

FACULDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Microencapsulação celular por extrusão eletrostática:  
Aplicação na expressão de  $\alpha$ -L-iduronidase para o tratamento da  
Mucopolissacaridose tipo I**

**DIRNETE DIEL**

PORTO ALEGRE, 2017



FACULDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Microencapsulação celular por extrusão eletrostática:  
Aplicação na expressão de  $\alpha$ -L-iduronidase para o tratamento da  
Mucopolissacaridose tipo I**

Dissertação apresentada por  
**Dirnete Diel** para obtenção do  
GRAU DE MESTRE em  
Ciências Farmacêuticas.

**Orientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira**

**Coorientadora: Dra. Valeska Lizzi Lagranha**

PORTO ALEGRE, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 23 de março de 2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Ana Helena da Rosa Paz  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Fabiana Quoos Mayer  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Diel, Dirnete da Silva  
Microencapsulação celular por extrusão eletrostática: Aplicação na expressão de alfa-L-iduronidase para o tratamento de Mucopolissacaridose tipo I / Dirnete da Silva Diel. -- 2017.  
101 f.

Orientador: Helder Ferreira Teixeira.  
Coorientadora: Valeska Lizzi Lagranha.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Microencapsulação celular. 2. Microcápsulas de alginato. 3. Mucopolissacaridose tipo I. 4. Box-Behnken. I. Ferreira Teixeira, Helder, orient. II. Lizzi Lagranha, Valeska, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Centro de Terapia Gênica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com o apoio financeiro de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE).



A presente dissertação de mestrado foi redigida na forma de capítulos, em conformidade com as normas vigentes no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e encontra-se estruturada da seguinte forma:

– O **capítulo I** trata da revisão da literatura acerca do tema da dissertação, abordando os aspectos relevantes para o desenvolvimento do trabalho: Mucopolissacaridose tipo I e tratamentos; microencapsulação celular e características primordiais das microcápsulas; aspectos referentes aos biomateriais, revestimentos e técnicas de microencapsulação celular, e por fim, aplicação terapêutica das microcápsulas na MPS I.

– O **capítulo II** apresenta os resultados obtidos da otimização da obtenção de microcápsulas de alginato no desenho experimental box-behnken, da caracterização físico-química e da avaliação da viabilidade e da atividade de IDUA *in vitro* antes e após o revestimento e avaliação *in vivo* da atividade de IDUA após 30 dias de tratamento com as microcápsulas revestidas com poli-L-lisina.



## AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar meu agradecimento àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho

Ao meu orientador, professor Dr. Helder Ferreira Teixeira, pela oportunidade, pelo acolhimento e incentivo durante toda iniciação científica e mestrado. Pelos ensinamentos, conselhos, confiança, apoio e atenção. Enfim, fico imensamente grata por todos esses anos de convivência.

A minha coorientadora Dra. Valeska Lizzi Lagranha, pelas oportunidades oferecidas, confiança, paciência e amizade.

À professora Dra. Ursula Matte, pela parceria e ensinamentos.

À professora Dra. Fernanda Bruxel, pela colaboração e amizade.

A toda minha família pelo incentivo, amor e apoio em todos os momentos.

Ao meu esposo Tiago Silveira pelo amor, carinho e pela compreensão ao longo desses anos de estudos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Desenvolvimento Galênico da Faculdade de Farmácia da UFRGS, por toda a colaboração, convivência, amizade e troca de experiências durante anos.

Aos colegas e amigos do Centro de Terapia Gênica do HCPA, pela contribuição científica e momentos de alegrias.

Por fim, agradeço a CAPES pela bolsa de mestrado e ao FIPE-HCPA e CNPq pelo apoio financeiro.



## RESUMO

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA). Essa deficiência resulta no acúmulo de glicosaminoglicanos levando a diversas manifestações clínicas. A microencapsulação de células recombinantes que superexpressam IDUA tem sido considerada uma estratégia promissora para o tratamento de MPS I. Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo a otimização da encapsulação de células BHK (Baby Hamster Kidney) superexpressando IDUA em microcápsulas de alginato revestidas com poli-L-lisina (PLL) utilizando-se um extrusor eletrostático. Em uma primeira etapa, um estudo de otimização das microcápsulas de alginato (MC-A) foi realizado por meio de um desenho experimental do tipo Box-Behnken (software Mini-Tab®) que permitiu avaliar simultaneamente a influência da voltagem (kV), fluxo alginato/células (mL/h) e concentração de alginato (%) sobre o tamanho das microcápsulas e a atividade de IDUA. Após, as microcápsulas foram revestidas sequencialmente com PLL e alginato (MC-APA) com o objetivo de aumentar a sua estabilidade. Nas condições experimentais empregadas, MC-A e MC-APA apresentaram-se monodispersas (span < 1,22) com um diâmetro médio inferior a 350  $\mu$ m, determinado por difração a laser. O revestimento alterou a morfologia das microcápsulas (microscopia eletrônica de varredura) e a sua resistência mecânica (analisador de textura), sendo observado um aumento de cerca de 6 vezes na força necessária para compressão das mesmas. O revestimento final pelo alginato (MC-APA) parece ter sido parcial de acordo com as análises de infravermelho por transformada de Fourier com refletância atenuada. Em uma última etapa, a atividade enzimática foi avaliada em modelo murino MPS I após implante subcutâneo de MC-APA. Foi observado um aumento significativo da atividade de IDUA na pele, após 30 dias de tratamento. Nas análises histológicas foi observado um infiltrado inflamatório no local da aplicação que não impediu a liberação da enzima nas condições avaliadas. No seu conjunto, esse estudo demonstra a potencialidade das MC-APA para a liberação local de IDUA.

**Palavras chave:** Mucopolissacaridose tipo I, microcápsulas de alginato, microencapsulação celular, Box-Behnken.

## ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is an autosomal recessive disorder caused by the deficiency of  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA). This deficiency results in the accumulation of glycosaminoglycans leading to various clinical manifestations. The microencapsulation of recombinant cells overexpressing IDUA has been considered as a promising strategy for the treatment of MPS I. In this context, the present study aimed to optimize the encapsulation of BHK cells overexpressing IDUA in poly-L-lysine (PLL) coated alginate microcapsules using an electrostatic extruder. In a first step, a Box-Behnken experimental design (Mini-Tab® software) was carried out for the optimization of the alginate microcapsules (MC-A), which allowed to evaluate simultaneously the influence of voltage (kV), alginate/cell flow (mL/h) and alginate concentration (%) on the size of the microcapsules and IDUA activity. Thereafter, the microcapsules were sequentially coated with PLL and alginate (MC-APA) in order to increase their stability. In the experimental conditions used, MC-A and MC-APA were monodisperse (span <1.22) with an average diameter of less than 350  $\mu$ m, determined by laser diffraction. The coating modified microcapsules morphology (scanning electron microscopy) and their mechanical resistance (texture analyzer), being observed a six-fold increase in the required force for their compression. The final alginate coating (MC-APA) appears to have only partially coated the microcapsules, according to the attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy analyses. In a final step, the enzymatic activity was evaluated in a MPS I murine model after subcutaneous implantation of MC-APA. A significant increase in IDUA activity was observed in the skin at 30 days after treatment. Histological analyses revealed an inflammatory infiltrate at the application site, which did not prevent the release of the enzyme under the evaluated conditions. Overall, this study demonstrates the potentiality of MC-APA for the local release of IDUA.

**Keywords:** Mucopolysaccharidosis type I, alginate microcapsules, cellular microencapsulation, Box-Behnken.



## LISTA DE TABELAS

---

### CAPÍTULO I

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Estratégias para o tratamento de MPS I utilizando a microencapsulação celular..... | 52 |
|--|----|

---

### CAPÍTULO II

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Variáveis independentes e variáveis dependentes estabelecidas para o Box- Behnken 3 <sup>3</sup> ..... | 67 |
| Tabela 2. Resultados das respostas observados nas condições determinadas no desenho Box-Behnken.....             | 71 |
| Tabela 3. Resumo da análise de variância da equação de regressão..   | 72 |
| Tabela 4. Resultado da otimização com as respostas previstas.....  | 75 |
| Tabela 5. Resultado da caracterização das microcápsulas.....   | 75 |

---



## LISTA DE FIGURAS

---

### CAPÍTULO I

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 1. | Representação esquemática de uma microcápsula e suas características.....        | 40 |
| Figura 2. | Estrutura química do alginato.....   | 43 |
| Figura 3. | Processo de gelificação do alginato.....   | 44 |
| Figura 4. | Esquema das tecnologias de extrusão utilizadas na produção de microcápsulas..... | 47 |
| Figura 5. | Método de produção das microcápsulas pela técnica de extrusão eletrostática..... | 48 |
| Figura 6. | Tráfego de enzimas lisossômicas após encapsulação celular.....                   | 49 |

---

### CAPÍTULO II

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 1. | Gráficos de contorno das áreas do tamanho das microcápsulas e da atividade de IDUA obtidos pelo planejamento Box-Behnken ..... | 72 |
| Figura 2. | Fotomicrografias das microcápsulas obtidas na MEV.....   | 76 |
| Figura 3. | Espectros obtidos no FTIR-ATR.....   | 78 |
| Figura 4. | Atividade da enzima IDUA durante 28 dias de microencapsulação.....   | 80 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 5. | Viabilidade das células rBHK encapsuladas durante 28 dias | 80 |
| Figura 6. | Atividade da enzima IDUA nos tecidos após tratamento..... | 81 |
| Figura 7. | Aspectos das microcápsulas recuperadas .....              | 82 |
| Figura 8. | Análise histológica das microcápsulas.....                | 83 |

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

|        |   |
|--------|---|
| BHK    | <i>Baby Hamster Kidney</i>                      |
| DBB    | Desenho Box- Behnken                            |
| DL     | Doenças lisossômicas                            |
| GAGs   | Glicosaminoglicanos                             |
| IDUA   | $\alpha$ -L-iduronidase                         |
| M6P    | Manose-6-fosfato                                |
| RM6P   | Receptor de manose-6-fosfato                    |
| MC-A   | Microcápsula de alginato                        |
| MC-APA | Microcápsula de alginato-poli-L-lisina-alginato |
| MEV    | Microscopia eletrônica de varredura             |
| MPS    | Mucopolissacaridose                             |
| MPS I  | Mucopolissacaridose tipo I                      |
| PLL    | Poli-L-lisina                                   |
| rBHK   | <i>Baby Hamster Kidney</i> recombinante         |
| TCTH   | Transplante de células-tronco hematopoiéticas   |
| TRE    | Terapia de reposição enzimática                 |



## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....                        | 23 |
| Referências.....                               | 27 |
| <b>OBJETIVOS</b> .....                         | 29 |
| Objetivo Geral.....                            | 31 |
| Objetivos Específicos.....                     | 31 |
| <b>CAPÍTULO I: Revisão da Literatura</b> ..... | 33 |
| Mucopolissacaridoses.....                      | 35 |
| Mucopolissacaridoses tipo I.....               | 35 |
| Tratamentos.....                               | 36 |
| Microencapsulação celular.....                 | 38 |
| Biomateriais.....                              | 41 |
| Microcápsulas de alginato.....                 | 42 |
| Revestimento das microcápsulas.....            | 44 |
| Métodos de produção das microcápsulas.....     | 46 |
| Aplicações terapêuticas das microcápsulas..... | 48 |
| Referências.....                               | 53 |
| <b>CAPÍTULO II. Parte Experimental</b> .....   | 61 |
| Introdução.....                                | 64 |
| Materiais e Métodos.....                       | 65 |
| Resultados e Discussão.....                    | 70 |
| Conclusão.....                                 | 83 |

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| Referências.....            | 84        |
| <b>DISCUSSÃO GERAL.....</b> | <b>89</b> |
| Referências.....            | 95        |
| <b>CONCLUSÕES.....</b>      | <b>99</b> |

## INTRODUÇÃO

---



A Mucopolissacaridose de tipo I (MPS I) é uma doença autossômica recessiva que afeta aproximadamente 1:100000 nascidos vivos (MUENZER, 2011). A MPS I é caracterizada pela deficiência da enzima  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA) a qual é necessária para a degradação dos glicosaminoglicanos heparan e dermatan sulfato. Diversos processos bioquímicos e fisiológicos podem ser afetados, levando a uma condição patológica crônica, multissistêmica e com manifestações clínicas variadas (CIMAZ; TORRE, 2014; MUNOZ-ROJAS et al., 2011). A terapia de reposição enzimática (TRE) tem sido utilizada com sucesso, a qual consiste na administração direta da enzima no paciente (D'ACO et al., 2012; VALAYANNOPOULOS; WIJBURG, 2011). Apesar da TRE ser a terapêutica atual mais segura, essa abordagem possui uma série de limitações, incluindo o fato da enzima administrada não chegar a órgãos de difícil acesso, como cérebro, ossos e cartilagens (GIUGLIANI et al., 2016; NOH; LEE, 2014). Até o momento, não há um tratamento eficaz e curativo para todas as manifestações clínicas da doença, motivando a busca por novas alternativas para seu tratamento.

Neste contexto, a microencapsulação celular tem sido investigada como uma potencial estratégia terapêutica para MPS I (HERNANDEZ et al., 2010; MATTE et al., 2011). MAYER et al (2010) desenvolveram uma linhagem de células *Baby Hamster Kidney* (BHK), geneticamente modificada, que super-expressa IDUA. Essas células foram encapsuladas em microcápsulas de alginato visando à produção de IDUA. Os resultados, obtidos até o momento, demonstraram um aumento da atividade de IDUA em modelo murino de MPS I, após implante intraperitoneal e subcutâneo (BALDO et al., 2012b; LAGRANHA et al., 2017).

Diversos estudos investigam o uso da microencapsulação celular para várias aplicações, bem com os fatores que podem influenciar nas características das microcápsulas e conseqüentemente no sucesso dessa abordagem de tratamento (GATTÁS-ASFURA et al., 2015; NABAVIMANESH; HASHEMI-NAJAFABADI; é VASHEGHANI-FARAHANI, 2015; PAREDES-JUAREZ et al., 2013; TAM et al., 2011; VEISEH et al., 2015; WETAPARNA et al., 2016). De maneira geral, a composição qualitativa e quantitativa das microcápsulas e o

método de preparação influenciam diretamente as propriedades físico-químicas das mesmas, como diâmetro médio e dispersão. Esses parâmetros podem influenciar na estabilidade das microcápsulas, na facilidade de implantação, bem como na reação inflamatória que ocorre no entorno do implante. No caso específico de MPS I, alguns tipos celulares já foram encapsulados em microcápsulas de alginato, sendo estas revestidas ou não com poli-L-lisina (BARSOUM et al., 2003; MAYER et al., 2010; PILLER PUICHER et al., 2012). Contudo, até o momento, as microcápsulas foram obtidas exclusivamente por extrusão com fluxo de ar.

A técnica de extrusão eletrostática tem recentemente substituído a extrusão por fluxo de ar, vibração ou corte mecânico por permitir um maior controle de parâmetros que influenciam as propriedades das microcápsulas, além de ser considerada mais reprodutível, escalonável e de fácil produção em condições estéreis (MANOJLOVIC et al., 2006). Esse método baseia-se na utilização de força eletrostática sendo que o potencial elétrico aplicado entre o dispositivo de formação de gotículas e a solução reticulante, induz uma carga na superfície da solução do polímero que resulta numa diminuição da tensão superficial do polímero e a gota é formada para expelir o excesso de carga superficial (GASPERINI; MANO; REIS, 2014).

Neste contexto, a presente dissertação de mestrado tem por objetivo aperfeiçoar o sistema de microencapsulação de células BHK recombinantes (rBHK) usando a técnica de extrusão eletrostática. Para tanto, parâmetros relacionados com a composição das formulações e condições do extrusor foram otimizados através de um desenho experimental. Também visa o presente estudo avaliar o efeito do revestimento das microcápsulas com poli-L-lisina sobre as propriedades das microcápsulas (tamanho e resistência), bem como avaliar a atividade de IDUA em modelo murino MPS I, após implante subcutâneo.

## Referências

BALDO, G. et al. Intraperitoneal implant of recombinant encapsulated cells overexpressing alpha- L -iduronidase partially corrects visceral pathology in mucopolysaccharidosis type I mice. **Cytotherapy**, v. 14, p. 860–867, 2012b.

BARSOUM, S. C. et al. Delivery of recombinant gene product to canine brain with the use of microencapsulation. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 142, n. 6, p. 399–413, 2003.

CIMAZ, R.; TORRE, F. L. Mucopolysaccharidoses. **Current Rheumatology Reports**, v. 16, p. 389–398, 2014.

D'ACO, K. et al. Diagnosis and treatment trends in mucopolysaccharidosis I: Findings from the MPS I registry. **European Journal of Pediatrics**, v. 171, n. 6, p. 911–919, 2012.

GASPERINI, L.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Natural polymers for the microencapsulation of cells. **Journal of the Royal Society**, v. 11, n. 100, p. 1–19, 2014.

GATTÁS-ASFURA, K. et al. Covalent layer-by-layer assembly of hyperbranched polymers on alginate microcapsules to impart stability and permselectivity KM. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 46, p. 8208–8219, 2015.

GIUGLIANI, R. et al. Emerging drugs for the treatment of mucopolysaccharidoses. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 9, n.1, p. 1–18, 2016.

HERNANDEZ, R. M. A. et al. Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 711–730, 2010.

LAGRANHA, V. L. et al. Subcutaneous implantation microencapsulated cells overexpressing  $\alpha$ -L-iduronidase for mucopolysaccharidosis type I treatment. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. V. 28, n.43, p. 1-11, 2017.

MANOJLOVIC, V. et al. Immobilization of cells by electrostatic droplet generation: A model system for potential application in medicine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 2, p. 163–171, 2006.

MAYER, F. et al. Effects of Cryopreservation and Hypothermic Storage on Cell Viability and Enzyme Activity in Recombinant Encapsulated Cells Overexpressing. **Artificial Organs**, v. 34, n. 5, p. 434–439, 2010.

MATTE, U. et al. Cell microencapsulation: a potential tool for the treatment of neuronopathic lysosomal storage diseases. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 34, p. 983–990, 2011.

MUENZER, J. Overview of the mucopolysaccharidoses. **Rheumatology**, v. 50, p.

4–12, 2011.

MUNOZ-ROJAS, M. V. et al. Clinical manifestations and treatment of mucopolysaccharidosis type I patients in Latin America as compared with the rest of the world. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 34, p. 1029–1037, 2011.

