

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
E BIOLOGIA MOLECULAR**

**OTIMIZAÇÃO DA LIBERAÇÃO E CAPTAÇÃO DE ENZIMAS
LISOSSOMICAS SUPEREXPRESSAS POR CÉLULAS
RECOMBINANTES MICROENCAPSULADAS**

Valeska Lizzi Lagranha

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

**Orientador: Dr. Roberto Giugliani
Co-Orientadora: Dra. Ursula da Silveira Matte**

Porto Alegre, abril de 2012.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Terapia Gênica, localizado no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA-UFRGS), com recursos financeiros provenientes do CNPq e FINE-HCPA.

Dedico esta tese ao meu pai, *in memoriam*, por ter me proporcionado o estudo. Por ter me ensinado que um dos valores mais importante na vida é o conhecimento. Sempre se dedicou para poder proporcionar aos filhos estudo de qualidade. Nos fins de semana “tomava a matéria”, mesmo que sempre do mesmo jeito e do mesmo conteúdo, mas que de alguma forma fazia com que eu, mesmo criança tivesse vontade de aprender cada vez mais para poder impressioná-lo sempre. Certamente ele acreditava que eu chegaria até aqui. E cheguei! Uma conquista pessoal se realiza com essa tese e com certeza hoje eu o impressionaria ainda mais!

Dedico também a minha mãe, que por muitas vezes foi mãe e pai. Que batalhou após a morte de meu pai, para seguir dando estudo aos filhos. Que se privou de muitas coisas para eu pudesse sair de casa, me graduar e chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar registrado aqui, os meus agradecimentos, a todos aqueles que de alguma forma colaboraram com o desenvolvimento desta tese, seja diretamente ou indiretamente. Obrigada a todos!

Um agradecimento especial ao Dr. Roberto Giugliani, meu orientador, pelas oportunidades oferecidas, confiança e atenção. E também à Dra Ursula Matte, minha co-orientadora, pela amizade, confiança, discussões científicas e paciência. Mesmo com tanto orientandos terminando seus trabalhos juntos, conseguiu tempo para auxiliar a todos! Obrigada!

Aos professores do PPGBM pelos conhecimentos repassados durante este período. E é claro, ao Elmo, por sua paciência, e por sempre estar dispostos a ajudar, até mesmo por “*chat*” no gmail.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de doutorado e apoio à pesquisa.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela infra-estrutura essencial ao desenvolvimento deste trabalho, principalmente aos laboratórios do Centro de Pesquisas Experimental, do Serviço de Genética Médica e da Unidade de Experimentação Animal.

A todos os colegas do Centro de Terapia Gênica pelo carinho, conversas, companheirismo, “terapias em grupo” e rodas de chimarrão. E principalmente pela amizade que fizeram de todos vocês um pouco da minha família aqui.

Á minha ex-bolsista de IC e hoje mestre (que orgulho) Talita Giacomet de Carvalho pela continuidade na ajuda nos trabalhos e no manejo com os animais.

Aos amigos da Academia Kyokushin pelos momentos de descontração e “desestresse”.

Ao meu ‘namorado’ Cristian Malcorra, pelo companheirismo, amor, amizade, parceria, cumplicidade, paciência... E também, é claro, pelas corridas, pedaladas e paciência nessa etapa final do doutorado! Você é muito especial e me faz mais feliz a cada dia que passa!

A toda minha família. Aos meus sobrinhos, irmãos e em especial à minha mãe Loiri Lizzi Lagranha, pelo apoio incondicional, carinho e por compreender minha ausência durante esse período. Amo vocês!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO	X
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 DOENÇAS LISOSSÔMICAS	14
1.2 MICROENCAPSULAÇÃO CELULAR	17
1.2.1 Biomateriais utilizados na Microencapsulação.....	18
1.2.2 Alginato.....	20
Propriedades: Estabilidade, permeabilidade e viscosidade.....	21
Diferentes íons e coberturas	22
1.2.3 Tipos celulares utilizados na microencapsulação	23
As células-tronco mesenquimais	24
1.3 CÉLULAS RECOMBINANTES MICROENCAPSULADAS E DL.....	25
1.4 REGULAÇÃO DOS RECEPTORES DE MANOSE-6-FOSFATO NO TRATAMENTO DE DL	30
2. OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GERAL.....	32
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
2.2.1 Aperfeiçoamento das microcápsulas.....	32
2.2.1 Regulação da captação enzimática.....	32
3. ARTIGOS	34
3.1 ENCAPSULATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS REDUCES IMMUNE RESPONSE AGAINST A BIOMATERIAL <i>IN VIVO</i>	34
3.2 TREATMENT OF MPS I MICE WITH MICROENCAPSULATED CELLS OVEREXPRESSING IDUA: EFFECT OF THE PREDNISOLONE ADMINISTRATION.....	47
3.3 UP-REGULATION OF MANNOSE 6-PHOSPHATE RECEPTORS IN FIBROBLASTS TREATED WITH CONDITIONED MEDIUM FROM BHK CELLS OVEREXPRESSING ARYLSULFATASE A.....	63
4. RESULTADOS ADICIONAIS.....	78
4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS MICROCÁPSULAS.....	79
4.2 IMPLANTE DAS MICROCÁPSULAS DE APA EM CAMUNDONGOS MPS I.....	80
5. DISCUSSÃO	83
6. CONCLUSÕES	93
7. REFERENCIAS	94
9. ANEXOS	107
9.1 CÉLULAS MICROENCAPSULADAS EM ALGINATO DE CÁLCIO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS IN VITRO E IN VIVO	107
9.2 CELL MICROENCAPSULATION: A POTENTIAL TOOL FOR THE TREATMENT OF NEURONOPATHIC LYSOSOMAL STORAGE DISEASES.....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo das estratégias usadas para a microencapsulação celular em relação ao tratamento das DL.....	27
Tabela 2. Atividade de ARSA em fibroblastos LDM tratados com BHK ^{ARSA} encapsulas, sobrenadante e cápsulas vazias.....	30
Tabela 3. Porcentagem de imperfeições morfológicas encontradas nas microcápsulas de alginato e APA.....	79
Tabela 4. Comparação entre dois tipos cápsulas de alginato implantadas na cavidade peritoneal de camundongos MPS I.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Secção transversal esquemática do mecanismo de microencapsulação celular.....	17
Figura 2. Geleificação do alginato e formação da estrutura “egg box”.....	20
Figura 3. Modelo da estrutura da rede e porosidade de hidrogéis obtidos de diferentes composições de alginatos.....	22
Figura 4. Tráfego de enzimas lisossomais após encapsulação celular.....	26
Figura 5. Aspecto geral das células microencapsuladas.....	79
Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura nas cápsulas de alginato.....	80
Figura 7. Atividade de IDUA no soro dos camundongos MPS I após 7 e 15 dias de implante.....	80
Figura 8. Aspecto das cápsulas implantadas por 15 dias, no momento da retirada da cavidade abdominal de camundongos MPS I.....	81
Figura 9. Infiltrado inflamatório em cápsulas implantadas por 15 dias. A. Cápsula de alginato.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ANGII: Angiotensina II
APA: Alginato-(Poli-L-Lisina)-Alginato
AR: Ácido Retinóico
ARSA: Arilsulfatase A
BHE: Barreira Hemato-Encefálica
BHK: *'Baby Hamster Kidney'*
BHK^{ARSA}: Células BHK superexpressando Arilsulfatase A
BHK^{IDUA}: Células BHK superexpressando Alfa-L-Iduronidase
cDNA: DNA codificante
CHO: *Chinese Hamster Ovary*
CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNTF: *Ciliary Neurotrophic Factor* (Fator Neurotrófico Ciliar)
CTM: Células-Tronco Mesenquimais
DL: Doença Lisossômica
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA: Ácido Desoxirribonucléico
EAH: Epitelial Amniótica Humanas
EDTA: *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*
ERT: *Enzyme Replacement Therapy*
FD: *Fabry Disease* (Doença de Fabry)
FIPE: Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos
G: α -L-gulurônico
GAG: Glicosaminoglicano
GAPDH: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
GUSB: β -glucuronidase
HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE: Hematoxilina – eosina
HepG2: Células de Hepatocarcinoma Humano
hGH: hormônio do crescimento humano
IDUA: Alfa-L-Iduronidase
IGFII: *Insulin-like Growth Factor II*
IGF-IIR: *Insulin-like Growth Factor II Receptor*
IgG: Imunoglobulina G
KDa: Quilodaltos

LD: *Lysosomal Disease*
LDM: Leucodistrofia Metacromática
LPS: Lipopolissacarídeo
M: β -D-manurônico
M6P: Mannose 6-phosphate (manose 6-fosfato)
M6PR: *Mannose 6-Phosphate Receptor* (Receptores de Manose 6-Fosfato)
MDCK: *Madin-Darby Canine Kidney*
MLD: *Metachromatic Leukodystrophy*
MPS: Mucopolissacaridose
mRNA: RNA mensageiro
MSC: *Mesenchymal Stem Cells*
pb: Pares de base
PBS: *Phosphate Buffered Saline*
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
pH: Potencial Hidrogeniônico
PLGA: *Poli-Lactic co-Glycolic Acid*
PLL: Poli-L-Lisina
PLO: Poli-L-Ornitina
rBHK: *Baby Hamster Kidney* recombinante
RNA: Ácido Ribonucléico
RT-qPCR: *Real Time quantitative PCR* (PCR em Tempo Real Quantitativo)
SNC: Sistema Nervoso Central
TCTH: Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas
TG: Terapia Gênica
TGF β : *Transforming Growth Factor β*
TGN: *trans-Golgi network*
THSC: *Transplantation of Hematopoietic Stem Cells*
TNF α : *Tumor Necrosis Factor alpha* (Fator de Necrose Tumoral)
TRE: Terapia de Reposição Enzimática
UP LVG: *Ultra Pure Low Viscosity Guluronic*
VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

RESUMO

As doenças lisossômicas (DL) são um grupo de doenças herdadas geneticamente e que são causadas por um defeito parcial ou total de enzimas envolvidas na degradação de macromoléculas dentro dos lisossomos. Terapias para aumentar os níveis de enzima nas DL incluem o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) e terapia de reposição enzimática (TRE). Esses tratamentos são todos baseados na propriedade das enzimas lisossomais de serem secretadas e captadas pelas células vizinhas através do receptor de manose-6-fosfato (M6PR). Novas abordagens terapêuticas vêm sendo investigadas, uma vez que as terapias atuais possuem limitações. A microencapsulação de células geneticamente modificadas superexpressando um produto terapêutico e o aperfeiçoamento na captação de enzimas lisossomais, via M6PR, parecem ser estratégias promissoras.

Neste trabalho objetivamos aperfeiçoar o sistema de liberação de enzimas lisossomais superexpressas por células recombinantes microencapsuladas para o tratamento das DL. Para isso, estudos de biocompatibilidade *in vivo* foram avaliados com distintos tipos celulares (BHK e HepG2), concentrações de alginato (1 e 1,5%), tempos (7 e 21 dias) e sítios de implante (cavidade peritoneal, tecido subcutâneo e músculo vasto-medial) em ratos Wistar. A resposta inflamatória foi caracterizada e células-tronco mesenquimais (CTM) foram encapsuladas e implantadas em ratos para avaliar se o seu efeito imunomodulador poderia diminuí-la. Posteriormente o efeito antiinflamatório da prednisolona foi avaliado em camundongos normais e MPS I tratados com células BHK superexpressando IDUA (BHK^{IDUA}) encapsuladas e implantadas na cavidade intraperitoneal por 15 dias. A liberação da enzima após implante foi avaliada por meio da recuperação das cápsulas e cultivo das mesmas por 24h e medida de IDUA no meio. Observamos que as microcapsulas *in vivo* provocam uma reação do tipo corpo estranho, em todos os parâmetros avaliados. Essa reação se dá por presença de fibrose e infiltrado inflamatório e diminui aos 21 dias. O uso de CTM encapsuladas melhorou esse aspecto, uma vez que a resposta foi menor em ratos nos quais esse tipo celular foi implantado, devido ao efeito imunomodulador dessas células. O tratamento com antiinflamatório prednisolona também diminuiu a resposta inflamatória gerada contra as microcápsulas implantadas na cavidade peritoneal de camundongos normais e MPS I. As células encapsuladas permaneceram viáveis após os 15 dias de implante. A liberação de enzima para o meio extra-

capsular é maior nas cápsulas recuperadas de animais tratados com prednisolona. Níveis de atividade de IDUA circulante passaram de indetectáveis para 2,4 nmol/h/mL de soro nos animais MPS I tratados.

Outra estratégia utilizada foi a superexpressão de M6PR para melhorar a captação enzimática. Avaliamos os níveis de M6PR em fibroblastos de pacientes com Leucodistrofia Metacromática (LDM) e normais após o tratamento com o sobrenadante de células BHK superexpressando ARSA (BHK^{ARSA}), por imunocitoquímica e PCR em Tempo Real. Finalmente foi avaliado se o pré-tratamento de fibroblastos MPS I com o sobrenadante de BHK^{ARSA} e posterior tratamento com o sobrenadante de BHK^{IDUA} melhorava a captação de IDUA nessas células devido ao aumento na expressão dos M6PR. O tratamento com o sobrenadante de células BHK^{ARSA} levou a um aumento na expressão, em cerca de 2 vezes, dos M6PR em fibroblastos de pacientes com LDM e de indivíduos normais. O pré-tratamento com o sobrenadante de células BHK^{ARSA} também levou a um aumento de 2 vezes na expressão dos M6PR e aumentou a captação de IDUA por fibroblastos de pacientes com MPS I.

Juntos esses resultados sugerem que as células microencapsuladas podem ser uma boa estratégia para a entrega de produtos terapêuticos desde que sua biocompatibilidade seja melhorada e que a partir da descoberta dos mecanismos que levam à superexpressão dos M6PR, o sobrenadante de BHK^{ARSA} poderá ser usado como adjuvante no tratamento com TRE ou células encapsuladas.

ABSTRACT

Lysosomal Diseases (LD) are a group of genetically inherited diseases, caused by total or partial failure of enzymes involved in the degradation of macromolecules in lysosomes. Therapies to increase enzyme levels in LD include transplantation of hematopoietic stem cells (THSC) and enzyme replacement therapy (ERT). These treatments are based on the properties of lysosomal enzymes to be secreted and uptaken by neighboring cells through the mannose 6-phosphate receptor (M6PR). Since current therapies have limitations, new therapeutic approaches are under investigation. Microencapsulation of genetically modified cells overexpressing therapeutic products and the improvement in the uptake of lysosomal enzymes via M6PR seem to be promising strategies.

In this work, we aimed to improve the delivery system of lysosomal enzymes overexpressed by microencapsulated recombinant cells for LD treatment. In vivo biocompatibility was evaluated using distinct cell lines (BHK and HepG2), alginate concentrations (1 and 1.5%), duration (7 and 21 days), and implant sites (peritoneal, subcutaneous and in the vastus medialis muscle) in Wistar rats. Inflammatory response was observed and characterized. Then we used encapsulated mesenchymal stem cells (MSC) to evaluate whether their immunomodulatory effect could decrease this response in rats. Subsequently, the anti-inflammatory effect of prednisolone was evaluated in normal and MPSI mice, both treated with encapsulated BHK cells overexpressing IDUA (BHKIDUA) and implanted in intraperitoneal cavity for 15 days. The enzyme release to the extra-capsular medium was measured in recovered capsules after 24h culture. The in vivo biocompatibility of microcapsules is a typical foreign body reaction in all parameters evaluated. This reaction occurs due to fibrosis and inflammatory infiltrate formation, but decreases after 21 days. The use of encapsulated MSC improved this aspect, since the response was milder in rats that received this cell type, due to the immunomodulatory effect of MSC. Treatment with prednisolone also decreased the response generated against alginate microcapsules implanted in the peritoneal cavity of both normal and MPS I mice. The encapsulated cells remained viable 15 days after the implant. The enzyme release to the extra-capsular medium was higher in capsules recovered from prednisolone treated animals. Circulating levels of IDUA increased from undetectable to 2.4 nmol/h/mL of serum.

Another strategy evaluated by our group was the up regulation of M6PR to enhance enzyme uptake. We evaluated M6PR levels in MLD and normal fibroblasts after treatment with the conditioned medium from cells overexpressing ARSA (BHK^{ARSA}), by immunocytochemistry and real time PCR. Finally we verified if pre-treatment of MPS I fibroblasts with BHKARSA followed by treatment with conditioned medium of BHK^{IDUA} improved IDUA uptake. MLD and normal fibroblasts treated with BHK^{ARSA} had a 2-fold increase in M6PR expression. Pre-treatment with BHKARSA and after with BHK^{IDUA} also led to a 2-fold increase in the expression of M6PR, and IDUA uptake was improved in these cells.

Together these results suggest that microencapsulated cells may be an interesting strategy for delivery of therapeutic products as long as its biocompatibility is improved. Once the mechanism leading to M6PR over expression is defined, the conditioned medium of BHK^{ARSA} could be used as an adjuvant in ERT or with encapsulated cells.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Lisossômicas

O lisossomo é uma organela caracterizada por conter hidrolases ácidas essenciais para a quebra bioquímica de moléculas como os glicosaminoglicanos, oligossacarídeos, esfingolipídeos e outros lipídeos (Heese, 2008).

As doenças lisossômicas (DL) são um grupo de doenças, em sua maior parte autossômica recessiva, herdadas geneticamente e que são causadas por um defeito parcial ou total de enzimas envolvidas na degradação dessas macromoléculas dentro dos lisossomos. Essa deficiência causa um bloqueio no processo catabólico, levando ao contínuo acúmulo do metabólito intermediário. Com o acúmulo destes produtos, o lisossomo aumenta e acaba por ocupar cada vez mais o espaço intracelular interferindo assim na função celular e causando a disfunção de órgãos e sistemas (Vitner et al, 2010).

Muitas das DL são caracterizadas por um curso progressivo com alta morbidade e mortalidade, apesar de haver variações significativas entre as diferentes doenças e até mesmo entre a mesma doença (Walkley 2009). As enzimas lisossomais são distribuídas igualmente, mas o armazenamento do substrato é normalmente restrita às células, tecidos e órgãos com maior *turnover* do mesmo. Além disso, a deficiência da enzima, bem como o acúmulo do substrato primário atrapalha outras vias metabólicas, levando à patologias graves vistas na maioria das DL (Parkinson-Lawrence et al, 2010).

O diagnóstico das DL pode começar por testes simples que auxiliam no processo de investigação (pesquisa de metabólitos acumulados) e prosseguir com testes específicos para um diagnóstico definitivo (ensaios enzimáticos ou moleculares). O diagnóstico bioquímico de certeza das DL se dá pela medida da atividade enzimática, que pode ser realizada em amostras de plasma, leucócitos e/ou cultura de células (Wilcox, 2004), sendo que a escolha do material adequado depende das peculiaridades de cada caso.

Terapias para aumentar os níveis de enzima nas DL incluem o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), terapia de reposição

enzimática (TRE) e terapia gênica. Esses tratamentos são todos baseados na propriedade das enzimas lisossomais de serem secretadas e captadas pelas células vizinhas pela via de manose-6-fosfato (M6P) (Sly et al, 1981). Após a internalização endocítica, as enzimas são transportadas por endossomas para o lisossomo, resultando na quebra do material armazenado (Vitner et al, 2010).

O TCTH teve início em 1980 (Hobbs, 1981). A expectativa de vida é aumentada, e muitas das anormalidades sistêmicas parecem melhorar após o transplante (Hobbs et al, 1981; Hugh Jones et al, 1989; Prasad & Kurtzberg, 2010). No entanto, apesar dos muitos avanços neste tratamento ao longo dos últimos 30 anos, seu uso tem sido preterido em favor da TRE sempre que disponível (Boelens et al, 2010).

Na TRE uma enzima recombinante purificada é administrada via intravenosa semanalmente ou quinzenalmente. Esta estratégia mostrou-se eficaz e foi aprovada para tratar pacientes com doença de Gaucher (Barton et al, 1991), doença de Fabry (Schiffmann et al, 2001), doença de Pompe (van de Hout et al, 2001), Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) (Kakkis et al, 2001), tipo II (Muenzer et al, 2006) e tipo VI (Harmatz et al, 2004). Pacientes tratados com TRE demonstraram benefícios clínicos, mas esta estratégia é limitada pelo alto custo e pelos seus efeitos limitados sobre certas manifestações da doença.

A TRE não é curativa e não pode melhorar todos os órgãos e sistemas no indivíduo quando as alterações irreversíveis já estão estabelecidas, entretanto o tratamento precoce pode prevenir a progressão em alguns aspectos relacionados com a doença melhorando a qualidade de vida dos pacientes. A grande dificuldade da TRE para esta e todas outras desordens similares é a capacidade limitada para tratar patologias esqueléticas e não ser possível reverter às modificações neurológicas causadas pela doença, devido à dificuldade da enzima em transpor a barreira hemato-encefálica (BHE). Além disso, a TRE ainda é uma terapia de alto custo, sendo que os valores gastos anualmente variam de R\$ 150.000,00 a R\$ 300.000,00 por paciente (Souza et al, 2008).

Dickson (2009) relata a TRE intratecal como alternativa para alcançar o sistema nervoso central (SNC). O tratamento via fluido cérebro-espinhal representa uma abordagem em potencial para a entrega da enzima através da

BHE. A eficácia e segurança deste método ainda estão sendo testados em pacientes com MPS I (Muñoz-Rojas et al, 2008)

Apesar da TRE ser a terapêutica atual mais segura, o acesso da enzima ao cérebro ainda parece ser o seu maior desafio, assim como para o TCTH. O fato da administração da enzima ter de ser realizada semanalmente dificulta a adesão por parte dos pacientes ao tratamento, que muitas vezes necessitam se deslocar a grandes distâncias para receber a infusão da enzima (Giugliani et al, 2010).

Uma das abordagens terapêuticas que vêm sendo pesquisadas para as DL é a terapia gênica (TG), pois permite a constante entrega da enzima alvo diretamente nos órgãos alvo. A TG tem por objetivo introduzir 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 (Nardi et al, 2002). É um processo destinado a tratar ou remediar doenças pela modificação genética das células de um paciente. A entrega do gene de interesse é realizada utilizando vetores de expressão, que se dividem em dois grupos principais: os vetores virais e os não-virais.

As DL são consideradas boas candidatas para a TG, já que são desordens causadas por apenas um defeito gênico e não estão sujeitas a regulação por mecanismos complexos. Uma atividade enzimática de cerca de 15-20% do nível normal já pode ser suficiente para a eficácia clínica (Beck, 2010), apesar de que diferentes órgãos podem precisar maiores quantidades de enzima para serem corrigidos (Cotugno et al, 2010).

Entretanto, algumas barreiras ainda devem ser consideradas na elaboração de um protocolo de terapia gênica, principalmente com relação à mutagênese insercional e à resposta imune provocada pelos vetores virais (Nakama et al, 2006; Deichmann et al, 2007; Barcia et al, 2007), e à baixa eficiência de transferência dos vetores não-virais (Matte et al, 2011).

Apesar de ensaios clínicos terem sido realizados com TG para diferentes DL, nenhum deles foi aprovado como um tratamento médico, devido aos efeitos adversos citados anteriormente. Assim sendo, são necessárias alternativas que visem à manutenção da expressão do transgene, bem como vetores com baixa toxicidade e riscos reduzidos. Uma alternativa poderia ser a microencapsulação celular, uma abordagem não-viral para a entrega de

compostos biologicamente ativos, que pode superar esses obstáculos e ser uma estratégia promissora para o tratamento das DL.

1.2 Microencapsulação celular

A tecnologia de encapsulação celular é uma estratégia que visa controlar, localizar e manter a entrega de produtos terapêuticos *in vivo* (Zimmermann et al, 2005). Assim sendo, com o objetivo de eliminar as barreiras enfrentadas pela TG, uma alternativa poderia ser a utilização de células geneticamente modificadas superexpressando um gene de interesse e encapsuladas em esferas semi-permeáveis, prevenindo o contato celular e a resposta imune (Munarin et al, 2010). A imobilização de células dentro de membranas semipermeáveis permite a difusão bi-direcional de nutrientes, oxigênio e produtos biologicamente ativos entre as células isoladas e o ambiente exterior. Assim, estas são protegidas das células do sistema imune e das imunoglobulinas (figura 1) (Orive et al, 2002).

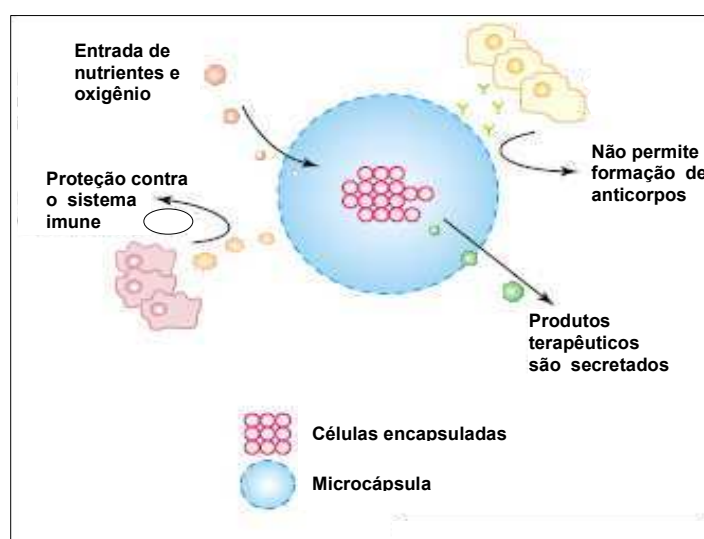


Figura 1. Secção transversal esquemática do mecanismo de microencapsulação celular.

Desde que Chang propôs a microencapsulação como uma alternativa para criar órgãos bio-artificiais há 47 anos (Chang, 1964), muitas tentativas para imobilizar células e outros materiais biológicos em diferentes tipos de cápsulas têm sido realizadas (Orive et al, 2001, Sakai et al, 2010). Uma variedade de polímeros, como quitosanas, poliácridatos, poliaminoácidos e poliamidas têm sido usados para a produção de microcápsulas. O alginato é

um dos polímeros que vem sendo muito utilizado para a encapsulação celular (Orive et al, 2003; Orive et al, 2004; Sakai et al, 2010).

As microcápsulas atualmente representam uma promissora abordagem utilizada preferencialmente no transplante celular e desenvolvimento de órgãos bio-artificiais (Orive et al, 2003), preservação (Mayer et al, 2010) e tratamento do câncer e outras desordens (Uludag et al, 2000; Munarin et al, 2010).

Para o tratamento de desordens mendelianas clássicas, como a hemofilia e as DL, o implante de células encapsuladas funciona como uma estratégia similar à reposição enzimática, como por exemplo, a entrega da β -glucuronidase para o tratamento de MPS VII (Ross et al, 2000) e do hormônio do crescimento para tratar de nanismo (Chang et al, 1999). Além disso, vem sendo usada para a entrega de produtos gênicos que podem modificar o quadro clínico, como por exemplo, a entrega de dopamina e fatores neurotróficos para o tratamento da doença de Parkinson (Chang et al, 1999; Lindvall & Wahlberg, 2008), fatores de crescimento de neurônios para tratar desordens neurodegenerativas (Bloch et al, 2004), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) para infarto do miocárdio (Zhang et al, 2007) e no tratamento de tumores (Visted et al, 2001; Kuijlen et al, 2006).

1.2.1 Biomateriais utilizados na Microencapsulação

A palavra biomaterial é definida como um material compatível com o organismo que pode ser usado para fazer implante, próteses e instrumentos cirúrgicos. O desenvolvimento de biomateriais vai desde metais, ligas e poliéster até os materiais híbridos que associam matérias inertes à vivos (por exemplo, cultura de células). Recentemente, devido à maior acessibilidade do conhecimento e da tecnologia na compreensão de doenças e regeneração de tecidos, pesquisadores têm tido mais oportunidades para o desenvolvimento de inovações baseadas em biomateriais com diferentes tipos celulares, incluindo células-tronco adultas e embrionárias (Santos et al, 2010).

Assim, biomateriais para aplicações médicas específicas, como veículos de entrega de micro ou nanodrogas (Ferrari, 2005), materiais que respondem fisiologicamente aos estímulos internos (Zisch et al, 2003) ou estímulos

externos (Stayton et al 1995), materiais para cirurgia minimamente invasiva e materiais avançados para a engenharia de tecidos podem ser rapidamente criados (Bellin et al, 2006).

Neste contexto, a encapsulação celular ganhou um grande interesse no campo da área farmacológica e médica. Mas uma das questões a se resolver é a escolha do material adequado. Essa escolha deverá levar em conta a estabilidade e biocompatibilidade dos polímeros empregados. Além disso, deve preservar a viabilidade e funcionalidade das células e o tamanho dos poros deve permitir a difusão passiva do produto secretado (Orive et al, 2002).

Os hidrogéis oferecem características que tornam o seu uso atraente. Sua natureza hidrofílica representa uma característica biocompatível (Schimidt et al, 2008). Além disso, os hidrogéis imitam matrizes extracelulares e fornecem um número de vantagens para a microencapsulação (Rowley et al, 1999; Mann et al, 2001; de Vos et al, 2006; Weber et al, 2007). Outros polímeros naturais e sintéticos usados na microencapsulação incluem o alginato (Orive et al, 2006), quitosanas (Zielinski et al, 1994), agarose (Sakai et al, 2005), ácido hialurônico (Khademhosseini et al, 2006) e metacrilato (HEMA) (Mokry et al, 2000). Os biomateriais naturais normalmente demonstram uma melhor biocompatibilidade, enquanto os sintéticos têm uma composição mais reprodutível.

Quitosanas são polissacarídeos biodegradáveis derivados da deacetilação de quitinas e são amplamente usadas com o “scaffold” em cultura celular em combinação com o ácido poliglicólico (Griffon et al, 2005; Gan e Wang 2007). Ao contrário do alginato, a quitosana e o ácido hialurônico são degradados por enzimas endógenas e isto limita seu uso na imunoinibição de células heterólogas.

Outros materiais usados para a microencapsulação celular são as fibras ocas (hollow fibers) que são usualmente feitas com poliácridonitrilo vinil cloride ou polietersulfona. Esta estratégia é geralmente usada em combinação com qualquer outro material que permaneça na interface entre as células e fibras (Chang et al, 1999, Bloch et al, 2004).

1.2.2 Alginato

O alginato é o biomaterial mais amplamente usado no campo da microencapsulação celular. Isso se deve principalmente à sua excelente capacidade de formar géis e biocompatibilidade *in vivo*. A encapsulação pode ser realizada em ambiente asséptico, em temperatura ambiente, em pH fisiológico e com uso de soluções isotônicas (Schmidt et al, 2008). Somado a isso, as matrizes obtidas a partir deste biomaterial mostram boas propriedades mecânicas e de alta porosidade, tornando-o um excelente material.

Os alginatos são polissacarídeos aniônicos ramificados extraídos de algas marrons (*Phaeophyta*), constituindo cerca de 20-40% do peso seco dessas algas (Orive et al, 2006). Quimicamente são compostos de copolímeros em bloco linear de ácidos β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G), onde a composição e arranjo seqüencial dos dois resíduos depende da fonte de onde eles foram isolados. Esses monômeros formam estruturas de homopolímero (GG e MM) e heteropolímero (GM ou MG) ao longo das cadeias que se associam com cátions bivalentes para criar os hidrogéis.

O modelo mais conhecido de ligação é o chamado “egg box” (Braccini et al, 2001; Sikorski et al, 2007), nas quais os resíduos G criam uma cavidade que constituem o sítio de ligação para formar a junção das cadeias (figura 2). Até pouco tempo, a capacidade de se ligar com cátions bivalentes era relacionada exclusivamente para moléculas G, no entanto, estudos recentes demonstraram semelhanças entre blocos M e G (Donati et al, 2005).

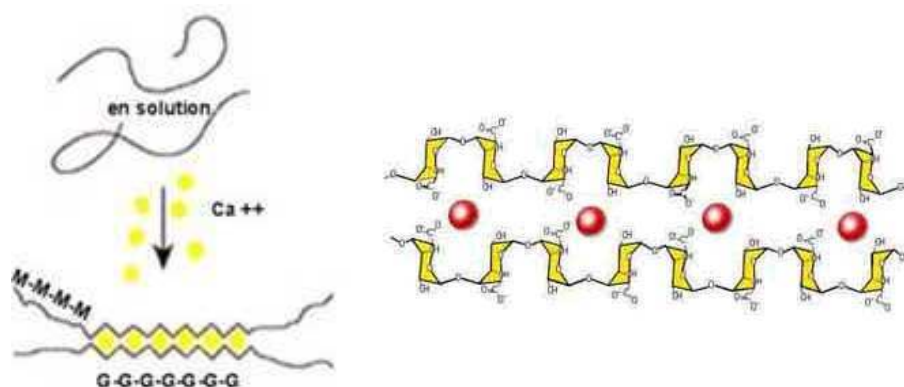


Figura 2. Geleificação do alginato e formação da estrutura “egg box”.

Propriedades: Estabilidade, permeabilidade e viscosidade

As propriedades dos géis são regidas por diversos parâmetros, incluindo a composição, o processo de purificação, a viscosidade da solução, o cátion empregado para a formação das cadeias e do polícatión usado para revestir as cápsulas. Além disso, os fatores adicionais como pH, temperatura, presença de seqüestro de íons (como EDTA ou citrato) na solução de geleificação, bem como o método de microencapsulação podem influenciar nas propriedades do material, e devem ser criticamente avaliados.

A estabilidade mecânica é crucial para proteger as células transplantadas, garantindo uma eficácia terapêutica por longos períodos de tempo. Se há ruptura da cápsula as células são expostas e apresentadas ao sistema imunológico, levando à falha do sistema. Além disso, já foi descrito que a rigidez dos hidrogéis pode ter influência sobre a morfologia e regulação das atividades celulares, como a proliferação e apoptose (Schmidt et al, 2008; Rowley et al, 2002; Genes et al, 2004; Friedland et al, 2009).

Alguns parâmetros como estabilidade mecânica, permeabilidade, diâmetro da cápsula e taxa de degradação do biomaterial são cruciais para o sucesso da terapia. O processo de geleificação é baseado na afinidade dos alginatos aos íons bivalentes e à capacidade de se ligar a esses de maneira seletiva e cooperativa. Em geral, alginatos com alto teor de G são mais estáveis e apresentam maior permeabilidade do que aqueles com alto teor de M (Drury et al, 2004). Isso se deve principalmente ao fato de que o comprimento dos blocos-G são os responsáveis pela ligação cruzada que ocorre com os cátions bivalentes. Por outro lado, resíduos de M são conhecidos por oferecer elasticidade para o gel. Já foi demonstrado que a rigidez das cadeias aumenta conforme a seguir: $MG < MM < GG$ (Martinsen et al, 1991; Strand et al, 2003). Como resultado, géis com alto conteúdo G possuem blocos-G longos e curtos segmentos elásticos produzindo uma rede dura e aberta, enquanto alginatos com alto teor de M tornam-se mais dinâmicos devido a seus longos segmentos elásticos (figura 3).

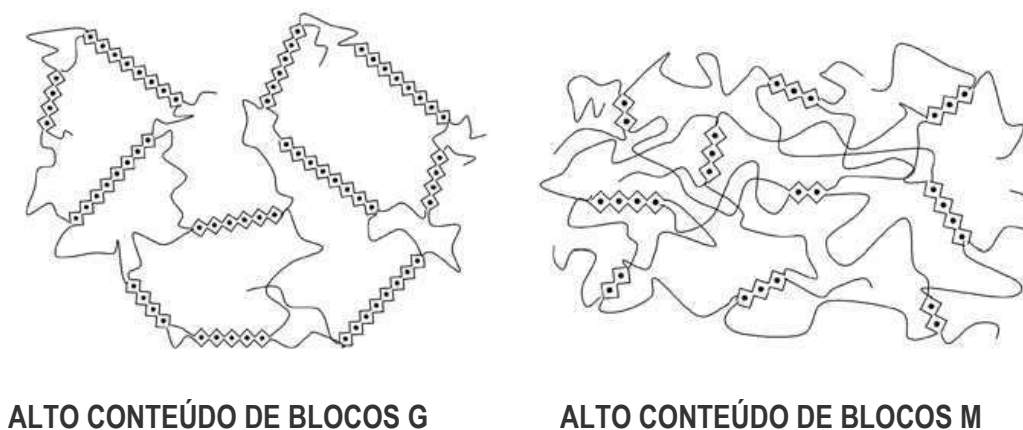


Figura 3. Modelo da estrutura da rede e porosidade de hidrogéis obtidos de diferentes composições de alginatos (Santos et al, 2010).

A viscosidade da solução depende do comprimento das cadeias, concentração e da pureza. Quanto mais longas as cadeias, maior será a viscosidade. Assim, soluções de baixa viscosidade produzem géis fracos e com pouca estabilidade, enquanto soluções muito viscosas podem formar géis mais fortes e prejudiciais para as células.

Fatores relacionados com o processo de purificação do alginato devem ser levados em conta. Inicialmente no processo de purificação existem alguns passos que provavelmente removem as cadeias menores, aumentando a viscosidade do alginato. Por outro lado, as impurezas do polímero podem atuar dificultando as interações inter-cadeias e seu arranjo tridimensional (Dusseault et al, 2006).

Diferentes íons e coberturas

A afinidade do alginato para os íons bivalentes demonstra ser aumentada seguindo a ordem: $Mn < Co < Zn < Cd < Ni < Cu < Pb < Ca < Sr < Ba$ (Draget et al, 1997). No entanto, muitos deles não podem ser usados para aplicação terapêutica. Na prática os mais comumente utilizados são Ca^{2+} e Ba^{2+} , e dentre estes o cálcio é o mais comum (Santos et al, 2010) devido às suas qualidades fisiológicas e biocompatibilidade que proporcionam uma boa viabilidade para as células imobilizadas.

Outra possibilidade é a utilização de bário em vez de cálcio. Íons Ba^{2+} apresentam maior afinidade ao alginato garantindo melhor estabilidade e mecânica em longo prazo (Omer et al, 2003a; Benzoni et al, 2005; Darrabie et al, 2006). O bário forma géis mais fortes, com diâmetro reduzido e menor permeabilidade. No entanto, apesar das vantagens mencionadas, o Ba^{2+} pode ser tóxico para as células. Tem sido relatado que este íon inibe os canais de potássio nas membranas celulares em concentrações superiores a 5-10mM (Zimmermann et al, 2000) quando a ligação cruzada durar mais que 15 minutos. Além disso, para o se alcançar uma boa permeabilidade a ponto de impedir a entrada de IgGs para dentro da mesma é necessário deixar a cápsula num tempo maior que 15 minutos (Zimmermann et al, 2007), aumentando o risco de toxicidade e o desempenho do sistema pode ficar comprometido.

A fim de aumentar a estabilidade mecânica e induzir a restrição da permeabilidade das microcápsulas, a mesma pode ser recoberta com uma camada de polication após a sua formação. No entanto, a carga positiva dos polications pode resultar em maior imunogenicidade, neste caso deve-se recobri-la novamente com uma fina camada de alginato. Muitos estudos empregam o alginato em combinação com outros materiais, como a poli-L-lisina para a formação das cápsulas (Ross et al 2000; Barsoum et al, 2003; Friso et al, 2005).

Uma questão muito discutida é a escolha do polication que recobrirá a microcápsula. Polications como poli-L-lisina (PLL) (Wang et al, 2006), poli-L-ornitina (PLO) (Thanos et al, 2007), quitonasa (Baruch et al, 2006), oligoquitosan (Orive et al, 2005) e biomateriais fotopolimerizadores (Baroli, 2006) têm sido usados. No entanto, a seleção do material mais adequado ainda é uma questão controversa.

