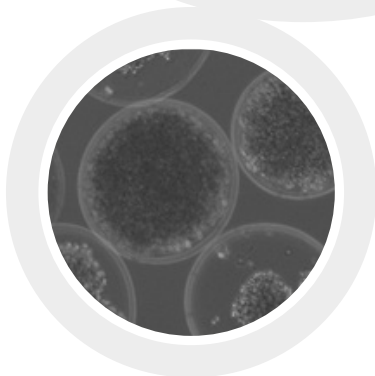
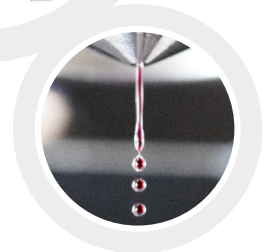
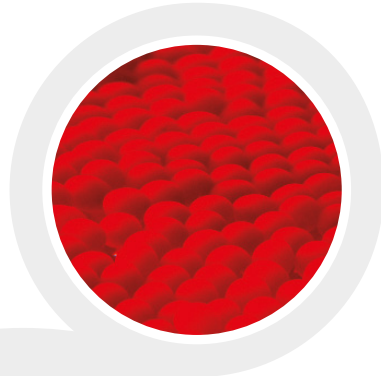




## best@buchi no. 68

# Encapsulamiento de Células para Aplicaciones Biotecnológicas

Autores: Whelehan M., Rütli D., John P. & Plüss R. | BÜCHI Labortechnik AG, CH-9230 Flawil



## Introducción

Por más de 50 años el encapsulamiento de enzimas, sabores, API's, químicos, cosméticos, ingredientes alimenticios, bioactivos y diferentes materiales en esferas y cápsulas, ha encontrado una miríada de aplicaciones exitosas en diferentes industrias [1]. Recientemente la tecnología, en forma de encapsulamiento de células, ha sido aplicada en el sector médico donde ha sido usada para ayudar a los científicos en el desarrollo de nuevos tratamientos para diversas enfermedades [2]. Se ha visto una nueva aplicación de la tecnología en la industria del Bioprocusamiento. Dentro de esta industria se ha examinado su potencial para aumentar los rendimientos de producción [3] y reducir significativamente los costos asociados con la producción de proteínas recombinantes utilizadas para el desarrollo de nuevos medicamentos.

### Aplicaciones Médicas

Se puede definir el encapsulamiento de células como el desarrollo de células en membranas porosas o impermeables que permiten una separación física de las células de su entorno inmediato, protegiéndolas así de condiciones desfavorables.

Desde el trabajo pionero desempeñado en 1980 por Lim y Sun [4], se ha ido anticipando que esta tecnología podría ser usada como un medio viable para la generación constante de células artificiales inmunoaisladas para trasplantes humanos y proporcionar una manera continúa de entregar productos terapéuticos al destinatario sin miedo al rechazo o a la necesidad de fármacos inmunosupresores [5]. Esta idea de tratamiento ha recibido un enorme interés por parte de la comunidad médica y ha sido estudiada para el tratamiento de otras enfermedades como: Parkinson, Alzheimer, anemia, hemofilia B y falla de órgano. Ha sido utilizado también para controlar el dolor y para entregar medicamentos de manera efectiva [3,5].

A pesar de la promesa inicial, el encapsulamiento de células aún tiene que alcanzar su máximo potencial y aún se deben abordar varias áreas clave. Sin embargo, en los últimos 2 años algunos avances significativos han sido realizados.

En el 2011, médicos en Londres curaron a un bebé de una infección hepática potencialmente mortal [6],

al encapsular las células hepáticas y subsecuentemente inyectándolas al bebé en el área a tratar. Las células recubiertas le ayudaron a vencer la enfermedad y lograr una completa recuperación sin la necesidad de un trasplante de órgano. Varias otras empresas esperan lograr un progreso similar cuando se utilice el encapsulamiento de células en ensayos clínicos en etapa tardía para el reemplazo de tejidos y la correcta administración de fármacos [7].

### Aplicaciones de Bioprocusamiento

Los altos costos y rendimientos bajos asociados con las operaciones de Bioprocusamiento existentes hacen que el riesgo para el desarrollo de nuevos fármacos recombinantes sea muy alto y con una alta probabilidad a fallar, como resultado se tendría una pérdida substancial para la compañía. Como un posible medio para solucionar este problema, en las últimas dos décadas se ha investigado la encapsulación celular como un medio para lograr la intensificación del Bioproceso y generar una mayor densidad celular y una mayor productividad para los cultivos de células de mamíferos.

El uso (frágil) de las células animal es en la actualidad la única manera de producir proteínas recombinantes altamente glucosiladas, las cuales son necesarias para la producción de fármacos. Las células que son utilizadas para producir estas proteínas pueden ser cultivadas usando diferentes tipos de biorreactores tecnológicos [3]. Sin embargo, las bajas densidades celulares que pueden alcanzar muchas de estas técnicas pueden llegar a resultar en una baja concentración de producto, con baja producción y un bajo rendimiento de proteínas recombinantes de alta calidad. Esto aumenta la complejidad para el posterior aislamiento y purificación del bio producto lo que lleva un aumento sustancial en los costos generales de producción.

Para reducir costos y acelerar el proceso de desarrollo dentro de la industria del Bioprocusamiento (para la producción de proteínas recombinantes importantes), se requiere el desarrollo de nuevas (Bioprocusamiento) técnicas de producción intensificadas. Una ruta prometedora para la intensificación de bioprocusos es generar cultivos celulares de alta densidad encapsulando células dentro de una membrana de hidrogel permeable para crear efectivamente sistemas de micro biorreactores con un tamaño definido, forma y propiedades físicas y funcionales (Figura 1).

