

INTRODUÇÃO

A tecnologia de encapsulação celular é uma estratégia promissora para controlar, localizar e manter a entrega de produtos terapêuticos in vivo. O alginato é um dos polímeros mais utilizados e melhor descrito na literatura. No entanto, aspectos como a sobrevivência das células dentro das cápsulas e a taxa de proliferação celular, ainda devem ser mais bem trabalhados para que este tipo de abordagem possa se tornar viável em uso clínico.

Nosso grupo vem desenvolvendo estudos com células microencapsuladas para o tratamento de doenças lisossômicas, como a Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) causada pela deficiência da enzima alfa-L-iduronidase (IDUA).

OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi avaliar a membrana das microcápsulas após 4 semanas de cultivo in vitro, por meio de microscopia eletrônica de varredura.

MATERIAIS E MÉTODOS

Células baby hamster kidney (BHK) superexpressando IDUA, numa concentração de $8,25 \times 10^6$ cels/mL, foram microencapsuladas e gelificadas em dois tipos de solução distintas: uma contendo apenas 20 mM BaCl₂, enquanto a outra solução continha 1 mM BaCl₂ + 50 mM de CaCl₂. Após isto, foram mantidas em condições padrão de cultivo celular. Um volume de 200 µL de cápsulas foi coletado semanalmente. As microcápsulas foram fixadas em glutaraldeído, desidratadas em acetona, dessecadas em Critical Point Dryer (Balzer CPD030) e então colocadas em stubs para metalização com partículas de ouro. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (JOEL 6060) com velocidade de aceleração de partículas de 10 kVa.

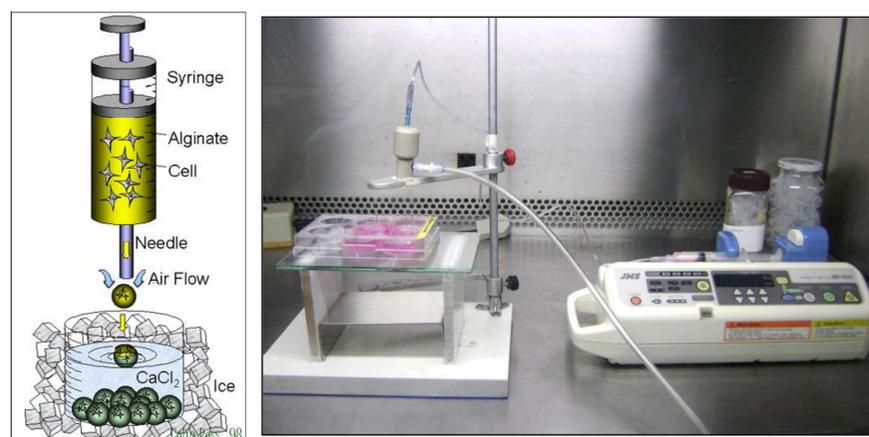


Figura 1. Microencapsulação celular. A) Representação esquemática mostrando a geleificação do alginato. B) Sistema de encapsulação com bomba de infusão aplicando fluxo de 40mL/h (seta vermelha), fluxo de ar de 4L/min (seta branca) e unidade de encapsulação (*).

RESULTADOS

Após uma semana em cultivo, as microcápsulas apresentaram algumas protuberâncias em suas membranas (Figura 2). As microcápsulas gelificadas apenas em cloreto de bário demonstraram mais fissuras na membrana comparadas àquelas gelificadas em cloretos de bário e cálcio. As células encapsuladas mantidas em cultura proliferaram bastante com o passar do tempo, e pressionaram a parede interna das cápsulas, formando protuberâncias (Figura 3). Após 3 e 4 semanas em cultivo, diversas rupturas na estrutura foram observadas (Figura 4A). Durante todos os tempos foram observadas linhas verticais ocasionadas pelo fluxo de ar durante a produção das mesmas, ranhuras e poros de tamanhos variados (Figura 4B).

