

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**DERIVAÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS - TRONCO EMBRIONÁRIAS EM  
SUBSTRATOS QUIMICAMENTE DEFINIDOS**

Rafael da Rocha Ruggeri

**PORTO ALEGRE  
2014/2**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**DERIVAÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS - TRONCO EMBRIONÁRIAS EM  
SUBSTRATOS QUIMICAMENTE DEFINIDOS**

Rafael da Rocha Ruggeri

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
à Faculdade de Veterinária como requisito  
parcial para a obtenção da Graduação em  
Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Dra. Adriana Bos- Mikich

**PORTO ALEGRE  
2014/2**

### CIP - Catalogação na Publicação

da Rocha Ruggeri, Rafael  
DERIVAÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS - TRONCO  
EMBRIONÁRIAS EM SUBSTRATOS QUIMICAMENTE DEFINIDOS /  
Rafael da Rocha Ruggeri. -- 2014.  
27 f.

Orientadora: Adriana Bos- Mikich.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade  
de Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Porto  
Alegre, BR-RS, 2014.

1. Hidrogéis. 2. Poli (álcool vinílico). 3.  
Células- tronco embrionárias. 4. Bovino. I. Bos-  
Mikich, Adriana, orient. II. Título.

## **DEDICATÓRIA**

A professora Adriana, por ter me acompanhado durante toda minha jornada acadêmica, de quem tive a sorte e privilégio de conviver de perto, partilhando dos desafios que se impuseram e das alegrias, dos quais marcaram minha caminhada e espero poder dividir ainda muitos momentos juntos de aprendizado e amizade.

## RESUMO

Linhagens de células tronco embrionárias para uso em terapia regenerativa devem ser criadas e mantidas sob condições restritas, excluindo o uso de suplementos indefinidos. Duas etapas fundamentais na criação de uma nova linhagem de células tronco embrionárias são a aderência ao substrato exposto e sua derivação até a formação de uma nova colônia primária. Além da possibilidade de emprego em sua espécie, o estudo com células bovinas serve como modelo para produção de células tronco embrionárias humanas, eliminando barreiras éticas e morais para pesquisas com material genético humano. Embriões bovinos foram usados para testar diferentes hidrogéis como substrato para derivação de células- tronco. O polímero sintético PVA, poli (álcool vinílico), foi utilizado para obter hidrogéis funcionalizados com a sequência tetrapeptídica RGDS (arginina-glicina-aspartato-serina) e reticulações com moléculas de ácido cítrico e o ácido 1,2,3,4-butano tetracarboxílico (BTCA). Os substratos foram testados para citotoxicidade celular utilizando células do cumulus (CCs). As CC's demonstraram morfologia celular normal, sem sinais de lise ou degeneração, porém notou-se ausência de proliferação nas amostras com ausência da reticulação com o BTCA. Em um segundo experimento, massas celulares de 20 embriões bovinos foram isoladas e divididas em dois grupos. O primeiro sendo marcado pelo uso de hidrogéis contendo 10% de PVA na sua composição reticulado com BTCA e o segundo apresentando 20% de PVA na sua composição e reticulado com BTCA. Em duas repetições houve uma satisfatória taxa de adesão de 20% nos substratos e sinais de uma possível derivação no substrato contendo 20% de PVA. Esses resultados motivam a aperfeiçoar nossas formulações de hidrogéis para aumento das taxas de adesão e proliferação de células tronco embrionárias sob condições definidas e potencial uso terapêutico em medicina regenerativa.

**Palavras chave:** Hidrogéis, poli (álcool vinílico), células- tronco embrionárias, bovino

## **ABSTRACT**

*Embryonic stem cells (ESC) to be used for cell therapies must be created and maintained under strict conditions, excluding the use of undefined supplements. Two key steps in the creation of a new embryonic stem cell line are adherence to the substrate and derivation towards the formation of a primary colony. Bovine embryonic stem cells (ESCs) may be used as a model for the development of ESCs, minimizing legal and ethical issues that impair the use of human gametes and embryos for research. Bovine embryos were used to test different hydrogels as substrate for ESC derivation. The synthetic polymer PVA, poly (vinyl alcohol), was used to obtain functionalized hydrogels with the tetrapeptide L-arginyl-glycyl-L-aspartyl-L-serine (RGDS) sequence and crosslinked with citric acid and 1, 2, 3, 4-butanetetracarboxylic acid (BTCA) molecules. The substrates were tested for cellular cytotoxicity using cumulus cells (CC's). The CC's showed normal cellular morphology, any signal of lyses or degeneration, however, in the sample without BTCA presence low proliferation was observed. In a second series of experiments, the Inner cell mass of 20 bovine embryos were isolated and divided in two groups. The first was characterized by composition of 10% of concentration of PVA and the second by composition of 20% of PVA, both were crosslinked with 1% of BTCA. In two repetitions, the results showed a good rate of inner cell mass (ICM) adherence on the substrates and signals of a possible derivation on the hydrogel containing 20% PVA. These results encourage us to improve the present hydrogel formulations to increase the rates of derivation and cell proliferation under defined cultured conditions to comply with good manufacturing practice directives for the potential therapeutic use of ESCs*