NABAVIMANESH, M. M.; HASHEMI-NAJAFABADI, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E. Islets immunoisolation using encapsulation and PEGylation , simultaneously , as a novel design. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 4, p. 486–491, 2015.

NOH, H.; LEE, J. I. Current and potential therapeutic strategies for mucopolysaccharidoses. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 39, n. 3, p. 215–224, 2014.

PAREDES-JUAREZ, G. A. et al. The role of pathogen-associated molecular patterns in inflammatory responses against alginate based microcapsules. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 3, p. 983–992, 2013.

PILLER PUICHER, E. et al. Encapsulated engineered myoblasts can cure Hurler syndrome: preclinical experiments in the mouse model. **Gene Therapy**, v. 19, n. 4, p. 355–364, 2012.

TAM, S. K. et al. Biocompatibility and physicochemical characteristics of alginate-polycation microcapsules. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 4, p. 1683–1692, 2011.

VALAYANNOPOULOS, V.; WIJBURG, F. A. Therapy for the mucopolysaccharidoses. **Rheumatology**, v. 50, p. 49–59, 2011.

VEISEH, O. et al. Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates. **Nature Materials**, v. 14, n. 6, p. 643–651, 2015.

WETAPARNA et al. Impact of alginate concentration on the viability, cryostorage , and angiogenic activity of encapsulated fibroblasts. **Materials Science & Engineering C**, v. 65, p. 269–277, 2016.

## **OBJETIVOS**

---



## **Objetivo Geral**

Otimizar a obtenção de microcápsulas de alginato contendo células rBHK formadas pelo processo de extrusão eletrostático e avaliar a atividade enzimática após implante subcutâneo.

## **Objetivos Específicos**

- Otimizar a obtenção de microcápsulas de alginato usando microencapsulador eletrostático;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas e morfológicas das microcápsulas obtidas antes e após revestimento com PLL;
- Avaliar a atividade da enzima  $\alpha$ -L-iduronidase e a viabilidade celular *in vitro*;
- Implantar as microcápsulas na via subcutânea de camundongos MPS I e avaliar a atividade de IDUA após 30 dias.



## **CAPÍTULO I: Revisão da Literatura**

---



## **Mucopolissacaridoses**

As mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo heterogêneo de doenças lisossômicas (DL) caracterizadas por mutações em genes que codificam enzimas envolvidas nas vias de degradação de glicosaminoglicanos (GAGs). Esse grupo de doença é representado pela deficiência de onze enzimas, que são classificadas de acordo com a enzima deficiente, em nove tipos (CIMAZ; TORRE, 2014). Essas doenças são herdadas de modo autossômico recessivo, com exceção da MPS tipo II que é ligada ao X, e possuem um amplo espectro de gravidade clínica inclusive para a mesma deficiência enzimática (MUENZER, 2011).

Os GAGs são polissacarídeos lineares não ramificados compostos por unidades dissacarídicas que quando ligados a proteínas, são chamados de proteoglicanos que são parte essencial da matriz extracelular. Em seu catabolismo, os proteoglicanos sofrem clivagem proteolítica e são sequencialmente degradados por diversas enzimas lisossômicas formando monossacarídeos e sulfatos inorgânicos (GANDHI; MANCERA, 2008). Com a redução ou a perda da atividade dessas enzimas lisossômicas ocorre o acúmulo destas macromoléculas não degradadas levando assim a perturbação das funções lisossômicas e celulares, causando diversas manifestações clínicas (MARTINS et al., 2009).

### ***Mucopolissacaridose tipo I***

A Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é considerada o protótipo das DL progressivas e multissistêmicas. É uma doença causada por mutação no gene que codifica a enzima  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA) (BECK et al., 2014). A IDUA é uma glicosidase que possui um tamanho de 69 kDa na sua forma madura. Essa enzima é responsável pela hidrólise de resíduos ácidos alfa-L-idurônicos dos GAGs heparan e dermatan sulfato (TAYLOR et al., 1991). Os lisossomos estão presentes em todas as células eucarióticas e têm papel importante em diversas funções, assim as manifestações clínicas da MPS I são variadas (MARTINS et al., 2009).

Devido à heterogeneidade da MPS I a mesma é dividida em três formas principais: a Síndrome de Hurler (forma grave), a Síndrome de Hurler-Scheie (forma intermediária) e a Síndrome de Scheie (forma atenuada) (BECK et al., 2014). Na forma mais grave é evidente o atraso no desenvolvimento nos primeiros anos, seguido de comprometimento neurológico progressivo e perda da capacidade física, sendo a expectativa de vida limitada à infância quando não tratada. Na forma intermediária geralmente não há prejuízo neurológico, porém devido às complicações cardiovasculares e respiratórias a expectativa de vida geralmente é limitada à fase adulta. Já na forma atenuada as manifestações clínicas apresentam-se tardiamente e de forma mais lenta, porém os pacientes sobrevivem até a idade adulta com significativa morbidade (BECK et al., 2014; MARTINS et al., 2009; MUNOZ-ROJAS et al., 2011).

Considerando a natureza progressiva da MPS I e para os tratamentos serem eficazes, é essencial o diagnóstico precoce, porém geralmente este é demorado, com exceção nos casos com histórico familiar que é realizado no pré-natal. Devido às semelhanças clínicas e os sintomas variados entre as DL, primeiramente, se faz uma triagem inicial através da análise de GAGs secretados na urina e após se faz ensaios enzimáticos e moleculares para o diagnóstico definitivo (GIUGLIANI, 2012). No entanto, apesar do diagnóstico definitivo, ainda há dificuldade de fazer a correlação genótipo-fenótipo para diferenciar as três formas clínicas da MPS I (SUGAWARA et al., 2008).

### ***Tratamentos***

Até o momento, o tratamento da MPS I está baseado em duas terapias com o objetivo de fornecer a enzima ao paciente, a terapia de reposição enzimática (TRE) e o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH). Ambas baseiam-se na propriedade da enzima IDUA de ser secretada e captada pelas células vizinhas pela via de manose-6-fosfato (M6P). No entanto, dependendo da gravidade, do fenótipo e do grau de progressão da doença os mesmos são limitados, intensivos e não curativos (BECK, 2010).

O primeiro TCTH para o tratamento de MPS I foi realizado em 1980 em uma criança com síndrome de Hurler. Desde então, centenas de pacientes receberam células tronco da medula óssea ou do cordão umbilical de doadores. Essa terapia por apresentar alta mortalidade e morbidade associada, é normalmente recomendada em situações mais graves e em situações em que o paciente tenha menos de dois anos de idade com cognição normal, pois assim pode prolongar a sobrevivência, preservar a neurocognição e melhorar algumas características somáticas (D'ACO et al., 2012; VALAYANNOPOULOS; WIJBURG, 2011).

Quando o TCTH é bem sucedido, a expectativa de vida dos pacientes é aumentada e muitas das anormalidades sistêmicas mostram melhoras evidentes. Porém, quando a função neurológica já é pré-existente a mesma é irreversível sendo apenas retardada a sua progressão (SHAPIRO et al., 2016). Nas disordens músculo-esqueléticas o tratamento parece não alterar a ordem natural da doença (VAN DER LINDEN et al., 2011). Assim evidencia-se que essa abordagem apresenta uma série de limitações incluindo o fato da enzima não chegar nas articulações e cérebro, associadas com a dificuldade de encontrar um doador compatível, efeitos adversos da quimioterapia bem como a necessidade precoce do tratamento (D'ACO et al., 2012; RU et al., 2011).

Aprovada em 2003, a TRE tem sido utilizada com sucesso para o tratamento de MPS I. O tratamento baseia-se na administração intravenosa da enzima alfa-L-iduronidase recombinante no paciente semanalmente ou quinzenalmente logo após o diagnóstico. Sua resposta depende também da gravidade e do início do tratamento. Após o tratamento são observados vários benefícios clínicos incluindo a diminuição da hepatomegalia, melhora na função respiratória, melhora na capacidade de movimentação e da qualidade de vida (BECK, 2010; D'ACO et al., 2012; LARAWAY et al., 2016; RU et al., 2011).

Apesar dos benefícios da TRE essa abordagem possui algumas limitações, incluindo o fato dos pacientes desenvolverem anticorpos contra a enzima, efeitos adversos à terapia e, além disso, a adesão ao tratamento pelo paciente é prejudicada pela necessidade da administração periódica da enzima e pelo

elevado custo. Outro desafio é que até o momento, a eficácia da TRE é limitada a redução das manifestações periféricas não tendo benefícios neurocognitivos, uma vez que a enzima não é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica (WOLF et al., 2015; VALAYANNOPOULOS; WIJBURG, 2011). Estudos de TRE intratecal como alternativa para acessar diretamente o sistema nervoso central estão em andamento, porém ainda é necessária a comprovação da eficácia e da segurança (DICKSON et al., 2007; MUNOZ-ROJAS et al., 2008).

Considerando a heterogeneidade clínica da MPS I e as dificuldades apresentadas pelos tratamentos atuais a busca por novas estratégias terapêuticas é impulsionada a fim de melhorar a eficiência do tratamento e a qualidade de vida dos pacientes. Atualmente, diversos estudos estão sendo realizados, com foco em diferentes aspectos da doença e desenvolvendo abordagens específicas, entre elas está a terapia gênica (BALDO et al., 2014; WOLF et al., 2015).

A terapia gênica/celular baseia-se na inserção de material genético nas células de modo a expressar ou ainda bloquear a expressão de uma proteína de interesse, visando à reversão de um fenótipo patológico (COTRIM; BAUM, 2008). As DL são excelentes candidatas para essa terapia uma vez que são caracterizadas por serem doenças monogênicas, e, além disso, não estão sujeitas a mecanismos de regulação complexos, e uma atividade enzimática de apenas 15-20% dos níveis normais já é suficiente para eficácia clínica (BECK, 2010). Estudos baseados em terapia gênica foram desenvolvidos para a MPS I (CAMASSOLA et al., 2005; CHUNG et al., 2007; FRAGA et al., 2015; OU et al., 2016). Dentre esses estudos uma abordagem promissora para a entrega de compostos biologicamente ativos para o tratamento da MPS I é a microencapsulação celular.

### **Microencapsulação celular**

Nos últimos anos muitas abordagens tecnológicas foram desenvolvidas visando aplicações biomédicas, e dentre as mais promissoras está a microencapsulação celular. Esse sistema possui uma ampla versatilidade

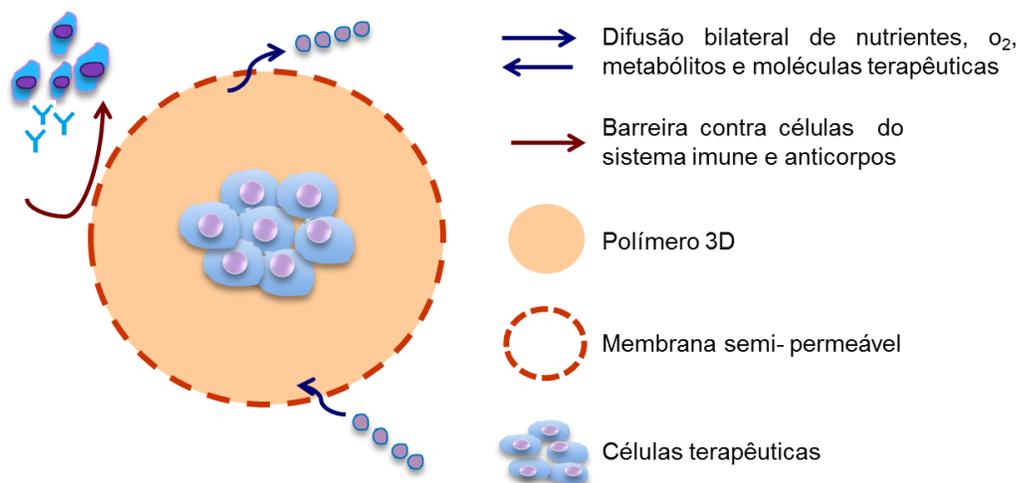
terapêutica, pois permite o uso de células de uma variedade de fontes, desde células primárias a células geneticamente modificadas que podem ser induzidas a expressar qualquer proteína desejada *in vivo*, sem a modificação do genoma do hospedeiro (MURUA et al., 2008; ORIVE et al., 2014). Desde os estudos pioneiros realizados por CHANG e colaboradores em 1964 esse sistema está sendo amplamente investigado. Estudos demonstram o potencial da aplicação dessa tecnologia em diversas doenças (ORIVE et al., 2014).

A microencapsulação celular consiste na imobilização de células dentro de uma membrana semipermeável, geralmente polimérica, a qual permite a liberação de produtos biologicamente ativos de forma prolongada, controlada e/ou localizada (MURUA et al., 2008). A permeabilidade da membrana deve ser adequada para permitir a difusão de nutrientes, oxigênio e de produtos ativos proporcionando um microambiente adequado para a viabilidade e proliferação celular bem como para a liberação do agente terapêutico. Além disso, a microencapsulação deve proteger as células do sistema imune do hospedeiro, impedindo que moléculas de peso molecular elevado como anticorpos e outros componentes entrem em contato com as células evitando assim a destruição das mesmas (figura 1) (DE VOS et al., 2009; ORIVE et al., 2014).

A utilização desse sistema como estratégia terapêutica requer que o mesmo seja biocompatível, permeável e com estabilidade adequada (ORIVE et al., 2014). Considerando que essas propriedades das microcápsulas são influenciadas por diversos fatores incluindo as características físico-químicas do biomaterial, do íon reticulante, do revestimento bem como da técnica de produção (ROKSTAD et al., 2014) é necessário desprender atenção nesses requisitos, pois os mesmos tem impacto significativo no desempenho global desse sistema.

A biocompatibilidade é uma propriedade complexa e está relacionada tanto com as interações entre o biomaterial e o sistema hospedeiro bem como entre o biomaterial e as células encapsuladas. A escolha adequada do material é primordial sendo que uma das características que deve ser considerada é a pureza do mesmo. No caso do alginato, por ser um biomaterial natural, possui

muitos contaminantes sendo essencial um processo de purificação. Esse processo deve ser eficiente para remover todos os contaminantes como endotoxinas, algumas proteínas e polifenóis. Esse processo deve ser controlado, pois pode induzir mudanças nas características do alginato (CAFIOREAL; BASTA, 2013; MENARD et al., 2009; TAM et al., 2006).



**Figura 1.** Representação esquemática de uma microcápsula e suas características (Adaptado de HERNÁNDEZ, et al., 2010).

Outros fatores que também podem influenciar tanto a resposta imune como a permeabilidade e a estabilidade mecânica e que devem ser considerados a distribuição do diâmetro e a morfologia da microcápsula (KONTTURI et al., 2011; STRAND et al., 2002). As cápsulas com tamanho  $< 500 \mu\text{m}$  são as mais adequadas, pois garantem uma boa taxa de difusão de nutrientes prolongando assim a viabilidade celular. O diâmetro reduzido contribui para as propriedades mecânicas, pois diminui a propensão à ruptura. Além disso, cápsulas pequenas, esféricas e lisas quando implantadas não induzem reação de corpo estranho, diminuindo assim o processo inflamatório e a adsorção de proteínas (SAKAI; KAWAKAMI, 2010; VEISEH et al., 2015). Assim estudos buscam desenvolver técnicas diferentes de microencapsulação objetivando o desenvolvimento de microcápsulas com características ideais para o implante.

A estabilidade mecânica das microcápsulas é fundamental para proteger e manter as células viáveis após implante. O sistema deve ter um equilíbrio entre força e flexibilidade. A força é necessária para a integridade estrutural da membrana de forma que permite a proteção das células, já a flexibilidade é necessária para a expansão celular. Assim as propriedades mecânicas podem ser controladas pela concentração, composição do polímero, do revestimento e dos íons gelificantes de forma a obter um sistema com uma rigidez mecânica adequada (BHUIBAL; PAREDES-JUAREZ; NICLOU, 2014). Uma solução de alginato composta de polímero de alto peso molecular leva a um aumento da viscosidade consequentemente melhorando a elasticidade do gel, porém uma solução muito viscosa acaba sendo indesejável, pois prejudica a formação esférica e uniforme da cápsula (TAM et al., 2011).

### ***Biomateriais***

Diversos biomateriais estão sendo estudados para a microencapsulação uma vez que a escolha do mesmo é o primeiro ponto crítico nesse processo. As propriedades de biocompatibilidade e estabilidade do biomaterial são primordiais e estão diretamente relacionados com o sucesso da aplicação da microcápsula (DEVOS et al., 2014). Assim, na busca de um material apropriado, vários tipos de polímeros naturais e sintéticos estão sendo estudados, sendo esses muito utilizados como veículos de liberação prolongada de agentes terapêuticos (GASPERINI; MANO; REIS, 2014; OLABISI, 2014).

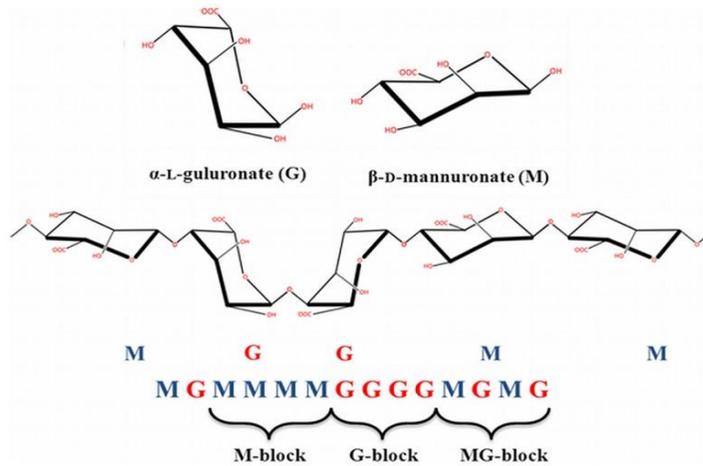
Cada biomaterial oferece vantagens e desvantagens sendo difícil encontrar um material adequado. Polímeros de origem natural que formam hidrogéis destacam-se, pois tem uma estrutura semelhante à matriz extracelular de vários tecidos humanos. Os hidrogéis são altamente hidratáveis formando redes tridimensionais com uma estrutura porosa, maleável que ao ser implantado permite uma baixa adsorção de proteínas. Além disso, criam um microambiente capaz de fornecer condições bioquímicas e físicas para o metabolismo celular (HERNÁNDEZ et al., 2010; LEE; MOONEY, 2013; ROKSTAD et al., 2014).

