

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 30/08/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE MUARES INCLUSAS EM
MICROCÁPSULAS DE HIDROGEL DE ALGINATO

JAQUELINE BRANDÃO DE SOUZA

Botucatu/SP
Agosto de 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE MUARES INCLUSAS EM
MICROCÁPSULAS DE HIDROGEL DE ALGINATO

JAQUELINE BRANDÃO DE SOUZA

Tese apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia Animal
para a obtenção do
Título de Doutor

Orientadora Profa. Ass. Dra. Ana Liz Garcia Alves
Co-orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Botucatu/SP
Agosto de 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Souza, Jaqueline Brandão de.

Células tronco mesenquimais de muares inclusas em microcápsulas de hidrogel de alginato / Jaqueline Brandão de Souza. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Coorientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves

Capes: 50501003

1. Células-tronco. 2. Biotecnologia animal. 3. Muar.
4. Medicina regenerativa.

Palavras-chave: Alginato; Cápsulas; Célula tronco mesenquimal; Muar.

Nome do autor: Jaqueline Brandão de Souza

Título: Células tronco mesenquimais de mueres inclusas em microcápsulas de hidrogel de alginato.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Ana Liz Garcia Alves
Presidente e Orientadora
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP Botucatu

Profa. Renée Laufer Amorim
Membro da banca
Departamento de Clínica Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP Botucatu

Profa. Marjorie de Assis Golim
Membro da banca
Departamento Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento -
Biotecnologia Médica
FMB UNESP Botucatu

Profa. Anna Paula Balesdent Barreira de Sá Pacheco
Membro da banca
Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária - DMCV
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Dra. Isadora Arruda
Membro da banca
Médica Veterinária Autônoma

Data da defesa: 30 de agosto de 2019, às 8:30 na sala de Videoconferência –
prédio da Diretoria da FMVZ Unesp Botucatu.

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais Aurea Donizeti Brandão de Souza
e José Braz de Souza
que conseguiram me proporcionar
condições para fazer parte
de uma excelente universidade e a minha
amada irmã Letícia Brandão de Souza,
pelo apoio e acolhimento de vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus e meus guias.

Meus amados pais, minha família e meu namorado pela força ao longo desses anos, companheirismo e incentivo.

Agradeço à Profa. Ass. Dra. Ana Liz Garcia Alves por me aceitar como orientada, pelo tempo que passou comigo e por compartilhar seus conhecimentos, principalmente em terapias regenerativas e engenharia tecidual. Ao meu co-orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves sempre disposto a ajudar, contribuir e ensinar tudo o que sabe com muito carinho e amor.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Doutorado.

Aos amigos presentes e que se importam.

Aos colegas de pós-graduação por termos um ótimo convívio e sempre nos ajudarmos e nessa etapa final em especial à Mariana Correa, uma querida amiga de pós-graduação, equipe e para a vida.

Aos demais professores envolvidos e funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica, por toda a ajuda, em especial a Shelly, uma pessoa incrível; ao Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da FMB em especial a Doutoranda Ana Livia por toda ajuda, atenção e carinho; a Dra. Elenice pelos anticorpos e a Profa. Marjorie pela realização da citometria de fluxo e pelos momentos de descontração com sua equipe de pesquisa durante as análises. A sua Doutoranda Aline, com carinho.

À banca pela contribuição e atenção com o trabalho, além da disponibilidade para acrescentar melhorias.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Nenhuma atividade no bem é insignificante, as mais altas árvores são oriundas de pequenas sementes.”

Chico Xavier

“Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos.”

Antoine de Saint-Exupéry

“Não se recrimine por sentir demais. É o bom sinal de que a sensibilidade continua viva.”

Pe Fábio de Melo

“Somos todos geniais. Mas se você julgar um peixe por sua capacidade de subir em árvores, ele passará sua vida inteira acreditando ser estúpido.”

Albert Einstein

“O poder mágico da borboleta dá leveza para superar momentos de mudanças e transformação. Ela dá outra visão do mundo, mostrando-lhe que nada é realmente tão sério quanto parece. Nem mesmo a morte que quando chega para a lagarta, apenas a torna mais bela e mais livre. Sua imagem ajuda nas viagens astrais no aumento da consciência, dá clareza mental e inspiração.”