**Key-words:** *Hydrogels, poly (vinyl alcohol), embryonic stem- cells, bovine*

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Resultados de aderência e derivação/ expansão das massas celulares internas em hidrogéis de diferentes concentrações de PVA.....	20
--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Célula aderida apresentando extensão citoplasmática indicativa de migração celular.....	16
Figura 2 -	PVA/ BTCA: Células alinhadas acompanhando a disposição das fibrilas do substrato (setas azuis), células em rearranjo irradiado (linhas amarelas) a partir do agregado inicial (setas largas).....	17
Figura 3 -	PVA/ BTCA/ RGDS: células dispersas (chave amarela) a partir do agregado inicial (chave azul).....	17
Figura 4 -	Baixa adesão e ausência de proliferação sobre substrato HA/ A2/ A10/ 3% RGDS.....	18
Figura 5 -	Baixa adesão e ausência de proliferação sobre substrato PVA/ AC/ RGDS.....	18
Figura 6 -	MCI aderida na amostra 1: 10% PVA /1%BTCA. Setas indicam a proliferação das células embrionárias.....	19
Figura 7 -	MCI aderida na amostra 2: 20% PVA/ 1%BTCA. Setas indicam a proliferação das células.....	20

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

PVA- poli álcool vinílico

RGDS- sequência arginina-glicina-aspartato-serina

COC- Complexo cumulus- oócito

mm- milímetro

MIV- maturação *in vitro*

FIV- Fertilização *in vitro*

μl- Microlitro

SP- São Paulo

°C- graus Celsius

CO<sub>2</sub>- dióxido de carbono

BTCA- 1,2,3,4-butano tetracarboxílico

HA- Hidrogel com alta massa molecular

HM- Hidrogel com media massa molecular

DMSO- dimetilsulfóxido

m/m- 10<sup>-3</sup> metros

% - por cento

DTBMP- 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol

2-ICEMA- 2-isocianato de etila

m/v- massa/ volume

4-ABA- 4,4-dietoxibutilamina

pH- potencial de hidrogênio

HCl- Acido clorídrico

cm- centímetro

sulfo-NHS- sulfo *N*-hidroxisuccinimida

mM- milimolar

EDC- hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida

MÊS- ácido 2-morfolinoetanosulfônico

μM- micromolar

h- horas

APMAAm- aminopropilmethacrilamida

BSA- Albumina sérica bovina

PMEDSAH- poli[2-(methacrililoiloxi)ethyl dimethyl-(3-sulfopropil)ammonio hidroxido]

## SUMÁRIO

<b>1-</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2-</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1-</b>	<b>Fertilização <i>in vitro</i>.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2-</b>	<b>Isolamento da massa celular interna.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3-</b>	<b>Preparação dos substratos.....</b>	<b>12</b>
2.3.1-	Procedimento experimental para as matrizes de media e alta massa molecular e fotorreticulados.....	12
2.3.2-	Procedimento experimental para as matrizes de PVA com adição de acido cítrico ou BTCA.....	13
2.3.3-	Procedimento experimental para as matrizes utilizadas na etapa de isolamento das MCI.....	13
<b>2.4-</b>	<b>Derivação e cultura das colônias de CTE.....</b>	<b>14</b>
<b>2.5-</b>	<b>Teste de citotoxicidade.....</b>	<b>14</b>
<b>2.6-</b>	<b>Coloração histológica.....</b>	<b>14</b>
<b>3-</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1-</b>	<b>Teste de citotoxicidade.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2-</b>	<b>Derivação das MCI.....</b>	<b>19</b>
<b>4-</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>5-</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>25</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>26</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Desde a criação da primeira linhagem de células tronco embrionárias humanas utilizando camadas de fibroblasto de camundongo (THOMSON et al., 1998) para derivação e expansão de colônias, um grande desafio da pesquisa tem se concentrado no desenvolvimento de condições de cultura livres de componentes animais usando matrizes poliméricas, peptídeos simples e meio de cultura que não tenha componentes indefinidos na sua formulação.

Esse é um importante ponto a ser levado em conta quando células-tronco embrionárias (CTE) são empregadas em ensaios clínicos, pois como já demonstrado, patógenos podem ser transmitidos às células a partir dos substratos de cultura e subsequentemente aos pacientes (MARTIN et al., 2005). Nesse sentido, a elaboração de protocolos para derivação e cultura de linhagens de células-tronco embrionárias humanas sob condições definidas são essenciais para uso clínico destas células em terapias de medicina regenerativa (BOS- MIKICH et al., 2011).

No Brasil como em uma série de outros países por questões éticas e legais, o uso de gametas e embriões humanos para pesquisas são restritos, o que torna difícil o desenvolvimento de novos protocolos que necessitam de um número considerável de embriões para testes e validação. O modelo bovino é considerado a melhor alternativa devido a sua similaridade ao embrião humano quanto à dinâmica de seu desenvolvimento e facilidade de aquisição de material a partir de abatedouros (RUGGERI et al., 2012).

A busca por substratos com possibilidades de uso para cultivo de células-tronco embrionárias levou pesquisadores a testarem diferentes fontes e combinações de materiais e reagentes para essa finalidade (CROCCO; FRATNZ; BOS-MIKICH, 2013). Atualmente, uma nova linha de materiais vem sendo desenvolvida para esta finalidade. Os biomateriais já tem um importante papel como veículo de liberação de fármacos e estão também sendo testados como plataformas de cultura de células e *scaffolds* (arcabouços) utilizando redes de polímeros hidrofílicos, ou hidrogéis (RATNER; BRYANT, 2004). Os hidrogéis são polímeros com ligações cruzadas, que absorvem extensivamente água ou fluídos biológicos mantendo sua estrutura tridimensional (KIRSCHNER; ANSETH, 2013).