Considerando a biocompatibilidade inerente dos polímeros naturais, nos últimos anos houve um avanço nos estudos desses materiais para a utilização na formação de microcápsulas. A escolha do polímero depende da sua composição e das propriedades físico-químicas que influenciam na funcionalidade e nas características da microcápsula. Mesmo com uma grande variedade de biomateriais, entre eles, agarose, ácido hialurônico, quitosana, colágeno e fibrina, o alginato é o mais descrito na literatura (SANTOS et al., 2013).

### ***Microcápsulas de alginato***

O alginato é muito utilizado e estudado na área de microencapsulação celular, principalmente devido a sua baixa toxicidade, fácil manipulação, capacidade de formação de géis *in vivo* e custo relativamente baixo (LEE; MOONEY, 2013). É um dos poucos materiais que pode ser processado em condições fisiológicas e a produção da cápsula pode ser realizada à temperatura ambiente e utilizando soluções isotônicas. O alginato é um copolímero binário não ramificado de ligação 1-4 com ácido  $\beta$ -D- manurônico (M) e ácido  $\alpha$ -L- gulurônico(L) (figura 2) que pode ser isolado a partir de algas marinhas como de *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria japônica*, entre outras, também podendo ser encontrado como um polissacarídeo de bactérias, tais como *Azotobacter vinelandii* e *Pseudomonas* (JUÁREZ et al., 2014).

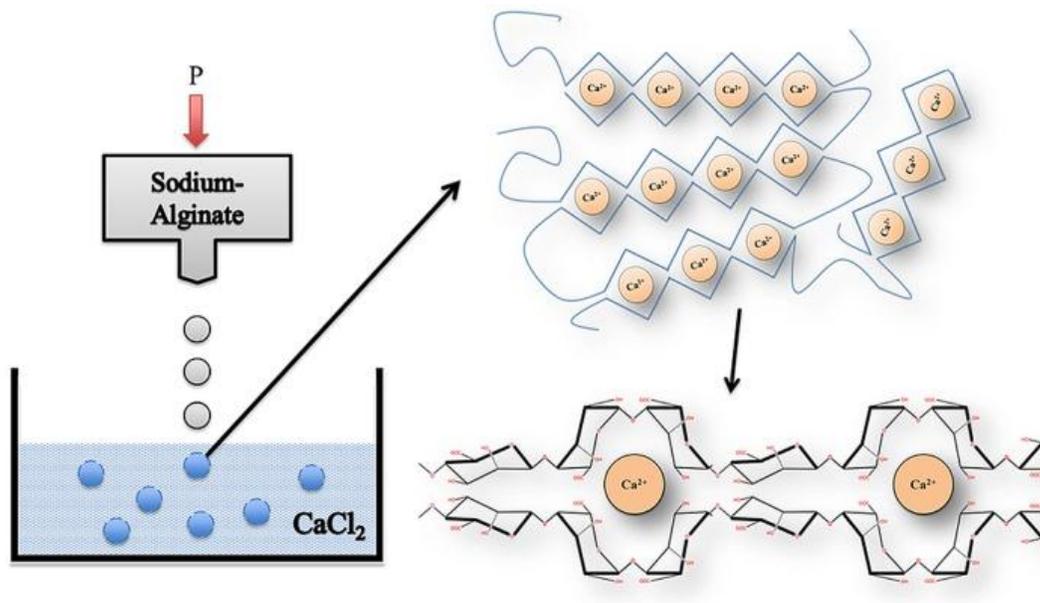
A proporção entre os resíduos manurônicos (M) e gulurônicos (G), bem como a sua estrutura sequencial e o grau de polimerização varia conforme a fonte de onde alginato foi isolado. Os monômeros estão ligados em blocos os quais são constituídos de resíduos consecutivos ou de resíduos alternados ao longo da cadeia que se associam através de ligações cruzadas com cátions bivalentes formando o hidrogel (LEE; MOONEY, 2013). O processo de formação das microcápsulas de alginato pode ser baseado em estratégias físicas e químicas de reticulação.



**Figura 2.** Estrutura química do alginato (Fonte: JUÁREZ et al., 2014).

O processo mais utilizado para a formação de hidrogel baseia-se na extrusão de uma suspensão de alginato contendo as células terapêuticas com uma solução de reticulação contendo agentes iônicos (DONATI; PAOLETTI, 2009). Esse processo, no qual os íons interagem com os resíduos G da cadeia polimérica e induzem à formação de zonas de junção, de modo que as cadeias adjacentes se associam e formam ligações cruzadas, resulta na estrutura do gel conhecido como modelo “egg-box” (figura 3) (DONATI; PAOLETTI, 2009; DE VOS et al., 2014).

As propriedades do hidrogel dependem do tipo de cátion utilizado para a reticulação. Devido à maior afinidade com o alginato, os cátions bivalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  ou  $\text{Ba}^{2+}$  são muito empregados para a formação de hidrogel. Devido às qualidades fisiológicas e de biocompatibilidade o agente de reticulação mais comumente utilizado para microencapsulação celular é o íon  $\text{Ca}^{2+}$  o qual é usado na forma de solução de cloreto de cálcio (MØRCH et al., 2006). No entanto, após serem implantadas essas microcápsulas reticuladas com cálcio são sensíveis a agentes quelantes, o que resulta em um aumento de permeabilidade e desestabilização podendo levar a ruptura do gel (OLABISI, 2014).



**Figura 3.** Processo de gelificação do alginato (Fonte: JUÁREZ et al., 2014).

### ***Revestimentos das microcápsulas***

A membrana das microcápsulas pode ser revestida no intuito de modular a permeabilidade e aumentar a resistência mecânica das mesmas. Os policátions como a poli-D-lisina (PDL), poli-L-ornitina (PLO) e poli-L-lisina (PLL) são os mais empregados para esse fim (PONCE et al., 2006). No entanto, muitos fatores determinam as propriedades de permeação, como o tipo de revestimento, espessura do revestimento e o tempo desse processo, concentração e as interações entre o revestimento e a membrana do alginato. O revestimento não deve interferir na difusão de nutrientes nem das moléculas terapêuticas. Assim, esses fatores devem ser bem controlados, pois o revestimento pode levar à diminuição da permeabilidade podendo gerar desnutrição das células e o acúmulo de materiais tóxicos nas cápsulas (DE VOS et al., 2014).

A poli-L-lisina é extensivamente aplicada no recobrimento de cápsulas de alginato, porém devido à formação de uma única camada de complexo alginato-polication, as cargas positivas ficam expostas na superfície da membrana, o que torna a cápsula imunogênica (ROBITAILLE et al., 2005; TAM et al., 2011). Isso acontece, porque o íon usado na reticulação e o polication competem com os

sítios de ligação levando a um defeito no revestimento da membrana. Uma maneira de minimizar esse problema é a utilização de quantidades adequadas de resíduos de M e G para permitir uma ligação adequada com a poli-L-lisina e obter uma conformação tipo super helicoidal, a qual pode mascarar as cargas positivas da poli-L-lisina que induz a resposta inflamatória ( DE VOS et al., 2014).

Outra forma descrita para minimizar essa imunogenicidade é adicionar mais um revestimento externo de alginato formando as microcápsulas alginato-poli-L-lisina-alginato (APA) (GASPERINI; MANO; REIS, 2014). Porém, esse revestimento adicional de alginato parece ter pouco efeito na biocompatibilidade das microcápsulas, pois mesmo com essa estratégia, observa-se que após o implante algumas formulações apresentam instabilidade frente ao pH ou a osmolaridade, tendo como consequência a resposta inflamatória (JUÁREZ et al., 2014; TAM et al., 2011). Estudos demonstram que após o implante de microcápsulas APA o sistema imunológico é ativado além da ativação induzida pelo procedimento cirúrgico (MURUA et al., 2007; TAM et al., 2011).

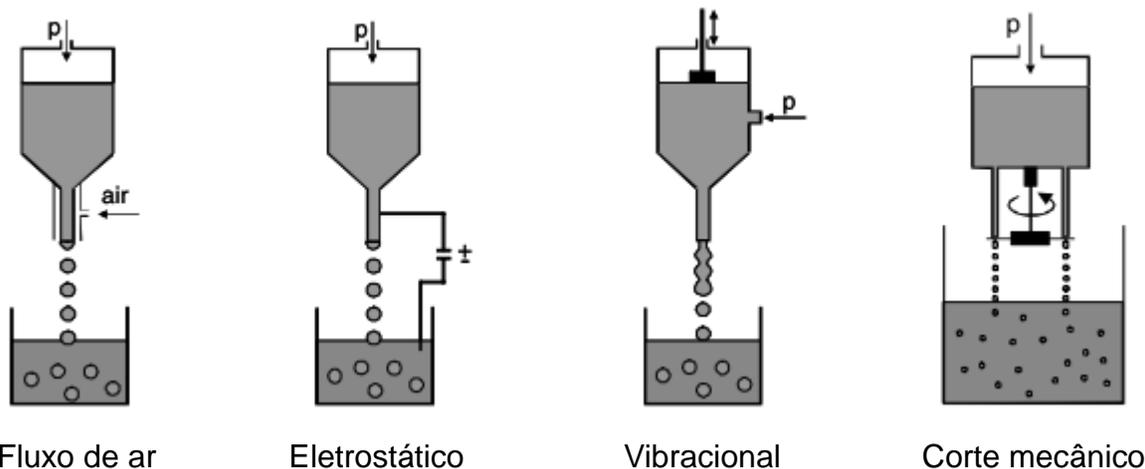
Estratégias como o uso de multicamadas e a funcionalização das mesmas no revestimento têm sido relatadas para melhorar as características das microcápsulas e a imunoisolação das células (ACARREGUI et al., 2014; BHUJBAL et al., 2014). As abordagens de peguilação ou de uso de diblocos de biopolímeros na superfície das microcápsulas têm sido eficientes, pois a presença dos mesmos protege as células, prologando assim o tratamento (GATTÁS-ASFURA et al., 2015; LIU et al., 2010; NABAVIMANESH; HASHEMI-NAJAFABADI; VASHEGHANI-FARAHANI, 2015; SPASOJEVIC et al., 2014). Uma alternativa para diminuir a adsorção de proteínas no biomaterial e o processo inflamatório desencadeado no implante é o uso de anti-inflamatórios co-encapsulados, os quais podem ser liberados de forma sustentada e localizada (DANG et al., 2013; MURUA et al., 2011). Considerando que a maior dificuldade ainda é encontrar um revestimento ideal que permita a viabilidade celular e que após o implante não ative o sistema imune, estudos sobre a funcionalização desse sistema estão em curso em diferentes grupos de pesquisa.

### ***Métodos de microencapsulação celular***

A tecnologia de encapsulação depende do material e da estratégia de formação do hidrogel. Os métodos de produção devem ser reprodutíveis e, além disso, devem ser capazes de produzir microcápsulas com características que proporcionam a sobrevivência das células bem como biocompatibilidade em longo prazo (RABANEL et al., 2009). Muitas tecnologias têm sido propostas para a produção de microcápsulas, sendo que a escolha da mesma deve ser baseada nas propriedades das microcápsulas, aplicação, mecanismo de liberação desejado, escala de produção e o custo do processo (JYOTHI et al., 2010).

Um dos principais meios para a formação das microcápsulas é através da dispersão de um líquido que é solidificado por meios físicos ou químicos, sendo o método de extrusão amplamente utilizado para a microencapsulação celular. Nesse método, uma suspensão do biomaterial e células é extrusada através de um pequeno orifício formando uma gotícula crescente e que pela força da gravidade cai livremente na solução gelificante (PRÜBE et al., 2000). As principais tecnologias de extrusão baseiam-se em técnicas de fluxo de ar (PRUSSE et al., 2008), de vibração (MAZZITELLI et al., 2008), de corte mecânico da gota (KOCH et al., 2003) e de potencial eletrostático (PRUSSE et al., 2008) que permitem controlar o diâmetro da gota, bem como a forma da cápsula formada (figura 4).

A técnica de extrusão eletrostática está sendo mais recentemente estudada por ser controlável, reprodutível, fácil de usar em condições estéreis e a sua produtividade é elevada para produzir microcápsulas na escala necessária para as necessidades clínicas (MANOJLOVIC et al., 2006). Esse método baseia-se na utilização de força eletrostática sendo que o potencial elétrico aplicado entre o dispositivo de formação de gotículas e a solução reticulante, induz uma carga na superfície da solução do polímero que resulta numa diminuição da tensão superficial do polímero e a gota é formada para expelir o excesso de carga superficial (figura 5) (GASPERINI; MANO; REIS, 2014).

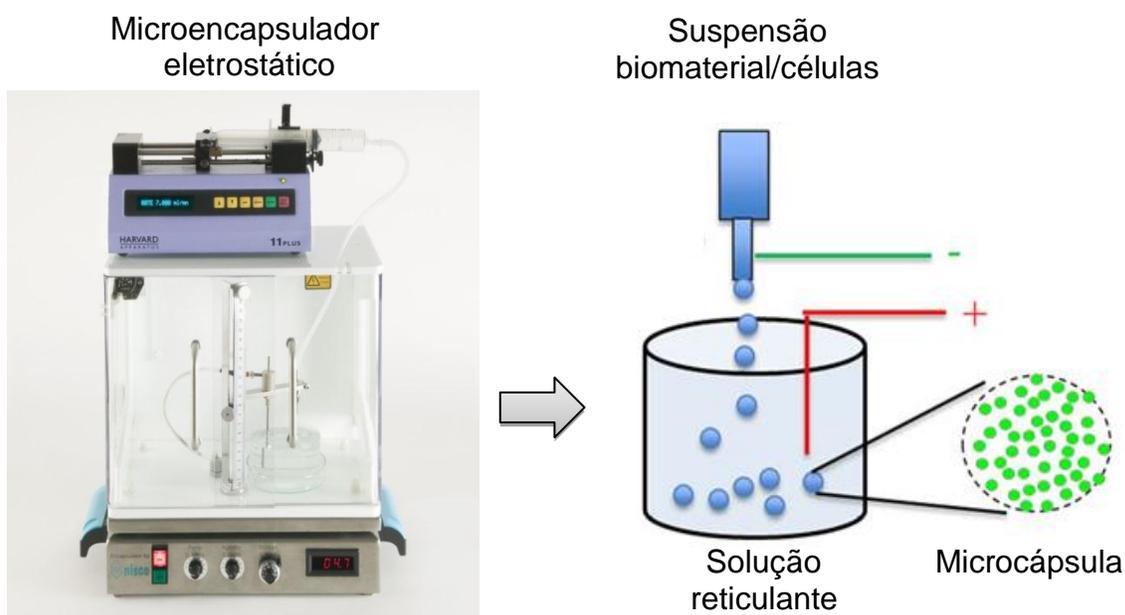


**Figura 4.** Esquema das tecnologias de extrusão utilizadas na produção de microcápsulas (Fonte: PRUSSE et al., 2008).

No entanto, essa técnica é complexa e envolve muitos parâmetros tais como o potencial eletrostático aplicado, diâmetro da agulha, vazão da suspensão, distância da agulha em relação a solução reticulante, bem como os fatores relacionados às propriedades físico-químicas do polímero usado como viscosidade, concentração, composição que influenciam o tamanho e as características da microcápsula (NEDOVIC et al., 2005; MANOJLOVIC et al., 2006). Assim é necessária uma ampla investigação desses fatores e parâmetros a fim de melhorar essa técnica para obtenção de microcápsulas com propriedades adequadas para aplicação clínica.

Considerando os diversos parâmetros envolvidos para a obtenção de microcápsulas usando a técnica de extrusão eletrostática, esse processo pode ser otimizado usando um delineamento experimental. A fim de caracterizar a possível relação entre uma ou mais variáveis resposta e um conjunto de fatores de interesse, muitas técnicas experimentais baseadas em métodos estatísticos são utilizadas para planejar, conduzir, implantar e analisar dados de forma válida e objetiva (MA et al., 2012). Uma ferramenta estatística empregada para esse fim é o método de superfície de resposta, que é útil quando há interesse em determinar condições ótimas para se trabalhar ou analisar a sensibilidade da variável resposta a mudanças dos níveis dos fatores de interesse (BAS; BOYACI, 2007).

Para essa ferramenta ser usada é necessário primeiramente identificar as variáveis independentes ou fatores que afetam o produto ou do processo, e depois estudar os seus efeitos sobre uma variável dependente ou resposta (BAS; BOYACI, 2007). Assim o delineamento experimental baseado no método de superfície de resposta, pode ser utilizado para a otimização da composição da microcápsula bem como do processo de microencapsulação celular.

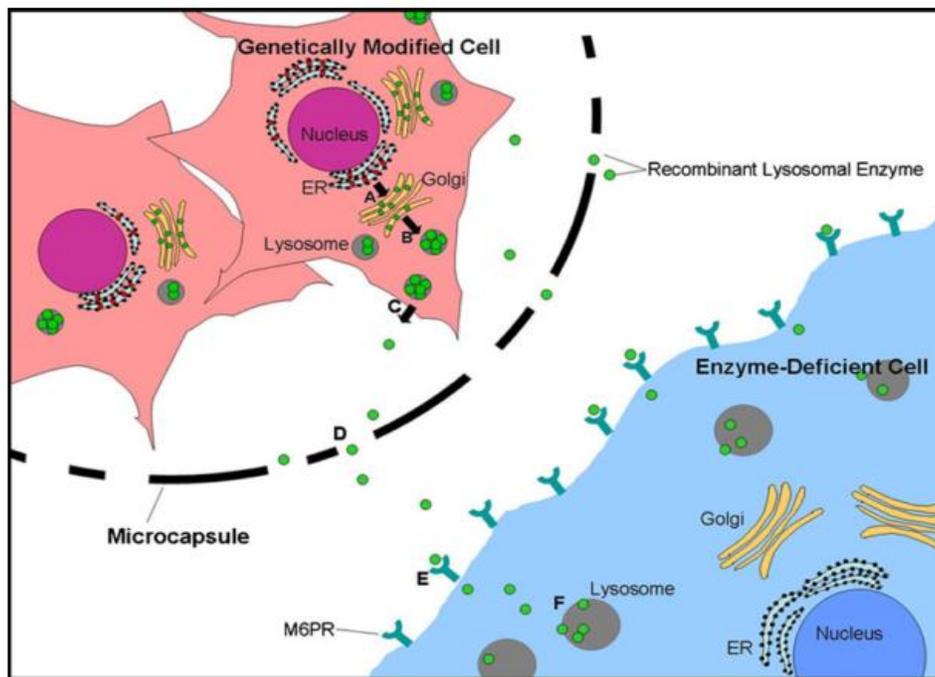


**Figura 5.** Método de produção das microcápsulas pela técnica de extrusão eletrostática.

### ***Aplicações terapêuticas das microcápsulas***

A microencapsulação celular é uma proposta promissora para o tratamento de diversas doenças. Essa tecnologia está sendo amplamente estudada e sua aplicação já foi demonstrada para doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, para as quais há ensaios estudos clínicos bem sucedidos (KISHIMA et al., 2004; SPUCH; NAVARRO, 2010) e também para o tratamento de tumores cerebrais (KEUNEN et al., 2011), anemia crônica (MURUA et al., 2007), doenças cardíacas (PAUL et al., 2010), doenças ósseas e de cartilagem (DASHTDAR et al., 2011; MAN et al., 2012; SAINI et al., 2006). O microencapsulamento celular

também tem sido considerado no tratamento da MPS I, permitindo o encapsulamento de células geneticamente modificadas que super-expressam a enzima IDUA. A enzima é produzida e secretada para o meio extracelular e recaptada por células deficientes via receptores de manose-6-fosfato (RM6P) e redirecionadas para os lisossomos (Figura 6) (MATTE et al., 2011).