Borboleta – O Renascimento

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do alginato de sódio (Yang et al., 2011).....	6
Figura 2	A) Bomba de infusão utilizada para o encapsulamento das células tronco mesenquimais de muares. B) Gotejamento das células + alginato em solução de cloreto de cálcio 102mM. C) e D) Formação das microcápsulas observadas em microscópio óptico Zeiss Axiovert40CFL, Axiovision.....	22
Figura 3	Viabilidade das células encapsuladas avaliadas por <i>Trypan blue</i> durante os momentos 0, 24, 48, 72 horas e 7 dias. Observa-se uma manutenção da viabilidade média de 93,57%±3,531, considerada adequada para o cultivo de células.....	27
Figura 4	Migração das células das cápsulas para a placa de cultura de 24 poços, avaliado pelas células aderidas ao fundo da placa em seus respectivos dias. Entre os momentos 0 e 7 dias, bem como 24h e 7 dias houve diferença estatística, sendo $p=0,0434$ ($p<0,05$) (*).....	28
Figura 5	A) Avaliação imunofenotípica das células tronco mesenquimais de tecido adiposo de muares encapsuladas, 24 horas pós-encapsulamento das células em microcápsulas de hidrogel de alginato. B) Avaliação 7 dias pós-encapsulamento das células no mesmo biomaterial.....	29
Figura 6	Fotomicroscopia de luz das lâminas em análise de imuno-histoquímica das cápsulas de células tronco. A) Controle negativo da amostra; B) Marcação positiva das CTMs pelo CD44 e C) Ausência de marcação das células pelo anticorpo MHC II.....	30
Figura 7	Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando as microcápsulas, poros e células tronco. A mensuração foi realizada utilizando o software ImageJ avaliando-se a área dos poros e das células. As setas indicam A) poros de microcápsulas e B) AdCTMs de muares encapsuladas. Magnitude 500x.....	31
Figura 8	Imagens da MEV evidenciando a rugosidade da cápsula e a presença de células em uma vista interna da cápsula aberta. Magnitude respectivamente de 600x, 1200x, 1200x, 5000x.....	31
Figura 9	Microcápsulas de células tronco mesenquimais de muares marcadas com nanocristal Qtracker. As células tronco no interior das microcápsulas podem ser observadas com o núcleo em azul pela marcação do DAPI e o citoplasma em vermelho pelo Qtracker. Quando o núcleo celular absorve o nanocristal também, nota-se a junção das cores e, portanto a coloração do núcleo em lilás. Seta branca indicando a borda da microcápsula de alginato que envolve todas as AdCTMs de muares.....	32
Figura 10	Os núcleos celulares em azul das AdCTMs de muares encapsuladas. B) O citoplasma em vermelho e C) a junção das duas imagens, mostrando a célula completa. Seta branca indicando a borda da microcápsula de alginato que envolve todas as AdCTMs de muares.....	33
Figura 11	Microcápsula de células tronco mesenquimais de muares vista por Lupa Olympus Japan. Lupa 2.5x, barra da imagem em 1000 μm	33

Figura 12	A) O poder de absorção das cápsulas se mantém constante até 4h e apresenta uma crescente a partir de 5h, quando apenas o biomaterial faz parte da análise. B) Na presença das células em seu interior, a oscilação da massa avaliada é observada, porém não houve diferença significativa.....	35
Figura 13	Comparação entre a absorção de cápsulas e de cápsulas com células inclusas.	35
Figura 14	Após submeter as cápsulas a 50°C por 3h a redução no teor de umidade foi notável. No entanto, após a desidratação do biomaterial e overnight mantendo-as imersas em meio de cultivo, as cápsulas demonstraram um evidente potencial de recuperação e absorção.....	36
Figura 15	Metabolismo celular avaliado pelo teste com MTT, mostrando uma diminuição em 24 e 72 horas e uma recuperação da atividade metabólica em 7 dias. O período de 24h faz parte da adaptação das células ao biomaterial e processo de encapsulamento já que altera o ambiente celular previamente estabelecido no cultivo. Não houve diferença estatística entre os grupos.....	36

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	5
Introdução e justificativa.....	6
Revisão de literatura.....	7
Objetivos.....	15
Referências.....	16
CAPÍTULO 2.....	19
Artigo Científico.....	20
Resumo.....	21
Introdução.....	22
Material e métodos.....	23
Comissão de ética.....	23
Cultivo e caracterização das células pós-descongelamento e pré-encapsulamento.....	24
Encapsulamento das CTMs e dissolução para análise.....	24
Caracterização do microencapsulamento das AdCTMs de muares.....	26
Comportamento celular.....	28
Imunofenotipagem pós-encapsulamento das células tronco.....	27
Morfologia das células inclusas em microcápsulas de hidrogel.....	27
Morfometria e avaliação das cápsulas.....	28
Análise de comportamento.....	29
Atividade metabólica celular.....	30
Análise estatística.....	31
Resultados.....	31
Discussão.....	45
Conclusão.....	52
Referências.....	53

BRANDAO, J.S. **Células tronco mesenquimais de mueres inclusas em microcápsulas de hidrogel de alginato**. Botucatu, 2019. Páginas 63p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Resumo