Hidrogéis hoje apresentam diversas aplicações para reparos de órgãos e tecidos do corpo humano, principalmente o hidrogel de poli álcool vinílico (PVA). Entretanto, hidrogéis de PVA não possuem propriedades de adesão celular, o que é um pré-requisito na engenharia tecidual para que seja possível o crescimento e proliferação celular e, posteriormente a

regeneração do tecido (RASIA, 2014). Uma das maneiras mais eficazes de introduzir propriedades de adesão celular a um polímero é a incorporação de peptídeos funcionais em cadeias poliméricas (WANG et al., 2013). Um candidato a desempenhar este papel de peptídeo funcional é a sequência arginina-glicina-aspartato-serina (RGDS), a menor sequência peptídica conhecida capaz de interagir com componentes da matriz extracelular e promover adesão celular (PIERSCHBACHER; RUOSLAHTI, 1984).

Levando em consideração as propriedades dos hidrogéis e sua aplicação como biomaterial, juntamente com a possibilidade de modificação química do PVA por RGDS, este trabalho objetiva testar diferentes substratos elaborados a partir de hidrogéis funcionalizados com a sequência tetrapeptídica RGDS em diferentes concentrações, bem como diferentes graus de reticulações e relação com outros polímeros, para aplicação como substrato para derivação de células-tronco embrionárias em condições livres de componentes indefinidos.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Fertilização *in vitro* (FIV)

O procedimento de FIV foi realizado de acordo com os protocolos padrões realizados por Vitrogen®. Complexos cumulus- oócitos (COCs) foram aspirados de folículos ovarianos (3- 6 mm de diâmetro) e colocados em grupos de 20 para maturação *in vitro* (MIV) em gotas de 70µL de meio de maturação (Meio 199®, Vitrogen, Cravinhos, SP, Brasil), a 38,5°C, em 5% CO<sub>2</sub> em ar por 22 horas. COCs com células do cumulus expandidas foram selecionados para fertilização.

COCs maturados foram removidos do meio de maturação e colocados em gotas de 70µl meio de fertilização (Vitrogen®). O sêmen foi descongelado em água a 36°C por 30 segundos. Os espermatozoides moveis foram obtidos por gradiente de Percoll por 15 minutos a 1200 rpm a temperatura ambiente. Após, retirou-se o sobrenadante realizou-se avaliação de concentração e motilidade, calculo de diluição e exposição dos espermatozoides aos COCs.

Oócitos e espermatozoides permaneceram na gota de FIV por 18 horas. Após este período de fertilização, os COCs foram colocados em placas com gotas de 70µl de meio CR4 (Vitrogen®), cultivados em ar umidificado com 5% CO<sub>2</sub> em ar a 38,5°C. Os embriões foram avaliados às 48 horas e 196 horas de cultivos para avaliações de taxa de fertilização e produção de blastocistos.

### 2.2 Isolamento da massa celular interna

Blastocistos de dia 9 de desenvolvimento (D9), expandidos ou em eclosão foram manipulados em suas placas de cultivo com par de agulhas de insulina 32G sob estereoscópio. Os blastocistos que não eclodiam espontaneamente, a zona pelúcida era removida delicadamente com auxílio de agulha e pressionando o embrião. A massa celular interna (MCI) foi isolada do trofocotoderma pela estabilização da blastocela com uma agulha e retirada das células trofocotodermas circundantes a MCI com outra. Houve máximo de cuidado em separar as células do trofocotoderma preservando a MCI.

## 2.3 Preparação dos substratos

Todos os hidrogéis produzidos foram elaborados a partir da presença de diferentes concentrações de Poli (álcool vinílico)

### 2.3.1 Procedimento experimental para geração das matrizes de media e alta massa molecular e fotorreticulados

- HA/ A2/ A10/ 3%RGDS
- FOTORETICULADOS
- HM/ A5/ A10/ RGDS
- HA/ A2/ A10/ 2%RGDS
- HA/ A1/ A10/ 3%RGDS

Massa molecular do HM que foi utilizado na síntese do HM/A5/A10: 31.000-50.000 Da

Massa molecular do HA que foi utilizado na síntese do HA/A2/A10 e HA/A1/A10: 85.000-124.000 Da.

Poli(álcool vinílico) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) na proporção de 20% massa/volume (m/V). Foi adicionado 1% m/m de 2-6-di-tert-butil-4-metilfenol (DTBMP) para inibir a polimerização de metacrilatos e a solução foi purgada com argônio durante 30 min. Após, percentagens molares (1, 2, 5 e 10%) de 2-isocianato de etila (2-ICEMA) foram adicionados gota a gota e a reação foi mantida a 60°C durante 4h com agitação magnética constante. O gel formado foi precipitado em acetona e seco em estufa a vácuo.

Após secagem do gel, o mesmo foi dissolvido em água deionizada na proporção de 12% m/V a 40°C. 4,4-dietoxibutilamina (4-ABA) foi adicionado na proporção fixa de 10 mol% para todas as formulações. O pH do meio reacional foi ajustado para 1 com solução de HCl 6 mol·L<sup>-1</sup> e a reação continuou durante 30 minutos. Elevou-se o pH até 8 com solução de NH<sub>4</sub>OH 20% e a mistura reacional foi dialisada (MWCO 2000) e liofilizada.

Soluções aquosas dos produtos liofilizados nas concentrações de 2 e 3% m/V contendo 1% de fotoiniciador (Irgacure 2959) foram preparadas e expostas durante 15s à lâmpada de Xenônio com potência de 300W e intensidade de 100mW/cm<sup>2</sup>, obtendo-se assim os hidrogéis.

