

# MICROENCAPSULACIÓN DE CÉLULAS: SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS

## CELL MICROENCAPSULATION TECHNOLOGY: ACTUAL TRENDS AND PERSPECTIVES

Orive G., Hernández R. M., Gascón A. R., Igartua M., Pedraz J. L.\*

### RESUMEN

La microencapsulación de células posibilita el tratamiento de un gran número de enfermedades. Mediante esta tecnología, las líneas celulares se inmovilizan en estructuras poliméricas esféricas o microcápsulas, que actúan como sistemas farmacéuticos de liberación controlada del producto terapéutico secretado por las células. Las microcápsulas, permiten el tránsito de nutrientes, oxígeno y de los productos secretados por las células, mientras que impiden la entrada de moléculas inmunocompetentes como consecuencia de sus elevados pesos moleculares. La futura aplicación clínica de esta estrategia exige un minucioso estudio y la optimización de las propiedades de las microcápsulas y líneas celulares, así como el desarrollo de la genética y la tecnología farmacéutica. En esta revisión, se discuten las posibilidades y las deficiencias de esta tecnología, así como los requerimientos futuros para un óptimo uso clínico.

**Palabras Clave:** *encapsulación de células, trasplante, microcápsula, biocompatibilidad, biotecnología, órganos bioartificiales.*

### ABSTRACT

Microencapsulated cell technology has the potential to treat a wide range of diseases. Cell lines are enclosed within spherical polymeric devices or microcapsules that function as vehicles for controlled drug delivery *in vivo*. Such devices allow the transit of the necessary nutrients, oxygen and secreted products, while entry of the host's immune mediators is prohibited by their larger molecular sizes. The future clinical application of this strategy demands the careful study and the optimization of the properties of both microcapsules and cell lines. Moreover the development of genetics and pharmaceutical technology will also be required. In this review, the feasibility and the drawbacks of this technology are presented. Furthermore, the future requirements for optimized clinical use are discussed.

**Key Words:** *cell encapsulation, transplant, microcapsule, biocompatibility, biotechnology, bioartificial organs.*

## INTRODUCCIÓN

La citomedicina es una prometedora estrategia basada en la utilización de agentes biológicos con fines terapéuticos. Estos agentes (principalmente células) son implantados en huéspedes enfermos para que secreten productos peptídicos con actividad terapéutica. A pesar de haberse obtenido resultados esperanzadores a corto plazo, la viabilidad y producción celular se ven comprometidas por la respuesta inmune del huésped. Por esta razón, el contenido biológico a transplantar debe protegerse frente al conjunto de moléculas inmunocompetentes, manteniéndose la actividad del implante durante largos periodos de tiempo. Una de las posibilidades para lograr este objetivo se basa en la inmunosupresión farmacológica del huésped, de modo que las defensas del mismo queden atenuadas. Pero esta opción carece de lógica clínica, ya que por una parte la inmunodepresión inducida en el paciente nunca justificaría nuestro objetivo terapéutico, y por otro lado, la inmunosupresión farmacológica solamente resultaría efectiva en el caso de las células alogénicas (procedentes de la misma especie), pero seguiría siendo insuficiente en el caso de las células xenogénicas (procedentes de otras especies). Por tanto, lo ideal sería inmunoaíslar única y exclusivamente el injerto biológico, manteniendo el estado inmunológico competente del huésped.

La microencapsulación permite englobar o incorporar las células dentro de una esfera polimérica que reúna las condiciones de permeabilidad, estabilidad e inmunoaíslamiento necesarias. Esta primera idea surgida hace más de 35 años (1), ha ido evolucionando y desarrollándose por muchos grupos de investigación, de modo que en la actualidad la microencapsulación celular se concibe como una nueva estrategia terapéutica con infinitas aplicaciones médicas. En este artículo se pretende analizar los

