3310	3456	3405	3398	3377	3377	3377	3393	3377	
$\nu_{(CH_2)}$	----	----	----	----	----	2878	----	----	----	----	----	----	----	2878	----	----	----	
$\nu_{as}(COO^-)$	----	----	1605	----	----	----	----	----	1605	1610	1610	1610	1610	1610	1610	1610	1610	
	----	----	----	----	1494	----	----	----	----	----	----	----	----	----	1494	----	----	
$\nu_s(COO^-)$	----	----	1410	----	----	----	----	----	1410	1410	1410	1410	1410	1410	1410	1410	1410	
$\nu_{(CH_2)}$	----	----	----	----	----	----	----	----	1308	1308	1308	1308	1308	1308	1308	1308	1308	
$\nu_{(C-O)}$	1054	----	1054	----	----	----	----	----	1054	1054	1021	1021	1021	1021	1021	1021	1021	
$\delta_{(C-H)}$	----	----	890	----	900	----	----	----	890	890	----	----	----	----	900	890	890	
$\nu_{(C-O)}$	----	----	----	----	----	----	----	----	809	809	----	809	809	809	809	809	809	

ALG = alginato; ALGAGA = alginato + agarose; ALGAMI = alginato + amido; ALGCEL = alginato + celulose; ALGGEL = alginato + gelatina; ALGGELPEG = alginato + gelatina + polietilenoglicol; ALGGLI = alginato + glicina; ALGQUI = alginato + quitosana; ALGQUISIL = alginato + quitosana + sílica

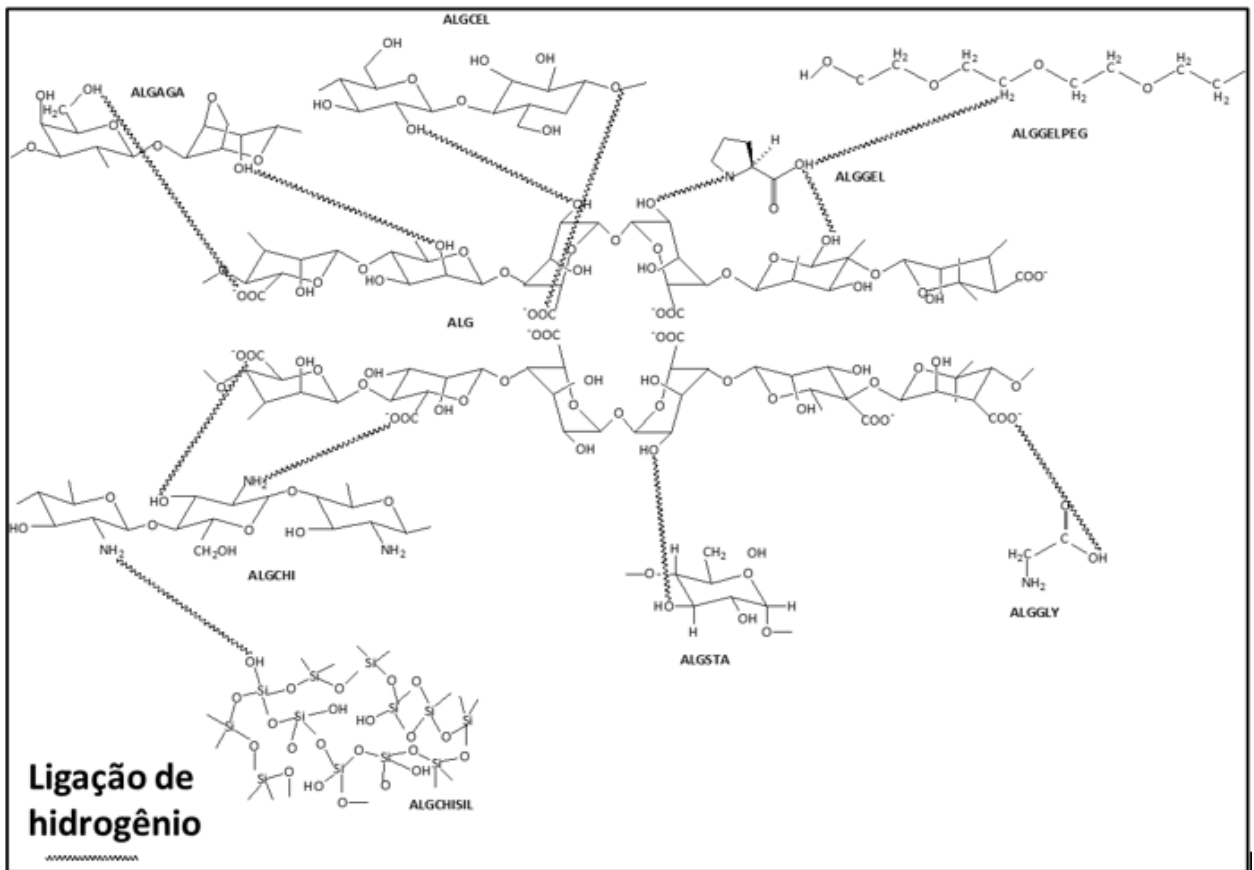
Com base na comparação entre bandas de alguns grupos funcionais antes e após a combinação entre alginato e polímeros funcionalizadores, alguns valores relevantes de deslocamento podem ser observados, conforme ilustrado na Tabela 17.

Tabela 17. Principais deslocamentos das bandas do alginato nos sistemas.

Sistema	$\Delta \nu (cm^{-1})$		
	Deslocamento		
	$\nu(O-H)$	$\nu_{as}(COO^-)$	$\nu(C-O)$
ALGAGA	-145	-5	-----
ALGCEL	-87	-5	+33
ALGGEL	-66	-5	+33
ALGGELPEG	-66	-5	+33
ALGGLY	-66	-5	+33
ALGQUI	-82		+33
ALGQUISIL	-66	-5	+33
ALGSTA	-94	-5	+33

ALG = alginato; **ALGAGA** = alginato + agarose; **ALGAMI** = alginato + amido; **ALGCEL** = alginato + celulose; **ALGGEL** = alginato + gelatina; **ALGGELPEG** = alginato + gelatina + polietilenoglicol; **ALGGLI** = alginato + glicina; **ALGQUI** = alginato + quitosana; **ALGQUISIL** = alginato + quitosana + sílica

A banda de estiramento do grupo OH do alginato foi deslocada em todas as matrizes, sugerindo interação entre os materiais, possivelmente a partir da formação de ligações de hidrogênio. A banda de estiramento assimétrico do grupo carboxílico, das unidades de ácido gulurônico e de ácido manurônico, mudou em todos os sistemas. Esse deslocamento mostra a interação por meio da ligação de hidrogênio nos sistemas: ALGAGA, ALGCEL, ALGGLI e ALGAMI. Nos sistemas ALGGEL e ALGGELPEG, os materiais interagem por forças eletrostáticas entre o grupo carboxílico do alginato e o grupo amino dos aminoácidos da gelatina. O Esquema 14 ilustra a interação potencial entre alginato e matrizes de funcionalização.



Esquema 14. Possíveis interações entre alginato e matrizes de funcionalização.

De acordo com o Esquema 14, as possíveis interações entre o alginato e as matrizes de funcionalização foram estabelecidas entre o grupo hidroxila dessas matrizes e os grupos funcionais do alginato (hidroxila, carboxila e éter). Nos sistemas ALGQUI e ALGQUISIL, a interação entre alginato e quitosana ocorreu, também, entre cargas negativas do grupo carboxílico do alginato e cargas positivas do grupo amino da quitosana.

5.2.5 – Estudos de Viabilidade Celular

A avaliação da viabilidade celular é importante para determinar a segurança de materiais empregados no encapsulamento celular. No presente estudo, a viabilidade das células MIN-6 encapsuladas foi investigada por meio dos ensaios com *Trypan Blue* e MTT.

5.2.5.1 – Ensaio com *Trypan Blue*

A Figura 11 apresenta os valores percentuais de viabilidade celular dos sistemas após 30 minutos, 6 h, 12 h e 24 h.

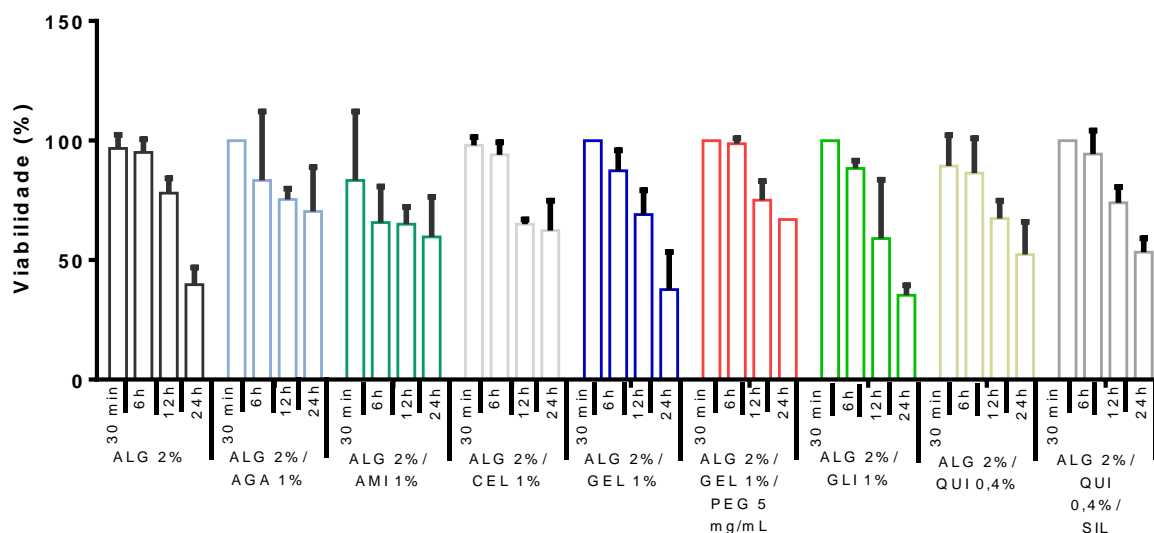


Figura 11. Ensaio com *Trypan Blue*. Comparação da viabilidade dos sistemas nos diferentes tempos. ALG = alginato; CEL = celulose; QUI = quitosana; GEL = gelatina; GLI = glicina; PEG = polietilenoglicol; SIL = sílica; AMI = amido; ALGAGA = alginato + agarose; ALGCEL = alginato + celulose; ALGGEL = alginato + gelatina; ALGGELPEG = alginato + gelatina + polietilenoglicol; ALGGELI = alginato + glicina; ALGQUI = alginato + quitosana; ALGQUISIL = alginato + quitosana + sílica e ALGAMI = alginato + amido

A Figura 11 apresenta a influência do tempo sobre a viabilidade celular dos sistemas encapsulados. De acordo com a Figura 11, todos os sistemas apresentaram redução da viabilidade ao final de 24 h, comparativamente ao tempo inicial de 30 minutos. Para os sistemas ALG, ALGCEL, ALGGELPEG, ALGQUI e ALGQUISIL, não foram observadas variações significativas até 6 horas do encapsulamento das células. Já para ALGAGA e ALGCEL, a viabilidade apresentou pouca redução entre 12 h e 24 h. Com o sistema ALGAMI, a viabilidade decresce após 6 horas. Todavia, a partir do qual, mantém-se, de modo geral, constante até 24 horas.