La membrana permeable permite la difusión bidireccional de pequeñas moléculas como: oxígeno, nutrientes, residuos y las proteínas recombinantes producidas. Lo más importante en la encapsulación celular es proporcionar un entorno libre de esfuerzo y estrés, permitiéndole a las células proliferar de manera libre a altas (intensificadas) concentraciones en comparación con los cultivos de suspensión convencionales. Esto conduce a mayores niveles de producción, así como a una reducción significativa en la complejidad al reducir la cantidad de pasos de procesamiento posteriores necesarios para obtener la pureza requerida del producto. Todas estas ventajas tienen un efecto positivo en todo el proceso económico al reducir de manera significativa los costos.

Diferentes tipos de microcápsulas han sido desarrollados para encapsular cultivos de células animales incluyendo el uso de polímeros como: alginato, agarosa, pectina, quitosano, grenetina y copolímeros de acrilato. De los cuales el más exitoso y común está basado en el sistema de encapsulación del alginato-poli-L-lisina-alginato, desarrollo por Lim y Sun [4].

Esto ayudará a muchos más medicamentos importantes a alcanzar el mercado a una mayor velocidad y más importante, a precios accesibles.

## Técnicas de Producción para Encapsulamiento de Células Animales

Para aplicar satisfactoriamente la microencapsulación celular a las investigaciones médicas y a las aplicaciones clínicas, se necesita una técnica de producción la cual se debe adherir a criterios estrictos. Los cuales incluyen: la habilidad de producir cápsulas pequeñas, mono dispersas, homogéneas y de forma esférica, con una distribución de tamaño estrecho, bajo condiciones ligeras y gentiles, usando un tiempo de producción corto y repetible [1]. Dicha técnica comúnmente expresado como Boquilla de Vibración o Encapsulamiento por Vibración ([www.buchi.com](http://www.buchi.com)), está disponible y puede ser desempeñada por el Encapsulador B-395 Pro (Figura 3) elaborado por BÜCHI Labortechnik AG. Esta técnica de producción a ganado un gran interés por parte de los fabricantes e investigadores científicos durante muchos años debido a su capacidad para producir las cápsulas requeridas con las características deseadas para aplicaciones médicas y de Bioprosesamiento [1]. Adicionalmente la máquina es muy fácil de configurar y operar, tiene costos bajos de operación y puede ser integrado al proceso GMP.

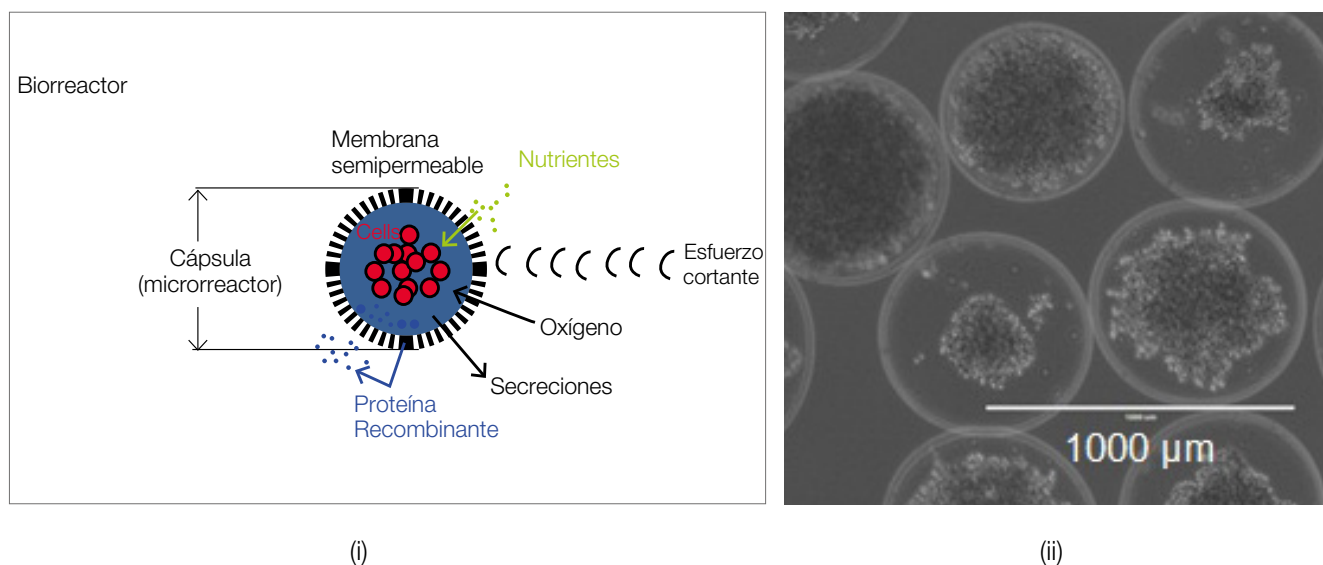


Figura 1: (i) Representación esquemática del sistema de biorreactor micro capsular donde las células son encapsuladas dentro de una membrana semi permeable para protegerla de las influencias del ambiente (ii) Proliferación de ovario de hámster chino (CHO) células a altas densidades celulares dentro de microcápsulas de tamaño 750 µm después de 192 horas en cultivo [experimento realizado por BÜCHI Labortechnik AG]¹.

