

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Anna Cláudia Dilda

**AVALIAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DE MACROCÁPSULAS DE mPVDF:
PARAMETROS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Porto Alegre
2011

Anna Cláudia Dilda

**AVALIAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DE MACROCÁPSULAS DE
mPVDF:
PARAMETROS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Ciências
Básicas da Saúde da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Ursula Matte
Co-orientadora: Drda. Valeska Lizzi Lagranha

Porto Alegre
2011

AGRADECIMENTOS

Ao professor Roberto Giugliani e à Dra. Ursula Matte por me receberem no Centro de Terapia Gênica e tornarem possível este trabalho.

À Dra. Ursula Matte pela orientação, suporte e troca de conhecimentos.

À Valeska, minha co-orientadora, por me ajudar, orientar e ensinar em todos os momentos da confecção deste trabalho.

À Talita por estar sempre disposta a ajudar e pelo enorme apoio técnico e psicológico.

À Flavinha, pela confecção da lâminas e pelo tratamento sempre carinhoso e bem humorado.

Aos colegas do Centro de Terapia Gênica pelas rodas de conversas, chimarrão e bolachinhas, que também foram essenciais para o sucesso do trabalho.

Ao Hospital de Clínicas pela infra-estrutura proporcionada, essencial para o trabalho, e pela bolsa de iniciação científica.

Aos professores da UFRGS por todo o conhecimento passado.

À Barbara pela amizade e suporte sempre que preciso.

Ao Lucas, por me proporcionar os momentos de lazer que, de certa forma, possibilitaram a concretização deste trabalho.

Aos meus amigos pela compreensão da minha ausência e por me darem força e desejarem meu sucesso.

E, finalmente, à minha família, pelo apoio inestimável, sem eles, este trabalho jamais seria possível.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMO	v
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Mucopolissacaridose Tipo I.....	7
1.2 Terapia Gênica	9
1.3 Terapia Celular	11
1.3 Encapsulação Celular	12
1.4.1 Microencapsulação	12
1.4.2 Macroencapsulação	16
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4. ARTIGO	21
5. CONCLUSÕES.....	42
6. PERSPECTIVAS	43
7. REFERÊNCIAS	44

LISTA DE ABREVIATURAS

APA: Alginato-poli-L-lisina-alginato
ARSA: Arilsulfatase A
BHK: *Baby Hamster Kidney*
CNTF: do inglês, fator neurotrófico ciliar
DECH: do inglês, doença do enxerto contra hospedeiro
DMEM: *Dulbecco`s Modified Eagle Media*
GAG: Glicosaminoglicanos
GUSB: β -glucoronidase
HE: Hematoxilina-Eosina
IDUA: α -l-iduronidase
MPS: Mucopolissacaridose
mPVDF: do inglês, fuoreto de polivinilideno modificado
PAN-PVC: do inglês, poli cloreto de vinila-acrilonitrila
PES: Polietersulfona
rBHK: *Baby Hamster Kidney* recombinantes
SNC: Sistema Nervoso Central
TCTH: Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas
TRE: Terapia de Reposição Enzimatica

RESUMO

A encapsulação celular é uma estratégia proposta para o tratamento de diversas doenças por fazer a localização, a manutenção e o controle da entrega de produtos terapêuticos *in vivo*. Esta tecnologia é capaz de proteger as células imobilizadas em seu interior da resposta imunológica do hospedeiro, ao mesmo tempo que permite a entrada de nutrientes e oxigênio e a saída de produtos terapêuticos e excreções celulares. A permeabilidade, a biocompatibilidade e a capacidade imunoprotetora da cápsula são essenciais para seu bom funcionamento. Este trabalho buscou avaliar a capacidade de liberação de produtos terapêuticos pelas macrocápsulas de fuoreto de polivinilideno modificado (mPVDF) e a sobrevivência e proliferação das células encapsuladas *in vitro*, além da biocompatibilidade do material *in vivo*. Para isso, células da linhagem BHK modificadas geneticamente para superexpressar o gene *IDUA* (rBHK) foram microencapsuladas, macroencapsuladas ou cultivadas livremente durante 24h, após as quais foi medida a atividade enzimática no meio para comparar a eficiência de liberação nos três grupos. Foram encapsuladas 2×10^5 , 2×10^6 ou 2×10^7 células rBHK em macrocápsulas e estas foram cultivadas por 7 ou 14 dias para observar a proliferação e sobrevivência das células na macrocápsula e determinar a concentração a ser usada *in vivo*. Como estudo piloto, foram implantadas três macrocápsulas em um camundongo C57/BL6 (um implante intraperitoneal, um subcutâneo e um intramuscular) para observar a reação inflamatória por análise histológica e sua influência na liberação da enzima. Não foi encontrada diferença significativa na liberação enzimática entre as macrocápsulas e as

microcápsulas. A concentração celular mais adequada encontrada foi 2×10^5 células por macrocápsula, já que concentrações maiores parecem afetar a sobrevivência celular e a liberação da enzima. Na análise histológica foi observada reação inflamatória contra corpo estranho e formação de fibrose. Um defeito de fabricação da macrocápsula utilizada permitiu a passagem de células do sistema imunológico, que reagira contra as células implantadas, afetando a liberação da enzima. Os testes *in vitro* indicam que as macrocápsulas podem ser uma estratégia viável para o tratamento de diversas doenças, entretanto os ensaios devem ser repetidos com macrocápsulas íntegras, as quais devem ser testadas em um número maior de animais.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mucopolissacaridose Tipo I:

A Mucopolissacaridose do tipo I (MPS I) é uma doença de depósito lisossômico de herança autossômica recessiva caracterizada por uma deficiência na atividade da α -L-iduronidase (IDUA - EC 3.2.1.76), enzima responsável pela clivagem do ácido α -L-idurônico terminal nos glicosaminoglicanos (GAG) heparan sulfato e dermatan sulfato. Tal deficiência leva ao acúmulo dessas substâncias nos lisossomos resultando em disfunções multissistêmicas (1,2) .

A MPS I apresenta um espectro fenotípico que inclui desde manifestações clínicas leves a graves, sendo subdividida em três formas: Hurler (OMIM #607014), Hurler-Scheie (OMIM #607015) e Scheie (OMIM #607016). A síndrome de Hurler, que afeta 1 a cada 100.000 nascidos vivos apresenta sintomas com maior gravidade. A síndrome de Scheie atingindo 1 a cada 800.000 nascidos vivos (1) é a forma mais leve da doença e a síndrome de Hurler-Scheie possui manifestações intermediárias (3). Os sintomas comuns da doença incluem dificuldade respiratória e infecções de repetição das vias aéreas, apnéia obstrutiva do sono, doença cardíaca valvular e coronariana, hepatoesplenomegalia, disfunções gastrintestinais, desaceleração do crescimento, disostose múltipla, artropatia, síndrome do túnel do carpo, opacificação da córnea, retinite pigmentosa, perda auditiva, hipertrofia dos alvéolos dentários, hidrocefalia comunicante, retardo e degeneração mental (somente na síndrome de Hurler), agitação e

hiperatividade (4). A sobrevivência dos pacientes vai até a primeira década de vida nos casos graves, enquanto os que apresentam a forma atenuada da doença chegam à adolescência ou à vida adulta, porém com morbidade significativa (5).

A conduta aplicada atualmente aos pacientes inclui tratamento multidisciplinar dos sintomas (fisioterapia, cirurgias, suplementação de oxigênio) e tratamentos específicos para a causa da doença, que incluem Terapia de Reposição Enzimática (TRE) e Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas (TCTH). O TCTH, se realizado precocemente, é capaz de aliviar a maior parte dos sintomas da forma grave da doença, alcançando inclusive órgãos de difícil acesso como o Sistema Nervoso Central (SNC) e ossos, sendo capaz de melhorar o desempenho neurocognitivo, aumentar a velocidade de crescimento e prevenir problemas cardíacos (6). Entretanto, o procedimento possui alto risco de morbidade e mortalidade devido à rejeição ou doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) e seu uso tem sido preterido em favor da TRE sempre que disponível (7).

Na TRE ocorre a infusão intravenosa da enzima α -L-iduronidase recombinante, a Laronidase (Aldurazyme; Genzyme Corporation, Cambridge, Massachusetts). A enzima é internalizada pelas células através do receptor de manose-6-fosfato, evitando o acúmulo de glicosaminoglicanos nos lisossomos (8). Tal terapia tem capacidade de diminuir a hepatomegalia, melhorar a função respiratória, aumentar a amplitude de movimento das articulações, diminuir a hipertrofia ventricular, melhorar o crescimento e a qualidade de vida em geral. Por outro lado, a Laronidase é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica e alcançar

os ossos e articulações, não tendo efeito sobre os sintomas neurocognitivos, ósseos e articulares. (3).

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 (9). Somado o fato da administração da enzima ter de ser realizada semanalmente, há dificuldade na adesão por parte dos pacientes ao tratamento, que muitas vezes necessitam se deslocar a grandes distâncias para receber a infusão da enzima.