De acordo com a Figura 11, uma redução na viabilidade foi observada ao longo de 24 horas. O percentual de células viáveis no tempo avaliado permaneceu entre 40 %, para o sistema ALG, e 70 % para ALGAGA. Assim, a combinação do alginato com outras matrizes pode manter o fluxo de oxigênio e nutrientes, possibilitando a obtenção de

sistemas mais viáveis, pois todas as matrizes, exceto ALGGEL e ALGGLY, apresentaram, ao final de 24 horas, viabilidade entre 52 % e 70 %, maior que o ALG. De acordo com a Figura 11, o tempo influenciou a viabilidade celular. Todos os sistemas apresentaram redução de viabilidade das matrizes encapsuladas ao final de 24 horas, em comparação aos 30 minutos iniciais.

5.2.5.2 – Ensaio com MTT

A Figura 12 apresenta os valores percentuais de viabilidade celular dos sistemas após 4 h, 6 h, 12 h e 24 h de exposição ao MTT.

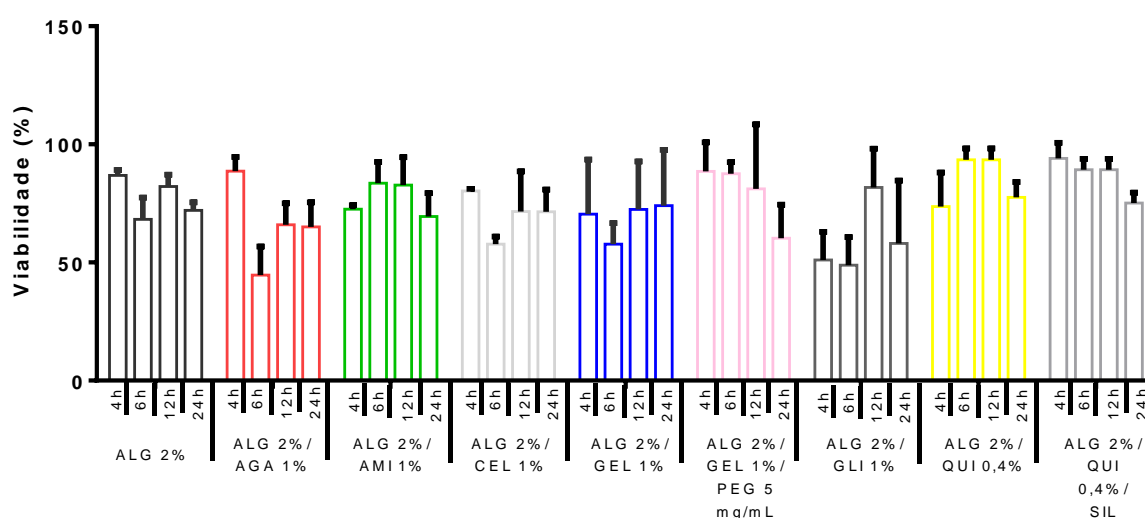


Figura 12. Ensaio com MTT. Comparação da viabilidade celular de cada sistema em relação ao tempo. ALG = alginato; CEL = celulose; QUI = quitosana; GEL = gelatina; GLI = glicina; PEG = polietilenoglicol; SIL = sílica; AMI = amido; ALGAGA = alginato + agarose; ALGCEL = alginato + celulose; ALGGEL = alginato + gelatina; ALGGELPEG = alginato + gelatina + polietilenoglicol; ALGGLI = alginato + glicina; ALGQUI = alginato + quitosana; ALGQUISIL = alginato + quitosana + sílica e ALGAMI = alginato + amido

De acordo com a Figura 12, os valores médios de viabilidade permaneceram na faixa de 51 % a 94 %, respectivamente, para os sistemas ALGGLY e ALGCHISIL. No final do período de avaliação de 24 horas, as porcentagens de viabilidade permaneceram entre 58 % (ALGGLY) e 83 % (ALGCHI). É possível observar a influência do tempo na viabilidade das células encapsuladas. De acordo com a Figura 12, a maioria dos sistemas mostrou uma redução na viabilidade ao final de 24 horas em comparação ao período inicial (4 horas). Isso era esperado, dada a possível formação de agregados celulares que dificultam a transferência de oxigênio, levando à morte celular. Com exceção de

ALGGELPEG e ALGCHISIL, cuja viabilidade diminuiu ao longo do período avaliado, os demais sistemas não apresentaram comportamento decrescente linear, principalmente até 12 horas, quando a maioria apresentou aumento de viabilidade. Esse perfil é, possivelmente, devido à proliferação celular favorecida pelas matrizes. As porcentagens de viabilidade mostradas nas Figuras 11 e 12 expressam a influência do tempo na viabilidade das células MIN-6, encapsuladas nos diferentes sistemas: uma tendência à redução da viabilidade é observada com o aumento do tempo.

De acordo com os dados de viabilidade obtidos dos ensaios com *Trypan blue* e MTT, observa-se que, para os sistemas ALG, ALGGEL, ALGGLY, ALGCHI e ALGCHISIL, os valores de viabilidade não foram próximos. Isto é possível, uma vez que o ensaio com MTT se refere à proliferação celular. Assim, nesses sistemas, células viáveis proliferam mais intensamente do que em outras matrizes.

5.2.6 – Secreção de Insulina

A Figura 13 mostra as concentrações de insulina atingidas no meio de cultura de células MIN-6 livres e encapsuladas nas matrizes. Os resultados indicam que as células encapsuladas em ALG, ALGAGA e ALGAMI foram capazes de produzir insulina nas mesmas taxas, que, no entanto, foram significativamente mais baixas ($\sim 40\text{-}50\%$; $P < 0,0061$) do que aquelas encontradas em células livres. A adição de celulose ou glicina diminuiu a quantidade de insulina produzida. Curiosamente, enquanto a introdução de quitosana nas matrizes melhorou as taxas de produção de insulina para os mesmos níveis de células livres, a adição de sílica a essas partículas (ALGCHISIL) reduziu drasticamente a capacidade de produção de insulina. É possível que a alta estabilidade (e provavelmente a natureza hermética) dessa combinação possa ser a razão subjacente à diminuição da produção de insulina. Por outro lado, o sistema ALGGELPEG revelou uma produção de insulina estatisticamente idêntica à encontrada nas células livres, enquanto a remoção do PEG das cápsulas reduziu significativamente a produção de insulina durante o período de 24 horas em cultura. Em termos de funcionalização, é possível observar a influência da matriz. A matriz combinada com alginato aumenta a estabilidade do sistema, garantindo fluxo adequado de oxigênio e nutrientes para a produção e secreção de insulina. Além disso, foi encontrada uma forte correlação direta ($r_{5p} = 0,746$, $p < 0,05$) entre a integridade da cápsula e a concentração liberada de insulina, indicando a importância da estabilidade da cápsula na administração de insulina.

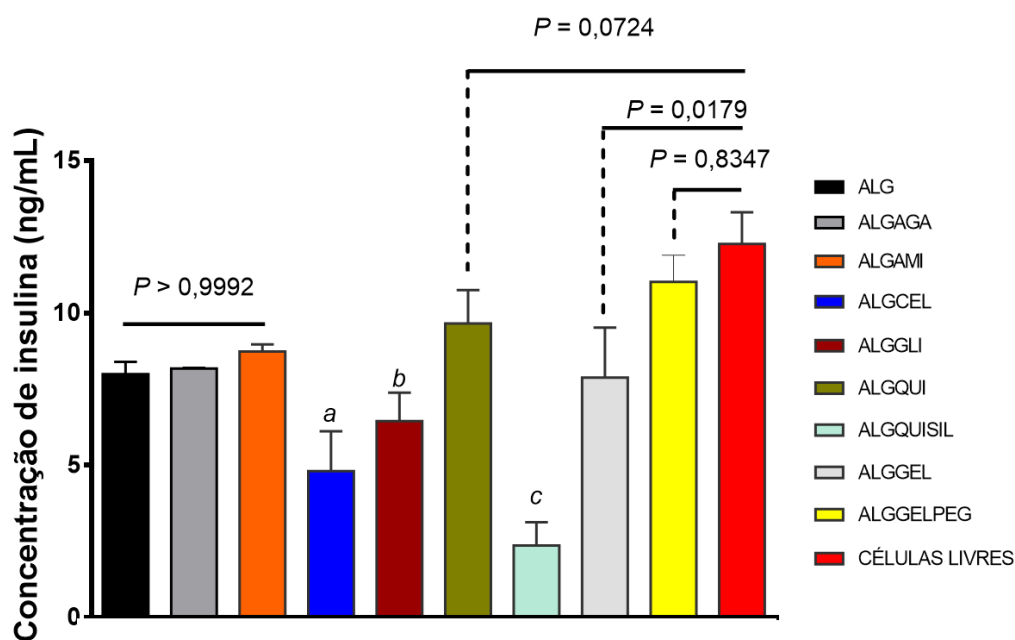


Figura 13. Concentração de insulina das diversas combinações de células MIN-6 encapsuladas. As diferenças foram comparadas com ANOVA unidirecional e os valores de P são mostrados. a) Para a diferença entre ALG e ALGCEL ($P = 0,0158$); b) para a diferença entre ALG e ALGGLI ($P = 0,6227$); c) para a diferença entre ALGQUI e ALGQUISIL ($P < 0,0001$).

De acordo com a Figura 13, não houve diferenças significativas na produção de insulina de células livres quando comparadas às células encapsuladas. Assim, o processo de encapsulamento de células MIN-6, a fim de produzir um sistema de liberação de insulina como alternativa ao diabetes, é viável, pois a funcionalidade celular é mantida no ambiente de encapsulamento. Vale ressaltar que o encapsulamento de células MIN-6 por alginato e alginato funcionalizado produz a barreira imunológica. Assim, é possível a administração de células MIN-6 encapsuladas, pois as matrizes de encapsulação não interferem na difusão de oxigênio, nutrientes, glicose e insulina, impedindo o contato direto entre as células e os linfócitos, podendo atrasar a estimulação do sistema imunológico e, portanto, diminuir a reação imune.