Por estas razones es una de las técnicas más empleadas y exitosas para producir microcápsulas que contienen células; por ejemplo, un modelo precursor del Encapsulador B-395 Pro fue empleado para encapsular células hepáticas para ayudar a un bebé en Londres a superar una enfermedad hepática potencialmente mortal [6].

La microencapsulación sigue siendo una herramienta extremadamente emocionante para la producción de tejidos artificiales y cultivos de alta densidad, tanto para aplicaciones médicas como de Bioprocesamiento.

Tiene la posibilidad de mejorar la forma en que los médicos y científicos traten efectivamente o desarrollen nuevos tratamientos para muchas enfermedades de alto impacto social (diabetes, Parkinsons, etc.) Si bien varios desafíos importantes aún enfrentan la tecnología, desarrollos recientes en aplicaciones médicas como los trasplantes humanos y empleo en ensayos clínicos muestran que la metodología tiene un futuro brillante, no solo desde un punto de vista científico, sino también económico.

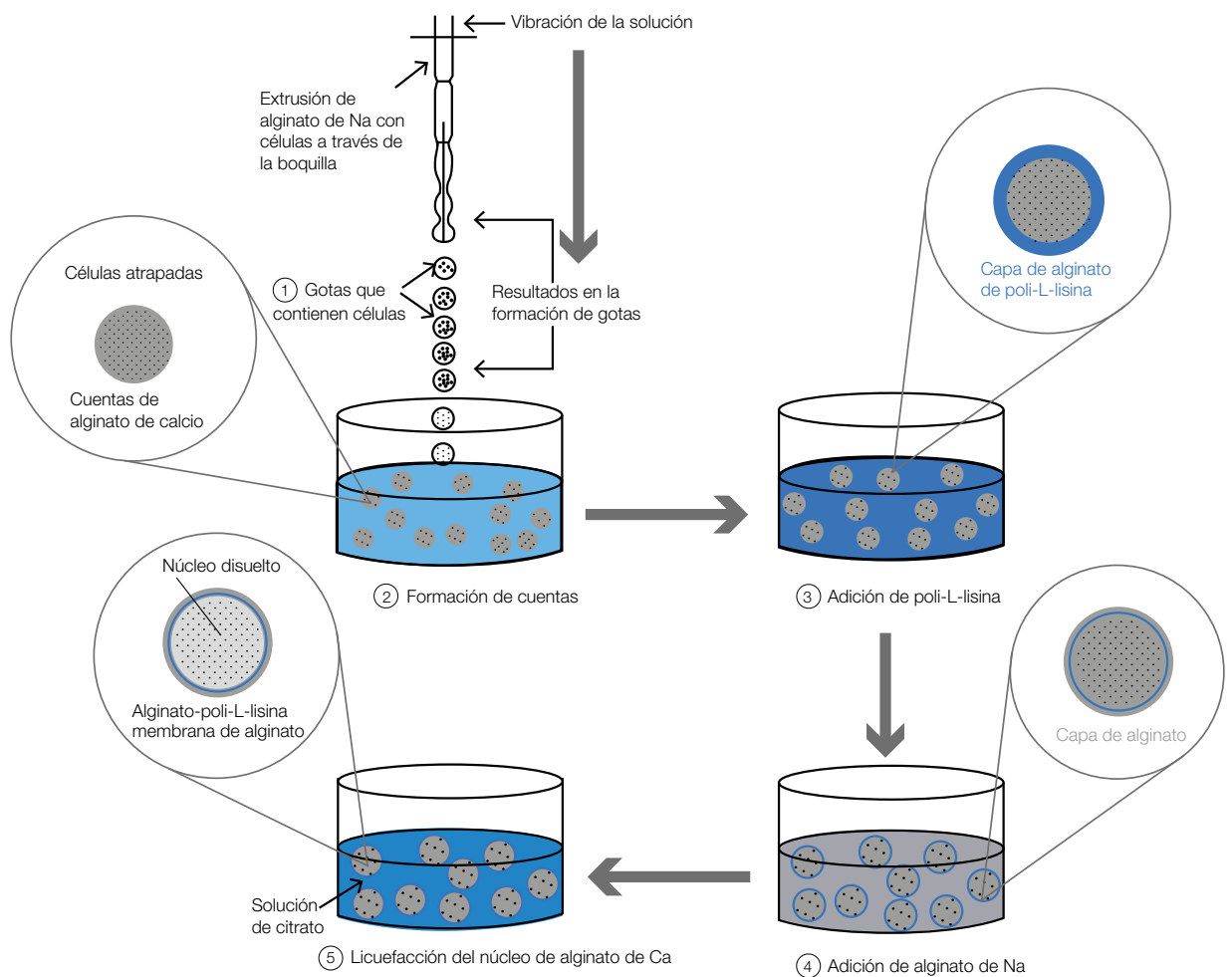


Figura 2: Esquema de los cinco pasos diferentes (etiquetado 1-5) involucrado en el procedimiento para encapsular células en el sistema de membrana de alginato-poli-L-alginato.

## Sistema de Encapsulación de Célula Alginato-Poli-L-Lisina-Alginato

El sistema de membrana alginato-poli-L-lisina-alginato para encapsular células (animal) fue descrito por primera vez en el trabajo pionero de Lim y Sun en 1980 [4], y sigue siendo la técnica más usada para encapsular células animales dentro de una membrana polimérica. El artículo científico que acompañó el trabajo ha sido citado más de 1200 veces en la literatura científica. El procedimiento está dividido en cinco pasos críticos los cuales se muestran de manera esquemática en la Figura 2.

