

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 muare 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 mueres. 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 mueres 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 mueres 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 mueres marcadas com nanocrystal 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 nanocrystal 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 mueres.....	32
Figura 10	Os núcleos celulares em azul das AdCTMs de mueres 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 mueres.....	33
Figura 11	Microcápsula de células tronco mesenquimais de mueres 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 muares 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 muares 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. Concluímos 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 muare 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.

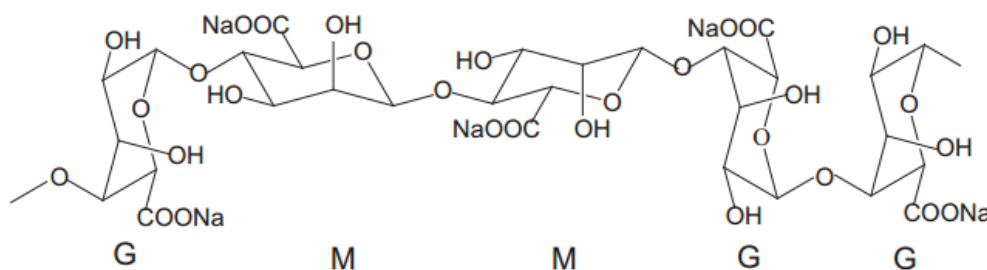


Figura 1. Estrutura química do alginato de sódio (Yang et al., 2011).

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 nanomarcacão, imunomarcacão, 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.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2

Artigo científico a ser submetido ao periódico Semina: Ciências Agrárias.

Título: **Study of the system alginate and mule mesenchymal stem cells for stem cell therapy**
Estudo do sistema alginato e células tronco mesenquimais de muare para a terapia celular

(sob as normas vigentes disponível em:
<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/about/submissions#authorGuidelines>)

AUTORES

*autor para correspondência: ana.liz@unesp.br

Observação: Resolvemos expor as imagens simultaneamente aos resultados do artigo para fins didáticos, embora as normas da revista exijam o envio das figuras separadamente.

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, elucidemos sua ação, efeito e eficácia nos tratamentos propostos. A inserção das CTMs derivadas do tecido adiposo de muare 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 imuno-histoquímica. A avaliação da morfologia da cápsula incluiu análise de superfície, verificação dos poros, da 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 ocorreu pela possível migração das mesmas através dos microporos das microcápsulas permitindo a aderência à placa de cultivo. As células apresentaram marcação positiva de CD44 e ausência do MHC II. 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. Concluímos 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.

1. Introdução

Embora os estudos *in vitro* estejam longe de mimetizarem as influências e sinalizações de um organismo vivo, contribuem no entendimento da interação da célula com os fatores externos e a partir dessa informação favorecem os estudos *in vivo* com mais segurança, bem como possibilitam regular o efeito terapêutico que se deseja (Moshtagh et al., 2018).

Atualmente, os estudos *in vitro* mais utilizados são elaborados em modelo bidimensional, distanciando os resultados daqueles observados em estudos em organismos vivos. Para aproximar tais estudos, avaliações *in vitro* podem ser realizadas em modelos tridimensionais (cultura 3D), aproximando a interação entre as células do cultivo e também delas com o ambiente extracelular (Hong et al., 2015). Dentre os arcabouços tridimensionais o alginato vem sendo amplamente utilizado pela facilidade de gelificação e por apresentar boa biocompatibilidade, ser biodegradável em condições fisiológicas normais, ter custo relativamente baixo, além de propriedades de bioadesão e baixa toxicidade (Moshtagh et al., 2018; Lee e Mooney, 2012).

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 divalentes, como o Ca^{2+} . A microencapsulação em gotas de alginato apresenta como vantagens a fácil realização e manutenção da atividade das células (Hari et al., 1996).

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). Assim como também protege as células do sistema imunológico do hospedeiro quando transplantadas (Hernández et al., 2010; Teramura et al., 2009), visto que impede que compostos de alto peso molecular penetrem, como anticorpos, fatores do sistema complemento produzidos pelo hospedeiro, ao mesmo tempo que permite a difusão de nutrientes, oxigênio, produtos secretados (Hernández

et al., 2010; Orive et al., 2003; Nafea et al., 2011), importantes para a sobrevivência das células implantadas.

Diversos estudos considerando diferentes biomateriais são encontrados, no entanto, o alginato é um dos mais estudados. 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 reparação da cartilagem articular em equinos; bem como, validar a eficácia da marcação das msCTMs alogênicas não encapsuladas em alginato usando o nanocrystal (Qtracker® 655 Cell Labeling Kit, Invitrogen, USA). A partir disso, houve um interesse maior em avaliar a possibilidade de proteger as células transplantadas 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*.

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, *in vitro*, visando seu uso na terapêutica articular para sua proteção ao ambiente não-próprio ou inflamatório quando utilizado em terapia alogênica intra-articular.

2. Materiais e métodos

2.1. Comissão de ética

Este experimento foi conduzido conforme as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, protocolo 0234/2018.

2.2. Cultivo e caracterização das células pós-descongelamento e pré-encapsulamento

O cultivo celular foi realizado segundo técnica descrita para equinos (Yamada et al., 2013; Carvalho et al., 2013) em garrafas de cultivo utilizando o meio de cultura Knockout DMEM®, 10% de SFB, L-glutamina, antibiótico-antimicótico (penicilina, estreptomicina e anfotericina B), aminoácido essencial e não-essencial. As garrafas de cultivo foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada três dias, e quando houve a confluência de no mínimo 80% da garrafa, foi realizada a tripsinização baseada na técnica previamente descrita em equinos (Vidal et al., 2007).

A caracterização das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo foi realizada pela reação antígeno-anticorpo, por citometria de fluxo e marcadores de superfície segundo Carvalho et al. (2009) e Yamada et al. (2013). O anticorpo monoclonal específico mouse anti-horse CD44 (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK) e mouse anti-horse MHC class II (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK), foram marcados com o anticorpo monoclonal secundário goat anti-mouse IgG-FITC (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

Parte das células foram submetidas às diferenciações, com o uso de “kits” comerciais, em tecido cartilaginoso (STEMPRO, Osteogenesis Differentiation Kit, GIBCO, Invitrogen Cell Culture, EUA), ósseo (STEMPRO, Osteogenesis Differentiation Kit, GIBCO, Invitrogen Cell Culture, EUA) e adiposo (STEMPRO, Adipogenesis Differentiation Kit, GIBCO, Invitrogen Cell Culture, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os cultivos resultantes foram corados com *Toluidine Blue* e *Alcian Blue* para cartilagem; *Alizarin Red* para o tecido ósseo; e *Oil Red* para o tecido adiposo visando a confirmação das diferenciações.

2.3. Encapsulamento das AdCTMs e dissolução para análise

As células derivadas do tecido adiposo de muare foram descongeladas do banco de células tronco do Laboratório de Terapia Regenerativa da Cirurgia

de Grandes Animais e cultivadas até sua expansão, com 90% de confluência. Após a tripsinização e centrifugação das CTMs aderidas às garrafas de cultivo, o pellet resultante foi ressuspendido em alginato de baixa viscosidade (Sigma) a 1,2% (Ma et al., 2002), com pH corrigido para 7,4 e previamente esterilizado. Utilizando-se uma bomba de infusão contínua com taxa de 40 mL/h, as microcápsulas foram produzidas com agulha 30Gx1/2" (0,30x13mm) a uma altura controlada de 10 cm para formar as microcápsulas em placas de Petri.

A solução de alginato com CTMs foi gotejada em solução de cloreto de cálcio 102mM, onde permaneceram por 20 minutos para a polimerização do alginato e a formação das cápsulas que, a cada 10 cápsulas, eram acondicionadas e mantidas em seus respectivos poços, em uma placa de 24 poços.

Em seguida, as cápsulas foram mantidas em meio Knockout DMEM em estufa de cultivo para a depuração do excesso de cálcio nas cápsulas e a adaptação celular à nova estrutura tridimensional.

Em cada momento, as respectivas microcápsulas eram separadas para a sua dissolução com citrato de sódio e contagem da viabilidade celular pela técnica de *Trypan Blue* em câmara de Neubauer. As células aderidas nos respectivos poços da placa de 24 poços eram contadas e, então avaliadas quanto a liberação das células pelas cápsulas. O microscópio Zeiss Axiovert40CFL, Axiovision, foi utilizado para avaliação das células em cultivo e para as análises iniciais de migração, viabilidade, o encapsulamento no momento do processamento.