5.2.7 – Ensaio de Desintegração dos Hidrogéis com Células MIN-6

A desintegração das cápsulas foi investigada durante 24 horas. O objetivo do ensaio foi simular às condições fisiológicas e avaliar, nesse meio, a estabilidade mecânica

das cápsulas. De acordo com a Figura 14, foi observada uma desintegração gradual dos sistemas durante o período investigado.

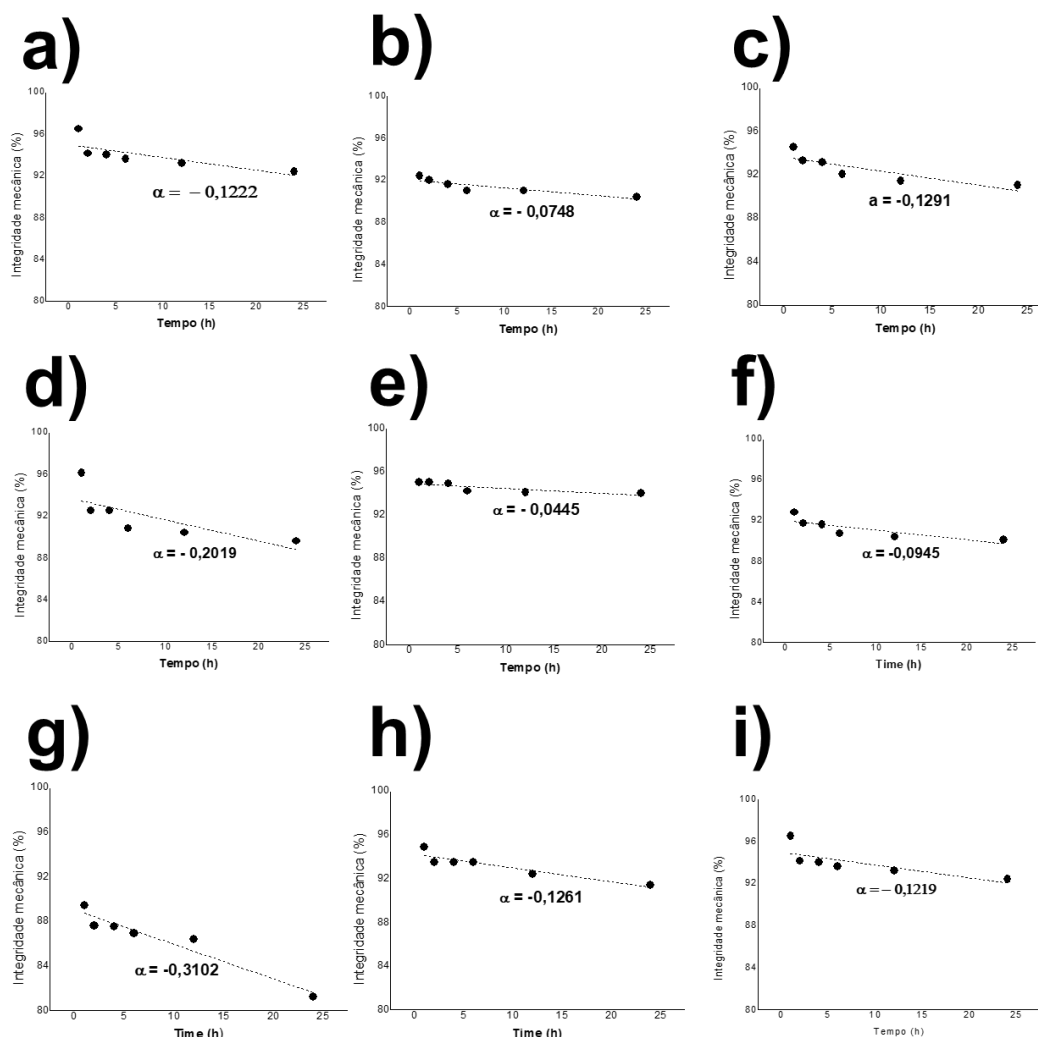


Figura 14. Curvas de desintegração dos sistemas ao longo de 24 horas. (a) ALG, (b) ALGAGA, (c) ALGCEL, (d) ALGQUI, (e) ALGQUISIL, (f) ALGGEL, (g) ALGGELPEG, (h) ALGGLI and (i) ALGAMI. ALG = alginato; ALGAGA = alginato + agarose; ALGAMI = alginato + amido; ALGCEL = alginato + celulose; ALGGEL = alginato + gelatina; ALGGELPEG = alginato + gelatina + PEG; ALGGLI = alginato + glicina; ALGQUI = alginato + quitosana e ALGQUISIL = alginato + quitosana + sílica.

De acordo com a Figura 14, para os sistemas ALGAGA, ALGCEL, ALGCHISIL, ALGGEL, ALGGLY e ALGAMI, as cápsulas mantiveram-se intactas, permanecendo acima de 90% durante o período avaliado. Os sistemas ALG e ALGGELPEG apresentaram os menores percentuais de integridade, respectivamente, 88 % e 81,2 %. Em relação ao ALG, a menor integridade das cápsulas é devida à instabilidade fisiológica

do alginato. Já para ALGGELPEG, sistema cujas cápsulas desintegraram mais rapidamente, após 1 hora, o percentual de cápsulas íntegras era inferior a 90 % (89,4 %), reduzindo-se a 81,2 % após as 24 horas. Possivelmente, as interações entre as matrizes alginato, gelatina e PEG podem ter proporcionado a formação de complexos mais solúveis, favorecendo a dissolução dos materiais em intervalos menores.

Em geral, há uma tendência à manutenção constante da integridade da cápsula entre 2 e 4 horas, bem como baixa desintegração durante o período de avaliação.

A Figura 15 mostra o dendrograma resultante dos casos de sistemas investigados.

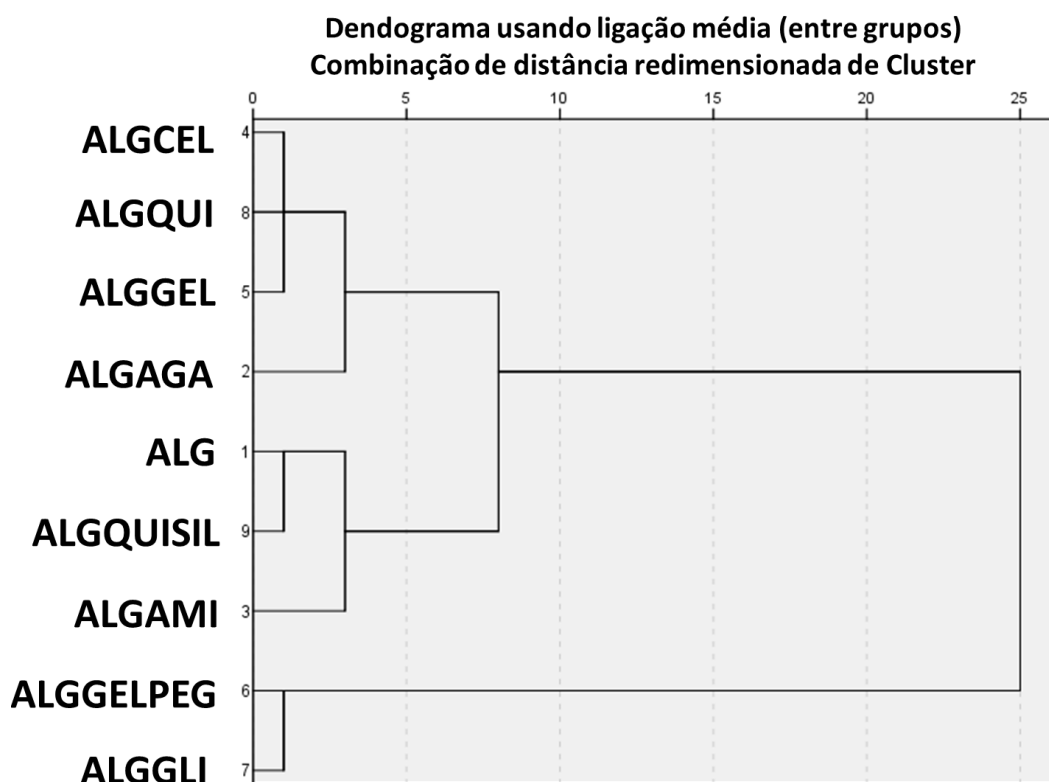


Figura 15. Dendrograma dos casos de sistemas investigados.

A Figura 15 mostra o dendrograma resultante dos casos de sistemas investigados. Como mostrado na Figura 15, três grupos distintos podem ser observados. O tamanho de partícula dos sistemas parece ser um parâmetro relevante no agrupamento das matrizes e parece, ainda, conferir características semelhantes aos sistemas encapsulados. Os sistemas ALGAGA, ALGCEL, ALGGEL e ALGQUI foram agrupados em uma classe. Esses sistemas possuem partículas de tamanho grande (2373 nm a 3445 nm). Os sistemas ALG, ALGAMI e ALGQUISIL foram agrupados em outra classe. A semelhança desses sistemas pode ser devida ao fato de apresentarem partículas menores (1056 nm a

1995 nm). As matrizes ALGGELPEG e ALGGLY formaram um grupo, mostrando, entre todos os sistemas, os maiores tamanhos de partículas (4873 nm e 4353 nm, respectivamente).

6 – CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou a obtenção de um sistema de produção e de secreção de insulina a partir do encapsulamento de células MIN-6.

Iniciou-se o estudo com as células K-562. Dadas as características das células K-562, como robustez, potencial proliferativo e facilidade de manipulação, procedemos ao seu encapsulamento, para fins de investigação de biocompatibilidade de material e de manutenção da viabilidade e diferenciação no ambiente de encapsulamento. De acordo com os resultados obtidos, as matrizes empregadas foram viáveis, de modo a garantir a viabilidade e diferenciação das células encapsuladas.

O alginato de sódio, como já demonstrado na literatura, apresentou-se como material adequado, biocompatível e não tóxico para encapsular células K-562. O sistema ALG 2 % foi o que apresentou o maior potencial, dado seu percentual de encapsulamento de 60 %. A funcionalização da matriz de alginato com quitosana (ALG 3 %/QUI 0,4 %) mostrou-se promissora, com percentual de encapsulamento de 31 %. Em termos de manutenção da viabilidade e potencial de diferenciação celular, em todos os sistemas as células mantiveram-se viáveis e diferenciaram-se, sobretudo ALG 2 %, ALG 3 % e ALG 3 %/QUI 0,4 %, cuja viabilidade manteve-se acima de 60 %.