As terapias regenerativas com a utilização de células tronco mesenquimais (CTMs) têm sido amplamente empregadas com a finalidade de modificar a progressão de enfermidades locomotoras em animais de grande porte. Estudos sobre o comportamento das células tronco, portanto, mostram-se de extrema importância para que, cada vez mais, elucidar sua ação, efeito e eficácia nos tratamentos propostos. A inserção das CTMs derivadas do tecido adiposo de mueres em microcápsulas de hidrogel gera expectativas promissoras para a proteção da célula contra anticorpos do receptor, bem como processos inflamatórios exacerbados, distribuição de agentes terapêuticos e supressão de processos inflamatórios. O presente trabalho teve por objetivo verificar o comportamento das CTMs após o encapsulamento em hidrogel, quanto a sua viabilidade, migração, além da avaliação morfológica e imuno-histoquímica. Avaliação da morfologia da cápsula, dos poros, a rugosidade por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e observação das células encapsuladas pela microscopia confocal de varredura a laser. A porcentagem de células viáveis manteve-se ao longo dos momentos em uma média de 93%, então o biomaterial permitiu a difusão de nutrientes e oxigênio adequadamente. A diminuição da quantidade de células no interior das cápsulas é justificada pela possível migração das mesmas através dos microporos das microcápsulas permitindo a aderência à placa de cultivo. Na avaliação morfológica foi possível identificar as células no interior da cápsula, em algumas células, notou-se vacuolização citoplasmática, posteriormente confirmada 50% da diferenciação celular em condrócitos pela marcação com colágeno II. As células apresentaram marcação positiva de CD44, parcial marcação do colágeno II, ausência no MHC II, confirmando seu fenótipo. As cápsulas foram avaliadas com a MEV quanto a sua morfologia, a área dos poros circulares e irregulares e o tamanho das células. Foi possível confirmar a presença das células tronco na microcápsula. A inclusão

das células em microcápsulas de alginato não comprometeu a viabilidade celular, assim como sua migração. Concluimos que a técnica pode ser eficaz frente aos possíveis usos terapêuticos e que mais estudos são necessários para a eficácia terapêutica do encapsulamento de célula tronco mesenquimais.

Palavras-chave: alginato, cápsulas, célula tronco mesenquimal, luar.

BRANDAO, J.S. **Mesenchymal stem cells of mules inclusions in alginate hydrogel microcapsules.** Botucatu, 2019. Pages 63p. Thesis (Doctorate) School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu.

Abstract

Regenerative therapies using mesenchymal stem cells (MSCs) have been widely widespread to treat locomotor diseases in large animals. Studies on the behavior of stem cells are extremely important to increase our knowledge regarding their action, effect and effectiveness in the proposed treatments. The insertion of murine adipose-derived MSCs into hydrogel microcapsules yields promising expectations for cell protection against immune response, as well as exacerbated inflammatory processes, delivery of therapeutic agents, and suppression of inflammatory processes. The present research aimed to verify the behavior of MSCs after hydrogel encapsulation, including cell viability, migration, morphological and immunohistochemical pattern. Evaluation of capsule morphology, pore size, roughness by scanning electron microscopy (SEM) and observation of encapsulated cells by confocal laser scanning microscopy. The percentage of viable cells remained throughout the moments at an average of 93%, so the biomaterial allowed the diffusion of nutrients and oxygen properly. A decreased amount of cells number inside the capsules is justified by the possible migration of them through the microcapsule micropores allowing adherence to the culture plate. The cells showed positive CD44 staining, absence in MHC II. The capsules were evaluated with SEM for their morphology, the area of circular and irregular pores and the size of the cells. It was possible to confirm the presence of stem cells in the microcapsule. The inclusion of cells in alginate microcapsules did not compromise cell viability as well as their migration. We conclude that the technique may be effective in view of possible therapeutic uses and that further studies are needed for the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cell encapsulation.

Keywords: alginate, capsules, mesenchymal stem cell, mule.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

1. Introdução e justificativa

As células tronco mesenquimais (CTMs) dispõem da capacidade de auto-renovação e podem formar ossos, gordura e cartilagem. Além da capacidade de se diferenciarem em diferentes tecidos, as células tronco também têm potencial de controlar a inflamação local, proteger o tecido de hipóxia e mediar a resposta imunológica através da sua função parácrina (Ma et al., 2002; Gugjoo et al., 2019).

Embora os estudos *in vitro* estejam longe de mimetizarem todas as influências e sinalizações de um organismo vivo, o controle dos fatores externos apresenta a vantagem de melhorar o entendimento da interação da célula com cada fator e a partir dessa informação desenvolver estudos *in vivo* com mais segurança, e até mesmo regular o efeito terapêutico que se deseja (Moshtagh et al., 2018).

No entanto, os estudos *in vitro* mais utilizados são realizados em modelo bidimensional, o que gera resultados muito diferentes dos observados em estudos nos organismos vivos. Para minimizar essa diferença, recentemente as avaliações *in vitro* são realizadas em modelos tridimensionais, aproximando a interação entre as células do cultivo e também delas com um ambiente extracelular (Hong et al., 2015). Dentre os arcabouços tridimensionais o alginato vem sendo amplamente utilizado pela facilidade de se tornar gel e aparentemente apresentar boa biocompatibilidade (Moshtagh et al., 2018).

O alginato forma uma solução viscosa quando dissolvido em solução salina e géis em contato com cátions divalentes. A viabilidade e a manutenção do fenótipo de condrócitos em *beads* de alginato vem sendo documentada. No entanto, ainda vigora discussão sobre os efeitos do microencapsulamento em alginato na condrogênese das CTMs (Ma et al., 2002).

