

## Encapsulación de células en perlas de alginato de calcio: posibilidades de aplicación

R. SERRANO,<sup>1</sup> M. P. RODRÍGUEZ,<sup>1</sup> L. SOREL,<sup>3</sup> A. AGUILAR,<sup>2</sup> L. HERRERA<sup>1</sup> y J. DE LA FUENTE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Agrupación de Genética de Células de Mamíferos, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

<sup>2</sup> Agrupación de Hibridomas y Modelos Animales, CIGB

<sup>3</sup> Instituto de Angiología y Cirugía Vascular, Hospital Clínico Quirúrgico "Salvador Allende", Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido en marzo de 1990

Aprobado en abril de 1990

### RESUMEN

La inmovilización de células animales se ha logrado empleando diferentes vías, se ha utilizado para alcanzar cultivos de alta densidad y como una alternativa a la terapia génica de células somáticas. En este trabajo se reporta una metodología para la encapsulación de células de melanoma de Bowes y células CHO productoras de ht-PA recombinante en perlas de alginato de calcio. Las células de melanoma de Bowes encapsuladas se emplearon para la producción de ht-PA en un reactor de cama fluidizada. Las células CHO productoras de ht-PA recombinante y encapsuladas, se inocularon en ratones y se demostró la presencia de anticuerpos específicos anti-ht-PA en estos animales.

### SUMMARY

Immobilization of animal cells has been achieved using different methods. Immobilized cells are currently used for high cell density culture of animal cells and as an alternative approach to somatic cell gene therapy. In this report we present a method for the entrapment of Bowes melanoma and recombinant ht-PA producing CHO cells in calcium alginate beads. The immobilized Bowes melanoma cells were used for the production of ht-PA in a fluidized-bed reactor. The calcium alginate beads containing the transformed CHO cells which produce recombinant ht-PA, were transplanted into mice. Specific antibodies against ht-PA were detected in these animals.

### INTRODUCCION

La inmovilización de células animales se ha utilizado por varios autores para alcanzar cultivos de alta densidad (Van Brunt, 1986; Posillico, 1986; Nilsson, 1987; Shirai *et al.*, 1988; Iijima *et al.*, 1988; Smiley *et al.*, 1989). Existen diferentes métodos para la inmovilización de células animales que incluyen la adsorción a soportes de cerámica, fibra hueca y otros, y la encapsulación en perlas de alginato, agarosa, colágeno o fibrina (Nilsson, 1987). Además de la posibilidad de lograr cultivos de alta densidad con la inmovilización celular, esta metodología permite emplear células animales como una alternativa a la terapia génica de células somáticas (Goosen *et al.*, 1985; Louis y Verma, 1988).

En este trabajo nosotros describimos una metodología para la encapsulación de células de melanoma de Bowes y células de ovario de hamster chino (CHO), transformadas en perlas de alginato de calcio. Las células de melanoma de Bowes encapsuladas fueron empleadas para la producción de activador tisular del plasminógeno humano

(ht-PA) en un reactor de cama fluidizada. Las células CHO transformadas y capaces de expresar ht-PA recombinante se encapsularon y se implantaron en ratones. Al menos por 12 días, el suero de los ratones trasplantados contenía anticuerpos contra el ht-PA.

## MATERIALES Y METODOS

### Células y condiciones de cultivo

Las células de melanoma de Bowes se cultivaron en medio MEM de Dulbecco (DMEM, Gibco, NY) suplementado con suero fetal de ternero al 10%, piruvato de sodio 1 mM y glutamina 2 mM. Las células se mantuvieron y se propagaron en frascos de rotación (1750 cm<sup>2</sup>).

Las células CHO transformadas y capaces de expresar ht-PA recombinante a niveles de aproximadamente 0,6 mU/célula/día crecidas en cultivo estacionario (clon C85D, Lleonart *et al.*, manuscrito en preparación), se mantuvieron según se ha reportado previamente (Pérez *et al.*, 1938).

### Encapsulación de las células en perlas de alginato de calcio

Se colectaron las células en fase logarítmica de crecimiento y se resuspendieron en DMEM a una concentración de 10<sup>6</sup> células/ml para Bowes y 14-18 x 10<sup>6</sup> células/ml para CHO. Un mililitro (0,87 ml para CHO) de la suspensión celular se mezcló con 2 ml de una solución de alginato de calcio al 2% (Bellco, NY), el cual fue previamente filtrado a través de una membrana de 0,2 μm. La suspensión celular en alginato se gotea entonces sobre una solución estéril de CaCl<sub>2</sub> 50 mM, NaCl 100 mM, empleando una aguja número 22, y se deja reposar durante 10 minutos. Estas perlas de gel se emplean entonces en los diferentes experimentos (figura 1).