Por essas razões, o sistema ALG 2 % foi escolhido como matriz pura para encapsulamento das células MIN-6, e como material a ser funcionalizado com agarose, amido, celulose, quitosana, gelatina, glicina, PEG e sílica. De acordo com os resultados obtidos, as matrizes funcionalizadas mantiveram a viabilidade celular, mostraram que a combinação de alginato com outras matrizes, além de proporcionar estabilidade mecânica, permite o fluxo de oxigênio e nutrientes. Dentre as matrizes puras de alginato, o ALG 2 % apresentou o maior potencial, dado o percentual de encapsulamento de 63 %. A obtenção de matrizes híbridas mostrou-se eficiente, com um aumento na porcentagem geral de encapsulamento. ALGCEL apresentou a maior eficiência de encapsulamento (85 %). Além de manter a viabilidade celular, em todos os sistemas as células MIN-6 permaneceram viáveis após 24 horas, principalmente ALGAGA, ALGAMI, ALGCEL e ALGGELPEG, cuja viabilidade permaneceu acima de 60 %. De acordo com os resultados da desintegração, a funcionalização das matrizes reduziu a desintegração das cápsulas, aumentando a integridade dos materiais. Todos os sistemas funcionalizados apresentaram integridade das cápsulas superior a 90 %, exceto ALGGELPEG. Em termos de secreção de insulina, em todas as matrizes as células produziram insulina. Foi observada a

influência do tamanho da partícula na produção de insulina. Com o aumento do tamanho das partículas, houve uma tendência a reduzir a produção de insulina. O sistema ALGGELPEG teve a maior produção de insulina.

Com base nos resultados obtidos, a técnica apresentou como limitação uma porcentagem de encapsulamento não superior a 85 % (ALGCEL). As potencialidades avaliadas referem-se à manutenção da viabilidade e à produção de insulina das células MIN-6 encapsuladas. Assim, considerando a instabilidade fisiológica do alginato, a seleção de uma matriz funcionalizada é relevante e necessária. Portanto, de acordo com o conjunto de resultados aqui discutidos, ALGAGA, ALGCEL e ALGQUI podem ser sistemas promissores para terapia celular.

Em suma, a presente tese alega que a combinação do alginato, que fornece permeabilidade, com matrizes como agarose, amido, celulose, gelatina, gelatina/PEG, glicina, quitosana e quitosana/sílica, que proporcionam estabilidade, propicia o encapsulamento efetivo de células MIN-6, secretoras de insulina, quando estimuladas, constituindo, dessa forma, um sistema de produção e secreção de insulina. Todavia, com base nos resultados de viabilidade e secreção de insulina, as matrizes funcionalizadas com glicina e sílica podem ser consideradas menos eficientes, não constituindo materiais de primeira escolha na combinação com alginato para encapsulamento de células MIN-6. Com isso, é necessária mais investigação acerca das limitações dessas matrizes, a fim de obter-se meios para minimizá-las, bem como explorar suas potencialidades.

7 – REFERÊNCIAS

1. Rokstad, A.M., Lacík, I., Vos, P., Strand, B.L.; Advances in Biocompatibility and Physico- chemical Characterization of Microspheres for Cell Encapsulation *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2014**, 67-68, 111.
2. Wang, J., Ding, Z., Zhang, F., Ye, W.; Recent Evelopment in Cell Encapsulations and their Therapeutic Applications *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, 77, 1247.
3. Newsholme, P., Cruzat, V.F., Keane, K.N., Carlessi, R., Homem de Bittencourt Jr, P.I.; Molecular Mechanisms of ROS Production and Oxidative Stress in Diabetes *Biochem. J.* **2016**, 473, 4527.
4. Keane, K.N., Cruzat, V.F., Carlessi, R., Homem de Bittencourt Jr, P.I., Newsholme, P.; Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and B-Cell Dysfunction *Oxid. Med. Cell. Longevity* **2015**, 1.
5. Carlessi, R.M., Chen, Y., Rowlands, J., Cruzat, V.F., Keane, K.N., Eagan, L., Mamotte, R., Stokes, R., Gunton, J.E., Homem de Bittencourt Jr, P.I., Newsholme, P.; GLP-1 Receptor Signalling Promotes B-Cell Glucose Metabolism Via Mtor-Dependent HIF-1a Activation *Sci. Rep.* **2017**, 7, 2661.
6. Mooranian, A., Tackechi, R., Jamieson, E., Morahan, G., Al-Salami, H.; Innovative Microcapsules for Pancreatic β -Cells Harvested from Mature Double-Transgenic Mice: Cell Imaging, Viability, Induced Glucose-Stimulated Insulin Measurements and Proinflammatory Cytokines Analysis *Pharm. Res.* **2017**, 34, 1217.
7. Wang, J., Ding, Z., Zhang, F., Ye, W.; Recent Evelopment in Cell Encapsulations and their Therapeutic Applications *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, 77, 1247.
8. Cañibano-Hernández, A., Saenz del Burgo, L., Espona-Noguera, A., Orive, G., M^a Hernández, R., Ciriza, J., Pedraz, J.L.; Hyaluronic Acid Enhances Cell Survival of Encapsulated Insulin-Producing Cells in Alginate-Based Microcapsules *Int. J. Pharm.* **2019**, 557, 198.
9. Cigan, A.D., Roach, B.L., Nims, R.J., Tan, A.R., Albro, M.B., Stoker, A.M., Cook, J.L., Vunjak-Novakovic, G., Hung, C.T., Ateshian, G.A.; High Seeding Density of Human Chondrocytes in Agarose Produces Tissue-engineered Cartilage Approching Native Mechanical and Biomechanical Properties *J. Biomech.* **2016**, 49, 1909.

10. Lee, J., Jiyoung, J., Kim, W., Kim, G.H.; Bone-Derived Decm/Alginate Bioink for Fabricating a 3D Cell-Laden Mesh Structure for Bone Tissue Engineering *Carbohydr. Polym.*, **2020**, 250, 116914.
11. Xie, D., Smyth, C.A., Eckstein, C., Bilbao, G., Mays, J., Eckhoff, D.E., Contreras, J.L.; Cytoprotection of PEG-modified adult porcine pancreatic islets for improved xenotransplantation *Biomater.* **2005**, 26, 403.
12. Boninsegna, S., Bosetti, P., Carturan, G., Dellagiacomma, G., Dal Monte, R., Rossi, M.; Encapsulation of Individual Pancreatic Islets by Sol-Gel SiO₂: A Novel Procedure for Perspective Cellular Grafts *J. Biotechnol.* **2003**, 100, 277.
13. Carturan, G., Dal Toso, R., Boninsegna, S., Dal Monte, R.; Encapsulation of Functional Cells by Sol–Gel Silica: Actual Progress and Perspectives for Cell Therapy *J. Mater. Chem.* **2004**, 14, 2087.
14. Boido, M., Ghibaudi, M., Gentile, P., Favaro, E., Fusaro, R., Tonda-Turo, C.; Chitosan-Based Hydrogel to Support the Paracrine Activity of Mesenchymal Stem Cells in Spinal Cord Injury Treatment *Sci. Rep.* **2019**, 9, 1.
15. Komeri, R., Muthu, J.; Injectable, Cytocompatible, Elastic, Free Radical Scavenging, and Electroconductive Hydrogel for Cardiac Cell Encapsulation *Colloids Surf., B* **2017**, 157, 381.
16. Bastaki, S.; Review Diabetes Mellitus and its Treatment *Int. J. Diabetes Metab.* **2005**, 13, 111.
17. Diem, P., Walseth, T.F., Zhang, H.J., Robertson, R.P.; Secretion and Degradation of Glucagon by HIT cells *Endocrinol.* **1990**, 127, 1609.
18. Miyazaki, J.I., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., Yamamura, K.I.; Establishment of a Pancreatic B Cell Line that Retains Glucose-Inducible Insulin Secretion: Special Reference to Expression of Glucose Transporter Isoforms *Endocrinol.* **1990**, 127, 126.
19. Poitout, V., Stout, L.E., Armstrong, M.B., Walseth, T.F., Sorenson, R.L., Robertson, R.P.; Morphological and Functional Characterization of β TC Cells an Insulin-Secreting Cell Line derived from Transgenic Mice *Diabetes* **1995**, 44, 306.
20. Skelin, M., Rupnik, M., Cencič, A.; Pancreatic Beta Cell Lines and their Applications in Diabetes Mellitus Research *ALTEX - Alternatives to animal experimentation* **2010**, 27, 105.

21. Qiao, P., Wang, J., Xie, Q., Li, F., Dong, L., Xu, T.; Injectable Calcium Phosphate–Alginate–Chitosan Microencapsulated MC3T3- E1 Cell Paste for Bone Tissue Engineering in Vivo *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, 33, 4633.
22. Venkatesan, J., Bhatnagar, I., Manivasagan, P., Kang, K., Kim, S.; Alginate Composites for Bone Tissue Engineering: A Review *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, 72, 269.
23. Valente, J.F.A., Valente, T.A.M., Alves, P., Ferreira, P., Silva, A., Correia, I.J.; Alginate Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering *Mater. Sci. Eng., C* **2012**, 32, 2596.
24. Grigore, A., Sarker, B., Fabry, B., Boccaccini, A.R., Detsch, R.; Behavior of Encapsulated MG-63 Cells in RGD and Gelatine Modified Alginate Hydrogels *Tissue Eng., Part A* **2014**, 20, 2140.
25. Santos, E., Pedraz, J.L., Hernández, R.M., Orive, G.; Therapeutic Cell Encapsulation: Ten Steps Towards Clinical Translation *J. Control. Release* **2013**, 170, 1.
26. Naghizadeh, Z., Karkhaneh, A., Khojasteh, A.; Selfcrosslinking Effect of Chitosan and Gelatin on Alginate Based Hydrogels: Injectable in Situ Forming Scaffolds *Mater. Sci. Eng., C*, **2018**, 89, 256.
27. Kosik, A., Luchowska, U., Świeszkowski, W.; Electrolyte Alginate/Poly-L-Lysine Membranes for Connective Tissue Development *Mater. Lett.* **2016**, 184, 104.
28. King, A., Sandler, S., Andersson, A.; The Effect of Host Factors and Capsule Composition on the Cellular Overgrowth on Implanted Alginate Capsules *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 57, 374.
29. Clayton, H.A., London, N.J., Colloby, P.S., Bell, P.R., James, R.F.; The Effect of Capsule Composition on The Biocompatibility of Alginate-Poly-L-Lysine Capsules *J. Microencapsul.* **1991**, 8, 221.
30. Coradin, T., Nassif, N., Livage, J.; Silica–Alginate Composites for Microencapsulation *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 61, 429.
31. Hanahan, D., Weinberg, R.A.; Hallmarks Of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, 144, 646.
32. Huo, X.F., Yu, J., Peng, H., Du, Z.W., Liu, X.L., Ma, Y.N., Zhang, X., Zhang, Y., Zhao, H.L., Zhang, J.W.; Differential Expression Changes in K562 Cells During the Hemin-Induced Erythroid Differentiation and the Phorbol Myristate Acetate