Paso 1: El primer paso dentro del proceso es la formación de gotas homogéneas de alginato de Sodio que contienen las células a encapsular. Las células que contienen gotas son usualmente producidas por técnicas de producción suave como el “Encapsulamiento por Vibración” según lo realizado por el Encapsulador BUCHI B-395 Pro. En esta técnica la solución de alginato que contiene la mezcla celular es extruido a través de la boquilla (de tamaño controlable) y forma un chorro de líquido que se divide en gotas usando frecuencias vibratorias. Esta técnica simple y gentil permite la formación de gotas sin dañar las células.

Paso 2: En este paso las gotas de alginato de sodio producidas en el paso 1 son solidificadas (gelificadas) en esferas homogéneas que atrapan las células. Esto generalmente se realiza colocando la gota en una solución gelificante que contiene un catión divalente como  $\text{CaCl}_2$ . Al obtener la solución endurecida, los cationes de calcio reemplazan de manera inmediata los contraiones de sodio y enlazan las esferas de alginato para formar una estructura de hidrogel apretada (cuentall) la cual atrapa las células dentro. Las gotas pueden endurecerse por un periodo específico de tiempo para asegurar la completa gelificación en toda la cuenta. Este tiempo depende principalmente del tamaño de la gota, las gotas más grandes requieren más tiempo para endurecerse completamente. La variación puede llegar a ser minutos.

Paso 3: El tercer paso incluye el recubrimiento de la superficie externa de la cuenta de alginato de sodio por una capa de polímero de poli-L-lisina, la cual forma una membrana delgada alrededor de la cuenta de alginato de sodio. Esto se logra al incubar las esferas en una solución de poli-L-lisina.

Los grupos amino cargados positivamente de la poli-L-lisina reaccionan con los grupos carboxilo libres de alginato (no unidos previamente a iones de calcio) y forman una membrana exterior rígida. El grosor de la membrana depende del tiempo de incubación, así como de la concentración y tamaño de las partículas de poli-L-lisina, con partículas más pequeñas que pueden difundirse aún más en la gota de alginato de Ca y formar una membrana más gruesa. Después de alcanzar el grosor de membrana deseado, las esferas son retiradas de la solución, lavadas con una solución salina para detener la reacción. .

Paso: En el paso 4 las cápsulas son incubadas en una solución diluida de alginato de Na. Esto da como resultado que los iones de alginato se combinen con la poli-L-lisina sin reaccionar en la superficie de la membrana, lo cual causa la formación de una segunda membrana delgada en el exterior de la estructura de la cápsula. Este tratamiento neutraliza los iones sin reacción de poli-L-lisina cargados positivamente en la membrana, así generando una superficie cargada negativamente (a partir de los iones sin reacción de alginato) y reduciendo la unión de las células al exterior de la membrana de alginato-poli-L-lisina. Debido a su (nueva) composición, la estructura ahora se conoce como cápsula.

Paso 5: Después de la adición de la capa externa de alginato, la cápsula ahora consiste en un núcleo rígido que consiste en esferas fuertemente ramificadas de alginato de Ca. Este alginato de calcio puede inhibir el crecimiento de las células y debe licuarse para dejar espacio para que las células crezcan.

Esto se logra al incubar las cápsulas en un citrato o en una solución de calcio quelante la cual causa el retiro de los iones de calcio del alginato, y son reemplazados por los contra iones del agente quelante ( $\text{Na}^+$ ). Esto resulta en un núcleo licuado que consiste en alginato de Na re solubilizado dentro de la membrana de alginato-poli-L-lisina-alginato (Nota: El paso de citrato no afecta la estructura integral del caparazón de alginato-poli-L-lisina-alginato). Grandes cantidades del alginato solubilizado permanecen atrapadas dentro del núcleo, puesto que son muy grandes para difundirse a través de la membrana. Después de la disolución del núcleo, las cápsulas son retiradas de la solución quelante y lavadas en una solución salina, posteriormente son agregadas a los medios apropiados para permitir el crecimiento celular. Debido a la naturaleza porosa de la membrana de la cápsula, los nutrientes y el oxígeno pueden difundirse dentro mientras que los desechos celulares y los subproductos pueden difundirse hacia afuera. La tasa de difusión depende principalmente del tamaño de la cápsula, las cápsulas pequeñas permiten una mayor tasa.

## Protocolo de Laboratorio para el Encapsulamiento de Células Animales dentro de una membrana de Alginato-Poli-L-Lisina-Alginato

El procedimiento es una adaptación de la técnica de encapsulación desarrollado por Lim y Sun [4] y describirá el encapsulamiento de células animales en microcápsulas de alginato-poli-L-lisina-alginato, el cual es ejecutado por el Encapsulador B-395 Pro de BUCHI al usar la técnica de encapsulamiento por vibración. El Encapsulador funciona mediante el uso de frecuencias vibratorias para romper un chorro de líquido laminar en gotas de igual tamaño, las cuales son transformadas de manera subsecuente en esferas a través de una técnica de solidificación (adicionalmente a  $\text{CaCl}_2$ ). La configuración del Encapsulador B-395 Pro de BUCHI permite la adición y el retiro de líquidos que son necesarios para la formación de la membrana alginato-poli-L-lisina, todos los pasos del proceso pueden ser realizados bajo condiciones completamente estériles. El proceso puede ser usado para encapsular la mayoría de los tipos de células (incluyendo animal y células madre) debido al esfuerzo mínimo ejercido sobre las células durante el proceso de encapsulación. La técnica reproducible y escalable puede ser integrada al proceso GMP. Para más información en la operación y aplicaciones de los Encapsuladores de BUCHI favor de ver la Guía de Encapsulador para Laboratorios de BUCHI ([www.buchi.com](http://www.buchi.com)).