1.2 Terapia Gênica

A fim de superar as limitações dos tratamentos acima descritos, várias estratégias inovadoras desenvolvidas pela comunidade científica têm sido estudadas quanto à sua possível aplicação ao tratamento da MPS I. Dentre elas está a terapia gênica (10, 11)

A terapia gênica consiste na correção de um defeito genético através da inserção de um gene funcional capaz de corrigir ou substituir o gene defeituoso na célula, de modo a expressar ou bloquear a expressão de uma proteína de interesse, revertendo o fenótipo patológico (12). Estudos clínicos nessa área têm abordado câncer, doenças infecciosas, doenças genéticas mendelianas e doenças comuns complexas (13). A inserção do material genético pode ser feita de três maneiras: utilizando vetores virais, vetores não virais ou não utilizando vetores.

Os vetores virais mais usados nos estudos de transferência gênica são adenovírus, retrovírus, herpes simplex vírus, além dos vírus adeno-

associados e lentivírus, que tem sido maior foco dos estudos clínicos. (14, 15). Vetores virais são muito eficientes para a transferência gênica, entretanto trazem sérios riscos, como possibilidade de mutagênese insercional, resposta inflamatória aguda e respostas humorais e celulares tardias. (16, 17). Já vetores não virais são mais seguros, mas com menor eficiência na transferência. Estes utilizam compostos sintéticos ou naturais, ou ainda forças físicas para transferir o material genético para dentro da célula. Uma abordagem utilizada para a transferência gênica é simplesmente a injeção direta do plasmídeo no tecido, chamada *naked DNA*. Dessa forma, os materiais utilizados na terapia não viral são menos tóxicos e imunogênicos que os vetores virais, mais fáceis de produzir, podem ser tecido-específicos e podem ser aplicados repetidamente. Entretanto são geralmente menos eficazes e tem expressão de curta duração (18).

Alguns estudos têm sido conduzidos nessa área com o objetivo de ultrapassar a BHE e reverter os sintomas neurais das mucopolissacaridoses, obtendo relativo sucesso. Uma única injeção dos vetores adenoassociado tipo 2 (rAAV2) ou 5 (rAAV5) carregando o gene recombinante da IDUA no núcleo estriado de camundongos com MPS I foi capaz de reverter as condições neuropatológicas desses animais (19). Traas e colaboradores (20) foi capaz de corrigir as manifestações clínicas no modelo canino de MPS I através da injeção intravenosa neonatal de vetores retrovirais, inclusive os sintomas do SNC; o mesmo resultado também foi encontrado em modelo murino da doença (21, 22). A injeção intraencefálica de vetores AAV5 em modelo canino de MPS I sob imunossupressão foi associada à ampla dispersão do genoma do vetor, prevenção do acúmulo de GAG e redução da

neuropatologia (23). Entretanto, existem relatos de formação de tumores devido à inserção do transgene ao genoma, além da toxicidade do produto superexpresso às células receptoras, o que já foi descrito em outras doenças (24).

1.3 Terapia Celular

O transplante de células para restabelecer funções de órgãos e tecidos danificados é uma alternativa estudada para o tratamento de diversas patologias. Especialmente as células-tronco, que tem a capacidade de migrar, se diferenciar e regenerar, seriam capazes tanto de entregar produtos terapêuticos em longo prazo, quanto de reparar o parênquima lesado na doença. Aliando-se a terapia gênica à terapia celular é possível modificar células para que superexpresssem um produto terapêutico.

Um exemplo é o transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas geneticamente modificadas. Nessa abordagem, células da medula óssea do paciente são modificadas para superexpressar a enzima lisossômica deficiente no indivíduo afetado, sendo capazes de fazer a reposição desse produto sem a necessidade de ablação da medula óssea e sem risco de DECH (25). Entretanto, modelos animais demonstraram que há silenciamento do transgene sem a seleção positiva e substituição das células modificadas por repopulação da medula remanescente (26).

Aplicada às doenças lisossômicas, a fim de reverter os danos neurológicos da Mucopolissacaridose tipo VII, Kosuga e colaboradores (27) implantou células epiteliais amnióticas de rato modificadas para

superexpressar β -glucuronidase no corpo estriado do modelo murino de MPS VII. Foi observada diminuição do acúmulo lisossômico nos neurônios nas áreas de implantação. Da mesma forma, outro trabalho demonstrou que a aplicação de células modificadas geralmente requer algum grau de supressão do sistema imunológico e a expressão do transgene é de difícil manutenção (28).

1.4 Encapsulação Celular

Com a finalidade de evitar a aplicação de imunossuppressores ou a necessidade da utilização de células autólogas, foi desenvolvida a tecnologia de encapsulação celular. Esta tecnologia consiste em imobilizar células em membranas semipermeáveis, as quais permitem o fluxo de pequenas moléculas essenciais para a manutenção da viabilidade celular, como a entrada de oxigênio e nutrientes e a saída de metabólitos tóxicos e produtos terapêuticos, ao mesmo tempo em que barram o acesso do sistema imunológico às células transplantadas (29).

1.4.1 Microencapsulação

Em 1964, Thomas M. S. Chang (30) desenvolveu a tecnologia de microencapsulação e propôs seu uso para a reposição enzimática em doenças genéticas. A partir de então, microcápsulas têm sido aplicadas a diversos propósitos além do transplante de células, como a produção de moléculas biológicas em larga escala pela indústria biotecnológica (31), no

cultivo de células, podem ser utilizadas como arcabouço (32), para produção de órgão artificiais (33), ensaios de citotoxicidade (34), entre outros.

Diversos polímeros naturais e sintéticos têm sido estudados para a fabricação de microcápsulas. Os hidrogéis são mais utilizados devido a características como umidade e maleabilidade, o que diminui a irritação mecânica do tecido adjacente, hidrofiliabilidade, que minimiza a adsorção de proteínas e adesão celular, e alta permeabilidade a metabólitos e nutrientes de baixo peso molecular (35).

A biocompatibilidade é uma característica crítica para a escolha do material utilizado para a encapsulação e dela depende o sucesso do transplante. O alginato de sódio é o biomaterial mais utilizado devido a sua abundância, facilidade de gelificação e aparente biocompatibilidade. Trata-se de uma família de exopolissacarídeos existentes na matriz extracelular de algas marrons e algumas bactérias. É composto por resíduos de ácidos 1,4-D-manurônico (M) e 1,4-L-gulurônico (G) que formam blocos M, G ou se intercalam produzindo blocos MG em diversas proporções e padrões de ligação que dependem da fonte de onde foram extraídos. (36) O alginato geralmente é complexado com outros materiais principalmente o polícatión poli-L-lisina, para aumentar seu isolamento do sistema imunológico.

Colágeno, quitosana, agarose, ácido hialurônico e polietilenoglicol são exemplos de outros biomateriais utilizados. A quitosana e o ácido hialurônico são degradados por enzimas endógenas, o que limita seu uso ao transplante de células heterólogas (35).

Como estratégia terapêutica, as microcápsulas têm sido aplicadas no tratamento de diversas doenças como: diabetes (37), regeneração de ossos

e cartilagens (38, 39), doenças neurológicas como Huntington (40), Parkinson (41) e lesão de medula espinhal (42), câncer (43, 44), doenças cardíacas (45), dor neuropática crônica (46), falência hepática (47) e anemia (48). Para doenças mendelianas clássicas, como as doenças lisossômicas, o implante de células encapsuladas funciona como uma estratégia similar à reposição enzimática. Lagranha e colaboradores (49) constatou que células BHK (*Baby Hamster Kidney*) superexpressando arilsulfatase A (ARSA, EC: 3.1.6.8) e microencapsulas em alginato possuem a capacidade de reverter a deficiência enzimática de ARSA em cultura de fibroblastos extraídos de pacientes com Leucodistrofia Metacromática (OMIM #250100). Um experimento parecido foi conduzido para o tratamento da doença de Fabry (OMIM #301500), obtendo sucesso na diminuição do acúmulo lisossômico nos fibroblastos de pacientes afetados (50). Para as mucopolissacaridoses, as microcápsulas já foram utilizadas para a entrega de β -glucuronidase (GUSB), enzima defeituosa na MPS VII, tanto para corrigir o acúmulo visceral com implantes intraperitoneais (51), quanto para corrigir o acúmulo no SNC (52, 24). No último caso, células epiteliais amnióticas humanas superexpressando GUSB foram encapsuladas e implantadas diretamente no corpo estriado de modelo murino da doença. Foi possível detectar aumento da atividade de GUSB no parênquima cerebral sete dias após o implante das cápsulas (24).

Para a MPS II, foram implantadas microcápsulas de alginato-poli-lisina-alginato (APA) contendo mioblastos superexpressando iduronato-2-sulfatase no peritônio de camundongos *knockout* para o gene *Idua*. O

tratamento foi capaz de diminuir o acúmulo de GAG detectados no fígado, rins e baço, oito semanas após a implantação (53).