- (PMA)-Induced Megakaryocytic Differentiation *Mol. Cell. Biochem.* **2006**, 292, 155.
33. Koefler, H.P., Golde, D.W.; Human Myeloid Leukemia Cell Lines—A Review. *Blood* **1980**, 56, 344.
34. Ministério da Saúde.World; *Health Organization. Global Health Estimates 2016: deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000–2016*. Geneva: WHO, 2018a.
35. Ministério da Saúde.World; *World Health Organization. World Health Statistics 2018: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals*. Geneva: WHO, 2018b.
36. Ministério da Saúde.World; World Health Organization. Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles. Geneva: WHO, 2018c.
37. Ministério da Saúde; Vigitel Brasil 2019 - Vigilância De Fatores De Risco E Proteção Para Doenças Crônicas Por Inquérito Telefônico, disponível em <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/vigitel-brasil-2019-vigilancia-fatores-risco-pdf> (acesso em 04/01/2021).
38. Orive, G., Santos, E., Pedraz, J.L., Hernández, R.M.; Application of Cell Encapsulation for Controlled Delivery of Biological Therapeutics *Adv. Drug Del. Rev.* **2014**, 67-68, 3.
39. Mazzitelli, S., Capretto, L., Quinci, F., Piva, R., Nastruzzi, C.; Preparation of Cell-Encapsulation Devices in Confined Microenvironment *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, 65(11-12), 1533.
40. Vos de, P., Lazarjani, H.A., Poncelet, D., Faas, M.M.; Polymers in Cell Encapsulation from an Enveloped Cell Perspective *Adv. Drug Del. Rev.* **2014**, 67-68, 15.
41. Lim, F., Sun, A.M.; Microencapsulated Islets as Bioartificial Endocrine Pancreas *Sci.* **1980**, 210, 908.
42. Prakash, S., Chang, T.M.S.; Preparation and In Vitro Analysis of Microencapsulated Genetically Engineered *E. coli* DH5 Cells for Urea and Ammonia Removal *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, 46, 621.
43. Nafea, E.H., Marson, A., Poole-Warren, L.A., Martens, P.J.; Immunoisolating Semi-Permeable Membranes for Cell Encapsulation: Focus on Hydrogels *J. Control. Release* **2011**, 154, 110.

44. Li, R.H.; Materials for Immunoisolated Cell Transplantation *Adv. Drug Del. Rev.* **1998**, 33(1-2), 87.
45. Wee, S., Gombotz, W.R.; Protein Release from Alginate Matrices *Adv. Drug Del. Rev.* **1998**, 31, 267.
46. Lacík, I.; Polymer Chemistry in Diabetes Treatment by Encapsulated Islets of Langerhans Review to 2006 *Aust. J. Chem.* **2006**, 59, 508.
47. Vos, P. de, Bucko, M., Gemeiner, P., Navratil, M., Svitel, J., Faas, M., Strand, B.L., Skjak-Braek, G., Morch, Y.A., Vikartovska, A., Lacik, I., Kollarikova, G., Orive, G., Poncelet, D., Pedraz, J.L., Ansorge-Schumacher, M.B.; Multiscale Requirements for Bioencapsulation in Medicine and Biotechnology *Biomaterials* **2009**, 30(13), 2559.
48. Stokke, B.T., Smidsroed, O., Bruheim, P., Skjaak-Braek, G.; Distribution of Uronate Residues in Alginate Chains in Relation to Alginate Gelling Properties *Macromolecules* **1991**, 24(16), 4637.
49. Santos, E., Pedraz, J.L., Hernández, R.M., Orive, G.; Therapeutic Cell Encapsulation: Ten Steps Towards Clinical Translation *J. Controlled Release* **2013**, 170(1), 1.
50. Teramura, Y., Oommen, O.P., Olerud, J., Hilborn, J., Nilsson, B.; Microencapsulation of Cells, including Islets, within Stable Ultra-thin Membranes of Maleimide conjugated PEG-lipid with Multifunctional Crosslinkers *Biomater.* 2013, 34(11), 2683.
51. Kim, H.J., Lee, H.C., Oh, J.S., Shin, B.A., Oh, C.S., Park, R.D., Yang, K.S. Cho, C.S.; Polyelectrolyte Complex Composed of Chitosan and Sodium Alginate for Wound Dressing Application *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1999**, 10, 543.
52. Wang, T., Lacík, I., Brissová, M., Anilkumar, A.V., Prokop, A., Hunkeler, D., Green, R., Shahrokhi, K., Powers, A.C.; An Encapsulation System for the Immunoisolation of Pancreatic Islets *Nat. Biotechnol.* **1997**, 15, 358.
53. Scheirer, W., Nilsson, K., Merten, O.W., Katinger, H.W., Mosbach, K.; Entrapment of Animal Cells for the Production of Biomolecules such as Monoclonal Antibodies *Dev. Biol. Stand.* **1983**, 55, 155.
54. Iwata, H., Amemiya, H., Matsuda, T., Takano, H., Hayashi, R., Akutsu, T.; Evaluation of Microencapsulated Islets in Agarose Gel as Bioartificial Pancreas

- by Studies of Hormone Secretion in Culture and by Xenotransplantation *Diabetes* **1989**, 38, 224.
55. Zalipsky, S., Mullah, N., Harding, J.A., Gittelman, J., Guo, L., DeFrees, S.A.; Poly(ethyleneglycol)-Grafted Liposomes with Oligopeptide or Oligosaccharide Ligands Appended to the Termini of the Polymer Chains, *Bioconjug. Chem.* **1997**, 8, 111.
56. C.H. Lee, A. Singla, Y. Lee; Biomedical Applications of Collagen *Int.J. Pharm.* **2001**, 221(1-2), 1.
57. Miyamoto, T., Takahashi, S. Ito, H., Inagaki, H., Noishiki, Y.; Tissue Biocompatibility of Cellulose and its Derivatives, *J. Biomed. Mater. Res.* **1989**, 23,125.
58. Zhang, Y., Wang, W., Zhou, J., Yu, W., Zhang, X., Guo, X., Ma, X.; Tumor Anti-Angiogenic Gene Therapy with Microencapsulated Recombinant CHO Cells *Ann. Biomed. Eng.* **2007**, 35, 605.
59. Leung, A., Lawrie, G., Nielsen, L.K., Trau, M.; Synthesis and Characterization of Alginate/Poly-L-Ornithine/Alginate Microcapsules for Local Immunosuppression *J. Microencapsul.* **2008**, 25, 387.
60. Miyamoto, H., Okada, N., Yoshioka, T., Suzuki, R., Sakamoto, K., Katsume, A., Saito, H., Tsutsumi, Y., Kubo, k., Nakagawa, S., Ohsugi, Y., Mayumi, T.; Prolongation of the Effective Duration of Cytomedical Therapy by Re-injection SK-2 Hybridoma Cell Microencapsulated within Alginate-Poly(L)Lysine-Alginate Membrane into Human Interleukin-6 Transgenic Mice *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, 22, 295.
61. Karimi, S., Bagher, Z., Najmoddin, N., Simorgh, S., Pezeshki-Modaress, M.; Alginate-Magnetic Short Nanofibers 3D Composite Hydrogel Enhances the Encapsulated Human Olfactory Mucosa Stem Cells Bioactivity for Potential Nerve Regeneration Application *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, 167, 796.
62. An, C., Liu, W., Zhang, Y., Pang, B., Liu, H., Zhang, Y., Zhang, H., Zhang, L., Liao, H., Ren, C., Wang, H.; Continuous Microfluidic Encapsulation of Single Mesenchymal Stem Cells using Alginate Microgels as Injectable Fillers for Bone Regeneration *Acta Biomater.* **2020**, 111, 181.
63. Patra, T., Gupta, M.K.; Evaluation of Sodium Alginate for Encapsulation-Vitrification of Testicular Leydig Cells *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, 153, 128.

64. Zhang, R., Xie, L., Wu, H., Yang, T., Zhang, Q., Tian, Y., Liu, Y., Han, X., Guo, W., He, M., Liu, S., Tian, W.; Alginate/Laponite Hydrogel Microspheres Co-Encapsulating Dental Pulp Stem Cells and VEGF for Endodontic Regeneration *Acta Biomater.* **2020**, 113, 305.
65. Suarez-Arnedo, A., Narváez, D.M., Sarmiento, P., Bocanegra, L., Salcedo, F., Muñoz-Camargo, C., Groot, H., Cruz, J.C.; Tridimensional Alginate Disks of Tunable Topologies for Mammalian Cell Encapsulation *Anal. Biochem.* **2019**, 574, 31.
66. Mulroy, E., Snow, B., Bok, A., Simpson, M., Smith, A., Taylor, K.M., Lockhart, M., B.B. Janice Lam, B.B.J., Frampton, C., Finucane, G., Schweder, P., Chen, B., McMahon, A., Macdonald, L.; A Long-Term Follow-Up of Safety and Clinical Efficacy Of NTCELL® [Immunoprotected (Alginate-Encapsulated) Porcine Choroid Plexus Cells for Xenotransplantation] in Patients with Parkinson's Disease *Parkinsonism Relat Disord* **2021**, 82, 128.
67. Dos Santos, V.H., Pfeifer, J.P.H., Brandão De Souza, J., Stievani, F., Hussni, C.A., Golim, M., Deffune, E., Alves, A.L.G.; Evaluation of Alginate Hydrogel Encapsulated Mesenchymal Stem Cell Migration in Horses *Res. Vet. Sci.* **2019**, 124, 38.
68. Park, H., Lee, H.J., Na, H., Lee, K.Y.; Alginate Hydrogels Modified with Low Molecular Weight Hyaluronate for Cartilage Regeneration *Carbohydr. Polym.* **2017**, 162, 100.
69. Mohanty, S., Yang Wu, Chakraborty, N., Mohanty, P., Ghosh, G; Impact of Alginate Concentration on the Viability, Cryostorage, Andangiogenic Activity of Encapsulated Fibroblastos *Mater. Sci. Eng., C* **2016**, 65, 269.
70. Xu, J., He, Y., Jianfeng, M, Ye, Q.; Coating a Shell on Alginate Microsphere by Liquid Phase Deposition *Mater. Lett.* **2017**, 188, 152.
71. Saberianpour, S., Karimi, A., Nemati, S., Amini, H., Sardroud, H.A., Khaksar, M., Mamipour, M., Nouri, M., Rahbarghazi, R.; Encapsulation of Rat Cardiomyoblasts with Alginate-Gelatin Microspheres Preserves Stemness Feature In Vitro *Biomed. Pharmacother.* **2019**, 109, 402.
72. Choi, C., Kim, S., Cha, C.; Dual-Functional Alginate Crosslinker: Independent Control of Crosslinking Density and Cell Adhesive Properties of Hydrogels via Separate Conjugation Pathways *Carbohydr. Polym.* **2021**, 252, 117128.