1.2.3 Tipos celulares utilizados na microencapsulação

Para a encapsulação celular existe uma série de propriedades necessárias que as células devem apresentar para que possam fornecer os produtos gênicos terapêuticos com eficácia. Tais propriedades são: bom potencial proliferativo para a modificação genética *in vitro*, a capacidade de produzir e secretar o produto do transgene e a capacidade de manter a

expressão do transgene estável após a encapsulação (Chang, 1999). Essas células também devem ser capazes de uma diferenciação terminal (Peirone et al, 1998), interrompendo o ciclo celular e a proliferação contínua. É necessário ainda que o transgene expresso seja funcional, por exemplo, adequadamente glicosilada.

Células “baby hamster kidney” (BHK), por exemplo, embora tenha um ciclo celular muito ativo, ao sintetizar enzimas lisossômicas, possuem os mesmos padrões de glicosilação que fibroblastos humanos (Stein et al, 1989). Eficiente fosforilação também foi relatada nestas células (Matzner et al, 2005), bem como para células “chinese hamster ovary” (CHO).

Outro tipo de células utilizadas na microencapsulação são as células epiteliais amnióticas humanas (EAH). Estas não expressam o complexo de histocompatibilidade classe II e expressam pouco o antígeno de classe I em sua superfície, resultando em não rejeição aguda após alo-transplante (Nakama et al, 2006). Células EAH têm outras características como a produção e secreção de vários neurotransmissores e fatores neurotróficos, que poderiam ser úteis no tratamento de doenças que afetam o SNC.

Apesar de alguns estudos sobre a entrega de produtos recombinantes utilizando fibroblastos terem sido bem sucedidos, estas células não são ideais para a sobrevivência em longo prazo (Chang, 1999). Em contraste, os mioblastos (C2C12) são proliferativamente ativos podendo ser transfectados com maior facilidade *in vitro*. Mas também são capazes de se diferenciar terminalmente em miotubos, contornando o problema da proliferação contínua e conseqüentemente a superlotação dentro das cápsulas (Chang, 1999; Murua et al, 2010).

As células-tronco mesenquimais

Células-tronco mesenquimais (CTM) são atualmente fortes candidatas para terapia celular. Estas células são facilmente isoladas da medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical entre outros. As CTM têm a habilidade de autorenovação e multipotencialidade, e podem se diferenciar em muitos tecidos derivados da mesoderme como adipócitos, osteócitos, condrócitos, hepatócitos, células musculares, células epiteliais, etc (Seong et al, 2010). Mais

importante, no entanto, é que as CTM possuem propriedades imunomodulatórias que as fazem atrativas para o tratamento de doenças inflamatórias.

Pesquisadores encontraram que essas células imuno-regulam direta e indiretamente os linfócitos T citotóxicos (Duffy et al, 2011). Além disso, estudos têm demonstrado que as CTM afetam significativamente a progressão de doenças auto-imunes, assim como estão envolvidas no reconhecimento e eliminação de alo-antígenos (Soleymaninejadian et al, 2011). Estas características biológicas, juntamente com o potencial da engenharia genética, fazem das CTM boas candidatas para a terapia celular, incluindo a microencapsulação, já que a resposta imune contra o biomaterial poderia ser diminuída.

1.3 Células recombinantes microencapsuladas e DL

Vários estudos sobre microencapsulação de células recombinantes para a entrega de um produto terapêutico diretamente ao SNC têm sido realizados. Entre estes podemos citar os fatores de crescimento ou neurotransmissores que podem ser aplicados para a prevenção de lesão cerebral (Maysinger et al, 1996), tratamento de doenças neurodegenerativas como o Alzheimer e Parkinson (Kishima et al, 2004; Grandoso et al, 2007; Spuch et al, 2010) e ainda tratamento de tumores cerebrais (Kuijlen et al, 2006).

Além disso, para a doença de Huntington um protocolo de fase I foi concluído. Neste estudo, Bloch e colaboradores (2004), avaliaram a segurança da administração intracerebral usando uma cápsula com membrana semipermeável contendo células BHK recombinantes superexpressando o fator neurotrófico ciliar CNTF (*ciliary neurotrophic factor*). Seis pacientes tiveram uma cápsula implantada dentro do ventrículo lateral direito. A cápsula era retirada e trocada por outra nova a cada 6 meses, por um período de 2 anos. Nenhum sinal de toxicidade induzida por CNTF foi observado. Todas as cápsulas retiradas estavam intactas, mas continham um número variável de células viáveis. Foram observadas melhoras nos resultados eletrofisiológicos que se correlacionaram com a quantidade de CNTF liberada pelas células encapsuladas, sem oferecer riscos aos pacientes.

Assim, a encapsulação de células pode ser adequada pra o tratamento de DL, uma vez que a enzima deficiente pode ser em longo prazo liberada diretamente no SNC. A fim de se obter maiores quantidades de enzima, as células encapsuladas devem ser geneticamente modificadas para haver a superexpressão. Assim o excesso de enzima é secretado e captado por células deficientes adjacentes (figura 4) através dos receptores de manose-6-fosfato (M6PR).

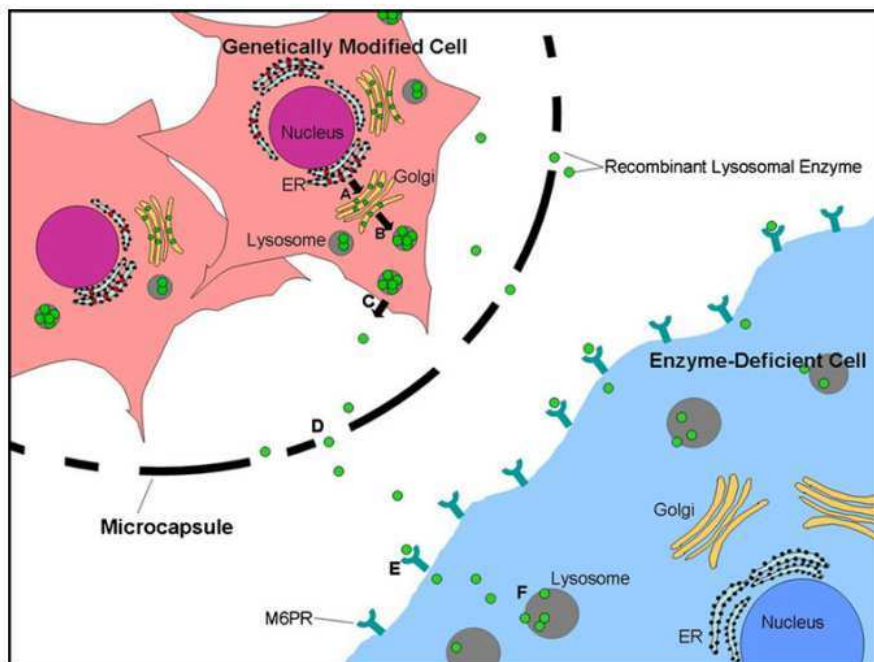


Figura 4. Tráfego de enzimas lisossomais após encapsulação celular. As enzimas lisossomais nascentes são glicosiladas no retículo endoplasmático (RE) da célula geneticamente modificada. (A) As enzimas são fosforiladas no resíduo de manose 6-fosfato no complexo golgênico. (B) A maioria das enzimas é transportada para o lisossomo maduro. (C) Algumas, no entanto, são secretadas para o ambiente extracelular, e (D) para fora das cápsulas. (E) Enzimas fosforiladas ligam-se aos receptores de manose 6-fosfato (M6PR) das células deficientes onde são endocitadas (F), voltando para os lisossomos. (Matte et al, 2010).

Esta estratégia tem sido usada experimentalmente para diferentes DL, conforme a tabela 1. Entre os protocolos existentes, as mucopolissacaridoses (MPS) são o grupo de DL em que a maioria dos experimentos foram realizados. Razões para isso incluem a disponibilidade de modelos animais e

ao caráter sistêmico da doença, que afeta tanto o SNC, quanto órgãos periféricos.

Tabela 1. Resumo das estratégias usadas para a microencapsulação celular em relação ao tratamento das DL

Produto Terapêutico	Células Encapsuladas	Biomaterial	DL	Modelo testado	Sítio de Implante	Referência
Alfa-L-Iduronidase	MDCK	APA	MPS I	Cachorros MPS I	Intraventricular	Barsoum et al, 2003
	C2C12	APA	MPS I	Camundongo MPS I	Intraperitoneal	Piller Puicher et al, 2011
Iduronato-2-sulfatase	C2C12	APA	MPS II	Camundongo MPS II	Intraperitoneal	Friso et al, 2005
	C2C12	Alginato	MPS II	Fibroblastos MPS II	-	Tomarin et al, 2002
B-Glucoronidase	Fibroblastos 2A50	APA	MPS VII	Camundongo MPS VII	Intraperitoneal	Ross et al, 2000a
	Fibroblastos 2A50	APA	MPS VII	Camundongo MPS VII	Intraventricular	Ross et al, 2000b
	IHAE	Polysulfona	MPS VII	Camundongo C3H/Fibroblastos MPS VII	Corpo estriado	Nakama et al, 2006
Ariisulfatase A	C2C12	Poli-eter-sulfona	LDM	Oligodendrócitos	-	Consiglio et al, 2007
		Alginato	LDM	Fibroblastos LDM	-	Lagranha et al, 2008
Alfa-Galactosidase	CHO	Polisulfona	FD	Fibroblastos FD	-	Naganawa et al, 2002

Nota: Adaptado de Matte et al, 2010.

Como exemplo, podemos citar a eficácia terapêutica para o tratamento de MPS VII em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Células humanas amnióticas epiteliais foram imortalizadas e transduzidas com um adenovírus contendo o gene da β -glucoronidase (GUSB). As microcápsulas foram implantadas no parênquima cerebral de ratos C3H e secretaram quantidades significativas de GUSB neste local (Nakama et al, 2006).

Barsoum e colaboradores (2003) relataram a possibilidade de entregar produtos terapêuticos no SNC de cães. Inicialmente usaram o hormônio do crescimento humano (hGH) como um marcador para avaliar a viabilidade celular após implante. Em seguida, células *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) foram geneticamente modificadas para superexpressar a enzima alfa-L-iduronidase (IDUA), enzima deficiente na MPS I, para corrigir a doença em modelo canino. As microcápsulas foram implantadas no cérebro e imunohistoquímica com anticorpo anti-IDUA demonstrou a presença da enzima em várias regiões do cérebro, mostrando a viabilidade de implante no cérebro desses animais.

Outro exemplo a ser citado é o estudo de Friso e colaboradores (2005), onde um implante intraperitoneal de mioblastos encapsulados

superexpressando a enzima iduronato sulfatase, demonstrou resultados benéficos no modelo animal de MPS II, reduzindo o acúmulo de glicosaminoglicanos (GAG).

Uso de Células Encapsuladas para o Tratamento da MPS I

A MPS I é considerada o protótipo da DL progressiva multisistêmica e que apresenta características que variam conforme a posição do paciente no espectro da doença. É uma doença herdada de forma autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima alfa-L-iduronidase (IDUA) levando ao acúmulo de GAG especialmente dermatan e heparan sulfato (Martins et al, 2009).

Os sintomas clínicos resultam do estoque lisossômico de GAG degradado parcialmente. Sendo assim as manifestações clínicas são heterogêneas, como: opacificação da córnea, disostose múltipla, fascies grosseira, rigidez articular, baixa estatura, hepato-esplenomagalia, entre outros. Baseado nos sintomas, são reconhecidas três formas principais: MPS IH ou Síndrome de Hurler (forma grave), MPS IS ou Síndrome de Scheie (forma atenuada) e MPS IH/S ou Síndrome de Hurler-Scheie (forma intermediária).

No Brasil, a incidência da MPS I é alta, quando comparada a outros países. Dados obtidos no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sugerem uma incidência da MPS I em torno de 1:106.000 em todo país. No entanto, devido à necessidade de centros especializados para realizar a confirmação do diagnóstico por ensaio enzimático e à morte precoce dos pacientes, torna-se difícil estimar com precisão a real incidência de MPS I.

Nosso grupo tem avaliado o tratamento de camundongos MPS I (*knockout* para IDUA) com células microencapsuladas implantadas na cavidade intraperitoneal destes animais (Baldo et al, 2009, *in press*). As células encapsuladas são BHK recombinantes (rBHK) contendo o gene IDUA humano. Três grupos experimentais de tratamentos foram testados: implante de cápsulas contendo 1×10^6 rBHK encapsuladas/g de camundongo, implante de cápsulas contendo 1×10^7 rBHK encapsuladas/g de camundongo e a TRE utilizando a enzima Aldurazyme® (Genzyme) como controle positivo. Após 60 dias de tratamento foi verificado uma discreta diminuição do acúmulo de GAG

em alguns órgãos como fígado e pulmão no grupo que recebeu menor número de células encapsuladas. Porém o grupo que recebeu o maior número de células encapsuladas foi observado, em alguns animais, um discreto aumento da atividade de IDUA plasmática que diminuiu após segunda semana de tratamento.

Apesar de ter sido notada uma diminuição no acúmulo de GAG, os resultados obtidos são inferiores aos obtidos com a TRE. Isto pode estar acontecendo devido a uma série de fatores como: morte das células dentro das cápsulas, falha na liberação da enzima devido a formação de resposta inflamatória e/ou fibrose ao redor das cápsulas ou ainda dificuldade de captação da enzima pelas células deficientes.

Piller Puicher e colaboradores (2011), também trataram camundongos MPS I com células C2C12 encapsuladas superexpressando IDUA, implantadas na cavidade peritoneal. A atividade de IDUA em plasma e tecidos foi avaliada. Os animais foram sacrificados após 4 meses e contrariamente aos nossos achados, os autores relatam haver uma normalização dos animais tratados com altos níveis de enzima e redução no acúmulo de GAG nos tecidos.

De qualquer forma, a imobilização de células em microcápsulas de alginato ainda parece ser uma alternativa no tratamento das DL, uma vez que simula a TRE, sem a necessidade de injeções semanais, pois as células produzem a enzima durante todo o período em que o alginato estiver viável (estima-se que as microcápsulas, *in vivo*, possuam uma durabilidade média de 6 meses – Dufrane et al, 2006) e ainda proporcionariam uma possível reversão da doença no SNC, quando aplicadas *in situ*. Além disso, é um processo menos dispendioso que a TRE e, uma vez que as células encontram-se isoladas, pode ser considerada mais segura que a terapia gênica convencional. No entanto, para esta terapia se tornar aplicável são necessários maiores estudos no que diz respeito a sua biodistribuição e comportamento *in vivo* para que a liberação e captação da enzima possam ser de alguma forma otimizadas.

1.4 Regulação dos Receptores de Manose-6-Fosfato no Tratamento de DL

Outro estudo realizado pelo nosso grupo (Lagranha et al, 2008) demonstrou a habilidade de células BHK superexpressando Arilsulfatase A (ARSA) microencapsuladas (BHK^{ARSA}) em corrigir a deficiência desta enzima em fibroblastos de pacientes com a doença. ARSA é a enzima deficiente na Leucodistrofia Metacromática (LDM). Células BHK foram transfectadas com um plasmídeo contendo o cDNA da ARSA e então encapsuladas. As cápsulas foram co-cultivadas com fibroblastos LDM por 4 semanas. Três grupos foram avaliados: fibroblastos imobilizados em microcápsulas (grupo: *capsule*), fibroblastos tratados com o sobrenadante de BHK^{ARSA} (grupo: *uptake*) e fibroblastos tratados com cápsulas vazias (grupo: *empty*).

Fibroblastos não tratados e normais foram usados como controles. Os grupos *capsule* e *uptake* demonstraram um aumento significativo na atividade de ARSA, comparado aos fibroblastos LDM não tratados, alcançando níveis normais da enzima. No grupo *empty* a atividade da enzima se manteve similar aos fibroblastos LDM não tratados. O aumento da atividade de ARSA, no entanto, se dá significativamente a partir da terceira semana de tratamento, sugerindo haver algum mecanismo que possibilite melhor captação da enzima após esse período (tabela 2).

Tabela 2. Atividade de ARSA em fibroblastos LDM tratados com BHK^{ARSA} encapsulas, sobrenadante e cápsulas vazias

	Capsulas	Controle de Captação	Vazias
Semana 1	3,25 ± 0,40 (n=6)	5,87 ± 1,24 (n=6)	2,40 ± 0,60 (n=3)
Semana 2	5,60 ± 0,86 (n=5)	8,72 ± 1,32 (n=6)	3,08 ± 0,42 (n=3)
Semana 3	16,06 ± 2,01 ^a (n=5)	18,26 ± 1,84 ^a (n=6)	2,66 ± 0,60 (n=3)
Semana 4	23,42 ± 6,39 ^a (n=5)	42,35 ± 5,20 ^b (n=6)	2,71 ± 0,34 (n=3)

Nota: Valores expressos em média ± DP (nmol/h/mg de proteína). a- diferença dentro do grupo entre os tempos e LDM controles (2,22 ± 0,17 nmol/h/mg de proteína, n=6), mas não em relação ao grupo normal (23,9 ± 0,17 nmol/h/MG de proteína; b- diferença dentro do grupo entre os tempos, controle LDM e controle normal. Todos os outros valores são iguais dentro do grupo entre os tempos e ao controle LDM, mas diferente d controle normal (One-way ANOVA, post hoc Tukey, p<0,01). Adaptado de Lagranha et al, 2008.

Esse mecanismo pode estar relacionado a uma regulação nos M6PR, uma vez que estes são os principais receptores responsáveis pela captação de enzimas lisossômicas. Se esse mecanismo estiver relacionado a uma superexpressão dos receptores de manose-6-fosfato, talvez isso possa ser utilizado para melhorar a captação de qualquer enzima lisossômica por células deficientes, melhorando tanto as terapias convencionais, bem como novas terapias.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Aperfeiçoar o sistema de liberação e captação de enzimas lisossômicas superexpressas por células recombinantes microencapsuladas para o tratamento de doenças lisossômicas, usando como modelo a mucopolissacaridose tipo I.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1 Aperfeiçoamento das microcápsulas

- Avaliar a resposta inflamatória após implante de microcápsulas contendo células BHK ou HepG2 em ratos Wistar em três distintos sítios de implantação.
- Avaliar a resposta inflamatória após implante de microcápsulas contendo células-tronco mesenquimais em ratos Wistar em três distintos sítios de implantação.
- Avaliar a resposta inflamatória em camundongos normais e com MPS I tratados com células BHK superexpressando alfa-L-iduronidase encapsuladas implantadas na cavidade intraperitoneal submetidos ou não a tratamento com antiinflamatório.
- Avaliar o aumento da atividade enzimática de IDUA no plasma sanguíneo de animais MPS I tratados.
- Verificar a viabilidade celular das BHK recombinantes encapsuladas e avaliar se há liberação da enzima para o meio extra-capsular depois de retiradas da cavidade intraperitoneal..

2.2.1 Regulação da captação enzimática

- Avaliar a expressão dos M6PR em fibroblastos de pacientes com Leucoditrofia Metacromática e de indivíduos normais após tratamento com o sobrenadante de células BHK superexpressando Arilsulfatase A.

- Verificar a expressão dos M6PR em fibroblastos de pacientes com Mucopolissacaridose tipo I após tratamento como sobrenadante de células BHK superexpressando Alfa-L-Iduronidase.
- Verificar se o pré-tratamento com sobrenadante de células BHK superexpressando Arilsulfatase A em fibroblastos de pacientes com MPS I aumenta a captação da enzima após tratamento com o sobrenadante de cápsulas contendo células superexpressando Alfa-L-Iduronidase.

3. ARTIGOS

3.1 Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells Reduces Immune Response Against a Biomaterial *in vivo*.

** Submetido para a revista Artificial Organs.*

ENCAPSULATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS REDUCES IMMUNE RESPONSE AGAINST A BIOMATERIAL *IN VIVO*

Talita Giacomet de Carvalho^{1,2, #}, Valeska Lizzi Lagranha^{1,2, #}, Mónica Lujan Lopez^{1,2},
Fabiana Quoos Mayer^{1,2}, Guilherme Baldo^{2,3}, Fernanda Sperb^{1,2}, Luise Meurer⁴,
Roberto Giugliani^{1,2,3}, Ursula Matte^{1,2}

¹Gene Therapy Center, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

²Post-Graduation Program on Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

³Postgraduate Program in Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Pathology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding Author:

Ursula Matte

Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS

90035-903

Fone: 55 51 3359 8841 / 8838

Fax: 55 51 3359 8010

Valeska Lizzi Lagranha and Talita Giacomet de Carvalho both contributed equally for the manuscript.

SUMMARY

Cell microencapsulation is an approach in which cells genetically modified to produce a therapeutic protein are isolated inside a semi-permeable membrane. Alginate, the most common material used for encapsulation, induce an immune response that decreases the protein release from the capsule. Mesenchymal Stem Cells (MSC) exhibits immunomodulatory activity and could be used for microencapsulation. In this study, we aimed to compare the immune response induced by alginate encapsulated MSC and two cell lines. MSC isolated from rat bone marrow, BHK or HepG2 were encapsulated in alginate and implanted in *vastus medialis* muscle of Wistar rats. After 7 or 21 days, presence of fibrosis and inflammation was evaluated. In animals that received cell lines, fibrosis increased from 7 to 21 days after implantation. In rats that received MSC, fibrosis did not increase, and in 21 days it was lower than in the animals of the cell line group that were sacrificed at the same time. The animals that received MSC showed a smaller inflammation area than the animals that received cell lines after 21 days of implantation. Thus, MSC decreased the immune response induced by alginate, and could be used as an alternative to improve the efficacy of cell microencapsulation technique.

Keywords: Mesenchymal Stem Cells, Cell Microencapsulation, Immune Response

INTRODUCTION

Cell microencapsulation has emerged as a promising strategy for the treatment of a wide variety of diseases. It is an approach in which cells are trapped in a semipermeable membrane that allows the exchange of metabolites and nutrients between the cells and the external environment, thus protecting them from the action of the immune system [1]. This technique allows the localized and controlled release, as well as long term duration of therapeutic effects derived from the microencapsulated cells [2]. However, this system has failed to reach clinical approval, partly due to the host response against the biomaterial used for microencapsulation. Microcapsule graft failure is usually associated with a foreign body reaction, with inflammatory infiltrate and collagen deposition around the capsules [3]. One of the major challenges facing the technique is to decrease this immune response. Different strategies have been taken to overcome this obstacle, including modification of the polymer [4], and administration of anti-inflammatory drugs together with the microcapsules [5, 6].

Mesenchymal stem cells (MSC) are currently strong candidates for cell based therapies. These cells can be easily isolated from bone marrow and adipose tissue among other sources. They have the ability of self-renewal and multipotency, and can differentiate into mesodermal derivatives, such as adipocytes, osteocytes and chondrocytes [7]. Most important, MSC possess immunomodulatory properties, which make them particularly attractive for the treatment of inflammatory diseases. These cells can directly and indirectly immunoregulate T lymphocytes [8]. Furthermore, it has been shown that MSC significantly affect the progression of autoimmune diseases, as they are involved in alloantigen recognition and elimination [9]. These biological traits, along with their genetic engineering potential for therapeutic applications, make MSC good candidates for cell based therapy including cell microencapsulation.

Based on these concepts, MSC could be used for microencapsulation to decrease the immune response against the polymer. In this study, we demonstrate the efficacy of microencapsulated MSC to decrease the host response against alginate, when compared to other microencapsulated cell lines implanted in the *vastus medialis* muscle of Wistar rats.

MATERIAL AND METHODS

MSC isolation, culture and characterization

Mesenchymal stem cells were obtained from donor Wistar rats, after sacrifice in CO₂ chamber. The tibiae and femurs were extracted and whole bone marrow was

flushed with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-LG, LGC Biotecnologia, Brazil). The mononuclear cell fraction was isolated by centrifugation using Ficcol (GE-Healthcare, USA) gradient at 2500 rpm/min at room temperature, followed by two washing steps with phosphate buffered saline (PBS) [10]. The cells were then plated in tissue culture flasks for expansion standard medium constituted of DMEM-LG supplemented with 20% fetal bovine serum (Gibco-Invitrogen, USA) and 1% penicillin/streptomycin (P/S, Gibco-Invitrogen, USA), and were maintained under normal tissue culture conditions (37°C, 5% CO₂). After 48 hours non-adhering cells were washed out with medium changes. The attached cells were cultured until 70% confluent, and harvested with 0.25% trypsin-EDTA (Gibco-Invitrogen, USA). Cells were used at passages 5-7.

To analyze the multipotential characteristics of the cells, they were seeded on 6 well plates at 1×10^5 cells/cm² and cultured for 2 weeks with adipogenic or osteogenic differentiation medium [11]. To check for calcium deposition or presence of lipids, cells were fixed in 10% formalin and stained with Alizarin Red S (Merck, Germany) or Oil Red-O (Merck, Germany), respectively.

Cell lines culture

Baby Hamster Kidney (BHK) and HepG2 cells were plated in tissue culture flasks in standard medium and maintained under normal tissue culture conditions, as described above. The cells were grown to about 90-95% confluence and harvested with 0.25% trypsin-EDTA. Medium changes were performed twice a week.

Cell microencapsulation

Cell microencapsulation was carried out as described by Lagranha *et al* [12]. Briefly, MSC, BHK or HepG2 cells were each mixed with 1.5% sodium alginate (Sigma-Aldrich, USA) at 6.16×10^5 cells/mL and extruded through a 27-gauge needle in an encapsulation unit (Nisco Encapsulation Unit, type J1) attached to JMS Seringe Pump (model SP-500). Droplets were sheared off with an air flow of 4 liters/min delivered to the tip of the needle. The droplets fell into a 125 mM CaCl₂ solution and ionically cross-linked with Ca²⁺ to form solid spherical hydrogel beads containing embedded cells. Cell microencapsulation was carried out under sterile conditions. The capsules were maintained under normal tissue culture conditions for 24 h before its use.

Microcapsules implantation

The microcapsules were implanted in male Wistar rats 2-4 months old (n=30), divided in animals that received encapsulated MSC, HepG2 or BHK cells. In each group animals were sacrificed 7 or 21 days after the microcapsules implantation.

The animals were anesthetized intraperitoneally with 100 mg/kg 10% ketamine (Eurofarma Lab LTDA, Brazil) and 10 mg/kg 2% Xylazine (Ind e Com LTDA Sespo, Brazil). Thereafter, incisions of approximately 1 cm were made for microcapsules implantation in the *vastus medialis* muscle. Approximately 1.85×10^5 cells were implanted in each rat.

The rats were maintained at Animal Experimentation Unit at the Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. They were fed *ad libitum* and maintained under a constant photoperiod of light/dark cycles 12:12 h and controlled temperature between 18 and 22°C. Handling, care and processing of animals were carried out according to regulations approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Histological analysis

Seven or twenty one days after the microcapsules implantation, rats were sacrificed in CO₂ chamber. The *vastus medialis* muscles with the microcapsules were collected and fixed for 48 h in buffered 10% formalin. Sections were stained with Hematoxilin-Eosin (HE) and Sirius Red.

The HE-stained sections were examined under a light microscope to check for inflammatory infiltrate. The thickness of the inflammatory infiltrate between the implantation site and adjacent tissue was measured in pixels using the Cell^F version 03.03 software (Olympus) on a 4x magnification in 20 different points per slide.

Sections stained with Picrossirius were analyzed by light microscopy and 5-8 fields per slide at a 10X magnification were evaluated. The fibrotic area was quantified, in pixels, by means of Adobe Photoshop CS3 [13].

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by the Predictive Analytics SoftWare (PASW, version 18.0). For comparison of thickness of the inflammatory infiltrate, nonparametric Kruskal-Wallis test was used, with Mann-Whitney test with Bonferroni correction as post hoc. To compare the size of the fibrotic area surrounding the microcapsules, one-way ANOVA with Tukey as a post hoc was used. Statistical differences among groups were considered when $p < 0.05$.

RESULTS

MSC isolation and differentiation

Adherent cells isolated from tibia and femur of Wistar rats were cultured in osteogenic and adipogenic media for analysis of multilineage differentiation potential. Two weeks after culture with osteogenic medium, calcium deposits were observed after staining with Alizarin Red, indicating osteogenic lineage differentiation. Oil-Red O staining revealed cells with fat store vesicles after 2 weeks of culture with adipogenic media, indicating adipogenic differentiation potential (data not shown).

Histological analysis

Light microscopy analysis of HE stained slides, showed inflammatory infiltrate formation surrounding the microcapsules in all groups of animals. Presence of macrophages, giant cells, plasmocytes and lymphocytes were observed, characterizing a foreign body immune response (Figure 1). As there was no difference in the inflammatory infiltrate and in the size of fibrotic area in the animals that received BHK or HepG2 microencapsulated cells, we considered both are the same group herein called cell line.

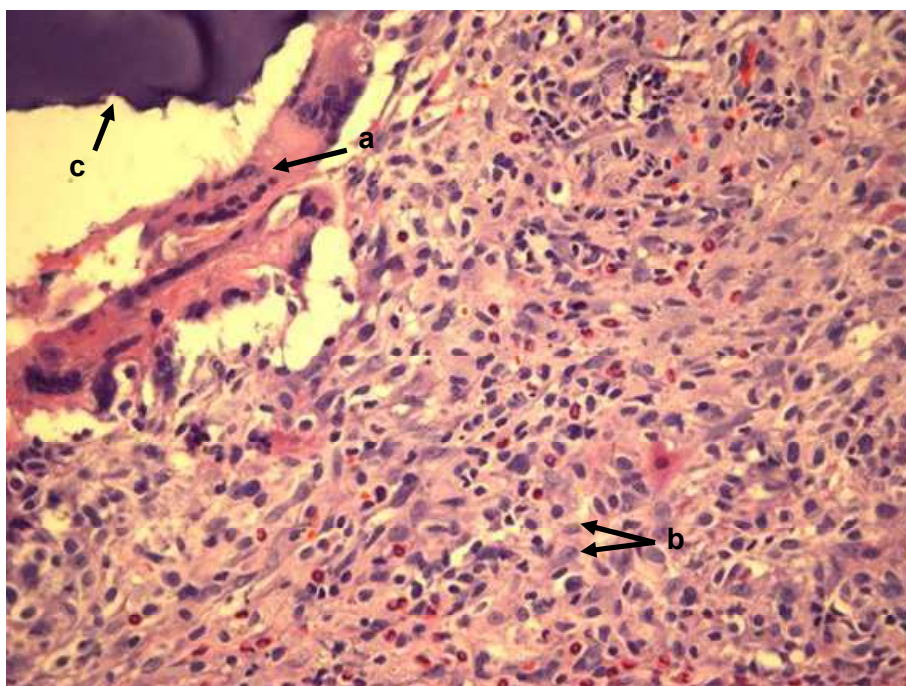


Figure 1. *Vastus medialis* muscle section stained with Hematoxylin-Eosin showing the presence of inflammatory infiltrate surrounding the capsules (40x). Arrows are showing: a. Multinucleated giant cells; b. Macrophages; c. Alginate microcapsule.

In both cell types inflammation decreased from 7 to 21 days after microcapsules implantation. In addition, animals that were sacrificed 21 days after the implantation surgery and received microencapsulated MSC showed a smaller inflammation area than the animals that received microencapsulated cell lines and were sacrificed at the same time (Figure 2).

Presence of areas with collagen deposition was observed in all groups and time points. Analysis of Sirius red stained slides showed that in animals that received microencapsulated cells lines, fibrosis increased from 7 to 21 days after implantation. In rats that received microencapsulated MSC, fibrosis does not increase, and in rats sacrificed at 21 days it was lower than in the animals that received BHK or HepG2 cells that were sacrificed at the same time (Figure 3).

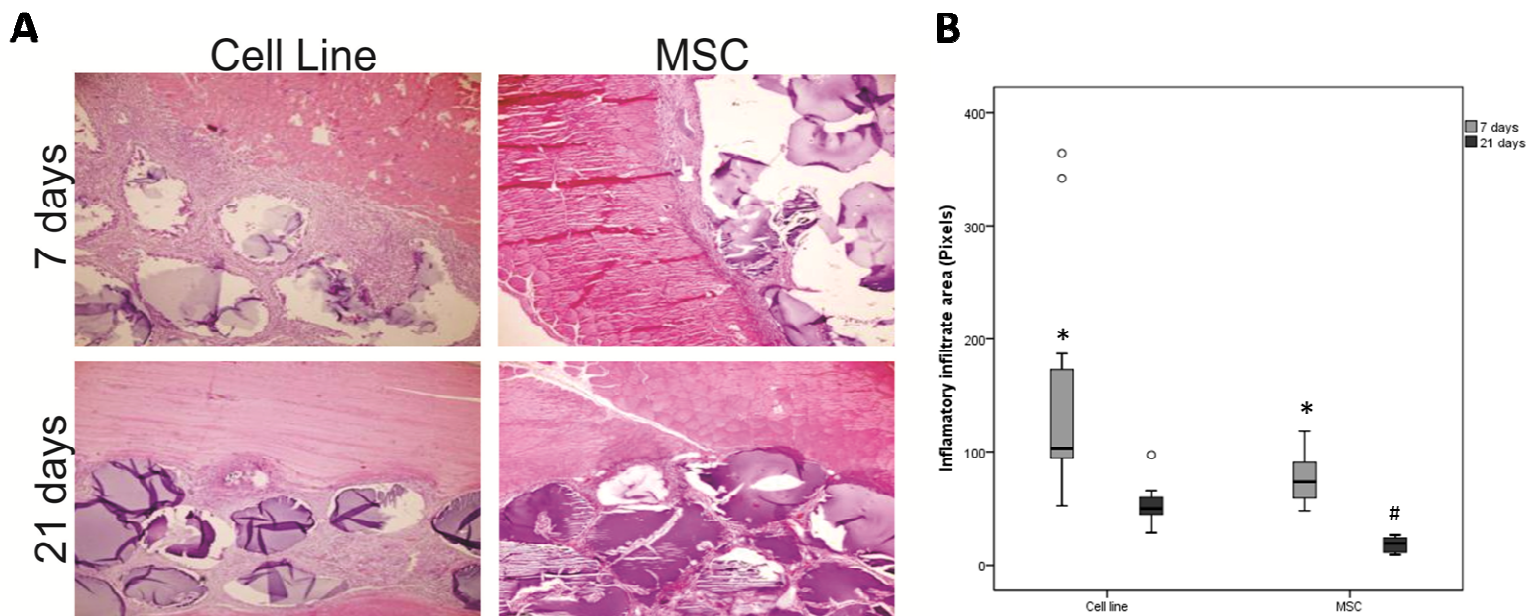


Figure 2. Inflammatory infiltrate observed in rats that received encapsulated MSC or cell lines, and were sacrificed 7 or 21 days after microcapsule implantation. A: *Vastus medialis* muscle sections stained with HE. Arrows are showing the inflammatory infiltrate areas (40x). B: Thickness of the inflammatory infiltrate, in pixels, measured from digital pictures (20 measurements per picture, 4X magnification). * $p < 0.05$ when compared to 7 days within the same group and # $p < 0.05$ when compared to other group (Kruskal Wallis Test).

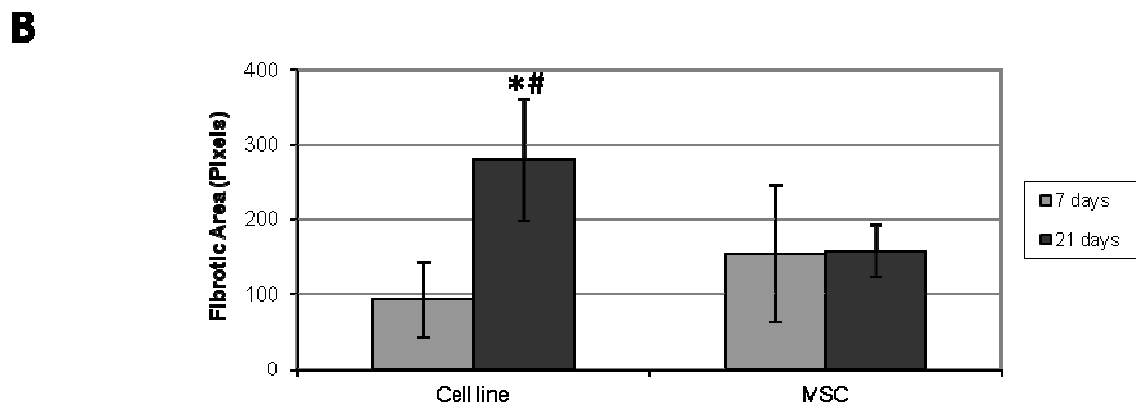
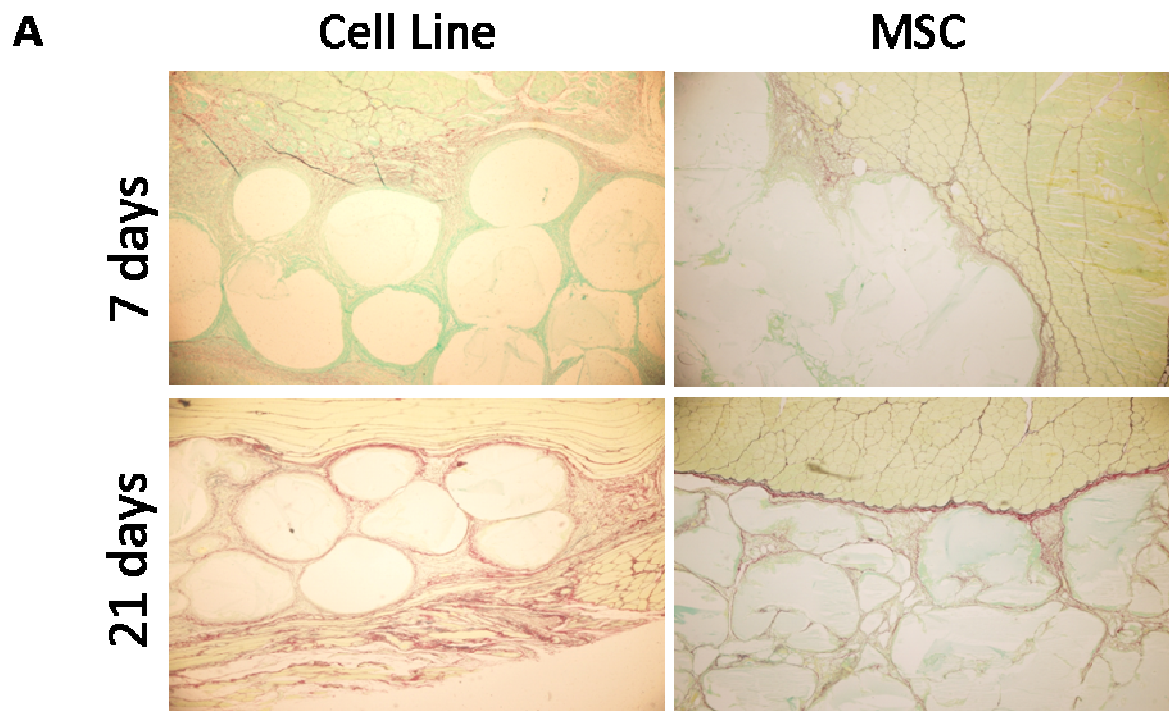


Figure 3. Fibrosis observed in rats that received encapsulated MSC or cell lines, and were sacrificed 7 or 21 days after microcapsule implantation. A: *Vastus medialis* muscle sections stained with Sirius red. Arrows are showing fibrotic areas (40x). B: Fibrotic area, in pixels, measured from digital pictures (5-8 pictures per rat, 10X magnification). * $p < 0.05$ when compared to 7 days within the same group and # $p < 0.05$ when compared to other group (One-Way ANOVA).