Para o tratamento de MPS I, as microcápsulas se apresentaram capazes de diminuir o acúmulo de GAG em fibroblastos de pacientes *in vitro* (54). Barsoum et al. (55) implantou células de rim canino Madin-Darby geneticamente modificadas superexpressando IDUA microencapsuladas em APA diretamente no encéfalo de cães com a deficiência enzimática. Houve resposta inflamatória extensa tanto no local do implante como nos tecidos adjacentes à incisão. Foram detectados baixos níveis de enzima em algumas regiões do encéfalo.

Nosso grupo tem avaliado o tratamento de camundongos MPS I (*knockout* para *IDUA*) com células microencapsuladas implantadas na cavidade intraperitoneal (56). As células encapsuladas são BHK recombinantes (rBHK) superexpressando o gene *IDUA* humano. Esta estratégia foi capaz de reduzir a excreção de GAG na urina em curto prazo. No entanto, os resultados ainda são inferiores aos obtidos com a TRE. Isto pode estar acontecendo devido a fatores como a falha na liberação da enzima pela formação de fibrose ao redor das cápsulas, já que uma pequena resposta inflamatória do tipo corpo-estranho e presença de fibrose nos locais dos implantes foi constatada por de Carvalho (57). Uma fibrose extra-capsular poderia ser responsável pela diminuição da liberação da enzima para o meio exterior. Além disso, Lagranha e colaboradores implantaram as células rBHK na cavidade intraperitoneal de camundongos MPS I e verificou que após 15 dias de implante as células encapsuladas recuperadas da cavidade peritoneal e mantidas em cultura tiveram uma

atividade média de 20,38 nmol/h/ml de meio, já quando despolimerizadas a média da atividade passou para 67,18 nmol/h/mL (dados não publicados). Somados, esses resultados demonstram que a formação da fibrose parece ser responsável pela baixa liberação da enzima aos camundongos.

Ainda assim, a imobilização de células parece ser uma alternativa bastante promissora no tratamento das doenças lisossômicas, uma vez que simula a TRE, sem a necessidade de injeções semanais, pois as células produzem a enzima durante todo o período em que estiverem viáveis. Entretanto, para esta terapia se tornar aplicável são necessários maiores estudos visando diminuir a resposta imunológica gerada ao biomaterial, possibilitando melhora na liberação da enzima.

1.4.2 Macroencapsulação

As macrocápsulas, como o nome sugere, são maiores e possuem uma relação volume-superfície menor quando comparadas às microcápsulas e são de fácil manipulação. São encontradas mais comumente na forma de fibras ocas, sendo as células infundidas em seu lúmen e as duas extremidades seladas, ou ainda na forma de membranas planas ligadas a um espaçador criando um compartimento de encapsulação.

As macrocápsulas são feitas de materiais semipermeáveis, dependem dos mecanismos homeostáticos do hospedeiro para a sustentação das células imobilizadas no seu interior, sendo a transferência de solutos através da membrana baseada em gradientes de concentração. Quanto maior o tamanho do dispositivo, mais difícil se torna a difusão das moléculas através

da membrana (29). Os implantes podem ser classificados de acordo com sua associação ao sistema vascular como intravasculares, quando são anastomosados a algum vaso do hospedeiro, ou extravasculares, quando dependem da formação de novos vasos na interface da membrana com o hospedeiro para manter a viabilidade das células encapsuladas (29).

Os materiais aplicados na fabricação desses dispositivos se baseiam geralmente em poli cloreto de vinila-acrilonitrila (PAN-PVC) ou polietersulfona (PES) (58) e de fluoreto de polivinilideno modificado (mPVDF) (59). As membranas de mPVDF são hidrofóbicas e resistentes a solventes orgânicos, ácidos e bases aquosos. Seus poros permitem a passagem de moléculas com até 500.000 Daltons. Podem ser autoclavadas e seladas por calor sem afetar sua funcionalidade ou tamanho dos poros. (manual do fabricante).

As macrocápsulas já foram aplicadas na cultura de células, como biorreatores (60), para mimetizar a barreira hematoencefálica *in vitro* (61), em pesquisas sobre câncer (62), no transplante de ilhotas pancreáticas para o tratamento de *diabetes mellitus* insulina-dependente (63), no tratamento de doenças neurodegenerativas (64) e na entrega de eritropoetina em modelo de anemia (65).

Bloch e colaboradores realizaram um ensaio clínico de fase I no qual microcápsulas contendo células BHK geneticamente modificadas foram macroencapsuladas em mPVDF para produzir fator neurotrófico ciliar (CNTF). As macrocápsulas foram implantadas no corpo estriado de pacientes com Doença de Huntington, sendo trocada a cada 6 meses por um período de 2 anos. Todos os pacientes permaneceram estáveis e alguns

mostraram melhora no estado eletrofisiológico. Entretanto, 13 das 24 macrocápsulas recuperadas não foram capazes de liberar quantidades significativas do fator (59).

2. JUSTIFICATIVA

A encapsulação celular é uma estratégia muito promissora para fazer a entrega contínua de produtos terapêuticos em longo prazo inclusive em locais de difícil acesso aos tratamentos convencionais como o Sistema Nervoso Central. Por esses motivos, sua aplicação no tratamento de doenças de depósito lisossômico tem sido pesquisada ativamente pelo Centro de Terapia Gênica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As pesquisas até agora desenvolvidas com microcápsulas de alginato de cálcio em modelo murino de MPS I foram capazes de produzir um fenótipo intermediário, uma vez que a resposta inflamatória e formação de fibrose ao redor das microcápsulas têm impedido uma liberação mais eficiente do produto. Uma das alternativas para resolver esse problema é a utilização de um material com maior biocompatibilidade, como as macrocápsulas de mPVDF, para que a reação imunitária não prejudique a entrega do produto terapêutico. Antes da aplicação destas para o tratamento da doença, é necessária uma avaliação do comportamento de proliferação, sobrevivência e liberação de produtos terapêuticos pelas células macroencapsuladas *in vitro* e a influência da resposta inflamatória sobre esses aspectos *in vivo*, já que esses aspectos ainda não foram estudados para este dispositivo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar, *in vitro*, a viabilidade, a cinética de proliferação celular e a liberação da enzima IDUA por células da linhagem BHK recombinantes imobilizadas em macrocápsulas de mPVDF e, caracterizar *in vivo* a biocompatibilidade destas macrocápsulas.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar, *in vitro*, a liberação da enzima IDUA pelas células macroencapsuladas, microencápsulas e células livres em 24h de cultivo.
- Avaliar, *in vitro*, a proliferação, viabilidade e liberação enzimática das rBHK macroencapsuladas nas concentrações de 2×10^5 , 2×10^6 e 2×10^7 durante 7 e 14 dias e determinar por meio destes ensaios a concentração celular a ser usada *in vivo*.
- Avaliar, *in vivo*, a ocorrência de reação inflamatória e formação de fibrose após implante em camundongos C57Bl/6 em três sítios de implantação: subcutâneo, músculo vasto-medial e intraperitoneal.
- Comparar a influência na viabilidade e liberação enzimática das células macroencapsuladas nos três sítios implantados.

4. ARTIGO

AVALIAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DE MACROCÁPSULAS DE mPVDF: PARAMETROS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Anna Cláudia Dilda¹, Valeska Lizzi Lagranha^{1,2}, Talita Giacomet de Carvalho^{1,2},
Luíse Meurer³, 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 Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil

Palavras chave: Encapsulação celular, mPVDF, biocompatibilidade

Correspondência: Anna Cláudia Dilda

Centro de Terapia Gênica/Centro de Pesquisas

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Porto Alegre, RS, Brasil

Fone/Fax: +55 51 33598838 / +55 51 33598010

e-mail: annadilda@gmail.com

(Trabalho a ser submetido ao periódico *Artificial Organs*)

Resumo

A encapsulação celular é uma tecnologia capaz de proteger as células no interior de cápsulas, prevenindo a resposta imunológica do hospedeiro, ao mesmo tempo que permite a entrada de nutrientes e oxigênio e a saída de produtos terapêuticos e excreções celulares, sendo proposta para o tratamento de diversas doenças. A permeabilidade, a biocompatibilidade e a capacidade imunoprotetora são essenciais para seu bom funcionamento. Este trabalho buscou avaliar a capacidade de liberação de produtos terapêuticos pelas macrocápsulas de mPVDF, a sobrevivência e proliferação das células encapsuladas *in vitro*, e a biocompatibilidade do material *in vivo*. Para isso, células da linhagem BHK superexpressando o gene *IDUA* (rBHK) foram microencapsuladas, macroencapsuladas ou cultivadas livremente durante 24h, após as quais foi medida a atividade enzimática para comparar a eficiência de liberação nos três grupos. Foram encapsuladas 2×10^5 , 2×10^6 ou 2×10^7 células rBHK por macrocápsula e estas foram cultivadas por 7 ou 14 dias para observar sua proliferação e sobrevivência no dispositivo. Foram implantadas três macrocápsulas em um camundongo C57Bl/6, um implante intraperitoneal, um subcutâneo e um intramuscular, para observar a reação inflamatória por análise histológica. Não foi encontrada diferença significativa na liberação enzimática entre as macrocápsulas e as microcápsulas. A concentração celular de 2×10^5 células por macrocápsula apresentou maior viabilidade celular e liberação enzimática. Na análise histológica foi observada reação inflamatória do tipo corpo estranho e formação de fibrose. Os testes *in vitro* indicam que as

macrocápsulas podem ser uma estratégia viável para o tratamento de diversas doenças, entretanto estas devem ser testadas em um número maior de animais.