Os hidrogéis fotorreticulados foram funcionalizados com a sequência peptídica arginina-glicina-ácido aspártico-serina (RGDS). Preparou-se uma solução tamponada contendo 2mM de sulfo *N*-hidroxisuccinimida (sulfo-NHS) e 5mM de hidrocloreto de *N*-(3-

dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) em 50mM de ácido 2-morfolinoetanosulfônico (MES). Adicionou-se 2,6 $\mu$ M de RGDS e logo após o hidrogel. O sistema foi mantido na temperatura de 4°C durante 12h com agitação magnética constante.

### 2.3.2 Procedimento experimental para as matrizes de PVA com adição de ácido cítrico ou BTCA

- PVA/BTCA sem RGDS
- PVA/ BTCA/ RGDS
- PVA/ AC/ RGDS

Poli(álcool vinílico) foi dissolvido em água deionizada na proporção de 12% m/V a 40°C. 4,4-dietoxibutilamina (4-ABA) foi adicionado na proporção fixa de 10 mol% para todas as formulações. O pH do meio reacional foi ajustado para 1 com solução de HCl 6 mol·L<sup>-1</sup> e a reação continuou durante 30 minutos. Elevou-se o pH até 8 com solução de NH<sub>4</sub>OH 20% e a mistura reacional foi dialisada (MWCO 2000) e liofilizada. O produto liofilizado foi dissolvido em água deionizada na proporção de 5% m/V. Adicionou-se 2% de ácido cítrico (AC) ou ácido butano 1,2,3,4,-tetracarboxílico (BTCA) e 2% de solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1mol·L<sup>-1</sup> como catalisador e a reação foi mantida sob agitação mecânica constante durante 10 minutos na temperatura de 40°C. A solução foi evaporada obtendo-se o hidrogel.

Os hidrogéis foram então funcionalizados com a sequência peptídica arginina-glicina-ácido aspártico-serina (RGDS). Preparou-se uma solução tamponada contendo 2mM de sulfo *N*-hidroxissuccinimida (sulfo-NHS) e 5mM de hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) em 50mM de ácido 2-morfolinoetanosulfônico (MES). Adicionou-se 2,6 $\mu$ M de RGDS e logo após o hidrogel. O sistema foi mantido na temperatura de 4°C durante 12h com agitação magnética constante.

### 2.3.3 Procedimento experimental para as matrizes utilizadas na etapa de isolamento das MCI

- 10%PVA /1% BTCA
- 20%PVA/ 1%BTCA

Poli(álcool vinílico) foi dissolvido em água deionizada obtendo-se soluções aquosas nas concentrações de 10 e 20%. Adicionou-se 1% m/V de ácido butano 1,2,3,4,-

tetracarboxílico (BTCA) e 1% de ácido clorídrico (HCl) concentrado foi adicionado como catalisador. A mistura reacional foi mantida em agitação magnética constante durante 10 minutos na temperatura de 40°C. O hidrogel foi obtido após evaporação do solvente.

#### **2.4 Derivação e cultura das colônias de CTE**

As MCIs isoladas foram colocadas nas diferentes matrizes cortadas em pedaços circulares de 1x1 cm em foças de placas (Nunc™) de 4 poços contendo meio DMEM/F12 Knockout (Gibco) suplementado com *knockout serum replacement 20%* (Gibco), glutamina (Gibco), aminoácidos não essenciais (Gibco), penicilina- estreptomicina (Sigma),  $\beta$ -Mercaptoetanol (Gibco) e bFGF (fator de crescimento de fibroblasto bovino) 10 $\mu$ g/mL (BD). Avaliação de aderência foi realizada 24 horas após a exposição das massas celulares por visualização em estereoscópio e inclinação manual das placas.

As colônias primárias de CTEs foram mantidas por 48 horas em atmosfera umidificada de 5% CO<sub>2</sub> em ar a 38,5°C. Cada experimento foi repetido duas vezes.

#### **2.5 Teste de citotoxicidade**

Para investigar a possibilidade de efeitos adversos às células embrionárias dos diferentes hidrogéis foram primeiramente utilizadas células de cumulus oophorus extraídos de complexos- cumulus- oocitos (COCs) para realizar uma avaliação visual de citotoxicidade.

Os hidrogéis foram colocados nas foças das placas Nunc 4 poços (Nunc™) e cobertos com meio B199 (Vitrogen®). As células do cumulus oophorus foram mecanicamente isoladas dos COCs aspiradas de ovários de abatedouro para experimentos de fertilização *in vitro*. As células foram expostas à superfície dos diferentes géis e cultivadas a 38,5°C por 48 horas a 5% CO<sub>2</sub> em ar. Após a cultura, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 5 minutos em temperatura ambiente. Cada hidrogel foi testado em triplicata.

#### **2.6 Coloração histológica**

Os hidrogéis foram corados com hematoxilina por 30 segundos e em eosina por 1 minuto. A análise visual da viabilidade celular foi realizada e um microscópio Olympus BX41 usando contraste de fase, para as laminas não coradas e microscópio óptico, para as amostras coradas. A análise baseou-se na observação celular das seguintes características:

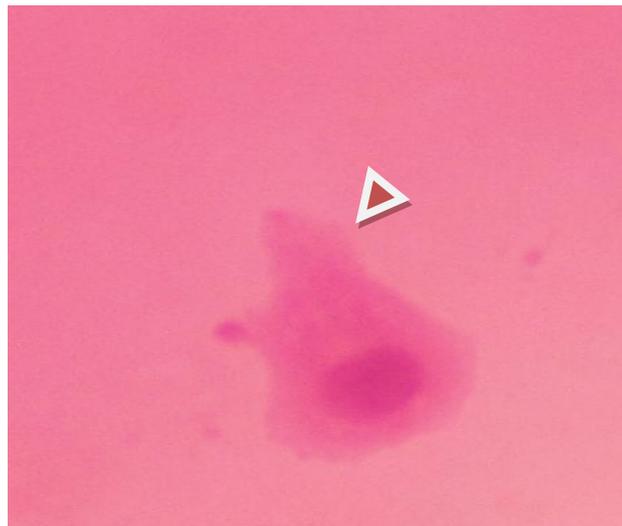
disseminação celular, lise celular, formação de monocamadas confluentes de células bem definidas, presença de grânulos intracitoplasmáticos e visualização de núcleos em interfase ou figuras metafásicas. Densidade celular não foi quantificada. As amostras de hidrogéis foram randomizadas e as placas para análise foram escolhidas ao acaso.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Teste de citotoxicidade

A análise visual de hidrogéis com células do cumulus pós 48 horas de cultivo corados com eosina/ hematoxilina sob microscopia óptica e análise de substratos em microscopia de contraste de fase revelaram dois padrões celulares bem definidos: células estreladas, quando bem espalhadas pelo substrato indicando adesão e migração celular e células circulares em grupos, dos quais podia se verificar dispersão celular. Nos substratos em que houve adesões, células com núcleo heterocromático estavam presentes na sua vasta maioria (Figura 1).

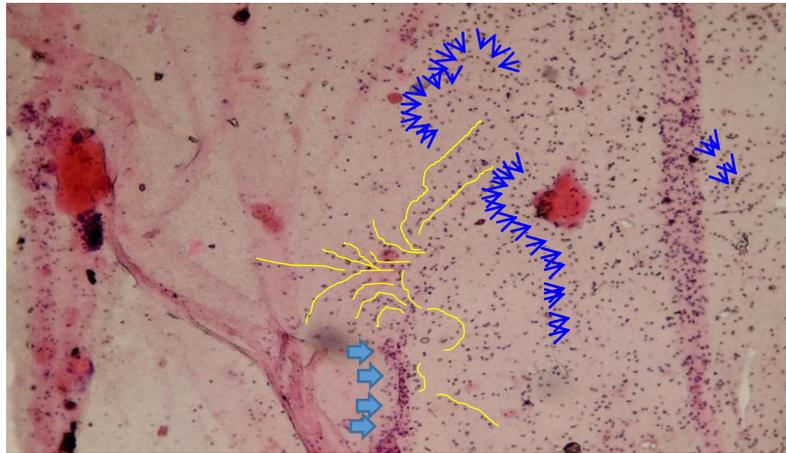
**Figura 1-** Célula aderida apresentando extensão citoplasmática (  ) indicativa de migração celular



Fonte: O próprio autor

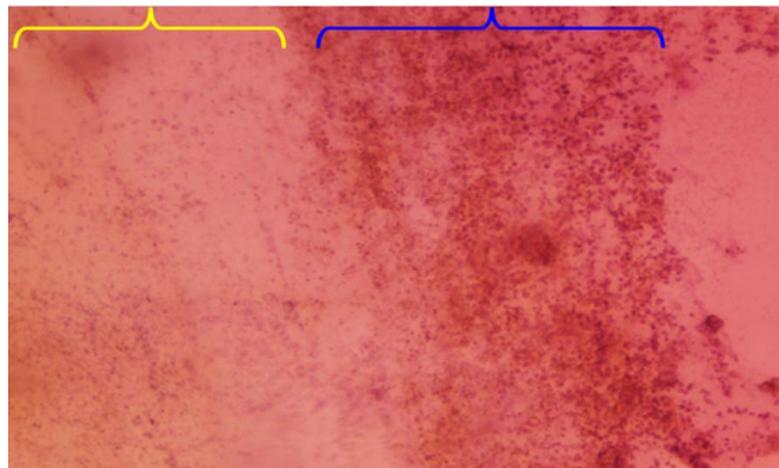
Foi observado que as amostras contendo PVA reticuladas com BTCA (Figuras 2 e 3) apresentaram nítidas carreiras de células em proliferação e migração sobre as fibras reticulares do substrato.

**Figura 2-** PVA/BTCA: células alinhadas acompanhando a disposição das fibrilas do substrato (setas azuis); células em rearranjo irradiado (linhas amarelas) à partir do agregado inicial (setas largas)



Fonte: O próprio autor

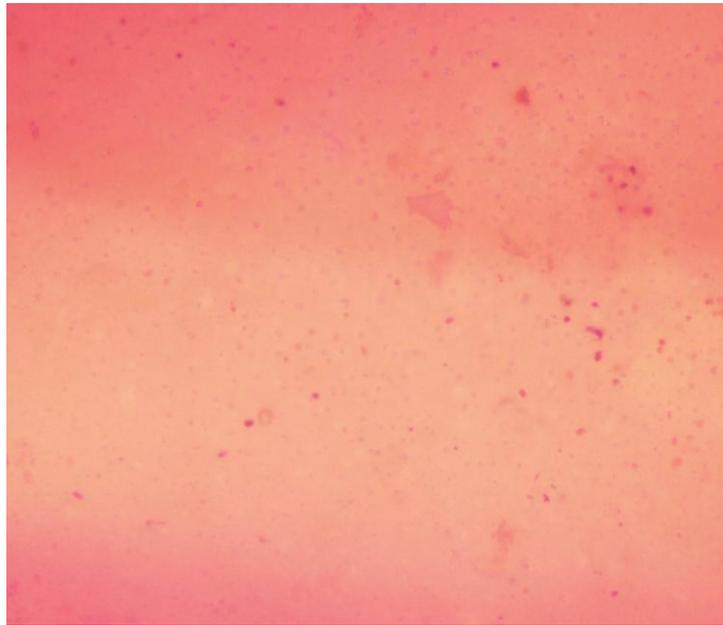
**Figura 3-** PVA/ BTCA/ RGDS: células dispersas (chave amarela) a partir do agregado inicial (chave azul)