DISCUSSION

Cell microencapsulation is a promising and potentially cost-effective method to treat a wide range of diseases. It is a system that has been studied for cellular transplantation [2], preservation [14] and for the controlled delivery of therapeutic products [12, 15]. However, there are obstacles to be overcome, and among them is to

decrease its immunogenicity. A promising solution for this problem is the administration of anti-inflammatory drugs together with the capsules [5, 6]. Another strategy is the polymer modification to improve its biocompatibility, which in some cases has also proved to be efficient [4]. Another approach to reduce the host response is to use cells with immunomodulatory capacity instead of, or together with, the cell lines commonly used for microencapsulation. MSC are good candidates for it, due to their immunomodulatory properties and low immunogenicity [16].

A few studies have attempted to encapsulate MSC [17, 18]. Goren *et al.* [19] encapsulated MSC in alginate-PLL for extended periods and proved that the cells could maintain their stem cell properties, long-last viability, and proliferation potential inside the microcapsules. They also demonstrated good biocompatibility and therapeutic efficacy of transduced MSC to express hemopexin-like protein to treat glioma, demonstrating the feasibility of the use of microencapsulated MSC.

Our results showed that in all rats that received microencapsulated cells, either MSC or cell lines developed inflammatory infiltrate, with macrophages, multinucleated giant cells and lymphocytes surrounding the microcapsules. These cells are clearly involved in the immune response that is formed against various biomaterials [20]. Previous results from our group showed that even when empty alginate capsules were implanted in the *vastus medialis* muscle or subcutaneously in Wistar rats, the same pattern of immune response was observed [21]. Thus observation suggests that this response is primarily a foreign body reaction against alginate.

The thickness of the inflammatory infiltrate between the capsules and adjacent tissue was proven to be smaller in rats that received microencapsulated MSC when compared to the animals that received cell lines, in both times, 7 and 21 days. When the size of the fibrotic area was analyzed, in the groups that received microencapsulated cell lines, it increased from 7 to 21 days of implantation. In animals that received microencapsulated MSC, fibrosis did not increase at 21 days post implantation and at this time it was lower than in the animals that received the cell lines and were sacrificed at the same time. These results support the immunoregulatory properties of MSC, that have been shown to happen by the release of cytokines to the area surrounding the capsules.

Fibrosis formation and inflammation are big problems faced in cell microencapsulation technology, since they limit the release and uptake of the therapeutic product, and compromise the viability of the entrapped cells [22]. MSC seem to be an attractive and feasible strategy to overcome these problems. The use of microencapsulated MSC can increase alginate biocompatibility and allow for a better efficiency of the system.

Acknowledgments: This work was supported by FIPE-HCPA, CNPq and CAPES.

REFERENCES

- [1] Li HB, Jiang H, Wang CY, Duan CM, Ye Y, Su XP, Kong QX, Wu JF, Guo XM 2006 Comparison of two types of alginate microcapsules on stability and biocompatibility in vitro and in vivo. *Biomed Mater* 1(1):42-7.
- [2] Orive G, Gascon RA, Hernandez RM, Igartua M, Pedraz JL 2003 Cell microencapsulation technology for biomedical purposes: novel insights and challenges. *Trends in Pharmacological Sciences* 24(5):207-10.
- [3] Santos E, Zarate J, Orive G, Hernández RM, Pedraz JL 2010 Biomaterials in cell microencapsulation. *Adv Exp Med Biol.* 670:5-21.
- [4] Mazumder MA, Burke NA, Shen F, Potter MA, Stöver HD 2009 Core-cross-linked alginate microcapsules for cell encapsulation. *Biomacromolecules.* 8;10(6):1365-73.
- [5] Blasi P, Giovagnoli S, Schoubben A, Ricci M, Rossi C, Luca G, Basta G, Calafiore R 2006 Preparation and in vitro and in vivo characterization of composite microcapsules for cell encapsulation. *Int J Pharm.* 31;324(1):27-36.
- [6] Baruch L, Benny O, Gilert A, Ukobnik M, Ben Itzhak O, Machluf M 2009 Alginate-PLL cell encapsulation system Co-entrapping PLGA-microspheres for the continuous release of anti-inflammatory drugs. *Biomed Microdevices.*
- [7] Seong JM, Kim BC, Park JH, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang YS 2010 Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater.* 5(6):062001.
- [8] Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD 2011 Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther.* 2(4):34.
- [9] Soleymaninejadian E, Pramanik K, Samadian E 2011 Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells: Cytokines and Factors. *Am J Reprod Immunol.* 2012 Jan;67(1):1-8.
- [10] Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR 2000 Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science.* 290(5497):1779-82.

- [11] Kang XQ, Zang WJ, Song TS, Xu XL, Yu XJ, Li DL, Meng KW, Wu SL, Zhao ZY 2005 Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro. *World J Gastroenterol.* 11(22):3479-84.
- [12] Lagranha VL, Baldo G, de Carvalho TG 2008 In vitro correction of ARSA deficiency in human skin fibroblasts from metachromatic leukodystrophy patients after treatment with microencapsulated recombinant cells. *Metab Brain Dis* 23(4):469-84.
- [13] Baldo G 2008 Desenvolvimento de protocolos pré-clínicos de terapia celular em modelos animais de lesão hepática aguda e crônica [Masters thesis]. Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- [14] Mayer FQ, Baldo G, de Carvalho TG, Lagranha VL, Giugliani R, Matte U 2010 Effects of cryopreservation and hypothermic storage on cell viability and enzyme activity in recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase. *Artif Organs* 34(5):434-9.
- [15] Baldo G, Quoos Mayer F, Burin M, Carrillo-Farga J, Matte U, Giugliani R. Recombinant Encapsulated Cells Overexpressing Alpha-L-Iduronidase Correct Enzyme Deficiency in Human Mucopolysaccharidosis Type I Cells 2011 *Cells Tissues Organs*.
- [16] Zhao S, Wehner R, Bornhäuser M, Wassmuth R, Bachmann M, Schmitz M 2010 Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders. *Stem Cells Dev.* 19(5):607-14.
- [17] Liu Y, Liu T, Ma X, Fan X, Bao C, Cui Z 2009 Effects of encapsulated rabbit mesenchymal stem cells on ex vivo expansion of human umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *J Microencapsul.* 26(2):130-42.
- [18] Zhou H, Xu HH 2011 The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 32(30):7503-13.
- [19] Goren A, Dahan N, Goren E, Baruch L, Machluf M 2010 Encapsulated human mesenchymal stem cells: a unique hypoimmunogenic platform for long-term cellular therapy. *FASEB J.* 24(1):22-31.
- [20] Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT 2008 Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 20(2):86-100.

[21] de Carvalho TG 2008 Células microencapsuladas em alginato de Cálcio: avaliação de parâmetros in vitro e in vivo [senior thesis] Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

[22] Matte U, Lagranha VL, de Carvalho TG, Mayer FQ, Giugliani R 2011 Cell microencapsulation: a potential tool for the treatment of neuronopathic lysosomal storage diseases. *J Inherit Metab Dis.* 34(5):983-90.

3.2 Treatment of MPS I mice with microencapsulated cells overexpressing IDUA: effect of the prednisolone administration

** Submetido em para a revista Journal of Microencapsulation.*

**TREATMENT OF MPS I MICE WITH MICROENCAPSULATED
CELLS OVEREXPRESSING IDUA: EFFECT OF THE PREDNISOLONE
ADMINISTRATION**

Valeska Lizzi Lagranha^{1,2}, Talita Giacomet de Carvalho^{1,2}, Roberto Giugliani^{1,2,3} and
Ursula Matte^{1,2}

¹ Post-Graduation Program on Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Gene Therapy Center, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding Author:

Ursula Matte
Gene Therapy Center
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350
Porto Alegre, RS
90035-903
Fone: +55 51 3359 8841 / 8838
Fax: +55 51 3359 8010

Key-Words: Cell Microencapsulation, Mucopolysaccharidosis type I, prednisolone, alginate

ABSTRACT

Context: Cell encapsulation, although a promising strategy to deliver therapeutic products *in vivo*, is hampered by immune response against biomaterials. **Aim:** To assess the effect of prednisolone on enzyme release by microencapsulated cells implanted *in vivo*. **Methods:** Recombinant BHK cells encapsulated in alginate were implanted in the peritoneum of normal and MPS-I mice, receiving or not prednisolone. After fifteen days, microcapsules were recovered for histological and enzyme analysis. Blood was collected from MPS-I mice. **Results:** All animals receiving prednisolone had a smaller inflammatory infiltrate, whereas fibrosis decreased just in normal mice. Prednisolone increased the amount of enzyme released from the recovered capsules. Seven days after implant, enzyme activity in serum increased from undetectable to 2.45 ± 1.0 nmol/h/ml in MPS I mice receiving prednisolone, whereas it was not detectable in animals without prednisolone. **Conclusion:** Although prednisolone improved enzyme release *in vitro*, it was not able to enhance enzyme activity *in vivo*.

INTRODUCTION

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I - MIM #607014) is an autosomal recessive disease characterized by a deficiency of α -L-iduronidase (IDUA; EC 3.2.1.76), that leads to storage of dermatan and heparan sulfate (Martins et al, 2009). MPS I has a spectrum of clinical severity, ranging from severe Hurler syndrome, estimated to affect 1 in 144,000 live births, to the attenuated phenotype of Scheie syndrome, with an incidence of 1 in 500,000 live births (Lowry and Renwick, 1971). Common symptoms include coarse faces, corneal clouding, hernias, dysostosis multiplex, joint stiffness, short stature, and hepatosplenomegaly. Mental retardation is present in the severe form, while the attenuated phenotype presents normal intelligence (D'Aco et al, 2012).

Current treatments for this disease are hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and enzyme replacement therapy (ERT), both of which are limited in their effects due to different factors. HSCT presents high morbidity and mortality and it is difficult to find a compatible donor (Valayannopoulos and Wijburg, 2011). ERT has been shown to improve many of the clinical manifestations of the disease, such as pulmonary capacity, hepato and splenomegaly, as well as the range of motion of joints (Clarke et al, 2009, Tytki-Szymanska et al, 2010). However, the enzyme does not cross the blood-brain-barrier, justifying the need for new therapies for the severe form of the disease that mainly affects the CNS.

An alternative approach to direct delivery is the implant of encapsulated cells into the brain. This strategy has been used to deliver dopamine and neurotrophic factors for the treatment of Parkinson disease (Yoshida et al, 1999; Lindvall and Wahlberg 2008), β -glucuronidase for mucopolysaccharidosis type VII (Ross et al, 2000; Nakama et al, 2006), and for treatment of tumors (Visted et al, 2001). Genetically modified cells are encapsulated within a biocompatible semipermeable membrane and become protected from most immune system mediators (Ross et al, 2000). This allows the enzyme secreted by these cells to be taken up by surrounding deficient cells in the CNS. Thus, it simulates *in situ* enzyme replacement therapy without the need for repeated injections or for the enzyme to pass the blood-brain barrier. Based on that concept, our group evaluated the treatment of MPS I mice (*Idua* knockout) with microencapsulated cells implanted into the intraperitoneal cavity (Baldo et al, 2012). However, an inflammatory response was observed, which may have contributed to the limited success of this strategy. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effect of a steroid anti-

inflammatory on the therapy with encapsulated cells overexpressing *Idua* for the treatment of MPS I mice.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Baby hamster kidney (BHK) cells, transfected with human cDNA IDUA (Mayer et al, 2010), herein referred to as recombinant BHK (rBHK), were grown in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM - LGC Biotecnologia, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS - Gibco, USA), 2% L -glutamine (Gibco, USA) and 1% antibiotic-penicillin/streptomycin (Gibco, USA). Cells were maintained in culture at 37°C in a humidified, 5% CO₂, 95% air atmosphere. The cells were grown to about 90- 95% confluence and harvested with 0.25% trypsin-EDTA. Medium changes were performed twice a week until the microencapsulation procedure was performed.

Animals

Female MPS I mice on a C57BL/6 background (kindly donated by Dr Elizabeth Neufeld) and normal mice of the same strain were used. MPS I mice were identified by PCR reaction as previously described (Baldo et al, submitted). The animals were maintained at Animal Experimentation Unit at the Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, fed *ad libitum* with standard chow and maintained under a constant photoperiod of light/dark 12:12h with controlled temperature (19 ± 1°C) and humidity (50 ± 10%). Handling, care and processing of animals were carried out according to regulations approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Cell microencapsulation

Procedures were carried out as previously described by our group (Lagranha et al, 2008). Briefly, rBHK cells were mixed with 1.5% sodium alginate (Sigma-Aldrich, Germany) at 1×10⁶ cells/g of body weight and extruded through a Encapsulation Unit, type J1 (Nisco, Switzerland) attached to JMS Syringe Pump (Singapore). Droplets were sheared off with an air flow of 4 L/min delivered to the tip of the needle and the rate of infusion was 40 mL/h. The droplets fell into a bath of 125 mM CaCl₂ and ionically cross-linked with Ca²⁺ to form solid spherical hydrogel beads containing embedded cells. For each mouse capsules were produced from a

volume of 300-400 μ L of cell suspension. Cell encapsulation was carried out under sterile conditions. The resulting capsules were maintained under normal tissue culture conditions for 24 h before the implant into the intraperitoneal cavity of mice.

Microcapsules implantation

The microcapsules were implanted in female mice 2-3 months old, divided in 4 groups: treated with microencapsulated rBHK only, both in MPS I (n=5) and normal mice (n=4) and treated with microencapsulated rBHK plus prednisolone, in MPS I (n=5) and normal mice (n=3). The animals were anesthetized by isoflurane inhalation and incisions of approximately 1 cm were made in the abdomen. A dose of 1×10^6 cells/g of body weight was implanted in each mouse in the peritoneal cavity. The groups treated with steroid anti-inflammatory received 1.5 mg/kg of prednisolone sodium phosphate (Prati-Donaduzzi, Brazil) by gavage during five consecutive days, starting at the day of the surgery, and two more doses in alternate days (Viana, 2007). In MPS I mice blood was collected from the orbital plexus to measure IDUA activity in serum seven and fifteen days after the implant, aiming to evaluate the effectiveness of treatment.

Recovery and analysis of the microcapsules after implantation

Fifteen days after the microcapsules implantation, the mice were sacrificed in CO₂ chamber. The microcapsules were collected from the intraperitoneal cavity by washing it with PBS. The recovered capsules were divided in three portions for analysis, as described below.

One portion was fixed for 48 h in buffered 10% formalin for histology. Other was dissolved using trypsin-EDTA 0.25% for 20-30 minutes, and then washed with sodium citrate 100mM for 3-5 minutes. The recovered rBHK were evaluated for cell viability by Trypan blue exclusion. The last one was washed 10 times in PBS and placed directly into 24-well plate for 24 h. After that, the medium was collected for evaluation of IDUA release from the capsules.

IDUA activity assay

IDUA activity was analyzed in serum and culture medium by fluorimetric assay (Hopwood et al, 1979) using synthetic substrate (4-methylumbellyferyl-alpha-L-iduronide, Glycosynth, UK). Results were expressed as nmol/h/mL.

Histological analysis

The microcapsules were stained with hematoxylin-eosin (HE) and picosirius, aiming to evaluate inflammatory response and fibrosis formation, respectively.

HE-stained sections were examined under light microscope and the thickness of the inflammatory infiltrate formed around the microcapsules was measured in μm using the Cell F software (Olympus). Ten different points per field and 10 fields per slide were measured on 20X magnification.

Picosirius-stained sections in 15-20 fields were evaluated under light microscope at 20X magnification. A ratio between the number of capsules stained with picosirius and total number of capsules was performed. The results were expressed in percentage.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the Predictive Analytics SoftWare (PASW, version 18.0). Mann-Whitney test for independent samples was used for comparison of enzyme released to the medium after implant and for IDUA activity in serum. For thickness of the inflammatory infiltrate and fibrosis formation Student t test for independent samples was used. Statistical differences among groups were considered when $p < 0.05$.

RESULTS

We implanted capsules on normal and MPS I mice to evaluate the effect of prednisolone on the inflammatory response and enzyme release. In six animals (two in each group: normal, MPS I and MPS I plus prednisolone) we observed an adherence of microcapsules to certain organs such as liver (figure 1), intestine, pancreas and omentum. Inflammatory infiltrate thickness showed difference between treated and non treated animals in both groups. In MPS I mice the infiltrate was $32.82 \pm 2.4 \mu\text{m}$ while in MPS I mice treated with prednisolone it was $18.35 \pm 2.0 \mu\text{m}$ ($p=0.01$). Similar results were found in normal mice, where the thickness was reduced from 38.76 ± 5.1 to $16.19 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ($p=0.03$) in animals treated with prednisolone (table 1). Figure 2 shows the capsules stained with HE before the implantation (fig 2A), after 15 days maintained *in vitro* (fig 2B), and capsules recovered 15 days after implant in the peritoneum of normal and MPSI mice (fig 2A to 2H). A large number of macrophages and multinucleated giant cells were observed in all animals, despite treatment group.

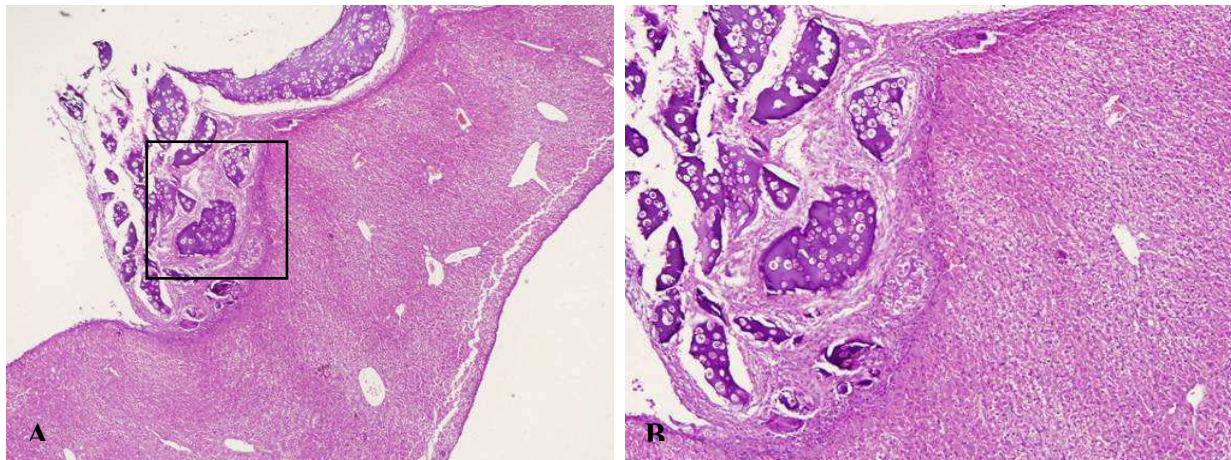


Figure 1. Microcapsules adhesion to the liver. A- Presence of inflammatory cells (magnification 4x); B- Higher magnification of the area indicated in A (magnification 10x).

Table 1. Infiltrate inflammatory thickness and percentage of fibrosis formation in MPS I and normal mice, treated with microcapsules IDUA over expression, with or without prednisolone.

Animals Group	Infiltrate Inflammatory (μm)	Fibrosis Formation (%)
MPS I	$32.82 \pm 2.4^{\text{a}}$	60.0 ± 21.8
MPS I + prednisolone	18.35 ± 2.0	26.1 ± 13.4
Normal	$38,76 \pm 5,1^{\text{b}}$	$55.0 \pm 10.0^{\text{b}}$
Normal+ prednisolone	16.19 ± 0.5	23.3 ± 4.7

Note: Values expressed in mean \pm SD. **a.** difference between MPS I mice treated with capsules only and MPS I mice treated with capsules plus prednisolone ($p=0.01$) and **b.** difference between normal mice treated with capsules only and normal mice treated with capsules plus prednisolone ($p<0.05$). Independent Samples t-Student test.

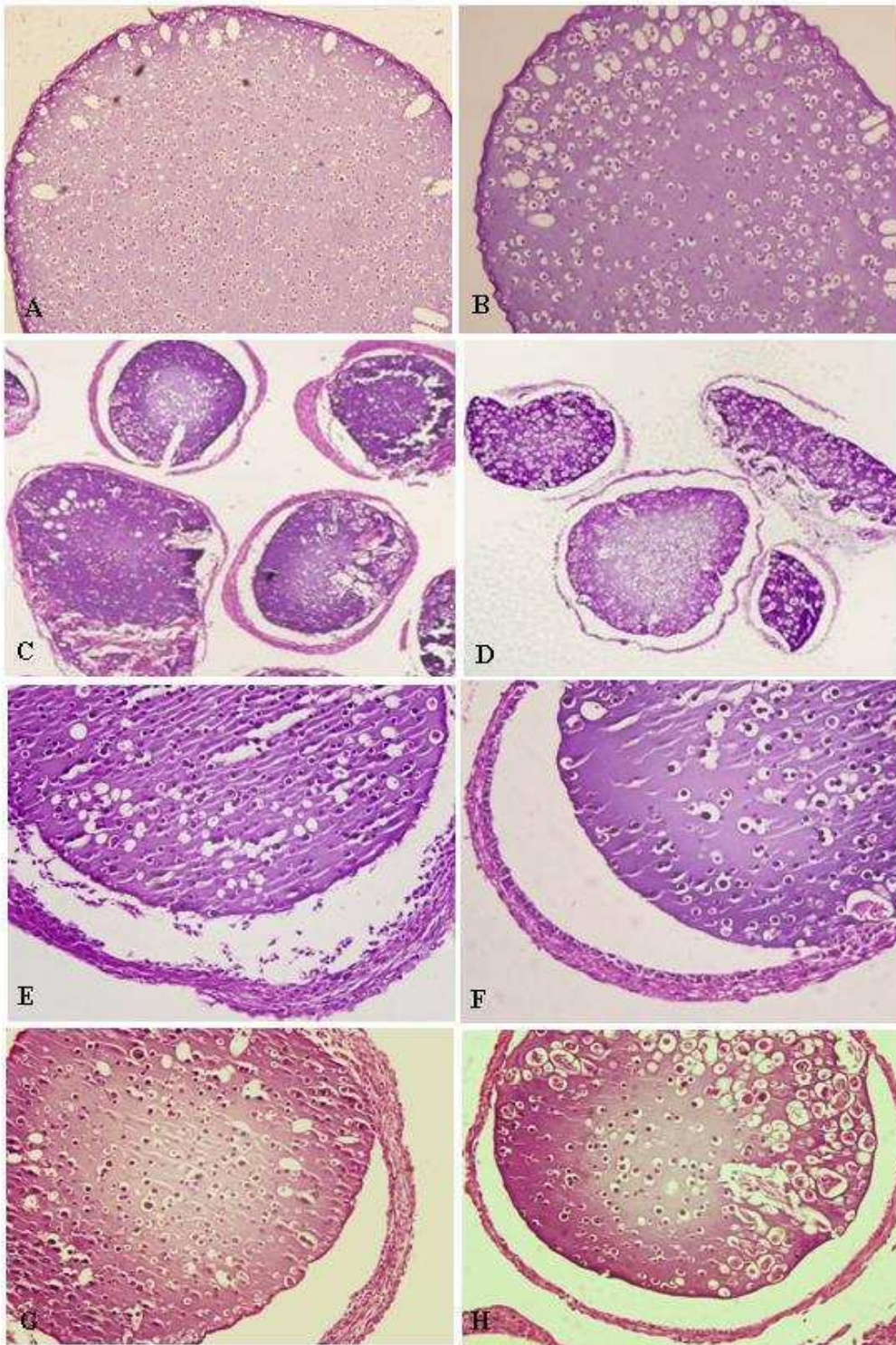


Figure 2. Microencapsulated rBHK *in vitro* and *in vivo*. A and B- Microcapsules before implant and 15 days maintained in culture *in vitro*, respectively (magnification 10x). C and D- Microcapsules recovered of the MPS I mice and MPS I mice plus prednisolone, respectively (magnification 4x). E and F- Microcapsules recovered of the MPS I mice and MPS I mice plus prednisolone, respectively (magnification 20x). G and H- Microcapsules recovered of the normal mice and normal mice plus prednisolone, respectively (magnification 20x).

On picosirius staining, not all capsules showed fibrosis. Moreover, those which were positive had a thin stained layer that was difficult to measure. Therefore, we performed a ratio between the number of positive and negative capsules for picosirius in a total of 15 to 20 fields (table 1). The MPS I mice had 60 ± 21.8 % of picosirius positive capsules while this number was 26.1 ± 13.4 % in MPS I mice treated with prednisolone ($p=0.83$). In normal mice, the percentage of picosirius-positive capsules was significantly different between normal mice with or without prednisolone, with values of 16.19 ± 0.5 and 38.76 ± 5.1 %, respectively ($p=0.034$), thus indicating a reduction in fibrosis.

After recovery, a fraction of the capsules was dissolved and cell viability was counted. No significant difference was found in cell viability among the groups after 15 days of implant. Cell viability ranged 75-90%.

Intact recovered capsules were kept in culture for 24 hours and the enzyme activity released to the medium was measured. The enzyme released in normal mice was 36.3 ± 20.3 nmol/h/mL of medium. In normal mice treated with prednisolone this value was 93.7 ± 46.1 nmol/h/mL of medium ($p=0.035$), showing that prednisolone improved the amount of IDUA released from the capsules (fig. 3). In MPS I mice enzyme activity released from the capsules was 42.3 ± 20.1 nmol/h/mL of medium while in those treated with prednisolone enzyme activity was 156.9 ± 108.6 nmol/h/mL of medium ($p=0.028$).

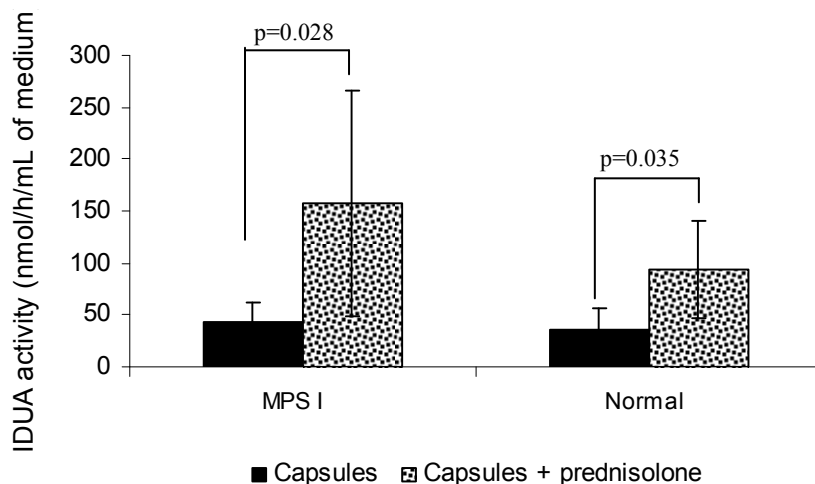


Figure 3. IDUA activity released to culture medium of microcapsules recovered 15 days after implant *in vivo*.

Treatment with prednisolone was effective in improving the release of enzyme to the extracapsular media and reduced inflammatory infiltrate thickness and fibrosis formation. Therefore we evaluated if it was also able to improve the amount of enzyme released *in vivo* to the bloodstream. IDUA activity in serum was measured 7 and 15 days after the implant. This test was performed only in MPS I mice to measure IDUA produced by encapsulated cells and non-endogenous IDUA. In MPS I mice, 7 days after implant, no enzyme activity was detectable, whereas there was a wide range of enzyme activity at 15 days. In the group that received prednisolone, IDUA activity increased from undetectable to 2.45 ± 1.0 nmol/h/ml of serum at 7 days ($p < 0.01$), however in 15 days this increase was no longer significant ($p = 0.5$, figure 4).

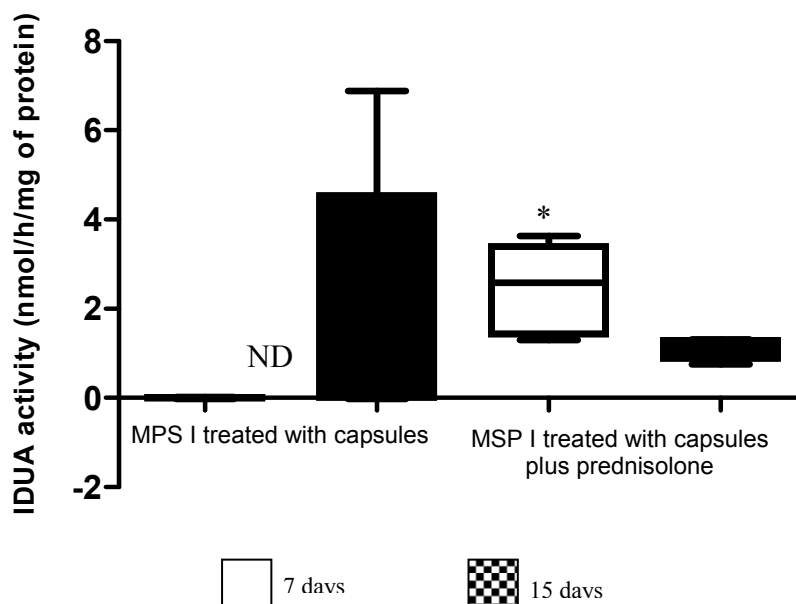


Figure 4. IDUA activity in serum of MPSI mice after 7 and 14 days post implant. *difference between MPSI treated with capsules in 7 days. *Independent Samples Mann-Whitney Test* ($p < 0.01$). ND= not detectable.

DISCUSSION

Alginate-based microcapsules are commonly used for the immuno protection of transplanted therapeutic cells. However, the biocompatibility of the encapsulated cell system, including the microcapsule itself, continues to be a subject of concern (Jayant et al, 2011). The development of fibrotic tissue around the implanted microcapsules was considered to be one of the major obstacles hampering the progress of

encapsulated cell transplantation. Fibrosis arising from the normal wound-healing process was stated to hinder the diffusion of cell nutrients and therapeutic products across the capsule membrane (Tam et al, 2009). In this study, we evaluated the effect of prednisolone on the inflammatory response formed against alginate microcapsules after implant in the peritoneal cavity of normal and MPS I mice.

We observed that prednisolone was able to reduce the thickness of inflammatory infiltrate and the percentage of capsules surrounded by fibrotic tissue both in normal and in MPS I mice. The presence of macrophages and multinucleated giant cells, both in animals that received or not prednisolone indicates a possible 'foreign body' reaction to the alginate. Although we cannot directly compare the groups, as the response was not quantified, it seems that this reaction is not resolved by the use of prednisolone. Macrophages and giant cells are involved in the immune response that is formed against various biomaterials, and it tends to be reduced and resolved in a short period of time (Anderson et al, 2008). Similar results from our group confirm these observations (De Carvalho et al, submitted).

In fact, the activation of the immune system is a complex issue that starts with the surgery. More precisely, injury to vascularized connective tissue caused by the incision induces an immediate inflammatory cell reaction as well as the release of bioactive factors such as cytokines and nitric oxide. It means that this reaction starts before the implant is even introduced into the body (Tam et al, 2009). In addition, the peritoneal cavity is a site with significant inflammatory response due the defensive action of the peritoneum, which acts as a defensive line in the presence of any foreign body (Robitaille et al, 2005).

Some studies have shown that an inflammatory response that results in cell growth and deposition of pericapsular fibroblasts can hamper the flow of substances in and out the capsules, thus diminishing the efficacy of treatment. This can happen due to the difficulty of the product release and/or a failure in the arrival of nutrients inside the capsules that can result in necrosis of encapsulated cells (Ponce et al, 2006).

In order to see if the cells kept their normal function, despite the presence of inflammatory infiltrate and fibrosis, we tested the cell viability and release of enzyme in culture from capsules retrieved from animals after 15 days of implant. Cell viability remained high, even in the groups without prednisolone, suggesting that fibrosis and inflammatory infiltrate were not able to cause significant cell loss inside the capsules. The enzyme was released to the extra capsular space, higher levels in the group treated with prednisolone. These results suggest that the inflammatory response was preventing the optimal release of enzyme and that the diminished response observed in the group treated with prednisolone allows more enzyme to be released.

Prednisolone is a corticosteroid, indicated for the treatment of diseases involving inflammation and pain. It reduces inflammation by suppressing the migration of polymorphonuclear leukocytes and reversing increased capillary permeability (Bílková et al, 2011). The combined use of microcapsules and anti-inflammatory or immunosuppressive agents are described in the literature (Peduto et al, 2000; Omer et al, 2003; Bungler et al, 2005; Baruch et al, 2009, Murua et al, 2009). For instance, microcapsules containing cells overexpressing Erythropoietin were produced with a core containing PLGA (poly-lactic co-glycolic acid) with dexamethasone, so the drug was slowly released by the polymer. The capsules were implanted subcutaneously in mice, and no significant response was observed at the site of implant (Murua et al, 2011).

Although the use of prednisolone improved the release of the enzyme *in vitro*, this was not accompanied by an increase in the amount of circulating enzyme *in vivo* after 15 days. However, in a short period of time (7 days), prednisolone significantly increased the amount of enzyme detected in the serum of MPS I animals. The reason why a longer effect was not observed may be due to the small number of animals analyzed and also may be related to an immune reaction against the enzyme, that has also observed in patients treated with ERT (Kakkis et al, 2001; Ponder, 2008).

CONCLUSION

In conclusion, the development of a protected microenvironment for transplant may be an interesting approach for delivery of the therapeutic product. However, long term administration of prednisolone presents side effects, such as musculoskeletal, gastrointestinal, dermatological, metabolic, endocrine, and ophthalmic disturbances. Therefore, this protocol should be administered with caution and for short periods of time. In our model, more extensive studies must be performed to ensure the efficacy of this approach.

Acknowledgments: The authors are grateful to Melissa Camassola and Nance Nardi (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil) for providing pR-IDUA plasmid. This work was supported by FIPE-HCPA. VLL and TGC are recipients of CNPq and CAPES scholarships. UM and RG are recipient of CNPq PQ scholarships.

REFERENCES

- Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin. Immunol*, 2008; (80) 86–100.
- Baldo G, Mayer F, Martinelli B, Meyer F, Burin M, Meurer L, Tavares A, Giugliani R, Matte U. Intraperitoneal implant of recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase partially corrects visceral pathology in MPS I mice. 2012, *Cytotherapy*; *In press*.
- Baruch L, Benny O, Gilert A, Ukobnik M, Itzhak OB, Machluf M. Alginate-PLL cell encapsulation system co-entrapping PLGA-microspheres for the continuous release of anti-inflammatory drugs. *Biomed. Microdevices*, 2009; 11, 1103–1113.
- Bilková E, Imramovský A, Sedlák M. Recent advances in the design and synthesis of prednisolone and methylprednisolone conjugates. *Curr Pharm Des*, 2011; 17(32):3577-95.
- Bunger CM, Tiefenbach B, Jahnke A, Gerlach C, Freier T, Schmitz KP, Hopt UT, Schareck W, Klar E, de Vos P. Deletion of the tissue response against alginate-pll capsules by temporary release of coencapsulated steroids. *Biomaterials*, 2005; 26, 2353-2360.
- Clarke LA, Wraith JE, Beck M, Kolodny EH, Pastores GM, Muenzer J, Rapoport DM, Berger KI, Sidman M, Kakkis ED, Cox GF. Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I. *Pediatrics*, 2009; 123:229–240.
- D'Aco K, Underhill L, Rangachari L, Arn P, Cox GF, Giugliani R, Okuyama T, Wijburg F, Kaplan P. Diagnosis and treatment trends in mucopolysaccharidosis I: findings from the MPS I Registry. *Eur J Pediatr*, 2012; *in press*.
- Hopwood JJ, Muller V, Smithson A, Baggett N. 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. *Clin Chim Acta*, 1979; 92(2):257-65.
- Jayant RD, McShane MJ, Srivastava R. *In vitro* and *in vivo* evaluation of anti-inflammatory agents using nanoengineered alginate carriers: towards localized implant inflammation suppression. *Int J Pharm*, 2011; 17;403(1-2):268-75.

Kakkis ED, Schuchman E, He X, Wan Q, Kania S, Wiemelt S, Hasson CW, O'Malley, T, Weil MA, Aguirre GA, Brown DE, Haskins ME. Enzyme replacement therapy in feline mucopolysaccharidosis I. *Mol Genet Metab*, 2001;72(3):199-208.

Lagranha VL, Baldo G, de Carvalho TG, Burin M, Saraiva-Pereira ML, Matte U, Giugliani R. *In vitro* correction of ARSA deficiency in human skin fibroblasts from metachromatic leukodystrophy patients after treatment with microencapsulated recombinant cells. *Metab Brain Dis*, 2008; 23(4):469-84.

Lindvall, O. and Wahlberg, LU. Encapsulated cell biodelivery of GDNF: a novel clinical strategy for neuroprotection and neuroregeneration in Parkinson's disease? *Exp Neurol*, 2008; 209:82-8.

Lowry RB, Renwick DH. Relative frequency of the Hurler and Hunter syndromes. *N Engl J Med*, 1971; 28;284(4):221-2.

Martins AM. Introduction to Brazilian Guidelines to Diagnosis, Treatment, and Monitoring for Gaucher Disease, Fabry Disease, Mucopolysaccharidosis I, and Pompe Disease. *J Pediatr*, 2009;155(4 Suppl):S9.

Mayer FQ, Baldo G, de Carvalho TG, Lagranha VL, Giugliani R, Matte U. Effects of cryopreservation and hypothermic storage on cell viability and enzyme activity in recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase. *Artif Organs*, 2011; 34(5):434-439.

Murua A, Herran E, Orive G, Igartua M, Blanco FJ, Pedraz JL, Hernández RM. Design of a composite drug delivery system to prolong functionality of cell-based scaffolds. *Int J Pharm*, 2011; 4;407(1-2):142-50.

Murua A, Orive G, Hernández RM, Pedraz JL. Xenogeneic transplantation of erythropoietin-secreting cells immobilized in microcapsules using transient immunosuppression. *J Control Release*, 2009; 137:174-178.

Nakama H, Ohsugi K, Otsuki T, Date I, Kosuga M and Sakuragawa N. Encapsulation cell therapy for mucopolysaccharidosis type VII using genetically engineered immortalized human amniotic epithelial cells. *Tohoku J Exp Med*, 2006; 209(1):23-32.

Omer, A, Keegan M, Czismadia E, de Vos P, Van Rooijen N, Bonner-Weir S, Weir GC. Macrophage depletion improves survival of porcine neonatal pancreatic cell clusters contained in alginate macrocapsules transplanted into rats. *Xenotransplantation*, 2003; 10, 240-251.

Peduto G, Rinsch C, Schneider BL, Rolland E, Aebischer P. Long-term host unresponsiveness to encapsulated xenogeneic myoblasts after transient immunosuppression. *Transplantation*, 2000; 15;70(1):78-85.

Ponce S, Orive G, Hernández R, Gascón AR, Pedraz JL, de Haan BJ, Faas MM, Mathieu HJ, de Vos P. Chemistry and the biological response against immunisolating alginate-polycation capsules of different composition. *Biomaterials*, 2006; 27(28):4831-9.

Ponder KP. Immune response hinders therapy for lysosomal storage diseases. *J Clin Invest*, 2008; 118(8):2686-9.

Robitaille R, Dusseault J, Henley N, Desbiens K, Labrecque N, Hallé JP. Inflammatory response to peritoneal implantation of alginate-poly-L-lysine microcapsules. *Biomaterials*, 2005; 26(19):4119-27.

Ross CJD, Ralph M, Chang PL. Somatic Gene Therapy for a Neurodegenerative Disease Using Microencapsulated Recombinant Cells. *Experimental Neurology*, 2000; 166; 276-286.