[u1] Comentário: Anna, quantas palavras pode ter o resumo pelas normas da revista???? O teu tem 306. Eu acho que é 250 palavras. Só confere...

Introdução

O transplante de células para restabelecer funções de órgãos e tecidos danificados é uma alternativa estudada para o tratamento de diversas patologias. Aliada à terapia gênica é possível que se modifique essas células para que superexpressem um produto terapêutico de interesse. Entretanto, a aplicação de células modificadas geralmente requer algum grau de supressão do sistema imunológico (1). Uma alternativa proposta para esse problema é a encapsulação celular em membranas semipermeáveis que garantem a proteção das células encapsuladas da ação do sistema imunológico, ao mesmo tempo em que permitem o seu desenvolvimento, proliferação e entrega do produto terapêutico ao hospedeiro (2). Dessa forma evita-se a necessidade da utilização de células autólogas além da aplicação crônica de imunossuppressores.

As macrocápsulas são de fácil manipulação e ficam contidas no local de implante, são encontradas mais comumente na forma de fibras ocas, sendo as células infundidas em seu lúmen e as duas extremidades seladas, ou ainda na forma de membranas planas ligadas a um espaçador criando um compartimento de encapsulação (3). Estes dispositivos dependem dos mecanismos homeostáticos do hospedeiro para a sustentação das células imobilizadas no seu interior, sendo a transferência de solutos através da membrana baseada em gradientes de concentração (3). Os materiais

aplicados na fabricação desses dispositivos se baseiam geralmente em polícloreto de vinila-acrilonitrila (PAN-PVC) ou polietersulfona (PES) (4) e de fluoreto de polivinilideno modificado (mPVDF) (5).

As membranas de mPVDF são hidrofóbicas e resistentes a solventes orgânicos, ácidos e bases aquosos. Seus poros permitem a passagem de moléculas com até 500.000 Daltons, barrando o acesso de imunoglobulinas e células do sistema imunológico, mas permitindo a entrada de oxigênio, sais e glicose e a saída de metabólitos tóxicos (Cellmax® hollow fibers-Spectrum Laboratories, Germany). Macrocápsulas de mPVDF são aplicadas extensivamente na pesquisa de medicamentos para combate ao câncer (5, 6), e no transplante de ilhotas pancreáticas para o tratamento de *diabetes mellitus* insulina-dependente (7).

Este trabalho visa a caracterização *in vitro* da viabilidade, cinética de proliferação e liberação do produto terapêutico expresso por células da linhagem BHK (*Baby Hamster Kidney*) recombinantes (rBHK) imobilizadas em macrocápsulas de mPVDF e, a caracterização *in vivo* da biocompatibilidade destas macrocápsulas.

Materiais e Métodos

Cultura de Células

Células rBHK superexpressando IDUA foram obtidas por transfecção com lipofectamina (8). Os clones rBHK foram plaqueados em frascos de cultura de 75 cm² e mantidos em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle*

Media) enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina (condições padrão de cultivo: mantidos a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂). As células, quando confluentes, foram tripsinizadas (tripsina 0,5% EDTA 5,3mM) e divididas em frascos novos.

Microencapsulação celular

Para a microencapsulação das células rBHK foi utilizado o método previamente descrito pelo nosso grupo (9). Resumidamente, as células foram cultivadas até uma concentração de aproximadamente $2,5 \times 10^5$ cel/mL e misturadas a solução de alginato de sódio 1,5%, previamente esterilizado com luz ultravioleta. As suspensões foram colocadas numa seringa e então submetidas a um fluxo constante de 40 mL/h, num aparelho perfusor, acoplado a uma unidade de encapsulação (Nisco). No interior da unidade de encapsulação há uma agulha, e, ao passar pela ponta da agulha, um jato de ar na velocidade de 4 L/min, fez as com que células caíssem sobre uma solução de CaCl₂ 100 mM, (0.85% NaCl, tamponado com HEPES, pH 7,4), polimerizando o alginato. As microcápsulas obtidas foram lavadas com PBS 1X e posteriormente mantidas em condições padrão de cultivo por 24 h.

Macroencapsulação celular

Macrocápsulas de mPDVF (Cellmax® hollow fibers-Spectrum Laboratories, Germany) cilíndricas com um diâmetro interno de 1 mm e externo de 1,2 mm foram cortadas em pedaços de cerca de 1,5 cm. As células rBHK foram inseridas por uma das extremidades e após isso, ambas

[u2] Comentário: Aqui não falas a concentração celular

foram seladas por calor. As macrocápsulas contendo as rBHK foram então mantidas em condições padrão de cultivo celular por 24 h.

Comparação de liberação de IDUA e viabilidade celular

Foram plaqueadas células rBHK livres, microencapsuladas ou macroencapsuladas, na concentração de 2×10^5 , em quintuplicata. Após 24h de cultivo, nas condições padrão já descritas, o meio foi coletado para avaliar a liberação da enzima por ensaio enzimático.

[u3] Comentário: Como está escrito nos anteriores a concentração, acho que aqui não precisa repetir

Para o ensaio de viabilidade celular, as macrocápsulas foram abertas e as células retiradas de seu interior. As microcápsulas foram despolimerizadas pela adição de uma solução 125mM de citrato de sódio e as células foram recuperadas por centrifugação a 1000 rpm por 5 minutos. As rBHK cultivadas livremente foram tripsinizadas. Após esta etapa, todas as células foram coradas com Azul de Tripán e contadas em Câmara de Neubauer.

Ensaio enzimático

A medida da atividade de IDUA foi realizada por meio de ensaio enzimático através de técnica fluorimétrica utilizando como substrato o 4-metilumbeliferil- α -L-iduronídeo (4-MU, Glycosynth) conforme descrito por Hopwood e colaboradores (10). Os resultados obtidos foram expressos em nmol/h/mL de meio.

Ensaio de Proliferação

Para determinar a concentração celular a ser usada nos estudos *in vivo*, o comportamento de proliferação, a viabilidade e a liberação de IDUA das células rBHK macroencapsuladas em diferentes concentrações celulares foram avaliados. As células foram imobilizadas nas concentrações de 2×10^5 , 2×10^6 e 2×10^7 células por fibra de mPVDF. As macrocápsulas foram, então, cultivadas por 7 ou 14 dias (n=3 por grupo) e após esse período, foi medida a atividade de IDUA no meio e células foram recuperadas para o ensaio de viabilidade já descrito acima.

Caracterização das macrocápsulas in vivo

Para a avaliação da biocompatibilidade das macrocápsulas, foi utilizado um camundongo C57/BL6 normal, no qual foram implantadas macrocápsulas em três sítios distintos: uma sem células no músculo vasto medial medindo 0,5 cm e outras duas contendo 2×10^5 células cada e medindo 1,0 cm foram implantadas uma na cavidade intraperitoneal e outra no tecido subcutâneo. O animal foi mantido 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*.

Implantação das macrocápsulas

O camundongo foi anestesiado por inalação com Isoflurano (Cristalia 150 ml/h) durante todo o procedimento. Foram feitas incisões de aproximadamente 1cm para implantação das macrocápsulas na cavidade

intraperitoneal, no músculo vasto-medial e por via subcutânea no abdome. Após implante os cortes foram suturados com fio vicryl 4.0 (Ethicon), o camundongo recebeu Tramal (cloridrato de tramadol, 0,01 mL/g, Pfizer) e foi mantido em incubadora para recuperação.

[u4] Comentário: Acho que não precisa, pois esse é o nome genérico, como usamos o comercial, deixa assim mesmo, apenas tramal

Após 14 dias do implante, o camundongo foi sacrificado em câmara de CO₂ e macrocápsulas foram recuperadas, além de ser feita coleta de sangue.

Análise histológica

As macrocápsulas recuperadas do implante subcutâneo e intramuscular foram coletadas juntamente com tecidos adjacentes ao sítio de implantação (músculo vasto-medial e pele do abdômen) e fixadas em formol 10% tamponado. As secções foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e Picrossírius.

As lâminas coradas com HE e Picrossírius foram analisadas em microscópio óptico (Olympus BX51) para verificar a presença de infiltrado inflamatório e a formação de fibrose, respectivamente.