Figura 3: . La configuración estándar del Encapsulador B-395 de BUCHI con recipiente de reacción de vidrio en su lugar.

## Equipo de Encapsulamiento

El Encapsulador modelo b-395 Pro de BUCHI con recipiente de reacción de vidrio (Figura 3) es usada para encapsular células. El recipiente de reacción se ajusta y encierra completamente la unidad de producción de microesferas, lo cual permite tener condiciones completamente estériles. El recipiente de reacción puede ser esterilizado a vapor, así como las otras partes que entran en contacto con las células y las soluciones usadas para producir las esferas y las cápsulas. Para la solución de polímeros de alginato se recomienda usar una solución filtrada de alginato de Na purificada y estéril (Figura 4) suministrada por BUCHI III. La solución ha sido pretratada y probada para permitir la producción de esferas y cápsulas de alta calidad para el encapsulamiento de diferentes tipos de células.



Figura 4: Solución filtrada de alginato de NA 1.8% (w/v) para encapsulamiento de células. Detalles: Isotonicidad: 300-330 mOsm. pH valor: 7.0 – 7.4. Viscosidad: 90 – 160 mPas.

## Soluciones:

Las siguientes soluciones en volúmenes específicos son necesarios para producir 12 mL de microcápsulas de alginato-poli-L-lisina-alginato que contienen células animales en una concentración de 106 células/mL. Se presenta, también una pequeña descripción de los usos de cada solución. Todos los productos químicos se obtuvieron de Sigma al menos que se indique lo contrario.

### 1. MOPS (lavado) buffer

· 10 mM MOPS (Ácido morfolinopropanosulfónico)

· 0.85 % (w/v) NaCl

· Ajustar pH a 7.4 a temperatura ambiente.

La solución MOPS es usada para lavar las cápsulas después de la producción para quitar componentes no activos. La solución también ayuda a mantener las condiciones fisiológicas.

### 2. Solución BUCHI de alginato de Na.

· 1.8 % (w/v) Solución estéril y filtrada de alginato de Na

· pH 7.0 - 7.4 a temperatura ambiente

El alginato de Na es mezclado con las células y se produce esferas de alginato de Ca que encapsulan a las células.

### 3. Solución solidificante (gelificante)

· 10 mM MOPS

· 100 mM CaCl<sub>2</sub> (dihidrato)

· pH 7.4 a temperatura ambiente

La solución gelificante reacciona con el alginato de Na para formar esferas de alginato de Ca.

### 4. Solución Poli-L-lisina

· 0.05 % (w/v) poli-L-lisina<sup>IV</sup> en solución solidificante.

· La poli-L-lisina cargada positivamente crea una membrana (permeable y estable) en la superficie externa de la esfera producida de alginato de Ca. El grosor de la membrana de poli-L-lisina depende del peso molecular y de la concentración del polímero, así como del tiempo de la reacción (incubación).

### 5. 0.03 % Solución alginato de Na

· 2 mL of 1.8 % de solución de alginato de Na en 118 mL de MOPS buffer

Esta solución es utilizada para formar una capa de alginato alrededor de la cápsula al combinarla con PLL no activo. Como resultado tenemos la neutralización del PLL y se genera una superficie cargada negativamente alrededor de la cápsula y reduce la fijación de las células a la superficie.

### 6. Solución de solubilización central.

· 50 mM Citrato de sodio.

· 0.45 % (w/v) NaCl

· 10 mM MOPS

· pH 7.4 a temperatura ambiente

La solución solubiliza el núcleo de alginato de Ca dentro de la esfera para aportar espacio para el crecimiento celular.

### Volúmenes requeridos

Los siguientes volúmenes son requeridos para producir 12 mLV de microcápsulas de alginato-poli-L-lisina-alginato que contienen células animales en una concentración de 106 células/mL. Nota: Todas las soluciones no estériles son filtradas a través de una membrana de filtro de líquido a 0.2 µm al ser entregadas al recipiente de reacción cerrado, todo esto sucede en la producción de la cápsula para poder mantener las condiciones estériles

12 mL	1.8 % Solución estéril de alginato de BUCHI
120 mL	0.03 % de solución de alginato (no esterilizada).
250 mL	de solución solidificante (no esterilizada).
50 mL	de solución Poli-L-lisina (no esterilizada).
2000 mL	MOPS buffer de lavado (no esterilizado)
5 mL	MOPS buffer <sup>VI</sup> de lavado (esterilizar filtrando a través de un filtro con membrana de 0.22 µm )
200 mL	Solución de solubilización (non-sterile)

Si requiere un mayor volumen de cápsulas favor de incrementar la cantidad de la solución poli-L-lisina de manera apropiada ya que el material de la membrana se consume proporcionalmente a la cantidad de esferas de alginato presentes.

<sup>IV</sup> Poly-L-lysine hydrobromide, MW 30 – 70 kDa. Sigma order no. P2636.

<sup>V</sup> Recommend volume for a single run, however greater volumes can be produced in a single run.

<sup>VI</sup> Used to re-suspend cells – see step 4.