### Determinación de ht-PA y anticuerpos anti-ht-PA

La determinación de ht-PA en los sobrenadantes de cultivo y suero de los animales se realizó empleando un ELISA específico (Pérez *et al.*, en prensa). Para la determinación de anticuerpos anti-ht-PA se utilizó un sistema ELISA en el que las placas de microtitulación se recubrieron con un antisuero policlonal anti-ht-PA

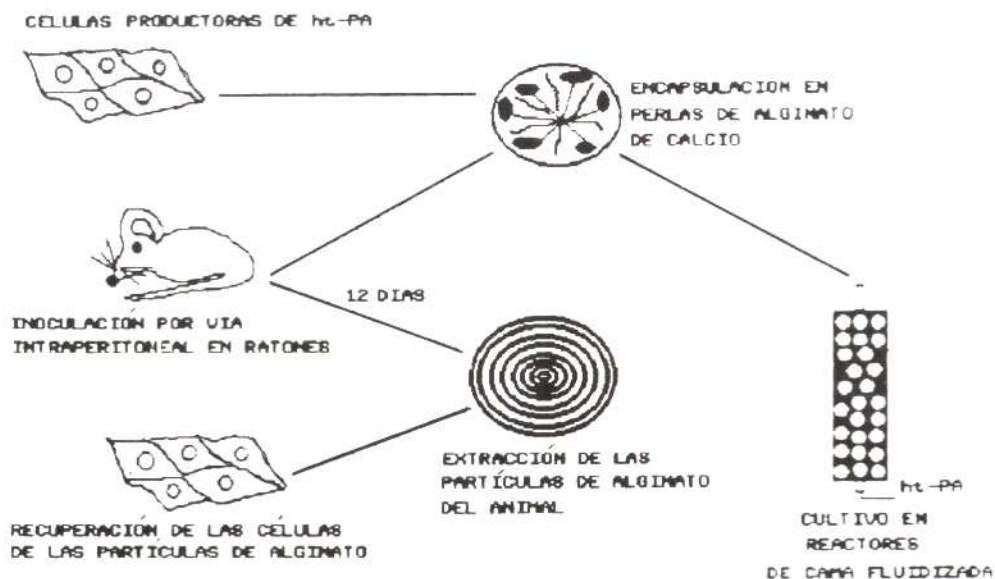


FIG. 1. Empleo de células encapsuladas en perlas de alginato de calcio. Células productoras de ht-PA se encapsularon en perlas de alginato de calcio. Las perlas de gel se utilizaron para la producción de ht-PA en un reactor de cama fluidizada, y para inocular ratones. En el suero de los ratones inoculados se detectaron anticuerpos específicos anti-ht-PA. Doce días después de la inoculación las partículas se recuperaron y se comprobó la viabilidad celular.

(10  $\mu\text{g/ml}$ ). Se añadió entonces ht-PA (5  $\mu\text{g/ml}$ ), el suero de ratón convenientemente diluido y el anticuerpo conjugado diluido 1:5000. La actividad de ht-PA se midió mediante la determinación de actividad fibrinolítica en placas de fibrina (Astrup y Mullertz, 1952). Se contó el número de células utilizando un haemocitómetro después que las perlas de alginato se solubilizaron en citrato de sodio 50 mM para recuperar las células encapsuladas.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Producción continua de ht-PA en un reactor de cama fluidizada por células de melanoma de Bowes encapsuladas en perlas de alginato de calcio

Las células de melanoma de Bowes encapsuladas en perlas de alginato de calcio se transfirieron a un reactor de cama

fluidizada (2,8 cm de diámetro x 13 cm de largo; Rodríguez *et al.*, manuscrito en preparación). Se suministraba medio DMEM de forma continua con un flujo de 20-40 ml/h. El reactor contiene 50 ml de la suspensión de perlas de alginato y 40 ml de medio. Al cultivo se le suministraba una mezcla de aire 95%/CO<sub>2</sub> 5% por la parte inferior del reactor con un flujo de 30 l/h.

Con este sistema se alcanzaron niveles de productividad de ht-PA de 0,2 pg/célula/día, que son 1,6-5 veces mayores que el que se obtiene en los cultivos en rotación con estas células en nuestras condiciones experimentales (figura 2). Las densidades celulares alcanzadas fueron de más de  $10^7$  células/ml de gel. Con este sistema se alcanza un aumento en la producción de ht-PA.