Fonte: O próprio autor

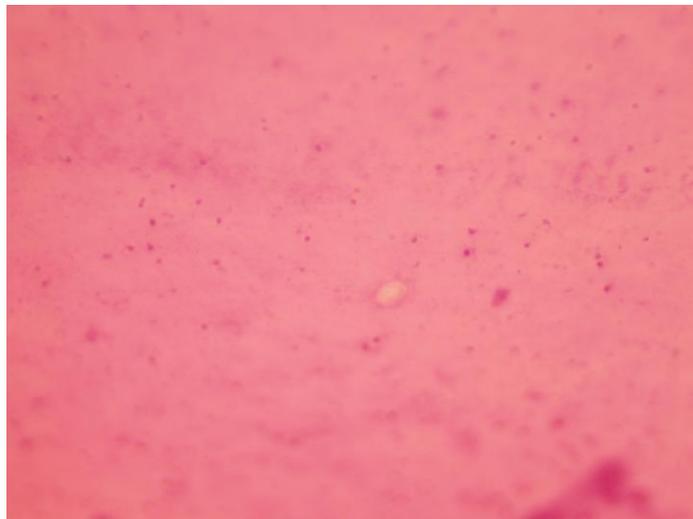
No entanto, observou-se que todas as amostras que não foram reticuladas com BTCA, tanto aquelas com diferenças de maior ou menor porosidade (Figura 4), adição de maior ou menor concentração de RGD e reticulação com Acido cítrico (Figura 5), não resultaram em substratos com adesão e proliferação, quando comparadas àquelas com adição de BTCA.

**Figura 4:** Baixa adesão e ausência de proliferação sobre substrato HA/ A2/ A10/ 3%RGDS



Fonte: O próprio autor

**Figura 5-** Baixa adesão e ausência de proliferação sobre substrato PVA/ AC/ RGD



Fonte: O próprio autor

Nesse sentido, apenas os substratos contendo reticulações de PVA com BTCA foram utilizados na fase de derivação de massas celulares de embriões para derivação de células-tronco.

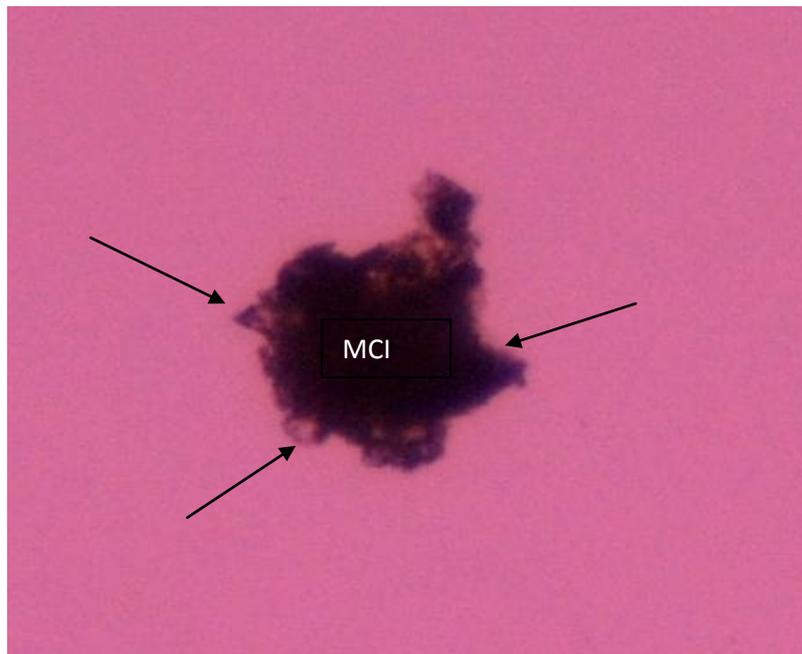
### 3.2 Derivação das MCIs

Após realizar o isolamento, cultivo sobre os substratos por 48 horas, fixação e coloração, os hidrogéis contendo as MCIs foram analisadas por microscopia óptica.

Tanto o hidrogel composto por PVA 10% reticulado com BTCA 1% (Figura 6) quanto o composto por PVA 20% reticulado com BTCA 1% (Figura 7) apresentaram adesão de células da massa celular interna. Nos dois substratos pode-se observar que as células embrionárias estavam aderidas ao substrato sugerindo que os substratos empregados para adesão de células-tronco embrionárias e sua derivação foram reconhecidos pelas células da massa celular e não exerceram uma ação citotóxica nas mesmas.