## Procedimiento

1. Prepare el recipiente de reacción como fue descrito en la sección 5.4 del manual de operación de BUCHI (o mostrado en el video de YouTube <sup>vii</sup>) con la boquilla de 300  $\mu\text{m}$  en su lugar y autoclave como se describe en la sección 6.11 y 6.12 del manual.
2. Prepare todas las soluciones y el equipo de laboratorio. Nota: Antes de empezar, se les recomienda a los operadores establecer parámetros óptimos para la producción de esferas en condiciones no estériles, ya sea que la máquina sea operada en modo "abierto" (operando sin el recipiente de reacción). Esto permitirá que se obtengan parámetros óptimos de manera más rápida y reducirá el desperdicio celular. Para más tips en como determinar parámetros óptimos para seleccionar el tamaño de la boquilla, así como otros parámetros, ver la sección 5 (Guía de inicio rápido para el sistema de boquilla simple) de la Guía de laboratorio del Encapsulador.
3. Bombee 200 mL de solución solidificante al envase de reacción usando la botella de presión. La solución solidificante se esteriliza al bombearla a través del filtro de líquido esterilizado en autoclave antes de entrar al envase de reacción.
4. Coloque el envase de reacción debajo de un gabinete de flujo de aire laminar.
5. Prepare un cultivo de células con Ca de  $1 \times 10^6$  células/mL debajo de un gabinete de flujo de aire laminar. Centrifugue las células, decante el sobrenadante y Re suspenda el pellet en 2 mL de MOPS buffer lavable esterilizado. Agregue 10 mL de la solución 1.8% sodio-alginato a las células re suspendidas usando una pipeta esterilizada de 25 mL (Figura 5). La solución se mezcla al ser re aspirada hacia la pipeta de 25 mL dos veces. Asegúrese de que no se introduzcan burbujas de aire durante la Re-suspensión y mezcla.  
Tome una jeringa estéril de 20 mL y colóquela en un tubo de silicona autoclave de 15 cm de largo (diámetro interno de 3 mm). Este tubo será usado para transportar las células de la jeringa, dicho tubo será retirado posteriormente. Rellene la jeringa con la suspensión de células-alginato y adjunte la jeringa a la unidad de producción

- de esferas en el recipiente de reacción, después de quitar el tapón de bloqueo (Figura 6).
- Coloque el envase de reacción a la unidad de control en el Encapsulador, el cual se coloca en el banco (no en el gabinete de flujo laminar).
6. Coloque la copa de derivación directamente debajo de la boquilla para prevenir cualquier derrame de alginato en la solución gelificante.
7. Encienda el agitador magnético.
8. Empiece la formación de esferas con parámetros previamente establecidos. Una vez que una cadena de gotas estable de alginato ha sido establecida retire la copa de derivación de debajo de la boquilla y permita que las gotas caigan en la solución gelificante previamente agitada (Nota: Justo antes de que la solución de alginato sea bombeada a través de la jeringa, coloque la copa de derivación debajo de la boquilla una vez más).
9. Permita que las gotas se endurezcan por 10 minutos en el baño gelificante para así formar esferas de alginato de Ca, posteriormente escurra las esferas de la solución gelificante. Nota: Las esferas y más tarde las cápsulas siempre deberán estar cubiertas por una pequeña cantidad de líquido para evitar la aglomeración, de lo contrario la Re-suspensión de las esferas y las cápsulas puede ser difícil y la membrana podría llegar a dañarse.
10. Bombee 200 mL de MOPS buffer, lave las esferas por 5 minutos y luego escúrralas
11. Bombee 50 mL de solución 0.05% de poli-L-lisina y deje a incubar por 15 minutos.
12. Escurra la solución 0.05% de poli-L-lisina y luego bombee 200 mL de MOPS buffer. Lave las esferas por 5 minutos y luego vuelva a escurrir. Repita este paso de lavado dos veces.
13. Bombee 100 mL de solución 0.03% de alginato y mueva por 5 minutos para permitir la formación de una membrana externa de alginato y posteriormente escurra la solución.

<sup>vii</sup> <http://www.youtube.com/watch?v=BGsvTfLk7hQ>



14. Bombee 200 mL de MOPS buffer, mueva por 1 minuto y posteriormente escurra. Repita el paso de lavado una vez más.

15. Bombee 200 mL de solución solubilización e incube al agitar por 15 minutos aproximadamente para permitir la solubilización del alginato en el núcleo. El tiempo adecuado para solubilizar depende del peso molecular y la pureza del alginato, así como de la susceptibilidad de las células encapsuladas a la solución de disolución.

16. Escurra la solución solubilización y bombee 200 mL de MOPS buffer. Lave las esferas por 5 minutos y escurra. Repita el paso de lavado dos veces más.

17. Bombee el medio de cultivo y drene con las cápsulas en el matraz colector.

18. Transfiera las cápsulas asépticamente en un matraz o en un reactor biológico para permitirles proliferar.

Nota: El alginato disuelto se difunde lentamente. Depende mucho del alginato que se está utilizando, así como del grosor de la membrana de la cápsula. Puede llegar a tomar hasta 2 horas para que cantidades substanciales dejen la cápsula. Para poder maximizar la eliminación del núcleo, puede:

·Extender el tiempo de extracción en MOPS o en el medio de cultivo sin iones bivalentes.

·Cultivar las células en un medio que contenga <50 mg/L de iones de Ca.

·Cultivar las células en un medio con una proporción de iones monovalentes (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) a iones bivalentes (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) entre 20: 1 y 50: 1.



Figura 5: Re-suspensión de células en un buffer.