**Figura 6.** Tráfego de enzimas lisossômicas após encapsulação celular. As enzimas lisossômicas nascentes são glicosiladas no retículo endoplasmático da célula geneticamente modificada. (A) As enzimas são fosforiladas no resíduo de manose 6-fosfato no complexo de Golgi. (B) A maioria das enzimas é transportada para o lisossomo maduro. (C) Algumas, no entanto, são secretadas para o ambiente extracelular, e (D) para fora das cápsulas. (E) Enzimas fosforiladas se ligam aos receptores de manose 6-fosfato das células deficientes (F) onde são endocitadas e voltam para os lisossomos (Fonte: MATTE et al., 2011).

Na tabela 1 estão apresentados estudos que visam o tratamento da MPS I com a microencapsulação celular. Diferentes linhagens de células modificadas para expressar a enzima alfa-L-iduronidase (IDUA) foram encapsuladas e testadas *in vitro* e *in vivo*. BARSOUM e colaboradores (2003) modificaram geneticamente células de rim de cães para expressar a IDUA, as quais foram immobilizadas em microcápsulas APA com cerca de 500  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Essas microcápsulas

foram implantadas no cérebro de cães MPS I. Apesar do processo inflamatório observado na região do implante, a IDUA foi detectada no plasma e no líquido cefalorraquidiano após 21 dias do implante e em várias regiões do cérebro após a morte dos animais. Os resultados desse estudo demonstrou que essa tecnologia permite a liberação de IDUA, porém para ser aplicável ao SNC de seres humanos deve ser desenvolvido um procedimento neurocirúrgico mais preciso e menos invasivo.

Em outro estudo, Piller Puicher e colaboradores (2012) utilizaram microcápsulas APA contendo células de mioblastos (C2C12) modificadas para expressar IDUA, as mesmas foram implantadas no peritônio de camundongos MPS I e avaliados os efeitos terapêuticos sistêmicos durante 4 meses. Evidenciou-se significativa indução da atividade enzimática tecidual nas primeiras 12 semanas do implante. Após isso se observou diminuição de enzima produzida sendo essa insuficiente para manter a sua eficácia terapêutica. Essa diminuição da eficácia também foi evidenciada pelo aumento dos níveis de GAGs urinários. Após o tratamento foi detectada redução do acúmulo de GAGs nos tecidos. Os resultados desse estudo evidenciam que o tratamento da MPS I com esse sistema pode ser uma abordagem válida.

Em nosso grupo de pesquisa, Mayer e colaboradores (2010) modificaram células BHK para super-expressar IDUA e avaliaram o efeito da criopreservação na viabilidade celular e na atividade enzimática após a imobilização das mesmas em microcápsulas de alginato (1% e 1,5%). Evidenciou-se que após 90 dias do congelamento das microcápsulas a viabilidade das células não foi prejudicada as microcápsulas com 1,5% de alginato apresentaram um aumento da atividade de IDUA.

Em outros estudos do grupo as microcápsulas de alginato contendo as células rBHK foram implantadas no peritônio. BALDO e colaboradores (2012b) observaram um aumento na atividade de IDUA no soro e nos tecidos nos tempos

iniciais do tratamento com redução da mesma após algumas semanas do implante. Além disso, nas análises das cápsulas retiradas após o tratamento revelou processo inflamatório e os animais tratados desenvolveram anticorpos contra a enzima. Com o objetivo de diminuir esse processo inflamatório e assim melhorar a liberação da enzima, LAGRANHA e colaboradores (2013) trataram animais com prednisolona via oral durante 5 dias após o implante das microcápsulas. Apesar da diminuição do infiltrado inflamatório e da melhora da liberação da enzima IDUA *in vitro* e *in vivo* após 7 dias, o tratamento com o antiinflamatório não manteve esse efeito durante um período mais longo. No último estudo do grupo (LAGRANHA et al., 2017), microcápsulas APA foram implantadas no subcutâneo. Após 4 meses de tratamento foi detectada atividade de IDUA e uma redução dos GAGs nos tecidos.

Os resultados apresentados nesses estudos evidenciam que essa estratégia parece ser uma abordagem promissora para o tratamento dessa doença. Os resultados obtidos até o momento demonstram que a microencapsulação celular parece ser uma alternativa a TRE, já que há liberação da enzima, e também por ser considerada mais segura que a terapia gênica convencional devido ao fato de que células ficam isoladas, sem contato direto com o hospedeiro.

Conforme observado na tabela 1, esses estudos limitam-se apenas na utilização da técnica de fluxo de ar para microencapsular as células. Sendo, portanto, necessários estudos com diferentes técnicas e composição das microcápsulas, uma vez que estas influenciam diretamente nas propriedades físico-químicas desse sistema. Esses parâmetros podem influenciar diretamente na estabilidade das microcápsulas, na facilidade de implantação, bem como na reação inflamatória que ocorre no entorno do implante. A técnica de extrusão eletrostática é vantajosa, pois pode ser controlável, reprodutível, fácil de usar em condições estéreis e a sua produtividade ser suficientemente elevada para produzir microcápsulas na escala necessária para as necessidades clínicas (Manojlovic et al., 2006; Manojlovic et al., 2004). No entanto, essa técnica é

complexa e envolve muitos parâmetros operacionais, os quais devem ser investigados a fim de desenvolver microcápsulas com propriedades adequadas para aplicação clínica.

**Tabela 1.** Estratégias para o tratamento da MPS I utilizando a microencapsulação celular.

| <b>Célula</b> | <b>Composição</b> | <b>Concentração</b> | <b>Técnica</b> | <b>Referência</b>              |
|---------------|-------------------|---------------------|----------------|--------------------------------|
| MDCK          | APA               | 2%                  | Fluxo de ar    | (BARSOUM et al., 2003).        |
| BHK           | Alginato          | 1 % e 1,5%          | Fluxo de ar    | (MAYER et al., 2010).          |
| C2C12         | APA               | 1,5%                | Fluxo de ar    | (PILLER PUICHER et al., 2012). |
| BHK           | Alginato          | 1,5%                | Fluxo de ar    | (BALDO et al., 2012b).         |
| BHK           | Alginato          | 1,5%                | Fluxo de ar    | (LAGRANHA et al., 2013).       |
| BHK           | APA               | 1,5%                | Fluxo de ar    | (LAGRANHA et al., 2017)        |

## Referências

ACARREGUI, A. et al. Multifunctional hydrogel-based scaffold for improving the functionality of encapsulated therapeutic cells and reducing inflammatory response. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 10, p. 4206–4216, 2014.

BALDO, G. et al. Intraperitoneal implant of recombinant encapsulated cells overexpressing alpha- L -iduronidase partially corrects visceral pathology in mucopolysaccharidosis type I mice. **Cytotherapy**, v. 14, p. 860–867, 2012b.

BALDO, G. et al. Gene delivery strategies for the treatment of mucopolysaccharidoses. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, p. 449–459, 2014.

BARSOUM, S. C. et al. Delivery of recombinant gene product to canine brain with the use of microencapsulation. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 142, n. 6, p. 399–413, 2003.

BAS, D.; BOYACI, H. Modeling and optimization: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 836–845, 2007.

BECK, M. Therapy for lysosomal storage disorders. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 62, n. 1, p. 33–40, 2010.

BECK, M. et al. The natural history of MPS I: global perspectives from the MPS I registry. **Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics**, v. 16, n. 10, p. 759–65, 2014.

BHUJBAL, S. V et al. A novel multilayer immunisolating encapsulation system overcoming protrusion of cells. **Scientific Reports**, v. 4, n. 685 , p. 1–8, 2014.

BHUJBAL, S. V; PAREDES-JUAREZ, G. A.; NICLOU, S. P. Factors influencing the mechanical stability of alginate beads applicable for immunisolation of mammalian cells. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 37, p. 196–208, 2014.

CAFIOREAL, R.; BASTA, G. Clinical application of microencapsulated islets: Actual prospectives on progress and challenges. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 68, p. 84–92, 2013.

CAMASSOLA, M. et al. Nonviral in vivo gene transfer in the mucopolysaccharidosis I murine model. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 28, n. 6, p. 1035–1043, 2005.

CHUNG, S. et al. Effect of neonatal administration of a retroviral vector expressing alfa-l-iduronidase upon lysosomal storage in brain and other organs in

mucopolysaccharidosis I mice. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 90, n. 2, p. 181–192, 2007.

CIMAZ, R.; TORRE, F. LA. Mucopolysaccharidoses. **Current Rheumatology Reports**, v. 16, p. 389–398, 2014.

COTRIM, A. P.; BAUM, B. J. Gene therapy: some history, applications, problems, and prospects. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 1, p. 97–103, 2008.

D'ACO, K. et al. Diagnosis and treatment trends in mucopolysaccharidosis I: Findings from the MPS I registry. **European Journal of Pediatrics**, v. 171, n. 6, p. 911–919, 2012.

DANG, T. et al. Enhanced function of immuno-isolated islets in diabetes therapy by co-encapsulation with an anti-inflammatory drug. **Biomaterials**, v. 34, n. 23, p. 5792–5801, 2013.

DASHTDAR, H. et al. A preliminary study comparing the use of allogenic chondrogenic pre-differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells for the repair of full thickness articular cartilage defects in rabbits. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, n. 9, p. 1336–1342, 2011.

DE VOS, P. et al. Multiscale requirements for bioencapsulation in medicine and biotechnology. **Biomaterials**, v. 30, n. 13, p. 2559–2570, 2009.

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

DICKSON, P. et al. Intrathecal enzyme replacement therapy: Successful treatment of brain disease via the cerebrospinal fluid. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 91, n. 1, p. 61–68, 2007.

FRAGA, M. et al. PEGylated cationic nanoemulsions can efficiently bind and transfect pIDUA in a mucopolysaccharidosis type i murine model. **Journal of Controlled Release**, v. 209, p. 37–46, 2015.

GANDHI, N. S.; MANCERA, R. The Structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. **Chemical Biology Drug Design**, v. 72, p. 455–482, 2008.

GASPERINI, L.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Natural polymers for the microencapsulation of cells. **Journal of the Royal Society**, v. 11, n. 100, p. 1–19, 2014.

GATTÁS-ASFURA, K. et al. Covalent layer-by-layer assembly of hyperbranched polymers on alginate microcapsules to impart stability and permselectivity KM. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 46, p. 8208–8219, 2015.

GIUGLIANI, R. Mucopolysaccharidoses: From understanding to treatment, a century of discoveries. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 924–931, 2012.

HERNÁNDEZ, R. M. et al. Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 7-8, p. 711–730, 2010.

JUÁREZ, P. et al. Immunological and technical considerations in application of alginate-based microencapsulation systems. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 2, p. 1–15, 2014.

JYOTHI, N. V. N. et al. Microencapsulation techniques , factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 3, p. 187–197, 2010.

KEUNEN, O. et al. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 9, p. 3749–3754, 2011.

KISHIMA, H. et al. Encapsulated GDNF-producing C2C12 cells for Parkinson's disease: A pre-clinical study in chronic MPTP-treated baboons. **Neurobiology of Disease**, v. 16, n. 2, p. 428–439, 2004.

KOCH, S. et al. Alginate encapsulation of genetically engineered mammalian cells: comparison of production devices, methods and microcapsule characteristics. **Journal of Microencapsulation**, v. 20, n. 3, p. 303–316, 2003.

KONTTURI, L. S. et al. A laboratory-scale device for the straightforward production of uniform, small sized cell microcapsules with long-term cell viability. **Journal of Controlled Release**, v. 152, n. 3, p. 376–381, 2011.

LAGRANHA, V. L. et al. Treatment of MPS I mice with microencapsulated cells overexpressing IDUA: effect of the prednisolone administration. **Journal of Microencapsulation**, v. 30, n. 4, p. 383–389, 2013.

LAGRANHA, V. L. et al. Subcutaneous implantation microencapsulated cells overexpressing  $\alpha$ -L-iduronidase for mucopolysaccharidosis type I treatment. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. V. 28, n.43, p. 1-11, 2017.

LARAWAY, S. et al. Outcomes of long-term treatment with laronidase in patients with mucopolysaccharidosis type I. **The Journal of Pediatrics**, v. 178, p. 219–226, 2016.

LEE, Y. K.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2013.

LIU, X. Y. et al. Biocompatibility investigation of polyethylene glycol and alginate-poly-L-lysine for islet encapsulation. **Journal American Society for Artificial Internal Organs**, v. 56, n. 3, p. 241–245, 2010.

MA, Y. et al. Modeling and optimization of membrane preparation conditions of the alginate-based microcapsules with response surface methodology. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.100, n.4, p. 989–998, 2012.

MAN, Y. et al. Angiogenic and osteogenic potential of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cell laden alginate microspheres. **Biomaterials**, v. 33, n. 34, p. 8802–8811, 2012.

MANOJLOVIC, V. et al. Immobilization of cells by electrostatic droplet generation: A model system for potential application in medicine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 2, p. 163–171, 2006.

MARTINS, A. M. et al. Guidelines for the management of mucopolysaccharidosis type I. **The Journal of Pediatrics**, v. 155, n. 4, p. 32–46, 2009.

MATTE, U. et al. Cell microencapsulation: a potential tool for the treatment of neuronopathic lysosomal storage diseases. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 34, p. 983–990, 2011.

MAYER, F. et al. Effects of Cryopreservation and Hypothermic Storage on Cell Viability and Enzyme Activity in Recombinant Encapsulated Cells Overexpressing. **Artificial Organs**, v. 34, n. 5, p. 434–439, 2010.

MAZZITELLI, S. et al. Production and characterization of alginate microcapsules produced by a vibrational encapsulation device. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 23, n. 2, p. 123–145, 2008.

MENARD, M. et al. Role of Protein Contaminants in the Immunogenicity of Alginates. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 93, p. 333–340, 2009.

MØRCH, Ä. A. et al. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , and  $\text{Sr}^{2+}$  on Alginate Microbeads. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 5, p. 1471–1480, 2006.

MUENZER, J. Overview of the mucopolysaccharidoses. **Rheumatology**, v. 50, p. 4–12, 2011.

MUNOZ-ROJAS, M. V. et al. Clinical manifestations and treatment of mucopolysaccharidosis type I patients in Latin America as compared with the rest of the world. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 34, p. 1029–1037, 2011.

MUNOZ-ROJAS, M.-V. et al. Intrathecal enzyme replacement therapy in a patient with mucopolysaccharidosis type I and symptomatic spinal cord compression.

- American Journal of Medical Genetics**, v. 146, n. 19, p. 2538–44, 2008.
- MURUA, A. et al. In vitro characterization and in vivo functionality of erythropoietin-secreting cells immobilized in alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 11, p. 3302–3307, 2007.
- MURUA, A. et al. Cell microencapsulation technology: Towards clinical application. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 2, p. 76–83, 2008.
- MURUA, A. et al. Design of a composite drug delivery system to prolong functionality of cell-based scaffolds. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, n. 1-2, p. 142–150, 2011.
- NABAVIMANESH, M. M.; HASHEMI-NAJAFABADI, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E. Islets immunoisolation using encapsulation and PEGylation , simultaneously , as a novel design. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 4, p. 486–491, 2015.
- OLABISI, R. M. Review Article Cell microencapsulation with synthetic polymers. **Journal of Biomedical Materials Research A** , v. 103, n. 2, p. 846–859, 2014.
- ORIVE, G. et al. Application of cell encapsulation for controlled delivery of biological therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 67-68, p. 3–14, 2014.
- OU, L. et al. Selection of the optimal lentiviral vector for treating mucopolysaccharidosis I. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 117, n. 2, p. 87–93, 2016.
- PAUL, A. et al. BacMam virus transduced cardiomyoblasts can be used for myocardial transplantation using AP-PEG-A microcapsules: molecular cloning, preparation, and in vitro analysis. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2010, p. 1-12, 2010.
- PILLER PUICHER, E. et al. Encapsulated engineered myoblasts can cure Hurler syndrome: preclinical experiments in the mouse model. **Gene Therapy**, v. 19, n. 4, p. 355–364, 2012.
- PONCE, S. et al. In vivo evaluation of EPO-secreting cells immobilized in different alginate-PLL microcapsules. **Journal of Controlled Release**, v. 116, p. 28–34, 2006.
- PRÜBE, U. et al. Production of spherical beads by JetCutting. **Chemical Engineering and Technology**, v. 23, n. 12, p. 1105–1110, 2000.
- PRUSSE, U. et al. Comparison of different technologies for alginate beads production. **Chemical Papers**, v. 62, n. 4, p. 364–374, 2008.