O estudo de células tronco em animais híbridos é escasso, e embora sejam semelhantes à espécie equina, os muares apresentam suas particularidades como resistência física e aprimoramento genético. São produzidos pelo cruzamento da fêmea equina (*Equus caballus*) e do macho

asinino (*Equus asinus*) (Embrapa, 2016). No Brasil, os muares são altamente empregados para o trabalho no campo, por se tratarem de animais mais rústicos, com capacidade de atingir áreas de difícil acesso (González et al., 2015). O interesse e a busca pelo tratamento desses animais vêm crescendo e o conhecimento a respeito mostra-se necessário, visto que até o presente momento não há trabalhos relacionados a esta espécie e a terapia regenerativa.

O objetivo desse estudo foi avaliar o comportamento das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AdCTMs) de muares e a caracterização do encapsulamento das células pré-aplicação, visando seu uso na terapêutica articular, bem como sua proteção ao ambiente alogênico ou inflamatório quando utilizado em terapia alogênica intra-articular.

2. Revisão de literatura

As células tronco mesenquimais possuem diversas propriedades terapêuticas e devido a sua ação imunomoduladora e a secreção de fatores parácrinos e citocinas pró e anti-inflamatórias, são amplamente empregadas em diversas terapias (Cassano et al., 2018). As células derivadas de medula óssea (Mccarthy et al., 2012), tecido adiposo (Yamada et al., 2013), membrana sinovial (Lee et al., 2013), entre outros são amplamente estudadas, em diferentes espécies como cães, gatos, equinos, humanos (Shah et al., 2018; Martin et al., 2002; Desancé et al., 2018; McIntyre et al., 2018). Os muares, no entanto, são animais de trabalho interessantes pela inteligência, resistência física e aprimoramento genético e são utilizados em regiões do Brasil. A procura por terapias celulares vem crescendo para esta espécie, mas até o presente momento não há trabalhos relacionados a terapia regenerativa.

O luar é um equídeo híbrido gerado a partir do cruzamento de machos *Equus asinus* e fêmeas *Equus caballus* que apresenta portanto, características fenotípicas e fisiológicas intermediárias entre as espécies que lhe conferem a origem (Miranda e Palhares, 2017).

O uso das CTMs em terapias autólogas e alogênicas é amplo e as pesquisas cada vez mais buscam uma forma segura e eficaz de uso desta

terapia. As células auxiliam em diversas enfermidades, cardíacas, sequelas neurológicas e principalmente locomotoras (Segers e Lee, 2008; Kim e Vellis, 2009; Yamada et al., 2013). A aplicabilidade da terapia com o uso de células requer prudência e o acompanhamento do animal, e a avaliação do mesmo, como indivíduo.

A aplicação de terapia intra-articular vem mostrando resultados satisfatórios, porém quando utilizadas em processos inflamatórios muito evidentes, a ação dessas células fica comprometida e o processo por si só ataca as células e causa a sua morte (Dados em publicação de Rosa et al., 2019; Naji et al., 2019). Complementar a isso, a cinética das CTMs após marcação com nanocristal foi avaliada por Santos et al. (2019) que observaram a dispersão periarticular após administração intra-articular das células.

A cartilagem articular danificada é conhecida pela capacidade limitada de reparação que a maioria dos demais tecidos do indivíduo devido à ausência de um sistema eficaz e a capacidade limitada de condrócitos maduros para proliferar e regenerar a nova cartilagem (Hunter, 1995; Newman, 1998; Roberts et al., 2009).

Além da liberação de fármacos, as cápsulas também têm sido usadas para outras aplicações biomédicas, como imobilização enzimática, encapsulamento de células e engenharia de tecido ósseo, como *scaffolds* (Bajpai e Kirar, 2016).

A eficácia do método de encapsulamento visa a não dispersão que ocorre em casos de células livres no local da aplicação intra-articular, sangue ou membrana sinovial, bem como a proteção das células contra a apoptose via resposta imunológica por processo inflamatório exacerbado, que acaba matando as células (Dados em publicação Rosa et al., 2019). A cápsula evitaria essa interrupção terapêutica da ação das células, assim como pode proteger a célula para que sua função parácrina seja mais duradoura.

O método de isolar as células, encapsulação, pode protegê-las do sistema imunológico do hospedeiro quando transplantadas (Hernández et al., 2010; Teramura e Iwata, 2009). Essa tecnologia considera importante a fonte celular adequada e o biomaterial como barreira seletiva e permeável. O biomaterial deve permitir a difusão de nutrientes, oxigênio, produtos secretados;

bem como pode impedir que compostos de alto peso molecular penetrem, como anticorpos, fatores de complemento produzidos pelo sistema imunológico do hospedeiro (Hernández et al., 2010; Orive et al., 2003; Nafea et al., 2011).