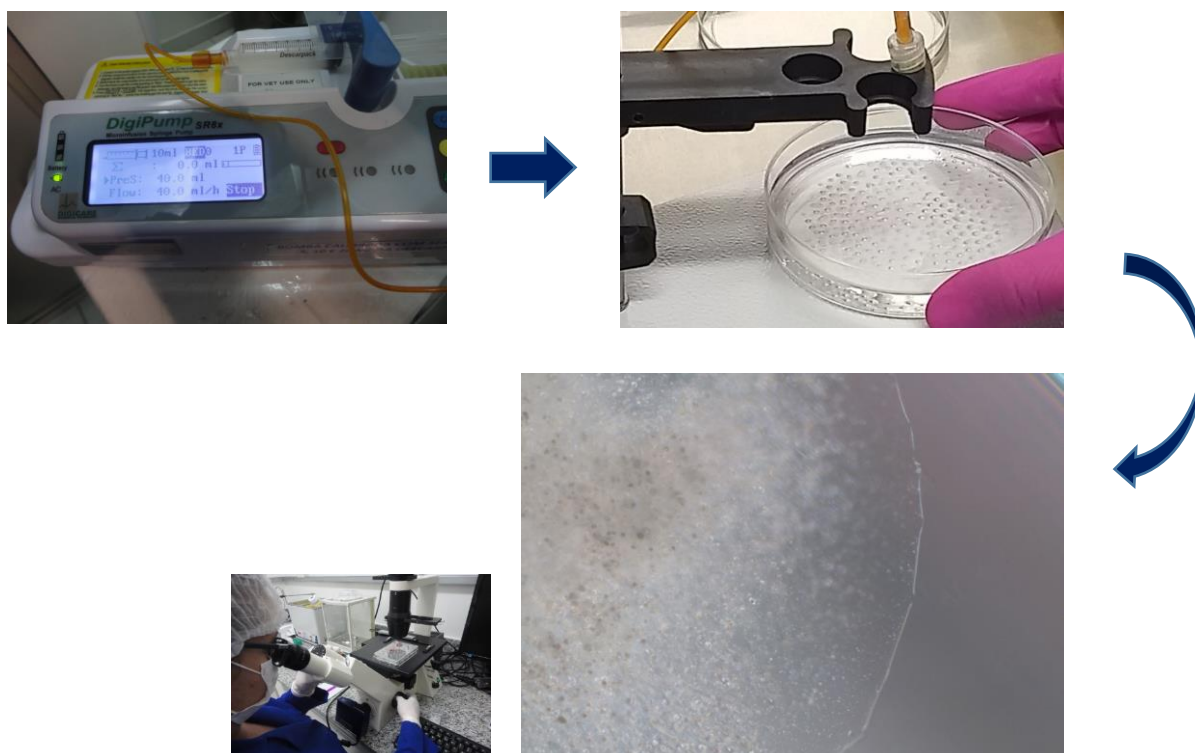


Figura. 2. A) Bomba de infusão utilizada para o encapsulamento das células tronco mesenquimais de muare. B) Gotejamento das células + alginato em solução de cloreto de cálcio 102mM. C) e D) Formação das microcápsulas observadas em microscópio óptico Zeiss Axiovert40CFL, Axiovision.

2.4. Caracterização do microencapsulamento das AdCTMs de muare

2.4.1. Comportamento celular

A porcentagem de células viáveis foi avaliada por momentos 0, 24, 48, 72 horas e 7 dias, bem como sua migração e concentração de células encapsuladas por poço em placa de 24 poços. A triplicata foi avaliada em cada momento e a placa inicialmente montada com todos os momentos.

A avaliação do comportamento célula-cápsula foi realizada pela microscopia óptica e sua viabilidade pela técnica de *Trypan blue*, as cápsulas eram dissolvidas e então, as células do seu interior contadas (Santos et al., 2018).

A migração foi observada pela aderência de células ao fundo do poço da placa de 24 poços, sendo que no momento inicial (M0) não havia presença de células aderidas.

2.4.2. Imunofenotipagem pós-encapsulamento das células tronco

A seleção dos anticorpos foi baseada em estudo prévio de conhecimento de pesquisa com células de equinos (Carvalho et al., 2014; Santos et al., 2018), bem como do estudo prévio de caracterização de células tronco mesenquimais do tecido adiposo de muares (Dados não publicados de Rosa et al., 2018).

A citometria de fluxo das células de muares foi realizada nos seguintes momentos pós-encapsulamento: 24 horas e 7 dias, para avaliar o comportamento das células tronco e as possíveis alterações consequentes ao processo.

As microcápsulas foram dissolvidas utilizando o citrato de sódio para posterior incubação das células com os anticorpos e então, análise por citômetro FACS Calibur (BD, San Jose, CA, USA).

2.4.3. Morfologia das células inclusas em microcápsulas de hidrogel

Imuno-histoquímica

Para as análises imuno-histoquímicas, cortes de quatro micrômetros de espessura foram obtidos dos blocos de parafina e distendidos em lâminas histológicas de vidro carregadas positivamente (Immunoslide, EasyPath, São Paulo, Brasil). Foram utilizados os anticorpos primários contra as proteínas CD44 (1:50), MHC II (1:25), bem como foi realizado o controle negativo. Como anticorpo secundário foi utilizado o sistema polímero (Envision, Dako, USA), incubado em estufa à temperatura de 27°C.

2.4.4. Morfometria e avaliação das cápsulas

Olympus SDF Plapo 1XPF Japan/Olympus SZX16

A análise micromorfológica foi realizada adaptada de Lopes et al. (2017) com solução aquosa de azul de toluidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) na concentração de 1:20. A imagem obtida utilizou a lupa Olympus SDF Plapo

1XPF Japan/Olympus SZX16 do Centro de Microscopia Eletrônica da Unesp de Botucatu.

O tamanho inicial da cápsula foi obtido por Digital Color Camera for Highest-resolution Photomicrography (Leica DFC500 Microsystems, Alemanha), em objetiva 2,5x e ocular 1,0x, obtendo a mensuração de 1596 μm por 1459 μm .

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise da morfologia externa das microcápsulas, seu tamanho, porosidade formada e análise das células incorporadas foram realizadas pelo Microscópio Eletrônico de Varredura (Diniz et al., 2016) (FEI Company, Quanta 200). Primeiramente, as amostras foram fixadas em formol 10%, e após 1 hora foi realizado o processamento no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu (CME-IBB). A caracterização do tamanho dos poros, das cápsulas e das células foi realizado com o auxílio do software Image J.

Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Imagens foram adquiridas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (TCS SP5, Leica), sendo utilizado o comprimento de onda laser HeNe 633nm para excitar o Qtracker e para o Dapi, o laser 405nm (Santos et al., 2019), para excitar e detectar a fluorescência da amostra de células encapsuladas. O núcleo das células no interior das cápsulas foi previamente corado em azul pelo Dapi e o citoplasma, em vermelho pelo Qtracker.

2.4.5. Análise de comportamento

Poder de absorção (*Swelling*) das microcápsulas

O comportamento de absorção de água das cápsulas foi estudado gravimetricamente com base em Bajpai e Kirar (2016) e Pierre et al. (2013). As

beads previamente pesadas foram colocadas em meio de cultivo sob condições de imersão a 37°C. As cápsulas foram retiradas em intervalos de tempo regulares, a cada 1h (em 7 momentos), limpas superficialmente para remover o excesso da água ao redor, fracamente ligada, suas massas foram quantificadas por uma balança semi-analítica e novamente colocadas no meio de intumescimento. O percentual de absorção foi determinado usando a seguinte expressão onde M_0 e M_t são a massa seca inicial e a massa no momento “t”, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores médios, relatados nos dados.

Dois grupos foram avaliados, Gcellencap (células encapsuladas) e o Gcáp (cápsulas). Uma triplicata pós-hidratação *overnight* foi avaliada adicionalmente a fim de verificar o comportamento da cápsula e sua capacidade de absorção em um maior tempo.

Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com a metodologia descrita de acordo com a Associação de Química Analítica Oficial (AOAC, 2016), também utilizado por Lopes et al. (2017) e adaptado a diferença do tamanho da cápsula deste estudo. Uma porção de $X_g = 5$ cápsulas foi mantida durante 3h a 50°C, temperatura adaptada ao tamanho das cápsulas deste trabalho. As massas das cápsulas foram calculadas por uma balança semi-analítica e o procedimento foi repetido. O teor de umidade ($X_p\%$) foi calculado usando a equação 1. Os testes foram realizados em triplicata.

$$X_p (\%) = \frac{[5 - c_w]}{[5]} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Após a desidratação das cápsulas na última análise, adicionalmente foram hidratadas e então verificadas pós-overnight quanto a massa final.

2.4.6. Atividade metabólica celular

Ensaio colorimétrico *thiazolyl blue tetrazolium bromide* (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide – MTT)

O ensaio colorimétrico de citotoxicidade para avaliar a atividade metabólica celular foi realizado utilizando o sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT), técnica adaptada para células encapsuladas por Uludag e Sefton (1993). Os momentos avaliados foram M0, M24, M72 horas e M7 dias. O grupo de células encapsuladas (Gcellencap) e o grupo controle de células tronco mesenquimais plaqueadas foram avaliados, incubados por 24h a 37°C. As células livres plaqueadas e as células encapsuladas cultivadas tiveram o meio trocado e, no dia da análise, substituído por 300µl de solução de MTT (5mg/mL) incubadas por 3h a 37°C no escuro. Após as 3h, o meio foi aspirado e substituído por álcool isopropílico para dissolver os cristais formados para a leitura na placa de 96 poços. A absorbância foi medida a 570nm em espectrofotômetro de varredura de microplacas BioTeK PowerWave XS2 (Highland Park, Winooski, VT, USA), software Gen5.