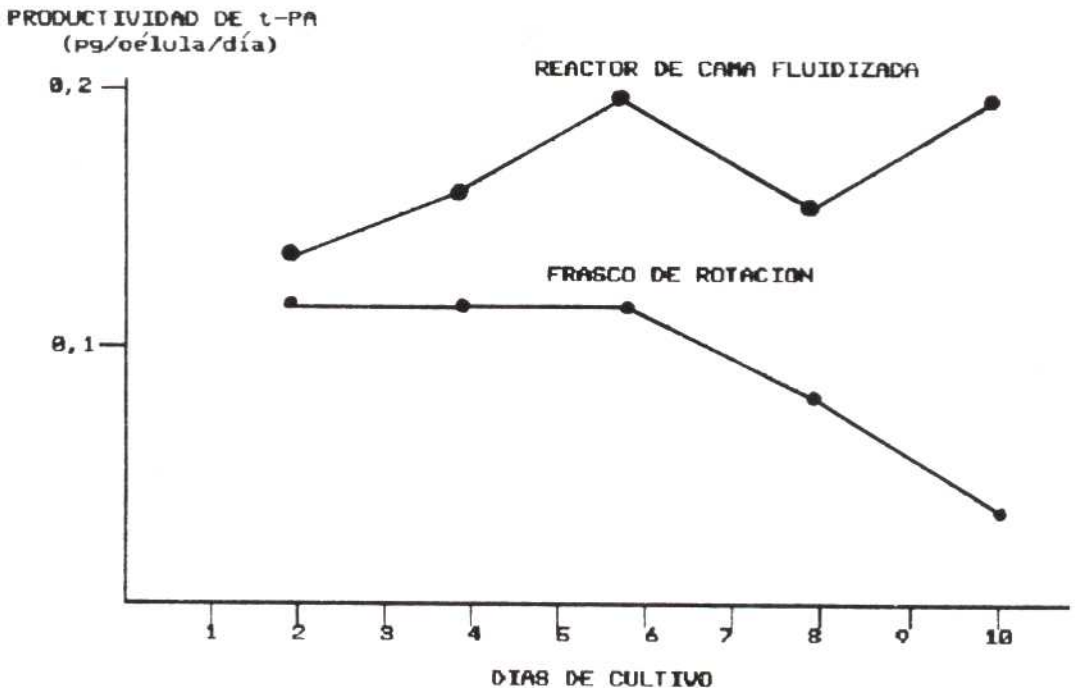


FIG. 2. Producción de ht-PA por células de melanoma de Bowes encapsuladas en perlas de alginato de calcio y cultivadas en un reactor de cama fluidizada o en un frasco de rotación de 4 litros.

## Expresión de ht-PA recombinante en el suero de ratones trasplantados con células CHO transformadas y encapsuladas en perlas de alginato de calcio

Las células CHO transformadas (clon C85D, Leonart *et al.*, manuscrito en preparación) se encapsularon y las perlas de alginato (diámetro promedio 2 mm con un rango entre 1,5 mm y 2,5 mm) se

transfirieron por vía intraperitoneal a ratones OF-1 hembras de 8-10 semanas de nacidos (tabla 1).

Como se muestra en la figura 3, se detectaron niveles de anticuerpos anti-ht-PA en el suero de los ratones inoculados con las células productoras de ht-PA recombinante y no así en los controles inoculados con células CHO no transformadas o perlas de alginato vacías.

Tabla 1  
INOCULACION EN RATONES DE LAS CELULAS ENCAPSULADAS EN PERLAS DE ALGINATO DE CALCIO

Células	Células/partícula	Partículas/ratón	Ratones
C85D	109 000	46	2
CHO dhfr <sup>-</sup>	105 000	43	1
----(*)	0	56	1

Ratones OF-1 hembras fueron inoculados por vía intraperitoneal con partículas de alginato de calcio vacías (\*) o conteniendo células CHO dhfr<sup>-</sup> o transformadas y productoras de ht-PA (clon C85D).