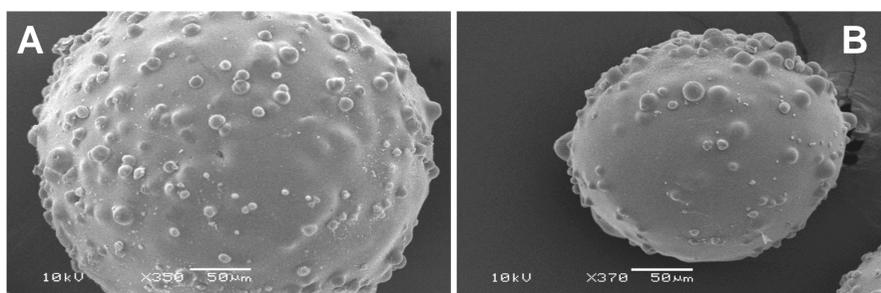


Figura 2: A) Microscopia eletrônica de varredura de cápsula de alginato gelificada em solução de BaCl₂, após 1 semana em cultivo. B) Microscopia eletrônica de varredura de cápsula de alginato gelificada em solução de BaCl₂ e CaCl₂, após 1 semana em cultivo.

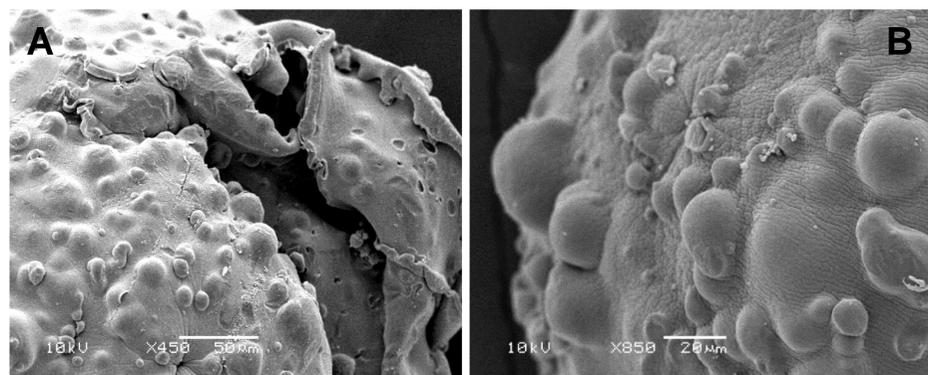


Figura 3: Cápsula gelificada em solução de BaCl₂, após 4 semanas em cultivo. São visíveis protuberâncias formadas pela pressão das células contra a membrana da capsula. B) Protuberâncias visíveis em cápsula após 3 semanas de cultivo, gelificada em BaCl₂ e CaCl₂. Alguns poros também são visíveis.

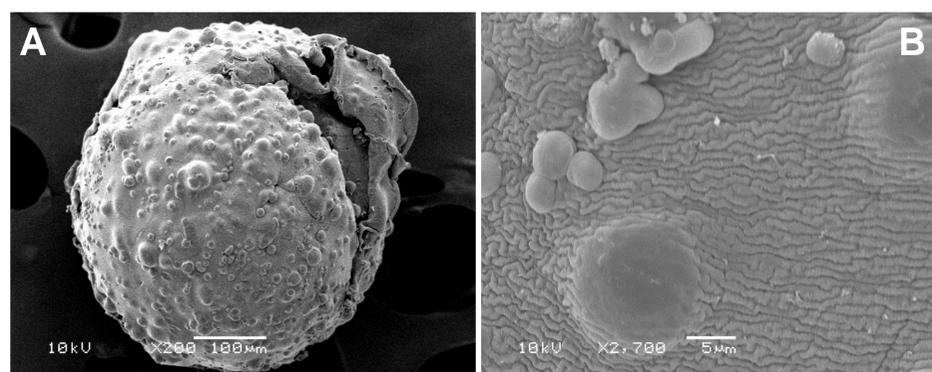


Figura 4: Cápsula previamente gelificada em solução de BaCl₂. Após 4 semanas em cultivo, é possível observar protuberâncias e rupturas na mesma. B) Na mesma cápsula, são observadas ranhuras ocasionadas pelo fluxo de ar no processo de fabricação.

CONCLUSÃO

Em conclusão, não foi observado diferença entre as microcápsulas gelificadas em apenas em cálcio ou em cloretos de bário e cálcio após 4 semanas em cultivo. A ruptura das membranas deve ser solucionada, uma vez que pode gerar maior resposta imune quando implantadas in vivo. Uma alternativa seria a irradiação das células para impedir sua proliferação, a diminuição da concentração celular ou ainda a troca do tipo celular.