2.5. Análise Estatística

Os dados experimentais estão reportados como a média $\pm$ desvio padrão. O desvio padrão também foi utilizado como barra de erro das figuras. Após a análise descritiva dos dados, os mesmos passaram por teste de normalidade e após, para as múltiplas comparações, teste de Dunn's. O Teste-t ou Mann-Whitney foi usado para as duplas comparações. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi <0.05 . O software utilizado para todas as análises foi o GraphPad Prism v.7 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

3. Resultados

3.1. Cultura das células pós-descongelamento, encapsulamento das CTMs e dissolução para análise

As AdCTMs de muares apresentaram boa proliferação, confluência pós-descongelamento, morfologia fibroblastóide e aderência ao plástico da garrafa de cultivo.

O encapsulamento utilizando a bomba de infusão contínua mostrou-se eficaz e replicável produzindo um elevado número de cápsulas em pouco tempo de processamento.

3.2. Caracterização do microencapsulamento das AdCTMs de muares

3.2.1. Comportamento celular

Nos momentos avaliados de 0, 24, 48, 72 horas e 7 dias as células encapsuladas mantiveram a média de viabilidade (%) em $93,57 \pm 3,531$. A migração celular iniciou-se a partir das 48h de avaliação e mais evidente em 7 dias com um aumento significativo de quase 10x em relação aos dois momentos iniciais. A partir de 24 horas o número de células se manteve.

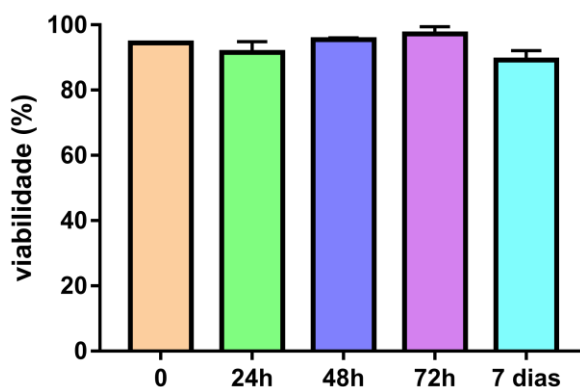


Figura 3. Viabilidade das células encapsuladas avaliadas por *Trypan blue* durante os momentos 0, 24, 48, 72 horas e 7 dias. Observa-se uma manutenção da viabilidade média de $93,57\% \pm 3,531$, considerada adequada para o cultivo de células.

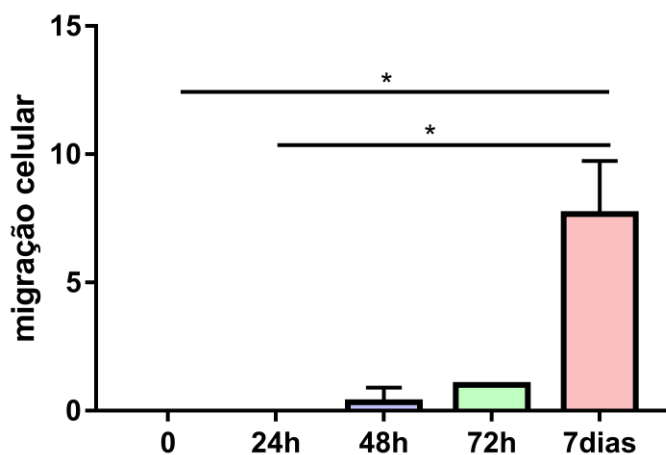


Figura 4. Migração das células das cápsulas para a placa de cultura de 24 poços, avaliado pelas células aderidas ao fundo da placa em seus respectivos dias. Entre os momentos 0 e 7 dias, bem como 24h e 7 dias houve diferença estatística, sendo $p=0,0434$ ($p<0,05$) (*).

3.2.2. Imunofenotipagem

Os anticorpos CD11b, CD45 foram negativos em todos os momentos como esperado para as células tronco mesenquimais. O CD90 foi positivo para as CTMs derivadas do tecido adiposo de muare. O MHC II foi negativo para as células encapsuladas.

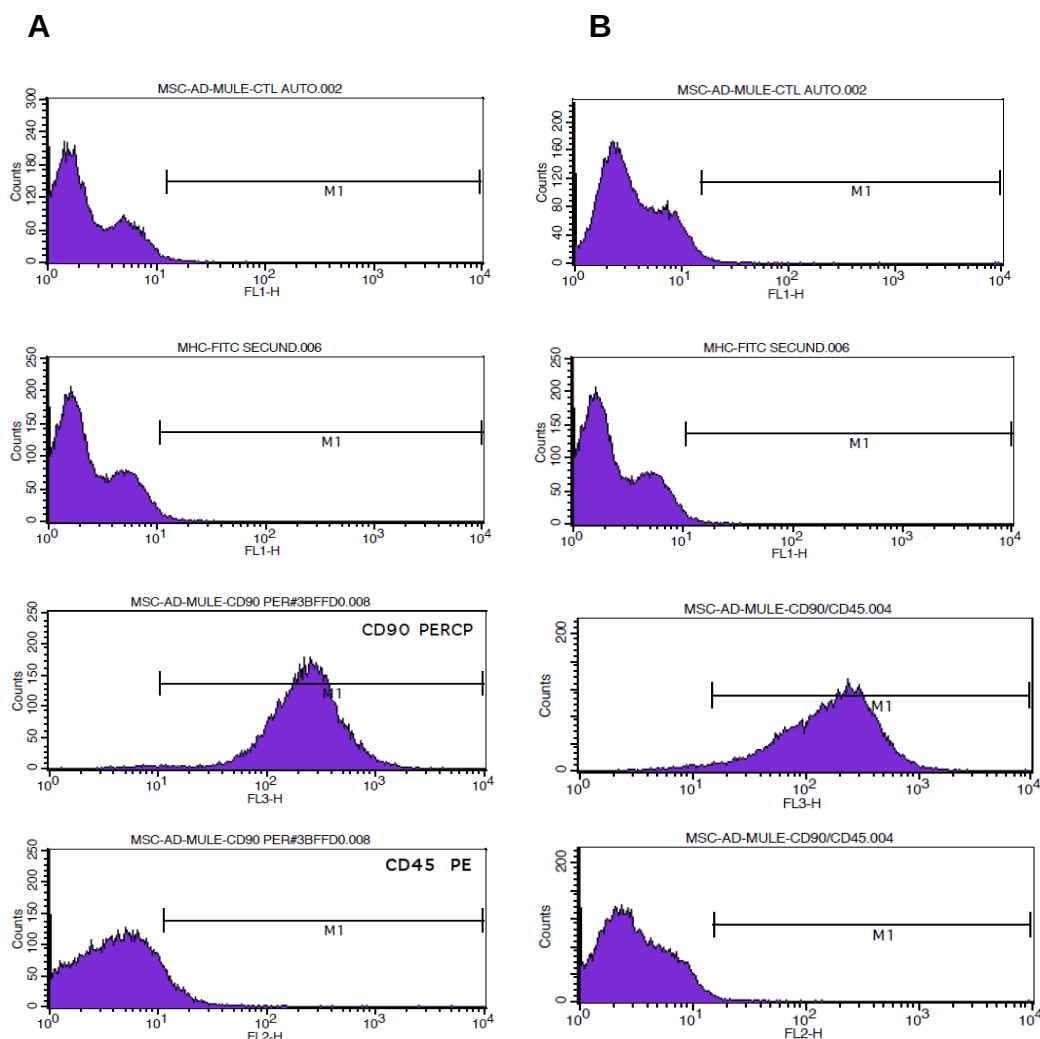


Figura 5. A) Avaliação imunofenotípica das células tronco mesenquimais de tecido adiposo de muaras encapsuladas, 24 horas pós-encapsulamento das células em microcápsulas de hidrogel de alginato. B) Avaliação 7 dias pós-encapsulamento das células no mesmo biomaterial.

3.2.3. Morfologia das microcápsulas e células encapsuladas

Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica avaliou o imunofenótipo das células dentro da cápsula. O processo de recuperação antigênica retirou o alginato das lâminas, restando somente as células aderidas às lâminas. Não houve marcação no controle negativo (Figura 7A). As células apresentaram marcação forte para CD44 (Figura 7B), em contrapartida, não houve expressão para o MHC II (Figura 7D). Assim, as células foram classificadas em CD44⁺⁺⁺/MHCII⁻.