Com o aumento da aplicação clínica de terapias baseadas em células é importante que se considere o desenvolvimento de sistemas que facilitem o armazenamento e a distribuição dos produtos de terapia celular, tanto na produção quanto na clínica. Para que tais sistemas sejam realizados, é essencial que as estratégias de bioprocessos sejam escaláveis, reprodutíveis e não influenciem a viabilidade ou função biológica viva (Swioklo et al., 2017).

Qualquer material biológico que precise ser isolado, protegido ou ser liberado de forma controlada pode ser encapsulado, sendo assim, as aplicações da microencapsulação são diversas. A encapsulação de células animais intactas em membranas semipermeáveis e com manutenção de seus metabolismos tem sido investigada (Zimmermann, 2001). O encapsulamento ou qualquer arcabouço que mantenha as células em uma estrutura tridimensional favorece a interação entre elas, melhorando a sinalização celular e liberação de fatores parácrinos desejáveis para a imunomodulação e diferenciação celular (Hong et al., 2015; Singh et al., 2018).

A microencapsulação permite a manutenção da viabilidade e da atividade das células, sistema de liberação controlada, uma vez que estes materiais são englobados e isolados com filmes de polímeros protetores, ainda com características de dissolução, porosidade e permeabilidade apropriadas ao objetivo desejado (Zimmermann, 2001). A porosidade e a permeabilidade do arcabouço permitem a troca de fatores de crescimento com o meio externo, porém mantém as células protegidas de mediadores imunológicos, fazendo com que permaneçam mais tempo no organismo e ao mesmo tempo o hospedeiro deve apresentar menor reação inflamatória (Herrero et al., 2007).

Além das vantagens apresentadas para a terapia celular, o arcabouço também pode ser útil para a liberação controlada de fármacos, permitindo maior desempenho destes, ou até mesmo liberação a longo prazo. Um exemplo é o estudo *in vitro* com neurônios que avaliou a eficácia do encapsulamento da galantamina como futuros tratamentos para a doença de Alzheimer (Mufamadi et al., 2019).

Dentre os materiais utilizados como arcabouço celular, tanto em cultivos tridimensionais como em terapias, encontram-se o alginato, quitosana, colágeno, fibrina e glicosaminoglicanos como exemplo de polímeros naturais. Os polímeros sintéticos mais utilizados para esses fins são polietilenoglicol, ácido poliglicólico, ácido polilático, entre outros (Hong et al., 2015).

O alginato é um polissacarídeo que é extraído de algas marinhas pardas e algumas bactérias, sendo um polímero aniônico solúvel em água que consiste de ácido β -D-manurônico (M) e α -L-ácido gulurônico (G) unidos por ligações (1 \rightarrow 4)-glicosídicas, de composição e sequência variada (Bajpai e Kirar, 2016; Mori et al., 2014; Araujo et al., 2013; Leite, 2014; Martins et al., 2007), sua estrutura química está ilustrada na Figura 1. Na indústria alimentícia é utilizado há anos, mas apresenta também características que tornam possível utilizá-lo como matriz na liberação de fármacos (Leite, 2014; Reis et al., 2006). Sendo assim, o seu uso é uma alternativa bastante promissora para a aplicação terapêutica com células tronco que liberam de forma parácrina suas citocinas de ação imunomoduladora.

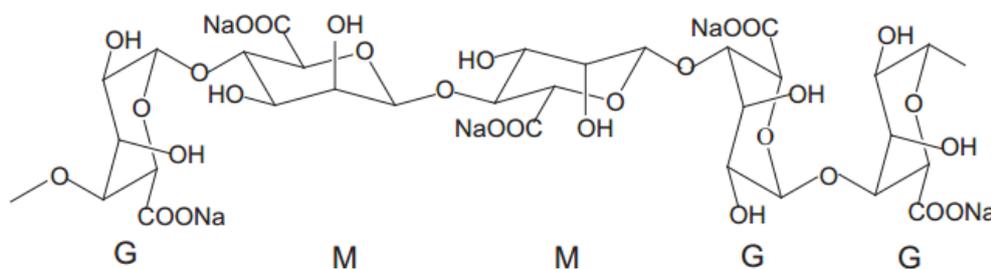


Figura 1. Estrutura química do alginato de sódio (Yang et al., 2011).

O alginato, polissacarídeo natural, extraído da matriz extracelular de algas marrons (Phaeophyceae), onde age como material estrutural, é amplamente utilizado para microencapsulação visto a rapidez e a simplicidade na formação de gel com íons metálicos. A microencapsulação em gotas de alginato apresenta como vantagem a manutenção da atividade celular, além de adquirir uma estrutura semelhante a contas de cadeias interligadas (Hari et al., 1996; Bajpai and Kirar, 2016) que permitiria a migração das células.

Os alginatos são polímeros biocompatíveis não tóxicos e como a preparação de esferas reticuladas é realizada sob condições normais (meio aquoso, temperatura ambiente e pH fisiológico), o controle sobre o tamanho das esferas e a relação do custo-benefício do processo de encapsulamento são características adicionais favoráveis (Bajpai and Kirar, 2016).