**Figura 6-** MCI aderida na amostra 1: 10%PVA/ 1%BTCA.

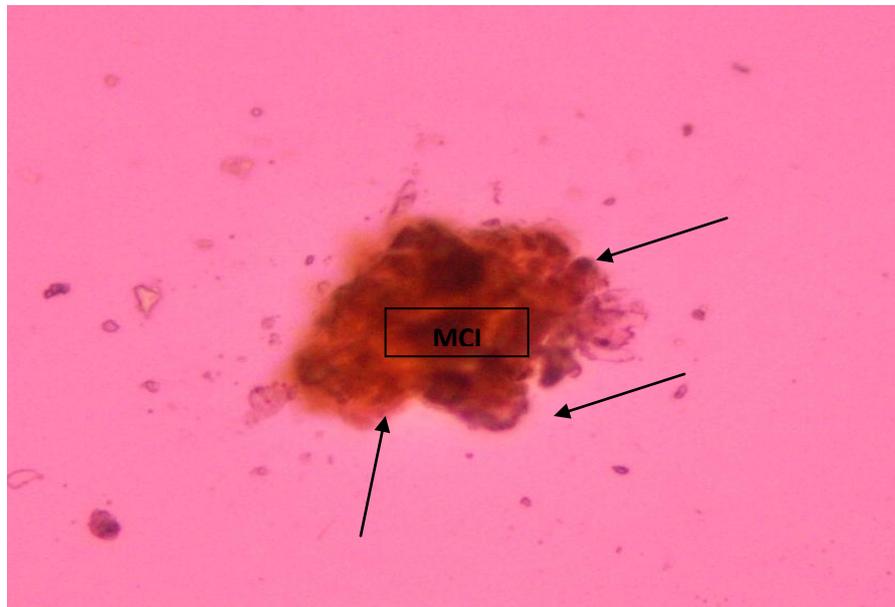
Setas indicam a proliferação das células  
embrionárias



Fonte: O próprio autor

**Figura 7-** MCI aderida na amostra 2: 20%PVA/1% BTCA.

Setas indicam a proliferação das células embrionárias



Fonte: O próprio autor

Conforme ilustrado na Tabela 1, nas duas rotinas realizadas, em cada amostra das cinco MCIs postas aos hidrogéis, uma adesão foi observada em cada. Assim, uma taxa de 20% de adesão foi obtida independentemente da amostra utilizada nas duas rotinas.

**Tabela 1-** Resultados de aderência e derivação/ expansão das massas celulares internas em hidrogéis de diferentes concentrações de PVA

<b>Substrato</b>	<b>Número de MCI</b>	<b>Aderência</b> (%)	<b>Expansão</b> (%)
<b>PVA 10%/BTCA</b>	10	2 (20)	
<b>PVA 20%/BTCA</b>	10	2 (20)	1 (10)

Fonte: O próprio autor

Foram observadas características de células em expansão a partir da MCI em ambos os substratos. Na colônia aderida em substrato com 20% BTCA a expansão é maior e bem mais evidente com as células partindo da massa embrionária inicial e se estendendo no substrato ( setas) indicativo de viabilidade e proliferação celular.

## 4 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o uso de hidrogéis produzidos a partir da utilização de álcool (polivinílico) como base, suas reticulações com moléculas de BTCA e ácido cítrico, além de diferentes concentrações de sequências RGDS, para utilização como substratos para derivação de células-tronco embrionárias.

Na primeira etapa, a funcionalização com RGDS do hidrogel alterou a morfologia das células, as quais adquiriram morfologia fusiforme indicativa de migração celular. LEI e colaboradores (2011) investigaram a influência das seguintes variáveis sobre a adesão, migração e proliferação celular de células-tronco mesenquimais de ratos em hidrogel de ácido hialurônico: natureza do reticulante, concentração de RGDS, concentração do polímero e densidade de reticulação. Um dos resultados mostrou que a introdução de RGDS alterou significativamente a morfologia celular, as células apresentavam morfologia esférica antes da adição de RGDS e após a adição de RGDS passaram a apresentar morfologia fusiforme, sugestiva de motilidade celular no substrato, semelhante aos resultados aqui observados com as células do cumulus oophorus.

Outro resultado interessante do trabalho de Lei é referente a proliferação celular e a concentração de RGDS. Geralmente, quanto mais elevada a concentração de RGDS, mais rapidamente as células migram e proliferam, porém o resultado encontrado foi oposto. A migração e proliferação celular foi maior em hidrogéis que apresentavam menor concentração de RGDS. Os autores afirmam então que a concentração de RGDS é um fator importante para modular a migração de células em hidrogéis de ácido hialurônico.

A menor taxa de adesão nos hidrogéis à base de 10% de PVA e 20% pode ter sido causada pelo não reconhecimento molecular entre as células embrionárias e o substrato, a porosidade inadequada da matriz e/ou grau de reticulação das fibras. Embora já seja conhecido o papel de reconhecimento da sequência RGD como um importante fator de adesão celular (PIERSCHBACHER; RUOSLAHTI, 1984) e o mesmo já tenha sido testado como diferentes substratos de cultivo para células-tronco (HIRANO et al., 1993), no presente estudo a sua utilização para aderência e derivação de CTE bovinas não gerou resultados condizentes com a literatura. O estudo envolvendo as células do cumulus indicou que a integração do RGDS com PVA só foi satisfatória para proliferação celular quando reticulada com BTCA, não havendo aparentemente diferença em adesão e proliferação de células do cumulus quando comparada apenas com a composição de PVA reticulada com o BTCA.