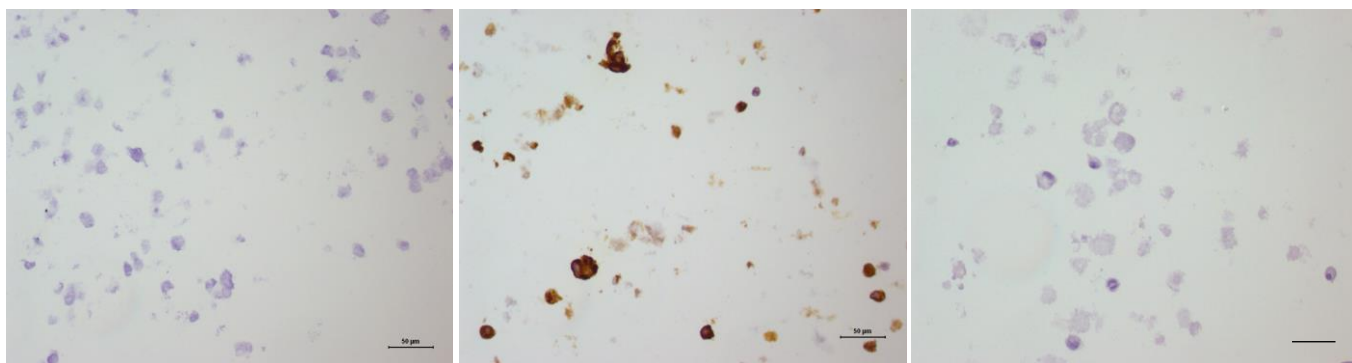


Figura 6. Fotomicroscopia de luz das lâminas em análise de imuno-histoquímica das cápsulas de células tronco. A) Controle negativo da amostra; B) Marcação positiva das CTMs pelo CD44; C) Marcação positiva pelo colágeno II de parte das células encapsuladas e D) Ausência de marcação das células pelo anticorpo MHC II.

3.2.4. Morfometria e avaliação das células e poros

Caracterização estrutural das microcápsulas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As cápsulas foram avaliadas quanto ao seu tamanho, morfologia, área dos poros e o tamanho das células (Fig. 8A e Fig. 8B, respectivamente). Observamos uma variação na morfologia dos poros de circular a irregular.

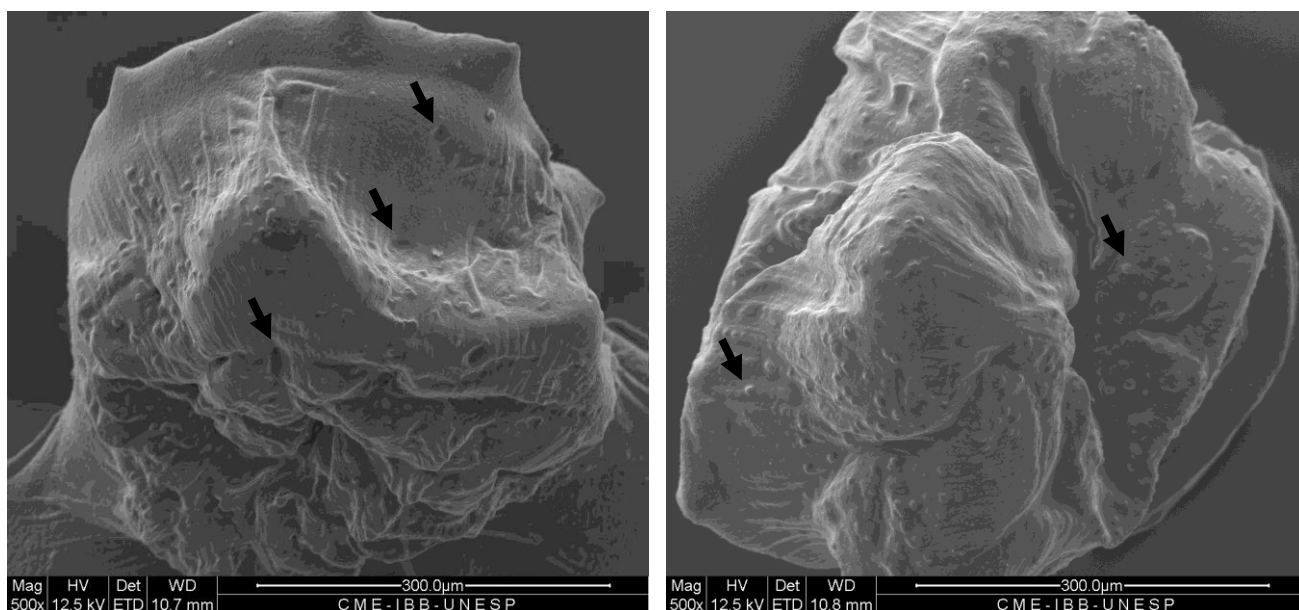


Figura 7. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando as microcápsulas, poros e células tronco. A mensuração foi realizada utilizando o software ImageJ avaliando-se a área dos poros e das células. As setas indicam A) poros das microcápsulas e B) AdCTMs de muers encapsuladas. Magnitude 500x.

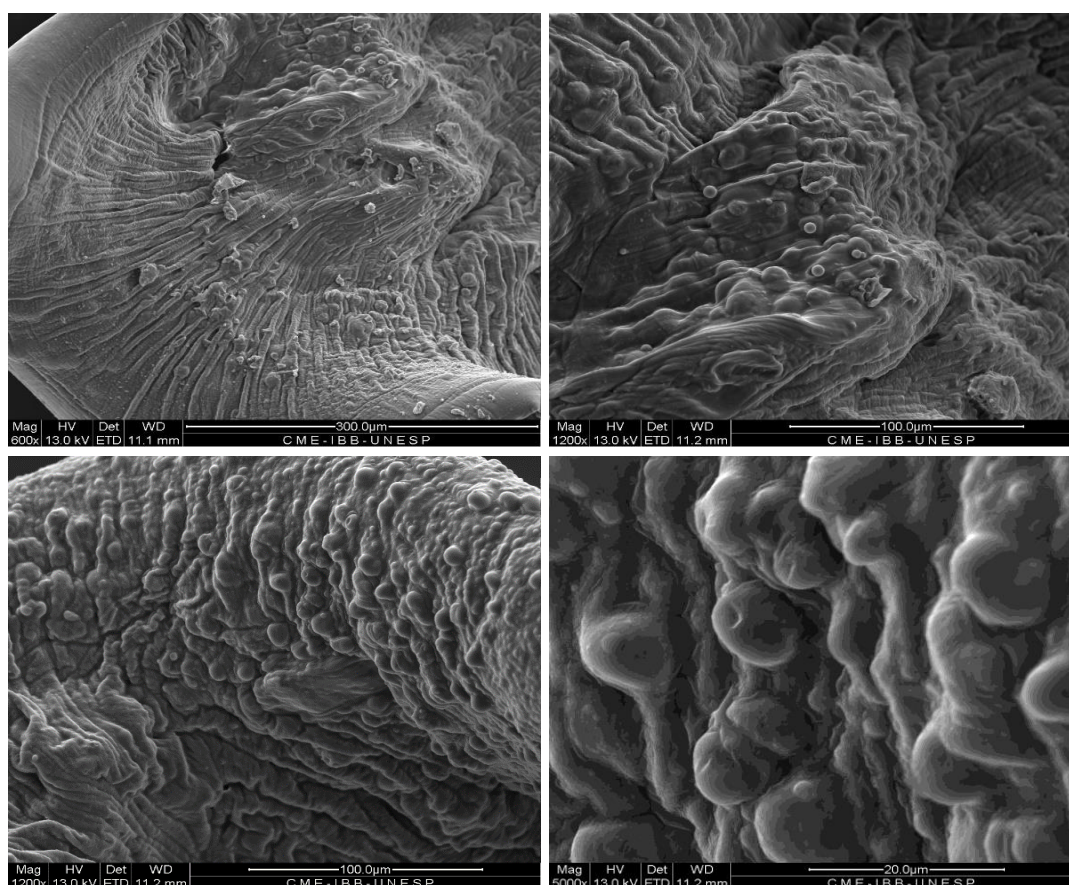


Figura 8. Imagens da MEV evidenciando a rugosidade da cápsula e a presença de células em uma vista interna da cápsula aberta. Magnitude de 600x, 1200x, 1200x, 5000x, respectivamente.

Morfologia e Área dos Poros		Tamanho Células
Circular (μm)	Irregular (μm)	Tamanho (μm)
100-165	20-45	$7,530 \pm 1,326$

Tabela 1. Proporção entre o tamanho dos poros (circulares e irregulares) e das células. Tamanho das células considerou a média de 10 medições.

Microscopia Confocal de Varredura a Laser

A amostra marcada com o nanocristal foi observada em 6 diferentes dias, visto que a cada dia que era avaliada as células incorporavam mais os marcadores. A primeira observação ocorreu no mesmo dia da marcação (M0), no entanto as melhores imagens e marcação das células pelas fluorescências se deram após 56 dias de preparo da lâmina.