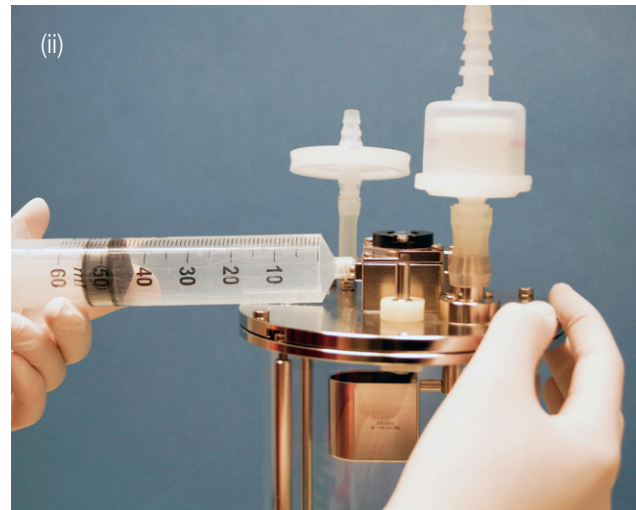


Figura 6: (i) Retirada del tapón ciego luer lock y (ii) fijación de la jeringa a la unidad productora de esferas.



## Encapsulamiento de Células para Aplicaciones Médicas y Bioprocesamiento

Recomendaciones especiales para Células.

Para células divisoras – disuelva el núcleo de alginato, luego mantenga un ratio de Na/Ca > 20:1 en el medio de cultivo para que el núcleo no se vuelva a solidificar al combinarse con los iones divalentes libres.

Para células en reposo- el núcleo de alginato gelificado puede llegar a mantenerse. Adicionalmente puede llegar a usarse el Ba<sup>2+</sup> el cual es un ion gelificante más fuerte comparado al Ca<sup>2+</sup>. El alginato de Ba es extremadamente estable e incluso puede soportar la disolución con una solución de citrato 50 mM durante muchos días.

Guía rápida para Encapsular Células en una Membrana de Alginato-Poli-L-Lisina-Alginato.

Procedimiento	Tiempo (min)
Re suspender las células en 2 mL de MOPS buffer y combinar con 10 mL de alginato de BUCHI.	-
Producir gotas de alginato en el Encapsulador de BUCHI y solidificarlos en 200 mL de solución gelificante.	10
Lavar las esferas en 200 mL de MOPS buffer	5
Incubar las esferas en 50 mL de solución de poli-L-lisina	15
Lavar las esferas con 200 mL de MOPS buffer. Repetir x2.	5 (15 en total)
Incubar las cápsulas en 100 mL de solución 0.03% de alginato.	5
Lavar las cápsulas con 200 mL de MOPS buffer. Repetir x1	1 (2 en total)
Incubar las cápsulas en 200 mL de solución solubilización.	15
Lavar las cápsulas con 200 mL de MOPS buffer. Repetir x2	5 (15 en total)
Adición de medios y cápsulas de recuperación en matraz de recolección.	-

## Resultados

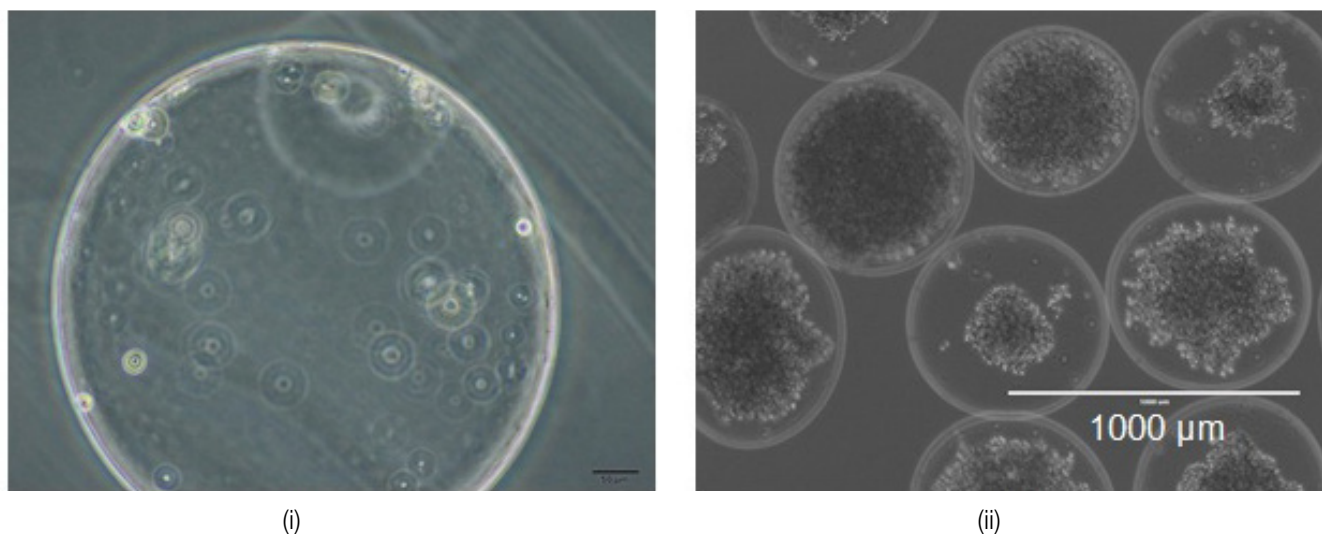


Figura 7: Imagen de microscopio óptico de células CHO encapsuladas en microcápsulas de alginato-poli-L-lisina-alginato utilizando el procedimiento descrito en el Encapsulador B-395 Pro de BUCHI. (i) Cápsulas inmediatamente después de realizar el experimento. (ii) Cápsulas que contienen células (CHO) después de 192 h en cultivo.