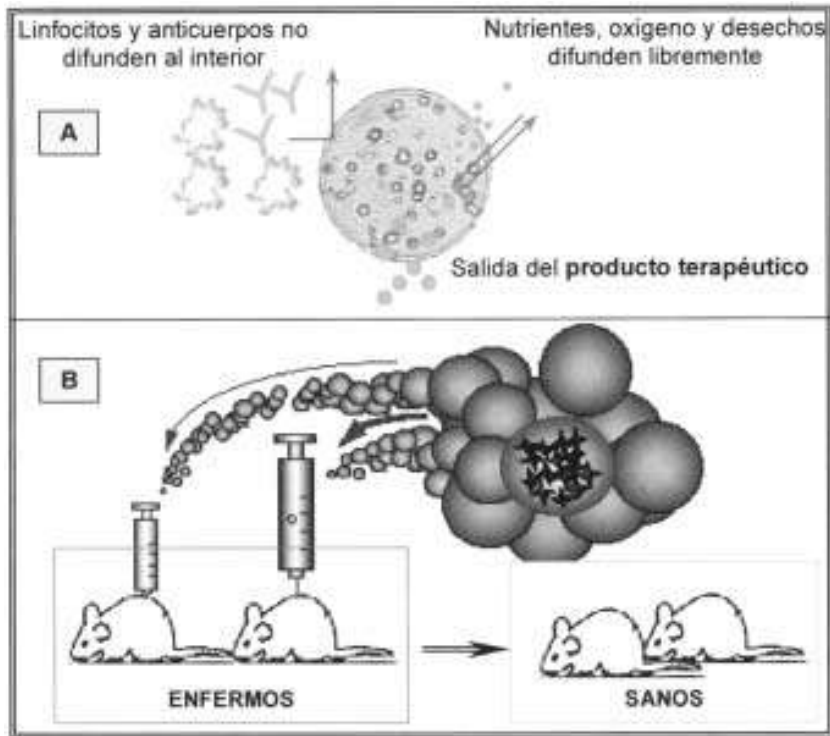
conceptos y pilares centrales de esta estrategia, así como valorar los posibles requerimientos previos a su aplicación clínica habitual.

## MICROENCAPSULACIÓN CELULAR

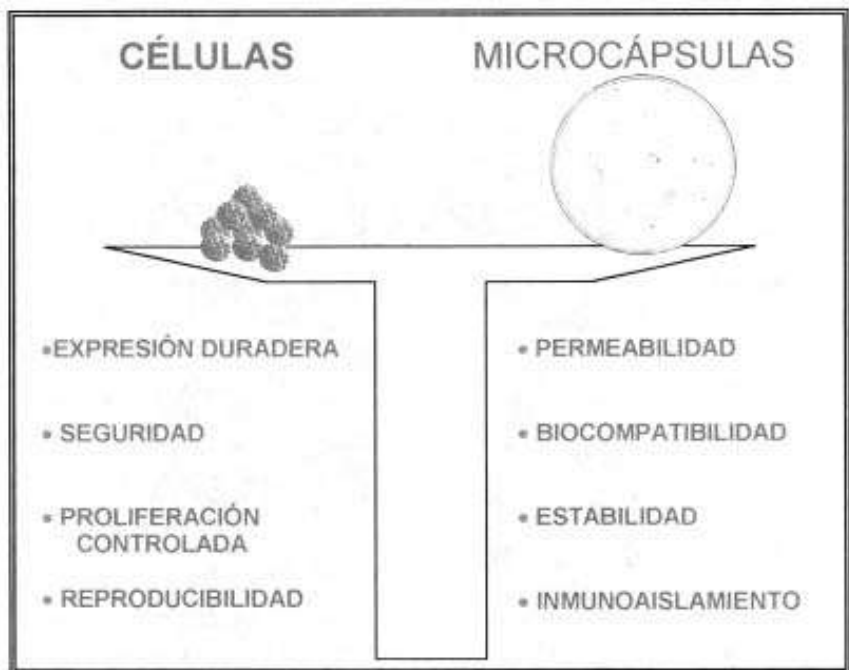
### CONCEPTOS GENERALES

Cuando se microencapsulan células, éstas quedan inmovilizadas en esferas no tóxicas que facilitan la entrada de nutrientes y oxígeno, la salida de desechos y productos terapéuticos y la protección frente a componentes de la respuesta inmune, dando lugar a un sistema farmacéutico de liberación controlada (2,3) (Véase figura 1). La microencapsulación celular requiere la perfecta simbiosis entre células y microcápsulas, de modo que una correcta combinación genera ventajas fundamentales respecto al empleo de cada una de ellos por separado. Por una parte, las células quedan resguardadas de la respuesta inmune gracias a la microcápsula y por otro lado el sistema farmacéutico se hace más duradero y eficaz al emplear células y no péptidos, ya que la célula produce de modo indefinido el producto terapéutico y además éste se produce *de novo*, es decir, en cada instante, evitando posibles alteraciones físico-químicas del mismo.