O sistema CTMs-alginato é um modelo prático para determinar a relação entre proliferação e diferenciação (Ma et al., 2002). Vantagens importantes do sistema de matrizes de gel para aprisionamento de células: sistema simples e prontamente manipulado para células; uma substância de entrega e andaime tridimensional para engenharia de tecidos em cartilagem; pronta dissolução de *beads* de alginato por agente quelante tal como o citrato de sódio.

Diversos estudos considerando diferentes biomateriais são encontrados, no entanto, o alginato é um dos mais estudados (Gao et al., 2019). Nosso grupo de pesquisa iniciou o estudo a respeito do hidrogel de alginato com a publicação de Santos et al. (2018 e 2019) cujos objetivos foram o cultivo das células de membrana sinovial (msCTMs) encapsuladas em hidrogel de alginato, em diferentes concentrações, comparando a viabilidade, proliferação e diferenciação condrogênica para posterior uso em implantes com propósito na regeneração da cartilagem articular em equinos; bem como, validar a eficácia da marcação das msCTMs alogênicas não encapsuladas em alginato usando o nanocristal (Qtracker® 655 Cell Labeling Kit, Invitrogen, USA). A partir disso, houve um interesse maior em avaliar a possibilidade de proteger as células enquanto elas atuam na doença articular, evitando sua morte prematura em casos de processos inflamatórios mais intensos (Dados em publicação de Rosa et al. 2019). Trabalhando com este material entendemos a necessidade de estudarmos a estrutura da cápsula *in vitro*.

Uma membrana de alginato reduz e controla a permeabilidade da cápsula e quando usada para transplante de células, a membrana da cápsula funciona como uma barreira imunoprotetora. Manter a viabilidade das células dentro desses sistemas é essencial para garantir a eficácia do processo, desde a ação mais prolongada das citocinas secretadas pelas células quanto garantir que essas células não morram em um ambiente considerado não-próprio (Zimmermann, 2001).

Descobriu-se, mais recentemente e ainda em estudo, por pesquisadores do Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais da Universidade Federal de São Carlos, que assim como o tamanho, a morfologia de partículas tem importância essencial, uma vez que a forma dos materiais interfere na maioria das propriedades físico-químicas (Alisson et al., 2019-FAPESP). Sendo assim, é importante que a caracterização da microcápsula seja realizada e para isso alguns testes devem ser efetuados. Tamanho das cápsulas, análise micromorfológica, microscopia eletrônica de varredura, teor de umidade, bem como a viabilidade (Lopes et al., 2017), ser inerte, porosa e absorvível em tempo hábil. Ainda para a sua caracterização, o comportamento de absorção das cápsulas de hidrogel de alginato pode ser estudado gravimetricamente (Pierre et al., 2013; Bajpai e Kirar, 2016), sendo importante para a difusão de nutrientes entre o meio de cultivo e as células no interior das microcápsulas, essencial para a manutenção das CTMs.

A análise que permite avaliar o metabolismo celular, viabilidade e crescimento também é importante quando se prioriza a manutenção das células encapsuladas. O uso do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazole)-2,5-difeniltetrazolio, mais conhecido como MTT é um teste que baseia-se na capacidade da enzima desidrogenase mitocondrial de células viáveis para clivar os anéis de tetrazólio do MTT amarelo pálido e formar cristais de formazam azul escuro que são impermeáveis às membranas celulares, resultando em acúmulo nas células saudáveis (Khattak et al., 2006; Herrero et al., 2007). Este ensaio colorimétrico de citotoxicidade teve sua técnica primeiramente descrita por Mosmann em 1983 e então adaptada para células encapsuladas por Uludag e Sefton em 1993.

Ma et al. (2002) verificaram que as CTMs em alginato podem formar cartilagem e o sistema alginato-CTMs representa um modelo relevante de estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na condrogênese e na ossificação endocondral. As CTMs cultivadas em cápsulas de alginato por mais de uma semana representam uma alternativa interessante como fonte de condrócitos para engenharia de tecidos em cartilagem, quando esta não está disponível em quantidade suficiente, como em grandes defeitos osteocondrais ou osteoartrite difusa.

O desenvolvimento de metodologias viáveis financeiramente e de fácil reprodutibilidade é necessário para incrementar as técnicas já existentes e desenvolver outras mais eficazes.

A viscosidade de uma solução de alginato depende do peso molecular e concentração da amostra do polímero (Smidsrød e Haug, 1968) aumenta à medida que o pH diminui e atinge um máximo pH 3-3,5 como grupos carboxilato no esqueleto de alginato tornam-se protonadas e formam ligações de hidrogênio (Lee e Mooney, 2012).