## Referencias

- [1] Whelehan et. al., Journal of Microencapsulation. 2011;28:669-688.
- [2] Orive et. al., Trends in Biotechnology. 2004;22:87-92.
- [3] Breguet et. al., Cytotechnology. 2007;53:81-93.
- [4] Lim & Sun, Science. 1980;210:908-909.
- [5] Sakata et. al., W. J. Gastrointes. Pathophy. 2012 ;3:19-26.
- [6] <http://www.bbc.co.uk/news/health-15745948>
- [7] <http://www.stockmarketmediagroup.com/nuvilex-inc-will-enter-phase-iii-trials-with-advantages-using-cell-encapsulation/>

## BUCHI Affiliates:

## Europe

## Switzerland/Austria

**BÜCHI Labortechnik AG**

CH – 9230 Flawil 1  
T +41 71 304 53 03  
F +41 71 304 55 05  
buchi@buchi.com  
www.buchi.com

## Italy

**BUCHI Italia s.r.l.**

IT – 20010 Comaredo (MI)  
T +39 02 834 50 11  
F +39 02 57 51 28 55  
italia@buchi.com  
www.buchi.it

## Benelux

**BÜCHI Labortechnik GmbH**

Branch Office Benelux  
NL – 3342 GT  
T +31 78 694 94 20  
F +31 78 694 94 30  
benelux@buchi.com  
www.buchi.be

## Russia

**BUCHI Russia/CIS**

United Machinery AG  
RU – 127767 Moscow  
T +7 495 35 35 405  
F +7 495 991 05 20  
russia@buchi.com  
www.buchi.ru

## France

**BUCHI Sarl**

FR – 94556 Rungis Cedex  
T +33 1 56 70 52 50  
F +33 1 46 86 00 31  
france@buchi.com  
www.buchi.fr

## United Kingdom

**BUCHI UK Ltd.**

GB – Oldham OL9 9DL  
T +44 161 533 1000  
F +44 161 533 1007  
uk@buchi.com  
www.buchi.co.uk

## Germany

**BÜCHI Labortechnik GmbH**

DE – 45127 Essen  
Freecall 0900 414 0 414 0  
T +49 201 747 490  
F +49 201 747 492 0  
deutschland@buchi.com  
www.buechigmbh.de

## Germany

**BÜCHINIR-Online**

DE – 69190 Walldorf  
T +49 6227 73 25 60  
F +49 6227 73 25 70  
nir-online@buchi.com  
www.nir-online.de

## Asia

## China

**BUCHI China**

CN – 200052 Shanghai  
T +86 21 5260 3366  
F +86 21 5230 8921  
china@buchi.com  
www.buchi.com.cn

## India

**BUCHI India Private Ltd.**

IN – Mumbai 400 055  
T +91 22 657 75400  
F +91 22 657 18095  
india@buchi.com  
www.buchi.in

## Indonesia

**PT. BUCHI Indonesia**

ID – Tangerang 15321  
T +62 21 537 52 15  
F +62 21 537 52 17  
indonesia@buchi.com  
www.buchi.co.id

## Japan

**Nihon BUCHI K.K.**

JP – Tokyo 110-0008  
T +81 3 3621 4777  
F +81 3 3621 4555  
nihon@buchi.com  
www.nihon-buchi.jp

## Korea

**BUCHI Korea Inc**

KR – Seoul 153-782  
T +82 2 6718 7500  
F +82 2 6718 7509  
korea@buchi.com  
www.buchi.kr

## Malaysia

**BUCHI Malaysia Sdn. Bhd.**

MY – 47301 Petaling Jaya,  
Selangor  
T +60 3 7832 0310  
F +60 3 7832 0309  
malaysia@buchi.com  
www.buchi.com

## Singapore

**BUCHI Singapore Pte. Ltd.**

SG – Singapore 609919  
T +65 6555 1175  
F +65 6555 7047  
singapore@buchi.com  
www.buchi.com

## Thailand

**BUCHI (Thailand) Ltd.**

TH – Bangkok 10600  
T +66 2 862 08 51  
F +66 2 862 08 54  
thailand@buchi.com  
www.buchi.co.th

## America

## Brazil

**BUCHI Brasil**

BR – Valinhos SP 13271-200  
T +55 19 3849 1201  
F +55 19 3849 2007  
brasil@buchi.com  
www.buchi.com

## USA/Canada

**BUCHI Corporation**

US – New Castle, DE 19720  
Toll Free: +1 877 662 8244  
T +1 302 662 3000  
F +1 302 662 8777  
us-sales@buchi.com  
www.nybuchi.com

## BUCHI Support Centers:

## South East Asia

**BUCHI (Thailand) Ltd.**

TH-Bangkok 10600  
T +66 2 862 08 51  
F +66 2 862 08 54  
bacc@buchi.com  
www.buchi.com

## Middle East

**BÜCHI Labortechnik AG**

UAE – Dubai  
T +971 4 313 2860  
F +971 4 313 2861  
middleeast@buchi.com  
www.buchi.com

## Latin America

**BUCHI Latinoamérica Ltda.**

BR – Valinhos SP 13271-200  
T +55 19 3849 1201  
F +55 19 3849 2007  
latinoamerica@buchi.com  
www.buchi.com

We are represented by more than 100 distribution partners worldwide.  
Find your local representative at: [www.buchi.com](http://www.buchi.com)