Consecuentemente, células y microcápsulas conforman los pilares centrales de esta estrategia, cuyo futuro desarrollo clínico dependerá del avance conjunto de cada uno de ellos (Véase figura 2). Supondría un gran error combinar un desarrollo biológico y genético potente con una tecnología farmacéutica precaria y viceversa. En la actualidad destaca el gran esfuerzo que muchos grupos de investigación destinan a uno u otro campo, pero por desgracia pocos son los centros que conciben el progreso paralelo como clave del éxito.



**Figura 1.** A) Función inmunoaislante de la microcápsula. Nutrientes, oxígeno, desechos celulares y productos terapéuticos difunden libremente mientras que se impide la entrada a componentes de la respuesta inmune. B) Las células microencapsuladas pueden implantarse en huéspedes enfermos y revertir su patología gracias a la secreción del producto terapéutico a largo plazo.



**Figura 2.** Propiedades a estudiar y perfeccionar de las células y microcápsulas.

## **PILARES DE LA MICROENCAPSULACIÓN CELULAR**

**MICROCÁPSULA:** La microcápsula es un sistema de inmovilización de forma esférica constituido por polímeros naturales o sintéticos y destinado a albergar y proteger agentes biológicos en su interior. Existe un gran número de polímeros (4) y técnicas de microencapsulación (5) cuyo objetivo es generar cápsulas uniformes de tamaño micrométrico y gran esfericidad. De hecho, una alta relación superficie-volumen favorece la difusión de nutrientes y oxígeno y con ello una mayor viabilidad celular. Paralelamente, toda microcápsula debe ser rodeada por una membrana semipermeable que permita el flujo bidireccional de las moléculas más pequeñas pero impida la entrada de aquellas con pesos moleculares superiores a 100-150 kDa (6). Este equilibrio entre la libre difusión y el inmunoaislamiento es prioritario en el diseño tecnológico de la microcápsula.

Otro aspecto necesario es la biocompatibilidad de la microcápsula (7,8) y de los materiales que la conforman (9), de modo que se evite o se reduzca al máximo tanto la activación de la respuesta inmune y el desarrollo de reacciones fibróticas como el posible daño al material biológico encapsulado. Esto solo puede realizarse a partir del minucioso análisis de los materiales y de las microcápsulas (10). Las cápsulas deben tener una biodegradabilidad controlada que permita la absorción de los implantes una vez que las células mueran o sean funcionalmente inactivas (11) y una estabilidad mecánica suficiente para soportar su manipulación y posterior implante en el huésped (12). La resistencia es probablemente una de las variables de mayor importancia y a la que menos dedicación se le otorga. Debido a que la presión que sufren las microcápsulas se incrementa en proporción al tamaño del huésped, cápsulas inestables en murinos no tienen aplicabilidad posible en huéspedes superiores.

Las directrices futuras exigen la búsqueda de nuevos materiales, o en todo caso policonjugados que generen membranas externas más resistentes que la poli-L-lisina (policonjugado ampliamente utilizado en la elaboración de la membrana de la microcápsula) y con un menor coste. Teniendo en cuenta que la producción a gran escala resultará necesaria, el abaratamiento de costes derivados tanto de la técnica de microencapsulación como de las materias primas empleadas será fundamental para la futura comercialización del sistema farmacéutico. Paralelamente, el almacenamiento y distribución del producto, así como su garantía de calidad deberán ser objeto de un estudio profundo.

**CÉLULAS:** El número de tipos celulares disponibles para la microencapsulación es tan amplio como las aplicaciones terapéuticas que nos podamos proponer. Hasta los años 80, las células de elección eran las primarias postmitóticas, tanto alogénicas como xenogénicas. Las células primarias secretan el producto terapéutico de interés de forma natural y su producción se regula en función de las necesidades orgánicas, es el caso de los islotes de Langerhans secretores de insulina (13-18), células cromafines productoras de factores neurotróficos (19) y sustancias de gran actividad analgésica (20,21) o células paratiroides secretores de parathormona (22). Este tipo de células resultan interesantes en estudios básicos en huéspedes de pequeño tamaño, pero obtener las cantidades necesarias para animales de mayor tamaño (incluido el hombre) resulta problemático. Además, la viabilidad a largo plazo de estas células es reducida ya que su capacidad proliferativa es limitada, al igual que su margen de seguridad.