Aumentar o peso molecular do alginato pode melhorar as propriedades físicas dos géis resultantes, mas uma solução de alginato formada a partir de um polímero de alto peso molecular torna-se muito viscoso o que é indesejável no processamento (LeRoux et al., 1999). Proteínas ou células combinadas com solução de alginato com dano de alto risco de viscosidade geram altas forças de cisalhamento durante a combinação e aplicação dentro do indivíduo (Kong et al., 2003). A manipulação do peso molecular e sua distribuição pode controlar independentemente a viscosidade da solução pré-gel e rigidez pós-gelificação. O módulo elástico de gel pode ser aumentado, enquanto a viscosidade da solução aumenta infimamente, usando uma junção de polímeros de alginato de alto e baixo peso molecular (Kong et al., 2002).

As propriedades físicas controlam a estabilidade dos géis, a liberação de drogas pelos géis e o fenótipo e função das células encapsuladas em gel de alginato (Lee and Mooney, 2012). Além disso, vários métodos químicos e físicos têm sido relatados para formar géis de alginato, mas a capacidade das células para contribuir na formação desse gel tem sido ignorada (Lee et al., 2003). As células adicionadas a soluções de alginato não modificadas agregam e formam uma estrutura não uniforme, devido à dominância das interações célula-célula nesse sistema. Esse comportamento de gelificação é de cisalhamento reversível e pode ser repetido várias vezes. Uma vez que a estrutura do gel é quebrada pelas forças de cisalhamento, as estruturas reticuladas são recuperadas em poucos minutos. Ainda, foi relatado que as células podem fornecer integridade mecânica adicional aos géis, via interações de ligação entre as células e os ligandos de adesão acoplados às cadeias de alginato (Drury et al., 2005).

Os géis de alginato têm sido amplamente explorados como veículo para entrega de proteínas ou células que podem direcionar a regeneração ou a engenharia de tecidos e órgãos (Silva e Mooney 2010; Lee e Mooney, 2012).

Além da liberação das células por migração ou de seus efeitos parácrinos, ambos por difusão da cápsula, são ainda liberados conforme o gel se degrada no organismo (Lee e Mooney, 2012).

O alginato demonstrou grande utilidade e potencial como um biomaterial para muitas aplicações biomédicas, em cicatrização de feridas, entrega de medicamentos, cultura celular *in vitro* e engenharia de tecidos. As boas características do alginato para estas aplicações incluem biocompatibilidade, condições de gelificação suaves e seu histórico de usos clínicos na terapêutica articular (Lee e Mooney 2012; Gao et al., 2019).

As células tronco mesenquimais são utilizadas no tratamento de osteoartrites com resultados satisfatórios. No entanto, um dos desafios a ser explorado antes de implementar clinicamente é um sistema de entrega adequado capaz de reter uma quantidade ótima de células na articulação. Sendo assim, é contundente identificar um sistema de entrega que forneça tanto uma proteção mecânica quanto imunológica para as células transplantadas, ao mesmo tempo em que aumenta o rendimento das células diferenciadas, mantendo o microambiente celular e sustentando as funções celulares diferenciadas. O encapsulamento de CTMs tem se mostrado uma abordagem promissora para o fornecimento de agentes terapêuticos (Gao et al., 2019).

O objetivo deste trabalho é a caracterização da microcápsula *in vitro* como uma opção de ferramenta para o transplante intra-articular de CTMs. Neste estudo, o encapsulamento de CTMs em alginato visa fornecer um veículo de entrega adequado para o transplante em terapias articulares.

3. Objetivos

O objetivo desse estudo foi avaliar o biomaterial, bem como o comportamento das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AdCTMs) de mueres e a caracterização após o encapsulamento das células pré-aplicação, visando seu uso na terapêutica articular para sua proteção ao ambiente não-próprio ou inflamatório quando utilizado em terapia alogênica intra-articular.

4. Objetivos específicos

- a) Definir o comportamento das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de mueres em microcápsulas de hidrogel de alginato através da viabilidade, migração, células/cápsula e imunomarcadores, mantendo as células em cultivo 3D;
- b) Estudar as características morfológicas da microcápsula de hidrogel de alginato (rugosidade e morfologia dos poros) com estudos de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura;
- c) Avaliar o sistema cápsula-células *in vitro* por nanomarcção, imunomarcção, microscopia confocal de varredura a laser, teor de umidade da cápsula, poder de absorção e avaliação do metabolismo celular.