Tam SK, de Haan BJ, Faas MM, Hallé JP, Yahia L, de Vos P. Adsorption of human immunoglobulin to implantable alginate-poly-L-lysine microcapsules: effect of microcapsule composition. *J Biomed Mater Res A*, 2009; 89(3):609-15.

Tylki-Szymanska A, Marucha J, Jurecka A, Syczewska M, Czartoryska M. Efficacy of recombinant human α -L-iduronidase (Iaronidase) on restricted range of motion of upper extremities in mucopolysaccharidosis type I patients. *J Inher Metab Dis*, 2010; 33:151–157.

Valayannopoulos V, Wijburg FA. Therapy for the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology*, 2011;50 Suppl 5:v49-59.

Viana, FAB. 2007. Guia Terapêutico Veterinário. PR Brazil, 2ed: Gráfica e Editora CEM.

Visted T, Bjerkvig R, Enger PO. Cell encapsulation technology as a therapeutic strategy for CNS malignancies. *Neuro Oncol*, 2001; 3:201-10.

Yoshida H, Date I, Shingo T, Fujiwara K, Miyoshi Y, Furuta T and Ohmoto T. Evaluation of reaction of primate brain to grafted PC12 cells. *Cell Transplant*, 1999; 8:427-30.

3.3 Up-regulation of mannose 6-phosphate receptors in fibroblasts treated with conditioned medium from BHK cells overexpressing arylsulfatase A

** A ser submetido para a revista: Journal of Inherited Metabolic Disease*

**UP-REGULATION OF MANNOSE-6-PHOSPHATE RECEPTORS IN
FIBROBLASTS TREATED WITH CONDITIONED MEDIUM FROM BHK
CELLS OVEREXPRESSING ARYLSULFATASE A**

Valeska Lizzi Lagranha^{1,2}, Talita Giacomet de Carvalho^{1,2} Ursula Matte^{1,2}, and
Roberto Giugliani^{1,2,3}

¹ Post-Graduation Program on Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Gene Therapy Center, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding Author:

Ursula Matte
Gene Therapy Center
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350
Porto Alegre, RS
90035-903
Fone: +55 51 3359 8841 / 8838
Fax: + 55 51 3359 8010

Key-words: mannose-6 phosphate, mannose 6-phosphate receptor, arysulfatase A, lysosomal enzymes.

ABSTRACT

The uptake of lysosomal hydrolases, in mammalian cells, is mediated by two distinct mannose 6-phosphate (M6P) binding proteins which are transmembrane glycoproteins: the 300-kDa cation-independent (M6PR300) and the 46-kDa cation-dependent M6P receptor (M6PR46). A previous study by our group showed that cross correction of fibroblasts from Metachromatic Leukodystrophy (MLD) patients, deficient in Arylsulfatase A (ARSA), significantly increases from the third week on. We speculate that this could be related to an up-regulation of the M6PR. If this was the case, ARSA could be used to increase the uptake of other lysosomal enzymes. So, we aimed to evaluate the expression of M6PR in fibroblasts after treatment with BHK cells over expressing ARSA (BHK^{ARSA}) and the uptake of alfa-L-Iduronidase (IDUA), another lysosomal enzyme. MLD and normal fibroblasts were treated with the supernatant of BHK^{ARSA}, Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) fibroblasts were treated with supernatant from BHK^{IDUA}, and MPSI fibroblasts were treated with supernatant from BHK^{ARSA} for 3 weeks plus BHK^{IDUA} for 5 days. The enzyme activities were measured and RNA was extracted for quantification of M6PR300 mRNA levels. Qualitative analysis of M6PR 300 KDa and 46 KDa was performed by immunocytochemistry. Treated MLD fibroblasts reached normal enzyme levels in three weeks. The expression of M6PR increased around 2-fold in third and fourth weeks, both in MLD and normal fibroblasts. In MPS I fibroblasts, IDUA activity reached normal levels in the second week, without increase in M6PR. In MPS I fibroblasts that were pre-treated with the supernatant from BHK^{ARSA} and treated with BHK^{IDUA}, IDUA activity increased about 50-fold in five days. This is significantly more than the 14-fold increase observed in fibroblasts without pre-treatment. *M6PR* expression in pre-treated group shows a two-fold increase in expression. Immunocytochemistry performed on MLD fibroblasts corroborates these findings. The explanation for this up-regulation is still unclear. Together, these results suggest that this strategy could be used to improve the uptake of enzymes for different lysosomal diseases and consequently improve enzyme replacement therapy.

INTRODUCTION

The biogenesis of lysosomes requires the correct sorting of >60 acid hydrolases from their site of synthesis in the endoplasmic reticulum to their final destination in lysosomes (Braulke and Bonifacino, 2009). This targeting event, in mammalian cells, is mediated by two distinct mannose 6-phosphate (M6P) binding proteins which are transmembrane glycoproteins: the 300-kDa cation-independent (CI- M6PR or MPR300) and the 46-kDa cation-dependent M6P receptor (CD-M6PR or MPR46), that are the sole members of the P-type lectin family. While the former appears to be implicated both in targeting of newly synthesized lysosomal enzymes and endocytosis of extra cellular lysosomal proteins, the latter has been shown so far only to participate in intracellular trafficking of lysosomal enzymes to lysosomes (Yadavalli and Nadimpalli, 2010).

Lysosomal enzymes are synthesized as latent proenzymes in the rough endoplasmic reticulum, co-translationally glycosylated, and then transferred to the *cis*-Golgi (Von Figura and Hasilik, 1986). In this compartment, due to the sequential action of two enzymes, phosphomannosyl residues are exposed on the oligosaccharide moiety, resulting in the formation of the mannose 6-phosphate (M6P) recognition marker. The so formed residues are specific to lysosomal hydrolases and have strong interaction with M6P receptors (M6PR) in the *trans*-Golgi network (TGN) (Braulke and Bonifacino, 2009).

The receptor–ligand complexes are transported to the endosomes where the acidic pH of the endosomal compartment facilitates their disassembly. The released lysosomal enzymes are packaged into lysosomes while the receptors return to the Golgi/TGN via a retromer-assisted transport system (Arighi et al, 2004). However, a small proportion of phosphorylated lysosomal polypeptides escape from this pathway and are released from cells. These secreted enzymes can interact with M6PR300 present on the plasma membrane and can therefore be internalized and targeted to lysosomes.

A previous study by our group (Lagranha et al, 2008) showed that cross correction of fibroblasts from Metachromatic Leukodystrophy (MLD) patients, deficient in Arylsulfatase A (ARSA), significantly increases from the third week on. We speculate that this could be related to an up-regulation of the M6PR, and therefore ARSA could be used to increase the uptake of other lysosomal enzymes. In the present work we evaluate the expression of M6PR in fibroblasts after treatment with BHK (Baby

Hamster Kidney) cells over expressing ARSA (BHK^{ARSA}) and the uptake of alfa-L-Iduronidase (IDUA), another lysosomal enzyme.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Skin biopsies from Metachromatic Leukodystrophy (MLD) patients, deficient in Arylsulfatase A (ARSA), and from Mucopolysaccharidosis type I patients, deficient in alfa-L-Iduronidase (IDUA), were obtained for diagnostic purposes and kept at the Medical Genetics Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Skin fibroblasts from two healthy donors, collected for another research project, were available at the laboratory. The use of these fibroblasts anonymously was approved by the local ethics committee.

Patients' fibroblasts were cultured in DMEM (LGC Biotecnologia, Brazil), 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA), 1% penicillin/streptomycin (P/S) (Gibco, USA), at 37°C in humidified 5% CO₂ incubator until reaching 70–80% confluence. Cells then were trypsinized and cultured in 6 well plates (0.5x10⁵ cells/well) to perform the treatments.

Recombinant Baby Hamster Kidney (BHK) cells were grown to about 90– 95% confluence in the same culture conditions described above. For BHK cells overexpressing ARSA (BHK^{ARSA}) (Lagranha et al, 2008) the medium was supplemented with 400ug/mL of Zeocin (Invitrogen, USA), and for BHK cells over expressing IDUA (BHK^{IDUA}) (Mayer et al, 2010), the medium was supplemented with 200ug/mL Geneticin (Invitrogen, USA), to ensure the maintenance of transgene expression. One day before each experiment, both recombinant BHK cells were kept in antibiotics free medium.

Fibroblasts treatment

All the fibroblasts were treated with conditioned media from BHK cells over expressing ARSA or IDUA. For this, the recombinant BHK cells were plated into the 75 cm² flask and grown until 90% confluence. Then, they were incubated in zeocin or geneticin-free medium 24h prior to the media collection. After 24 h, supernatant was

collected, centrifuged at 2,000×g at 4°C for 10 min, filtered, and then added to fibroblasts containing one volume of DMEM supplemented with 10% FBS and 1% P/S (1:1). This procedure was performed every 3 days.

Experimental Design

Fibroblasts from MLD patients (group: *MLD*) and normal fibroblasts (group: *Normal*) were treated with supernatant from BHK^{ARSA} for 6 and 4 weeks respectively. Fibroblasts from Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) patients were treated with the supernatant from BHK cells over expressing IDUA (BHK^{IDUA}) for 3 weeks (group: *IDUA*) or for 5 days after 3 weeks of pre-treatment with the supernatant of BHK^{ARSA} (group: *Pre-treatment*). Fibroblasts were collected weekly to assess enzyme activity (n = 3-5 per group), M6PR expression (n = 3-7 per group), and immunocytochemistry (n = 1-2 per group).

Enzyme Activity

Harvested cells were washed twice in phosphate buffered saline (PBS 1X), sonicated in distilled water and centrifuged to eliminate cellular debris. Protein quantification was performed using the Lowry protein assay (Lowry et al, 1951). ARSA enzyme activity was measured by a colorimetric assay (Lee-Vaupel and Conzelmann, 1987) and IDUA enzyme activity was measured by a fluorimetric assay (Hopwood et al, 1979). Specific enzyme activities were expressed as nmol/h/mg of protein.

Gene Expression by RT- qPCR

RNA extraction was performed with RNeasy mini kit (QIAGEN, Germany). RNA quality was assessed by spectrophotometry on Nanodrop1000 (Thermo, USA) and the nucleotide:protein (260/280) ratio was within the acceptable boundaries of 1.8 and 2.1. The conversion to cDNA was made using Superscript II conversion kit (Invitrogen, USA). For quantification of *M6PR* mRNA, primers were designed for the membranous 300-kDa cation-independent receptor (CI- M6PR or MPR300), annealing at exon 4 (5' GGGGGTGATGAATATGACAAC 3') and at the junction of exons 4 and 5 (5' GGGGGTGATGAATATGAC 3'), with an amplicon size of 90 bp. Glyceraldehyde 3-

phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was the normalizer gene (primer sequences 5' CCCATCACCATCTTCCAGG 3' and 5' CATATTTGGCAGCTTTCTCC 3'). Quantitative PCR reactions were performed on the MXPro (Stratagene – GE Healthcare Life Sciences, USA) using SYBR Green Rox Plus (LGC Biotecnologia - Brazil) at 57°C and 60°C annealing temperature for *M6PR* and *GAPDH* genes, respectively. The efficiency curve of amplification was 84.6% for *M6PR* primers and 99% for *GAPDH* primers (data not shown). Relative gene expression was quantified using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schnittgen, 2001).

Immunocytochemistry

Cells were fixed in methanol using wash series with increasing concentrations of 50, 75, 87 and 100% of methanol (in PBS 1X). Immunocytochemistry was performed using the antibody anti-M6PR of 46 and 300KDa (kindly provided by Dr. William S. Sly, School of Medicine, Saint Louis University, USA) in a 1:200 dilution. Incubation with the primary antibodies was performed overnight at 4°C and developed with peroxidase-conjugated secondary antibody anti-IgG (DAKO, USA) for 1h. Qualitative analysis was performed by light microscopy in 3-4 fields for each antibody (46 and 300 KDa).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Predictive Analytics SoftWare (PASW, version 18.0). Both for the analysis of enzyme activity and for gene expression, One-Way ANOVA with Tukey post-hoc were performed. Statistical differences among groups were considered when $p < 0.05$.

RESULTS

Treatment of MLD and normal fibroblasts

Results obtained in ARSA group showed that MLD fibroblasts are able to capture the enzyme from media (Figure 1 A). Untreated MLD fibroblasts (time 0) have an activity of 2.08 ± 0.46 nmol/h/mg of protein. After 3 weeks, ARSA activity in treated MLD fibroblasts reached normal levels (21.7 ± 2.1 nmol/h/mg of protein). On weeks 5 and 6 ARSA activity was higher than in normal controls ($p < 0.01$). In RT-qPCR (Figure

1B), using untreated MLD fibroblasts as calibrator, it was observed that in the third and fourth weeks of treatment the expression of *M6PR* increased around two-fold (2.23 ± 0.62 and 2.25 ± 0.37 , respectively, $p < 0.01$).

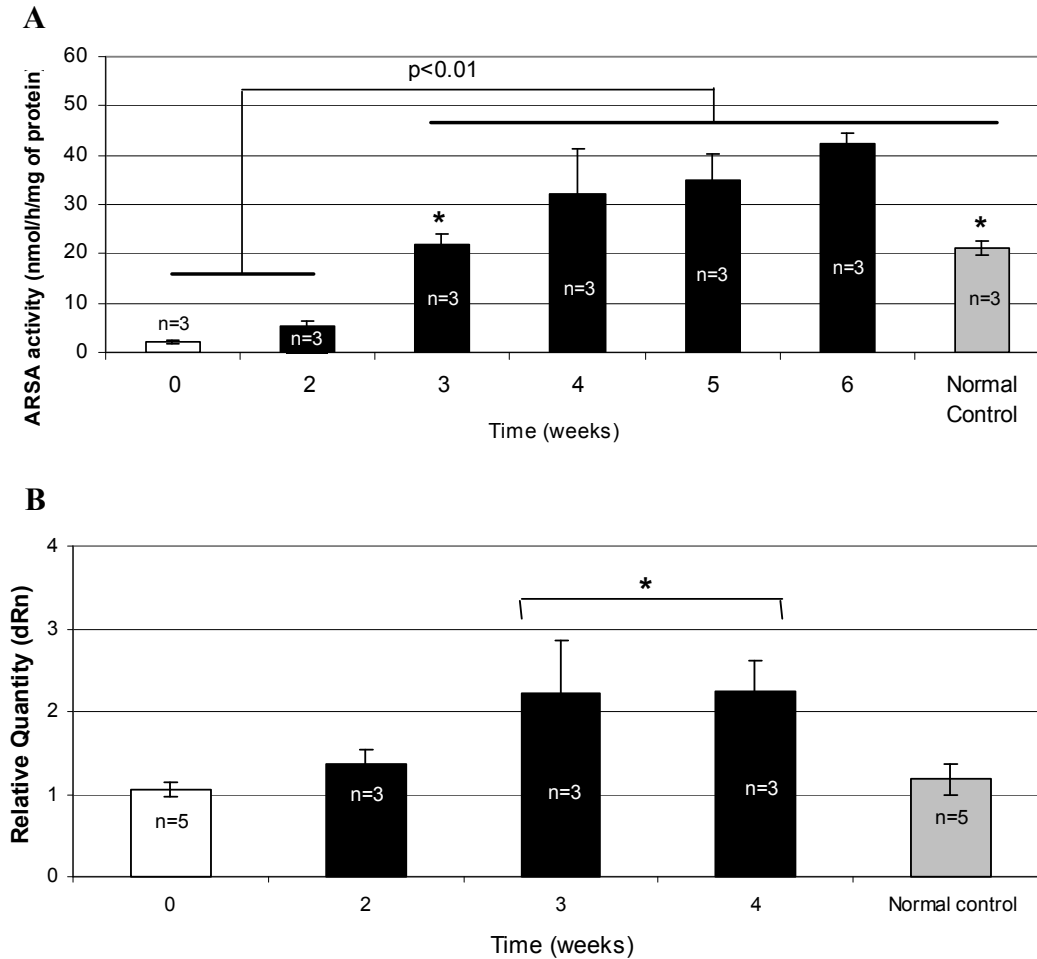


Figure 1. A) ARSA activity in MLD fibroblasts treated with BHK^{ARSA} conditioned media. Values represent mean \pm standard deviation (SD). * Different of weeks 5 and 6 ($p < 0.01$, One-Way ANOVA test). B) Relative quantity of *M6PR* expression in MLD fibroblasts treated with BHK^{ARSA} conditioned media. Values represent mean \pm standard deviation (SD). * Different of untreated MLD fibroblast (time 0), second week and normal fibroblast ($p < 0.01$, One-Way ANOVA test).

Immunocytochemistry corroborates the findings obtained in RT-qPCR (figure 2). MLD and normal fibroblasts did not stain for both anti-M6PR antibodies 46- (suppl.

Figure 1) and 300 KDa (Figure 2). From the third week on, a stronger stain is observed, as found in the previous techniques.

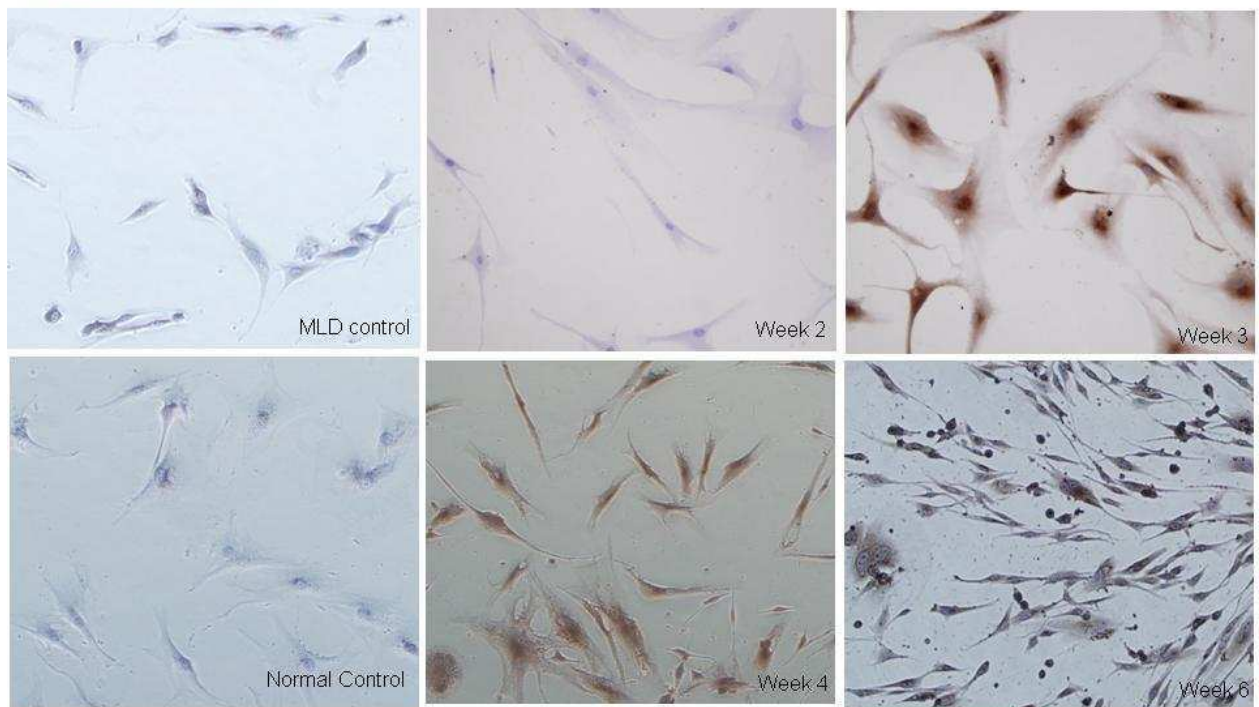
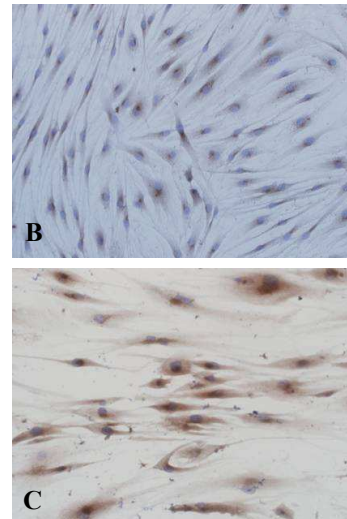
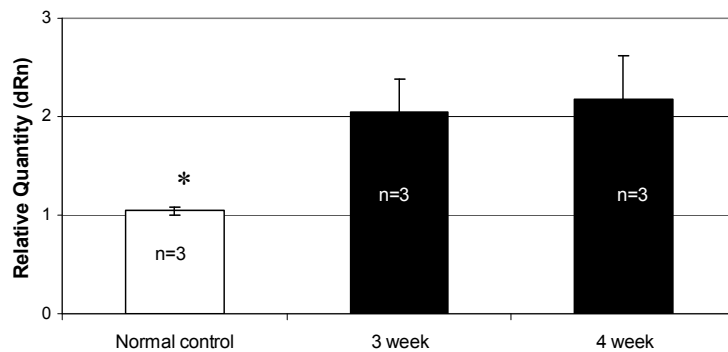


Figure 2. Immunocytochemistry in MLD fibroblasts (untreated and treated) and normal fibroblasts with anti-300 KDa antibody (magnification: 10x).

To assess whether this increase is related to the primary enzyme deficiency, and therefore restricted to MLD fibroblasts, normal fibroblasts were treated with BHK^{ARSA} conditioned media and *M6PR* expression was evaluated in the third and fourth weeks. A similar increase in M6PR expression was observed both by RT-qPCR and immunocytochemistry after 3 and 4 weeks of treatment (figure 3).



A

Figure 3. M6PR expression in normal fibroblasts treated with BHK^{Arsa} conditioned media. A) RT-qPCR relative quantity of *M6PR*. Values represent mean \pm SD. * Difference among 3 and 4 week ($p < 0.05$, One-Way ANOVA test. Immunocytochemistry with anti-300 KDa antibody in B) untreated normal fibroblasts and C) normal fibroblast treated for 3 weeks (magnification: 10x).

Treatment of MPS I fibroblasts

In order to determine if this up-regulation of M6PR was caused by enzyme administration or was specific to ARSA, *M6PR* expression was evaluated in fibroblasts from MPS I patients after treatment with conditioned media from BHK^{Idua} (the enzyme deficient in MPS I). Figure 4 A shows that the MPS I fibroblasts were corrected, and their enzyme activity reached normal levels within the second week of treatment. Conversely, no significant increase in *M6PR* expression was detected (figure 4 B).

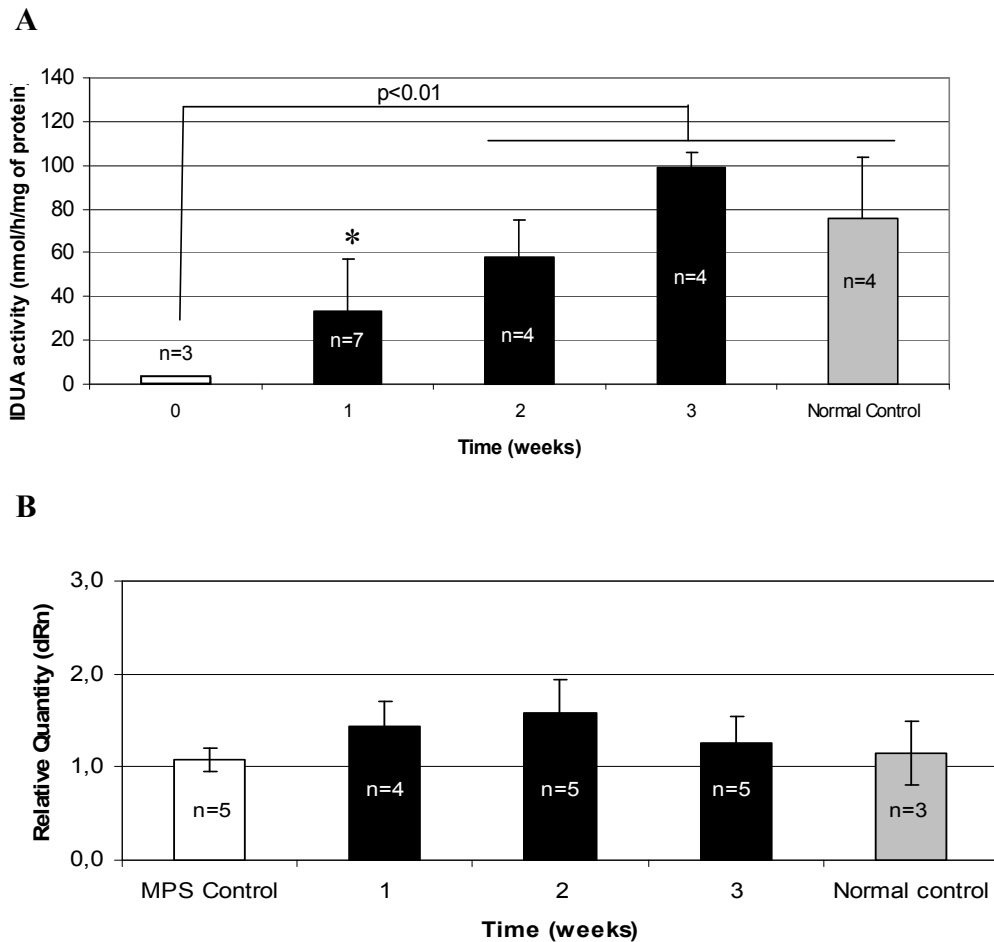


Figure 4. IDUA activity and *M6PR* expression in MPS I fibroblasts treated with BHK^{*Idua*} conditioned media for 3 weeks. A) IDUA activity in MPS I fibroblasts. * Different of week 3 and normal control (One way ANOVA, $p < 0.01$); B) Relative quantity of *M6PR* expression. No statistical difference was found among the groups ($p = 0.08$). *Note:* Values represent mean \pm SD.

Finally, we tested if a pre-treatment with BHK^{*Arsa*} conditioned media in MPS I fibroblasts would change the uptake of IDUA. In MPS I fibroblasts treated with BHK^{*Arsa*} conditioned media for 3 weeks and then with BKH^{*Idua*} conditioned media for 5 days the enzyme activity increased from 2.91 ± 0.65 to 100.84 ± 11.36 nmol/h/mg. This is significantly more than the 28.10 ± 21.4 nmol/h/mg of protein observed in fibroblasts without pre-treatment (Figure 5A). *M6PR* expression corroborates all previous findings, as the pre-treated group shows a two-fold increase in expression (Figure 5 B).

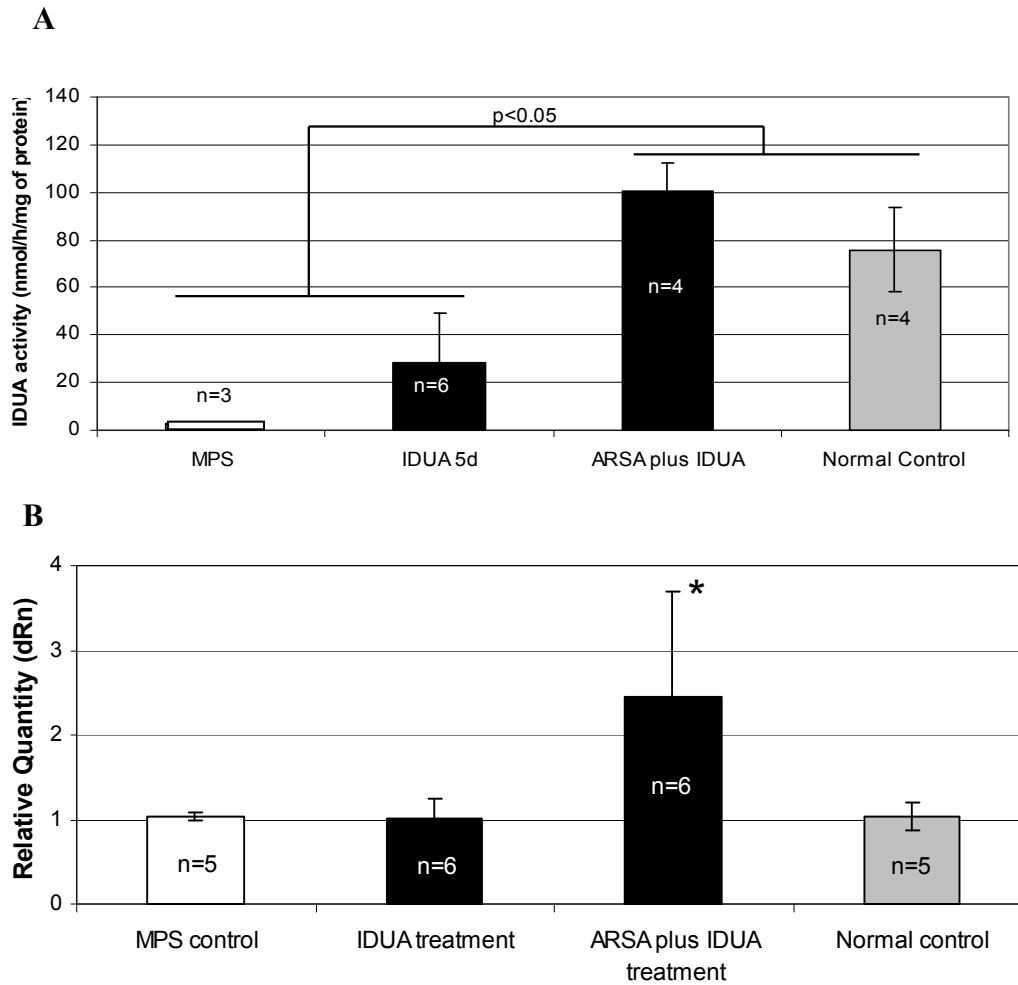


Figure 5. IDUA activity and *M6PR* expression in MPS I fibroblasts pre-treated with BHK^{Arsa} conditioned media followed by BHK^{Idua} conditioned media. A) IDUA activity (One way ANOVA, $p < 0.01$); B) Relative quantity of *M6PR* expression. * Difference between all groups (One Way ANOVA, $p < 0.01$). Note: Values represent mean \pm SD.

DISCUSSION

At present study, we aimed to evaluate the M6PR expression in MLD, MPS I and normal fibroblasts after the treatment with the supernatant of BHK^{ARSA} cells. We showed that this treatment was able to increase the expression of this receptor and consequently the uptake of a different lysosomal enzyme was improved.

A study of Braukle et al (1989) also showed an increase in mannose receptors after pre-treatment with cholera toxin or pertussis toxin, increasing the number of cell surface receptor 2- and 1.5-fold, respectively. However, this increase was due to a modification in the signal transduction pathway that led to a redistribution of M6PR. In

our case, the increase in M6PR was not due redistribution but result of a two-fold increase in gene expression compared to control fibroblasts. This suggests that the supernatant of BHKARSA is somehow able to up-regulate this gene.

The mechanism causing this up-regulation is not known. It may be related to the binding of ARSA to the receptor, although this would be a unique feature among the lysosomal enzymes. In addition, it has been reported that the binding of mannose is able to block the receptors, without a positive feedback (Tsukimura et al, 2008).

The up-regulation could also be caused by a by-product of BHK cells, in this case, more specifically of BHK^{ARSA}, as the same phenomenon was not observed in fibroblasts treated with BHK^{IDUA}. Experiments using a purified recombinant ARSA (Martino et al, 2005) would help clarifying this issue.

If the purified ARSA fails to elicit the same response, it may suggest that a heterologous protein produced specifically by this BHK^{ARSA} cell line could be involved in the up-regulation mechanism. This clone was obtained by our group using pTRACER-CMV2 (Lagranha et al, 2008), an integrative vector that, by means of insertional mutagenesis, may have caused the superexpression of a second protein, in addition to ARSA. The M6PR 300 KDa is a complex receptor, with binding sites for different molecules, including Insulin-like Growth Factor II (IGF-II), Retinoic Acid (RA), Transforming Growth Factor β (TGF- β) and other proteins containing M6P residues (Gary-Bobo et al, 2007).

Anyway, despite the precise mechanism, this up-regulation of M6PR leads to a better uptake of other lysosomal enzymes, as shown by MPS I fibroblasts. These results show that this strategy could be used to improve the efficacy of enzyme replacement therapy.

Acknowledgements: TGC and VLL are recipients of a CAPES and CNPq scholarships, UM and RG are recipient of CNPq PQ scholarships. This work was supported by FIPE-HCPA.

REFERENCES

Arighi CN, Hartnell LM, Aguilar RC, Haft CR, Bonifacino JS. Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Cell Biol*, 2004;165:123–133.

Braulke T, Bonifacino JS. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2009;1793:605–614.

Gary-Bobo M, Nirdé P, Jeanjean A, Morère A, Garcia M. Mannose 6-phosphate receptor targeting and its applications in human diseases. *Curr Med Chem*, 2007;14(28):2945-53.

Hopwood JJ, Muller V, Smithson A, Baggett N. 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. *Clin Chim Acta*, 1979; 92(2):257-65.

Lagranha VL, Baldo G, de Carvalho TG, Burin M, Saraiva-Pereira ML, Matte U, Giugliani R. In vitro correction of ARSA deficiency in human skin fibroblasts from metachromatic leukodystrophy patients after treatment with microencapsulated recombinant cells. *Metab Brain Dis*, 2008; 23(4):469-84.

Lee-Vaupel M, Conzelmann E. A simple chromogenic assay for arylsulfatase A. *Clin Chim Acta*, 1987; 164:171–180.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193:265-275

Martino S, Consiglio A, Cavalieri C, Tiribuzi R, Costanzi E, Severini GM, Emiliani C, Bordignon C, Orlacchio A. Expression and purification of a human, soluble Arylsulfatase A for Metachromatic Leukodystrophy enzyme replacement therapy. *J Biotechnol*, 2005; 117(3):243-51.

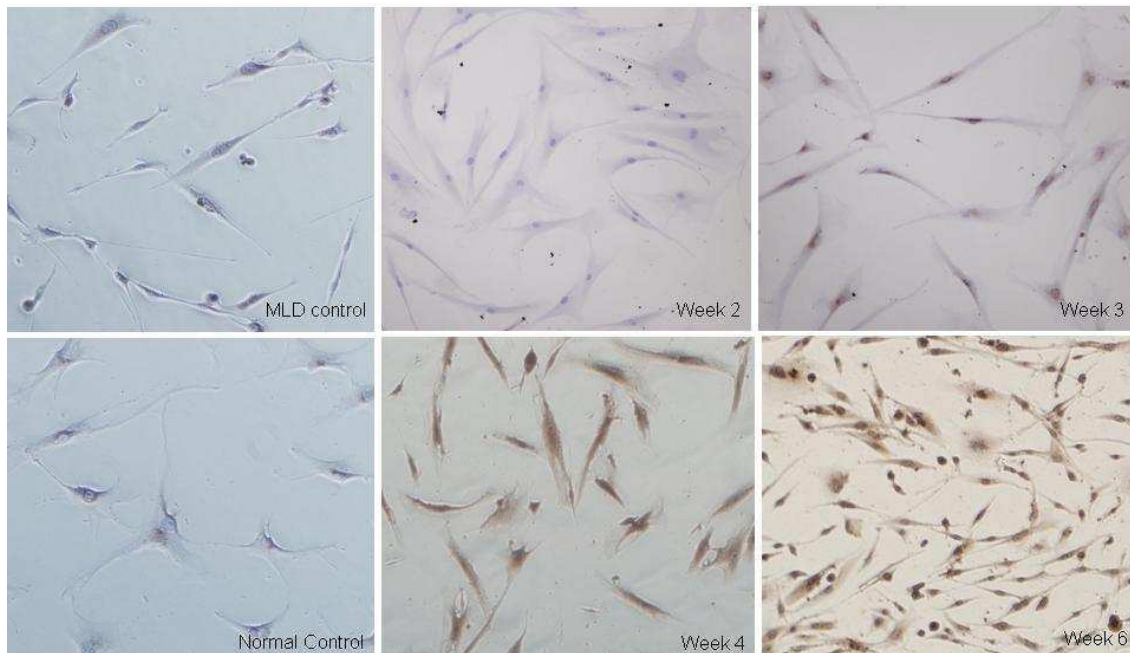
Mayer FQ, Baldo G, de Carvalho TG, Lagranha VL, Giugliani R, Matte U. Effects of cryopreservation and hypothermic storage on cell viability and enzyme activity in recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase. *Artif Organs*, 2010; 34(5):434–439.

Tsukimura T, Tajima Y, Kawashima I, Fukushige T, Kanzaki T, Kanekura T, Ikekita M, Sugawara K, Suzuki T, Togawa T, Sakuraba H. Uptake of a recombinant human alpha-L-iduronidase (Iaronidase) by cultured fibroblasts and osteoblasts. *Biol Pharm Bull*, 2008; 31(9):1691-5

von Figura K, Hasilik A. Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem*, 1986; 55:167-93.

Yadavalli S, Nadimpalli SK. Role of cation independent mannose 6-phosphate receptor protein in sorting and intracellular trafficking of lysosomal enzymes in chicken embryonic fibroblast (CEF) cells. *Glycoconj J*, 2010; 27(1):39-48.

SUPPLEMENTARY MATERIAL



Supplementary Figure. Immunocytochemistry in MLD fibroblasts (untreated and treated) and normal fibroblasts with anti-46 KDa antibody (magnification: 10x).

4. RESULTADOS ADICIONAIS

No último ano do doutorado foi possibilitado um estágio na Universidad del Pais Vasco, na cidade de Vitória na Espanha. Esse estágio foi realizado no laboratório de Desarrollo y Evaluación de Medicamentos, coordenado pelo Dr. Gorka Orive que é um especialista em encapsulação. Seu grupo domina a área de melhoramento e caracterização de biomateriais, bem como sua combinação para melhor uso *in vivo*. Assim, a contribuição deste estágio foi de extrema importância para podermos dar continuidade ao projeto, no que diz respeito à melhora da biocompatibilidade do alginato *in vivo*, nosso principal problema até então.

Neste grupo, a técnica de encapsulação é realizada utilizando-se um alginato ultrapuro, o '*Ultra Pure Low Viscosity Guluronic*' (UP LVG) fornecido pela empresa norueguesa FMC Nova Matrix™. Este alginato contém cerca de 60% de conteúdo de blocos gulurônicos, baixa viscosidade, além de baixos níveis de proteínas. Além do uso do alginato UP LVG, as cápsulas formadas sofrem um recobrimento com poli-L-lisina 0,05% (PLL), para diminuir o tamanho dos poros e dificultar o acesso do sistema imune. No entanto, como a PLL é imunogênica, as cápsulas são novamente recobertas com uma solução menos concentrada de UP LVG (0,1%). Devido a sua constituição, as microcápsulas formadas são chamadas de APA (alginato-PLL-alginato).

Desta forma, ao retornar ao Brasil propomo-nos a utilizar a mesma técnica aprendida na Espanha. O alginato ultrapuro foi adquirido, e cápsulas recobertas com PLL e alginato (APA) foram produzidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Para podermos comparar o efeito das cápsulas APA, *in vivo*, com os resultados anteriormente para as cápsulas de alginato marca Sigma (a partir de agora referido apenas como alginato), utilizamos as mesmas concentrações celulares e implantamos o mesmo volume em um grupo de quatro camundongos MPS I.

Os resultados adicionais obtidos ainda são parciais e encontram-se descritos a seguir:

4.1 Caracterização Morfológica das Microcápsulas

As microcápsulas de APA produzidas com alginato ultrapuro demonstraram melhor morfologia em relação às microcápsulas de alginato não puro. As deformidades avaliadas foram em menor número conforme pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem de imperfeições morfológicas encontradas nas microcápsulas de alginato e APA.