Análise Estatística

Os testes foram realizados através do software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

Comparação da liberação de IDUA e viabilidade

O ensaio fluorimétrico foi capaz de detectar uma atividade enzimática de $9,19 \pm 3,41$ nmol/h/mL de meio para as células livres, as microcápsulas apresentaram atividade média de $1,17 \pm 0,33$ nmol/h/ml e as macrocápsulas $1,02 \pm 0,19$ nmol/h/ml de meio (figura 1). Não houve diferença significativa quanto à liberação enzimática entre as células macro e microencapsuladas ($p=0,824$), e ambas apresentaram liberação cerca de 9 vezes menor que as células livres ($p=5$). As células livres apresentaram viabilidade média de 87%, enquanto as microcápsulas 74,35% e as macrocápsulas 76,7%, não havendo diferença estatística.

Ensaio de proliferação

Na avaliação da proliferação e viabilidade das células na macrocápsula, foi observado que a concentração de 2×10^5 células por macrocápsula é a que proporciona melhores condições para a multiplicação celular, permitindo uma boa sobrevivência e maior grau de liberação da enzima para o meio extracapsular tanto em 7 como em 14 dias de cultivo (figura 2). A proporção de 2×10^7 parece prejudicar a sobrevivência das células nas macrocápsulas, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) na viabilidade quando comparada aos outros dois grupos nos 14 dias de cultivo. Os grupos com 2×10^6 e 2×10^7 células apresentaram liberação enzimática

menor que a proporção de 2×10^5 células tanto quando cultivadas durante 7 como 14 dias.

Caracterização das macrocápsulas in vivo

O animal implantado apresentou boa recuperação após a cirurgia, restabeleceu normalmente suas funções motoras e não apresentou possíveis reações adversas consequentes do procedimento. Quando do sacrifício para a remoção das cápsulas, foi observada formação de uma fina camada tecidual ao redor dos dispositivos e neovascularização.

Análise histológica

Foi feita análise histológica das cápsulas implantadas nas regiões subcutânea e intramuscular, juntamente com tecidos adjacentes ao local de implantação (pele do abdome e músculo vasto medial). Nas secções da cápsula implantada sob a pele do abdome coradas com hematoxilina e eosina, foi possível observar reação inflamatória do tipo corpo estranho, com grande número de macrófagos, neutrófilos e células gigantes, havendo um **significativo** infiltrado inflamatório (figura 3A, 3B).

A coloração com picrossirius acusou importante formação de fibrose ao redor do dispositivo, com deposição de colágeno sobre as camadas de células inflamatórias (figura 3C, 3D). Além disso, as macrocápsulas apresentaram grandes vacúolos, não esperados para esse material, que

[u5] Comentário: Não sei se deixaria assim, já que foi um animal. Talvez tira essa palavra apenas.

permitiram a passagem de células inflamatórias através do polímero para dentro do dispositivo. (figura 3B)

A mesma reação do tipo corpo estranho pôde ser observada no implante intramuscular vazio (sem as rBHK), (figuras 4A, B). A formação de fibrose ao redor deste dispositivo também ficou visível pela coloração com picrossírius (figuras 4C, D).

Discussão

A tecnologia de encapsulação celular é uma estratégia promissora para fazer a localização, a manutenção e o controle da entrega de produtos terapêuticos *in vivo*. Uma performance satisfatória desses dispositivos depende de propriedades como permeabilidade, resistência mecânica, capacidade de imunoproteção e biocompatibilidade (11). A avaliação dessas propriedades, portanto, é muito importante para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de terapias com células encapsuladas.

Pesquisas anteriores de nosso grupo verificaram que o implante de células superexpressando IDUA microencapsuladas em alginato de cálcio em modelo murino de MPS I não foi capaz de reverter completamente os sintomas da doença (12), produzindo um fenótipo intermediário. Isso foi devido à indução de resposta imunitária contra as microcápsulas, seguida de formação de fibrose, o que prejudicou a liberação da enzima para o meio extracapsular (dados não publicados). Uma das possíveis soluções para este problema é a aplicação de um novo sistema de encapsulação envolvendo um material mais biocompatível. Dessa forma, este trabalho

visou a avaliação da macroencapsulação em mPVDF quanto à sua eficiência na liberação de IDUA e biocompatibilidade.

Foi medida a capacidade de liberação enzimática das células livres, macro e microencapsuladas. As células livres apresentaram valores de atividade enzimática 9 vezes maior que as células macro e microencapsuladas, corroborando com resultados encontrados por Mayer e colaboradores (8). Fazendo uma comparação da liberação da enzima IDUA entre as macrocápsulas e microcápsulas, não foi detectada diferença significativa entre as duas estratégias de encapsulação, indicando que a enzima é capaz de atravessar os poros de ambos dispositivos com a mesma facilidade. Foi demonstrado que as microcápsulas de alginato contendo células rBHK são capazes de diminuir significativamente o acúmulo de GAG de fibroblastos de pacientes com MPS I *in vitro* (13). Tendo as macrocápsulas a mesma eficiência na liberação da enzima, admite-se que ela também tenha tal capacidade.

A avaliação do comportamento de proliferação e sobrevivência das células na macrocápsula foi feita com o objetivo de determinar as melhores condições a serem aplicadas *in vivo*. Foi realizado um ensaio comparando diferentes concentrações celulares e tempos de cultivo. Em todos os tempos, a menor concentração celular, 2×10^5 , mostrou maior viabilidade e liberação enzimática, o que indica que um maior número de células afeta a sobrevivência, prejudicando a produção e liberação da enzima para o meio extracapsular. Além disso, outro trabalho que fez uso do mesmo dispositivo também utilizou esta concentração celular (5). Levando em conta estes aspectos, foram determinadas as condições nas quais se aplicaria a

macrocápsula *in vivo* como sendo 2×10^5 células por macrocápsula durante 14 dias.

Um teste piloto foi realizado em um camundongo normal C57Bl/6, pertencente à mesma linhagem dos indivíduos *knockout* para o gene *Idua*, modelo murino de MPS I. Três cápsulas foram implantadas em três diferentes sítios (músculo, pele e peritônio). O objetivo inicial foi avaliar a resposta imunológica contra o implante, através de análise histológica, e sua influência sobre a liberação da enzima através de ensaio de atividade enzimática.

Na análise das secções dos implantes intramuscular e subcutâneo, foi observado infiltrado inflamatório, contendo grande número de macrófagos, neutrófilos e células gigantes, e formação fibrótica. O recrutamento de neutrófilos é característico de reação inflamatória aguda contra o implante, a qual é disparada pelo rompimento do tecido conectivo vascularizado durante a cirurgia de implantação (14). A presença de monócitos, macrófagos, e células gigantes indicam reação do tipo corpo estranho contra o implante, também caracterizada como inflamação crônica. Esta deve ficar confinada ao local do implante e se resolver em não mais de duas semanas quando se trata de um material biocompatível (15). Seguindo a inflamação crônica, observa-se a infiltração de fibroblastos e neovascularização, levando a formação de uma cápsula fibrosa, a qual se separa do implante por uma ou duas camadas de células inflamatórias derivadas da reação contra corpo estranho. A partir daí, dependendo das suas propriedades físico-químicas, o material implantado pode desencadear apoptose das células aderidas à sua superfície ou estas células podem manter-se aderidas durante toda a vida

útil do implante (15). Portanto, acompanhar a reação ao implante por períodos mais longos de tempo, como três e quatro semanas, e conduzir o teste em um número maior de animais é necessário para observar se há resolução da inflamação.

Na análise histológica foi observada a presença de grandes vacúolos no material ao invés dos microporos esperados. Estes vacúolos permitiram a passagem de células através da macrocápsula, sendo possível observar a presença de grande quantidade de células inflamatórias dentro da macrocápsula. O contato das células inflamatórias com as células xenogênicas (rBHK) pode ter levado a uma resposta inflamatória maior do que a esperada para um dispositivo íntegro. Além disso, as células inflamatórias devem ter reconhecido ativamente as rBHK. Por isso, não foi possível estimar a viabilidade das células recuperadas da macrocápsula já que a viabilidade calculada para o implante intraperitoneal provavelmente também levaria em conta as células inflamatórias, estando, dessa forma, equivocado. Outro fato a ser levado em consideração é que a superfície anormalmente irregular do material também influencia na resposta imunitária, sendo mais um fator agravante. Adicionado a isto, também há o fato de a permeabilidade da cápsula poder estar sendo afetada pelo defeito de fabricação. Desta forma, a avaliação da liberação da enzima para a circulação não foi realizada.

Foi feito contato com o fabricante, que admitiu o problema e enviará um novo lote. Como todos os experimentos foram realizados com o mesmo lote defeituoso, deverão ser repetidos com as cápsulas íntegras para que se possam obter conclusões efetivas sobre sua utilidade neste caso.