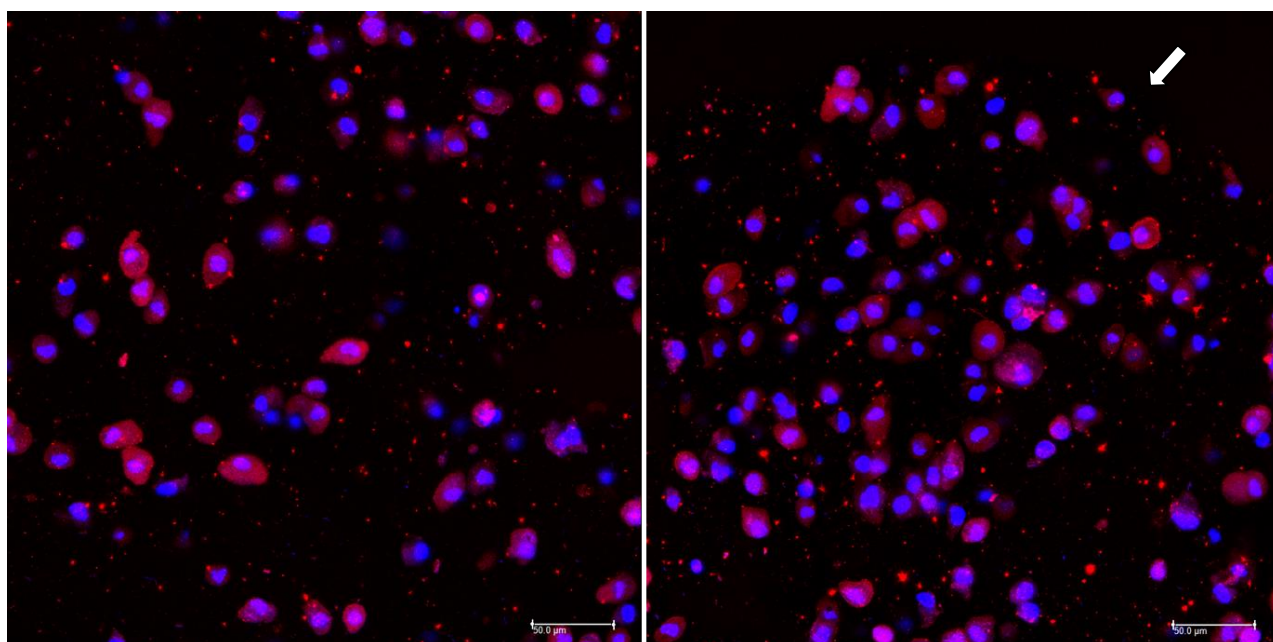


Figura 9. Microcápsulas de células tronco mesenquimais de mueres marcadas com nanocristal Qtracker. As células tronco no interior das microcápsulas podem ser observadas com o núcleo em azul pela marcação do DAPI e o citoplasma em vermelho pelo Qtracker. Quando o núcleo celular absorve o nanocristal também, 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 mueres.

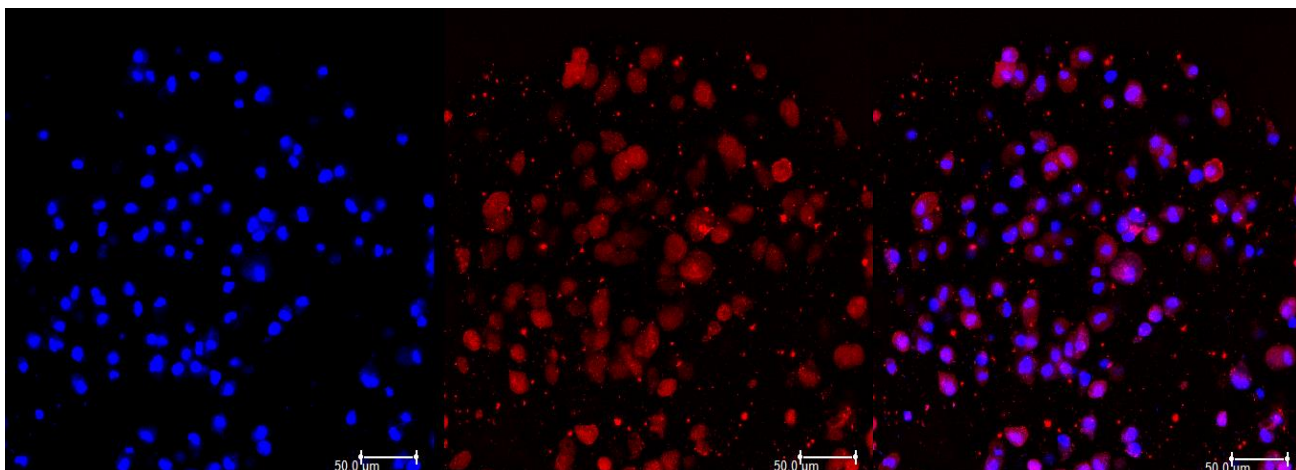


Figura 10. A) Os núcleos celulares em azul das AdCTMs de muares encapsuladas. B) O citoplasma em vermelho e **C)** A junção das duas imagens, mostrando a célula completa. Seta branca indicando a borda da microcápsula de alginato que envolve todas as AdCTMs de muares.

A Lupa Olympus Japan permitiu a visualização da cápsula de células tronco (Figura 12), evidenciando a concentração de células no centro da cápsula e pouca presença de células próximo a borda do biomaterial.

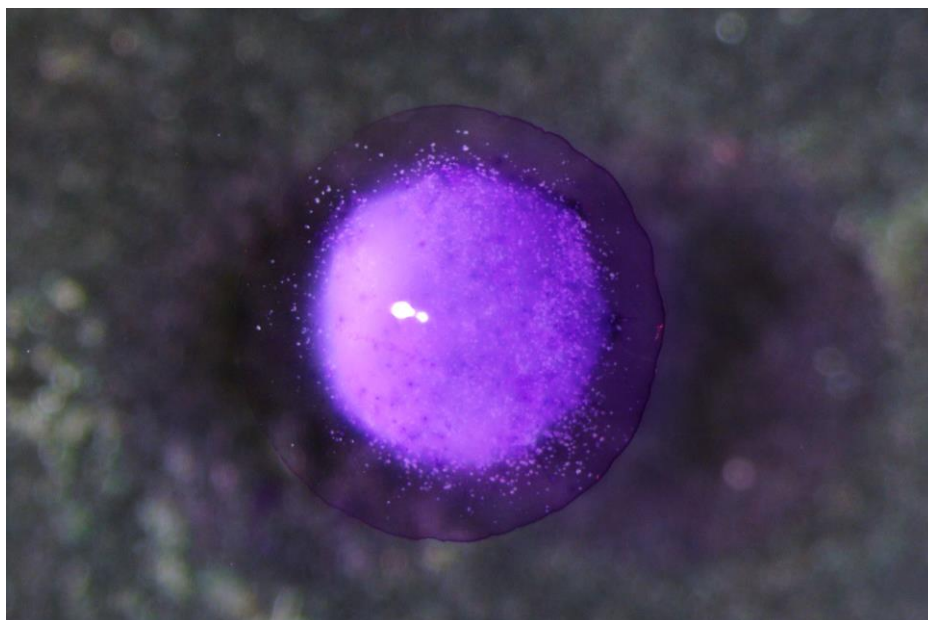


Figura 11. As células tronco mesenquimais de muares incluídas em microcápsula vista por Lupa Olympus Japan. Lupa 2.5x, barra da imagem em 1000 µm.

A mesma lupa permitiu que fosse realizado uma mensuração da cápsula e confirmação do seu potencial de absorção do meio ao qual ela foi submetida. O tamanho original desta microcápsula é de 1596 μm por 1459 μm . Após imersão em azul de toluidina (1:20) diluída em água ultrapura (18.2m Ω .cm), a avaliação por lupa Olympus e ImageJ mostrou as seguintes dimensões:

Área (cm ²)	D1 (cm)	D2 (cm)
0,05526 $\pm$ 0,0004	0,2613 $\pm$ 0,004	0,2658 $\pm$ 0,0005

Tabela 2. Características da cápsula observadas em lupa Olympus Japan e mensuradas pelo software ImageJ. D1 é referente ao diâmetro com base no eixo y e D2 referente ao diâmetro com base no eixo x. A capacidade de absorção da cápsula também pôde ser observada por este teste.

Observamos então, que houve um aumento em seu tamanho pela capacidade de absorção (cápsulas mantidas em solução de toluidina), melhor analisada em *swelling*, bem como no teor de umidade pós-hidratação da amostra.

3.2.5. Análise de comportamento

Teste de absorção (*swelling*) da amostra

Na análise de absorção o grupo de cápsulas e o grupo de células encapsuladas foram avaliados. O comportamento da massa mensurada em cada momento pode ser observado na Figura 13. A oscilação da massa da amostra no grupo que possui a presença das células foi mais evidente em relação ao grupo apenas de cápsulas. A comparação entre a absorção de cápsulas e de cápsulas com células inclusas pode ser verificada na mesma Figura 14.