	Morfologia	% de cápsulas deformadas
Cápsula Alginato	Colabadas	5,8
	Com cauda	8,8
	Superfície irregular	5,5
Total:		20,1
Cápsula APA	Colabadas	1,9
	Com cauda	3,1
	Superfície irregular	2,6
Total:		7,6

Os aspectos gerais em relação à morfologia podem ser observados na figura 5.

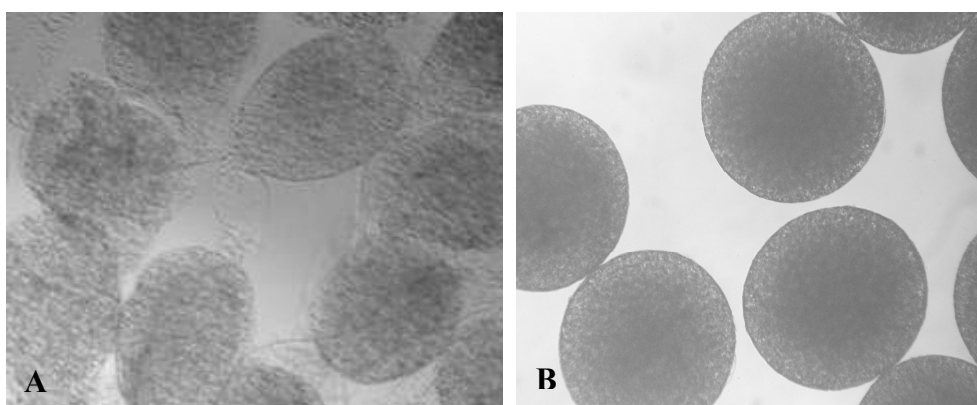


Figura 5. Aspecto geral das células microencapsuladas. A) Microcápsulas de Alginato com cápsulas deformadas e com picos; B) Microcápsulas de APA com formato mais homogêneo. (Aumentos: 4x).

O tamanho das microcápsulas foi medido usando o ImageProPlus® software e os tamanhos variaram de 400 a 800 μm . A microscopia eletrônica de varredura revelou fissuras inter conectadas na superfície capsular, confirmando a presença de uma matriz porosa (figura 6).

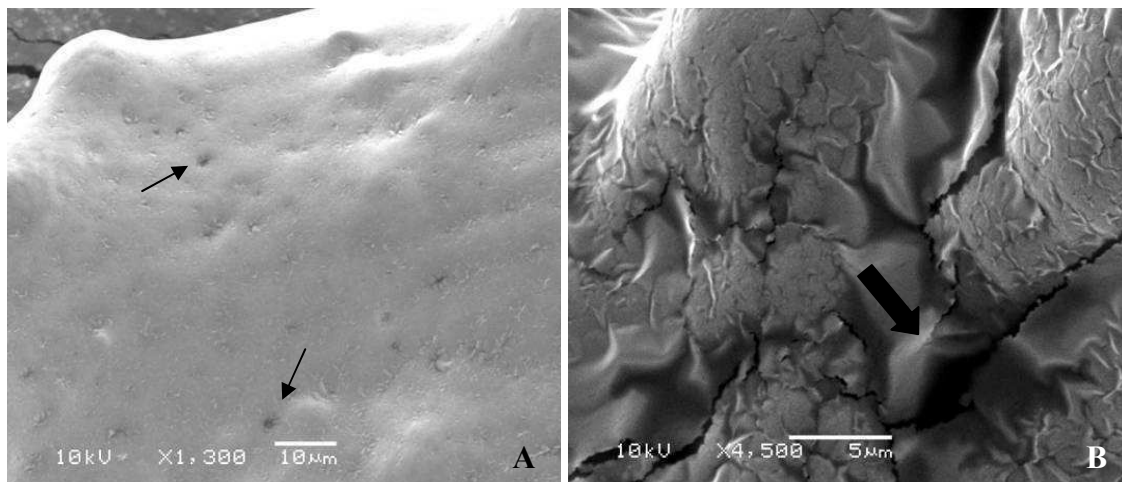


Figura 6. Microscopia Eletrônica de Varredura nas cápsulas de alginato. Setas indicam a matriz porosa. A) Superfície capsular (aumento: 1.300x); B) Fissuras interconectando toda a superfície capsular (aumento: 4500x).

4.2 Implante das Microcápsulas de APA em camundongos MPS I

No que diz respeito à atividade de IDUA no soro dos animais tratados após 7 e 15 dias, não houve diferença nos valores encontrados em relação a 15 dias. Já em 7 dias os níveis de IDUA passam de não detectáveis para $0,58 \pm 0,19$ nmol/h/mL de soro (figura 7).

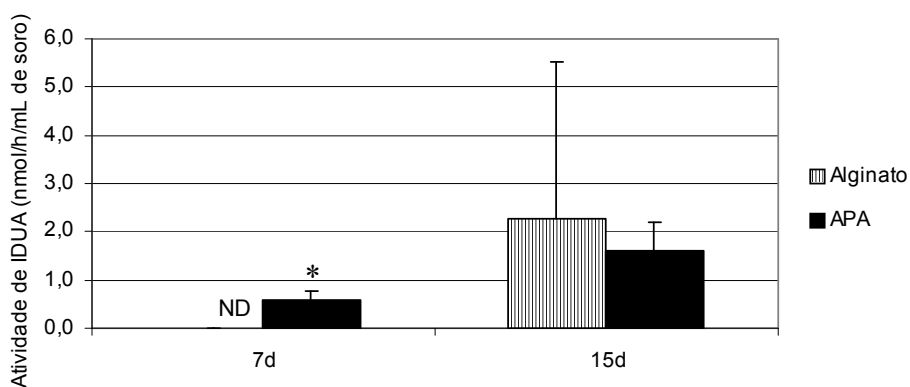
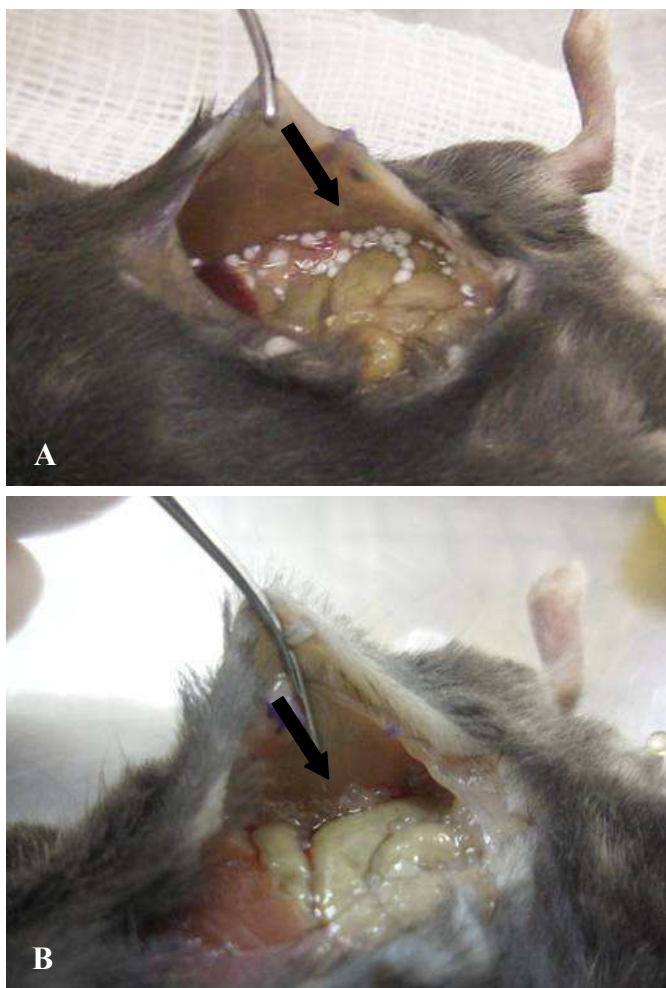


Figura 7. Atividade de IDUA no soro dos camundongos MPS I após 7 e 15 dias de implante. * Diferença entre grupo tratado com APA e alginato em 7 dias (*Independent Samples Mann-Whitney Test*, $p < 0,05$). ND= não detectável.

Quando retiradas da cavidade abdominal e colocadas em cultura a liberação de IDUA para o meio extra-capsular foi de $98,05 \pm 30,24$ nmol/h/mL de meio para as cápsulas de APA e de $42,34 \pm 20,10$ nmol/h/mL de meio para as cápsulas de alginato. Isto demonstra que o alginato ultrapuro, bem como o tratamento com PLL, parecem melhorar a liberação da enzima para o meio.

Além disso, o aspecto das cápsulas no momento da sua retirada após os 15 dias de implante também foi diferente entre as duas composições de cápsulas. Não observamos nenhuma cápsula de APA aderida a órgãos. Além disso, o aspecto das mesmas foi diferente, sendo as de APA mais “transparentes” que aquelas compostas apenas por alginato, que eram mais esbranquiçadas e endurecidas (figura 8).

Figura 8. Aspecto das cápsulas implantadas por 15 dias, no momento da retirada da cavidade abdominal de camundongos MPS I. As setas indicam as microcápsulas. A) Microcápsulas de alginato; B) Microcápsulas de APA.



A análise histológica foi avaliada por espessura do infiltrado inflamatório e percentual de fibrose. No grupo tratado com APA ambos os parâmetros parecem diminuir. A espessura do infiltrado passa de $32,82 \pm 2,4$ para $17,86 \pm 3,4$ μm , já a fibrose diminui, mas sem diferença estatística (tabela 4).

Tabela 4. Comparação entre dois tipos cápsulas de alginato implantadas na cavidade peritoneal de camundongos MPS I.

Grupo	Infiltrado Inflamatório (μm)	Formação de fibrose (%)
Alginato	$32,82 \pm 2,4^a$	$60,0 \pm 21,8$
APA	$17,86 \pm 3,4$	$31,5 \pm 10,7$

Note: Valores expressam média \pm desvio padrão. **a-** Diferença entre cápsulas de alginato e APA quanto ao infiltrado inflamatório (Independent Samples t-Student test, $p < 0,01$).

A figura 9 demonstra a espessura do infiltrado inflamatório após 15 dias de implante. Notamos que a superfície celular parece ser bem diferente em APA.

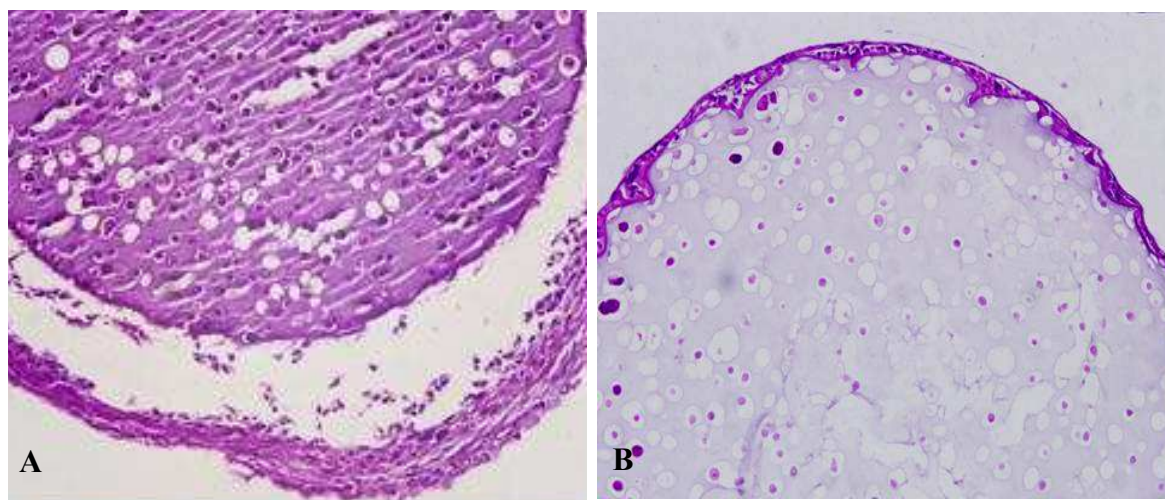


Figura 9. Infiltrado inflamatório em cápsulas implantadas por 15 dias. A. Cápsula de alginato; B. Cápsula APA. Aumento: 20x.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho objetivamos aperfeiçoar o sistema de liberação e captação de enzimas lisossomais superexpressas por células recombinantes microencapsuladas para o tratamento de doenças lisossômicas. Uma vez que a estratégia de encapsulação celular vem sendo muito utilizada em estudos de terapias gênica e celular (Ambrosino *et al*, 2003; Prakash & Martoni, 2006; Zhang *et al*, 2007), o comportamento destas frente a diferentes tipos celulares, sítio de implantação e tempo de sobrevivência em cada sítio implantado deve ser mais bem caracterizado.

Assim sendo, o estudo do comportamento de células encapsuladas *in vivo* é uma etapa importante para que a microencapsulação celular possa ser utilizada com sucesso. Em 2006, Wang e colaboradores relataram diferenças na taxa de proliferação *in vitro* e *in vivo* de células-tronco embrionárias de ratos quando encapsuladas. Através de técnicas de microscopia confocal, eles detectaram uma taxa de proliferação celular muito maior *in vivo* em células encapsuladas implantadas no peritônio, destacando a forte influência do microambiente pericapsular para o metabolismo celular.

Realizamos então um estudo inicial implantando cápsulas contendo dois tipos celulares (BHK e HepG2) em 3 distintos sítios de implante em ratos Wistar, objetivando caracterizar o comportamento inflamatório e viabilidade desses tipos celulares *in vivo*. No entanto, a recuperação das cápsulas foi dificultada pela aderência destas aos tecidos dos animais e por estarem envolvidas por uma rede de fibrose, o que impossibilitou a verificação da viabilidade das células encapsuladas pelas técnicas que tínhamos disponíveis. Assim, investigamos a resposta inflamatória formada em reação às cápsulas através de contagens dos tipos celulares mais freqüentemente encontrados no infiltrado inflamatório, medida da espessura deste e quantificação da área de fibrose formada em cada grupo.

Macrófagos e células gigantes multinucleadas estão claramente envolvidos na resposta imunológica que se forma contra vários biomateriais (Anderson *et al*, 2008). Os resultados que obtivemos por meio da contagem de células presentes no infiltrado inflamatório mostraram que há um grande

número de macrófagos, e presença de células gigantes multinucleadas, tanto nos animais que receberam células encapsuladas (BKH e HepG2) quanto nos que receberam cápsulas vazias, indicando uma possível resposta do tipo 'corpo estranho' ao alginato. Este é o tipo de resposta que é mais comumente formada na presença de um biomaterial, e tende a ser reduzida e resolvida em pouco tempo (Anderson *et al*, 2008). Para confirmar essa redução avaliamos o número de células em 7 e 21 dias. Nos animais mortos 21 dias após o implante, houve diminuição significativa do número de células gigantes multinucleadas nas secções de músculo analisadas, o que condiz com o fato de que a resposta do tipo corpo estranho é mais intensa nos primeiros dias após a implantação.

Anderson e colaboradores (2008) relatam que a presença de linfócitos e plasmócitos no sítio de implantação das cápsulas, além de macrófagos e algumas células gigantes aderidas ao alginato, caracteriza uma inflamação crônica. Corroborando esses achados, os nossos resultados mostraram que há aumento significativo de plasmócitos e linfócitos nos animais que morreram 21 dias após o implante das cápsulas, tempo suficiente para formação de uma inflamação crônica.

Também verificamos que o infiltrado inflamatório diminui após 21 dias da implantação das cápsulas, e que não há diferença deste parâmetro entre ratos que receberam cápsulas vazias e ratos que receberam células encapsuladas (BKH e HepG2). Estas são evidências de que a resposta que está ocorrendo é principalmente uma resposta formada contra o alginato. Este é considerado o polímero mais adequado para a fabricação de microcápsulas, devido às suas características de não interferência no material encapsulado e sua capacidade de formar géis rígidos em condições fisiológicas (Ponce *et al*, 2006). Entretanto, sua biocompatibilidade ainda é motivo de discussão, pois sendo um polímero natural, ele pode ser contaminado. Além disso, os processos industriais utilizados para a sua extração podem introduzir mais contaminantes. Algumas dessas impurezas incluem endotoxinas, alguns tipos de proteínas e polifenóis, que estão associados à diminuição da sua biocompatibilidade. Também há evidências de que as características das ligações entre as moléculas que formam o polímero podem exercer influência na sua biocompatibilidade (Uludag *et al*, 2000).

A formação de fibrose e inflamação são um grande problema em face da tecnologia de encapsulação celular (Matte et al, 2010), já que elas limitam a liberação e captação do produto terapêutico e comprometem a viabilidade das células imobilizadas (Tam et al, 2009; Jayant et al, 2011). Essas observações ressaltam a importância do desenvolvimento de mecanismos que melhorem a biocompatibilidade das cápsulas. Para isso testamos a encapsulação de células tronco-mesenquimais (CTM), que possuem propriedades imunomodulatórias e baixa imunogenicidade (Zhao et al, 2010).

Alguns estudos têm sido realizados encapsulando CTM (Liu et al, 2009; Zhou et al, 2011). Goren e colaboradores (2010) encapsularam CTM em APA por longos períodos e provaram que as células mantinham sua viabilidade, suas propriedades de células-tronco e seu potencial de proliferação dentro das microcápsulas. Baseado nestes conceitos, nós encapsulamos células-tronco mesenquimais obtidas da medula de ratos Wistar e implantamos nos três mesmos sítios (músculo vasto medial, tecido subcutâneo e cavidade peritoneal) para comparar os resultados quanto à inflamação.

Nossos resultados mostram que todos os ratos que receberam células microencapsuladas, seja CTM, BHK ou HepG2, desenvolveram infiltrado inflamatório com presença de macrófagos, células gigantes multinucleadas e linfócitos ao redor das cápsulas. Essas células, como já citado anteriormente, estão claramente envolvidas na resposta formada contra vários biomateriais. Porém, a espessura do infiltrado inflamatório foi menor naqueles ratos que receberam CTM, quando comparados aos animais que receberam linhagens, tanto em 7 quanto em 21 dias. Quando avaliamos o tamanho da área fibrótica, nos grupos que receberam linhagem celular, esta área aumentou dos 7 aos 21 dias de implante, enquanto nos animais que receberam CTM, esta área não aumentou. Esses resultados corroboram as propriedades imunomodulatórias das CTM, que parecem exercer tal propriedade pela liberação de citocinas na área ao redor das cápsulas

O uso de CTM encapsulada parece aumentar a biocompatibilidade e permitindo melhor eficácia do sistema. Para isso, pode-se realizar uma co-encapsulação contendo dois tipos celulares: as CTM e as células expressando o produto terapêutico, ou ainda modificar as CTM para que esta produza o produto terapêutico. Para qualquer uma das opções são necessários mais

estudos que determinem as proporções entre cada tipo celular utilizado na co-encapsulação e estudos que verifiquem se as propriedades imunomodulatórias das CTM se mantêm após a inserção de um plasmídeo, por exemplo.

Uma vez que o interesse do nosso grupo é o tratamento de DL, iniciamos um protocolo pré-clínico em camundongos *knock-out* para o gene *Idua*, modelo animal de MPS I. Neste momento, nosso objetivo era desenvolver a prova de conceito de que uma linhagem celular BHK superexpressando *Idua* produzida em nosso laboratório (Mayer et al, 2010) e imobilizada em cápsulas de alginato, seria capaz de diminuir o acúmulo de GAGs teciduais e melhorar as manifestações da doença. Por razões de facilidade de acesso, optou-se pelo implante das cápsulas na cavidade intra-peritoneal dos animais. Os resultados obtidos foram parcialmente satisfatórios em parte devido à formação de uma resposta imune pericapsular que pode ter diminuído a liberação da enzima. (Baldo et al, 2012, *in press*).

Para comprovar que a diminuição na liberação da enzima *in vivo* era devida à formação de fibrose, testamos o efeito da administração de prednisolona como droga imunomoduladora nos camundongos. Prednisolona é um corticosteróide, indicado para o tratamento de doenças envolvendo inflamação e dor. Ela reduz a inflamação por suprimir a migração de leucócitos polimorfonucleares e reverter o aumento da permeabilidade capilar (Bílková et al, 2011). O uso combinado das microcápsulas e antiinflamatórios ou agentes imunossupressores já foram descritos na literatura (Peduto et al, 2000; Omer et al, 2003b; Bungler et al, 2005; Baruch et al, 2009; Murua et al, 2009). Neste contexto, microcápsulas contendo células superexpressando Eritropoetina foram produzidas com seu centro contendo PLGA (poli-lactic co-glycolic acid) com dexametasona, para que a droga fosse sendo vagarosamente liberada pelo polímero. As cápsulas foram então implantadas no subcutâneo em camundongos e nenhuma resposta significativa foi observada (Murua et al, 2011).

Nós observamos que a prednisolona foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório, bem como o percentual de tecido fibrótico ao redor das cápsulas, tanto nos camundongos normais, quanto nos MPS I. A presença de macrófagos e células gigantes multinucleadas está de acordo com nossos achados anteriores. Embora não possamos comparar diretamente os grupos,

já que a resposta não foi quantificada, a reação imunológica parece não ser totalmente resolvida com o uso da prednisolona na dose avaliada. Doses maiores, que levam à imunossupressão, até poderiam apresentar um resultado mais efetivo, porém os efeitos adversos da imunossupressão tornariam a sua utilidade limitada do ponto de vista clínico.

A ativação do sistema imune é uma questão complexa e que inicia já com os procedimentos cirúrgicos. Mais precisamente a lesão do tecido vascularizado, causado pela incisão, induz a uma imediata liberação de células inflamatórias e proteínas plasmáticas, bem como a liberação de fatores bioativos, como as citocinas e óxido nítrico. Isso significa que a reação inicia antes do implante ser colocado no corpo (Tam et al, 2000). Além disso, a cavidade peritoneal é um local com alta resposta inflamatória devido a presença do peritônio, que atua como uma barreira defensiva na presença do qualquer corpo estranho (Robitaille et al, 2005).

Com o objetivo de verificar se as células mantinham suas funções normais, apesar da presença de fibrose e infiltrado inflamatório, nós avaliamos a viabilidade celular e a liberação de enzima para o meio de cultura das cápsulas recuperadas dos animais após os 15 dias de implante. A viabilidade celular manteve-se alta, inclusive nos grupos que não receberam prednisolona, sugerindo que a fibrose e a resposta inflamatória não são capazes de causar grandes perdas celulares no interior das cápsulas. A enzima foi liberada para o meio extra-capsular e em maiores quantidades nos grupos que receberam o antiinflamatório. Esses resultados sugerem que a resposta inflamatória de fato diminui a quantidade de enzima liberada no meio.

Mesmo que o uso da prednisolona melhore a liberação da enzima *in vitro*, esta melhora não foi acompanhada pelo aumento na quantidade de enzima circulante *in vivo* após 15 dias. Entretanto, em períodos menores (7 dias) o tratamento com prednisolona elevou a quantidade de enzima para níveis detectáveis no soro dos animais MPS I. A razão para que não se tenha observado um efeito mais longo pode ser pelo pequeno número de animais analisados, mas também pode estar relacionada a uma reação imune contra a enzima, que já foi descrita em pacientes tratados com a TRE (Kakkis et al, 2001; Ponder, 2008).

O desenvolvimento de um microambiente protetor para o transplante pode ser um exemplo interessante para a entrega de produtos terapêuticos, mas a administração em longo prazo de prednisolona mesmo em doses baixas apresenta efeitos colaterais como distúrbios músculo-esqueléticos, gastrintestinais, dermatológicos, metabólicos, endócrinos e oftalmológicos. Portanto, esse protocolo deve ser usado com cuidado por curtos períodos de tempo. No nosso modelo, estudos mais extensivos deverão ser realizados para nos certificarmos da eficácia desta abordagem.

A partir do contato com um grupo espanhol com maior experiência em encapsulação, iniciamos um estudo piloto tratando camundongos MPS I com células BHK superexpressando IDUA, encapsuladas em um alginato ultra-puro (FMC Nova MatrixTM) e recobertas PLL, formando uma cápsula composta por APA. Uma vez que o alginato é purificado, a chance de produzir resposta é muito menor.

As cápsulas de APA demonstraram (mesmo que em um estudo inicial) uma morfologia mais homogênea em relação àquelas feitas apenas com o alginato. As cápsulas APA tiveram menor formação de caudas e deformidades do que as de alginato apenas. Isso se dá pela composição do alginato, que por ser purificado, contém poucos contaminantes como poli-fenóis e outras proteínas e pelas trocas catiônicas no recobrimento com a PLL. Estudos de microscopia eletrônica de varredura deverão ser realizados nas cápsulas contendo o alginato purificado e APA, para comparar a superfície celular e matriz porosa.

Os resultados em relação à atividade de IDUA no soro dos animais tratados com APA foi diferente apenas em 7 dias. Talvez isso seja pela formação de anticorpos neutralizantes anti-IDUA, conforme já foi destacado anteriormente. Já ao serem colocadas em cultura, as cápsulas de APA demonstraram uma maior liberação de IDUA para o meio. Esses resultados são corroborados pelos achados histológicos, que mostram a diminuição da fibrose e espessura do infiltrado.

Estudos mais extensos utilizando APA e eventualmente outros sítios de implantação são necessários para confirmar a utilidade desta abordagem para o tratamento da MPS I. Estes estudos estão em andamento no laboratório.

Um segundo enfoque do trabalho foi voltado para a captação das enzimas lisossomais, uma vez que a microencapsulação propõe a entrega dessas enzimas, mas não garante que as mesmas sejam eficientemente captadas pelas células deficientes. O mecanismo de captação das enzimas lisossômicas envolve receptores de Manose-6-Fosfato (M6PR) localizados na membrana plasmática e lisossomal.

Em função disso, realizamos um estudo objetivando avaliar a expressão dos receptores de manose 6-fosfato em fibroblastos de pacientes com LDM, MPS I e normais, após o tratamento com o sobrenadante de células BHK^{Arsa}. Nós percebemos que esse tratamento foi capaz de aumentar a expressão do receptor e conseqüentemente a captação das enzimas lisossomais foi elevada. Não foi possível realizar o RT-qPCR para amostras de fibroblastos de LDM obtidos na primeira, quinta e sexta semanas de tratamento, devido a qualidade dessas amostras. Na primeira semana, pequenas quantidades de RNA foram obtidas porque a quantidade inicial plaqueadas foi de $0,5 \times 10^5$ cels/poço. Já nas quinta e sexta semana os fibroblastos começaram a soltar-se do fundo da placa de cultura, resultando em pouquíssimas células ou em RNA de baixa qualidade.

Um estudo de Braukle e colaboradores (1989) mostraram que houve um aumento no número de M6PR na superfície celular de 2 e 1,5 vezes após pré-tratamento com as toxinas colérica ou pertussis, respectivamente. Entretanto, essa elevação foi devido a uma redistribuição dos ligantes de M6PR devido a uma via de transdução de sinal sensitiva à toxina colérica ou pertussis. No nosso caso, o aumento dos receptores não foi devido à sua redistribuição, uma vez que a quantificação por PCR em tempo real mostrou uma superexpressão em comparação aos fibroblastos controles.

Este aumento da expressão pode ser causado diretamente pela ligação de ARSA ao M6PR. Entretanto, se esse for o caso, não é um mecanismo comum às demais enzimas lisossômicas, já que o aumento de expressão de M6PR não foi observado em fibroblastos tratados com Idua. Além disso, a interação não pode ser relacionada com os sítios de manose, já que é possível bloquear e/ou saturar esses sítios com diferentes concentrações de manose sem, no entanto, alterar a expressão de receptor (Tsukimura et al, 2008).

Para checar se há algo inerente a ARSA que causa a superexpressão dos M6PR poderia-se, por exemplo, tratar os fibroblastos com a enzima recombinante purificada e disponível para ensaios clínicos de TRE para LDM (Metazym®, Shire Pharmaceutical Development). Se a Metazym® também elevar a expressão dos M6PR, nós podemos afirmar que este é um mecanismo inerente a enzima ARSA. Caso contrário, outros mecanismos devem ser investigados.

Esse efeito pode ser limitado à enzima recombinante ARSA expressa pelas células BHK. Talvez essa enzima possua algum tipo de modificação pós-traducional que interage diferencialmente com o receptor causando um 'feedback' positivo. Se isto for verdade, nós podemos afirmar que essa modificação pós-traducional não é relacionada com a glicosilação e fosforilação, porque a expressão do cDNA de ARSA em células BHK apresenta o mesmo modelo da enzima sintetizada em fibroblastos humanos, incluindo a forma glicosilada e deglicosilada (Stein et al, 1989). Para testar essa hipótese se poderia avaliar o tamanho da enzima produzida nessa e em outras células por western blot ou ainda por espectroscopia de massas *in tandem*.

Ainda, é possível que essa superexpressão seja devida a ligação de outras moléculas nos diferentes sítios presentes no receptor. O receptor de 300 KDa (também chamado de IGFIIR) é uma proteína multifuncional à qual se liga o *Insulin-like Growth Factor II* (IGF-II), Ácido Retinóico (AR), *Transforming Growth Factor* β (TGF- β) latente e outras proteínas contendo resíduo de manose-6-fosfato. Essas moléculas que estariam ativando o receptor não devem fazer parte do metabolismo usual das células BHK, pois nos fibroblastos tratados com meio condicionado de BHK^{IDUA} não houve superexpressão do M6PR. Assim, esse suposto ligante poderia estar relacionado especificamente ao clone obtido na transfecção das BHK com vetor pTRACER-CMV2 (Invitrogen-USA) descrito por Lagranha e colaboradores (2008). Sugere-se que houve uma possível inserção do transgene ao genoma hospedeiro, já que integração espontânea no genoma receptor pode ocorrer por recombinação, embora isso aconteça em uma pequena fração das células transfectadas. Talvez o cDNA da ARSA tenha se integrado em sítios específicos e ativado fatores que ativem a regulação dos

M6PR. Para testar essa hipótese, uma nova clonagem do gene *ARSA* poderia ser testada tanto utilizando outro vetor, quanto outro tipo celular.

Estudos prévios têm demonstrado que o M6PR tem um papel crítico no desenvolvimento de mamíferos e que sua expressão é controlada tanto por mecanismos epigenéticos quanto fatores tecido-específico. Liu e colaboradores (1995) identificaram uma região '*enhancer*' de 54 pb dentro do promotor, mas sua regulação é ainda desconhecida. A acetilação de histonas tem um papel crítico na superexpressão do M6PR/IGFR1I. Chu e colaboradores (2012) revelaram que este gene teve um aumento de expressão em células H9c3 células tratadas com fator de necrose tumoral (TNF- α), lipopolissacarídeo (LPS), angiotensina II (ANGII) e inomicina. Interessantemente, a acetilação de histona foi essencial para ANGII induzir a expressão de *IGF-1IR*. Usando inibidores químicos para bloquear individualmente ou a histona acetiltransferase ou a histona deacetilase, seria possível verificar se o mecanismo que causa a superexpressão está ou não relacionado a mudanças epigenéticas.

Qualquer que seja o mecanismo pelo qual ocorre essa ativação do M6PR, ela leva a uma melhora no processo de captação de outras enzimas lisossômicas, como demonstrado neste trabalho com fibroblastos de pacientes com MPS I. Porém, é preciso conhecer melhor o mecanismo para evitar a ocorrência de efeitos secundários. A habilidade dos M6PR para regular e direcionar as enzimas lisossomais, facilitar a ativação do inibidor de crescimento TGF- β , e modular os níveis circulantes de citocinas e do fator inibitório de leucemia, sugere que estes podem ter um importante papel na supressão tumoral (Hébert, 2006). Várias linhas de evidência suportam a hipótese de que M6PR atua como um inibidor de crescimento e que a perda das funções dos receptores está associada com a progressão da tumorigênese. A descoberta de que a superexpressão de M6PR resulta na inibição do crescimento tanto *in vitro* quanto *in vivo* é consistente com essas idéias (O'Gorman et al, 2002).

Embora a superexpressão dos receptores possam estar associada com a diminuição da proliferação e crescimento celular, esses parâmetros não foram avaliados quantitativamente em nosso trabalho. Apenas uma diferença visual foi observada na proliferação dos fibroblastos MPS I tratados com o

sobrenadante das BHK^{IDUA}. O número inicial de células foi o mesmo em todos os experimentos, mas no grupo IDUA, após 3 semanas as células encontravam-se totalmente confluentes, enquanto no grupo ARSA a confluência só foi alcançada na quarta semana.

Finalmente, nós também avaliamos os M6PR de 46 KDa por imunocitoquímica, e este também apresentou-se aumentado pela análise qualitativa. Mas, neste caso, nós não podemos afirmar se estes receptores tiveram sua expressão (mRNA) aumentada ou se eles apenas sofreram um redistribuição via transdução de sinal, uma vez que não avaliamos este receptor por RT-qPCR. Cabe lembrar que o M6PR de 46 KDa é codificado por um gene distinto do receptor de 300 KDa (Gari-Bobo et al, 2007).

Os experimentos sugeridos acima devem ser realizados antes que se possa propor a utilização de um pré-tratamento com ARSA para aumentar a eficácia da TRE para outras DL. Porém, este mecanismo pode ser uma estratégia adjuvante no tratamento com TRE ou células encapsuladas.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram testadas duas estratégias para aperfeiçoar o sistema de liberação e captação de enzimas lisossômicas: o aperfeiçoamento das microcápsulas e o aumento da expressão dos receptores de manose-6-fosfato.

A resposta inflamatória após implante de microcápsulas em ratos Wistar foi maior aos 7 do que aos 21 dias, sendo que no músculo vasto medial e subcutâneo parece ter sido maior em função do contato direto das cápsulas ao tecido adjacente. Células BHK se mostraram as mais viáveis para a encapsulação.

O uso de células-tronco mesenquimais encapsuladas gerou menor resposta inflamatória, demonstrando o efeito imunomodulador destas células.

O tratamento com antiinflamatório Prednisolona diminui a resposta inflamatória às microcápsulas implantadas no peritônio tanto em camundongos normais quanto com MPS I tratados com células rBHK.

A atividade enzimática de IDUA no plasma sanguíneo de animais MPS I tratados ou não com Prednisolona e células BHK^{IDUA} encapsuladas passou de níveis indetectáveis para 2,4 nmol/h/mL de soro.

Após 15 dias de implante intraperitoneal as BHK^{IDUA} encapsuladas permaneceram viáveis e a liberação da enzima para o meio extra-capsular foi maior nos grupos tratados com Prednisolona.

O tratamento com o sobrenadante de células BHK^{ARSA} levou a um aumento na expressão dos M6PR em fibroblastos de pacientes com Leucoditrofia Metacromática e de indivíduos normais, visualizado tanto por imunocitoquímica quanto por RT-qPCR.

O pré-tratamento com o sobrenadante de células BHK^{ARSA} levou a um aumento na expressão dos M6PR e aumentou a captação de IDUA por fibroblastos de pacientes com MPS I.

7. REFERENCIAS

Ambrosino G, Varotto S, Basso SM, Cecchetto A, Carraro P, Naso A, De Silvestro G, Plebani M, Abatangelo G, Donato D, Cestrone A, Giron G, D'Amico DF. Hepatocyte transplantation in the treatment of acute liver failure: microencapsulated hepatocytes versus hepatocytes attached to an autologous biomatrix. *Cell Transplant*, 2003;12(1):43-9.

Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol*, 2008; 20(2):86-100.

Baldo G, Mayer F, Martinelli B, Meyer F, Burin M, Meurer L, Tavares A, Giugliani R, Matte U. Intraperitoneal implant of recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase partially corrects visceral pathology in MPS I mice. *Cytotherapy*, 2012; *In press*.

Barcia C, Gerdes C, Xiong WD, Thomas CE, Liu C, Kroeger KM, Castro MG, Lowenstein PR. Immunological thresholds in neurological gene therapy: highly efficient elimination of transduced cells might be related to the specific formation of immunological synapses between T cells and virus-infected brain cells. *Neuron Glia Biol*, 2007; 13;(2):309-322.

Baroli B, Photopolymerization of biomaterials: issues and potentialities in drug delivery, tissue engineering and cell encapsulation applications. *J Chem Technol Biotechnol*, 2006; 81:491-9.

Barsoum SC, Milgram W, Mackay W, Coblenz C, Delaney KH, Kwiecien JM, Kruth AS and Chang PL. Delivery of recombinant gene product to canine brain with the use of microencapsulation. *J Lab Clin Med*, 2003; 142(6):399-413.

Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, Di Bisceglie AM, Doppelt SH, Hill SC, Mankin HJ, Murray GJ, Parker RI, Argoff CE, Grewak RP, Yu K. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency—macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N Engl J Med*, 1991; 324 (21):1464–1470.

Baruch L, Machluf M. Alginate-chitosan complex coacervation for cell encapsulation: effect on mechanical properties and on long-term viability. *Biopolymers*, 2006; 82(6):570-9.

Baruch L, Benny O, Gilert A, Ukobnik M, Itzhak OB, Machluf M. Alginate-PLL cell encapsulation system co-entrapping PLGA-microspheres

for the continuous release of anti-inflammatory drugs. *Biomed Microdevices*, 2009; 11:1103–1113.

Beck M. Therapy for Lysosomal Storage Disorders. *IUBMB Life*, 2010; 62(1):33–40

Bellin I, Kelch S, Langer R et al. Polymeric triple-shape materials. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 103(48):18043-7.

Benzoni E, Torre ML, Faustini M et al. Transient transfection of porcine granulosa cells after 3D culture in barium alginate capsules. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2005; 18(4):677-82.

Bílková E, Imramovský A, Sedlák M. Recent advances in the design and synthesis of prednisolone and methylprednisolone conjugates. *Curr Pharm Des*, 2011; 17(32):3577-95.

Bloch J, Bachoud-Lévi AC, Déglon N, Lefaucheur JP, Winkel L, Palfi S, Nguyen JP, Bourdet C, Gaura V, Remy P, Brugières P, Boisse MF, Baudic S, Cesaro P, Hantraye P, Aebischer P, Peschanski P. Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther*, 2004; 15(10) 968-75.

Boelens JJ, Prasad VK, Tolar J, Wynn RF, Peters C. Current international perspectives on hematopoietic stem cell transplantation for inherited metabolic disorders. *Pediatr Clin N Am*, 2010; 57 (1):123–145.

Braccini I, Pérez S. Molecular basis of C(2)-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, 2001; 2(4):1089-96.

Braulke T, Tippmer S, Neher E, von Figura K. Regulation of the mannose 6-phosphate/IGF II receptor expression at the cell surface by mannose 6-phosphate, insulin like growth factors and epidermal growth factor. *EMBO J*, 1989; 8(3):681-6.

Bunger CM, Tiefenbach B, Jahnke A, Gerlach C, Freier T, Schmitz KP, Hopt UT, Schareck W, Klar E, de Vos P. Deletion of the tissue response against alginate-PLL capsules by temporary release of coencapsulated steroids. *Biomaterials*, 2005; 26:2353-2360.

Chang PL. Encapsulation for somatic gene therapy. *Ann N Y Acad Sci*, 1999; 875:146-58.

Chang TM. Semipermeable microcapsules. *Science*, 1964; 146:524-5.

Chu CH, Lo JF, Hu WS, Lu RB, Chang MH, Tsai FJ, Tsai CH, Weng YS, Tzang BS, Huang CY. Histone acetylation is essential for ANG-II-induced IGF-IIR gene expression in H9c2 cardiomyoblast cells and pathologically hypertensive rat heart. *J Cell Physiol*, 2012; 227(1):259-68.

Cotugno G, Tessitore A, Capalbo A, Annunziata P, Strisciuglio C, Faella A, Aurilio M, Di Tommaso M, Russo F, Mancini A, De Leonibus E, Aloj L, Auricchio A. Different serum enzyme levels are required to rescue the various systemic features of the mucopolysaccharidoses. *Hum Gene Ther*, 2010; 21 (5):555–569.