Referências

- (1) Hodges BL, Cheng SH. Cell and gene-based therapies for the lysosomal storage diseases. *Curr Gene Ther.* 2006;6:227–241.
- (2) Ma J, Qi W, Xie Y, Wang W, Yu W and Ma X. K562 cell growth activity and metabolism characteristics in APA microencapsulates culture and modeling study. *J Biotechnology.* 2006;152(2):242-51.
- (3) Uludag H, Vos P and Tresco P. Technology of mammalian cell encapsulation. *Advanc. Drug Delivery Reviews.* 2000;2:29-64.
- (4) Chang PL. Encapsulation for somatic gene therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 18:(875):146–158
- (5) Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia.* 2009;23:925–933.
- (6) Suggitt M, Swaine DJ, Pettit GR, Bibby MC. Characterisation of the hollow fibre assay for the determination of microtubule disruption in vivo. *Clin Cancer Res.* 2004;10:6677-85.
- (7) Figliuzzi M, Cornolti R, Plati T, Rajan N, Adobati F, Remuzzi G, Remuzzi A. Subcutaneous xenotransplantation of bovine pancreatic islets. *Biomaterials.* 2005;26:5640-7.
- (8) 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: 434–439.

- (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: 469–484.
- (10) 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: 257–265.
- (11) Li RH, Materials for immunisolated cell transplantation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998; 33:87–109.
- (12) Baldo G, Mayer FQ, Tavares A, Meyer F, Burin M, Meurer L, Giugliani R, Matte U. Efeitos do implante intraperitoneal de células encapsuladas superexpressando alfa-L-iduronidase no modelo murino de mucopolissacaridose tipo I. *Revista HCPA* 2009; 29 (Supl 1) :1-459.
- (13) Baldo G, Mayer FQ, 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. *Cells Tissues Organs.* 2011. Epub.
- (14) Ratner BD, Bryant SJ. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2004;6:41–75.
- (15) Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008, 20(2):86-100.

Legendas

Figura 1: Comparação da liberação de IDUA pelas células livres, microencapsuladas e macroencapsuladas através da medida da atividade enzimática no meio após 24 h de cultivo. ANOVA de uma via e post hoc de Tukey, * $p < 0,05$.

[u6] Comentário: Antes do p colocar o teste estatístico. Em todas as legendas.

Figura 2: Ensaio de proliferação e medida da atividade de IDUA no meio após 7 e 14 dias. ANOVA de uma via e post hoc de Tukey, * $p < 0,05$

Figura 3: Implante subcutâneo de macrocápsulas contendo rBHK, A: HE, aumento 100X, as flechas pretas indicam infiltrado inflamatório. B: HE, aumento 400X, flecha preta indica infiltrado inflamatório nos vacúolos das macrocápsulas. C: Picrossírius, aumento 40X, setas brancas indicam formação fibrótica. D: Picrossírius, aumento 200X, seta branca indica formação fibrótica.

[u7] Comentário: Essa era a objetiva de 10??? Se sim tu pode colocar de duas formas: aumento de 10X ou aumento de 100. Se deixar o sinal de X parece que no final é 1000. OU deixa o valor da objetivo e X ou só o aumnto final sem o X>

Figura 4: Implante intramuscular de macrocápsula vazia, A: HE aumento 40X, seta preta indica infiltrado inflamatório e seta pontilhada indica tecido muscular. B: HE aumento 1000X, setas pretas indicam células gigantes. C: Picrossírius aumento 400X, setas brancas indica formação de fibrose. D: Picrossírius, 100X, setas brancas indicam formação de fibrose.

Figuras

Figura 1:

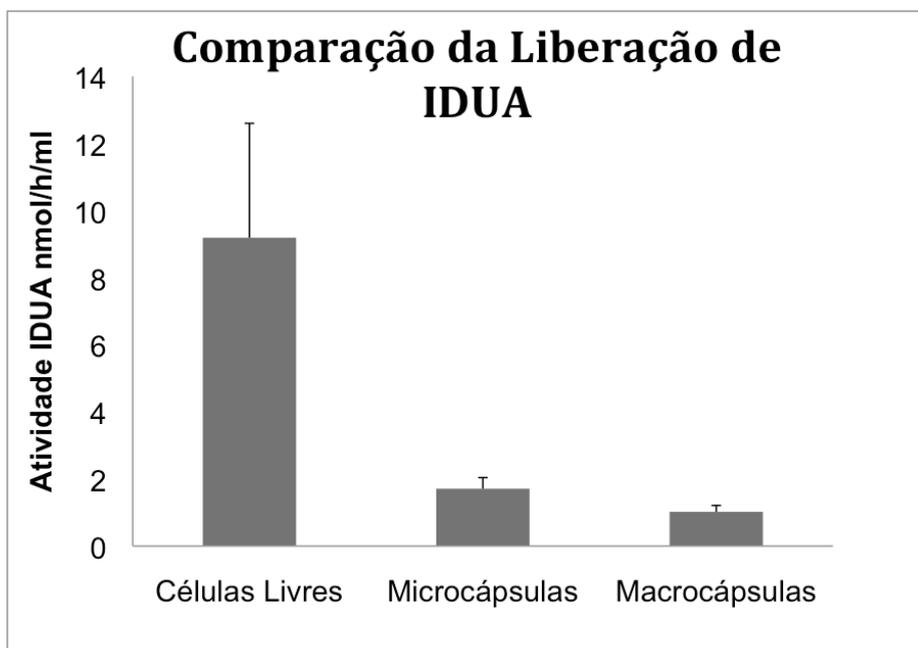


Figura 2:

[u8] Comentário: Faltou colocar no gráfico o que é o eixo y??? na legenda das atividades colocaste a unidade, mas no de viabilidade não. Coloca na legenda

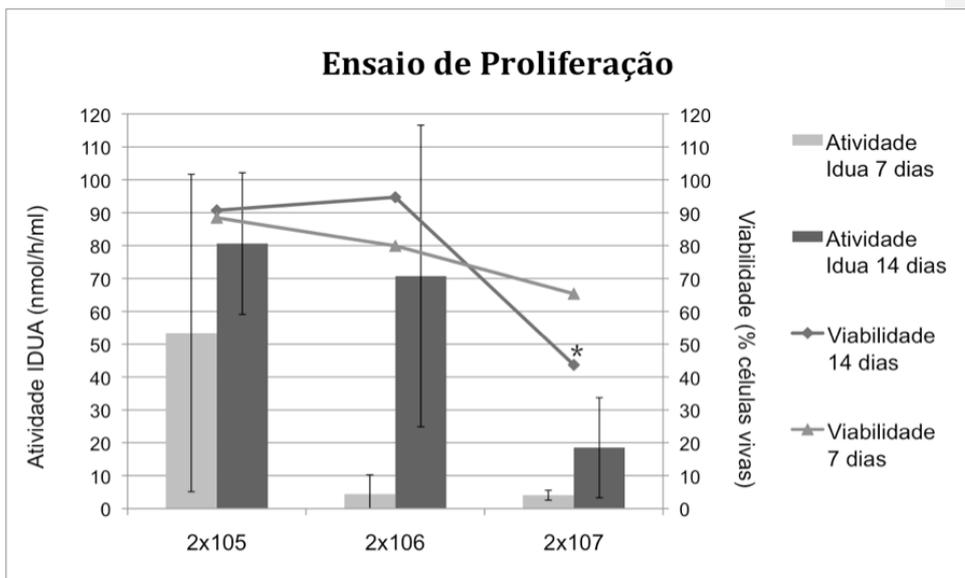


Figura 3:

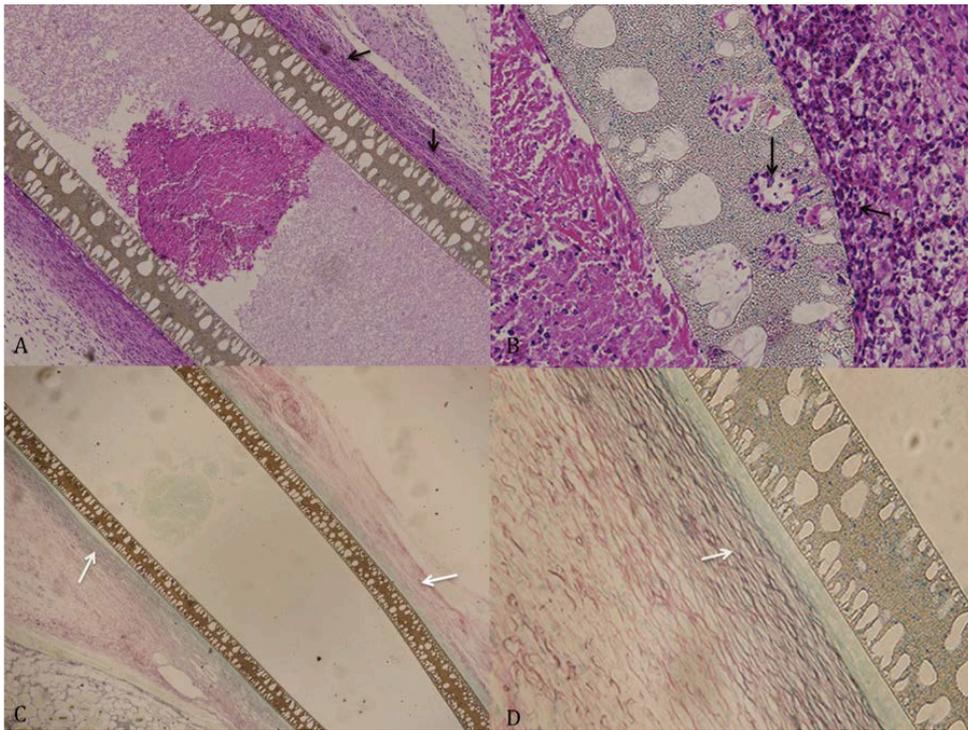
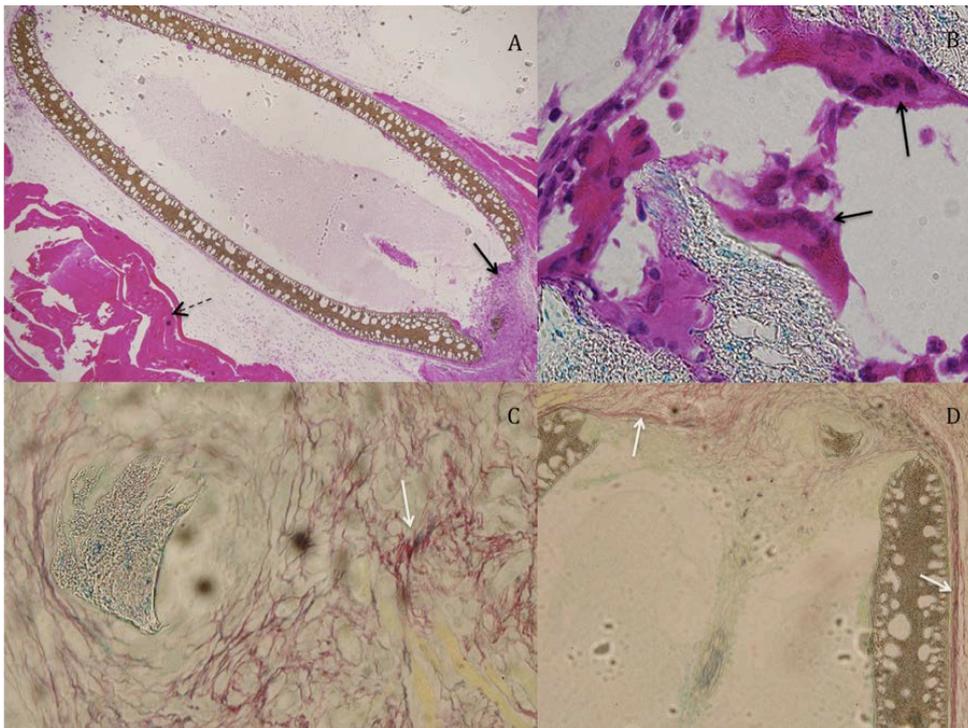


Figura 4:



5. CONCLUSÕES

Foi constatado que as macrocápsulas possuem a mesma eficiência de liberação de IDUA que as microcápsulas, uma vez que não foi encontrada diferença significativa na detecção desta enzima nos ensaios *in vitro*. Isto valida as macrocápsulas como um possível dispositivo alternativo às microcápsulas na terapia celular.

Foi possível determinar a concentração celular mais adequada para ser utilizada nos ensaios com macrocápsulas, a qual permite o acesso de todas as células aos nutrientes difundidos para dentro do dispositivo, possibilitando a proliferação celular e mantendo a viabilidade e uma boa produção e liberação enzimática *in vitro*.

No teste *in vivo*, foi constatado que a macrocápsula induz uma resposta do tipo corpo estranho, com um significativo infiltrado inflamatório e formação de fibrose após duas semanas de implantação. Porém, também foi observado que o dispositivo do lote utilizado possuía um defeito de fabricação e apresentava irregularidades na superfície. Isto pode ter afetado sua biocompatibilidade, além de ter permitido o acesso do sistema imune às células encapsuladas, diminuindo a viabilidade e, por conseguinte, a produção da enzima pelas células recombinantes. Esta observação também pode afetar os resultados obtidos nos testes *in vitro*.

6. PERSPECTIVAS

Repetir os testes *in vitro* de comparação de liberação de IDUA e o ensaio de proliferação com as macrocápsulas íntegras, uma vez que o defeito de fabricação pode ter afetado sua permeabilidade.

Repetir o teste *in vivo* em um número maior de camundongos para caracterizar a resposta imunitária contra as macrocápsulas íntegras, testando tempos maiores de implantação.

Testar o dispositivo em modelo murino de MPS I, avaliando a habilidade de entrega da enzima em longo prazo e à locais de difícil acesso, observando uma possível reversão de fenótipo da doença.

7. REFERÊNCIAS

- (1) Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, Childs B, Kinzler K, Vogelstein B, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw Hill; 2001. . pp. 3421–3452
- (2) Vitner EB, Platt FM, Futerman AH. Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *J. Biol. Chem.* 2010;285, 20423–20427.
- (3) Martins AM, Dualibi AP, Norato D, Takata ET, Santos ES, Valadares ER, Porta G, de Luca G, Moreira G, Pimentel H, Coelho J, Brum JM, Semionato Filho J, Kerstenetzky MS, Guimarães MR, Rojas MV, Aranda PC, Pires RF, Faria RG, Mota RM, Matte U, Guedes ZC. et al. Guidelines for the management of mucopolysaccharidosis type I. *J Pediatr.* 2009;155:S32–S46.
- (4) Clarke LA, Heppner J. EditorsIn: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. SourceGeneReviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2002 Oct 31 [updated 2011 Jul 21].
- (5) Cleary MA, Wraith JE. The presenting features of mucopolysaccharidosis type IH (Hurler syndrome). *Acta Paediatr.* 1995;84:337–339
- (6) Staba SL, Escolar ML, Poe M, Kim Y, Martin PL, Szabolcs P, Allison-Thacker J, Wood S, Wenger DA, Rubinstein P, Hopwood JJ, Krivit W, Kurtzberg J. et al. Cord-blood transplants from unrelated donors in patients with Hurler's syndrome. *New England Journal of Medicine.* 2004;350(19):1960–1969.
- (7) Boelens JJ, Prasad VK, Tolar J, Wynn RF, Peters C. Current international perspectives on hematopoietic stem cell transplantation for inherited metabolic disorders. *Pediatr Clin North Am.* 2010;57:123-45

- (8) Tsukimura T, Tajima Y, Kawashima I, Fukushima T, Kanzaki T, Kanekura T, et al. Uptake of a recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase) by cultured fibroblasts and osteoblasts. *Biol Pharm Bull.* 2008;31:1691–1695.
- (9) 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.
- (10) Wolf DA, Lenander AW, Nan Z, Belur LR, Whitley CB, Gupta P, et al. Direct gene transfer to the CNS prevents emergence of neurologic disease in a murine model of mucopolysaccharidosis type I. *Neurobiol Dis.* 2011 Jul;43(1):123-33.
- (11) Ellinwood NM, Ausseil J, Desmaris N, Bigou S, Liu S, Jens JK, et al. Safe, efficient, and reproducible gene therapy of the brain in the dog models of Sanfilippo and Hurler syndromes. *Mol Ther.* 2011;19:251–259
- (12) Cotrim AP, Baum BJ. Gene therapy: some history, applications, problems, and prospects. *Toxicol Pathol.* 2008;36(1):97-103.
- (13) Lee B and Davidson BL. Gene Therapy Grows into Young Adulthood: Special Review Issue. *Human Molecular Genetics*, 2011;20.
- (14) Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2010;58:107–19.
- (15) Fu, H, Dirosario, J, Killedar, S, Zaraspe, K and McCarty, DM. Correction of Neurological Disease of Mucopolysaccharidosis IIIB in Adult Mice by rAAV9 Trans-Blood-Brain Barrier Gene Delivery. *Mol Ther.* 2011;19: 1025–1033.

- (16) Deichmann A, Hacein-Bey-Abina S, Schmidt M, et al. Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. *J Clin Invest*. 2007;117:225-232
- (17) Barcia C, Jimenez-Dalmaroni M, Kroeger KM, Puntel M, Rapaport AJ, Larocque D, King GD, et al. One-year expression from high-capacity adenoviral vectors in the brains of animals with pre-existing anti-adenoviral immunity: Clinical implications. *Mol Ther*. 2007;15:2154–2163.
- (18) Al-Dosari MS & Gao, X. Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. *Aaps Journal*. 2009;4:671-681
- (19) Desmaris N, Verot L, Puech JP, Caillaud C, Vanier MT, Heard JM: Prevention of neuropathology in the mouse model of Hurler syndrome. *Ann Neurol*. 2004;56:68–76.
- (20) Traas AM, Wang P, Ma X, Tittiger M, Schaller L, O'donnell P, et al: Correction of clinical manifestations of canine mucopolysaccharidosis I with neonatal retroviral vector gene therapy. *Mol Ther*. 2007;15:1423–1431.
- (21) Chung S, Ma X, Liu Y, Lee D, Tittiger M, Ponder KP: Effect of neonatal administration of a retroviral vector expressing α -L- iduronidase upon lysosomal storage in brain and other organs in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Genet Metab*. 2007;90:181–192
- (22) 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.
- (23) Ciron C, Desmaris N, Colle MA, Raoul S, Joussemet B, Vérot L, et al: Gene therapy of the brain in the dog model of Hurler's syndrome. *Ann Neurol*. 2006;60:204–213.