- RABANEL, J.-M. et al. Progress technology in microencapsulation methods for cell therapy. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 4, p. 946–963, 2009.
- ROBITAILLE, R. et al. Inflammatory response to peritoneal implantation of alginate – poly- L -lysine microcapsules. **Biomaterials**, v. 26, p. 4119–4127, 2005.
- ROKSTAD, A. M. A. et al. Advances in biocompatibility and physico-chemical characterization of microspheres for cell encapsulation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 67-68, p. 111–130, 2014.
- RU, M. H. DE et al. Enzyme replacement therapy and / or hematopoietic stem cell transplantation at diagnosis in patients with mucopolysaccharidosis type I: results of a European consensus procedure. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 55, n. 6, p. 1–9, 2011.
- SAINI, V. et al. Combination of viral biology and nanotechnology: new applications in nanomedicine. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, p. 200–206, 2006.
- SAKAI, S.; KAWAKAMI, K. Development of subsieve-size capsules and application to cell therapy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 670, p. 22–30, 2010.
- SANTOS, E. et al. Therapeutic cell encapsulation: Ten steps towards clinical translation. **Journal of Controlled Release**, v. 170, n. 1, p. 1–14, 2013.
- SHAPIRO, E. et al. Neurocognition across the spectrum of mucopolysaccharidosis type I: Age, severity, and treatment. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 116, n. 8, p. 1477–1490, 2016.
- SPASOJEVIC, M. et al. Reduction of the inflammatory responses against alginate-poly-L-Lysine microcapsules by anti-biofouling surfaces of PEG-b-PLL diblock copolymers. **PLOS One**, v. 9, n. 10, p. 1–11, 2014.
- SPUCH, C.; NAVARRO, C. The therapeutic potential of cell encapsulation technology for drug delivery in neurological disorders. **Nanotechnology**, v. 20, p. 403-420, 2010.
- STRAND, B. L. et al. Alginate-polylysine-alginate microcapsules: effect of size reduction on capsule properties. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 5, p. 615–630, 2002.
- SUGAWARA, K. et al. Structural study on mutant alpha-L-iduronidases: insight into mucopolysaccharidosis type I. **Journal of Human Genetics**, v. 53, n. 5, p. 467–74, 2008.
- TAM, S. K. et al. Impact of residual contamination on the biofunctional properties of

purified alginates used for cell encapsulation. **Biomaterials**, v. 27, p. 1296–1305, 2006.

TAM, S. K. et al. Biocompatibility and physicochemical characteristics of alginate-polycation microcapsules. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 4, p. 1683–1692, 2011.

TAYLOR, J. A. et al. alpha-L-iduronidase in normal and mucopolysaccharidosis-type-I human skin fibroblasts. **The Biochemical Journal**, v. 274, p. 263–8, 1991.

VALAYANNOPOULOS, V.; WIJBURG, F. A. Therapy for the mucopolysaccharidoses. **Rheumatology**, v. 50, p. 49–59, 2011.

VAN DER LINDEN, M. H. et al. Orthopaedic management of Hurler's disease after hematopoietic stem cell transplantation: A systematic review. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 34, n. 3, p. 657–669, 2011.

VEISEH, O. et al. Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates. **Nature Materials**, v. 14, n. 6, p. 643–651, 2015.

WOLF, A. D. et al. Gene therapy for neurologic manifestations of mucopolysaccharidoses. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, n. 2, p. 283–296, 2015.



## **CAPÍTULO II: Parte Experimental**

---



## **Otimização da obtenção de microcápsulas de alginato contendo células que superexpressam a enzima $\alpha$ -L-iduronidase visando o tratamento da Mucopolissacaridose tipo I**

Dirnete Diel<sup>1</sup>, Valeska Lizzi Lagranha<sup>2</sup>, Roselena Schuh<sup>1</sup>, Fernanda Bruxel<sup>3</sup>, Ursula Matte<sup>2</sup>, Helder Ferreira Teixeira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIPAMPA, Uruguaiana, RS, Brasil.

### RESUMO

A Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é causada pela deficiência de  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA), resultando no acúmulo de glicosaminoglicanos (GAGs). A microencapsulação de células recombinantes é uma abordagem terapêutica promissora que pode superar as limitações dos tratamentos atuais disponíveis. Nesse trabalho objetivamos otimizar a obtenção de microcápsulas de alginato usando a técnica de extrusão eletrostática e, além disso, avaliar o efeito do revestimento com poli-L-lisina nesse sistema (APA). As microcápsulas envolvendo células geneticamente modificadas para super-expressar IDUA otimizadas e revestidas demonstraram ser estáveis, permeáveis e com tamanho adequado para o implante. As microcápsulas implantadas no subcutâneo de animais MPS I não apresentam alteração da morfológica e evidenciou uma liberação de IDUA aumentada na pele após 30 dias de tratamento. Nas análises histológicas foi verificado infiltrado inflamatório envolvendo as microcápsulas o que não parece ter prejudicado a sobrevivência das células. O conjunto dos resultados obtidos demonstram que as microcápsulas APA tem potencialidade para o tratamento local da MPS I.

## INTRODUÇÃO

A Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença autossômica recessiva caracterizada pela deficiência da enzima  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA), que resulta no acúmulo dos glicosaminoglicanos dermatan e heparan sulfato nos lisossomos. As manifestações clínicas da MPS I são heterogêneas causando diferentes graus de comprometimento cardiorrespiratório, músculo-esquelético e do sistema nervoso central (MARTINS et al., 2009; MUNOZ-ROJAS et al., 2011).

Os tratamentos disponíveis para a MPS I baseiam-se no transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) e na terapia de reposição enzimática (TRE). Apesar da ampla aplicação e benefícios clínicos, seus efeitos ainda são limitados (GIUGLIANI et al., 2016; NOH; LEE, 2014). O TCTH somente é eficaz se for realizado no início da vida e está associado a alta morbidade e mortalidade (D'ACO et al., 2012; RU et al., 2011 VALAYANNOPOULOS; WIJBURG, 2011). O tratamento com a TRE é o mais utilizado, porém também é limitado devido a enzima não atravessar a barreira hematoencefálica e, além disso, é necessário a infusão semanal da enzima ocasionando um elevado custo de tratamento (WOLF et al., 2015; VALAYANNOPOULOS; WIJBURG, 2011).

A tecnologia de microencapsulação celular é um sistema de terapia celular e consiste na imobilização de células no interior de uma membrana semipermeável a qual deve permitir a troca de nutrientes, metabólitos e a liberação de produtos biologicamente ativos de forma prolongada, controlada e/ou localizada (SANTOS et al., 2013; MURUA et al., 2008). Dessa forma, esse sistema é interessante para a aplicação no tratamento da MPS I, uma vez que as células recombinantes microencapsuladas podem secretar a enzima IDUA e a mesma ser absorvida pelas células deficientes (MATTE et al., 2011). Estudos prévios em nosso grupo de pesquisa com a microencapsulação de células BHK (*baby hamster kidney*) geneticamente modificadas para super-expressar IDUA (MAYER et al., 2010) demonstraram resultados promissores após implante intraperitoneal e subcutâneo (BALDO et al., 2012b; LAGRANHA et al., 2013; LAGRANHA et al., 2017).

Até o momento, todos os estudos para a encapsulação de células que superexpressam IDUA foram realizados com extrusor de fluxo de ar. A técnica de extrusão eletrostática tem sido mais recentemente considerada superior em termos de reprodutibilidade, escalonamento e possibilidade de produção em condições estéreis (MANOJLOVIC et al., 2006). Esse método baseia-se na utilização de forças eletrostáticas sendo que o potencial elétrico aplicado entre o dispositivo de formação de gotículas e a solução reticulante, induz uma carga na superfície da solução do polímero que resulta numa diminuição da tensão superficial do polímero e a gota é formada para expelir o excesso de carga superficial (GASPERINI; MANO; REIS, 2014).

Nesse sentido, nesse estudo, objetivamos otimizar a encapsulação de células rBHK superexpressando IDUA em microcápsulas de alginato (MC-A) através de um desenho experimental do tipo Box-Behnken, visando determinar condições ideais da formulação e de parâmetros relevantes do equipamento de extrusão eletrostática. Em uma segunda fase, o estudo tem por objetivo avaliar o efeito do revestimento das microcápsulas com poli-L-lisina (MC-APA) sobre propriedades como diâmetro, dispersão, resistência mecânica, bem como atividade enzimática após implante subcutâneo em modelo murino MPS I.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Cultura celular***

Células de *Baby Hamster Kidney* (BHK), transfectadas com o plasmídeo pR-IDUA para gerar células BHK recombinantes (rBHK) que superexpressam a IDUA (MAYER et al., 2010), foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal de bovino (Gibco, Grand Island, NY, EUA) e 1% de antibiótico-penicilina/Streptomycin (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA). As células foram mantidas e condições padrão de cultivo celular a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. Para encapsulação as células foram tripsinizadas por cerca de 3 minutos em tripsina-EDTA 0.25% e contadas em câmara de Neubauer.

### ***Produção das microcápsulas***

As células rBHK foram imobilizadas em microcápsulas usando uma unidade de encapsulação eletrostática tipo V1 (Nisco, Zurique, Suíça) ligado a uma bomba de infusão de seringa. As células foram ressuspensas em uma solução de alginato de sódio ultra puro (UP LVG) (Nova Matriz FMC, Noruega) contendo  $8,3 \times 10^6$  células/mL. A suspensão foi submetida a extrusão (agulha de 0,35 mm) com uma taxa de infusão constante. As gotas entraram em contato com a solução reticulante de  $\text{CaCl}_2$  80 mM e formaram o hidrogel de alginato contendo as células incorporadas. As microcápsulas de alginato (MC-A) foram mantidas em agitação para completar a geleificação iônica.

Após a otimização da obtenção das microcápsulas de alginato as mesmas foram revestidas com hidrobromidrato de poli-L- lisina a 0,05% (MC-APA) (PLL; Sigma-Aldrich, EUA) durante 10 minutos, seguido por um último revestimento com solução de alginato de sódio a 0,1% durante 5 minutos. As condições de fluxo de infusão da suspensão alginato/células, da voltagem usada no gerador eletrostático bem como a concentração do alginato foram determinados pelo delineamento experimental. O processo de encapsulação celular foi realizado sob condições estéreis e todas as soluções foram esterilizadas por filtração.

### ***Delineamento experimental utilizando Box-Behnken***

Para fins do estudo de otimização foi selecionado um projeto estatístico Box-Behnken com 3 fatores, 3 níveis e 15 execuções (BOX ;BEHNKEN, 1960). O desenho experimental consiste num conjunto de pontos situados no ponto médio de cada extremidade e no ponto central replicado do cubo multidimensional. As variáveis independentes e dependentes estão listadas na tabela 1. Através da utilização do software estatístico Minitab 17 (State College, PA, EUA) foi possível avaliar os principais efeitos, interação de efeitos e efeitos quadráticos da concentração de alginato, da voltagem e do fluxo no tamanho e na atividade enzimática. O objetivo dessa otimização é minimizar o tamanho das microcápsulas e maximizar a atividade da enzima IDUA. Todos os experimentos foram realizados

de um modo aleatório, para minimizar qualquer possível fonte de erros experimentais e, desse modo, a variabilidade da resposta. Para fins de analisar a precisão do modelo usado foi comparado os resultados previstos pelo software com os obtidos experimentalmente nas condições otimizadas.

**Tabela 1.** Variáveis independentes e variáveis dependentes estabelecidas para o planejamento experimental Box- Behnken 3<sup>3</sup>.

| <b>Variáveis independentes</b> | <b>Níveis</b>     |                  |                  |
|--------------------------------|-------------------|------------------|------------------|
|                                | <b>Baixo (-1)</b> | <b>Médio (0)</b> | <b>Alto (+1)</b> |
| Voltagem (kV)                  | 6                 | 8                | 10               |
| Fluxo alginato/células (mL/h)  | 15                | 20               | 25               |
| Concentração de alginato (%)   | 1,3               | 1,5              | 1,7              |
| <b>Variáveis dependentes</b>   | <b>Limites</b>    |                  |                  |
| Tamanho (µm)                   | Mínimo            |                  |                  |
| Atividade de IDUA 24h (%)      | Máximo            |                  |                  |

### ***Caracterização das microcápsulas***

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para caracterizar a morfologia da superfície das microcápsulas. As amostras foram fixadas com glutaraldeído 25%, desidratadas e dessecadas com etanol sob vácuo, após foram colocadas em bases de alumínio e metalizadas com ouro. Em seguida, foram observadas em microscópio eletrônico de varredura JOEL JSM 6060.

O diâmetro médio e a distribuição do tamanho das microcápsulas foram determinados utilizando um analisador de tamanho de partícula de difração de laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, UK). As amostras foram diluídas de forma a assegurar que a intensidade de dispersão da luz estava dentro do intervalo de sensibilidade do instrumento.

A resistência mecânica das microcápsulas foi determinada em um analisador de textura (TA-XT21, Microsystems, UK) equipado com um transdutor

de força. O equipamento consiste de uma probe móvel de 10 mm a qual se move verticalmente a uma velocidade constante. A estabilidade mecânica foi medida avaliando a força (g) necessária para a compressão das microcápsulas.

A análise das interações moleculares e da composição da superfície das microcápsulas foi realizada em Infravermelho por Transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR). Os espectros foram obtidos no comprimento de onda de 650-4000  $\text{cm}^{-1}$  em um Perking Elmer BX (Waltham, USA) acoplado a uma unidade de ATR (cristal de germânio de passo único). A resolução escolhida foi de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 32 acumulações de sinal por amostra foram utilizadas. As amostras das microcápsulas foram secas em estufa e as leituras foram realizadas em triplicata.

## **Estudos *in vitro***

### ***Atividade de IDUA***

A atividade de IDUA foi medida no meio de cultura antes e após a encapsulação das células e nos tecidos dos animais. A atividade de IDUA foi avaliada utilizando um ensaio fluorimétrico (HOPWOOD et al., 1979). Os resultados foram expressos em nmol/h/ml no DMEM, no sobrenadante dos tecidos nmol /h /mg de proteína. O teor de proteína dos tecidos foi medido usando o método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

### ***Viabilidade celular***

A viabilidade das células BHK foi determinada nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 após a microencapsulação pelo ensaio de tetrazólio (MTT) (Sigma, St. Louis, MO). Em uma placa foi colocado 300  $\mu\text{L}$  das microcápsulas em cada poço com 1 mL de meio sem soro e 200  $\mu\text{L}$  de solução de 5 mg/ml de MTT em PBS. As microcápsulas foram incubadas a 37 ° C por 4 h. Após, a solução de MTT foi removida, e foi adicionado 1 mL de dimetilsulfóxido. Após 10 min a solução púrpura resultante foi retirada e lida num leitor de microplacas (Spectramax) no comprimento de onda de 570 nm.

## **Estudos *in vivo***

### ***Animais***

Camundongos C57BL/6 (Idua-KO), gentilmente doados pela Dra. Elizabeth Neufeld, UCLA, EUA) foram usados para o implante das microcápsulas. Os camundongos MPS I foram genotipados por reação de PCR como previamente descrito (BALDO et al., 2012a) e mantidos na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em ciclo de claro/escuro de 12 horas e com água e comida *ad libitum*.

Os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com as recomendações do Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde, monitorados por um médico veterinário e desenhado para minimizar o sofrimento animal. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre número 15-0365.

### ***Implante das microcápsulas***

As microcápsulas MC-APA foram implantadas em camundongos MPS I de 1 mês (n=5). Para grupos controles foram utilizados animais MPS I não tratados e animais normais de 2 meses (idade dos animais no momento da eutanásia) (n=5). Os animais foram anestesiados com isoflurano e um volume de 300 µl de microcápsulas foi implantado com um cateter 18 G no tecido subcutâneo em dois sítios distintos no dorso do animal. Após 30 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico isoflurano e os órgãos foram retirados para análises da atividade de IDUA e histológica. As microcápsulas implantadas no dorso superior e do dorso inferior foram retiradas para análise histológica e colocadas em cultura por 24h para avaliação da liberação de IDUA pós-implante.

## **Análise histológica**

As microcápsulas foram fixadas com formalina tamponada 10%, emblocadas em parafina e submetidas à cortes semi-finos pra a montagem das lâminas histológicas. Foram feitas colorações de hematoxilina-eosina (H&E) para investigação de resposta inflamatória.

## **Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos. A análise estatística dos dados paramétricos foi realizada por teste t de Student e ANOVA (Tukey post- hoc). Para os dados de IDUA e MTT ao longo do tempo, foi realizado ANOVA (one-Way). Para tanto foi utilizado o software SPSS Statistics 18. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

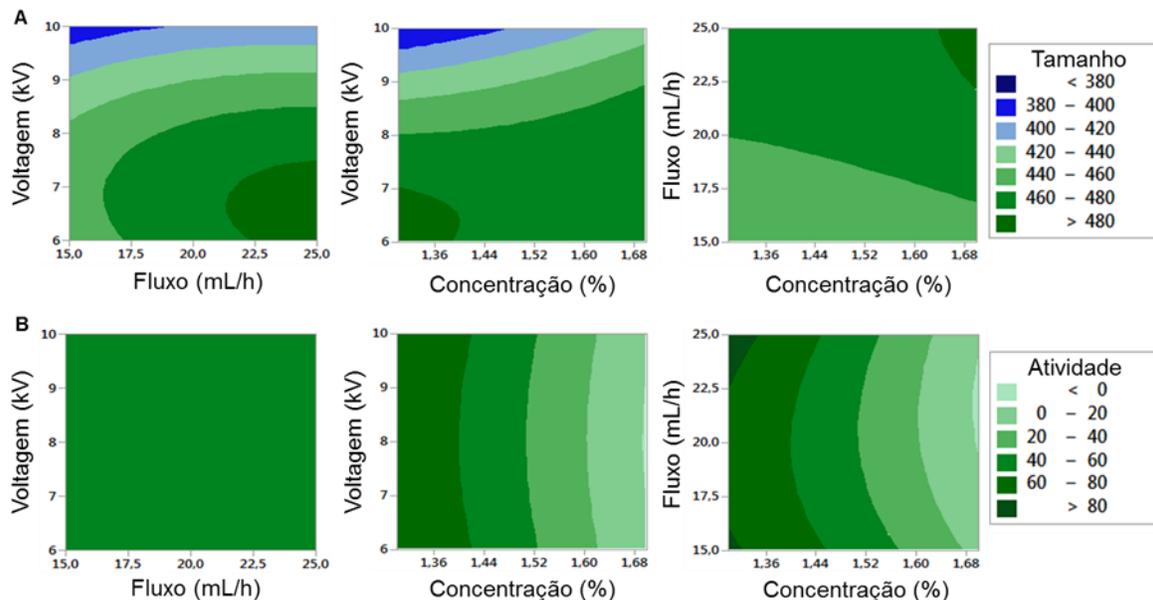
### **Delineamento experimental utilizando Box-Behnken**

A avaliação simultânea do efeito da voltagem (kV), fluxo alginato/células (mL/h) e da concentração de alginato (%) sobre o tamanho das microcápsulas e a atividade de IDUA foi realizado através de desenho experimental Box-Behnken de 3 fatores e 3 níveis para explorar superfícies de resposta e construir os modelos polinomiais. Os resultados obtidos a partir da matriz proposta (tabela 2) foram avaliados e utilizados para a análise de regressão e para gerar as equações polinomiais que descrevem a relação entre as respostas e os fatores considerados. Através da construção dos gráficos de contorno (figura 1) é possível visualizar a influência dos fatores nas respostas, esses gráficos são plotados como uma função de duas variáveis, mantendo a terceira variável constante. Na tabela 3 está demonstrado um resumo dos dados da análise da regressão, o valor de p foi utilizado como uma ferramenta para verificar a significância de cada fator

e também como indicador da força do efeito de cada variável independente nas respostas.