Darrabie MD, Kendall WF, Opara EC. Effect of alginate composition and gelling cation on microbead swelling. *J Microencapsul*, 2006; 23(6):613-21.

De Vos P, Faas MM, Strand B et al. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials*, 2006; 27(32):5603-17.

Deichmann A, Hacein-Bey-Abina S, Schmidt M, Garrigue A, Brugman MH, Hu J, Glimm H, Gyapay G, Prum B, Fraser CC, Fischer N, Schwarzwaelder K, Siegler ML, de Ridder D, Pike-Overzet K, Howe SJ, Thrasher AJ, Wagemaker G, Abel U, Staal FJ, Delabesse E, Villeval JL, Aronow B, Hue C, Prinz C, Wissler M, Klanke C, Weissenbach J, Alexander I, Fischer A, von Kalle C, Cavazzana-Calvo M. Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. *J Clin Invest*, 2007; 117(8):2225-32.

Dickson PI. Novel treatments and future perspectives: outcomes of intrathecal drug delivery. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2009; 47 Suppl 1:S124-7.

Donati I, Holtan S, Mørch YA et al. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. *Biomacromolecules*, 2005; 6(2):1031-40.

Draget KI, Skjåk-Braek G, Smidsrød O. Alginate based new materials. *Int J Biol Macromol*, 1997; 21(1-2):47-55.

Drury JL, Dennis RG, Mooney DJ. The tensile properties of alginate hydrogels. *Biomaterials*, 2004; 25(16):3187-99.

Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther*, 2011; 2(4):34.

Dufrane D, Goebbels RM, Saliez A, Guiot Y, Gianello P. Six-month survival of microencapsulated pig islets and alginate biocompatibility in primates: proof of concept. *Transplantation*, 2006; 81(9):1345-53.

Dusseault J, Leblond FA, Robitaille R, Jourdan G, Tessier J, Ménard M, Henley N, Hallé JP Microencapsulation of living cells in semi-permeable membranes with covalently cross-linked layers. *Biomaterials*, 2005; 26(13):1515-22.

Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*, 2005; 5(3):161-71.

Friedland JC, Lee MH, Boettiger D. Mechanically Activated Integrin Switch Controls alpha5beta1 Function. *Science*, 2009; 323:642-4.

Friso A, Tomanin R, Alba S, Gasparotto N, Puicher EP, Fusco M, Hortelano G, Muenzer J, Marin O, Zacchello F and Scarpa M. Reduction of GAG storage in MPS II mouse model following implantation of encapsulated recombinant myoblasts. *J Gene Med*, 2005; 7:1482-91.

Gan Q, Wang T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2007; 59 (1):24–34.

Gary-Bobo M, Nirdé P, Jeanjean A, Morère A, Garcia M. Mannose 6-phosphate receptor targeting and its applications in human diseases. *Curr Med Chem*, 2007;14(28):2945-53.

Genes NG, Rowley JA, Mooney DJ, Bonassar LJ. Effect of substrate mechanics on chondrocyte adhesion to modified alginate surfaces. *Arch Biochem Biophys*, 2004; 422(2):161-7.

Giugliani R, Federhen A, Rojas MV, Vieira T, Artigalás O, Pinto LL, Azevedo AC, Acosta A, Bonfim C, Lourenço CM, Kim CA, Horovitz D, Bonfim D, Norato D, Marinho D, Palhares D, Santos ES, Ribeiro E, Valadares E, Guarany F, de Lucca GR, Pimentel H, de Souza IN, Correa J Neto, Fraga JC, Goes JE, Cabral JM, Simionato J, Llerena J Jr, Jardim L, Giuliani L, da Silva LC, Santos ML, Moreira MA, Kerstenetzky M, Ribeiro M, Ruas N, Barrios P, Aranda P, Honjo R, Boy R, Costa R, Souza C, Alcantara FF, Avilla SG, Fagundes S, Martins AM.

Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genet Mol Biol*, 2010; 33(4):589-604.

Goren A, Dahan N, Goren E, Baruch L, Machluf M. Encapsulated human mesenchymal stem cells: a unique hypoinmunogenic platform for long-term cellular therapy. *FASEB J*, 2010; 24(1):22-31.

Grandoso L, Ponce S, Manuel I, Arrúe A, Ruiz-Ortega JA, Ulibarri I, Orive G, Hernández RM, Rodríguez A, Rodríguez-Puertas R, Zumárraga M, Linazasoro G, Pedraz JL, Ugedo L. Long-term survival of encapsulated GDNF secreting cells implanted within the striatum of parkinsonized rats. *Int J Pharm*, 2007; 343(1–2):69–78.

Griffon DJ, Sedighi MR, Sendemir-Urkmez A, Stewart AA, Jamison R. Evaluation of vacuum and dynamic cell seeding of polyglycolic acid and chitosan scaffolds for cartilage engineering. *Am J Vet Res*, 2005; 66(4):599–605.

Harmatz P, Whitley CB, Waber L, Pais R, Steiner R, Plecko B, Kaplan P, Simon J, Butensky E, Hopwood JJ. Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *J Pediatr*, 2004; 144(5):574–580.

Hébert E. Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptorexpression and tumor development. *Biosci Rep*, 2006; 26(1):7-17.

Heese BA. Current strategies in the management of lysosomal storage diseases. *Semin Pediatr Neurol*, 2008 ;15(3):119-26.

Hobbs JR, Barret AJ, Chambers D, James D, Hugh-Jones K, Byrom N, Henry K, Lucas C, Benson B, Tansley L, Patrick A, Mossman J, Young E Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet*, 1981; 2:709-712.

Hugh-Jones K, Hobbs JR, Vellodi A, et al. Long-term follow-up of children with Hurler's disease treated with bone marrow transplantation. In: Hobbs JR (Ed). *Correction of certain genetic diseases by transplantation*. London: COGENT. 1989, p. 103-111.

Jayant RD, McShane MJ, Srivastava R. *In vitro* and *in vivo* evaluation of anti-inflammatory agents using nanoengineered alginate carriers: towards localized implant inflammation suppression. *Int J Pharm*, 2011;17;403(1-2):268-75.

Kakkis E, Muenzer J, Tiller G, Waber L, Bekmont J, Passage M, Izykowski B, Phillips J, Doroshov R, Walot I, Hoft R, Yu K, Okazaki S, Lewis D, Thompson J, Neufeld E . Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *New England J Med*, 2001; 344:182-188.

Khademhosseini A, Eng G, Yeh J, Fukuda J, Blumling J 3rd, Langer R, Burdick JA. Micromolding of photocrosslinkable hyaluronic acid for cell encapsulation and entrapment. *J Biomed Mater Res A*, 2006; 9(3):522-32.

Kishima H, Poyot T, Bloch J, Dauguet J, Condé F, Dollé F, Hinnen F, Pralong W, Palfi S, Déglon N, Aebischer P, Hantraye P. Encapsulated GDNF-producing C2C12 cells for Parkinson's disease: a pre-clinical study in chronic MPTP-treated baboons. *Neurobiol Dis*, 2004; 16 (2):428–439.

Kuijlen JM, de Haan BJ, Helfrich W, de Boer JF, Samplonius D, Mooij JJ, de Vos P. The efficacy of alginate encapsulated CHO-K1 single chain-TRAIL producer cells in the treatment of brain tumors. *J Neurooncol*, 2006; 78:31-9.

Lagranha VL, Baldo G, de Carvalho TG, Burin M, Saraiva-Pereira ML, Matte U, Giugliani R. In vitro correction of ARSA deficiency in human skin fibroblasts from metachromatic leukodystrophy patients after treatment with microencapsulated recombinant cells. *Metab Brain Dis*, 2008; 23(4):469-84.

Lindvall, O, Wahlberg, LU. Encapsulated cell biodelivery of GDNF: a novel clinical strategy for neuroprotection and neuroregeneration in Parkinson's disease? *Exp Neurol*, 2008; 209:82-8.

Liu Y, Liu T, Ma X, Fan X, Bao C, Cui Z. Effects of encapsulated rabbit mesenchymal stem cells on ex vivo expansion of human umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *J Microencapsul*, 2009; 26(2):130-42.

Liu Z, Mittanck DW, Kim S, Rotwein P. Control of insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor gene transcription by proximal promoter elements. *Mol Endocrinol*. 1995, 9(11):1477-87.

Mann BK, Gobin AS, Tsai AT, Schmedlen RH, West JL. Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: synthetic ECM analogs for tissue engineering. *Biomaterials*, 2001; 22(22):3045-51.

Martins AM. Introduction to Brazilian Guidelines to Diagnosis, Treatment, and Monitoring for Gaucher Disease, Fabry Disease, Mucopolysaccharidosis I, and Pompe Disease. *J Pediatr*, 2009; 155(4 Suppl):S9.

Martinsen A, Skjåk-Bræk G, Smidsrød O. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng*, 1989; 33(1):79-89.

Matte U, Lagranha VL, de Carvalho TG, Mayer FQ, Giugliani R. Cell microencapsulation: a potential tool for the treatment of neuronopathic lysosomal storage diseases. *J Inher Metab Dis*, 2011; 34(5):983-90.

Matte U, Baldo G, Giugliani R. Non Viral Gene Transfer Approaches for Lysosomal Storage Disorders. *In: Xubo Yuan. (Org.). Non-viral Gene Therapy. : InTech - Open Access Publisher, 2011, p. 1-16.*

Matzner U, Herbst E, Hedayati KK, Lüllmann-Rauch R, Wessig C, Schröder S, Eistrup C, Möller C, Fogh J, Gieselmann V. Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *Hum Mol Genet*, 2005; 14:1139–1152

Mayer FQ, Baldo G, de Carvalho TG, Lagranha VL, Giugliani R, Matte U. Effects of cryopreservation and hypothermic storage on cell viability and enzyme activity in recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase. *Artif Organs*, 2010; 34(5):434–439.

Maysinger D, Berezovskaya O, Fedoroff S. The hematopoietic cytokine colony stimulating factor 1 is also a growth factor in the CNS: (II). Microencapsulated CSF-1 and LM-10 cells as delivery systems. *Exp Neurol*, 1996; 141(1):47–56.

Mokry J, Karbanová J, Lukás J et al. Biocompatibility of HEMA copolymers designed for treatment of CNS diseases with polymer-encapsulated cells. *Biotechnol Prog*, 2000; 16(5):897-904.

uenzer J, Wraith JE, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, Eng CM, Vellodi A, Martin R, Ramaswami U, Gucsavas-Calikoglu M, Vijayaraghavan S, Wendt S, Puga AC, Ulbrich B, Shinawi M, Cleary M, Piper D, Conway AM, Kimura A. A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Genet Med*, 2006; 8 (8):465–473.

Munarin F, Petrini P, Farè S, Tanzi MC. Structural properties of polysaccharide-based microcapsules for soft tissue regeneration. *J Mater Sci Mater Med*, 2010; 21(1):365-75.

Munoz-Rojas MV, Vieira T, Costa R, Fagundes S, John A, Jardim LB, Vedolin LM, Raymundo M, Dickson PI, Kakkis E, Giugliani R. Intrathecal enzyme replacement therapy in a patient with mucopolysaccharidosis type I and symptomatic spinal cord compression. *Am J Med Genet A*, 2008; 146A(19):2538-44.

Murua A, Orive G, Hernández RM, Pedraz JL. Xenogeneic transplantation of erythropoietin-secreting cells immobilized in microcapsules using transient immunosuppression. *J. Control. Release*, 2009; 137:174–178.

Murua A, Orive G, Hernandez RM, Pedraz JL. EPO delivery by genetically engineered C2C12 myoblasts immobilized in microcapsules. *Adv Exp Med Biol*, 2010; 670:54–67.

Murua A, Herran E, Orive G, Igartua M, Blanco FJ, Pedraz JL, Hernández RM. Design of a composite drug delivery system to prolong functionality of cell-based scaffolds. *Int J Pharm*, 2011;407(1-2):142-50.

Nakama H, Ohsugi K, Otsuki T, Date I, Kosuga M and Sakuragawa N. Encapsulation cell therapy for mucopolysaccharidosis type VII using genetically engineered immortalized human amniotic epithelial cells. *Tohoku J Exp. Med*, 2006; 209(1):23-32.

Nardi NB, Teixeira LAK, da Silva EFA. Terapia Gênica. *Ciência e Saúde Coletiva*, 2002; 7: 109-116.

O'Gorman DB, Weiss J, Hettiaratchi A, Firth SM, Scott CD. Insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor overexpression reduces growth of choriocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Endocrinology*, 2002; 143(11):4287-94.

Omer A, Duvivier-Kali VF, Trivedi N et al. Survival and maturation of microencapsulated porcine neonatal pancreatic cell clusters transplanted into immunocompetent diabetic mice. *Diabetes*, 2003a; 52(1):69-75.

Omer A, Keegan M, Czismadia E, de Vos P, Van Rooijen N, Bonner-Weir S, Weir GC. Macrophage depletion improves survival of porcine neonatal pancreatic cell clusters contained in alginate macrocapsules transplanted into rats. *Xenotransplantation*, 2003b; 10: 240-251.

De Castro M, Orive G, Hernández RM, Bartkowiak A, Brylak W, Pedraz JL. Biocompatible oligochitosans as cationic modifiers of alginate/Ca microcapsules. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2005; 74(1):429-39.

Orive G, Gascón AR, Hernández RM, Igartua M, Luis Pedraz J. Cell microencapsulation technology for biomedical purposes: novel insights and challenges. *Trends Pharmacol Sci*, 2003; 24(5):207-10.

Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M, Rojas A, Pedraz JL. Microencapsulation of an anti-VE cadherin antibody secreting IB5 hybridoma cells. *Biotechnol Bioeng*, 2001; 76: 285-94.

Orive G, Hernandez RM, Rodriguez Gascon A, Calafiore R, Chang TM, de Vos P, Hortelano G, Hunkeler D, Lacik I and Pedraz JL. History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. *Trends biotechnol*, 2004; 22(2): 87-92.

Orive G, Ponce S, Ández AR, Gascón M, Igartua JL, Pedraz JL. Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials*, 2002; 23:3825-3831.

Orive G, Tam SK, Pedraz JL, Hallé JP. Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials*, 2006; 27(20):3691-700.

Parkinson-Lawrence EJ, Shandala T, Prodoehl M, Plew R, Borlace GN, Brooks DA. Lysosomal storage disease: revealing lysosomal function and physiology. *Physiology*, 2010; 25:102–115.

Peduto G, Rinsch C, Schneider BL, Rolland E, Aebischer P. Long-term host unresponsiveness to encapsulated xenogeneic myoblasts after transient immunosuppression, *Transplantation*, 2000; 70: 78–85.

Peirone M, Ross CJ, Hortelano G, Brash JL, Chang PL. Encapsulation of various recombinant mammalian cell types in different alginate microcapsules. *J Biomed Mater Res*, 1998; 15(42 (4)):587–96.

Piller Puicher E, Tomanin R, Salvalaio M, Friso A, Hortelano G, Marin O, Scarpa M. Encapsulated engineered myoblasts can cure Hurler syndrome: preclinical experiments in the mouse model. *Gene Ther*, 2011; *In press*.

Ponce S, Orive G, Hernández R, Gascón AR, Pedraz JL, de Haan BJ, Faas MM, Mathieu HJ, de Vos P. Chemistry and the biological response against

immunoisolating alginate-polycation capsules of different composition. *Biomaterials*, 2006; 27(28):4831-9.

Ponder KP. Immune response hinders therapy for lysosomal storage diseases. *J Clin Invest*, 2008; 118(8):2686-9.

Prakash S, Martoni C. Toward a new generation of therapeutics: artificial cell targeted delivery of live cells for therapy. *Appl Biochem Biotechnol*, 2006;128(1):1-22.

Prasad VK, Kurtzberg J. Transplant outcomes in mucopolysaccharidoses. *Semin Hematol*, 2010; 47(1):59-69.

Robitaille R, Dusseault J, Henley N, Desbiens K, Labrecque N, Hallé JP. Inflammatory response to peritoneal implantation of alginate-poly-L-lysine microcapsules. *Biomaterials*, 2005; 26(19):4119-27.

Ross CJD, Ralph M, Chang PL. Somatic Gene Therapy for a Neurodegenerative Disease Using Microencapsulated Recombinant Cells. *Experimental Neurology*, 2000; 166; 276-286

Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, 1999; 20(1):45-53.

Rowley JA, Mooney DJ. Alginate type and RGD density control myoblast phenotype. *J Biomed Mater Res*, 2002; 60(2):217-23.

Sakai S, Kawabata K, Ono T et al. Development of mammalian cell-enclosing subsieve-size agarose capsules (<100 micron) for cell therapy. *Biomaterials*, 2005; 26(23):4786-92.

Sakai S, Ito S, Ogushi Y, Hashimoto I, Hosoda N, Sawae Y, Kawakami K. Enzymatically fabricated and degradable microcapsules for production of multicellular spheroids with well-defined diameters of less than 150 micron. *Biomaterials*, 2009; 30(30):5937-42.

Santos E, Zarate J, Orive G, Hernández RM, Pedraz JL. Biomaterials in cell microencapsulation. *Adv Exp Med Biol*, 2010; 670:5-21.

Schiffmann R, Kopp JB, Austin HA 3rd, Sabnis S, Moore DF, Weibel T, Balow JE, Brady RO. Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2001; 285(21):2743–2749.

Schmidt JJ, Rowley J, Kong HJ. Hydrogels used for cell-based drug delivery. *J Biomed Mater Res A*, 2008; 87(4):1113-22.

Seong JM, Kim BC, Park JH, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang YS. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater*, 2010; 5(6):062001.

Sikorski P, Mo F, Skjåk-Braek G et al. Evidence for egg-box-compatible interactions in calcium-alginate gels from fiber X-ray diffraction. *Biomacromolecules*, 2007; 8(7):2098-103.

Sly WS, Fischer HD, Gonzalez-Noriega A, Grubb JH, Natowicz M. Role of the 6-phosphomannosyl-enzyme receptor in intracellular transport and adsorptive pinocytosis of lysosomal enzymes. *Meth Cell Biol*, 1981; 23:191–214

Soleymaninejadian E, Pramanik K, Samadian E. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells: Cytokines and Factors. *Am J Reprod Immunol*, 2012; 67(1):1-8.

Souza MV, Krug BC, Picon P, Schwartz IVD. Medicamentos de alto custo para doenças raras no Brasil: o exemplo das doenças lisossômicas. *Ciência e Saúde Coletiva*, 2008; 883: 1-11.

Spuch C, Antequera D, Portero A, Orive G, Hernández RM, Molina JA, Bermejo-Pareja F, Pedraz JL, Carro E. The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Biomaterials*, 2010; 31(21):5608–5618

Stayton PS, Shimoboji T, Long C, Chilkoti A, Chen G, Harris JM, Hoffman AS. Control of protein-ligand recognition using a stimuli-responsive polymer. *Nature*, 1995; 378(6556):472-4.

Stein C, Gieselmann V, Kreysing J, Schimidt B, Pohlmann R, Waheed A, Meyer HE, O'brien JS, Von Figura K. Cloning and expression of human arylsulfatase A. *J Biol Chem*, 1989; 264:1252–1259.

Strand BL, Mørch YA, Syvertsen KR, Espevik T, Skjåk-Braek G. Microcapsules made by enzymatically tailored alginate. *J Biomed Mater Res A*, 2003; 64(3):540-50.

Tam SK, de Haan BJ, Faas MM, Hallé JP, Yahia L, de Vos P. Adsorption of human immunoglobulin to implantable alginate-poly-L-lysine microcapsules: effect of microcapsule composition. *J Biomed Mater Res A*, 2009; 89(3):609-15.

Thanos CG, Calafiore R, Basta G, Bintz BE, Bell WJ, Hudak J, Vasconcellos A, Schneider P, Skinner SJ, Geaney M, Tan P, Elliot RB, Tatnell M, Escobar L, Qian H, Mathiowitz E, Emerich DF. Formulating the alginate-polyornithine biocapsule for prolonged stability: evaluation of composition and manufacturing technique. *J Biomed Mater Res A*, 2007; 83(1):216-24.

Tsukimura T, Tajima Y, Kawashima I, Fukushige T, Kanzaki T, Kanekura T, Ikekita M, Sugawara K, Suzuki T, Togawa T, Sakuraba H. Uptake of a recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase) by cultured fibroblasts and osteoblasts. *Biol Pharm Bull*, 2008; 31(9):1691-5

Uludag H, Vos P and Tresco P. Technology of mammalian cell encapsulation. *Advac Drug Delivery Reviews*, 2000; 42: 29-64.

Van den Hout JM, Reuser AJ, de Klerk JB, Arts WF, Smeitink JA, Van der Ploeg AT. Enzyme therapy for pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk. *J Inherit Metab Dis*, 2001; 24(2):266–274.

Visted T, Bjerkgvig R, Enger PO. Cell encapsulation technology as a therapeutic strategy for CNS malignancies. *Neuro Oncol*, 2001; 3:201-10.

Vitner EB, Platt FM, Futerman AH. Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *J Biol Chem*, 2010; 285(27):20423–20427.

Walkley SU. Pathogenic cascades in lysosomal disease-Why so complex? *J Inherit Metab Dis*, 2009; 32(2):181–189.

Wang X, Wang W, Ma J, Guo X, Yu X, Ma X. Proliferation and differentiation of mouse embryonic stem cells in APA microcapsule: A model for studying the interaction between stem cells and their niche. *Biotechnol Prog*, 2006; 22(3):791-800.

Weber LM, Hayda KN, Haskins K et al. The effects of cell-matrix interactions on encapsulated beta-cell function within hydrogels functionalized with matrix-derived adhesive peptides. *Biomaterials*, 2007; 28(19):3004-11.

Wilcox WR. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *The journal of Pediatrics*, 2004; 144:3-14.

Zhang HL, Wu JJ, Ren HM, Wang J, Su YR, Jiang YP. Therapeutic effect of microencapsulated porcine retinal pigmented epithelial cells transplantation on rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Bull*, 2007; 23(3):137-44.

Zhang H, Zhu SJ, Wang W, Wei YJ, Hu SS. Transplantation of microencapsulated genetically modified xenogeneic cells augments angiogenesis and improves heart function. *Gene Ther*, 2008; 15(1):40-8.

Zhao S, Wehner R, Bornhäuser M, Wassmuth R, Bachmann M, Schmitz M. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders. *Stem Cells Dev*, 2010; 19(5):607-14.

Zhou H, Xu HH. The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2011; 32(30):7503-13.

Zielinski BA, Aebischer P. Chitosan as a matrix for mammalian cell encapsulation. *Biomaterials*, 1994; 15(13):1049-56.

Zimmermann U, Mimietz S, Zimmermann H, Hillgärtner M, Schneider H, Ludwig J, Hasse C, Haase A, Rothmund M, Fuhr G. Hydrogel-based non-autologous cell and tissue therapy. *Biotechniques*, 2000; 29(3):564-72.

Zimmermann H, Zimmermann D, Reuss R, Feilen PJ, Manz B, Katsen A, Weber M, Ihmig FR, Ehrhart F, Gessner P, Behringer M, Steinbach A, Wegner LH, Sukhorukov VL, Vásquez JA, Schneider S, Weber MM, Volke F, Wolf R, Zimmermann U. Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. *J Mater Sci Mater Med*, 2005; 16(6):491-501.

Zimmermann H, Wählich F, Baier C, Westhoff M, Reuss R, Zimmermann D, Behringer M, Ehrhart F, Katsen-Globa A, Giese C, Marx U, Sukhorukov VL, Vásquez JA, Jakob P, Shirley SG, Zimmermann U. Physical and biological properties of barium cross-linked alginate membranes. *Biomaterials*, 2007; 28(7):1327-45.

Zisch AH, Lutolf MP, Ehrbar M et al. Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell in growth matrices for vascularized tissue growth. *FASEB J*, 2003; 17(15):2260-2.

9. ANEXOS

9.1 Células microencapsuladas em alginato de cálcio: avaliação de parâmetros in vitro e in vivo

**Submetido para a revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre*

**CÉLULAS MICROENCAPSULADAS EM ALGINATO DE CÁLCIO: AVALIAÇÃO
DE PARÂMETROS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Talita Giacomet de Carvalho¹, Valeska Lagranha^{1,2}, Fabiana Quoos Mayer¹,
Guilherme Baldo^{1,3}, Luíse Meurer⁴, Roberto Giugliani^{1,2,3}, Ursula Matte¹

¹ Centro de Terapia Gênica, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

⁴ Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil

Correspondência: Ursula Matte
Centro de Terapia Gênica/Centro de Pesquisas
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Porto Alegre, RS, Brasil
Fone/Fax: +55 51 21018838 / +55 51 21018010
e-mail: umatte@hcpa.ufrgs.br

RESUMO

A microencapsulação celular tem sido proposta como uma estratégia promissora para o tratamento de uma grande variedade de doenças, pois além de proteger o material transplantado da ação do sistema imune, permite a liberação de produto terapêutico. Sua biocompatibilidade e capacidade imunoprotetora são essenciais para seu bom funcionamento. Neste trabalho objetivamos avaliar a viabilidade e cinética de proliferação *in vitro*, e a biocompatibilidade de células encapsuladas com diferentes concentrações de alginato. Para isso, células BHK e HepG2 foram encapsuladas e mantidas em cultura por até 28 dias para verificação da viabilidade e cinética de proliferação celular *in vitro*. Para avaliar a biocompatibilidade foram implantadas cápsulas vazias, células BHK e HepG2 encapsuladas em alginato 1,5 ou 2,0% na cavidade peritoneal, músculo vasto medial e por via subcutânea de ratos Wistar. Após 7 ou 21 dias, os ratos foram mortos e seus órgãos coletados para análise histológica. Um grupo de animais recebeu células BHK superexpressando Arilsulfatase A (rBHK) encapsuladas, para avaliar a liberação enzimática *in vivo*, durante 7 dias. Não houve diferença quanto à viabilidade e cinética de proliferação celular *in vitro* entre os grupos em nenhum tempo. Foi observada presença de fibrose e infiltrado inflamatório nos locais onde as cápsulas ficaram em contato com o tecido, porém este diminuiu após 21 dias. A contagem de células revelou diferenças no número de linfócitos, plasmócitos e células gigantes em relação aos diferentes tempos analisados, concentração de alginato ou composição da cápsula. Nos animais que receberam rBHK encapsuladas houve aumento da atividade da enzima em amostras do músculo em relação ao controle. Embora tenha sido notada a presença de infiltrado inflamatório, este não impediu a liberação da enzima para o tecido. Isso indica que, com alguns aperfeiçoamentos, esta é uma estratégia viável para o tratamento de várias doenças.

INTRODUÇÃO

A microencapsulação celular, que consiste no imuno-isolamento de células em membranas semipermeáveis, tem sido proposta como uma estratégia promissora para o tratamento de uma grande variedade de doenças (Consiglio *et al*, 2007; Gao *et al*, 2005). Seu princípio básico é a proteção das células encapsuladas da ação do sistema imune, ao mesmo tempo em que permite o seu desenvolvimento e proliferação, e a entrega do produto terapêutico ao hospedeiro (Ma *et al*, 2006). As membranas semipermeáveis das microcápsulas permitem a entrada de pequenas moléculas como oxigênio, nutrientes e eletrólitos necessários para que as células possam permanecer viáveis, e permitem a saída de metabólitos tóxicos, hormônios e outros componentes bio-ativos.

Desde que a microencapsulação foi proposta por Chang para a criação de órgãos bioartificiais (Chang, 1964), um grande número de tentativas têm sido feitas para imobilizar células e outros materiais biológicos em diferentes tipos de cápsulas (Jaya *et al*, 2008; Choudhury e Kar, 2008). Essas tentativas, associadas aos avanços da genética, biologia e tecnologias farmacológicas, fizeram com que a microencapsulação celular se tornasse o sistema preferencial para o transplante celular. Além disso, é uma estratégia potencial tanto para a reposição de órgãos (Hamid *et al*, 2001, Gao *et al*, 2005), quanto para a entrega controlada de produtos terapêuticos (Grandoso *et al*, 2007, Consiglio *et al*, 2007).

Entretanto, para que esse tipo de terapia seja viável em longo prazo, alguns desafios ainda devem ser enfrentados. É necessário o desenvolvimento de microcápsulas mecanicamente estáveis, com tamanho, morfologia e porosidade que permitam o transporte correto das moléculas para dentro e para fora da cápsula, e que sejam totalmente compatíveis com o hospedeiro. Além disso, a seleção de células adequadas para cada caso é importante, já que cada tipo celular apresenta diferenças na taxa de proliferação, e algumas podem se multiplicar e romper a membrana da cápsula entrando em contato com o organismo do hospedeiro, e conseqüentemente provocando reação do sistema imune (Orive *et al*, 2004). Os três principais fatores que podem limitar a sobrevivência das células microencapsuladas *in vivo* são a biocompatibilidade do enxerto, as propriedades imunoprotetoras das microcápsulas e a distância entre as células encapsuladas e o suprimento sanguíneo (Zimmermann *et al*, 2005).

Em vista disso, objetivamos caracterizar, *in vitro*, a viabilidade e a cinética de crescimento de células das linhagens BHK e HepG2 imobilizadas em microcápsulas de alginato e, caracterizar *in vivo* a biocompatibilidade destas microcápsulas com diferentes concentrações de alginato após 7 e 21 dias de implantação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo de células BHK e HepG2

As células das linhagens BHK (*Baby Hamster Kidney*) e HepG2 (células de hepatocarcinoma humano) foram plaqueadas em frascos de cultura de 75 cm² e cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*, LGC Biotecnologia, Brasil) enriquecido com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco, EUA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, EUA). Quando confluentes, foram tripsinizadas (tripsina 0,5% EDTA 5.3 mM, (Gibco, EUA) e divididas em 2 ou 3 frascos novos.

Células BHK recombinantes (rBHK) superexpressando a enzima arilsulfatase A (ARSA), obtidas por Lagranha e colaboradores (2008) foram cultivadas e encapsuladas para avaliar a liberação da enzima para o meio extra capsular, nos experimentos *in vivo*.

Encapsulação celular

Para a microencapsulação das células BHK e HepG2 foi utilizada a técnica já descrita pelo nosso grupo (Lagranha et al, 2008). As células foram cultivadas isoladamente até atingir 90% de confluência. Então as células foram misturadas a duas distintas concentrações de alginato de sódio (1,5% e 2,0%). As suspensões foram submetidas a um fluxo constante de 40 mL/h, em um aparelho perfusor acoplado a uma unidade de encapsulação (Nisco, Suíça). Ao passar pela extremidade da unidade, um jato de ar na velocidade de 4,0 L/min fez com que a suspensão caísse sobre uma solução de CaCl₂ 125 mM, ocorrendo assim a geleificação do alginato. Após encapsuladas, as células foram mantidas nas condições padrão de cultivo celular por 24h, onde foi realizado os experimentos subseqüentes.

Caracterização das microcápsulas *in vitro*

Para avaliar a cinética de proliferação das duas linhagens celulares e sua viabilidade, foram encapsuladas 7×10^5 células BHK por poço e 9×10^5 células HepG2 por poço, e mantidas em cultura durante 7, 14, 21 e 28 dias. Após cada tempo, as cápsulas foram rompidas pela adição de uma solução 150 mM de citrato de sódio. As células recuperadas foram tripsinizadas para a separação de possíveis grumos celulares, coradas com azul de trypan e contadas em câmara de Neubauer. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Caracterização das microcápsulas *in vivo*

Para avaliação da biocompatibilidade, as cápsulas foram implantadas em ratos Wistar machos, divididos em 6 grupos de 10 animais, que receberam: (1) células BHK encapsuladas em alginato 1,5%, (2) células BHK encapsuladas em alginato 2,0%, (3) células HepG2 encapsuladas em alginato 1,5%, (4) células HepG2 encapsuladas em alginato 2,0%, (5) cápsulas de alginato 1,5% vazias, (6) cápsulas de alginato 2,0% vazias. Para avaliar a liberação da enzima para o meio extra capsular, bem como sua captação pelos tecidos adjacentes ao local de implantação, foram realizados ainda dois grupos: (7) 4 ratos receberam células BHK recombinantes superexpressando a ARSA (rBHK) encapsuladas em alginato 1,5%, (8) 3 ratos receberam células rBHK encapsuladas em alginato 2,0%. Além disso, 6 ratos foram usados como grupo *sham*. Os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA-HCPA), sob temperatura controlada (entre 18 e 22°C) e em ciclos de claro-escuro de 12 horas. Alimentação e água foram fornecidas *ad libitum*. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob o número GPPG 07-608.

Implante das microcápsulas

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com 100mg/kg de Quetamina (Eurofarma Lab LTDA, SP, Brasil) 10% e 10mg/kg de Xilazina (Sespo Ind e Com LTDA, SP, Brasil) 2%. Após, foram feitas incisões de aproximadamente 1 cm para implantação das cápsulas no peritônio, no músculo vasto-medial e por via subcutânea no abdome. Nos animais que receberam cápsulas com células foram implantadas aproximadamente $1,85 \times 10^5$ células por sítio de implantação. O grupo *sham* recebeu apenas 1mL de meio de cultura DMEM em cada um dos três locais. Os ratos foram suturados, receberam o anestésico dipirona (0,01 mL/g) e foram mantidos em incubadora para recuperação.

Análise histológica

Cinco animais de cada grupo foram sacrificados em câmara de CO₂ 7 dias após o implante das cápsulas, o restante 21 dias após. Nos grupos que receberam células rBHK encapsuladas, os ratos foram sacrificados 7 dias após a implantação. Após o sacrifício, os órgãos e tecidos adjacentes ao sítio de implantação das cápsulas (músculo vasto-medial, pele do abdômen, fígado, baço, intestino delgado, omento e rim) foram coletados e fixados por 48 horas em formalina 10% tamponada. As secções foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e Picrossírius.

As secções coradas com HE foram analisadas em microscópio óptico para verificação da existência de infiltrado inflamatório e, quando presente, foi realizada a contagem de macrófagos, plasmócitos, linfócitos e células gigantes multinucleadas, em 5 campos por secção, em um aumento de 40x. Em um subgrupo de animais (n=17) também foi realizada a medida, em pixels, da espessura do infiltrado inflamatório entre o sítio de implantação e o tecido adjacente (em 20 pontos diferentes), através do software ImagePró-Express em um aumento de 4x.

As secções coradas com Picrossírius foram analisadas em microscópio óptico sendo avaliados 3 campos por lâmina, em um aumento de 10x. As imagens obtidas tiveram a área de fibrose quantificada, em pixels, por meio do software Adobe Photoshop CS3 (Baldo, 2008). Os resultados foram expressos em porcentagem de área de fibrose.

Ensaio da atividade enzimática da ARSA

Amostras do músculo vasto-medial, omento, fígado e baço dos ratos do grupo que recebeu células rBHK encapsuladas foram coletadas, maceradas e diluídas a 4% em água destilada. Após, foram sonicadas e centrifugadas para eliminar os *debris* celulares. A quantidade de proteína total foi determinada para cada amostra através do método de quantificação de Lowry (Lowry *et al*, 1951). A atividade enzimática da ARSA foi medida por ensaio colorimétrico (Lee-Vaupel e Conzelmann, 1987). O extrato de proteína foi incubado a 0°C com 10mM do substrato *p*-nitrocatecol-sulfato. Após 5h a reação foi parada com a adição de NaOH 1N, e a atividade da ARSA foi medida a 515 nm em espectrofotômetro (U-2001 Spectrophotometer, Hitachi). Os resultados foram expressos em nmol/h/mg de proteína.

Análise estatística

Para comparação dos dados de cinética de proliferação e viabilidade celular foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, pois os dados de proliferação celular foram comparados como porcentagem em relação ao número inicial de células. Para comparação do número de células presentes no infiltrado inflamatório e quantificação da área de fibrose foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, com Dunnett como *post hoc*. Para avaliar a interação entre os parâmetros (composição da cápsula, tempo de implantação e concentração de alginato) foram realizados testes de análise de univariância. Já para os ensaios enzimáticos, foi usado ANOVA de uma via, com Tukey como *post hoc*.

RESULTADOS

Encapsulação celular

O protocolo utilizado permitiu a produção de microcápsulas capazes de manter a integridade, a estabilidade e a viabilidade das células (Figura 1A, B e C). Utilizando velocidade de infusão das células de 40 mL/h e velocidade do fluxo de ar de 4 L/min, e partindo de uma quantidade inicial de $1,85 \times 10^5$ células em 300 μ L de solução de alginato, foram produzidas 1400 ± 210 cápsulas/mL, contendo aproximadamente $4,4 \times 10^2$ células/cápsula. O software ImageProPlus foi utilizado para medir as cápsulas de alginato, e os resultados obtidos mostraram uma variação de 300 a 800 μ m, com um tamanho médio de 500 μ m.

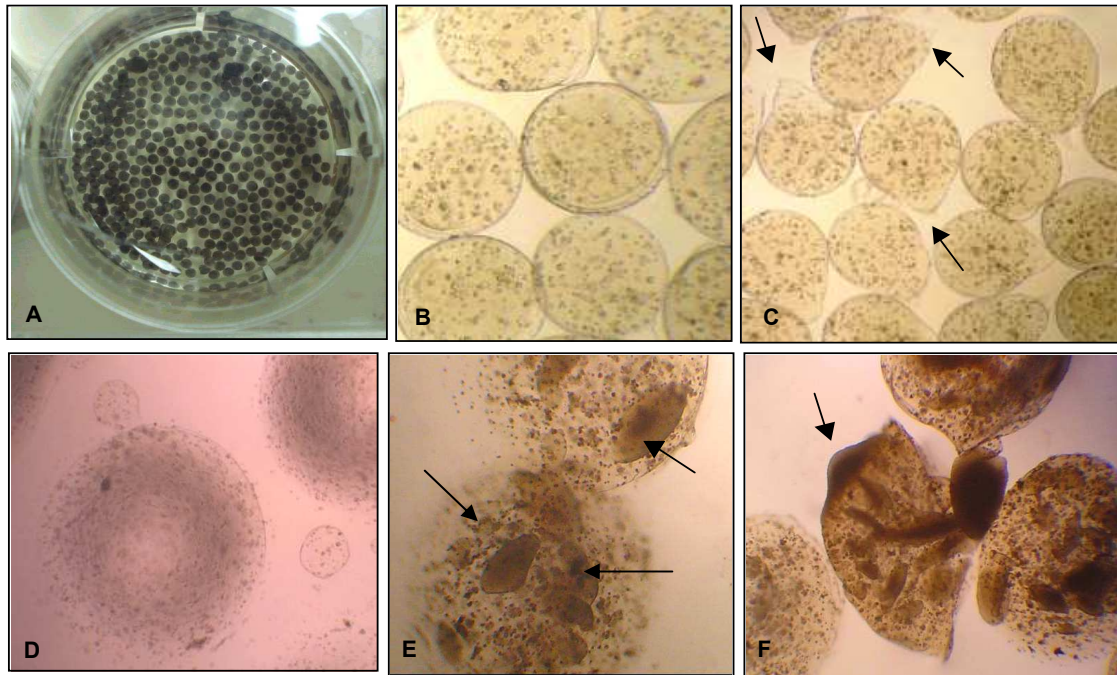


Figura 1. Células encapsuladas. *A.* Visão macroscópica das cápsulas coradas com Nankin; *B.* Células BHK encapsuladas (40x); *C.* Células BHK após um dia de encapsulação -as setas indicam irregularidades físicas formadas devido ao fluxo de ar (40x); *D.* Células BHK após 21 dias da encapsulação (40x); *E.* Células HepG2 após 28 dias da encapsulação -as setas indicam áreas de super-crescimento celular (40x) e *F.* Deformação nas cápsulas devido a super-crescimento das células HepG2 após 28 dias da encapsulação – as setas indicam áreas de crescimento extracapsular (40x).