73. Moxon, S.R., Corbett, N.J., Fisher, K., Potjewy, G., Domingos, M., Hooper, N.M.; Blended Alginate/Collagen Hydrogels Promote Neurogenesis and Neuronal Maturation *Mater. Sci. Eng.* **2019**, 104, 109904.
74. Rajalekshmi, R., Shaji, A.K., Joseph, R., Bhatt, A.; Scaffold For Liver Tissue Engineering: Exploring the Potential of Fibrin Incorporated Alginate Dialdehyde–Gelatin Hydrogel *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, 166, 999.
75. Bushkalova, R., Farno, M., Tenailleau, C., Duployer, B., Cussac, D., Parini, A., Sallerin, B., Sophie Fullana, G.; Alginate-Chitosan PEC Scaffolds: A Useful Tool For Soft Tissues Cell Therapy *Int. J. Pharm.* **2019**, 571, 118692.
76. Schwarz, S., Kuth, S., Distler, T., Gögele, C., Stölzel, K., Detsch, R., Boccaccini, A.R., Schulze-Tanzil, G.; 3D Printing and Characterization of Human Nasoseptal Chondrocytes Laden Dual Crosslinked Oxidized Alginate-Gelatin Hydrogels for Cartilage Repair *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, 116, 111189.
77. Dutta, S.D., Hexiu, J., Patel, D.K., Ganguly, K., Lim, K.; 3D-Printed Bioactive and Biodegradable Hydrogel Scaffolds of Alginate/ Gelatin/Cellulose Nanocrystals for Tissue Engineering *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, 167, 644.
78. Bonhome-Espinosa, A.B., Campos, F., Durand-Herrera, D., Sanchez-López, J.D., Schaub, S., Duran, j.d.g., Lopez-Lopez, M.T., Carriel, V; In Vitro Characterization of a Novel Magnetic Fibrin-Agarose Hydrogel for Cartilage Tissue Engineering *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2020**, 104, 103619.
79. Jutila, A., Donald, Z., Stu, B., June, R.; Encapsulation of Chondrocytes in Physiologically-Stiff Agarose *Osteoarthr. Cartil.* **2013**, 21, 241.
80. Mayfield, A.E., Tilokee, E.L., Latham, N., McNeill, B., Lam, B-K., Ruel, M., Suuronen, E.J., Courtman, D.W., Stewart, D.J., Davis, D.R.; The effect of Encapsulation of Cardiac Stem Cells Within Matrixenriched Hydrogel Capsules on Cell Survival, Post-Ischemic Cell Retention and Cardiac Function *Biomater.* **2014**, 35(1), 133.
81. Sakai, S., Kawabata, K., Ono, T., Ijima, H., Kawakami, K.; Development of Mammalian Cell-Enclosing Subsieve-Size Agarose Capsules (≤ 100 mm) for Cell Therapy *Biomater.* **2005**, 26(23), 4786.
82. Zignego, D.L., Jutila, A.A., Gelbke, M.K., Gannon, D.M., June, R.K.; The Mechanical Microenvironment of High Concentration Agarose for Applying Deformation to Primary Chondrocytes *J Biomech.* 2014, 47(9), 2143.

83. Rennerfeldt, D.A., Renth, A.N., Talata, Z., Gehrke, S.H., Detamore, M.S.; Tuning Mechanical Performance of Poly(ethylene glycol) and Agarose Interpenetrating Network Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering *Biomater.* **2013**, 34(33), 8241.
84. Rioja, A.Y., Daley, E.L.H, Habif, J.C., Putnam, A.J., Stegemann, J.P; Distributed Vasculogenesis from Modular Agarose-Hydroxyapatite Fibrinogen Microbeads *Acta Biomater.* **2017**, 55, 144.
85. Na, Yin; Stilwell, M.D., Santos, T.M.A., Wang, H., Weibel, D.B.; Agarose Particle-Templated Porous Bacterial Cellulose and its Application in Cartilage Growth *in Vitro Acta Biomater.* **2015**, 12, 129.
86. Lam, D., Enright, H.A., Peters, S.K.G., Moya, M.L., Soscia, D.A., Cadena, J., Alvarado, J.A., Kulp, K.S., Wheeler, E.K., Fischer, N.O; Optimizing Cell Encapsulation Condition in ECM-Collagen I Hydrogels To Support 3D Neuronal Cultures *J. Neurosci. Methods* **2020**, 329, 108460.
87. Si, R., Gao, C., Guo, R., Lin, C., Li, J., Guo, W.; Human Mesenchymal Stem Cells Encapsulated-Coacervated Photoluminescent Nanodots Layered Bioactive Chitosan/Collagen Hydrogel Matrices to Indorse Cardiac Healing After Acute Myocardial Infarction *J. Photochem. Photobiol. B* **2020**, 206, 111789.
88. Vuornos, K., Ojansivua, M., Koivisto, J.T., Häkkänen, H., Belay, B., Montonen, T., Huhtala, H., Kääriäinen, M., Hupa, L., Kellomäki, M., Hyttinen, J., Ihalainen, J.A., Miettinen, S.; Bioactive Glass Ions Induce Efficient Osteogenic Differentiation of Human Adipose Stem Cells Encapsulated in Gellan Gum and Collagen Type I Hydrogels *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, 99, 905.
89. Gao, Y., Kong, W., Li, B., Ni, Y., Yuan, T., Guo, L., Lin, H., Fan, H., Fan, Y., Zhang, X.; Fabrication and Characterization of Collagen-Based Injectable and Self-Crosslinkable Hydrogels for Cell Encapsulation *Colloids Surf. B* **2018**, 176, 448.
90. Tabatabaei, F., Moharamzadeh, K., Tayebi, L.; Fibroblast Encapsulation in Gelatin Methacryloyl (Gelma) versus Collagen Hydrogel as Substrates for Oral Mucosa Tissue Engineering *J. Oral Biol. Craniofac. Res.* **2020**, 10, 573.
91. Moeinzadeh, S., Park, Y., Lin, S., Yang, Y.P.; In-Situ Stable Injectable Collagen-Based Hydrogels for Cell and Growth Factor Delivery *Materialia* **2020** (in press).
92. Schroedera, M.E., Rodriguez, A.G., Speckl, K.F., Walker, C.J., Midekssa, F.S., Grim, J.C., Weiss, R.M., Anseth, K.S.; Collagen Networks Within 3D PEG

- Hydrogels Support Valvular Interstitial Cell Matrix Mineralization *Acta Biomater.* **2020** (in press).
93. Heo, D.N., Hospodiuk, M., Ozbolat, I.T.; Synergistic Interplay Between Human Mscs And Huvecs In 3D Spheroids Laden in Collagen/Fibrin Hydrogels for Bone Tissue Engineering *Acta Biomater.* **2019**, 95, 348.
94. Buitrago, J.O., Patel, K.D., Ahmed El-Fiqi, Jung-Hwan Lee, Banani Kundu, Hae-Hyoung Lee, Hae-Won Kim; Silk Fibroin/Collagen Protein Hybrid Cell-Encapsulating Hydrogels with Tunable Gelation and Improved Physical and Biological Properties *Acta Biomater.* **2018**, 69, 218.
95. Wei, D., Sun, J., Yang, Y., Wu, C., Chen, S., Guo, Z., Fan, H., Zhang X.; Cell Alignment Guided by Nano/Micro Oriented Collagen Fibers and the Synergistic Vascularization for Nervous Cell Functional Expression *Mater Today Chem.* **2018**, 8.
96. Yao, L., Flynn N.; Dental Pulp Stem Cell-Derived Chondrogenic Cells Demonstrate Differential Cell Motility in Type I and Type II Collagen Hydrogels *Spine J.* **2018**, 18(6), 1070.
97. Lou, J., Stowers, R., Nam, S., Xia, Y., Chaudhuri, O.; Stress Relaxing Hyaluronic Acid-Collagen Hydrogels Promote Cell Spreading, Fiber Remodeling, and Focal Adhesion Formation in 3D Cell Culture *Biomater.* **2018**, 154, 213.
98. Yang, J., Chen, X., Yuan, T., Yang, X., Fan, Y., Zhang, X.; Regulation of the Secretion of Immunoregulatory Factors of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) by Collagen-Based Scaffolds during Chondrogenesis *Mater. Sci. Eng.C* **2017** 70(2), 983.
99. Zhang, W., Kong, C.W., Tong, M.H., Chooi, W.H., Huang, N., Li, R.A., Chan, B.P.; Maturation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes (hESC-CMs) in 3D Collagen Matrix: Effects of Niche Cell Supplementation and Mechanical Stimulation *Acta Biomater.* **2017**, 49, 204.
100. Chu, S., Maples, M.M., Bryant, S.J.; Cell Encapsulation Spatially Alters Crosslink Density of Poly(Ethylene Glycol) Hydrogels Formed from Free-Radical Polymerizations *Acta Biomater.* **2020**, 109, 37.
101. Lim, G.P., Soon, C.F., Othman, S.A., Naznin Sultana, Ahmad, M.K., Nayan, N., Tee, K.S.; Generation of Hela Spheroids in Ca-Alginate-PEG Microbeads using Flicking Technique as an Improved Three-Dimensional Cell Culture System *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2020**, 599, 124885.