- (24) Nakama H, Ohsugi K, Otsuki T, Date I, Kosuga M, Okuyama T, 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.
- (25) Horn PA, Keyser KA, Peterson LJ, Neff T, Thomasson BM, et al. Efficient lentiviral gene transfer to canine repopulating cells using an overnight transduction protocol. *Blood* 2004;103:3710–3716
- (26) Morris, J.C., Conerly, M., Thomasson, B., Storek, J., Riddell, S.R., and Kiem, H.P. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses to enhanced green and yellow fluorescent proteins after myeloablative conditioning. *Blood.* 2004;103: 492-9.
- (27) Kosuga M, Sasaki K, Tanabe A, Li XK, Okawa H, Ogino I, Okuda O, et al. Engraftment of genetically engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol. Ther.* 2001;3(2):139–148
- (28) Hodges BL, Cheng SH. Cell and gene-based therapies for the lysosomal storage diseases. *Curr Gene Ther.* 2006;6:227–241.
- (29) Uludag H, Vos P and Tresco P. Technology of mammalian cell encapsulation. *Advanc. Drug Delivery Reviews.* 2000;2:29-64.
- (30) Chang TM. Semipermeable microcapsules. *Science.* 1964, 146:524-5.
- (31) Ying DY, Phoon MC, Sanguansri L, Weerakkody R, Burgar I, Augustin MA. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. *J Food Sci.* 2010;75:E588–95.

- (32) Ye Z, Mahato RI. Combining stem cells and genes for effective therapeutics. *Mol Pharm.* 2011 Oct 3;8(5):1443-5.
- (33) Orive G, Gascón AR, Hernández RM, Igartua M, Luis Pedraz J. Cell microencapsulation technology for biomedical purposes: novel insights and challenges. *Trends Pharmacol Sci.* 2003b, 24(5):207-10.
- (34) Goguen B, Kedersha N. Clonogenic cytotoxicity testing by microdrop encapsulation, *Nature* 1993 ;363:189–190.
- (35) Hernandez RM, Orive G, Murua A and Pedraz JL. Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010;62: 7-8: 711-730.
- (36) Fang Y, Al-Assaf S, Phillips GO, Nishinari K, Funami T, Williams PA, Li L. Multiple steps and critical behaviors of the binding of calcium to alginate. *J. Phys. Chem.* 2007B ;11: 2456–2462.
- (37) Elliott RB, Escobar L, Tan PL, Muzina M, Zwine S, Buchanan C. Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 2007;14 157–161.
- (38) Endres M, Wenda N, Woehlecke H, Neumann K, Ringe J, Erggelet C, et al. Microencapsulation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal progenitor cells from subchondral bone marrow in Ca-alginate for cell injection, *Acta Biomater.* 2010;6 436–444
- (39) Tan H, Huang D, Lao L, Gao G. RGD modified PLGA/gelatin microspheres as microcarriers for chondrocyte delivery, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2009;91:228–238.

- (40) Borlogan CV, Skinner SJM, Geaney M, Vasconcellos AV, Elliot RB, Emerich DF. Neuroprotection by encapsulated choroid plexus in a rodent model of Huntington's disease, *NeuroReport*. 2004;15:2521–2525.
- (41) Stover NP, Watts RL, Spheramine for treatment of Parkinson's disease, *Neurotherapeutics*. 2008;5:252–259.
- (42) Tobias CA, Han SSW, Shumsky JS, Kim D, Tumolo M, Dhoot NO, et al, Alginate encapsulated BDNF producing fibroblast grafts permit recovery of function after spinal cord injury in the absence of immune suppression, *J. Neurotrauma*. 2005;22:138–156.
- (43) Teng H, Zhang Y, Wang W, Ma X, Fei J, Inhibition of tumor growth in mice by endostatin derived from abdominal transplanted encapsulated cells, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2007;39:278–284.
- (44) Cirone P, Shen F, Chang PL, A multiprong approach to cancer gene therapy by coencapsulated cells, *Cancer Gene Ther.* 2005;12:369–380.
- (45) Zang H, Zhu SJ, Wang W, Wey YJ, Hu SS, Transplantation of microencapsulated genetically modified xenogenic cells augments angiogenesis and improves heart function, *Gene Ther.* 2008;15:40–48.
- (46) Jeon Y, Kwak K, Kim S, Kim Y, Lim J, Baek W. Intrathecal implants of microencapsulated xenogenic chromaffin cells provide a long-term source of analgesic substances, *Transplant. Proc.* 2006;38:3061–3065
- (47) Liu ZC, Chang TMS. Transdifferentiation of bioencapsulated bone marrow cells into hepatocyte-like cells in the 90% hepatectomized rat model, *Liver Transpl.* 2006;12:566–572
- (48) Ponce S, Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Canals JM, Muñoz MT, Pedraz JL. In vivo evaluation of EPO-secreting cells immobilized in different alginate–PLL microcapsules, *J. Control. Release*. 2006;116:28–34.

(49) 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: 469–484.

(50) Naganawa Y, Ohsugi K, Kase R, Date I, Sakuraba H, Sakuragawa N In vitro study of encapsulation therapy for Fabry disease using genetically engineered CHO cell line. *Cell Transplant.* 2002;11(4):325–329

(51) Ross CJ, Bastedo L, Maier SA, Sands MS, Chang PL. Treatment of a lysosomal storage disease, mucopolysaccharidosis VII, with microencapsulated recombinant cells. *Hum Gene Ther.* 2000a;11(15):2117-27.

(52) Ross CJ, Ralph M, Chang PL. Somatic gene therapy for a neurodegenerative disease using microencapsulated recombinant cells. *Exp Neurol.* 2000b;166(2):276–286

(53) Friso A, Tomanin R, Alba S et al. Reduction of GAG storage in MPS II mouse model following implantation of encapsulated recombinant myoblasts. *J Gene Med.* 2005;7(11):1482–1491

(54) Baldo G, Mayer FQ, 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. *Cells Tissues Organs.* 2011. Epub.

(55) Barsoum C, Milgram W, Mackay W, et al. Delivery of recombinant gene product to canine brain with the use of microencapsulation. *J Lab Clin Med.* 2003;142:399–412.

(56) Baldo G, Mayer FQ, Tavares A, Meyer F, Burin M, Meurer L, Giugliani R, Matte U. Efeitos do implante intraperitoneal de células encapsuladas

superexpressando alfa-l-iduronidase no modelo murino de mucopolissacaridose tipo I. Revista HCPA 2009; 29 (Supl 1) :1-459.

(57) De Carvalho, TG. Caracterização in vitro e in vivo de células imobilizadas em microcápsulas de alginato. Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Monografia de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

(58) Chang PL. Encapsulation for somatic gene therapy. Ann N Y Acad Sci. 1999; 18:(875):146–158

(59) Bloch, J., Bachoud-Levi, A. C., Deglon, N., Lefaucheur, J. P., Winkel, L., Palfi, S., Nguyen, J. P., Bourdet, C., Gaura, V., Remy, P. et al. 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;15:968–975

(60) Knazek RA, Kohler PO, Gullino PM, Hormone production by cells grown in vitro on artificial capillaries. Exp. Cell Res. 1974;84:251–254.

(61) Neuhaus W, Lauer R, Oelzant S, Fringeli UP, Ecker GF, Noe CR. A novel flow based hollow-fiber blood-brain barrier in vitro model with immortalised cell line PBMEC/C1-2. J Biotechnol. 2006;125:127–141.

(62) Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. Leukemia. 2009;23:925–933.

(63) Figliuzzi M, Cornolti R, Plati T, Rajan N, Adobati F, Remuzzi G, Remuzzi A. Subcutaneous xenotransplantation of bovine pancreatic islets. Biomaterials. 2005;26:5640-7.

(64) Kordower JH, Winn SR, Liu Y-T, Mufson EJ, Sladek JR Jr., Baetge EE, Hammang JP, Emerich DF. The aged monkey basal forebrain: rescue and

sprouting of axotomized basal forebrain neurons after grafts of encapsulated cells secreting human nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994a;91:10898–10902.

(65) Rinsch C, Regulier E, Deglon N, Dalle B, Beuzard Y, Aebischer P. A gene therapy approach to regulated delivery of erythropoietin as a function of oxygen tension. *Hum Gene Ther*. 1997;8:1881-1889.