**Tabela 2.** Resultados das respostas observados nas condições determinadas no desenho Box-Behnken.

| <b>Corrida</b> | <b>Concentração de alginato (%)</b> | <b>Fluxo (mL/h)</b> | <b>Voltagem (kV)</b> | <b>Tamanho (<math>\mu\text{m}</math>)</b> | <b>Atividade de IDUA 24 h (%)</b> |
|----------------|-------------------------------------|---------------------|----------------------|---|-----------------------------------|
| 1              | 1,3                                 | 20                  | 6                    | 472,928                                   | 77,32                             |
| 2              | 1,5                                 | 15                  | 10                   | 387,815                                   | 60,82                             |
| 3              | 1,5                                 | 20                  | 8                    | 492,202                                   | 37,11                             |
| 4              | 1,5                                 | 20                  | 8                    | 461,359                                   | 45,36                             |
| 5              | 1,3                                 | 25                  | 8                    | 478,797                                   | 94,39                             |
| 6              | 1,7                                 | 15                  | 8                    | 434,647                                   | 5,7                               |
| 7              | 1,5                                 | 15                  | 6                    | 471,136                                   | 64,94                             |
| 8              | 1,7                                 | 20                  | 10                   | 444,367                                   | 5,11                              |
| 9              | 1,7                                 | 25                  | 8                    | 543,905                                   | 5,49                              |
| 10             | 1,5                                 | 20                  | 8                    | 439,997                                   | 42,26                             |
| 11             | 1,3                                 | 20                  | 10                   | 388,853                                   | 77,32                             |
| 12             | 1,5                                 | 25                  | 6                    | 483,955                                   | 44,33                             |
| 13             | 1,3                                 | 15                  | 8                    | 432,907                                   | 79,38                             |
| 14             | 1,7                                 | 20                  | 6                    | 453,965                                   | 5,48                              |
| 15             | 1,5                                 | 25                  | 10                   | 380,221                                   | 48,45                             |



**Figura 1.** Gráficos de contorno das áreas do tamanho das microcápsulas em µm (A) e da atividade de IDUA em % em relação às células não encapsuladas (B) obtidos pelo planejamento Box-Behnken para análise do efeito da concentração, fluxo e da voltagem.

**Tabela 3.** Resumo da análise de variância da equação de regressão.

| Tamanho          |            | Atividade de IDUA |            |
|------------------|------------|-------------------|------------|
| Fatores          | Valor de p | Fatores           | Valor de p |
| $X_1$            | 0,516      | $X_1$             | < 0,001    |
| $X_2$            | 0,212      | $X_2$             | 0,599      |
| $X_3$            | 0,015      | $X_3$             | 0,989      |
| $X_1^2$          | 0,867      | $X_1^2$           | 0,454      |
| $X_2^2$          | 0,658      | $X_2^2$           | 0,106      |
| $X_3^2$          | 0,118      | $X_3^2$           | 0,484      |
| $X_1 X_2$        | 0,805      | $X_1 X_2$         | 0,356      |
| $X_1 X_3$        | 0,234      | $X_1 X_3$         | 0,985      |
| $X_2 X_3$        | 0,726      | $X_2 X_3$         | 0,674      |
| $R^2 = 81,04 \%$ |            | $R^2 = 96,74\%$   |            |

$X_1$  = concentração de alginato (%),  $X_2$  = fluxo (mL/h),  $X_3$  = voltagem (kV)

### ***Influência das variáveis independentes no tamanho das microcápsulas (Y<sub>1</sub>)***

O tamanho das microcápsulas foi obtido no intervalo de 380,2 a 543,905 µm para as combinações dos níveis das diferentes variáveis definidas na matriz (tabela 2). Na equação polinomial obtida para o tamanho observam-se os efeitos em termos das variáveis independentes.

$$Y_1 = 685 - 599x_1 + 12,3x_2 + 30,9x_3 + 63x_1^2 - 0,269x_2^2 - 6,75x_3^2 \\ + 3,6x_1x_2 + 46,5x_1x_3 - 0,51x_2x_3$$

A análise de regressão demonstrou que o tamanho das microcápsulas é fortemente influenciado pela voltagem em termos lineares (tabela 3). Quando é utilizada uma voltagem maior ocorre a diminuição no tamanho das microcápsulas como pode ser visualizado nos gráficos de contorno (figura 1 A). Observa-se também nesses gráficos que o fluxo parece ter uma tendência a influenciar no tamanho, porém o mesmo não foi significativo quando analisamos o valor de p, sugerindo que a faixa de estudo dos níveis do fluxo pode estar limitando o aparecimento do efeito do mesmo sobre a resposta. O valor do coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,8104$ ) demonstra que 81% da variação do tamanho é explicado pelas variáveis estudadas e sugere que existe outros fatores não explorados nesse estudo que afetam o tamanho. Portanto fica evidente que a técnica de extrusão eletrostática, a qual é baseada na aplicação de uma voltagem para gerar uma diferença de potencial e formar a gota, influencia no tamanho da microcápsula.

### ***Influência das variáveis independentes na atividade de IDUA (Y<sub>2</sub>)***

A atividade de IDUA obtida após 24 h de encapsulação das células varia de 5,11 a 94,3 % quando comparado a mesma quantidade de células não encapsuladas. Analisando a equação polinomial da atividade observam-se os efeitos das variáveis independentes.

$$Y_2 = 219 + 194x_1 - 10,1x_2 - 18,3x_3 - 97x_1^2 + 0,378x_2^2 + 0,91x_3^2 \\ - 4,69x_1x_2 - 0,2x_1x_3 + 0,206x_2x_3$$

Conforme a análise de regressão, a atividade de IDUA é influenciada significativamente pela concentração de alginato (tabela 3). Analisando os gráficos de contornos para atividade, observa-se que quando é utilizada uma menor concentração de alginato ocorre um aumento na atividade de IDUA após 24 h de encapsulação (figura 1B). O valor do coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,9674$ ) sugere que 96 % da variação da atividade é explicada pelas variáveis. Quando a concentração do polímero é baixa, obtém-se uma microcápsula mais porosas aumentando a permeabilidade e assim permitindo maior difusão de nutrientes e produtos, conseqüentemente, há uma contribuição para o aumento da atividade metabólica das células conforme foi demonstrado nesse estudo com as microcápsulas obtidas com a menor concentração de alginato (LEAL-EGAÑA et al., 2011, MOHANTY et al., 2016).

Através da análise dos gráficos de contorno e da resolução das equações, usando o software, foram previstos valores ótimos das variáveis independentes (tabela 4) para obter microcápsulas com menor tamanho e com uma maior atividade de IDUA. De acordo com estas condições, o tamanho e a atividade foram previsto (tabela 3) obtendo um *desirability* de 0,975 o qual indica que essas condições parecem alcançar resultados favoráveis para as respostas como um todo. Cinco experimentos foram realizados utilizando-se as condições ótimas para a validação do modelo e os resultados mostraram valores de  $341,67 \pm 30,15$  e  $92,02 \pm 6,95$  para o tamanho ( $\mu\text{m}$ ) e para a atividade de IDUA (%) respectivamente. Os achados experimentais estão em boa concordância com os valores previstos, indicando suficiente precisão para a predição das condições ótimas sugerindo a confiabilidade do DBB utilizado para a otimização.

**Tabela 4.** Resultado das condições da otimização com as respostas previstas.

| <b>Fatores</b>               | <b>Predito</b> | <b>Respostas</b>             | <b>Predito</b> |
|------------------------------|----------------|------------------------------|----------------|
| Fluxo (mL/h)                 | 25             | Atividade (%)                | 94,48          |
| Voltagem (kV)                | 10             | Tamanho ( $\mu\text{m}$ )    | 378,02         |
| Concentração de alginato (%) | 1,3            | <i>Desirability</i> = 0,9750 |                |

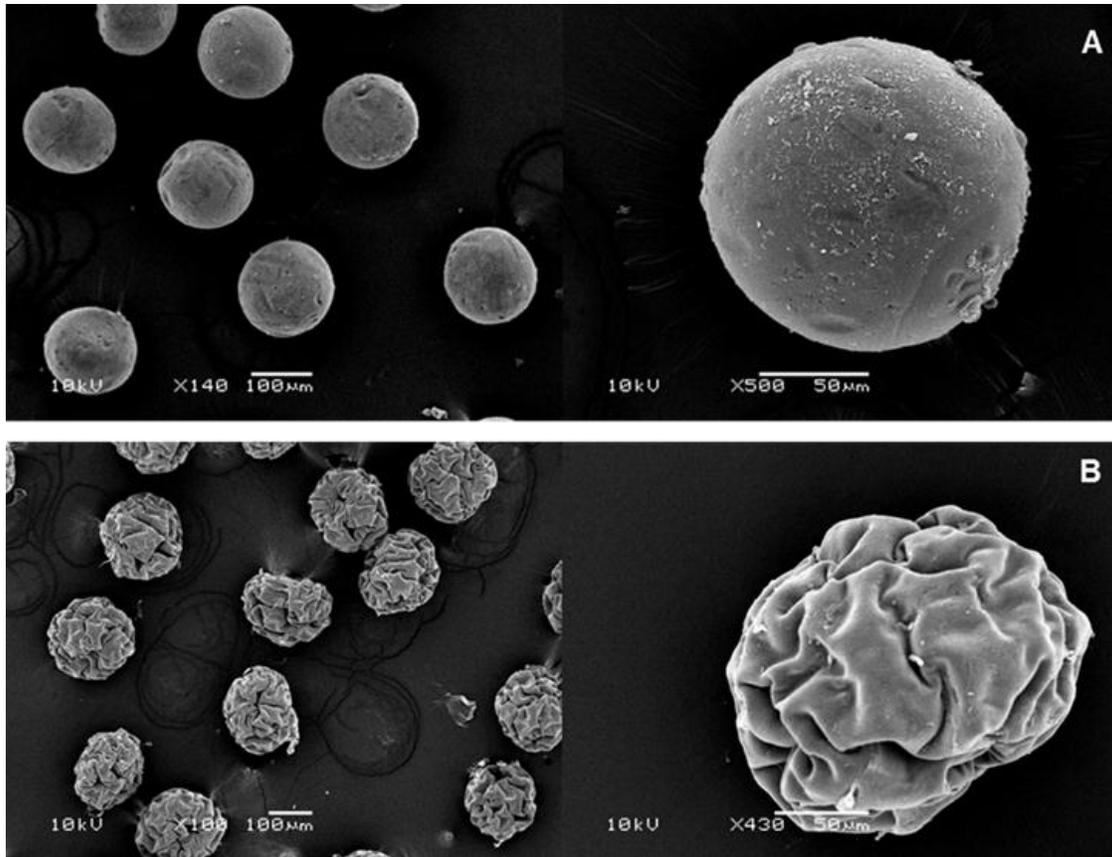
### **Caracterização das microcápsulas**

As microcápsulas de alginato otimizadas foram revestidas com a poli-L-lisina e por último recobertas com alginato, obtendo assim as MC-APA. Analisando as microcápsulas sem e com revestimento observou-se que não há diferença estatística no diâmetro médio e na distribuição do tamanho das microcápsulas (tabela 5). Esses resultados podem ser correlacionados com a análise da microscopia eletrônica de varredura (MEV) (figura 2).

**Tabela 5.** Avaliação do diâmetro, da distribuição do tamanho e da resistência das microcápsulas.

|  | <b>MC-A</b>        | <b>MC-APA</b>      |
|--|--------------------|--------------------|
| <b>Diâmetro médio (<math>\mu\text{m}</math>)</b> | 341,67 $\pm$ 30,15 | 315,27 $\pm$ 10,55 |
| <b>Span</b>                                      | 1,18 $\pm$ 0,20    | 1,22 $\pm$ 0,14    |
| <b>Força (g)</b>                                 | 6,63 $\pm$ 0,77    | 38,83 $\pm$ 4,62*  |

Resultados da média  $\pm$  desvio padrão. Teste t de *Student*, \*  $p < 0,05$ ,  $n=5$ .



**Figura 2.** Fotomicrografias das MC-A (A) e MC-APA (B) obtidas na MEV.

Nas fotomicrografias visualiza-se que as MC-A são pequenas, esféricas, lisas e com uma distribuição uniforme (figura 2 A). As MC-APA (figura 2 B), sofreram alteração na sua forma apresentando-se rugosas. Essa alteração da forma pode ser resultado do próprio revestimento ou do método de secagem usado no preparo das amostras para a MEV. Com o revestimento as microcápsulas ficam com uma camada superficial o que pode resultar no colapso das microcápsulas no processo de secagem (CONFORTO et al., 2015; DELADINO et al., 2008; SHU; ZHU, 2002).

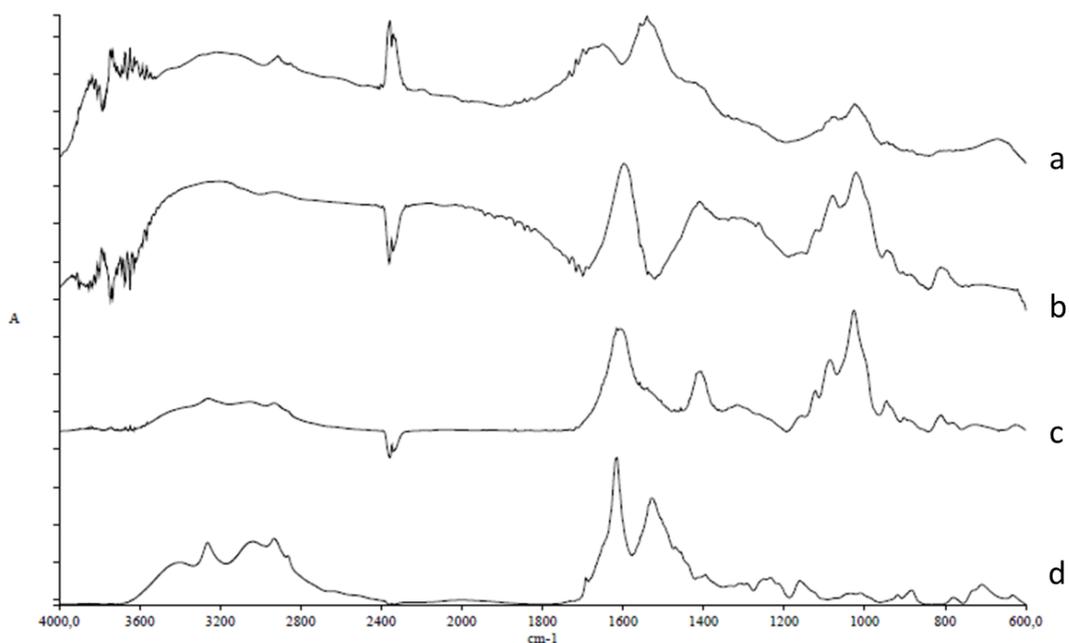
O tamanho e a morfologia são importantes características das microcápsulas, pois influenciam na viabilidade celular e na biocompatibilidade (KONTTURI et al., 2011). Microcápsulas menores são consideradas as mais adequadas do que as maiores, pois permitem uma captação e difusão de nutrientes e oxigênio eficiente para as células, prolongando assim a viabilidade.

Além disso, microcápsulas pequenas, com geometria bem definida e com superfície lisa podem diminuir a adsorção de proteínas e a formação de fibrose (SAKAI; KAWAKAMI, 2010; VEISEH et al., 2015).

A estabilidade mecânica das microcápsulas é uma característica fundamental para proteger e manter as células viáveis após o implante. O revestimento é um dos muitos fatores que influencia positivamente a estabilidade e nesse estudo a mesma foi avaliada antes e após o revestimento com a PLL. Na tabela 4 está demonstrada a força necessária para a compressão das microcápsulas e observa-se que após o revestimento com PLL ocorre um aumento desta força a compressão das mesmas. O revestimento, portanto, aumenta a resistência e pode proporcionar uma maior estabilidade (BHUIBAL et al., 2014).

A fim de obter informações sobre a organização desse sistema, as microcápsulas e os componentes principais das mesmas foram examinadas usando FTIR-ATR. Na figura 3 estão demonstrados os espectros obtidos, analisando o espectro das MC-A (b) observam-se bandas características do alginato de sódio (c), dois picos em torno de 1410 e 1600  $\text{cm}^{-1}$  que representam a simetria e as vibrações de estiramento assimétricas do  $\text{COO}^-$ , respectivamente, e três picos na região de 1200-950  $\text{cm}^{-1}$  que correspondem a várias vibrações do anel de hidrato de carbono (VAN HOOGMOED; BUSSCHER; DE VOS, 2003).

No espectro da PLL (d) observam-se bandas que resultam do alongamento de vibrações de flexão das ligações N-H e das vibrações das ligações C=O e C-N representadas pelo pico da amida A próximo de 3265  $\text{cm}^{-1}$ , pico da amida I 1650  $\text{cm}^{-1}$  e pico da amida II 1550  $\text{cm}^{-1}$  (ROZENBERG; SHOHAM, 2007). Quando comparamos o espectro da MC-APA (a) com o da PLL e do alginato, observam-se dois picos atenuados, sendo o pico na região de 1500  $\text{cm}^{-1}$  com características semelhante a amida II da PLL e também visualiza-se os picos de hidrato de carbono na região de 1200-950  $\text{cm}^{-1}$  característicos do alginato (TAM et al., 2005; VAN HOOGMOED; BUSSCHER; DE VOS, 2003).



**Figura 3.** Espectros de FTIR-ATR da superfície das MC-APA (a), MC-A (b) e de seus componentes principais, alginato de sódio (c) e poli-L-lisina (d).