102. Yu, J., Chen, F., Wang, X., Dong, N., Lu, C., Yang, G., Chen, Z.; Synthesis and Cof MMP Degradable and Maleimide Cross-Linked PEG Hydrogels for Tissue Engineering Scaffolds *Polym. Degrad. Stab.* **2016**, 133, 312.
103. Mahadevaiah, S., Robinson, K.G., Kharkar, P.M., Kiick, K.L., Akins, R.E.; Decreasing Matrix Modulus of PEG Hydrogels Induces a Vascular Phenotype in Human Cord Blood Stem cells *Biomater.* **2015**, 62, 24.
104. Gwon, K., Kim, E., Tae, G.; Heparin-Hyaluronic Acid Hydrogel in Support of Cellular Activities of 3D Encapsulated Adipose Derived Stem Cells *Acta Biomater.* **2017**, 49, 284.
105. Shubin, A.D., Felong, T.J., Schutrum, B.E., Joe, D.S.L., Ovitt, C.E., Benoit, D.S.W.; Encapsulation of Primary Salivary Gland Cells in Enzymatically Degradable Poly(ethylene glycol) Hydrogels Promotes Acinar Cell Characteristics *Acta Biomater.* **2017**, 50, 437.
106. Komeri, R., Muthu, J.; Injectable, Cytocompatible, Elastic, Free Radical Scavenging and Electroconductive Hydrogel for Cardiac Cell Encapsulation *Colloids Surf., B* **2017**, 157, 381.
107. Nayak, S., Dey, S., Kundu, S.C.; Silk Sericin–Alginate–Chitosan Microcapsules: Hepatocytes Encapsulation for Enhanced Cellular Functions *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, 65, 258.
108. Lou, R., Xie, H., Zheng, H., Ren, Y., Gao, M., Guo, X., Song, Y., Yu, W., Liu, X., Ma, X.; Alginate-Based Microcapsules with Galactosylated Chitosan Internalfor Primary Hepatocyte Applications *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, 93, 1133.
109. Tang, Y., Sun, J., Fan, H., Zhang, X.; An Improved Complex Gel of Modified Gellan Gum and Carboxymethyl Chitosan for Chondrocytes Encapsulation *Carbohydr. Polym.* **2012**, 88(1), 46.
110. Afshar, A., Ghaee, A.; Preparation of Aminated Chitosan/Alginate Scaffold Containing Halloysite Nanotubes Wwith Improved Cell Attachment *Carbohydr. Polym.* **2016**, 151, 1120.
111. Surrao, D.C., Arasu Y., Ekberg, J.A.K., A. St John, J.A.; Blended, Crosslinked Alginate-Methylcellulose Hydrogels for Encapsulation and Delivery of Olfactory Ensheathing Cells *Materialia* **2020**, 10, 100654.
112. Dautzenberg, H., Schuldt, U., Grasnick, G., Karle, P., Muller, P., Lohr, M., Pelegrin, M., Piechaczyk, M., Rombs, K.V., Gunzburg, W.H., Salmons, B., Saller,

- R.M.; Development of Cellulose Sulfate-Based Polyelectrolyte Complex Microcapsules Formed for Medical Applications *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, 875, 46.
113. Weber, W., Rinderknecht, M., Daoud-El Baba, M., de Glutz, F.N., Aubel, D., Fussenegger, M.; Cellmac: A Novel Technology for Encapsulation of Mammalian Cells in Cellulose Sulfate/Pdmac Capsules Assembled on a Transient Alginate/Ca²⁺ Scaffold *J. Biotechnol.* **2004**, 114, 315.
114. Schaffellner, S., Stadlbauer, V., Stiegler, P., Hauser, O., Halwachs, G., Lackner, C., Iberer, F., Tscheliessnigg, K.H.; Porcine Islet Cells Microencapsulated in Sodium Cellulose Sulfate *Transplant. Proc.* **2005**, 37, 248.
115. Stadlbauer, V., Stiegler, P.B., Schaffellner, S., Hauser, O., Halwachs, G., Iberer, F., Tscheliessnigg, K.H., Lackner, C.; Morphological and Functional Characterization of a Pancreatic Beta-Cell Line Microencapsulated in Sodium Cellulose Sulfate/ Poly(Diallyldimethylammonium Chloride), *Xenotransplantation* **2006**, 13, 37.
116. Lohr, M., Bago, Z.T., Bergmeister, H., Ceijna, M., Freund, M., Gelbmann, W., Gunzburg, W.H., Jesnowski, R., Hain, J., Hauenstein, K., Henninger, W., Hoffmeyer, A., Karle, P., Kroger, J.C., Kundt, G., Liebe, S., Losert, U., Muller, P., Probst, A., Puschel, K., Renner, M., Renz, R., Saller, R., Salmons, B., Walter, I.; Cell Therapy using Microencapsulated 293 Cells Transfected with a Gene Construct Expressing CYP2B1, an Ifosfamide Converting Enzyme, Instilled Intra-Arterially in Patients with Advanced-Stage Pancreatic Carcinoma: A Phase I/II Study *J. Mol. Med. (Berl)* **1999**, 77, 393.
117. Pelegrin, M., Marin, M., Noel, D., Del Rio, M., Saller, R., Stange, J., Mitzner, S., Gunzburg, W.H., Piechaczyk, M.; Systemic Long-Term Delivery of Antibodies in Immunocompetent Animals using Cellulose Sulphate Capsules containing Antibody producing Cells *Gene Ther.* **1998**, 5, 828.
118. Pelegrin, M., Marin, M., Oates, A., Noel, D., Saller, R., Salmons, B., Piechaczyk, M.; Immunotherapy of a Viral Disease by In Vivo Production of Therapeutic Monoclonal Antibodies *Hum. Gene Ther.* **2000**, 11, 1407.
119. Catalano, P.N., Bourguignon, N.S., Alvarez, G.S., Libertun, C., Diaz, L.E., Desimone, M.F., Lux-Lantos, V.; Sol-Gel Immobilized Ovarian Follicles: Collaboration between Two Different Cell Types in Hormone Production and Secretion *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 11681.

120. Mi, H., Jing, X., Napiwocki, B.N., Li, Z., Turng, L., Huang, H.; Fabrication of Fibrous Silica Sponges by Self-Assembly Electrospinning and Their Application in Tissue Engineering for Three-Dimensional Tissue Regeneration *Chem. Eng. J.* **2018**, 331, 652.
121. Ogurtsova, K., da Rocha Fernandes, J.D., Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N.H., Cavan, D., Shaw, J.E., Maka, F.J., Roff, L.E.; IDF Diabetes Atlas: Global Estimates for the Prevalence of Diabetes for 2015 and 2040 *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2017**, 128, 40.
122. Lee, B.R., Hwang, J.W., Choi, Y.Y., Wong, S.F., Hwang, Y.H., Lee, D.L., Lee, S.; In Situ Formation and Collagen-Alginate Composite Encapsulation of Pancreatic Islet Spheroids *Biomater.* **2012**, 33, 837.
123. Cañibano-Hernández, A., Saenz del Burgo, L., Espona-Noguera, A., Orive, G., Hernández, R.M., Ciriza, J., Pedraz, J.L.; Hyaluronic Acid Enhances Cell Survival of Encapsulated Insulin-Producing Cells in Alginate-Based Microcapsules *Int. J. Appl. Pharm.* **2019**, 557, 192.
124. Hu, S., Kuwabara, R., Chica, C.E.N., Smink, A.M., Koster, T., Medina, J.D., Haan, B.J. de, Beukema, M., Lakey, M.J.R.T., García, A.J., Vos, P. de; Toll-Like Receptor 2-Modulating Pectin-Polymers In Alginate-Based Microcapsules Attenuate Immune Responses And Support Islet-Xenograft Survival *Biomater.* **2021**, 266, 120460.
125. Kuehn, C., Fülöp, T., Lackey, J.R.T., Vermette, P.; Young Porcine Endocrine Pancreatic Islets Cultured in Fibrin and Alginate Gels Show Improved Resistance Towards Human Monocytes *Pathol. Biol.* **2014**, 62(6), 354.
126. Dumpala, P.R., Holdcraft, R.W., Martis, P.C., Laramore, M.A., Parker, P.S., Levine, D.M., Smith, B.H., Gazda, L.S.; Retention of Gene Expression in Porcine Islets After Agarose Encapsulation and Long-Term Culture *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, 476(4), 580.
127. Luan, N.M., Teramura, Y., Iwata, H.; Immobilization of the Soluble Domain of Human Complement Receptor 1 on Agarose-Encapsulated Islets for the Prevention of Complement Activation *Biomater.* **2010**, 31(34), 8847.
128. Matsumoto, S., Abalovich, A., Wechsler, C., Wynyard, S., Elliott, R.B.; Clinical Benefit of Islet Xenotransplantation for the Treatment of Type 1 Diabetes *EBiomedicine* **2016**, 12, 255.

129. Weber, L.M., Jing He, Bradley, B., Haskins, K., Anseth, K.S.; PEG-Based Hydrogels as an in Vitro Encapsulation Platform for Testing Controlled b-Cell Microenvironments *Acta Biomater.* **2006**, 2, 1.
130. Laporte, C., Tubbs, E., Pierron, M., Gallego, A., Moisan, A., Lamarche, F., Lozano, T., Hernandez, A., Cottet-Rousselle, C., Gauchez, A., Persoons, V., Bottausci, F., Fontelaye, C., Boizot, F., Lablanche, S., Rivera, F.; Improved Human Islets' Viability and Functionality with Mesenchymal Stem Cells and Arg-Gly-Asp Tripeptides Supplementation of Alginate Micro-Encapsulated Islets In Vitro *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, 528, 650.
131. Borg, D.J., Welzel, P.B., Grimmer, M., Friedrichs, J., Weigelt, M., Wilhelm, C., Prewitz, M., Stißel, A., Hommel, A., Kurth, T., Freudenberg, U., Bonifacio, E., Werner, C.; Macroporous Biohybrid Cryogels for Co-Housing Pancreatic Islets with Mesenchymal Stromal Cells *Acta Biomater.* **2016**, 44, 178.
132. Ma, J., Qi, W., Xie, Y., Wang, W., Yu, W., Ma, X; K562 Cell Growth Activity and Metabolism Characteristics in APA Microencapsulated Culture and Modeling Study *J. Biotechnol.* **2006**, 125(2), 242.
133. Zhi, Z., Liu, B., Jones, P., Pickup, M.J.C.; Polysaccharide Multilayer Nanoencapsulation of Insulin-Producing β -Cells Grown as Pseudoislets for Potential Cellular Delivery of Insulin *Biomacromolecules* **2010**, 11, 610.
134. Sakai, S., Ono, T., Ijima, H., Koei Kawakami; MIN6 Cells-Enclosing Aminopropyl-Silicate Membrane Templated by Alginate Gels Differences in Gyluronic Acid *Int. J. Pharm.* **2004**, 270, 65.
135. Sakai, S., Hashimoto, I., Kawakami, K.; Development of Alginate–Agarose Subsieve-Size Capsules for Subsequent Modification with a Polyelectrolyte Complex Membrane *Biochem. Eng. J.* **2006**, 1, 76.
136. Surrao, D.C., Arasu, Y., Ekberg, J.A.K., St John, J.A.; Blended, Crosslinked Alginate-Methylcellulose Hydrogels for Encapsulation and Delivery of Olfactory Ensheathing Cells *Materialia* **2020**, 10, 100654.
137. Simó, G., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., Rodríguez-Nogales, J.M.; Research Progress in Coating Techniques of Alginate Gel Polymer for Cell Encapsulation *Carbohydr. Polym* **2017**, 170,1.
- 138 – Saberianpour, S., Karimia, A., Nemati, S., Amini, H., Sardroud, H.A., Khaksar, M., Mamipour, M., Nouri, M., Rahbarghazi, R.; Encapsulation of Rat