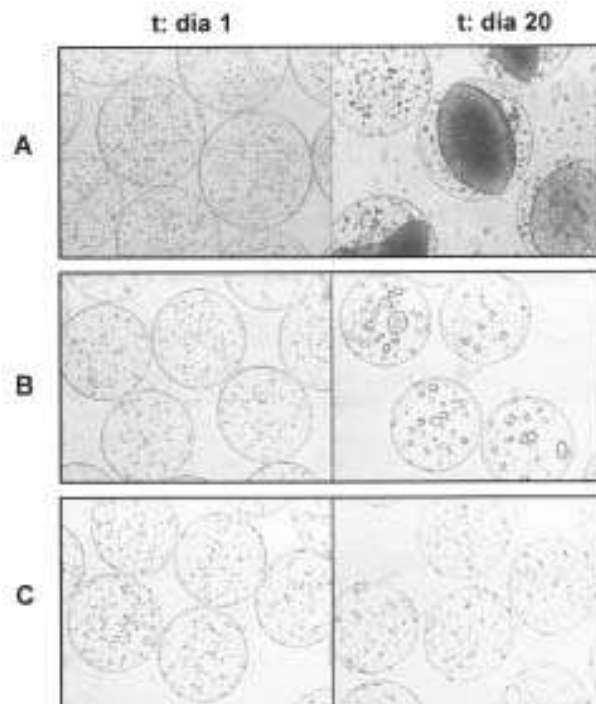
A principios de los 90, las células inmortales adquieren protagonismo gracias a su capacidad secretora indefinida y a su facilidad de cultivo *in vitro*. Las células PC-12 procedentes de tumores murinos adrenales y secretores de dopamina o los hibridomas secretores de anticuerpos son microencapsulados y destinados a ob-

jetivos tan diversos como el tratamiento del Parkinson (23,24) o la inhibición de la angiogénesis tumoral (25,26). No obstante, la ventaja que supone la división celular indefinida resulta un obstáculo insalvable al inmovilizar las células, ya que éstas sobresalen de la microcápsula e incluso llegan a destruirla aumentando el riesgo de un tumor en el huésped.

Este conjunto de hechos ha propiciado la aparición de células universales que pueden ser manipuladas genéticamente para que produzcan diversas enzimas o péptidos (27). De este modo, un mismo tipo celular puede secretar productos diferentes tan solo variando el gen con el que es transfectado. La aparición de fibroblastos (28,29) y mioblastos (30) abre las puertas a una estrategia de microencapsulación celular caracterizada por una mayor seguridad, por la facilidad del cultivo celular y por la producción durante largos periodos de tiempo. Por lo tanto cada variante celular se comporta de diferente modo una vez microencapsulada. Tal y como se muestra en la figura 3, mientras los

hibridomas forman agregados de gran densidad celular que inducen situaciones hipóxicas, los fibroblastos generan agregados de menor tamaño pero capaces de romper las microcápsulas y crear tumores en los animales experimentales. Los mioblastos en cambio, no forman agregados y lo que aún es más importante, se diferencian a otro tipo celular que carece de capacidad proliferativa, manteniéndose constante el número de células inmovilizadas.

De forma ideal, las células a microencapsular deberán presentar: i) alta capacidad proliferativa en cultivo, pero reducida o nula una vez inmovilizadas, ii) viabilidad prolongada en el interior de las microcápsulas, iii) elevada secreción del producto terapéutico tanto *in vitro* como *in vivo*, iv) alto margen de seguridad y reproducibilidad y v) producción sometida a regulación orgánica y externa. Si bien esta situación ideal se antoja compleja, la seguridad en primer lugar y la efectividad en segundo, deberán ser totalmente contrastadas previamente a su uso clínico habitual.