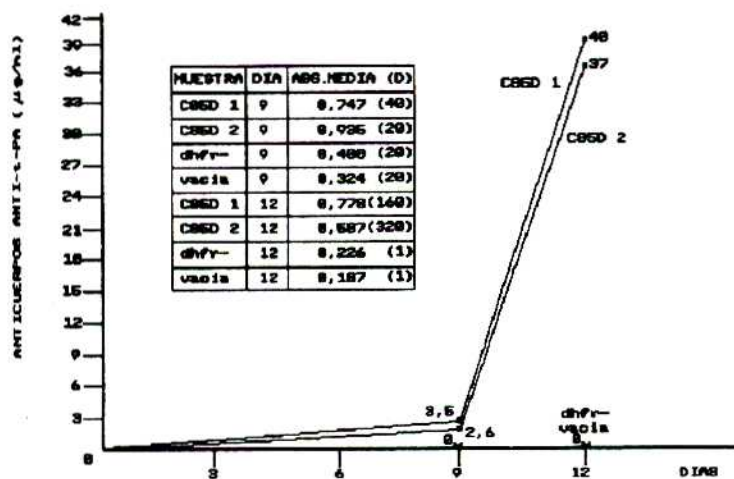


FIG. 3. Detección de anticuerpos específicos anti-ht-PA en el suero de ratones inoculados con células CHO (clon C85D) productoras de ht-PA recombinante y encapsuladas en perlas de alginato de calcio.

Los animales se inocularon según se indica en la tabla 1. Nueve y doce días después de la inoculación se midió la presencia de anticuerpos específicos anti-ht-PA en el suero de los animales. Para ello se diluyó el suero (D) y cada muestra se sometió a dos mediciones independientes, calculándose para cada muestra el valor de absorbancia media (ABS.MEDIA). Las muestras corresponden a los animales inoculados con perlas de alginato de calcio vacías (vacía), que contienen células CHO productoras de ht-PA recombinante (clon C85D, C85D 1 y 2), o células CHO dhfr<sup>-</sup> (dhfr<sup>-</sup>). Para cada punto se indica el valor de la concentración de anticuerpos anti-ht-PA (µg/ml).

Pasados 12 días de inoculados los animales, las perlas de alginato de calcio se extrajeron y se comprobó que las células se encontraban vivas por tinción con *tripan blue*. En nuestras condiciones experimentales no fue posible detectar ht-PA en el suero de los animales inoculados con las células CHO transformadas. Esto puede ser originado por los bajos niveles de expresión de ht-PA que tienen estas células y que no fue posible detectar con el ELISA empleado. No obstante, la presencia de anticuerpos específicos para el ht-PA en el suero de los ratones inoculados con las células CHO productoras de ht-PA recombinante, permite valorar el empleo de este sistema para el suministro de un producto génico *in vivo*.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a F. O. Castro y A. Alfaro la ayuda brindada en el desarrollo de estos experimentos.

## REFERENCIAS

- ASTRUP, T. y S. MULLERTZ (1952). The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem and Biophys.* **40**: 346-351.
- BRUNT, J. VAN. (1986). Immobilized mammalian cells: the gentle way to productivity. *Biotechnology* **4**: 505-510.

- GOOSEN, M. F. A.; G. M. O'SHEA; H. M. GHARAPETIAN; S. CHOU y A. M. SUN. (1985). Optimization of microencapsulation parameters: semipermeable microcapsules as a bioartificial pancreas. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 146-150.
- IIJIMA, S.; T. MANO; M. TANIGUCHI y T. KOBAYASHI (1988). Immobilization of hybridoma cells with alginate and urethane polymer and improved monoclonal antibody production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 572-576.
- LOUIS, D. e I. VERMA (1988). An alternative approach to somatic cell gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3150-3154.
- NILSSON, K. (1987). Methods for immobilizing animal cells. *Tibtech* **5**: 73-78.
- PEREZ, A.; P. RODRIGUEZ; R. LEONART; I. GUILLEN; L. HERNANDEZ; E. HERNANDEZ; C. SANTIZO; J. DE LA FUENTE y L. HERRERA (1988). Synthesis and secretion of the hepatitis B surface antigen in mammalian cells. *Interferon y Biotecnología* **5**: 223-228.
- PEREZ, M. E.; L. SORELL; P. RODRIGUEZ; L. HERNANDEZ; M. RODRIGUEZ; M. AGUILAR y J. GAVILONDO. Obtención y empleo de anticuerpos monoclonales contra el activador tisular del plasminógeno. *Biotecnología Aplicada* (en prensa).
- POSILLICO, E.G. (1986). Microencapsulation technology for large scale antibody production. *Biotechnology* **4**: 114-117.
- SHIRAI, Y.; R. SASAKI; K. HASHIMOTO; H. KAWAHARA; K. HITOMI y H. CHIBA (1988). Continuous production of erythropoietin with immobilized animal cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 544-549.
- SMILEY, A.; W-S. HU y D. WANG (1989). Production of human immune interferon by recombinant mammalian cells cultivated on microcarriers. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 1182-1190.