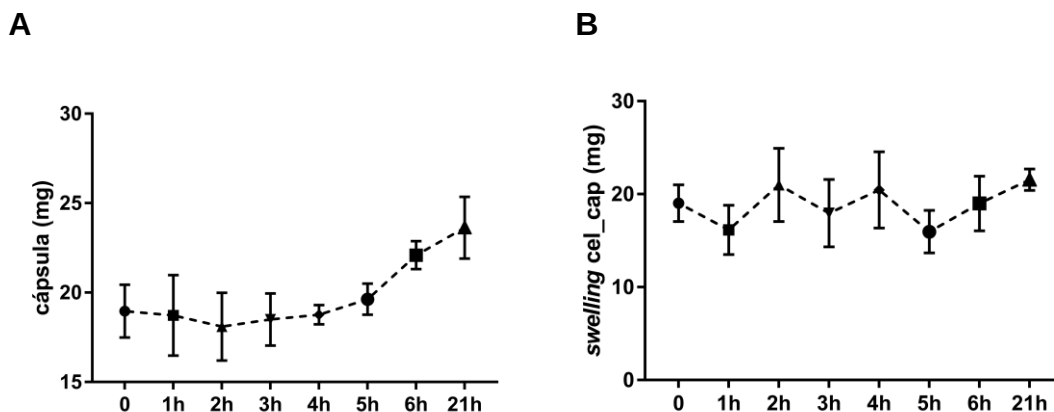


Figura 12. A) O poder de absorção das cápsulas se mantém constante até 4h e apresenta uma crescente a partir de 5h, quando apenas o biomaterial faz parte da análise. B) Na presença das células em seu interior, a oscilação da massa avaliada é observada, porém não houve diferença significativa.

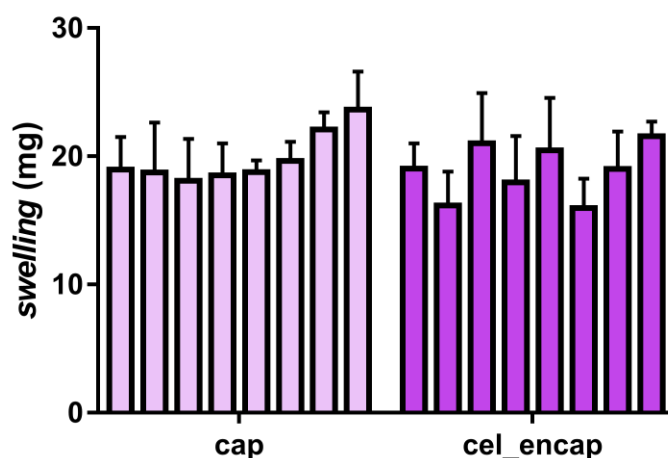


Figura 13. Comparação entre a absorção de cápsulas e de cápsulas com células incluídas.

Teor de umidade da cápsula

Apenas o grupo de cápsulas foi avaliado em relação ao teor de umidade, pois a temperatura ao qual elas foram submetidas, visou a avaliação do biomaterial e não das células, nesse teste, como observado na Figura 15.

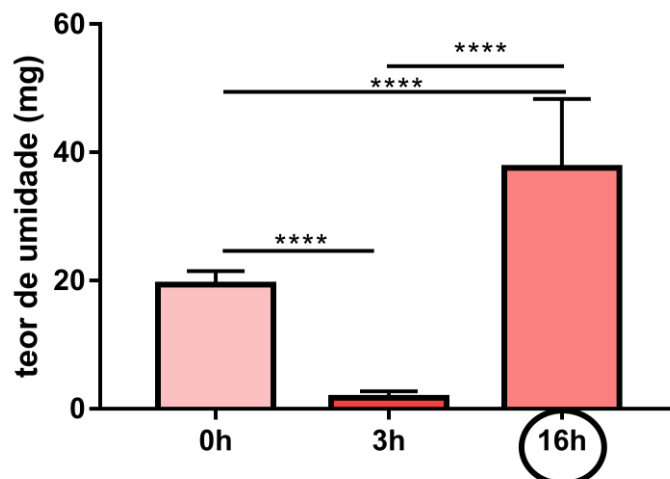


Figura 14. Após submeter as cápsulas a 50°C por 3h a redução no teor de umidade foi notável. No entanto, após a desidratação do biomaterial e *overnight* mantendo-as imersas em meio de cultivo, as cápsulas demonstraram um evidente potencial de recuperação e absorção.

3.2.6. Atividade metabólica celular

As células encapsuladas obtiveram um declínio na atividade metabólica celular 24h após o encapsulamento que aos 7 dias mostrou uma melhora.

Ensaio de MTT

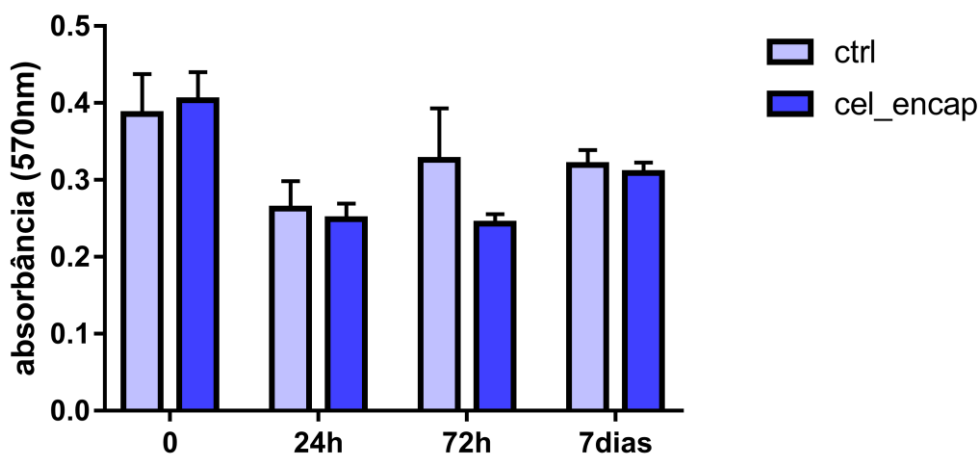


Figura 15. Metabolismo celular avaliado pelo teste com MTT, mostrando uma diminuição em 24 e 72 horas e uma recuperação da atividade metabólica em 7 dias. O período de 24h faz parte da adaptação das células ao biomaterial e processo de encapsulamento já que altera o ambiente celular previamente estabelecido no cultivo. Não houve diferença estatística entre os grupos.

4. Discussão

A viabilidade celular, bem como a caracterização de um ambiente tridimensional são fundamentais para que a interação do sistema cápsula-célula seja eficaz na terapia regenerativa intra-articular. A avaliação morfológica, a avaliação dos poros, o poder de absorção e umidade da cápsula; a integridade das células, seu comportamento em relação ao processo de encapsulamento e sua atividade metabólica devem ser analisadas e consideradas.

As células tronco mesenquimais de tecido adiposo (AdCTMs) de muares apresentaram boa proliferação, confluência pós-descongelamento, morfologia fibroblastóide e aderência ao plástico da garrafa de cultivo, além da expressão dos marcadores CD44, CD90, CD106 e negatividade para CD45, CD11b, CD34/31, MHC classe II. Além disso, também foram capazes de se diferenciar *in vitro* em condrócitos, osteoblastos e adipócitos que constituem os princípios básicos comportamentais para a caracterização de células tronco, de acordo com Dominici et al., 2006. A escolha dos anticorpos baseou-se em estudos prévios na espécie equina de Carvalho et al. (2009 e 2013) nos quais realizaram o isolamento e a caracterização imunofenotípica das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de cavalos. Até o presente momento, não há estudos que relacionem os muares à terapia regenerativa, portanto as informações oriundas de pesquisas com equinos, entre outras espécies são a base para o presente estudo.

O encapsulamento utilizando a bomba de infusão contínua mostrou-se eficaz e replicável, assim como observado por Rosa et al. (dados em publicação, 2019). A replicabilidade do processo é essencial para a manutenção da homogeneidade da amostra, facilidade de execução e confiabilidade do processamento. O desenvolvimento de metodologias viáveis financeiramente e de fácil reprodutibilidade é necessário para incrementar as técnicas já existentes e desenvolver outras mais eficazes.

A concentração de alginato 1,2% foi utilizada para a preparação das microcápsulas possibilitando uma adequada densidade, bem como a formação de poros circulares e irregulares, observados pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). Estudos de Nalini et al., 2019; Trouche et al., 2010; Bajpai e

Kirar, 2016 e Santos et al., 2019 utilizaram a MEV, assim como em nosso estudo, como uma importante análise do biomaterial, morfologia, avaliação dos poros e das CTMs. A mesma concentração de alginato foi utilizada por Ma et al. (2002) e uma concentração ligeiramente maior de 1,5% por Santos et al. (2018). Embora pesquisadores confirmem que as variações na concentração de alginato influenciem o metabolismo celular, a difusão de nutrientes e os componentes necessários do meio de cultivo para a célula (Bittencourt et al., 2009), tanto o alginato 1,2% utilizado por este experimento quanto o alginato 1,5% utilizado por Santos et al. (2018) não apresentaram problemas à difusão de nutrientes pela membrana da cápsula, visto que a viabilidade das células mostrou-se elevada e a sua sobrevivência ao longo do tempo foi mantida.