**Figura 3.** Estudio comparativo del comportamiento de tres líneas celulares una vez microencapsuladas. A) células de hibridoma 1B5 (referencias 25 y 26), B) fibroblastos BHK y C) mioblastos C2C12.

## PERSPECTIVAS

El reducido número de ensayos clínicos con células microencapsuladas en relación a otras estrategias de terapia génica, refleja la necesidad de un mayor esfuerzo para superar ciertas limitaciones actuales, fundamentalmente relacionadas con la seguridad de las células y la estabilidad de las microcápsulas. Asimismo, la capacidad de expresión de células modificadas genéticamente ha de multiplicarse sustancialmente, de modo que el número total de cápsulas implantadas pueda reducirse al máximo. Esta expresión debe ser regulable para que la secreción del producto sea continua o pulsátil, adaptándose a las necesidades fisiológicas del producto terapéutico en cuestión. Por otra parte, con el objetivo de aumentar la seguridad, las células encapsuladas deberán tener una vida limitada que asegure una acción terapéutica más prolongada que la mera encapsulación del péptido, pero que evite cual-

quier situación fisiopatológica en caso de que las células escapen a la protección de la microcápsula. De ahí que el desarrollo paralelo de la genética y la tecnología farmacéutica se antojen indispensables para el futuro éxito de las técnicas de inmovilización (31).

A pesar del camino que queda por recorrer, lo cierto es que los trabajos científicos más recientes vislumbran resultados cada vez más prometedores, mayor grado de seguridad y un mayor abanico de aplicaciones terapéuticas a las que la estrategia de células microencapsuladas puede hacer frente (Véase tabla 1). Todo hace pensar que el siglo que comenzamos va a ser, desde un punto de vista médico el de la terapia génica, un siglo en el que el páncreas, el riñón o el hígado artificial pueden hacerse realidad y en el que se desarrollen medicamentos inteligentes que se adapten a las necesidades puntuales de cada enfermo.

**Tabla 1.** Ejemplos de trabajos científicos relevantes sobre microencapsulación celular en los últimos 2 años.

Línea celular	Tipo de microcápsula	Objetivo	Referencia
Fibroblastos BHK	Alginato-PLL-alginato	Cáncer	32
Células de riñón 293	Alginato	Cáncer	33
Mioblastos primarios	Alginato-PLL-alginato	Angiogénesis	34
Mioblastos C2C12	Alginato-PLL-alginato	Hemofilia	35
Mioblastos C2C12	Alginato-PLL-alginato	Hemofilia	36
Células MDCK	Alginato-PLL-alginato	Enanismo	37
Fibroblastos 2A50	Alginato-PLL-alginato	Mucopolisacaridosis	38
Fibroblastos de rata	Alginato-PLL-alginato	Daños medulares	39
Células cromafines	Alginato-PLL-alginato	Parkinson	40

## CONCLUSIONES

La medicina del siglo XXI trata de buscar la curación de las enfermedades actuales mediante nuevas estrategias biotecnológicas que permitan la corrección o sustitución de órganos y tejidos dañados de un modo más eficaz y más cómodo para el paciente. La microencapsulación de células es una de estas estrategias dirigida a la liberación controlada, constante y autoregulada de péptidos y proteínas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades crónicas.

El progreso que se está llevando a cabo en este campo, augura importantes éxitos a esta tecnología siempre y cuando la evolución y desarrollo del continente (microcápsula) y contenido (líneas celulares) se haga de forma paralela. Este artículo viene a plasmar el convencimiento

de diversos autores expertos en la materia, de que la tecnología farmacéutica en su empeño por mejorar la resistencia, biocompatibilidad y diseño de las microcápsulas, y la biología celular y genética en su esfuerzo por aplicar nuevas líneas celulares y mejorar los procesos de transfección genética, deben caminar de la mano con el fin de que la tecnología de células microencapsuladas pueda convertirse a corto plazo en una realidad clínica.