Uma das características desse estudo é que com a utilização do ATR a máxima profundidade da penetração da radiação de infravermelho nas microcápsulas foi em torno de 3-4  $\mu\text{m}$  a  $1000\text{ cm}^{-1}$  isso é muitas vezes menor do que o real diâmetro das cápsulas obtidas (342  $\mu\text{m}$ ), ou seja, são informações da superfície das microcápsulas (LEVIN; BHARGAVA, 2005). Essa técnica fornece informações da composição química e das interações moleculares da membrana e assim serve para testar e controlar o revestimento externo. Baseados nos dados obtidos das MC- APA observa-se a co-presença do alginato e da PLL, o que sugere que adição do último revestimento com o alginato forma uma membrana muito fina que pode ser pouco eficiente para cobrir a PLL ou decorre das imperfeições no recobrimento o que pode deixar a PLL exposta na superfície e permite a sua leitura pelo feixe de infravermelho. As informações sobre as interações moleculares e a exposição de grupos funcionais na superfície são importantes para elucidar a correlação das propriedades físico-químicas com a biocompatibilidade *in vivo* das microcápsulas (TAM et al., 2011). Porém a fim de

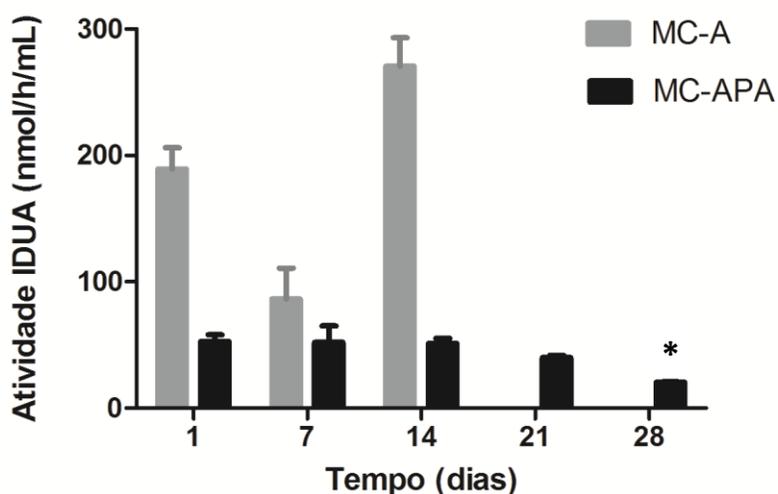
complementar essas informações e obter dados mais específicos é necessário associar outras técnicas de caracterização como, por exemplo, espectrometria de massas e espectroscopia fotoeletrônica de raio-X (TAM et al., 2005).

### **Estudos *in vitro* e *in vivo***

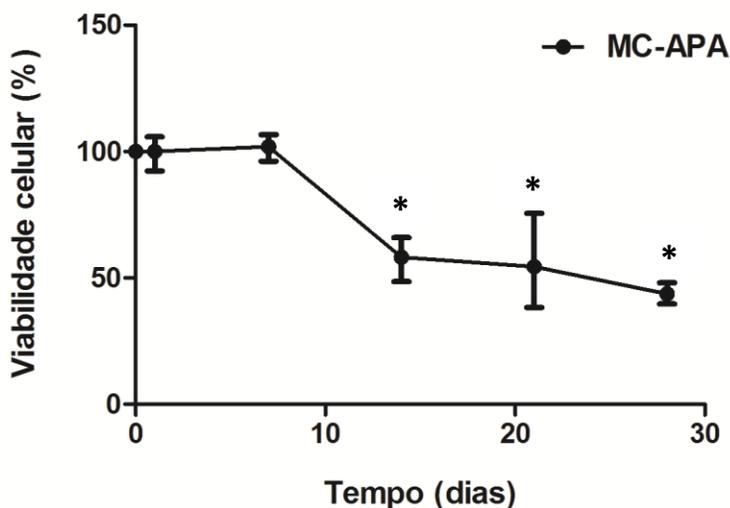
As microcápsulas contendo as células recombinantes foram avaliadas *in vitro* durante 28 dias. Para esse fim as mesmas foram mantidas em cultura, e semanalmente, foi realizado o ensaio de MTT para observar a viabilidade celular e o ensaio enzimático para avaliar a liberação da enzima IDUA (ambos em triplicata). Conforme mostra a figura 4, a atividade de IDUA das MC-A aumenta de forma acentuada após 14 dias da microencapsulação. Esse aumento parece estar relacionado a um extravasamento de células para o meio extra-capsular, uma vez que microcápsulas com concentração de alginato de 1,3%, são mais maleáveis e mais permeáveis, tornando o seu interior um ambiente propício para a divisão celular, o que leva, conseqüentemente, a um inchaço na cápsula. Esse inchaço, provoca uma pressão na sua membrana que pode levar ao rompimento da mesma, inviabilizando os estudos *in vivo*. Dessa forma as análises subsequentes foram feitas apenas com as MC- APA.

Já a atividade de IDUA das MC-APA (figura 4) começa a diminuir após 21 dias da microencapsulação das células, enquanto a viabilidade das mesmas começa a cair após 14 dias da microencapsulação (figura 5). A viabilidade celular e a expressão de IDUA não estão relacionadas diretamente devido ao fato do plasmídeo utilizado na produção das células rBHK (pRIDUA) ter origem de replicação em eucariotos. Isso significa que o número de cópias do plasmídeo pode variar de célula pra célula, e conseqüentemente a sua expressão também. Dessa forma, o fato da viabilidade diminuir após 14 dias e a atividade de IDUA apenas após 21 dias podem estar relacionado a um maior número de cópias de plasmídeo nas células viáveis garantindo uma elevada atividade de IDUA, mesmo após morte de algumas destas. De qualquer forma, após 28 dias da encapsulação observa-se que cerca de 50% das células ainda estão viáveis, as quais representam a manutenção da atividade enzimática em torno de 50%.

Com a obtenção de microcápsulas com tamanho reduzido, espera-se que não ocorra limitação de transporte de nutrientes e oxigênio para as células imobilizadas. Entretanto, com o revestimento, o qual é necessário para aumentar a estabilidade, ocorre também uma modulação da permeabilidade evidenciada pela redução da atividade de IDUA nas MC-APA. As microcápsulas revestidas são mais rígidas e menos porosas, o que pode estar prejudicando a viabilidade celular (THAKUR et al., 2010).

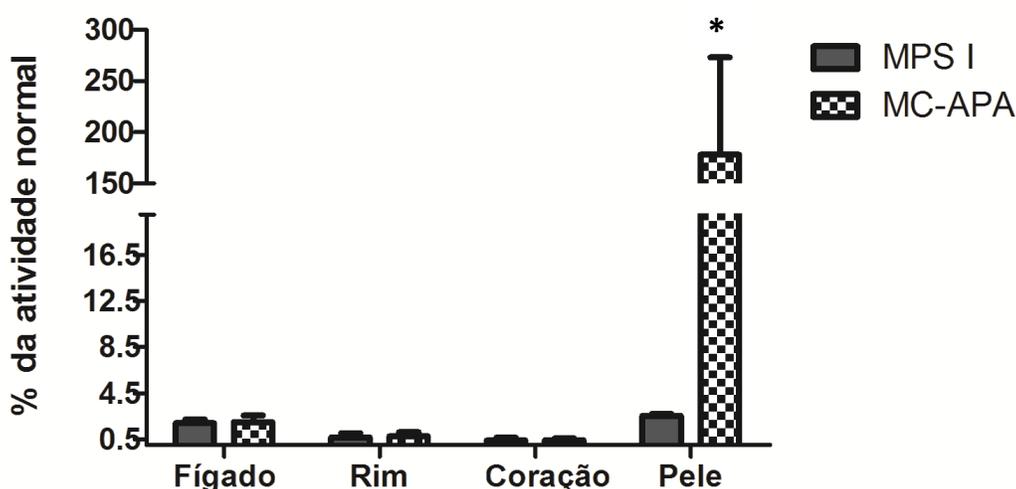


**Figura 4.** Atividade da enzima IDUA durante 28 dias de microencapsulação. *One-Way ANOVA*, \* diferença entre 1, 7 e 14 dias,  $p < 0,05$ ,  $n=3$ .



**Figura 5.** Viabilidade das células rBHK encapsuladas durante 28 dias. *One-Way ANOVA*, \* diferença entre 0, 1 e 7 dias,  $p < 0,01$ ,  $n=3$ .

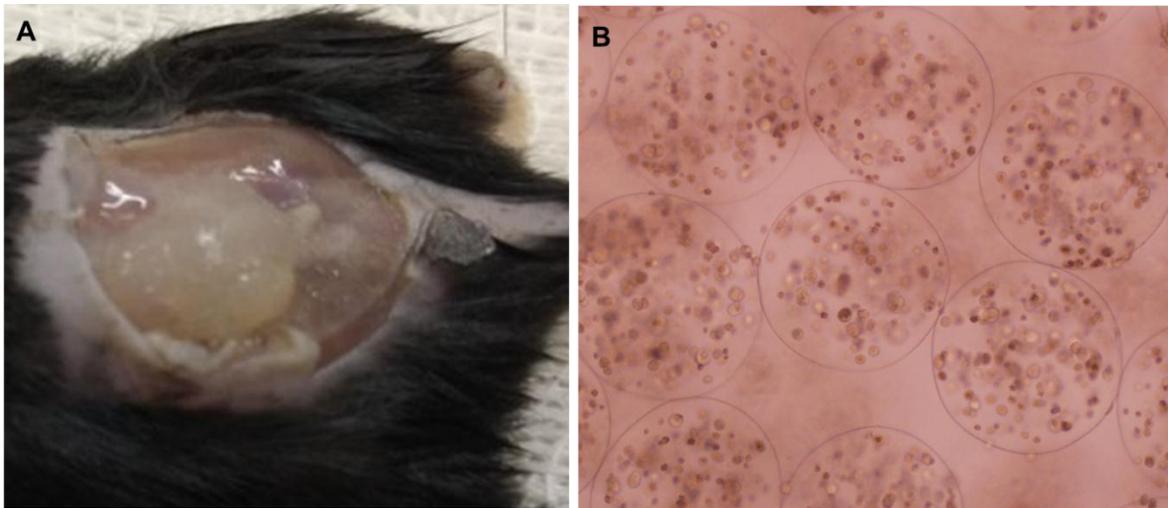
As microcápsulas APA foram implantadas em dois locais no tecido subcutâneo do dorso de camundongos MPS I. Após 30 dias, os animais foram sacrificados e o fígado, rim, coração, a pele do local do implante foram retirados. O ensaio de atividade de IDUA foi realizado e comparado com os resultados dos animais controles. De acordo com a figura 6, foi detectado um aumento da atividade de IDUA de forma significativa (cerca de 70 vezes) na pele do local do implante das microcápsulas. Não foi observada diferença estatística na atividade de IDUA no fígado, rim e coração dos animais tratados.



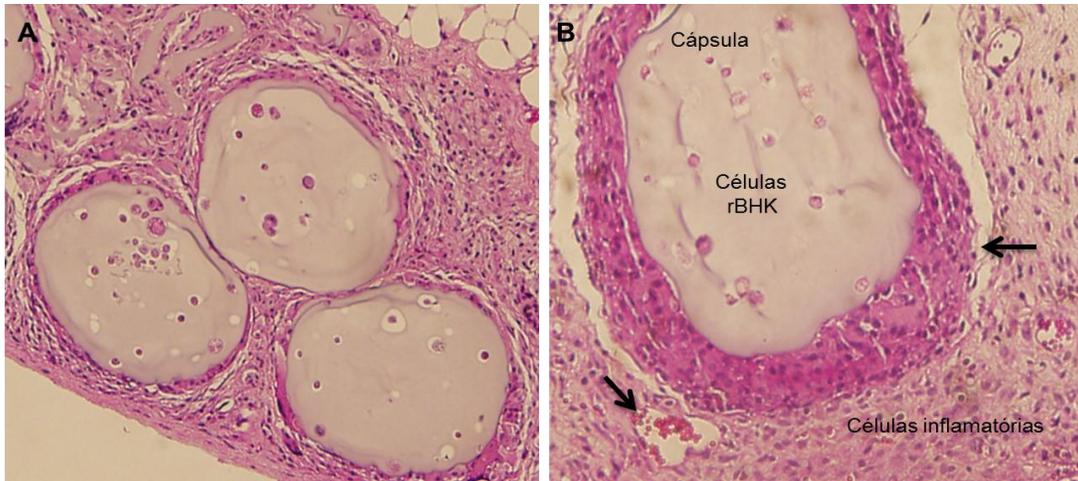
**Figura 6.** Atividade de IDUA nos tecidos após 30 dias de tratamento. Teste t de Student, \* diferença entre MPS I e tratado,  $p \leq 0,05$ ,  $n=5$ .

As MC-APA implantadas foram recuperadas do tecido subcutâneo após 30 dias de tratamento. As microcápsulas ficaram agregadas e em volta delas formou-se uma membrana (figura 7 A). As microcápsulas retiradas de um sítio de implante (dorso superior) foram mantidas em meio de cultura por 24 h para análise da atividade de IDUA e as microcápsulas do outro sítio (dorso inferior) foram utilizadas para a histologia. Após 24 h, a atividade de IDUA das MC-APA recuperadas foi de  $44,75 \pm 15,29$  nmol/h/mL, o que representa aproximadamente 65% da atividade enzimática quando comparada com as microcápsulas pré-implante. Na figura 7 B visualiza-se a microscopia das microcápsulas retiradas, as mesmas permaneceram intactas e com leves deformações na estrutura.

Nas análises histológicas das microcápsulas recuperadas foi evidenciada uma resposta inflamatória pela presença de infiltrado inflamatório ao redor das cápsulas formado principalmente por macrófagos e células gigantes multinucleares. Também foi possível visualizar alguns capilares com células sanguíneas nas proximidades desse sistema (figura 8 A-B). Esse tipo de resposta imune é comum para esse tipo de sistema. A mesma é geralmente desencadeada pelo procedimento cirúrgico e pelo biomaterial utilizado (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008). Estudos com biomateriais altamente purificados demonstraram que a resposta a esse sistema reduz consideravelmente quando comparadas com os materiais não purificados (MENARD et al., 2009; TAM et al., 2006; JUÁREZ, et al., 2014).



**Figura 7.** Membrana formada em volta das microcápsulas após 30 dias de implante (A). Aparência das MC-APA recuperadas pós-implante (B).



**Figura 8.** Análise histológica das MC-APA após 30 dias do implante. (A) Aspecto microscópico das microcápsulas (ampliação 100). (B) Infiltrado inflamatório e vasos sanguíneos (setas) (ampliação 200).

Os resultados do tratamento de 30 dias mostraram que a liberação da enzima foi localizada o que pode ser devido a pequena neovascularização do tecido subcutâneo, apesar de ser um sítio de fácil acesso e minimamente invasivo o mesmo apresenta pouca vascularização precoce (VERITER; GIANELLO; DUFRANE, 2013). Apesar da presença de alguns capilares sanguíneos nas proximidades das cápsulas os mesmos parecem ser insuficientes para uma captação eficiente da enzima, talvez por terem se formado tardiamente ou talvez por serem poucos numerosos. A formação da membrana em volta das microcápsula parece não estar impedindo a liberação da enzima, já que a mesma foi detectada na pele. Em um estudo recente do grupo, foi verificada atividade de IDUA em órgãos após 120 dias de implante subcutâneo (LAGRANHA et al., 2017), o que nos sugere que é necessário um tratamento por um período mais longo para uma maior produção de novos vasos e assim a distribuição da enzima.

## CONCLUSÃO

As microcápsulas otimizadas (contendo as células rBHK) através da técnica de extrusão eletrostática mostraram-se monodispersas, com tamanho e resistência mecânica adequados para implante subcutâneo. O revestimento com PLL (MC-APA) proporcionou uma maior estabilidade mecânica ao sistema e com

uma permeabilidade suficiente para aumentar a atividade de IDUA na pele de maneira significativa. Apesar dos resultados indicarem a presença de uma resposta imune envolvendo esse sistema, esta não impediu a liberação localizada da enzima. Estudos de longo prazo representam a perspectiva imediata deste trabalho, uma vez que a presença insuficiente de capilares sanguíneos nas proximidades das microcápsulas implantadas pode ter sido o fator determinante para a enzima não ser distribuída para os outros tecidos/órgãos.

## REFERÊNCIAS

BALDO, G. et al. Recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase correct enzyme deficiency in human mucopolysaccharidosis type I cells. **Cells Tissues Organs**, v. 195, n. 4, p. 323–329, 2012a.

BALDO, G. et al. Intraperitoneal implant of recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase partially corrects visceral pathology in mucopolysaccharidosis type I mice. **Cytotherapy**, v. 14, p. 860–867, 2012b.

BHUJBAL, S. V. et al. Factors influencing the mechanical stability of alginate beads applicable for immunoisolation of mammalian cells. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 37, p. 196–208, 2014.

BOX, G. E. P.; BENHKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**. V.2, n.4, p.455-475, 1960.

D'ACO, K. et al. Diagnosis and treatment trends in mucopolysaccharidosis I: Findings from the MPS I registry. **European Journal of Pediatrics**, v. 171, n. 6, p. 911–919, 2012.

DE VOS, P. et al. Zeta-potentials of alginate-PLL capsules: a predictive measure for biocompatibility. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 81, n. 4, p. 771–780, 2006.

DE VOS, P. et al. The association between in vivo physicochemical changes and inflammatory responses against alginate based microcapsules. **Biomaterials**, v. 33, n. 22, p. 5552–5559, 2012.

GASPERINI, L.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Natural polymers for the microencapsulation of cells. **Journal of the Royal Society**, v. 11, n. 100, p. 1–19, 2014.

GIUGLIANI, R. et al. Emerging drugs for the treatment of mucopolysaccharidoses. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 9, n.1, p. 1–18, 2016.

HOPWOOD, J.J. et al. A fluorometric assay using 4-methylumbelliferyl alpha- L -iduronide for the estimation of alpha- L -iduronidase activity and the detection of Hurler and Scheie syndromes. **Clinica Chimica Acta**, v. 92, p. 257 – 65, 1979.

JUÁREZ, P. et al. Immunological and technical considerations in application of alginate-based microencapsulation systems. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 2, p. 1–15, 2014.

KONTTURI, L. S. et al. A laboratory-scale device for the straightforward production of uniform, small sized cell microcapsules with long-term cell viability. **Journal of Controlled Release**, v. 152, n. 3, p. 376–381, 2011.

LAGRANHA, V. L. et al. Treatment of MPS I mice with microencapsulated cells overexpressing IDUA: effect of the prednisolone administration. **Journal of Microencapsulation**, v. 30, n. 4, p. 383–389, 2013.

LAGRANHA, V. L. et al. Subcutaneous implantation microencapsulated cells overexpressing  $\alpha$ -L-iduronidase for mucopolysaccharidosis type I treatment. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. V. 28, n.43, p. 1-11, 2017.

LEAL-EGAÑA, A. et al. Determination of pore size distribution at the cell-hydrogel interface. **Journal of nanobiotechnology**, v.10, n. 24, p. 1-7, 2011.