- Cardiomyoblasts with Alginate-Gelatin Microspheres Preserves Stemness Feature
In Vitro Biomed. Pharmacother. **2019**, 109, 402.
139. Tentori, L., Salvati, P.M.; Hemoglobinometry in Human Blood *Methods Enzymol.* **1981**, 76, 707.
140. Knowler, R.G., Salter, M., Brooks, S.L., Moncada, S.; Anti-Inflammatory Glucocorticoids Inhibit the Induction by Endotoxin of Nitric Oxide Synthase in the Lung, Liver and Aorta of the Rat *Biochem Biophys Res Commun.* **1990**, 172(3), 1042.
141. Peres, C.M., Curi, R.; *Como Cultivar Células*; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, **2005**, p. 24.
142. Shaari, N., Kamarudin, S.K; Chitosan and Alginate Types of Bio-Membrane in Fuel Cell Application: An Overview *J. Power Sources* **2015**, 289, 71.
143. Coradin, T., Allouche, J., Boissiere, M., Livage, J.; Sol-Gel Biopolymer/Silica nanocomposites in Biotechnology *Curr. Nanosci.* **2006**, 2(3), 219.
144. Jyothi, N.V.N., Prasanna, P.M., Sakarkar, S.N., Prabha, K.S., Ramaiah, P.S., Srawan, G.Y.; Microencapsulation Techniques, Factors Influencing Encapsulation Efficiency *J. Microencapsul.* **2010**, 27, 187.
145. Raguvaran, R., Manuja, B.K., Chopra, M., Thakur, R., Anand, T., Kalia, A., Manuja, A.; Sodium Alginate and Gum Acacia Hydrogels of ZnO Nanoparticles Show Wound Healing Effect on Fibroblast Cells *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, 96, 185.
146. Teong, B., Manousakas, I., Chang, S.J., Huang, H.H., Ju, K., Kuo, S.M.; Alternative Approach of Cell Encapsulation by Volvox Spheres *Mater. Sci. Eng., C* **2015**, 55, 79.
147. Braia, M., Loureiro, D., Tubio, G., Lienqueo, M.E., Romanini, D.; Interaction between Trypsin and Alginate: An ITC and DLS Approach to the Formation of Insoluble Complexes *Colloids Surf B Biointerfaces* **2017**, 155, 507.
148. Abnoos, M., Mohseni, M., Mousavi, S.A.J., Ashtari, K., Ilka, R., Mehravi, B.; Chitosan-Alginate Nano-carrier for Transdermal Delivery of Pirfenidone Idiopathic Pulmonary Fibrosis *Int. Biol. Macromol.* **2018**, 118, 1319.
149. Balan, B., Trifkovi, K., SorCevi, V., Markovi, S., Pjanovic, R., Nedovi, V., Bugarski, B.; Novel Resveratrol Delivery Systems Based on Alginate-Sucrose and Alginate-Chitosan Microbeads Containing Liposomes *Food Hydrocoll.* **2016**, 61, 832.

150. Kim, K.M., Kim, H.M., Lee, W.J., Kim, T.I., Lee, J.K., Jeong, J., Paek, S.M., Oh, J.M.; Surface Treatment of Silica Nanoparticles for Stable and Charge-controlled Colloidal Silica *Int. J. Nanomedicine* **2014**, 9(2), 29.
151. Guinier, A., Fournet, G.; *Small-angle scattering of X-rays*; Wiley: New York, **1955**.
152. Green, D.L., Lin, J.S., Lam, Y., Hu, M.Z., Schaefer, D.W, Harris, M.T.; Size, Volume Fraction, and Nucleation of Stober Silica Nanoparticles *J. Colloid Interfaces Sci.* **2003**, 266, 346.
153. Hecht, H., Srebnik, S.; Sequence-Dependent Association of Alginate with Sodium and Calcium Counterions *Carbohydr. Polym.* 2017, 157, 1144.
154. Colthup, N.B., Daly, L.H., Wiberley, S.E.; *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*; Academic Press: New York, **1975**, p. 373 e p. 381.
155. Morais, E.C., Brambilla, R., Correa, G.G., Dalmoro, V., Santos, J.H.Z.; Imprinted Silicas for Paracetamol Preconcentration Prepared by the Sol-Gel Process *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **2017**, 83, 90.
156. Zhang, S., Xu, K., Darabi, M.A., Yuan, Q., Xing, M.; Mussel-Inspired Alginate Gel Promoting the Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and Anti-Infection *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, 69, 496.
157. Lozzio C.B., Lozzio B.B.; Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell Line with Positive Philadelphia Chromosoma *Blood* **1975**, 45, 321.
158. Koeffler, H.P., Golde D.W.; Human Myeloid Leucemia Cell Lines-A Review *Blood* **1980**, 56, 344.
159. Erard F., Dean A., Schechter A.N.; Inhibitors of Cell Division Reversibly Modify Hemoglobin Concentration in Human Erythroleukemia K-562 Cells *Blood* **1981**, 58, 1236.
160. Luisi-DeLuca C., Mitchell T., Spriggs D., Kufe D.; Induction of Terminal Differentiation in Human K- 562 Erythroleukemia Cells by Arabinofuranosyl cytosine *J. Clin. Invest.*, **1984**, 74, 821.
161. Rowley P.T., O&son-Wilhelm B.M., Farley B.A., LaBella S.; Inducers of Erythroid Differentiation in K- 562 Human Leukemia Cells *Expl Hematol.* **1981**, 9, 32.
162. Todokoro K., Kanazawa S., Amanuma H., Ikawa Y.; Specific Binding of Eritropoietin to its Receptor on Responsive Mouse Erythroleukemia Cells. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 4126.

163. Sasaki, R., Masuyarnat, A., Ethot, Y., Yoshidas, H., Miura, Y., SAsaki, H.; The Extracts from Rat Submandibular Glands Induce the Erythroid Differentiation of K-562 Cells *Leukemia*, **1995**, 19(6), 397.
164. Miyamoto, Y., Kosaka, M., Eta, Y., Shibai, H., Saito, S.; Effect of Erythroid Differentiation Factor on Erythroid Differentiation and Proliferation of K-562 Cells *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, 168(3), 1149.
165. Sakai, S., Hashimoto, I., Kawakami, K.; Development of Alginate–Agarose Subsieve-Size Capsules for Subsequente Modification with a Polyelectrolyte Complex Membrane *Biochem. Eng. J.* 2006, 30, 76.
166. Wu, Y., Lin, Z.Y., Wenger, A. C., Tam, K.C., Tang, X. 3D Bioprinting of Liver-Mimetic Construct with Alginate/Celulose Nanocrystal Hybrid Bioink, *Bioprint.* **2018**, 9, 1.
167. Pinto Junior, E.A., Dávila, J.L., Akira d'Ávila, M.; Rheological Studies on Nanocrystalline Cellulose/Alginate Suspensions *J. Mol. Liq.* **2019**, 277, 418.
168. Córdoba, A., Cuéllar, N., González, M., Medina, J.; The Plasticizing Effect of Alginate on the Thermoplastic Starch/Glycerin Blends *Carbohydr. Polym.* **2008**, 73, 409.
169. Ling, K., Wub, H., Neish, A.S., Champion, J.A; Alginate/Chitosan Microparticles for Gastric Passage and Intestinal Release of Therapeutic Protein Nanoparticles *J. of Controll. Release* **2019**, 295, 174.
170. Hu, T., Qahtan, A.S.A., M.D., Lei, Zhixin, L., Zhao, D., Nie, H.; Inhibition of Hela Cell Growth by Doxorubicin-Loaded and Tuftsin conjugated Alginate-PEG Microparticles *Bio. Materials* **2018**, 3, 48.
171. Lau, H., Jeong, S., Kim, A.; Gelatin-Alginate Coacervates for Circumventing Proteolysis and Probing Intermolecular Interactions by SP R *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, 117, 427.
172. Li, C., Qian, Y., Zhao, S., Yin, Y., Li, J.; Alginate/PEG based Microcarriers with Cleavable Crosslinkage for Expansion and non Invasive Harvest of Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells *Mat. Sci. Eng. C* **2016**, 64, 43.
173. Zhang, B., Yang, T., Wang, Q., Zhang, G., Huo, J., Huang, J., Wang, L; Fabrication of Uniform Alginate-Agarose Microcapsules loading FeSO₄ using Water-Oil-Water-Oil Multiple Emulsions System combined with Premix Membrane Emulsification Technique *Colloids surf. A Physicochem. Eng. Asp* **2016**, 498, 128.

174. Thomas, D., L, Latha, M.S., Thomas, K.K.; Synthesis and in Vitro Evaluation of Alginate-Cellulose Nanocrystal Hybrid Nanoparticles for the Controlled Oral Delivery of Rifampicin *J. Drug Deliv. Sci. Tec.* **2018**, 46, 392.
175. Asthana, A., Verma, R., Sing, A.K., Susan, A.B.H.; Glycine Functionalized Magnetic Nanoparticle Entrapped Calcium Alginate Beads: A Promising Adsorbent for Removal of Cu(II) Ions *J. Environ. Chem. Eng.* **2016**, 4, 1985.
176. Joshy, K.S., George, A., Jose, J., Kalarikkal, N., Pothene, A.L., Thomas, S.; Novel Dendritic Structure of Alginate Hybrid Nanoparticles for Effective Anti-viral Drug Delivery *Int. J. Biol. Macromol* **2017**, 103, 1265.
177. Jayapal, J., Dhanaraj, S.; Exemestane Loaded Alginate Nanoparticles for Cancer Treatment: Formulation and In Vitro Evaluation *Int. J. Biol. Macromol* **2017**, 105, 416.