Referências

- Araujo V, Gamboa A, Caro N, et al. 2013. Release of prednisolone and inulin from a new calcium-alginate chitosan-coated matrix system for colonic delivery. *J. Pharm. Sci.*;102:2748–2759.
- Bajpai, S.K., Kirar, N., 2016. Swelling and drug release behavior of calcium alginate / poly (sodium acrylate) hydrogel beads 5551. <https://doi.org/10.1080/15685551.2015.1092016>
- Cassano, J.M. et al., 2018. Inflammatory licensed equine MSCs are chondroprotective and exhibit enhanced immunomodulation in an inflammatory environment. *Stem Cell Research & Therapy.*, v.9, p.82. DOI 10.1186/s13287-018-08402.
- Desancé, M., Contentin, R., Bertoni, L., Gomez-Leduc, T., Branly, T., Jacquet, S., Betsch, J-M., Batho, A., Legendre, F., Audigié, F., Galéra, P., Demoor, M., 2018. Chondrogenic Differentiation of Defined Equine Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord Blood for Use in Cartilage Repair Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 19(2), 537; <https://doi.org/10.3390/ijms19020537>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I. Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S. et al., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8:4.
- Gao, X., Gao, L., Groth, T., Tian, F., He, D., Wang, M., Gong, F., Chu, J., Zhao, M., 2019. Fabrication and properties of an injectable sodium alginate/PRP composite hydrogel as a potential cell carrier for cartilage repair. *J Biomed Mater Res.*;1–12. DOI: 10.1002/jbm.a.36720.
- Herrero, E.P., Valle, M.D., E.M., Galán, M.A., 2007. Immobilization of Mesenchymal Stem Cells and Monocytes in Biocompatible Microcapsules to Cell Therapy *Biotechnol. Prog.*, 23, 940-945.
- Lee, J. C., Min, H. J., Park, H. J., Lee, S., Seong, S. C., Lee, M. C., 2013. Synovial membrane-derived mesenchymal stem cells supported by platelet-rich plasma can repair osteochondral defects in a rabbit model. *The Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, 29:6.
- Lee, K.Y. e Mooney, D.J., 2012. *Progress in Polymer Science Alginate:*

- Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 37, 106–126.
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- Lopes, S., Bueno, L., Aguiar Júnior, F., Finkler, C., 2017. Preparation and characterization of alginate and gelatin microcapsules containing *Lactobacillus rhamnosus*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 89(3): 1601-1613.
- Ma, H., Hung, S., Lin, S., Chen, Y., Lo, W., 2002. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. Wiley Periodicals, Inc.
- Martin, D.R., Cox, N.R., Hathcock, T.L., Niemeyer, G.P., Baker, H.J., 2002. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Experimental Hematology*. Vol. 30, Issue 8, Pages 879-886.
- McIntyre, J.A., Jones, I.A., Han, B., Vangsness Jr., C.T., 2018. Intra-articular Mesenchymal Stem Cell Therapy for the Human Joint. *The American Journal of Sports Medicine*, 46(14):3550–3563 DOI: 10.1177/0363546517735844.
- Mori, M., Rossi, S., Bonferoni, M.C., et al., 2014. Calcium alginate particles for the combined delivery of platelet lysate and vancomycin hydrochloride in chronic skin ulcers. *Int. J. Pharm.* 461:505–513.
- Pierre A, Hanna S, Gad H, et al., 2013. Optimization of gabapentin release and targeting absorption, through Incorporation into alginate beads. *Br. J. Pharm. Res.* 3:597–616.
- Santos, V.H., Pfeifer, J.P.H., Souza, J.B., Milani, B.H.G., Oliveira, R.A., Assis, M.G., Deffune, E., Moroz, A., Alves, A.L.G., 2018. Culture of mesenchymal stem cells derived from equine synovial membrane in alginate hydrogel microcapsules. *BMC Veterinary Research* 14:114
<https://doi.org/10.1186/s12917-018-1425-0>
- Santos, V.H., Pfeifer, J.P.H, Souza, J.B., Stievani, F.C., Hussni, C.A., Golim, M.A., Deffune, E., Alves, A.L.G., 2019. Evaluation of alginate hydrogel encapsulated mesenchymal stem cell migration in horses. *Research in Veterinary Science* 124. 38–45.

- Segers, V.F.M. e Lee, R.T., 2008. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*. Vol 451|21. doi:10.1038/nature06800.
- Shah, K., Drury, T., Roic, I., Hansen, P., Malin, M., Boyd, R., Sumer, H., Ferguson, R., 2018. Outcome of Allogeneic Adult Stem Cell Therapy in Dogs Suffering from Osteoarthritis and Other Joint Defects. *Stem Cells International*. Article ID 7309201, 7 pages
<https://doi.org/10.1155/2018/7309201>.
- Smidsrød, O. e Haug, A., 1968. A Light scattering study of alginate. *Acta Chem. Scand.* **22**,797-810.
- Teramura, Y., Iwata, H., 2009. Islet encapsulation with living cells for improvement of biocompatibility. *Biomaterials* 30: 2270–2275.
- Yamada, A.L.M., Carvalho, A.M., Moroz, A., Deffune, E., Watanabe, M.J., Hussni, C.A., Rodrigues, C.A., Alves, A.L.G., 2013. Mesenchymal stem cell enhances chondral defects healing in horses. *Stem Cell Discovery*, 3:4.
- Yang, J.; Xie, Y.; He, W., 2011. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate Polymers*. 84:33–39.
- Zimmermann, L.A.S., 2001. Desenvolvimento e avaliação de micropartículas contendo microrganismos viáveis utilizados como bioinseticida de micropartículas Itendo microrganismos viáveis utilizados como bioinseticida. *Farmacêuticas, F.D.E.C.*