A fim de não submeter futuros animais de estudo *in vivo* a um procedimento cirúrgico invasivo, testamos a diminuição do tamanho das microcápsulas com o uso de agulha 30G, formando a média de esferas de 1527 μm que são capazes de passar por um cateter de tamanho 14G e permitem a realização de aplicação de células encapsuladas em terapia intra-articular com o animal em estação, sob sedação (Dados não publicados de Rosa et al., 2019). As células deste estudo em muare, ao passarem via agulha 30G, não apresentaram comprometimento significativo da sua integridade de membrana, ao ser observadas por microscopia de fluorescência, ou de sua viabilidade como observado pela técnica de Trypan blue. Dados estes que diferem de Lang et al. (2017) que relataram a diminuição da viabilidade das células tronco mesenquimais de equinos derivadas da medula óssea, quando injetadas por agulha 25G comparado a 20G, observando também aumento de debris celulares conforme diâmetro da agulha diminuía, mencionando ainda que, as células tronco maiores são mais propensas a serem cortadas e mortas quando passam através de menor diâmetro de agulha. No entanto, em nosso estudo, acreditamos que o alginato pode ter protegido as células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de muare, uma vez que sua viscosidade facilitou a passagem da célula pela agulha.

A fim de confirmar que as AdCTMs ficaram bem após o encapsulamento, foi avaliada a migração das células do interior das cápsulas para a placa de cultivo de 24 poços a partir de 48 horas pós-processamento em crescente com

72h e evidente migração aos 7 dias avaliados. A morfologia observada em microscópio invertido foi similar às células quando em cultivo de células tronco convencional, com morfologia fibroblastóide. A partir de 24 horas, o número de células se manteve. A diminuição inicialmente ocorreu pela adaptação que a célula sofreu em relação ao encapsulamento, também observado por Santos et al., 2019; alteração do ambiente previamente mantido em cultivo e novo sistema 3D de interação semelhante ao relatado por Hong et al., 2015.

A morte celular que pode ocorrer durante o encapsulamento pela reação à toxicidade do cloreto de cálcio foi considerada, baseado no estudo de Ma et al., 2002. No entanto, neste estudo, a fim de minimizar este revés, as cápsulas pós-produção foram mantidas em meio de cultivo por pelo menos 24h para que a depuração do cálcio ocorresse e permitisse que as células se adaptassem ao novo sistema.

A avaliação morfológica das AdCTMs encapsuladas permitiu evidenciar o citoplasma bem corado em vermelho pelo nanocristal Qtracker e o núcleo celular em azul pelo DAPI, por microscopia confocal de varredura a laser. A endocitose como descrito por Azzazy et al., 2006, para incorporação dos marcadores ocorreu de forma efetiva e permitiu que a imunofluorescência confirmasse a integridade celular: da membrana plasmática, do citoplasma e do núcleo celular. Com o passar do tempo, no entanto, algumas células apresentaram seu núcleo bem marcado, mas não seu citoplasma. A integridade de cerca de 80% se manteve e as demais, infere-se que possam não ter suportado o procedimento total de encapsulamento e então tiveram a membrana comprometida, que constitui a perda considerada esperada pelo processo de encapsulamento. O tempo de avaliação pode ter sido prolongado demais para a sobrevivência desse percentual de células, embora a maioria tenha se mantido íntegra.

Nesse estudo, observamos que o número de células encapsuladas (6×10^4) manteve a viabilidade de 93% o que está de acordo com Ma et al. (2002) que avaliaram células humanas encapsuladas e reportaram a alta manutenção da viabilidade (>90%) por 4 semanas, bem como que a duração do cultivo *in vitro* não teve efeito na viabilidade celular. A viabilidade demonstrada

por Santos et al. (2018), no entanto, apresentou em média 78%, possivelmente pela diferença na concentração do alginato.

Em relação ao encontrado em nosso estudo e por Santos et al. (2018), embora muares e equinos sejam semelhantes, o muar apresenta suas particularidades. Por serem animais mais resistentes em relação aos cavalos (Miranda e Palhares, 2017) as células de muares podem acompanhar essa rusticidade o que nos faz inferir que podem ser mais tolerantes ao processo de encapsulamento, visto a mudança que ocorreu no ambiente em que a célula estava sendo cultivada, permitindo uma maior interação entre as células do cultivo e também delas com o ambiente extracelular, como demonstrado no estudo de Hong et al., 2015.

O número de células inclusas em microcápsulas de hidrogel pode ser considerado adequado em 6×10^4 cels/cap em relação ao tamanho da cápsula sendo proporcional ao número de células que Santos et al. (2018) encontraram como melhor concentração de células por cápsula, considerando a boa adaptação ao *scaffold* de alginato de sódio. A concentração de 10^5 células foi mais eficiente para a aplicação intra-articular em equinos para uma cápsula de 3000 μm de tamanho, enquanto neste estudo o tamanho da cápsula obtido foi de 1500 μm objetivando uma posterior aplicação, não submetendo os animais ao procedimento cirúrgico, visto que com este tamanho, as cápsulas passam por cateter de 14G e a aplicação poderia ser realizada com o animal em estação. A mesma concentração de 6×10^4 deste estudo foi utilizada por Ma et al. (2002), no entanto com diferente tamanho da cápsula que produziram como 3,4mm.

A caracterização estrutural das microcápsulas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu avaliá-las quanto a área dos poros e sua morfologia. Apresentaram-se morfologicamente circulares, com área de 100 a 165 μm e irregulares, com 20 a 45 μm . Lien et al. (2009) demonstraram que condrócitos mostraram proliferação preferencial e produção de matriz extracelular por *scaffolds* com poros entre 250 e 500 μm , sendo este tamanho de poro observado como capaz de manter o fenótipo das células, enquanto poros de 50 a 200 μm resultam em células, muitas vezes, desdiferenciadas. Observaram também que à medida que o tamanho dos poros se torna maior, a

taxa de crescimento celular e a secreção de glicosaminoglicanos aumenta, bem como a expressão dos marcadores genéticos para agregano, colágeno tipo I, tipo II e tipo X. O espaço que a célula tem para se manter está diretamente relacionado ao seu metabolismo e conseqüentemente, ao crescimento das células. No entanto, no presente estudo com os poros encontrados de 20 a 165 µm foi possível observar a diferenciação das CTMs em condrócitos.

Os comprimentos de onda laser HeNe 633nm (Qtracker) e laser 405nm (DAPI) foram utilizados para excitar e detectar a fluorescência da amostra de células encapsuladas, utilizado também por Santos et al. (2018), que confirmou a eficiência da marcação de células encapsuladas pelo nanocristal. O núcleo das células no interior das cápsulas foi previamente corado em azul pelo DAPI e o citoplasma, em vermelho pelo Qtracker. Neste estudo, a amostra marcada com o nanocristal foi observada em 6 diferentes dias. A primeira observação ocorreu no mesmo dia da marcação (M0), no entanto, as melhores imagens e marcação das células pelas fluorescências se deram após 30, 40 e 56 dias que a lâmina foi preparada, como se a célula realizasse endocitose e a melhor internalização da fluorescência ocorresse ao longo do tempo. Algumas marcações inespecíficas foram observadas inicialmente em M0, no entanto, evidenciaram-se marcações esperadas das células íntegras. Cada dia que passava de observações, as células ficavam magnânimas, confirmando a integridade destas.

A morfometria da microcápsula confirmou o tamanho inicial médio de 1596 µm por 1459 µm, em Leica DFC500 (Microsystems Alemanha – Digital Color Camera for highest-resolution photomicrography). Posteriormente, após manter as células coradas com azul de toluidina (1:20), foram avaliadas por lupa Olympus e novamente mensuradas. Observamos então, o potencial de absorção do meio ao qual ela foi submetida. Após mensuração, o aumento das dimensões da microcápsula (2613 por 2658 µm) pela capacidade de absorção que ela possui, pôde ser melhor analisada no teste de absorção (*swelling*), bem como no teor de umidade pós-hidratação da amostra.

A análise de absorção (*swelling*) das cápsulas de CTMs ao longo de 7 momentos foi realizada de hora em hora. O último momento foi avaliado após manter as cápsulas em cultivo, por 15 horas. A presença das células no interior

da cápsula afetou o potencial de absorção da mesma, que apresentou oscilação evidente em relação ao biomaterial apenas. Bajpai e Kirar (2016) e Kikuchi et al., (1999) relataram que quando as *beads* são colocadas em solução, os íons presentes no meio entram na matriz da cápsula por troca iônica que resulta no relaxamento das correntes M da estrutura química do alginato, juntamente com o aumento da absorção. A estrutura totalmente hidratada começa a perder sua integridade estrutural devido o rompimento das cavidades “eggbox” e as cadeias de alginato começam a se desintegrar e se dissolver. A capacidade de absorção da microcápsula foi observada neste estudo, assim como a modificação da sua estrutura que, ao longo dos momentos avaliados, foi adquirindo o aspecto mais viscoso, possivelmente pela desintegração do material que ocorre de acordo com os autores supracitados.

Ao mesmo tempo, também foi observado o equilíbrio de forças nos momentos iniciais avaliados em relação ao *swelling* das cápsulas sem a presença das células em seu interior, que de acordo com Ganji et al. (2010) a absorção não é um processo contínuo, visto que, contra a força osmótica há uma força de elasticidade oposta que equilibra o esticamento da rede do biomaterial e impede sua deformação. Quando as forças osmótica e elástica estão equilibradas, não há absorção. Inferimos, portanto, que a presença das células tronco no interior das microcápsulas, quando nos grupos avaliados, possivelmente se torna mais um microambiente de troca de íons, dessa forma além da troca entre as cápsulas e o meio externo ao qual ele está submetido, há ainda a interação entre as células, o biomaterial e o meio externo supostamente causando a oscilação observada nesse grupo.