LEVIN, I. W.; BHARGAVA, R. Fourier transform infrared vibrational spectroscopic imaging: Integrating microscopy and molecular recognition. **Annual Review of Physical Chemistry** . v. 56, n. 1, p. 429–474, 2005.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

MANOJLOVIC, V. et al. Immobilization of cells by electrostatic droplet generation: A model system for potential application in medicine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 2, p. 163–171, 2006.

MARTINS, A. M. et al. Guidelines for the management of mucopolysaccharidosis type I. **The Journal of Pediatrics**, v. 155, n. 4, p. 32–46, 2009.

MATTE, U. et al. Cell microencapsulation: a potential tool for the treatment of neuronopathic lysosomal storage diseases. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 34, p. 983–990, 2011.

MAYER, F. et al. Effects of Cryopreservation and Hypothermic Storage on Cell Viability and Enzyme Activity in Recombinant Encapsulated Cells Overexpressing. **Artificial Organs**, v. 34, n. 5, p. 434–439, 2010.

MENARD, M. et al. Role of Protein Contaminants in the Immunogenicity of Alginates. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v. 93, p. 333–340, 2009.

MOHANTY, S. et al. Impact of alginate concentration on the viability, cryostorage, and angiogenic activity of encapsulated fibroblasts. **Materials Science and Engineering C**, v. 65, p. 269-277, 2016.

MUNOZ-ROJAS, M. V. et al. Clinical manifestations and treatment of mucopolysaccharidosis type I patients in Latin America as compared with the rest of the world. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 34, p. 1029–1037, 2011.

MURUA, A. et al. Cell microencapsulation technology: Towards clinical application. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 2, p. 76–83, 2008.

NOH, H.; LEE, J. I. Current and potential therapeutic strategies for mucopolysaccharidoses. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 39, n. 3, p. 215–224, 2014.

ROZENBERG, M.; SHOHAM, G. FTIR spectra of solid poly-L-lysine in the stretching NH mode range. **Biophysical Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 166–171, 2007.

RU, M. H. DE et al. Enzyme replacement therapy and / or hematopoietic stem cell transplantation at diagnosis in patients with mucopolysaccharidosis type I: results of a European consensus procedure. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 55, n. 6, p. 1–9, 2011.

SANTOS, E. et al. Therapeutic cell encapsulation: Ten steps towards clinical translation. **Journal of Controlled Release**, v. 170, n. 1, p. 1–14, 2013.

SAKAI, S.; KAWAKAMI, K. Development of subsieve-size capsules and application to cell therapy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 670, p. 22–30, 2010.

TAM, S. K. et al. Physicochemical model of alginate-poly-L-lysine microcapsules defined at the micrometric/nanometric scale using ATR-FTIR, XPS, and ToF-SIMS. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6950–6961, 2005.

TAM, S. K. et al. Impact of residual contamination on the biofunctional properties of purified alginates used for cell encapsulation. **Biomaterials**, v. 27, p. 1296–1305, 2006.

TAM, S. K. et al. Biocompatibility and physicochemical characteristics of alginate-polycation microcapsules. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 4, p. 1683–1692, 2011.

THAKUR, A. et al. Characterization of viability and proliferation of alginate-poly-L-lysine – alginate encapsulated myoblasts using flow cytometry. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v. 94, n. 2, p. 296–304, 2010.

VALAYANNOPOULOS, V.; WIJBURG, F. A. Therapy for the mucopolysaccharidoses. **Rheumatology**, v. 50, p. 49–59, 2011.

VAN HOOGMOED, C. G.; BUSSCHER, H. J.; DE VOS, P. Fourier transform infrared spectroscopy studies of alginate-PLL capsules with varying compositions. **Journal of biomedical materials research A**, v. 67, n. 1, p. 172–178, 2003.

VEISEH, O. et al. Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates. **Nature Materials**, v. 14, n. 6, p. 643–651, 2015.

VERITER, S.; GIANELLO, P.; DUFRANE, D. Bioengineered sites for islet cell transplantation. **Current diabetes reports**, v. 13, n. 5, p. 745–755, 2013.

WOLF, A. D. et al. Gene therapy for neurologic manifestations of mucopolysaccharidoses. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, n. 2, p. 283–296, 2015.



## **DISCUSSÃO GERAL**

---



Considerando as deficiências dos tratamentos convencionais usados na MPS I, a microencapsulação celular tem sido considerada uma alternativa promissora. Atráves do uso das microcápsulas é possível a imobilização de células que superexpressam IDUA, o que permite a liberação da enzima e a captação pelas células deficientes após o implante (MATTE et al., 2011). Contudo, essa abordagem depende de diversos fatores que podem impactar no sucesso dessa terapia.

Estudos anteriores do grupo com a microencapsulação de células que superexpressam IDUA apresentaram resultados interessantes (BALDO et al., 2012a, BALDO et al., 2012b; LAGRANHA et al., 2013). No entanto, esses estudos se limitam, majoritariamente aos aspectos biológicos, o que ressalta a importância de mais estudos tecnológicos. Considerando que até o momento a única técnica empregada para a microencapsulação de células visando o tratamento de MPS I é a de fluxo de ar, além disso, os mesmos se limitam a uma determinada concentração do biomaterial, assim podem ser exploradas diferentes técnicas de microencapsulação entre outros fatores que podem melhorar a biocompatibilidade e a eficiência desse sistema.

Dessa forma nesse trabalho objetivamos aperfeiçoar esse sistema de microencapsulação celular usando a técnica de extrusão eletrostática. Para isso tanto a composição da microcápsula como a técnica de microencapsulação foram otimizadas a fim de obter microcápsulas com características adequadas para a aplicação na MPS I. Para melhor elucidação do desenvolvimento do trabalho, a dissertação foi organizada em dois capítulos.

O capítulo I foi dedicado à revisão do tema abordado, fornecendo subsídios para o desenvolvimento do trabalho. Além de contextualizarem-se os aspectos da MPS I e os problemas referentes aos tratamentos atuais, foram apresentados aspectos referentes à microencapsulação celular, bem como as estratégias para obter microcápsulas com características adequadas, considerando os principais fatores que influenciam as mesmas.

Os dados obtidos auxiliaram tanto na escolha da técnica e dos parâmetros usada para a microencapsular as células rBHK como na escolha do biomaterial, composição e revestimento das microcápsulas. A técnica de extrusão eletrostática permite obter microcápsulas com características adequadas que podem proporcionar a sobrevivência das células bem como biocompatibilidade em longo prazo, além disso, é fácil de usar em condições estéreis (GRYSHKOV et al., 2014; MANOJLOVIC et al., 2006). No entanto, essa técnica envolve vários parâmetros, assim foi necessário usar um desenho experimental para determinar as melhores condições a serem utilizadas. Além disso, a concentração do alginato e o efeito do revestimento com PLL também foram exploradas.

No capítulo II foram apresentados os resultados obtidos nos estudos da otimização usando o desenho Box-Behnken, caracterização físico-química das microcápsulas, avaliação da atividade enzimática e da viabilidade celular *in vitro* e avaliação das microcápsulas otimizadas no tratamento da doença em camundongos MPS I.

No que se refere à otimização foram selecionadas como respostas produzir microcápsulas com tamanho reduzido associado à maior atividade enzimática. Os principais fatores que influenciam nessas características foram selecionados e a relação entre esses fatores e as respostas foi investigado pelo método de superfície de resposta (BAS; BOYACI, 2007). Observou-se que a voltagem aplicada no microencapsulador eletrostático influencia de forma direta o tamanho da microcápsulas. Quando é aplicada uma maior voltagem, menor é o tamanho das microcápsulas produzidas. Uma maior voltagem gera uma maior tensão superficial o que resulta na formação e no desprendimento rápido da gota reduzindo o tamanho da microcápsula formada (PONCELET et al., 1999; PRUSSE et al., 2008). Quando analisamos a concentração do alginato, verificamos que na concentração mais baixa (1,3%) ocorre maior atividade de IDUA, por serem mais porosas as mesmas permitem maior difusão de nutrientes e produtos e conseqüentemente uma maior atividade metabólica das células (LEAL-EGAÑA et al., 2011; MOHANTY et al., 2016).

A fim de avaliar o efeito do revestimento nas microcápsulas de alginato otimizadas, as mesmas foram revestidas com PLL seguido de um último revestimento de alginato obtendo assim as MC-APA. Após o revestimento observou-se que não houve alteração do tamanho médio nem na distribuição do mesmo. Houve uma diminuição da liberação da enzima, o que é esperado, pois o revestimento modula a permeabilidade. Quando analisamos a morfologia as MC-A as mesmas tem formato bem definido e esférico, porém as MC-APA apresentaram reentrâncias, essa alteração da forma após o revestimento pode estar associado a técnica usada na desidratação (CONFORTO et al., 2015).

O principal motivo de revestir as microcápsulas é aumentar a estabilidade das mesmas, uma característica fundamental para proteger e manter as células viáveis após o implante. Contudo, a fim de obter um sistema estável e permeável, tanto a concentração do polímero como do tempo desse revestimento devem ser bem controlados (MA et al., 2012a). Assim nesse estudo usamos uma concentração de 0,05% de PLL e o tempo de revestimento de 10 minutos, o que é bem descrito na literatura (BHUJBAL et al., 2014; MA et al., 2012b). Comparando as microcápsulas observou-se que o revestimento proporcionou um aumento da resistência aproximadamente seis vezes maior quando comparadas com as não revestidas. Essa estabilidade também foi verificada *in vitro*, após 14 dias em cultura ocorreu o rompimento das MC-A o que não ocorreu com as MC-APA.

As análises em FTIR-ATR foram realizadas a fim de caracterizar a superfície das microcápsulas, uma vez que as informações sobre as interações e a exposição de grupos funcionais na superfície influenciam a imunogenicidade desse sistema (DE HAAN et al., 2011; ROKSTAD et al., 2011) Os espectros das microcápsulas APA demonstraram a presença de bandas características do alginato e da PLL, porém observam-se sutis alterações na intensidade e forma de algumas bandas. Assim pode-se sugerir algumas hipóteses, essas alterações podem ser decorrentes da interação entre essas duas camadas, ou a adição do último revestimento com o alginato forma uma membrana muito fina que pode ser pouco eficiente para recobrir a PLL ou ainda decorre das imperfeições no

recobrimento o que pode deixar exposta na superfície e permitir a sua leitura pelo feixe de infravermelho (TAM et al., 2005, TAM et al.,2011). Talvez algumas opções como um tempo maior do revestimento ou uma concentração maior do alginato possam ser testadas para melhorar esse último revestimento.

Em outro momento, foi realizado um estudo *in vitro* durante 28 dias para avaliar a viabilidade celular e a liberação da enzima IDUA. Nas MC-APA ocorre a diminuição da viabilidade ao longo desse período o que implica na diminuição da atividade enzimática. A proliferação das células encapsuladas é limitada pelo espaço das microcápsulas tendo impacto significativo na viabilidade celular e, conseqüentemente, na secreção da enzima. O revestimento também pode estar limitando essas trocas e assim prejudicando a manutenção celular (THAKUR et al., 2010). No entanto, mesmo com a diminuição da atividade a mesma é produzida de forma eficiente após 28 dias de microencapsulação das células rBHK. As MC-A demonstraram instabilidade *in vitro*, uma vez que as células extravasaram para o meio, não sendo possível continuar o estudo com essas.

Em relação ao tratamento feito através da via subcutânea, após 30 dias foi possível detectar uma atividade enzimática elevada na pele do local do implante indicando que a enzima continuou sendo produzida e liberada pelas microcápsulas. A liberação da enzima foi apenas localizada não atingindo a circulação, isso pode estar relacionado com a neovascularização do sítio do implante que pode estar prejudicando a captação da enzima (VERITER; GIANELLO; DUFRANE, 2013) .

Nas análises histológicas da microcápsulas após o tratamento foi evidenciado a presença de uma resposta inflamatória em torno da superfície capsular e poucos vasos sanguíneos nas proximidades. Apesar do infiltrado inflamatório, não houve grandes perdas celulares no interior das cápsulas, pois as mesmas continuavam a produzir a enzima após o tratamento. Esse tipo de resposta é comum para esse tipo de sistema, é geralmente desencadeada pelo procedimento cirúrgico e pelo biomaterial utilizado (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008).

Nesse trabalho escolhemos usar um alginato ultra puro a fim de minimizar a resposta imune, no entanto, mesmo assim, ele pode conter algumas impurezas residuais (MENARD et al., 2009). Outro fator que pode ativar o sistema imune é a composição da superfície desse sistema, como observado nesse trabalho, o último revestimento com alginato parece ter imperfeições e ser pouco eficiente para recobrir a PLL podendo deixar expostas algumas cargas positivas as quais são imunogênicas. Além disso, esse sistema pode sofrer indesejadas alterações físico-químicas *in vivo* o que pode desencadear um processo inflamatório (DE VOS et al., 2012).

## Referências

- ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**, v. 20, n. 2, p. 86–100, 2008.
- BALDO, G. et al. Recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase correct enzyme deficiency in human mucopolysaccharidosis type I cells. **Cells Tissues Organs**, v. 195, n. 4, p. 323–329, 2012a.
- BALDO, G. et al. Intraperitoneal implant of recombinant encapsulated cells overexpressing alpha- L -iduronidase partially corrects visceral pathology in mucopolysaccharidosis type I mice. **Cytherapy**, v. 14, p. 860–867, 2012b.
- BAS, D.; BOYACI, H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 836–845, 2007.
- BHUJBAL, S. V et al. Factors in influencing the mechanical stability of alginate beads applicable for immunoisolation of mammalian cells. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 37, p. 196–208, 2014.
- CONFORTO, E. et al. An optimized methodology to analyze biopolymer capsules by environmental scanning electron microscopy. **Materials Science and Engineering C**, v. 47, p. 357–366, 2015.
- DE HAAN, B. J. et al. Structural surface changes and inflammatory responses against alginate-based microcapsules after exposure to human peritoneal fluid. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 98 , n. 3, p. 394–403, 2011.
- DE VOS, P. et al. The association between *in vivo* physicochemical changes and inflammatory responses against alginate based microcapsules. **Biomaterials**, v. 33, n. 22, p. 5552–5559, 2012.
- GRYSHKOV, O. et al. Encapsulating Non-Human Primate Multipotent Stromal

Cells in Alginate via High Voltage for Cell-Based Therapies and Cryopreservation. **PLOS One**, v. 9, n. 9, p. 1–12, 2014.

LAGRANHA, V. L. et al. Treatment of MPS I mice with microencapsulated cells overexpressing IDUA: effect of the prednisolone administration. **Journal of microencapsulation**, v. 30, n. 4, p. 383–389, 2013.

LEAL-EGAÑA, A. et al. Determination of pore size distribution at the cell-hydrogel interface. **Journal of nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 24, 2011.

MA, Y. et al. Modeling and optimization of membrane preparation conditions of the alginate-based microcapsules with response surface methodology. **Journal of Biomedical Materials Research A**, p. 989–998, 2012a.

MA, Y. et al. Investigation of alginate – e -poly- L -lysine microcapsules for cell microencapsulation. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 101, n. 5, p. 1265–1273, 2012b.

MANOJLOVIC, V. et al. Immobilization of cells by electrostatic droplet generation: A model system for potential application in medicine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 2, p. 163–171, 2006.

MATTE, U. et al. Cell microencapsulation: a potential tool for the treatment of neuronopathic lysosomal storage diseases. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 34, p. 983–990, 2011.

MENARD, M. et al. Role of Protein Contaminants in the Immunogenicity of Alginates. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v. 93, p. 333–340, 2009.

MOHANTY, S. et al. Impact of alginate concentration on the viability , cryostorage , and angiogenic activity of encapsulated fibroblasts. **Materials Science & Engineering C**, v. 65, p. 269–277, 2016.

PONCELET, D. et al. Formation of Microgel Beads by Electric Dispersion of Polymer Solutions. **American Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 9, p. 2018–2023, 1999.

PRUSSE, U. et al. Comparison of different technologies for alginate beads production. **Chemical Papers**, v. 62, n. 4, p. 364–374, 2008.

ROKSTAD, A. M. et al. Alginate microbeads are complement compatible, in contrast to polycation containing microcapsules, as revealed in a human whole blood model. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2566–2578, 2011.

TAM, S. K. et al. Physicochemical model of alginate-poly-L-lysine microcapsules defined at the micrometric/nanometric scale using ATR-FTIR, XPS, and ToF-SIMS.

**Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6950–6961, 2005.

TAM, S. K. et al. Biocompatibility and physicochemical characteristics of alginate-polycation microcapsules. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 4, p. 1683–1692, 2011.

THAKUR, A. et al. Characterization of viability and proliferation of alginate-poly- L - lysine – alginate encapsulated myoblasts using flow cytometry. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v. 94, n. 2, p. 296–304, 2010.

VERITER, S.; GIANELLO, P.; DUFRANE, D. Bioengineered sites for islet cell transplantation. **Current diabetes reports**, v. 13, n. 5, p. 745–755, 2013.



## **CONCLUSÕES**

---



- As microcápsulas de alginato obtidas pela técnica de extrusão eletrostática foram otimizadas usando do desenho experimental Box-Behnken no qual foi possível identificar os principais fatores (voltagem e concentração de alginato) que influenciam na liberação da enzima e no tamanho das microcápsulas.
- Após a otimização, foram obtidas microcápsulas de alginato com tamanho reduzido, monodispersas, esféricas e com boa permeabilidade para a liberação da enzima IDUA após a encapsulação.
- O revestimento das microcápsulas de alginato não alterou o diâmetro, porém aumentou a estabilidade e modulou a permeabilidade.
- A caracterização da superfície das MC-APA por FTIR-ATR evidenciou a co-presença da PLL e do alginato.
- As MC-APA apresentaram uma adequada liberação de IDUA *in vitro* ao longo de 28 dias após a microencapsulação.
- As células microencapsuladas implantadas na via subcutânea de camundongos MPS I foram capazes de produzir e liberar a enzima no local do implante, uma vez que após 30 dias de tratamento a atividade de IDUA estava elevada na pele. No entanto, não foram capazes de corrigir a deficiência da enzima no coração, rim e fígado nas condições avaliadas.
- As microcápsulas retiradas dos animais após o tratamento permaneceram intactas, sem alteração na morfologia e mantiveram as células viáveis com adequada liberação da enzima.
- A análise histológica das MC-APA retiradas dos animais após o tratamento mostrou a presença de raros vasos sanguíneos nas proximidades das cápsulas, bem como uma resposta imune evidenciada por um infiltrado inflamatório na superfície.
- Os resultados acima descritos demonstram que as MC-APA tem potencialidade para o tratamento local da MPS I.