Caracterização das microcápsulas *in vitro*

Foi realizada a comparação da cinética de proliferação celular entre células HepG2 e BHK. Uma vez que o número inicial de células encapsuladas foi distinto para cada tipo celular, os dados foram comparados como percentual de crescimento em relação à quantidade inicial. Após 7, 14, 21 e 28 dias as células foram recuperadas e foi avaliada sua taxa de proliferação e viabilidade. Foi observado um aumento do número de células em todos os tempos e para ambos os grupos. Após a primeira e segunda semana, as células BHK apresentaram maior taxa de crescimento celular quando comparadas às células HepG2 neste tempo (Figura 2). Já após a terceira e a quarta semana, os dois tipos celulares apresentaram uma taxa percentual de proliferação, em relação ao número celular inicial, muito similar. Entretanto, quando

comparados entre si, não houve diferença estatística significativa entre os grupos em nenhum tempo.

Para avaliar a viabilidade das células encapsuladas em cada tempo, o percentual de células que permaneciam viáveis foi determinado, após a descongelização do alginato. Em ambas as linhagens, e em todos os tempos analisados, a viabilidade celular permaneceu maior do que 70%, e não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

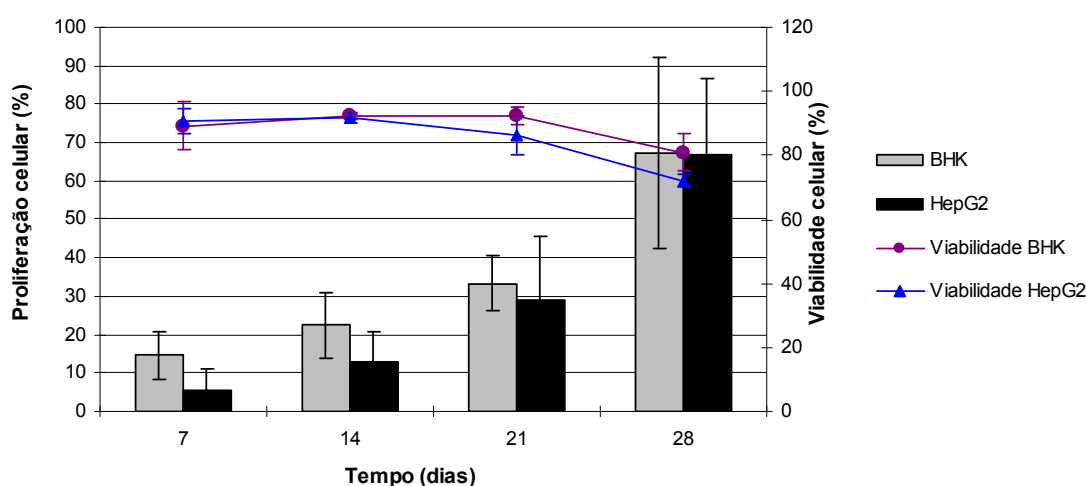


Figura 2. Comparação do percentual de proliferação *in vitro* (em relação à quantidade inicial de células) e da viabilidade de células BHK e HepG2 encapsuladas.

Caracterização das microcápsulas *in vivo*

Após a cirurgia para implante das cápsulas, houve um rápido restabelecimento das funções motoras dos animais, e não foram observados efeitos adversos que poderiam ser consequência do procedimento. Por análise macroscópica após o sacrifício, foi possível observar que em alguns ratos houve a formação de exsudatos no local onde foram implantadas as cápsulas por via subcutânea. Por terem sido encontrados em um número pequeno de animais (n=8), é provável que seja consequência da variação de resposta individual.

Análise histológica

A análise histológica das secções dos órgãos analisados dos animais que receberam cápsulas mostrou a presença de infiltrado inflamatório somente onde estas ficaram em estreito contato com o sítio de implantação (Figura 3), neste caso, músculo vasto medial e pele do abdome. No fígado, baço, intestino delgado, omento e rim não houve formação de infiltrado inflamatório significativos. Portanto, a descrição dos tipos celulares presentes foi feita apenas para pele e músculo.

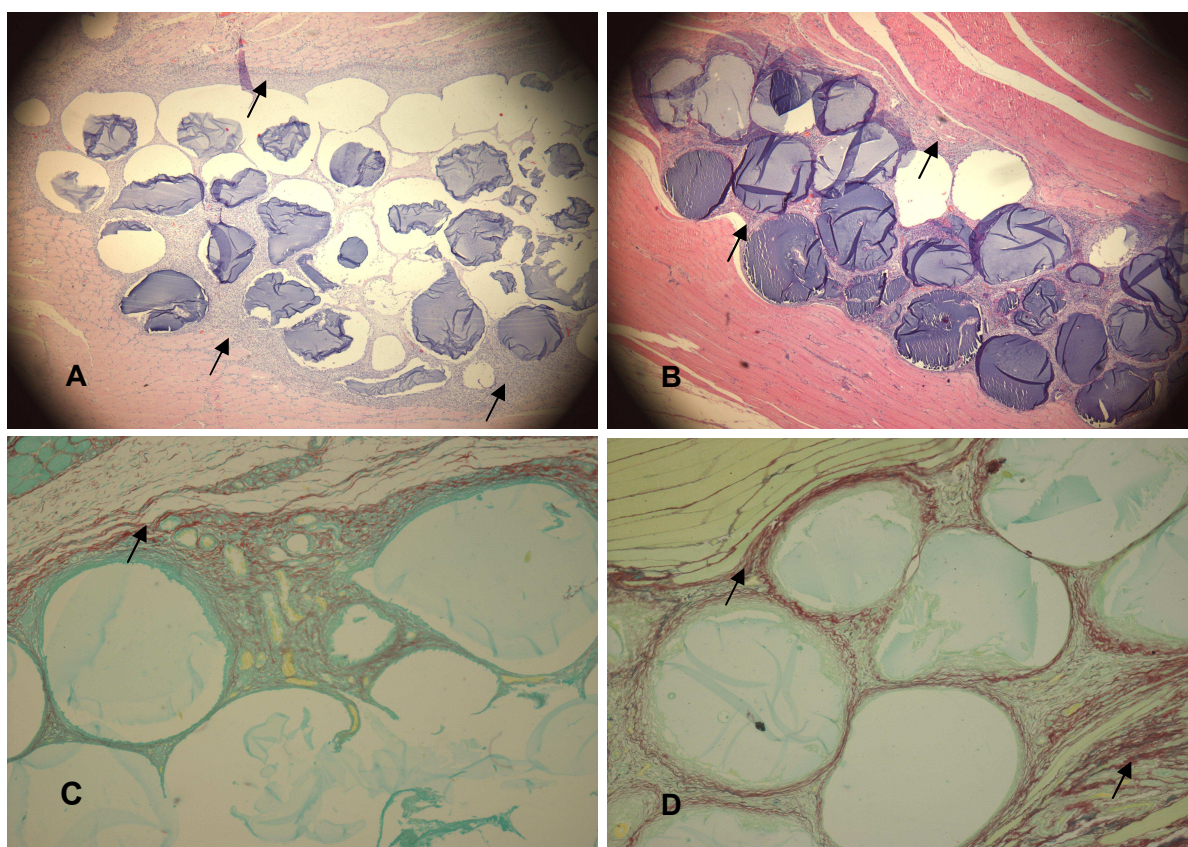


Figura 3. Visão microscópica de cápsulas implantadas no músculo vasto medial. A e B: Secções histológicas coradas com HE após 7 e 21 dias de implantação das cápsulas, respectivamente (4x). As setas indicam as regiões de infiltrado inflamatório. C e D: Secções histológicas coradas com picrossírius após 7 e 21 dias de implantação das cápsulas, respectivamente (10x). As setas indicam áreas de fibrose.

A contagem de células de infiltrado inflamatório no músculo indicou que o número de células gigantes multinucleadas diminui após 21 dias ($p=0,018$), e o de plasmócitos aumenta após 21 dias ($p<0,001$). Já o número de linfócitos foi diferente em relação à composição das cápsulas, sendo notado um aumento significativo nos animais que receberam células BHK encapsuladas em relação aos que receberam

cápsulas vazias ou HepG2 ($p=0,003$), tanto em 7 como em 21 dias. O número de linfócitos apresenta ainda diferença quando avaliada a interação entre concentração do alginato e tempo, sendo maior o número desse tipo celular no grupo que recebeu cápsulas feitas de alginato 1,5% e que foram mortos 21 dias após a implantação ($p=0,018$) (Tabela 1).

Tabela 1. Contagem, por grupo, de células gigantes multinucleadas, plasmócitos e linfócitos presentes no infiltrado inflamatório em amostras do músculo vasto medial.

CÉLULAS GIGANTES					
<i>Tempo</i>	7 dias		21 dias		
<i>Alginato</i>	1,5%	2,0%	1,5%	2,0%	Total
Vazias	6,7 ± 10,1	4,8 ± 4,4	1,4 ± 13,1	0.0 ± 0.0	12,9
BHK	1,6 ± 2,0	2,2 ± 3,3	0.0 ± 0.0	2,2 ± 2,6	6
HepG2	6,2 ± 4,7	3,6 ± 3,1	2,0 ± 2,0	2,6 ± 0,57	14,4
Total	14,5	10,6	3,4	4,8	
	25,1		8,2		
PLASMÓCITOS					
<i>Tempo</i>	7 dias		21 dias		
<i>Alginato</i>	1,5%	2,0%	1,5%	2,0%	Total
Vazias	4,5 ± 5,0	19,2 ± 15,2	82,6 ± 92,7	200,0 ± 230,9	306,3
BHK	8,6 ± 7,6	17,4 ± 8,6	56,25 ± 38,5	104,5 ± 88,9	186,75
HepG2	16,2 ± 5,2	12 ± 6,8	220,4 ± 91,5	149,6 ± 70,5	398,2
Total	29,3	38,6	359,25	454,1	
	67,9		813,35		
LINFÓCITOS					
<i>Tempo</i>	7 dias		21 dias		
<i>Alginato</i>	1,5%	2,0%	1,5%	2,0%	Total
Vazias	15,0 ± 15,0	18,6 ± 16,7	14,0 ± 7,0	0.0 ± 0.0	47,6
BHK	43,3 ± 19,5	36,8 ± 26,3	52,2 ± 14,0	23,2 ± 22,7	155,5
HepG2	8,5 ± 3,0	34,0 ± 13,0	54,8 ± 45,6	27,6 ± 28,53	124,9
Total	66,8	89,4	121	50,8	
	156,2		171,8		

A mesma análise foi realizada para as secções de pele. Neste órgão, o número de células gigantes multinucleadas não diferiu em relação à nenhuma variável analisada (Figura 4). O número de plasmócitos foi diferente nos dois tempos avaliados e nas concentrações de alginato usadas, sendo que esse tipo celular estava aumentado em ratos dos grupos que sobreviveram por mais tempo ($p < 0,001$), e em ratos que receberam cápsulas de alginato 2,0% ($p = 0,041$). Por fim, o número de linfócitos foi diferente em relação ao tempo, tendo sido maior em ratos que morreram 21 dias após a cirurgia ($p = 0,027$). Quando avaliadas as interações entre as variáveis, o número de linfócitos também se mostrou aumentado em relação à composição da cápsula e concentração ($p = 0,023$), sendo que os ratos que receberam células BHK encapsuladas em alginato 1,5% e morreram 21 dias após a implantação apresentaram maior quantidade deste tipo celular (Tabela 2).

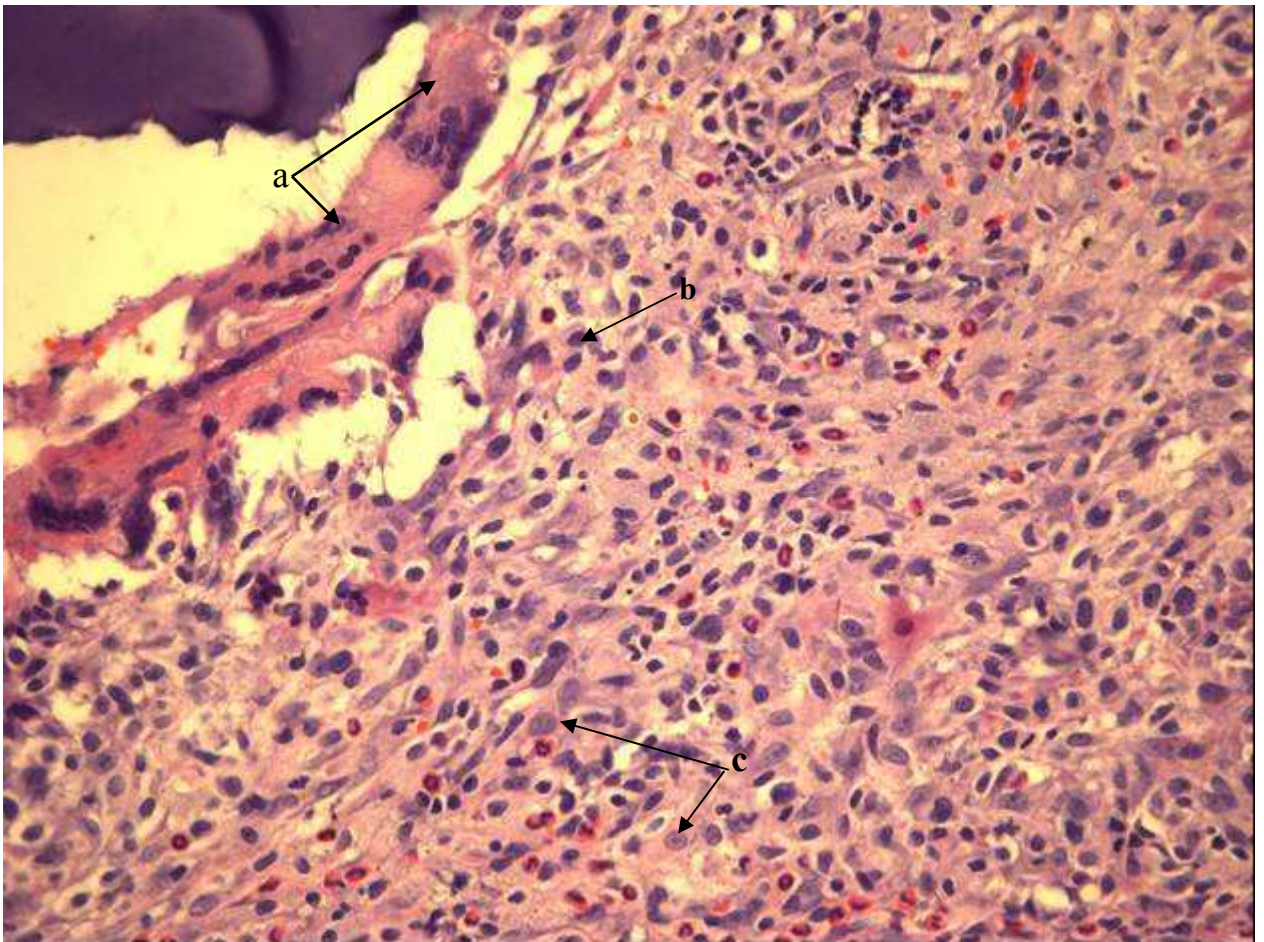


Figura 4. Secção de pele corada com HE mostrando alguns dos tipos celulares presentes no infiltrado inflamatório (40x). a. Células gigantes multinucleadas; b. plasmócito; c. macrófagos.

Tanto nas secções de músculo quanto de pele foi observado grande quantidade de macrófagos, independentemente do grupo. Nos animais do grupo *sham* não foi detectada a presença de infiltrado inflamatório nas secções analisadas.

Tabela 2. Contagem, por grupo, de células gigantes multinucleadas, plasmócitos e linfócitos presentes no infiltrado inflamatório em amostras de pele.

CÉLULAS GIGANTES					
<i>Tempo</i>	7 dias		21 dias		
<i>Alginato</i>	1,5%	2,0%	1,5%	2,0%	Total
Vazias	2,0 ± 2,0	7,7 ± 8,3	31,7 ± 7,1	3,5 ± 2,3	44,9
BHK	5,3 ± 7,5	0,8 ± 1,3	11,0 ± 11,6	3,7 ± 4,9	20,8
HepG2	2,7 ± 1,5	2,2 ± 1,7	1,2 ± 1,6	2,4 ± 3,7	8,5
Total	10	10,7	43,9	9,6	
	20,7		53,5		
PLASMÓCITOS					
<i>Tempo</i>	7 dias		21 dias		
<i>Alginato</i>	1,5%	2,0%	1,5%	2,0%	Total
Vazias	2,3 ± 2,5	3,5 ± 2,3	13,5 ± 10,9	164,2 ± 47,8	183,5
BHK	7,0 ± 4,3	19,2 ± 15,7	62,2 ± 80,2	71,7 ± 76,6	159,5
HepG2	57,0 ± 39,4	9,0 ± 13,2	82,0 ± 60,7	162,8 ± 112,9	310,8
Total	66,3	31,7	157,7	398,7	
	98		556,4		
LINFÓCITOS					
<i>Tempo</i>	7 dias		21 dias		
<i>Alginato</i>	1,5%	2,0%	1,5%	2,0%	Total
Vazias	14,0 ± 6,0	31,7 ± 7,1	30,1 ± 19,0	58,8 ± 18,8	134,6
BHK	56,3 ± 14,5	36,6 ± 37,7	142,25 ± 139,1	12,2 ± 7,1	247,35
HepG2	15,2 ± 12,9	37,0 ± 19,1	99,2 ± 37,3	35,8 ± 41,1	430,55
Total	85,5	105,3	271,55	106,8	
	190,8		378,35		

Em um subgrupo de 17 animais foi realizada a medida, em pixels, da distância entre o infiltrado inflamatório e as cápsulas implantadas no tecido muscular em relação

à variável tempo. Esta medida demonstrou estar significativamente diminuída em animais que foram mortos 21 dias após a implantação das cápsulas, onde a distância foi de $50,28 \pm 27,17$ pixels, em relação aos que morreram 7 dias após a implantação, cuja medida foi de $116,97 \pm 40,03$ pixels, ($p < 0,01$) (Figura 3 A e B).

Além do infiltrado inflamatório, foi avaliada a presença de fibrose no músculo vasto-medial que recebeu cápsulas. Os resultados da quantificação da área de fibrose neste sítio de implantação, em relação às três variáveis (formação da cápsula, concentração do alginato e tempo), não apresentaram diferença estatística significativa, embora pareça haver uma tendência ao aumento da deposição de colágeno nos animais que morreram 21 dias após a implantação das cápsulas, em relação aos que morreram anteriormente (Figura 3 C e D).

Ensaio da atividade enzimática da ARSA

Considerando que o sítio onde foram implantadas as cápsulas apresentou grande quantidade de infiltrado inflamatório e extensiva fibrose, e que esta foi encontrada principalmente circundando as cápsulas, foi avaliado se a presença da inflamação e da fibrose não impediria a liberação de enzima superexpressa em clone rBHK encapsulado para o meio extra capsular bem como sua captação pelos tecidos adjacentes.

Neste caso, observou-se um aumento na atividade enzimática da ARSA em amostras do músculo vasto medial de ratos que receberam tanto cápsulas com alginato 1,5% ($2,097 \pm 0,222$ nmol/h/mg de proteína), quanto 2,0% ($2,167 \pm 0,975$ nmol/h/mg de proteína) em relação aos ratos do grupo sham ($0,177 \pm 0,224$ nmol/h/mg de proteína) ($p < 0,01$). Entretanto, não foi observada diferença significativa em relação à concentração do alginato (Figura 5). A medida de ARSA foi avaliada também em fígado e baço, no entanto, não houve diferença significativa nestes órgãos. O grupo *sham* apresentou valores de atividade enzimática de $148,1 \pm 22,2$ e $141,2 \pm 6,0$ para fígado e baço respectivamente. O grupo que recebeu cápsulas 1,5% apresentou valores de $130,4 \pm 12,3$ e $144,2 \pm 9,5$. Já para o grupo cápsulas 2,0%, esses valores foram de $126,0 \pm 12,5$ e $142,2 \pm 6,7$ (Valores expressos em nmol/h/mg de proteína).

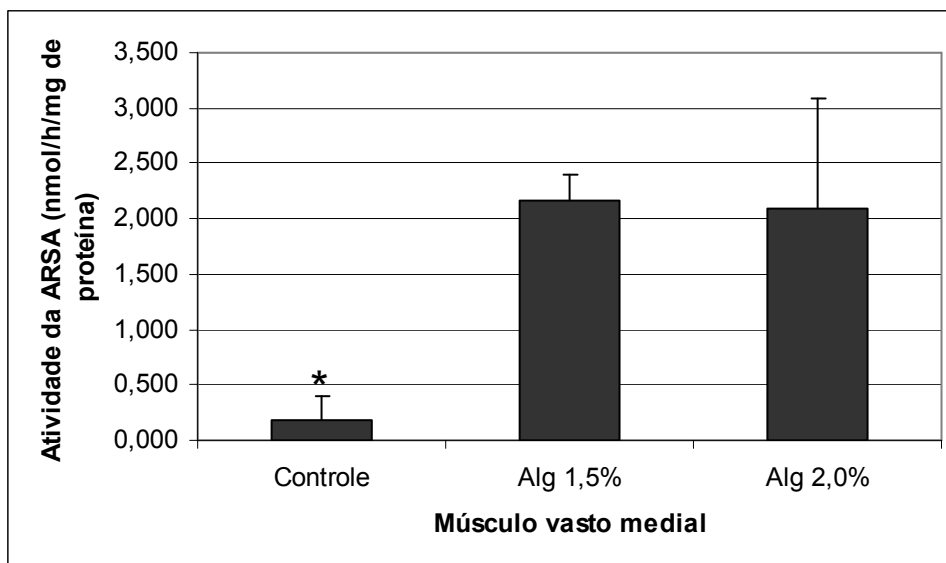


Figura 5. Atividade da ARSA em amostras do músculo vasto medial de ratos dos grupos que receberam células rBHK encapsuladas em alginato 1,5% (Alg 1,5%) e 2,0% (Alg 2,0%), e grupo controle. * $p < 0,01$ (One-way ANOVA)

DISCUSSÃO

Neste estudo objetivamos avaliar, *in vitro*, a viabilidade e a cinética de proliferação das células BHK e HepG2 imobilizadas em microcápsulas de alginato e caracterizar, *in vivo*, o efeito da implantação de cápsulas com diferentes concentrações de alginato em diferentes tempos. Uma vez que a estratégia de encapsulação celular vem sendo muito utilizada em estudos de terapias gênica e celular (Prakash, 1996; Zhang *et al*, 2007; Ambrosino *et al*, 2003), o comportamento destas frente a diferentes tipos celulares usados na encapsulação, o sítio de implantação e tempo de sobrevivência em cada sítio implantado deve ser mais bem caracterizado.

O estudo do comportamento de células encapsuladas *in vitro* é uma etapa importante para que a microencapsulação celular possa ser utilizada *in vivo*, uma vez que diferentes tipos celulares apresentam diferentes cinéticas de proliferação. Uma característica das células HepG2 em cultura é sua expansão mais acentuada quando forma grumos. Após a terceira e quarta semana, devido a uma menor disponibilidade de área na cápsula, pontos de super crescimento se formam, aumentando o contato célula a célula e conseqüentemente favorecendo a taxa de proliferação. Já as BHKs,

não apresentam este padrão de formar grumos em cultura, e conseqüentemente a taxa de proliferação não é influenciada por este motivo. Entretanto, apesar desses padrões de proliferação distintos, os dados de cinética de proliferação celular das linhagens BHK e HepG2 encapsuladas (figura 2) não apresentam diferença estatística significativa. Passadas as 4 semanas de cultivo ambas atingem cerca de 70% de proliferação em relação ao número inicial celular, e continuam igualmente viáveis.

O objetivo inicial do estudo das microcápsulas *in vivo* era avaliar os mesmos parâmetros analisados *in vitro*. Em 2006, Wang e colaboradores relataram diferenças na taxa de proliferação *in vitro* e *in vivo* de células-tronco embrionárias de ratos. Através de técnicas de microscopia confocal, eles detectaram uma taxa de proliferação celular muito maior *in vivo* em células encapsuladas implantadas no peritônio, destacando a forte influência do microambiente pericapsular para o metabolismo celular. No entanto, em nosso trabalho, a recuperação das cápsulas foi dificultada pela aderência destas aos tecidos dos animais. Além disso, as que foram recuperadas estavam envolvidas por uma rede de fibrose, o que impossibilitou a contagem e a verificação da viabilidade das células encapsuladas pelas técnicas que temos disponíveis. Assim, investigamos a resposta inflamatória formada em reação às cápsulas através de contagens dos tipos celulares mais freqüentes encontrados no infiltrado inflamatório, a medida deste infiltrado e quantificamos a área de fibrose formada em cada grupo.

Macrófagos e células gigantes multinucleadas estão claramente envolvidos na resposta imunológica que se forma contra vários biomateriais (Anderson *et al*, 2008). Os resultados que obtivemos por meio da contagem de células presentes no infiltrado inflamatório mostraram que há um grande número de macrófagos, e presença de células gigantes multinucleadas, tanto nos animais que receberam células encapsuladas (BKH e HepG2) quanto nos que receberam cápsulas vazias, indicando uma possível resposta do tipo 'corpo estranho' ao alginato. Este é o tipo de resposta que é mais comumente formada na presença de um biomaterial, e tende a ser reduzida e resolvida em pouco tempo (Anderson *et al*, 2008). Para confirmar essa redução avaliamos o número de células em 7 e 21 dias. Nos animais mortos 21 dias após a implantação, houve diminuição significativa do número de células gigantes multinucleadas nas secções de músculo analisadas, o que condiz com o fato de que a resposta do tipo corpo estranho é mais intensa nos primeiros dias após a implantação.

Anderson e colaboradores (2008) relatam que a presença de linfócitos e plasmócitos no sítio de implantação das cápsulas, além de macrófagos e algumas

células gigantes aderidas ao alginato, caracteriza uma inflamação crônica. Corroborando com esses achados, os nossos resultados mostraram que há aumento significativo de plasmócitos e linfócitos nos animais que morreram 21 dias após a implantação das cápsulas, tempo suficiente para formação de uma inflamação crônica. Também foi observado um aumento do número de linfócitos nos animais que receberam células BHK, em relação aos que receberam HepG2 ou cápsulas vazias. Uma possível explicação para este fato é que as células BHK que foram encapsuladas podem estar entrando em contato com as células do hospedeiro, devido a uma alta taxa proliferativa *in vivo* ou a algum rompimento específico da cápsula. Caso isso esteja acontecendo, haverá a formação de uma resposta imune específica, mediada por linfócitos B e T, contra essas células, o que justificaria o aumento destes tipos celulares em 21 dias. A ocorrência deste fato poderia ser verificada através da realização de técnicas de imunohistoquímica para detecção da presença de anticorpos reativos a peptídeos das células BHK.

Nossos resultados também mostraram que o infiltrado inflamatório diminui após 21 dias da implantação das cápsulas, e que não há diferença deste parâmetro entre ratos que receberam cápsulas vazias e ratos que receberam células encapsuladas (BHK e HepG2). Estas são evidências de que a resposta que está ocorrendo é principalmente uma resposta do tipo corpo estranho formada contra o alginato. Este é considerado o polímero mais adequado para a fabricação de microcápsulas, devido às suas características de não interferência no material encapsulado a sua capacidade de formar géis rígidos em condições fisiológicas (Ponce *et al*, 2006). Entretanto, sua biocompatibilidade ainda é motivo de discussão, pois sendo um polímero natural, ele pode ser contaminado. Além disso, os processos industriais utilizados para a sua extração podem introduzir mais contaminantes. Algumas dessas impurezas incluem endotoxinas, alguns tipos de proteínas e polifenóis, que estão associados à diminuição da sua biocompatibilidade. Para isso, têm sido desenvolvidos processos de purificação para monitorar e remover estes contaminantes (Orive *et al*, 2006). Também há evidências de que as características das ligações entre as moléculas que formam o polímero podem exercer influência na sua biocompatibilidade (Uludag *et al*, 2000). Alguns grupos têm relatado que alginatos com maior quantidade de blocos M provocam resposta inflamatória através da estimulação de monócitos para a produção de citocinas, como interleucina (IL)-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) (Otterlei *et al*, 1991). Além disso, anticorpos anti alginato foram encontrados quando o polímero transplantado tinha maior quantidade de blocos M, mas não quando predominavam os blocos G (Kulseng *et al*, 1999). Quanto ao crescimento celular pericapsular, grupos

diferentes encontraram resultados discordantes, sendo que alguns relatam que este crescimento é maior em alginatos com maior quantidade de blocos G (Clayton *et al*, 1991 e de Vos *et al*, 1997), e outros de blocos M (Soon-Shiong *et al*, 1991).

Alguns estudos têm mostrado que uma resposta inflamatória que resulta em crescimento celular pericapsular e deposição de fibroblastos pode induzir necrose das células encapsuladas e como consequência, a falência do tratamento (Ponce *et al*, 2006), devido a dificuldade da chegada de nutrientes ao interior da cápsula. A fim de verificar se as células estavam mantendo suas funções normais, apesar da presença do infiltrado inflamatório e fibrose, testamos a liberação de uma enzima que estava sendo superexpressa pelas células encapsuladas, neste caso células BHK recombinantes (rBHK) que receberam o cDNA da enzima arilsulfatase A. Foram testadas amostras de 4 órgãos e tecidos (músculo vasto medial, fígado, baço e omento), porém apenas no músculo vasto medial foi detectado um aumento significativo da atividade enzimática em relação ao controle. Provavelmente a atividade da ARSA não foi detectada nos outros locais devido ao baixo número de células encapsuladas e à distância dos tecidos até as cápsulas. Entre todos os tecidos, o músculo era o único em que todas as cápsulas implantadas no mesmo local ficavam em contato direto com o tecido. Nos outros casos as microcápsulas foram implantadas na cavidade abdominal, ficando assim mais dispersas e diminuindo a quantidade de enzima que poderia chegar aos órgãos. Assim, talvez neste sítio de implantação seja necessário aumentar o número celular encapsulado ou aumentar o número de cápsulas implantadas para garantir a liberação e captação da enzima pelos órgãos adjacentes. Outro fator que pode ter influenciado esses resultados é a quantidade da atividade da ARSA que é normalmente detectada nos tecidos e órgãos analisados. No fígado e no baço há atividade muito maior da enzima em relação ao músculo. Se a quantidade de enzima liberada pelas células encapsuladas for pequena, provavelmente a diferença na atividade não vai ser detectada em níveis significativos nos tecidos que expressam grande quantidade da ARSA. Além disso, a liberação da enzima só foi analisada em ratos que morreram 7 dias após a implantação das cápsulas, tempo em que provavelmente as células encapsuladas ainda não haviam sofrido todas as consequências da presença do infiltrado inflamatório e ainda estavam vivas e funcionais.

Com base nessas constatações, podemos concluir que o alginato utilizado para a encapsulação das células provocou uma reação inflamatória, com recrutamento de células do sistema imune para o local de implantação das cápsulas. Isso demonstra

que há a necessidade de desenvolvimento de técnicas que aumentem a biocompatibilidade deste polímero. Entretanto, essa resposta diminui com o tempo, sendo semelhante à reação causada por outros biomateriais utilizados para diversos fins (Anderson *et al*, 2008, Khan Y *et al*, 2008). Além disso, o infiltrado inflamatório não impediu a liberação da enzima produzida pelas células encapsuladas em 7 dias, embora em pequena quantidade. Estes fatos indicam que, com alguns aperfeiçoamentos, a utilização de células encapsuladas em alginato é uma estratégia promissora e viável para o tratamento de diversas doenças.

REFERÊNCIAS

Ambrosino G, Varotto S, Basso SM, Cecchetto A, Carraro P, Naso A, De Silvestro Plebani M, Abatangelo G, Donato D, Cestroni A, Giron G, D'Amico DF. Hepatocyte transplantation in the treatment of acute liver failure: microencapsulated hepatocytes versus hepatocytes attached to an autologous biomatrix. *Cell Transplant*. 2003, 12(1):43-9.

Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol*. 2008, 20(2):86-100.

Baldo G. Desenvolvimento de protocolos pré-clínicos de terapia celular em modelos animais de lesão hepática aguda e crônica. Centro de Pesquisas – HCPA. Dissertação de mestrado. 2008, Porto Alegre, RS, Brasil.

Barsoum C, Milgram W, Mackay W, Coblenz C, Delaney KH, Kwiecien JM, Kruth SA and Chang PL. Delivery of recombinant gene product to canine brain with the use of microencapsulation. *J. Lab. Clin. Med*. 2003, 142(6):399-412.

Chang TM. Semipermeable microcapsules. *Science*. 1964, 146:524-5.

Choudhury PK, Kar M. Controlled release metformin hydrochloride microspheres of ethyl cellulose prepared by different methods and study on the polymer affected parameters. *J Microencapsul*. 2008, 14:1-8.

Clayton HA, London NJ, Colloby PS, Bell PR, James RF. The effect of capsule composition on the biocompatibility of alginate–poly L-lysine capsules. *J Microencapsul*. 1991, 8:221–33.

Consiglio A, Martino S, Dolcetta D, Cusella G, Conese M, Marchesini S, Benaglia G, Wrabetz L, Orlacchio A, Déglon N, Aebischer P, Severini GM, Bordignon C. Metabolic correction in oligodendrocytes derived from metachromatic leukodystrophy mouse model by using encapsulated recombinant myoblasts. *J Neurol Sci.* 2007, 255(1-2):7-16.

De Vos P, De Haan B, Van Schifgaarde R. Effect of the alginate composition on the biocompatibility of alginate–polylysine microcapsules. *Biomaterials* 1997,18:273–8.

Gao Y, Jiang HC, Xu J, Pan SH, Li YD. Microencapsulating hepatocytes. *Transplant Proc.* 2005, 37(10):4589-93.

Grandoso L, Ponce S, Manuel I, Arrúe A, Ruiz-Ortega JA, Ulibarri I, Orive G, Hernández RM, Rodríguez A, Rodríguez-Puertas R, Zumárraga M, Linazasoro G, Pedraz JL, Ugedo L. Long-term survival of encapsulated GDNF secreting cells implanted within the striatum of parkinsonized rats. *Int J Pharm.* 2007, 343(1-2):69-78.

Hamid M, McCluskey JT, McClenaghan NH, Flatt PR. Functional examination of microencapsulated bioengineered insulin-secreting beta-cells. *Cell Biol Int.* 2001, 25(6):553-6.

Jaya S, Durance TD, Wang R. Effect of alginate-pectin composition on drug release characteristics of microcapsules. *J Microencapsul.* 2008, 3:1-11.

Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *J Bone Joint Surg Am.* 2008, 90. Suppl 1:36-42.

Kulseng B, Skjak-Braek G, Ryan L, Anderson A, King A, Faxvaag A, et al. Antibodies against alginates and encapsulated porcine islet-like cell clusters. *Transplantation.* 1999, 67:978–84.

Lee-Vaupel M and Conzelmann E. A simple chromogenic assay for arylsulfatase A. *Clin Chim Acta.* 1987, 164: 171-180.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, 7 Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry.* 1951, 193:265-275.

Ma J, Qi W, Xie Y, Wang W, Yu W and Ma X. K562 cell growth activity and metabolism characteristics in APA microencasulates culture and modeling study. *J Biotechnology.* 2006, 152(2):242-51.

Orive G, Hernández RM, Rodríguez Gascón A, Calafiore R, Chang TM, de Vos P, Hortelano G, Hunkeler D, Lacík I, Pedraz JL. History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. *Trends Biotechnol.* 2004, 22(2):87-92.

Orive G, Tam SK, Pedraz JL, Hallé JP. Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials.* 2006, 27(20):3691-700.

Otterlei M, Ostgaard K, Skjak-Braek G, Smidsrod O, Soon-Shiong P, Espevik T. Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. *J Immunother.* 1991,10:286–91.

Ponce S, Orive G, Hernández R, Gascón AR, Pedraz JL, de Haan BJ, Faas MM, Mathieu HJ, de Vos P. Chemistry and the biological response against immunoisolating alginate-polycation capsules of different composition. *Biomaterials.* 2006, 27(28):4831-9.

Prakash, S. and Chang, T.M.S. Microencapsulated genetically engineered live E. Coli DH5 cells administered orally to maintain normal plasma urea level in uremic rats. *Nat. Med.* 1996, 2:883–887.

Ross CDJ, Bastedo L, Maier SA, Sands MS and Chang PL. Somatic gene therapy of a lysosomal storage disease, mucopolysaccharidosis VII, with microencapsulated recombinant cells. *Hum. Gene Therapy.* 2000, 11:2117-27.

Soon-Shiong P, Otterlei M, Skjak-Braek G, Smidsrod O, Heintz R, Lanza P, et al. An immunology basis for the fibrotic reaction to implanted microcapsules. *Transplant Proc.* 1991, 23:758–9.

Uludag H, Vos P and Tresco P. Technology of mammalian cell encapsulation. *dvanc. Drug Delivery Reviews.* 2000, 2:29-64.

Lagranha VL, Baldo G, de Carvalho TG, Burin M, Saraiva-Pereira ML, Matte U, Giugliani R. *In vitro* correction of ARSA deficiency in human skin fibroblasts from metachromatic leukodystrophy patients after treatment with microencapsulated recombinant cells. *Metab Brain Dis,* 2008; 23(4):469-84.

Wang X, Wang W, Ma J, Guo X, Yu X, Ma X. Proliferation and differentiation of mouse embryonic stem cells in APA microcapsule: A model for studying the interaction between stem cells and their niche. *Biotechnol Prog.* 2006, 22(3):791-800.

Zhang Y, Wang W, Zhou J, Yu W, Zhang X, Guo X, Ma X. Transplantation of a polymer-encapsulated cell line genetically engineered to release NGF. *Exp Neurol*. 2007, 122:100-6.

Zimmermann H, Zimmermann D, Reuss R, Feilen PJ, Manz B, Katsen A, Weber M, Ihmig FR, Ehrhart F, Gessner P, Behringer M, Steinbach A, Wegner LH, Sukhorukov VL, Vásquez JA, Schneider S, Weber MM, Volke F, Wolf R, Zimmermann U. Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. *J Mater Sci Mater Med*. 2005, 16(6):491-501.

9.2 Cell microencapsulation: a potential tool for the treatment of neuronopathic lysosomal storage diseases

** Publicado na revista Journal of Inherited Metabolic Disease*

Cell microencapsulation: a potential tool for the treatment of neuronopathic lysosomal storage diseases

Ursula Matte · Valeska Lizzi Lagranha ·
Talita Giacomet de Carvalho · Fabiana Quoos Mayer ·
Roberto Giugliani

Received: 31 January 2011 / Revised: 17 April 2011 / Accepted: 4 May 2011
© SSIEM and Springer 2011

Abstract Lysosomal storage disorders (LSD) are monogenic diseases caused by the deficiency of different lysosomal enzymes that degrade complex substrates such as glycosaminoglycans, sphingolipids, and others. As a consequence there is multisystemic storage of these substrates. Most treatments for these disorders are based in the fact that most of these enzymes are soluble and can be internalized by adjacent cells via mannose-6-phosphate receptor. In that sense, these disorders are good candidates

to be treated by somatic gene therapy based on cell microencapsulation. Here, we review the existing data about this approach focused on the LSD treatments, the advantages and limitations faced by these studies.