O teor de umidade pode ser definido como a porcentagem do peso de água em relação ao peso seco e é um fator importante na avaliação da viabilidade de microrganismos como relatado por Lopes et al. (2017), podendo ser aplicada às cápsulas. Após submeter as microcápsulas (apenas o biomaterial) a 50°C por 3h, a redução no teor de umidade foi evidente e apresentou o teor de $90,75 \pm 6,261$ %, sendo observado por Lopes et al. (2017) o teor de $97,70 \pm 0,03$ %. No entanto, após a desidratação do biomaterial, adicionalmente mantivemos as cápsulas imersas em meio de cultivo, por 12 horas e foi constatado que o biomaterial demonstrou um evidente potencial de

recuperação e absorção, sendo segundo Herrero et al. (2007) uma característica importante da microcápsula, como forma de garantir que os nutrientes e o oxigênio sejam disponibilizados para as células em seu interior, confirmando a troca que há entre o meio externo e interno da cápsula.

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, recomendado pelos autores Khattak et al., 2006; Herrero et al., 2007 que se baseia 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. As células encapsuladas obtiveram um declínio na atividade metabólica mitocondrial 24h após o encapsulamento que foi recuperado aos 7 dias. O metabolismo celular avaliado pelo ensaio de MTT, que mostrou uma diminuição em 24 e 72 horas e uma recuperação da atividade metabólica em 7 dias indicou segundo Herrero et al. (2007) que existiu uma certa interferência do processo de encapsulamento no metabolismo celular, citotoxicidade inicial à técnica, no entanto houve a recuperação das AdCTMs a partir dos 7 dias.

5. Conclusão

Neste estudo foram considerados diversos ensaios de análises que permitiram concluir que a difusão de nutrientes através do biomaterial é essencial para a manutenção da viabilidade, integridade das células tronco mesenquimais, assim como do metabolismo celular. A caracterização estrutural das microcápsulas permitiu avaliá-las quanto aos poros e sua morfologia, superfície, rugosidade, demonstrando que este biomaterial foi adequado para o encapsulamento das células. O processo de encapsulamento das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de mueres mostrou-se eficaz e reprodutível com o sistema de bomba de infusão contínua. A viabilidade celular se manteve elevada e sua morfologia apresentou diferenciação condrogênica,

processo este que pode contribuir nas terapias articulares. A proteção da célula utilizando a microcápsula em um ambiente alogênico no qual ela é utilizada é o fator mais importante da formação desse sistema células-cápsula.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Doutorado: 142322/2016-4 GD. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

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.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2016. Official methods of analysis. 20th edition. Arlington, USA, 2214 p.
- Azzazy, H.M., Mansour, M.M., Kazmierczak, S.C., 2006. Nanodiagnostics: a new frontier for clinical laboratory medicine. *Clin. Chem.* 52 (7), 1238-1246.
- 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>
- Bittencourt R.A.C., Pereira H.R., Felisbino S.L., Ferreira R.R., Guilherme G.R.B., Moroz A., Deffune E., 2009. Cultura de Condrócitos em arcabouço tridimensional: hidrogel de alginato. *Acta Ortop Bras.* 17:242–6.
- Carvalho, A., Alves, A., De Oliveira, P., Alvarez, L., Amorim, R., Hussni, C., Deffune, E., 2011. Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell for experimental tendinitis therapy in equines. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 31, p. 26-34.
- Carvalho, A.M., Alves, A.L.G., Golim, M.A., Moroz, A., Hussni, C.A., Oliveira, P.G.G., Deffune, E., 2009. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.*132, 303–306.
- Carvalho, A.M., Badial, P., Álvarez, L.E.C., Yamada, A.L.M., Borges, A., Deffune, E., Hussni, C., Garcia Alves, A.L., 2013. Equine tendonitis therapy using mesenchymal stem cells and platelet concentrates: a randomized controlled trial. *Stem Cell Res. Ther.*, v. 4, p. 85.
- Carvalho, A.M., Yamada, A.L., Golim, M.A., Álvarez, L.E., Hussni, C.A., Alves, A.L., 2014. Evaluation of mesenchymal stem cell migration after equine tendonitis therapy. *Equine Vet. J.* 46 (5), 635–638.
- Cassano, J.M. et al., 2018. Inflammatory licensed equine MSCs are chondroprotective and ex-hibit enhanced immunomodulation in an inflammatory environment. *Stem Cell Research & Therapy.*, v.9, p.82. DOI

10.1186/s13287-018-08402.

- Chien, H.W., Tsai, W.B., Jiang, S., 2012. Direct cell encapsulation in biodegradable and functionalizable carboxybetaine hydrogels. *Biomaterials* 33(23):5706-5712. doi: 10.1016/j.biomaterials.
- 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>
- Diniz, I.M.A., Chen, C., Ansari, S., Zadeh, H.H., Moshaverinia, M., Chee, D., Marques, M.M., Shi, S., Moshaverinia, A., 2016. Gingival Mesenchymal Stem Cell (GMSC) Delivery System Based on RGD-Coupled Alginate Hydrogel with Antimicrobial Properties: A Novel Treatment Modality for Peri-Implantitis. *J Prosthodont.* 2016 February ; 25(2): 105–115. doi:10.1111/jopr.12316.
- 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.
- Ganji, F., Vasheghani-Farahani, S., Vasheghani-Farahani, E., 2010. Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. *Iranian Polymer Journal* 19 (5), 375-398.
- 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.
- Huurne, M.T.; Schelbergen, R.; Blattes, R.; Blom, A., De Munter, W., Grevers, L. C., et al., 2012. Anti-inflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 24:11.

- Kikuchi, A., Kawabuchi, M., Watanabe, A., et al., 1999. Effect of Ca⁺⁺-alginate gel dissolution on release of dextran with different molecular weights. *J. Controlled Release*, 58:21–28.
- Kim, S.U. e Vellis, J., 2009. Stem Cell-Based Cell Therapy in Neurological Diseases: A Review. *Journal of Neuroscience Research*, 87:2183–2200.
- Kong, Y., Zhao, Y., Li, D., Shen, H., Yan, M., 2019. Dual Delivery of Encapsulated BM-MSCs and BMP-2 Improves Osteogenic Differentiation and New Bone Formation. *J Biomed Mater Res*. 107A:2282–2295. Wiley Periodicals, Inc.
- Kornicka, k., Geburek, F., Röcken, M., Marycz, K., 2019. Stem Cells in Equine Veterinary Practice-Current Trends, Risks, and Perspectives. *J. Clin. Med.* 2019, 8(5), 675; <https://doi.org/10.3390/jcm8050675>.
- 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, 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.
- Mattapally, S., Pawlik, K.M., Fast, V.G., Zumaquero, E., Lund, F.E., Randall, T.D., Townes, T.M., Zhang, J., 2018. Human Leukocyte Antigen Class I and II Knockout Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cells:

- Universal Donor for Cell Therapy. *Journal of the American Heart Association*. DOI: 10.1161/JAHA.118.010239
- 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.
- Naji, A., Favier, B., Deschaseaux, F., Rouas-Freiss, N., Eitoku, M., Suganuma, N., 2019. Mesenchymal stem/stromal cell function in modulating cell death. *Stem Cell Research & Therapy*. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1158-4>.
- Nalinia, T., Khaleel Bashab, S., Majeeth Mohamed Sadiq, A., Sugantha Kumarid, V., 2019. Development and characterization of alginate / chitosan nanoparticulate system for hydrophobic drug encapsulation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 52, 65-72.
- Penny, J., Harris, P., Shakesheff, K. M., Mobasher, A., 2012. The biology of equine mesenchymal stem cells: phenotypic characterization, cell surface markers and multilineage differentiation. *Front Biosci*, 17.
- 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. and Haug, A., 1968. A Light scattering study of alginate. *Acta Chem. Scand.* **22**,797-810.
- Swioklo, S., Ding, P., Pacek, A.W., Connon, C.J., 2017. Process parameters for the high-scale production of alginate-encapsulated stem cells for storage and distribution throughout the cell therapy supply chain. *Process Biochem.* 59, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.06.005>
- Teramura, Y., Iwata, H., 2009. Islet encapsulation with living cells for improvement of biocompatibility. *Biomaterials* 30: 2270–2275.
- Trouche, E., Fullana, S.G., Mias, C., Ceccaldi, C., Tortosa, F., Seguelas, M.H., Calise, D., Parini, A., Cussac, D., Sallerin, B. 2010. Evaluation of Alginate Microspheres for Mesenchymal Stem Cell Engraftment on Solid Organ. *Cell Transplantation*, Vol. 19, pp.1623-1633.
- Vidal, M.A., Kilroy, G.E., Lopez, M.J., Johnson, J.R., Moore, R.M., Gimble, J.M., 2007. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet. Surg.*;36(7):613-22.
- 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.
- Yong, K., 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>
- 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.