En resumen, nosotros nos sumamos al pensamiento de muchos investigadores (11) que pronostican que durante el próximo cuarto de siglo, la terapia con células microencapsuladas emergerá de sus etapas de investigación básica para desarrollar un papel determinante en el tratamiento de las enfermedades más preocupantes de la humanidad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chang, TMS. Semipermeable microcapsules. *Science*. Vol. 46, 524, 1964.
2. Chang PL. Microencapsulation, an alternative approach to gene therapy. *Transfus Sci*. Vol. 17 (1), 35-43, 1996.
3. Chang PL, Raamsdonk MV, Hortelano G, Barsoum SC, MacDonald NC and Stockley TL. The in vivo delivery of heterologous proteins by microencapsulated recombinant cells. *Tibtech*. Vol. 17, 78-83, 1999.
4. Gerbsch N and Buchholz R. New processes and actual trends in biotechnology. *FEMS Microb Rev*. Vol. 16, 259-268, 1995.
5. Orive G, Hernández RM., Gascón AR., Igartua M, Rojas A y Pedraz JL. Métodos de encapsulación para la inmovilización de agentes biológicos. *Industria Farmacéutica* Vol. 94, 93-97, 2001.
6. Okhamafé AO and Goosen MFA. Cell encapsulation technology and therapeutics. Kühnreiber WM, Lanza RP, Chick WL, editors. Birkhäuser Boston, 1999; pag. 53-62.
7. Van Schilfgaarde R and De Vos P. Factors influencing the properties and performance of microcapsules for immunoprotection of pancreatic islets. *J Mol Med*. Vol. 77, 199-205, 1999.
8. Rihova B., Immunocompatibility and biocompatibility of cell delivery systems. *Adv Drug Del Rev*. Vol. 42, 65-80, 2000.
9. Li RH. Materials for immunoisolated cell transplantation. *Adv Drug Del Rev*. Vol. 33, 87-109, 1998.
10. Orive G, Ponce S, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M y Pedraz JL. Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials* (aceptado para publicación, 2002).
11. Lysaght MJ and Aebischer P. Encapsulated cells as therapy. *Scientific American*. April, 76-82, 1999.
12. Raamsdonk JMV and Chang PL. Osmotic pressure test: a simple, quantitative method to assess the mechanical stability of alginate microcapsules. *J Biomed Mater Res*. Vol. 54, 264-271, 2001.
13. Lanza RP, Ecker D, Kühnreiberb WM, Staruk JE, Marsh J and Chick WL. A simple method for transplanting discordant islets into rats using alginate gel spheres. *Transplant*. Vol. 59, 1485-1487, 1995.
14. Lanza RP, Kühnreiberb WM, Ecker D, Staruk JE and Chick WL. Xenotransplantation of porcine and bovine islets without immunosuppression using uncoated alginate microspheres. *Transplant*. Vol. 59, 1377-1384, 1995.
15. Kühnreiberb WM, Lanza RP and Chick WL. Cell encapsulation technology and therapeutics. Kühnreiber WM, Lanza RP, Chick WL, editors. Birkhäuser Boston, 1999; pag. 217-228.