Lysosomal storage disorders

The lysosome is an organelle characterized by an acidic lumen which is rich in enzymes essential for the biochemical breakdown of molecules such as glycosaminoglycans, oligosaccharides, sphingolipids, and other lipids (Heese 2008). Lysosomal storage disorders (LSD) are a group of about 50 genetically inherited diseases that are generally caused by total or partial defects in an enzyme involved in the degradation of macromolecules within the lysosomes. This deficiency leads to a gradual accumulation of partially degraded molecules, causing progressive cellular impairment and dysfunction of many organs and systems (Vitner et al. 2010).

Most LSD are characterized by its progressive course with high morbidity and increased mortality, although there are significant variations between different diseases, and even among patients with the same disease (Walkley 2009). Lysosomal enzymes are ubiquitously distributed, but substrate storage is usually restricted to cells, tissues and organs with higher substrate turnover. Moreover, the enzyme defect and the primary substrate storage disrupts other metabolic pathways, leading to the severe pathology seen in most LSD (Parkinson-Lawrence et al. 2010).

Therapies to increase enzyme levels on selected LSD include bone marrow transplantation, enzyme replacement therapy (ERT), and gene therapy. These treatments are based on the property of lysosomal enzymes to be secreted and uptaken by neighboring cells by the mannose-6-

Communicated by: Gregory M. Pastores

Competing interest: None declared.

U. Matte · V. L. Lagranha · T. G. de Carvalho · F. Q. Mayer ·
R. Giugliani
Gene Therapy Center, Experimental Research Center,
Hospital de Clínicas,
Porto Alegre, RS, Brazil

U. Matte · V. L. Lagranha · T. G. de Carvalho · F. Q. Mayer ·
R. Giugliani
Post-Graduation Program on Genetics and Molecular Biology,
UFRGS,
Porto Alegre, RS, Brazil

U. Matte · R. Giugliani
Post-Graduation Program on Child and Adolescent Health,
UFRGS,
Porto Alegre, RS, Brazil

R. Giugliani
Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas,
and Department of Genetics, UFRGS,
Porto Alegre, RS, Brazil

R. Giugliani (✉)
Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
Rua Ramiro Barcelos, 2350,
Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil
e-mail: rgiugliani@hcpa.ufrgs.br

phosphate pathway (Sly et al. 1981). After endocytic internalization, the enzyme is transported by endosomes to the lysosome, resulting in the breakdown of accumulated storage material. Bone marrow transplantation was first attempted in the early 1980s (Hobbs 1981). However, despite the many advances in this treatment over the last 30 years (Boelens et al. 2010), its use has been deferred in favor of ERT whenever it is available. Enzyme replacement therapy is widely used with success for many LSD. The recombinant enzyme is administered to the patients intravenously weekly or every other week. This strategy was proved to be effective and approved to treat patients with the non-neuropathic form of Gaucher disease (Barton et al. 1991), Fabry disease (Schiffmann et al. 2001), Pompe disease (Van den Hout et al. 2001), Mucopolysaccharidosis I (MPS I) (Kakkis et al. 2001), MPS II (Muenzer et al. 2006), and MPS VI (Harmatz et al. 2004). Patients treated with ERT show clinical benefits, but this strategy is limited by the high cost and life-long dependence on 4–5 hours infusions. Moreover, ERT has limited ability to treat neurological and skeletal pathologies. Gene therapy may overcome some of these problems, as it may allow constant delivery of the enzyme direct to target organs. LSD can be considered good candidates for gene therapy, as they are single gene disorders and not subject to complex regulation mechanisms. In addition, enzyme activity of only 15–20% of the normal level can be sufficient for clinical efficacy (Beck 2010), even though different systems may need higher amounts of enzyme to be corrected (Cotugno et al. 2010).

Even though clinical trials have been performed with gene therapy for different LSD, none of them has been approved as a medical treatment yet, because of potential side effects (Nakama et al. 2006). As an alternative, cell microencapsulation technology, a nonviral approach for the delivery of biologically active compounds, can overcome these hurdles and be a promising strategy to treat LSD.

Cell microencapsulation

Cell microencapsulation is an approach in which cells are trapped in a semipermeable membrane, allowing the exchange of metabolites and nutrients between them and the external environment. The membrane prevents the access of the immune system to the cells, without the need for continued immunosuppression of the host (Uludag et al. 2000). Furthermore, this technique allows the localized and controlled release, and long term duration of therapeutic products derived from the microencapsulated cells (Orive et al. 2002). Since microencapsulation was proposed by Chang for the creation of bioartificial organs (Chang 1964), a large number of attempts has been made to

immobilize cells and other biological materials in different types of capsules. These efforts, coupled with advances in genetics, biology and pharmacological technology have meant that the microencapsulation become an important system for cellular transplantation (Orive et al. 2003), preservation (Mayer et al. 2010) and a potential strategy for the replacement of both organs and for the controlled delivery of therapeutic products (Orive et al. 2003).

Biomaterials used for microencapsulation purposes

Many types of natural and synthetic polymers are being explored for microencapsulation design. The capsular material must be biocompatible, mechanically stable, and provide an environment for the encapsulated cells to survive and secrete the therapeutic product. In addition, pore size must allow the passive diffusion of the secreted product (Orive et al. 2002).

Alginate has been the most important encapsulation polymer, due to its abundance, easy gelling properties and biocompatibility. Alginate is composed of mannuronic (M) and guluronic (G) dimers in proportions that vary depending upon the source from which alginate is isolated. The difference in the composition has a significant impact on some properties of the gel, such as biocompatibility, stability, mechanical strength, permeability and biodegradability (Orive et al. 2006). Most studies employ alginate in combination with other materials, such as poly-L-lisine as the polycation for microcapsule formation (Barsoum et al. 2003; Friso et al. 2005; Ross et al. 2000a, b).

Agarose, chitosan, and hyaluronic acid are other polymers used for microencapsulation. Chitosan, a biodegradable polysaccharide derived from the deacetylation of chitin, is widely used as scaffold for cell culture in combination with polyglycolic acid (Griffon et al. 2005; Gan and Wang 2007). Unlike alginate, chitosan and hyaluronic acid are degradable by endogenous enzymes. This limits its use as an immunoisolation device for heterologous cells. Other materials used for cell encapsulation are diffusion chambers and hollow fibers, usually made with polyacrylonitrile vinyl chloride or polyethersulfone. They are usually used in combination with some biomaterial that remains in the interface between the cells and the fibers (Chang et al. 1999).

One of the major challenges facing microencapsulation technique is to decrease the host response induced by the polymers used for encapsulation, or by the recombinant secreted product. Microcapsule graft failure is usually associated with a foreign body reaction, with fibrotic overgrowth around the capsules. Different strategies have been taken to overcome this obstacle, including modification of the polymer (Mazumder et al. 2009), and administration of anti-inflammatory drugs together with the

capsules (Blasi et al. 2006; Baruch et al. 2009), most of them showing an improvement in the biocompatibility.

Cells used for microencapsulation purposes

There are properties necessary for cells to be suppliers of therapeutic gene products within immunoisolation devices. Such properties are: robust proliferative potential necessary for genetic modification and expansion *in vitro*, capability to produce and secrete the transgene product, and the ability to exhibit stable transgene expression after encapsulation (Chang 1999). These cells should also be able to differentiate terminally (Peirone et al. 1998), thus interrupting the cell cycle and continuing proliferation.

In addition, these cells must be able to produce and secrete functional lysosomal enzymes. Baby Hamster Kidney (BHK) cells for example, although have active cell cycle, synthesize lysosomal enzymes in the same pattern as human skin fibroblasts, including both glycosylated and deglycosylated forms (Stein et al. 1989). Efficient phosphorylation has also been reported in these cells (Matzner et al. 2005), as well as for Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. Another cell type used for encapsulation purposes is Human Amniotic Epithelial (HAE) cells. These cells do not express major histocompatibility complex class II with mild expression of class I antigens on their surfaces resulting in no acute rejection after allo-transplantation (Nakama et al. 2006). HAE cells have many others unique features, like the production and secretion of several neurotransmitters and neurotrophic factors, that could be helpful in the treatment of the diseases that affect the central nervous system.

Although several studies on the delivery of recombinant products with fibroblasts have been successful in demonstrating the feasibility of this approach with immunoisolation devices, these cells are not ideal for long-term survival as they cannot exit the cell cycle in order to differentiate (Chang 1999). In contrast, myoblasts (C2C12) are proliferative cells that do possess this important property. They can be transfected *in vitro*, express and secrete transgene products, but are also capable of differentiating terminally into myotubes, circumventing the problem of continued proliferation and overcrowding of cells within microcapsules (Chang 1999; Murua et al. 2010).

Recombinant microencapsulated cells and LSD

Several studies on microencapsulation of recombinant cells for delivery of a therapeutic product directly to the Central Nervous System (CNS) have been made. Among them, the products of interest include growth factors or neurotransmitters that can be applied to the prevention of brain injury

(Hoffman et al. 1993; Maysinger et al. 1996), treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer and Parkinson Diseases (Déglon et al. 1996; Kishima et al. 2004; Grandoso et al. 2007; Spuch et al. 2010) and treatment of brain tumors (Kuijlen et al. 2006). Moreover, there is one phase I clinical trial in which encapsulated recombinant cells over expressing human ciliary neurotrophic factor (CNTF) were implanted in the right lateral ventricle of six Huntington's disease patients. In this trial there was no sign of CNTF-induced toxicity, the capsules retrieved were intact but contained variable number of surviving cells and improvement in electrophysiological results was proportional to the amount of released CNTF (Bloch et al. 2004). These results suggest that the cell encapsulation approach to delivery of recombinant products to CNS can be clinically applicable.

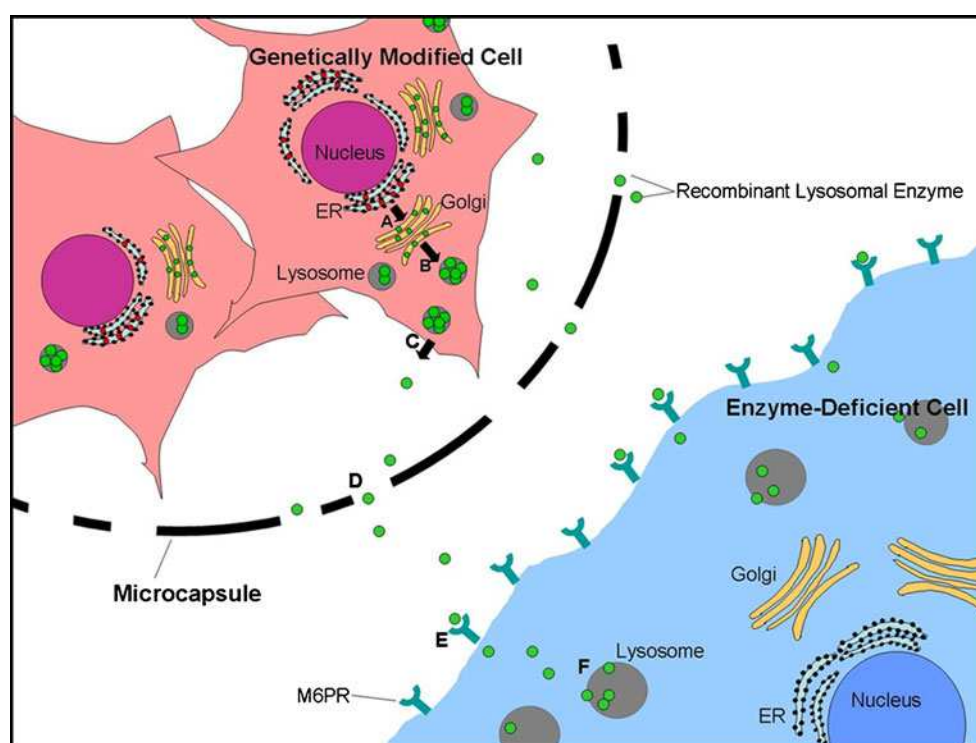
Interestingly, this approach delivers the gene of interest in the spinal fluid, similar to the intrathecal enzyme replacement therapy. Thus, cell encapsulation can be suitable for the treatment of LSD, once the deficient enzyme could be long term released directly in the CNS. In order to obtain larger amounts of secreted enzyme, the encapsulated cells should be genetically modified to over-express the enzyme of interest. This enzyme would then be released to the extracapsular space (Bressel et al. 2008) and uptaken by adjacent deficient cells (Figure 1). This strategy has been used experimentally for different LSD, as shown in Table 1. Among the existing protocols, the MPS are the group of LSD in which most experiments have been performed. Reasons for that include the availability of animal models, and the systemic character of the disease, with both CNS and visceral involvement.

Mucopolysaccharidosis type I

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I - MIM #607014) is an autosomal recessive disease characterized by a deficiency of α -L-iduronidase (IDUA - EC 3.2.1.76) enzyme, leading to accumulation and urinary excretion of high levels of glycosaminoglycans (GAG), specifically dermatan and heparan sulfates (Martins et al. 2009). MPS I has a spectrum of clinical severity, ranging from severe Hurler syndrome, estimated to affect 1 in 144,000 live births, to the attenuated phenotype of Scheie syndrome, with an incidence of 1 in 500,000 live births (Lowry and Renwick 1971). Common symptoms include coarse facies, corneal clouding, hernias, dysostosis multiplex, joint stiffness, short stature, and hepatosplenomegaly. Mental retardation is present in the severe form, while the attenuated phenotype presents normal intelligence (Wraith 1995, Neufeld and Muenzer 2001).

ERT with Laronidase (recombinant human α -L-iduronidase, Aldurazyme[®], Bio-Marin Pharmaceutical Inc., USA and Genzyme Corporation, USA) is a specific treatment that

Fig. 1 Traffic of lysosomal enzymes throughout the encapsulated cells. The nascent lysosomal enzymes are glycosylated in the endoplasmic reticulum (ER) of the genetically modified cells. **(a)** The enzymes are phosphorylated at the residue of mannose-6 in the Golgi apparatus. **(b)** Most enzymes are transported to mature lysosomes. **(c)** Some, however, are secreted to the extracellular environment and **(d)** to outside of the microcapsules. **(e)** Phosphorylated enzymes bind to mannose-6-phosphate receptors (M6PR) of the enzyme-deficient cells **(f)** where they are endocytosed and subsequently targeted to the lysosomes



addresses the pathophysiology of MPS I by delivering sufficient IDUA activity to reverse and prevent GAG storage (Kakkis et al. 2001). It represents the most significant recent advance in patient treatment and has been shown to improve many of the clinical manifestations of the disease, such as physical capacity, hepato and splenomegaly, as well as the range of motion of joints (Kakkis et al. 2001, Sifuentes et al. 2007, Clarke et al. 2009, Tylki-Szymanska et al. 2010). However, the enzyme does not cross the blood—brain-barrier, justifying the need of new therapies for the severe form of the disease that mainly affects the CNS.

Barsoum et al. (2003) reported the feasibility of delivering recombinant gene products to the CNS of dogs, first using human growth hormone (hGH) as a marker for delivery in normal dogs, and then using *Idua* as a therapeutic product for delivery in the MPS I dog model. The first study was performed to evaluate cell viability upon implantation in the CNS, showing no difference with encapsulated cells kept in vitro.

Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells were genetically modified to over-express canine *Idua*, and then enclosed in alginate-poly-L-lysine-alginate (APA) microcapsules. The encapsulated cells were implanted into the brain and the

Table 1 Summary of strategies used for recombinant cell microencapsulation regarding LSD treatment

Therapeutic protein	Encapsulated cell	Capsule material	LSD	Model tested	Implantation site	Ref
Alpha-L- iduronidase	MDCK	APA	MPS I	MPS I dogs	Intraventricular	Barsoum et al. 2003
Iduronate-2-sulfatase	C2C12	APA	MPS II	MPS II mice	Intraperitoneal	Friso et al. 2005
	C2C12	Alginate	MPS II	MPS II fibroblasts	-	Tomanin et al. 2002
β -glucuronidase	2A50 fibroblasts	APA	MPS VII	MPS VII mice	Intraperitoneal	Ross et al. 2000a
	2A50 fibroblasts	APA	MPS VII	MPS VII mice	Intraventricular	Ross et al. 2000b
Arylsulfatase A	IHAE	Polysulfon	MPS VII	C3H mice / MPS VII fibroblasts	Corpus striatum	Nakama et al. 2006
	C2C12	Polyether-sulfone	MLD	Oligodendrocytes	-	Consiglio et al. 2007
Alpha-galactosidase	BHK	Alginate	MLD	MLD fibroblasts	-	Lagranha et al. 2008
	CHO	Polysulfon	FD	FD fibroblasts	-	Naganawa et al. 2002

delivery of gene product measured in the plasma and cerebrospinal fluid through 21 days was low but detectable. Immunohistochemistry with anti-IDUA antibody showed the presence of the enzyme in various brain regions. Also, anti-IDUA antibodies in the cerebrospinal fluid and in plasma were detected in the treated dogs. In addition, extensive inflammatory reactions were noted, both at the sites of implantation and in the immediate vicinity of the implanted microcapsules. The affected dog presented classical MPS I signs (stunted growth, joint abnormalities and corneal clouding) both before and after microcapsule implantation. No histological correction of lysosomal inclusions, even in the immediate vicinity of the capsule-implantation site, has been detected.

This was a preliminary study focused on the feasibility of implanting microencapsulated cells in the brain of a larger animal. The presence of inflammatory reaction, more prominent in the affected animal, may be a reaction not only to the microcapsule itself but also for the enzyme, as seen in the gene therapy (Shull et al. 1996) and enzyme replacement therapy protocols (Shull et al. 1994).

Mucopolysaccharidosis type II

Mucopolysaccharidosis II or Hunter Syndrome (MPS II, MIM 309900) is an X-linked recessive disorder caused by mutations in the iduronate-2-sulfatase gene (IDS; EC 3.1.6.13) (Martin 2007). This lysosomal enzyme removes the sulfate group in position 2 of the iduronic acid and its deficiency causes storage of dermatan and heparan sulfate (Jung et al. 2010). MPS II has an estimated incidence of around 1 in 77,000 live male births (Burton et al. 2010) and the clinical features involve the development of increasingly severe and life-limiting multisystem involvement over time (Neufeld and Muenzer 2001). The main treatment for MPS II is ERT, in which the recombinant enzyme Idursulfase (recombinant human Iduronate-2-sulfatase, Elaprase®, Shire HGT, USA) is administered weekly to the patient. In the cases with CNS involvement, this approach fails to correct the symptoms because the enzyme does not cross the blood-brain barrier (Martin 2007).

The somatic cell therapy using microencapsulated cells to treat MPS II was investigated by two studies. The first one showed a proof of principle with an *in vitro* study in which Hunter primary fibroblasts were co-cultured with alginate microcapsules containing C2C12 cell clones overexpressing IDS. After 5 days of co-culture this strategy was able to increase IDS activity inside the deficient fibroblasts to levels similar to normal (Tomanin et al. 2002). The second study was a pre-clinical experiment in which there was intraperitoneal implantation of APA microcapsules containing 1.5×10^6 allogeneic myoblasts (C2C12) overexpressing IDS in the MPS II mouse model. Animals were

treated for 8 weeks and an increase in IDS activity in plasma and different tissues was observed, along with a reduction on urinary GAG between the fourth and the sixth week of treatment. At the end of the treatment, a reduction of 30% in the amount of GAG accumulated in the liver and 38% in the kidney were observed. In the spleen, GAG levels were almost normal (Friso et al. 2005). In addition, no immunogenic response against the recombinant protein was observed in mice, either immunosuppressed or not. These results show the feasibility of the microencapsulation approach as a potential strategy to MPS II treatment.

Mucopolysaccharidosis type VII

Mucopolysaccharidosis type VII (MPS VII – MIM #253220), also known as sly syndrome, is caused by a deficiency in α -glucuronidase (GUSB) and affects less than 1 in 250,000 live births (<http://www.mpssociety.org>). This enzyme is involved in the stepwise degradation of several GAG, including dermatan, heparan, and chondroitin sulfate. Accumulation of these GAG takes place in the lysosome of many systems and tissues, including the CNS. The clinical symptoms are severe mental defect with cognitive and behavioral problems, short stature, hepatosplenomegaly and skeletal deformities (Richard et al. 2009). At present there is no treatment available for this disease.

To evaluate the usefulness of this technique to treat MPS VII, Ross et al. (2000a) injected APA encapsulated non-autologous cells overexpressing *Gusb* in the peritoneum of MPS VII mice. The results showed the presence of *Gusb* in the plasma 24 hours after injection, reaching 66% of physiological levels by 2 weeks post implantation. Activity of *Gusb* was also detected in liver and spleen for the duration of the 8-week experiment. Accumulation of GAG was significantly reduced in liver and spleen sections and urinary GAG content reached normal levels. However, the implanted mice developed antibodies against the recombinant enzyme. This was surpassed by T cell-mediated immune modulation, enhancing the effectiveness of the therapy.

In another study, Ross et al. (2000b) encapsulated mouse 2A50 fibroblasts, a cell line deficient in the mannose 6-phosphate receptor, transfected with a plasmid to express mouse *Gusb*. The cells were encapsulated in APA and implanted directly into the lateral ventricles of the brain of MPS VII mice. β -glucuronidase was delivered throughout most of the CNS, reversing the histological pathology. Moreover, there were improvements in the circadian rhythm behavioral abnormalities, with a more stable periodicity and a less fragmented pattern of activity.

Nakama et al. (2006) also evaluated the therapeutical efficacy of cell microencapsulation for MPS VII. They generated an immortalized human amniotic epithelial cells

and transfected them with an adenoviral vector encoding human GUSB. The cells were encapsulated and co-cultured with MPS VII human and mouse fibroblasts and high GUSB activity was detected in the medium. Addition of mannose-6-phosphate led to decreased enzyme activity, suggesting an uptake of the enzyme mediated by mannose-6-phosphate receptor. The microencapsulated cells were also implanted in the brain of C3H mice. One week after the injection, the enzyme activity was significantly higher in the brains of the recipient mice compared to controls.

Taken together, these three studies show the efficacy of the microencapsulation approach in increasing the levels of enzyme in the CNS and correcting some of the symptoms present in the MPS VII mice.

Metachromatic Leukodystrophy

Metachromatic leukodystrophy (MLD – MIM #250100) is an autosomal recessive disease caused by the deficiency of Arylsulfatase A (ARSA – E.C.3.1.6.8) with an incidence of 1 in 40,000 live births (Mabe-Santana 2006). This deficiency results in the storage of sulfatide (cerebroside 3-sulfate), a major component of myelin involved in cell-to-cell interactions (Marcus et al. 2006). This disease is characterized by myelin degeneration in both the central and peripheral nervous systems, leading to progressive motor and mental deterioration culminating in death in early childhood in the infantile form. There is no effective treatment for MLD.

Consiglio et al. (2007) transduced C2C12 mouse myoblasts with a retroviral vector containing the full-length human *ARSA* cDNA and evaluated the efficacy of the recombinant secreted enzyme to reverse the MLD phenotype in oligodendrocytes (OL) of the MLD mouse model in vitro. Conditioned media of C2C12 cells over-expressing *ARSA* encapsulated in polyether-sulfone polymer was collected and used to treat OL. The deficient cells internalized the enzyme and it was normally sorted to the lysosomal compartment, reaching 80% of physiological levels and restoring the metabolism of sulfatide.

Also in this perspective, Lagranha et al. (2008) have shown the ability of Baby Hamster Kidney (BHK) cells over-expressing ARSA to correct the deficiency of this enzyme in human skin fibroblasts. BHK cells were transfected with a plasmid containing *ARSA* cDNA, encapsulated in sodium alginate and co-cultured with fibroblasts from MLD patients for 4 weeks. Three groups were analyzed: fibroblasts treated with ARSA-over-expressing BHK cells (rBHK) trapped in alginate capsules (capsules group), fibroblasts treated with supernatant of non-encapsulated rBHK (uptake control) and fibroblasts treated with empty capsules (empty group). Untreated and normal fibroblasts were used as controls. Capsules and uptake control groups

showed higher enzymatic activity levels, compared to MLD untreated, reaching normal levels of the enzyme. In the empty group, ARSA activity was equal to that of untreated fibroblasts. Transmission electron microscopy showed evidence of normalization of the lysosomal ultra structure, suggesting that the secreted enzyme was able to degrade the substrate. Thus, these results show the promising potential of developing an ARSA delivery system to the CNS based on the use of a microencapsulated cells line for gene therapy of MLD.

Fabry disease

Fabry disease (FD - MIM 301500) is an X-linked recessive disorder caused by the alpha-Galactosidase A (GLA - E.C. 3.2.1.22) deficiency that affects 1 in 40,000-60,000 male births (Lin et al. 2010). The lack of this enzyme activity leads to an accumulation of globotriaosylceramide and related glycosphingolipids upon the lysosomes (Filoni et al. 2010). There is heterogeneity of symptoms in Fabry patients, with renal, cardiac, and neurologic manifestations due to vascular problems being present alone or together in most patients (Sirrs et al. 2010). Hypohidrosis, angiokeratoma, acroparesthesia and corneal opacity are also common signs and symptoms of the disease (Naganawa et al. 2002). The available treatment for FD is ERT with Agalsidase alpha (recombinant human alpha-galactosidase A, Replagal®, Shire HGT, USA) or Agalsidase beta (recombinant human alpha-galactosidase A, Fabrazyme®, Genzyme Corporation, USA). This approach does not completely reverse the all symptoms (Jardim et al. 2006) and requires the adhesion of the patients to a life-long treatment.

There is one study using microencapsulated cells in vitro for FD. Patient's fibroblasts were co-cultured with microencapsulated recombinant Chinese Hamster Ovary cells (CHO) over-expressing alpha-galactosidase. Fibroblasts were able to uptake the enzyme decreasing the globotriaosylceramide levels inside the cells (Naganawa et al. 2002). There is a requirement of more studies of microencapsulation for FD, especially in vivo, but this first work show evidence of the potential functionality of this tool.

Conclusions

Cell microencapsulation emerged many years ago as a promising tool for biotechnology and medicine (Chang 1964). It is a potentially cost-effective method to treat a wide range of diseases. Although the rationale of using cell microencapsulation to treat LSD seems straightforward, there are just a few studies published about it. Moreover, this technology is still far from the clinical setting. In order

for cell microencapsulation to become a treatment option for LSD, there are several issues that need to be overcome. Since these are life long diseases, there is need for biocompatible and stable materials in capsule manufacturing that could be kept for long periods of time inside the patients. The development of more accurate and less invasive surgical procedures to implant the capsules is also needed, especially for treating CNS symptoms. In addition, the achievement of a higher output of recombinant enzyme and optimization of the amount cells to be encapsulated is another critical point. Studies to address these issues and bring the microencapsulation technique closer to a realistic proposal for clinical application for the LSD are needed.

Acknowledgements TGC is the recipient of a CAPES scholarship; VLL and FQM are recipients of CNPq scholarships, UM and RG are recipient of CNPq PQ scholarships. This work was supported by FIPE-HCPA.

References

- Barsoum SC, Milgram W, Mackay W et al. (2003) Delivery of recombinant gene product to canine brain with the use of microencapsulation. *J Lab Clin Med* 142(6):399–413
- Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM et al. (1991) Replacement therapy for inherited enzyme deficiency—macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N Engl J Med* 324(21):1464–1470
- Baruch L, Benny O, Gilert A, Ukobnik M, Ben Itzhak O, Machluf M (2009) Alginate-PLL cell encapsulation system Co-entrapping PLGA-microspheres for the continuous release of anti-inflammatory drugs. *Biomed Microdevices* 11:1103–1113
- Beck M (2010) Therapy for Lysosomal Storage Disorders. *IUBMB Life* 62(1):33–40
- Blasi P, Giovagnoli S, Schoubben A, Ricci M, Rossi C, Luca G, Basta G, Calafiore R (2006) Preparation and in vitro and in vivo characterization of composite microcapsules for cell encapsulation. *Int J Pharm*. 31;324(1):27–36.
- Bloch J, Bachoud-Lévi AC, Déglon N et al. (2004) Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther* 15(10):968–975
- Boelens JJ, Prasad VK, Tolar J, Wynn RF, Peters C (2010) Current international perspectives on hematopoietic stem cell transplantation for inherited metabolic disorders. *Pediatr Clin N Am* 57(1):123–145
- Bressel T, Paz AH, Baldo G, Lima EOC, Matte U, Saraiva-Pereira M (2008) An effective device for generating alginate microcapsules. *Genet Mol Biol* 31:1
- Burton BK, Guffon N, Roberts J, van der Ploeg AT, Jones SA (2010) Home treatment with intravenous enzyme replacement therapy with idursulfase for mucopolysaccharidosis type II - data from the Hunter Outcome Survey. *Mol Genet Metab* 101(2–3):123–129
- Chang TM (1964) Semipermeable microcapsules. *Science* 146:524–525
- Chang PL (1999) Encapsulation for somatic gene therapy. *Ann N Y Acad Sci* 18:(875):146–158. *Mater Res*
- Chang PL, Van Raamsdonk JM, Hortelano G, Barsoum SC, MacDonald NC, Stockley TL (1999) The in vivo delivery of heterologous proteins by microencapsulated recombinant cells. *Trends Biotechnol* 17(2):78–83
- Clarke LA, Wraith JE, Beck M et al. (2009) Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I. *Pediatrics* 123:229–240
- Consiglio A, Martino S, Dolcetta D et al. (2007) Metabolic correction in oligodendrocytes derived from metachromatic leukodystrophy mouse model by using encapsulated recombinant myoblasts. *J Neurol Sci* 255(1–2):7–16
- Cotugno G, Tessitore A, Capalbo A et al. (2010) Different serum enzyme levels are required to rescue the various systemic features of the mucopolysaccharidoses. *Hum Gene Ther* 21(5):555–569
- Déglon N, Heyd B, Tan SA, Joseph JM, Zurn AD, Aebischer P (1996) Central nervous system delivery of recombinant ciliary neurotrophic factor by polymer encapsulated differentiated C2C12 myoblasts. *Hum Gene Ther* 7(17):2135–2146
- Filoni C, Caciotti A, Carraresi L et al. (2010) Functional studies of new GLA gene mutations leading to conformational Fabry disease. *Biochim Biophys Acta* 1802(2):247–252
- Friso A, Tomanin R, Alba S et al. (2005) Reduction of GAG storage in MPS II mouse model following implantation of encapsulated recombinant myoblasts. *J Gene Med* 7(11):1482–1491
- Gan Q, Wang T (2007) Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids Surf B Biointerfaces* 59(1):24–34
- Grandoso L, Ponce S, Manuel I et al. (2007) Long-term survival of encapsulated GDNF secreting cells implanted within the striatum of parkinsonized rats. *Int J Pharm* 343(1–2):69–78
- Griffon DJ, Sedighi MR, Sendemir-Urkmez A, Stewart AA, Jamison R (2005) Evaluation of vacuum and dynamic cell seeding of polyglycolic acid and chitosan scaffolds for cartilage engineering. *Am J Vet Res* 66(4):599–605
- Harmatz P, Whitley CB, Waber L et al. (2004) Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *J Pediatr* 144(5):574–580
- Heese BA (2008) Current strategies in the management of lysosomal storage Diseases. *Semin Pediatr Neurol* 15:119–126
- Hobbs JR (1981) Bone marrow transplantation for inborn errors. *Lancet* 2(8249):735–739
- Hoffman D, Breakefield XO, Short MP, Aebischer P (1993) Transplantation of a polymer-encapsulated cell line genetically engineered to release NGF. *Exp Neurol* 122(1):100–106
- Jardim LB, Aesse F, Vedolin LM et al. (2006) White matter lesions in Fabry disease before and after enzyme replacement therapy: a 2-year follow-up. *Arq Neuropsiquiatr* 64(3B):711–717
- Jung SC, Park ES, Choi EN, Kim CH, Kim SJ, Jin DK (2010) Characterization of a novel mucopolysaccharidosis type II mouse model and recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy. *Mol Cells* 30(1):13–18
- Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE et al. (2001) Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N Engl J Med* 344(3):182–188
- Kishima H, Poyot T, Bloch J et al. (2004) Encapsulated GDNF-producing C2C12 cells for Parkinson's disease: a pre-clinical study in chronic MPTP-treated baboons. *Neurobiol Dis* 16(2):428–439
- Kuijlen JM, de Haan BJ, Helfrich W, de Boer JF, Samplonius D, Mooij JJ, de Vos P (2006) The efficacy of alginate encapsulated CHO-K1 single chain-TRAIL producer cells in the treatment of brain tumors. *J Neurooncol* 78(1):31–39
- Lagranha VL, Baldo G, de Carvalho TG et al. (2008) In vitro correction of ARSA deficiency in human skin fibroblasts from metachromatic leukodystrophy patients after treatment with microencapsulated recombinant cells. *Metab Brain Dis* 23(4):469–484

- Lin HY, Huang CH, Yu HC et al. (2010) Enzyme assay and clinical assessment in subjects with a Chinese hotspot late-onset Fabry mutation (IVS4+919G→A). *J Inherit Metab Dis* 33(5):619–624
- Lowry RB, Renwick DH (1971) Relative frequency of the Hurler and Hunter syndromes. *N Engl J Med* 28;284(4):221–2.
- Mabe-Santana P (2006) La enfermedad de Krabbe y la leucodistrofia metacromática. In: Sanjurjo P, Baldellou A (eds.) *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*: Ergon, 639–650
- Marcus J, Honigbaum S, Shroff S, Honke K, Rosenbluth J, Dupree JL (2006) Sulfatide is essential for the maintenance of CNS myelin and axon structure. *Glia* 53:372–381
- Martin RA (2007) Mucopolysaccharidosis Type II. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K (eds.) *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle
- Martins AM, Dualibi AP, Norato D et al. (2009) Guidelines for the management of mucopolysaccharidosis type I. *J Pediatr* 155(4 Suppl):S32–S46
- Matzner U, Herbst E, Hedayati KK et al. (2005) Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *Hum Mol Genet* 14:1139–1152
- Mayer FQ, Baldo G, de Carvalho TG, Lagranha VL, Giugliani R, Matte U (2010) Effects of cryopreservation and hypothermic storage on cell viability and enzyme activity in recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase. *Artif Organs* 34(5):434–439
- Maysinger D, Berezovskaya O, Fedoroff S (1996) The hematopoietic cytokine colony stimulating factor 1 is also a growth factor in the CNS: (II). Microencapsulated CSF-1 and LM-10 cells as delivery systems. *Exp Neurol* 141(1):47–56
- Mazumder MA, Burke NA, Shen F, Potter MA, Stöver HD (2009) Core-cross-linked alginate microcapsules for cell encapsulation. *Biomacromolecules* 8(10(6)):1365–1373
- Muenzer J, Wraith JE, Beck M et al. (2006) A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Genet Med* 8(8):465–473
- Murua A, Orive G, Hernandez RM, Pedraz JL (2010) EPO delivery by genetically engineered C2C12 myoblasts immobilized in microcapsules. *Adv Exp Med Biol* 670:54–67
- Naganawa Y, Ohsugi K, Kase R, Date I, Sakuraba H, Sakuragawa N (2002) In vitro study of encapsulation therapy for Fabry disease using genetically engineered CHO cell line. *Cell Transplant* 11(4):325–329
- Nakama H, Ohsugi K, Otsuki T et al. (2006) Encapsulation cell therapy for mucopolysaccharidosis type VII using genetically engineered immortalized human amniotic epithelial cells. *Tohoku J Exp Med* 209(1):23–32
- National MPS Society, viewed August 14 2010, <http://www.mppsociety.org>
- Neufeld EF, Muenzer J (2001) The mucopolysaccharidoses. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W et al. (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw Hill, New York, pp 3421–3452
- Orive G, Ponce S, Hernandez RM, Gascon AR, Igartua M, Pedraz JL (2002) Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials* 23(18):3825–3831
- Orive G, Gascon RA, Hernandez RM, Igartua M, Pedraz JL (2003) Cell microencapsulation technology for biomedical purposes: novel insights and challenges. *Trends Pharmacol Sci* 24(5):207–210
- Orive G, Tam SK, Pedraz JL, Hallé JP (2006) Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials* 27(20):3691–3700
- Parkinson-Lawrence EJ, Shandala T, Prodoehl M, Plew R, Borlace GN, Brooks DA (2010) Lysosomal storage disease: revealing lysosomal function and physiology. *Physiology* 25:102–115
- Peirone M, Ross CJ, Hortelano G, Brash JL, Chang PL (1998) Encapsulation of various recombinant mammalian cell types in different alginate microcapsules. *J Biomed Mater Res* 15(42(4)):587–96
- Richard M, Arfi A, Seguin J, Gandolphe C, Scherman D (2009) Widespread biochemical correction of murine mucopolysaccharidosis type VII pathology by liver hydrodynamic plasmid delivery. *Gene Ther* 16(6):746–756
- Ross CJ, Bastedo L, Maier SA, Sands MS, Chang PL (2000a) Treatment of a lysosomal storage disease, mucopolysaccharidosis VII, with microencapsulated recombinant cells. *Hum Gene Ther* 11(15):2117–2127
- Ross CJ, Ralph M, Chang PL (2000b) Somatic gene therapy for a neurodegenerative disease using microencapsulated recombinant cells. *Exp Neurol* 166(2):276–286
- Schiffmann R, Kopp JB, Austin HA et al. (2001) Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 285(21):2743–2749
- Shull RM, Kakkis ED, McEntee MF, Kania SA, Jonas AJ, Neufeld EF (1994) Enzyme replacement in a canine model of Hurler syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(26):12937–12941
- Shull RM, Lu X, McEntee MF, Bright RM, Pepper KA, Kohn DB (1996) Myoblast gene therapy in canine mucopolysaccharidosis. I: abrogation by an immune response to alpha-L-iduronidase. *Hum Gene Ther* 7(13):1595–1603
- Sifuentes M, Doroshov R, Hoft R et al. (2007) A follow-up study of MPS I patients treated with laronidase enzyme replacement therapy for 6 years. *Mol Genet Metab* 90:171–180
- Sirrs S, Clarke JT, Bichet DG et al. (2010) Baseline characteristics of patients enrolled in the Canadian Fabry Disease Initiative. *Mol Genet Metab* 99(4):367–373
- Sly WS, Fischer HD, Gonzalez-Noriega A, Grubb JH, Natowicz M (1981) Role of the 6-phosphomannosyl-enzyme receptor in intracellular transport and adsorptive pinocytosis of lysosomal enzymes. *Meth Cell Biol* 23:191–214
- Spuch C, Antequera D, Portero A et al. (2010) The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Biomaterials* 31(21):5608–5618
- Stein C, Gieselmann V, Kreysing J et al. (1989) Cloning and expression of human arylsulfatase A. *J Biol Chem* 264:1252–1259
- Tomanin R, Friso A, Alba S et al. (2002) M. Non-viral transfer approaches for the gene therapy of mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *Acta Paediatr Suppl* 91(439):100–104
- Tylki-Szymanska A, Marucha J, Jurecka A, Syczewska M, Czartoryska M (2010) Efficacy of recombinant human α -L-iduronidase (laronidase) on restricted range of motion of upper extremities in mucopolysaccharidosis type I patients. *J Inherit Metab Dis* 33:151–157
- Uludag H, Vos P, Tresco P (2000) Technology of mammalian cell encapsulation. *Advac Drug Deliv Rev* 42:29–64
- Van den Hout JM, Reuser AJ, de Klerk JB, Arts WF, Smeitink JA, Van der Ploeg AT (2001) Enzyme therapy for pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk. *J Inherit Metab Dis* 24(2):266–274
- Vitner EB, Platt FM, Futerman AH (2010) Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *J Biol Chem* 285(27):20423–20427
- Walkley SU (2009) Pathogenic cascades in lysosomal disease-Why so complex? *J Inherit Metab Dis* 32(2):181–189
- Wraith JE (1995) The mucopolysaccharidoses: a clinical review and guide to management. *Arch Dis Child* 72:263–267