16. Lanza RP and Chick WL. Yearbook of cell and tissue transplantation. Lanza RP and Chick WL editors. Dordrecht, The Netherlands. 1996/97; pag. 253-264.
17. Lanza RP, Ecker D, Kühtreiberb WM, Marsh JP, Ringeling J and Chick WL. Transplantation of islets using microencapsulation: Studies in diabetic rodents and dogs. *J Mol Med.* Vol. 77, 206-210, 1999.
18. Soon-Shiong P, Feldman E., Nelson R., Heintz R., Yao Q. and Yao Z. Long-term reversal of diabetes by injection of immunoprotected islet cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* Vol. 90, 5843-5847, 1993.
19. Unsicker K. The trophic cocktail made by adrenal chromaffin cells. *Exp Neurol.* Vol. 123, 167-173, 1993.
20. Livett BG, Dean DM, Whelan LG, Udenfriend S and Rossier J. Co-release of enkephalin and catecholamines from cultured adrenal chromaffin cells. *Nature.* Vol. 289, 317, 1981.
21. Verhofstad AA, Coupland RE and Colenbrander B. Immunohistochemical and biochemical analysis of the development of the noradrenaline- and adrenaline- storing cells in the adrenal medulla of the rat and pig. *Arch Hist Cyt.* Vol 52, 351-360, 1989.
22. Hasse C, Klock G, Schlosser A, Zimmermann U and Rothmund M. Parathyroid allotransplantation without immunosuppression. *Lancet* Vol. 351, 1296-1297, 1997.
23. Kordower JH, Liu YT, Winn S and Emerich DF. Encapsulated PC12 cell transplants into hemiparkinsonian monkeys: a behavioral, neuroanatomical, and neurochemical analysis. *Cell transplant.* Vol. 4 (2), 155-171, 1995.
24. Emerich DF, Winn SR and Lindner MD. Continued presence of intraestriatal but not intraventricular polymer-encapsulated PC12 cells is required for alleviation of behavioral deficits in Parkinsonian rodents. *Cell transplant.* Vol. 5 (5), 589-596, 1996.
25. Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M, Rojas A y Pedraz JL Optimización del proceso de microencapsulación de un hibridoma productor de anticuerpo anticaderina-VE. *Industria Farmacéutica.* Vol. 3, 89-92, 2000.
26. Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M, Rojas A y Pedraz JL. Microencapsulation of an anti VE-cadherin antibody secreting 1B5 hybridoma cells. *Biotechnology Bioengineering* Vol. 76, 285-294, 2001.
27. Chang PL and Bowie KM. Development of engineered cells for implantation in gene therapy. *Adv Drug Del Rev.* Vol. 33, 31-43, 1998.
28. Dhawan J, Pan LC, Pavlath GK, Travis MA, Lanctot AM and Blau HM. Systemic delivery of human growth hormone by injection of genetically engineered myoblast. *Science.* Vol. 254, 1509-1512, 1991.
29. Maysinger D, Piccardo P, Filipovic-Grcic J and Cuello AC. Microencapsulation of genetically engineered fibroblast secreting nerve growth factor. *Neurochem Int.* Vol. 23 (2), 123-129, 1993.
30. Barr E and Leiden JM. Systemic delivery of recombinant proteins by genetically modified myoblast. *Science* Vol 254, 1507-1509, 1991.
31. Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M, Rojas A y Pedraz JL. Clasificación de los sistemas de inmovilización de agentes biológicos. *Industria Farmacéutica.* Vol 93, 67-71, 2001.
32. Joki T, Machluf M, Atala A, Zhu J and col. Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. *Nat Biotech.* Vol 19, 35-39, 2001.
33. Read TA, Sorensen DR, Mahesparan and col. Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. *Nat Biotech.* Vol 19, 29-34, 2001.
34. Springer ML, Hortelano G, Bouley DM, Wong J, Kraft PE and Blau HM. induction of angiogenesis by implantation of encapsulated primary myoblast expressing vascular endothelial growth factor. *Journal of Gene Med.* Vol 2, 279-288, 2000.
35. Hortelano G, Xu N, Vanderberg A, Solera J, Chang PL and Ofosu FA. Persistent delivery of factor IX in mice: gene therapy for hemophilia using implantable microcapsules. *Hum Gene Ther.* Vol 10, 1281-1288, 1999.
36. Hortelano G, Wang L and Ofosu FA. Sustained and therapeutic delivery of factor IX in nude haemophilia B mice by encapsulated C2C12 myoblast: concurrent tumourigenesis. *Haemophilia.* Vol 7, 207-214, 2000.
37. Stockley TC, Robinson KE, Delaney K, Ofosu FA and Chang PL. Delivery of recombinant product from subcutaneous implants of encapsulated recombinant cells in canines. *J Lab Clin Med.* Vol 135, 484-492, 2000.
38. Ross CJD, Bastedo L, Maier SA, Sands MS and Chang PL. Treatment of a lysosomal storage disease, mucopolysaccharidosis VII, with microencapsulated recombinant cells. *Hum Gene Ther.* Vol 11, 2117-2127, 2000.
39. Tobias CA, Dhoot NO, Wheatley MA, Tessler A, Murray M and Fischer I. Grafting of encapsulated BDNF-producing fibroblast into the injured spinal cord without immune suppression in adults rats, *J Neuro.* Vol 18 (3), 287-301, 2001.
40. Xue Y, Gao J, Xi Z, Wang Z and col. Microencapsulated bovine chromaffin cell xenografts into hemiparkinsonian rats: a drug induced rotational behaviour and histological changes analysis. *Art Organs.* Vol 25 (2), 131-135, 2001.

*Recibido: Noviembre 21 de 2002*

*Aceptado: Febrero 26 de 2002*