Na segunda etapa, os resultados mostram que 20% das massas celulares expostas aos substratos são capazes de aderir aos hidrogéis compostos tanto por 10% de PVA, como 20%. Em ambos os substratos obtivemos sinais de proliferação celular a partir da MCI, sendo que na amostra contendo 20% de PVA a expansão inicial após 48 horas de cultura foi bastante evidente. Em prévio estudo (RUGGERI et al., 2012), utilizando fibronectina purificada como substrato, obteve-se 39% de adesão de MCIs obtidas de embriões gerados por partenogênese. Os presentes resultados empregando PVA reticulado com BTCA apresentaram taxa de adesão inferior. Por outro lado, as diferentes concentrações de PVA não geraram diferenças nas adesões (20%). Os sinais de expansão da colônia celular observadas na amostra 2 indicam a possibilidade de maior afinidade célula-substrato utilizando-se 20% de PVA na composição do hidrogel. Adicionalmente, o período de cultivo empregado neste estudo foi bastante limitado, 48 horas apenas. Potencialmente se houvésemos permitido um tempo maior de cultura, estas colônias teriam apresentado uma maior expansão sobre o substrato.

A busca por substratos livres de componente animal e com composição definida é relativamente recente (BRIMBLE et al., 2004). Materiais biológicos apresentam sítios de reconhecimento celular que possibilitam maiores graus de adesão celular, porém a larga quantidade de componentes indefinidos desses materiais e a inconstância de sua composição exigem a pesquisa por outros substratos (KLIMANSKAYA et al., 2005), para que estas células possam vir a ser utilizadas em terapias humanas. Assim, estudos mais recentes focam em biomateriais sintéticos e suas características bioquímicas, que permitam a manutenção da pluripotência das linhagens de célula-tronco produzidas em condições não definidas. Porém, muitos dos testes descritos na literatura ainda resultam em baixas taxas de adesão e derivação das massas celulares internas e as taxas de sucesso variam consideravelmente entre os centros mundiais dedicados a esta área da pesquisa com CTE (LU et al., 2006)

Na busca por materiais sintéticos, quimicamente definidos para manutenção de CTEh já estabelecidas, diferentes linhas de pesquisa tem sido exploradas, as quais objetivam primariamente condições cada vez mais favoráveis à proliferação celular. Trabalhos envolvendo substratos tridimensionais apresentaram taxas satisfatórias de derivação, manutenção da pluripotência e diferenciação nas 3 camadas germinativas (KLIMANSKAYA et al., 2005) (LEVENBERG, S; HUANG, NF; LAVIK, 2003). Na mesma linha, Lim e colaboradores (2011) desenvolveram matrizes a base de hidrogéis multifuncionais que fornecem ao mesmo tempo, suporte estrutural, mecânico e elétrico. Desta forma, as CTE's tem a possibilidade de livre proliferação recebendo estímulos químicos, elétricos e mecânicos do próprio meio de cultura, além de manter o estado indiferenciado.

Outros sofisticados ambientes tri-dimensionais de cultivo de células, biorreatores com regulação molecular e física do crescimento e diferenciação celular estão sendo pesquisados (BURDICK; VUNJAK-NOVAKOVIC, 2009). No entanto, na busca de um ambiente de cultivo mais barato, tanto para pesquisa quanto para uso terapêutico, os hidrogéis vêm ganhando relevância devido a sua fácil e menos onerosa manufatura (BRAFMAN et al., 2010), assim como por apresentar características estruturais similares à microarquitetura e porosidade dos biomateriais mais sofisticados (PLACZEK et al., 2009).

Outros polímeros com características semelhantes aos hidrogéis à base de PVA já foram descritos como os biomateriais a base de ácido hialurônico (GERECHT et al., 2007) (LIU et al., 2012). No entanto, até o momento os únicos resultados envolvendo proliferação e manutenção do estado indiferenciado das células embrionárias de linhagens pré-estabelecidas, em substratos contendo este ácido são na presença de fibroblastos humano ou de camundongo acrescidos ao meio de cultivo. Outro hidrogel com satisfatória taxa de proliferação celular, com mais de 20 passagens realizadas sem perder características de pluripotência foi elaborado a partir da molécula aminopropilmetacrilamida (APMAAm). Entretanto, este estudo utilizou a albumina sérica bovina (BSA), um componente de origem animal e com elementos indefinidos presentes na sua composição e que demonstrou desempenhar um papel decisivo na adesão das células embrionárias isoladas (IRWIN et al., 2011) inviabilizando assim, a caracterização deste sistema de cultivo como quimicamente definido.

BRAFMAN e colaboradores (2010) realizaram experimentos envolvendo o emprego de um material com características similares ao substrato utilizado no presente trabalho. Os autores relataram a confecção de um polímero a base de poli[2-(metacriloiloxi)etil dimetil-(3-sulfopropil)ammonio hidróxido] (PMEDSAH), havendo adesão e desenvolvimento de colônias de células-tronco positivas para os principais marcadores de pluripotência utilizados atualmente. Pelas características do substrato utilizado em nosso estudo e os resultados alcançados com o cultivo das células embrionárias estima-se que as células geradas neste substrato a base de PVA, também devam apresentar resposta positiva aos marcadores de pluripotência celular embrionária quando lhes for permitido um período maior de cultivo *in vitro*.

Em concordância com os registros da literatura onde se observa que substratos densos e com porosidade definida apresentam melhores taxas de crescimento celular (LEE, SUNRAY; KIM, JIHOON; PARK, 2011), o substrato que apresentou uma massa celular embrionária com maiores indicativos de expansão é aquele que apresenta característica de densidade mais elevada, composto por 20% de PVA. Para elaboração da maioria dos

polímeros produzidos atualmente as concentrações de cada componente é determinada de forma empírica (BRAFMAN et al., 2010), bem como as características biofísicas de cada substrato (LIM et al., 2011). Por outro lado, a avaliação da viabilidade destes substratos quimicamente definidos se dá pela morfologia e proliferação celular com a aderência e expansão inicial de colônias primárias de células-tronco embrionárias sobre os hidrogéis. Com os resultados gerados pelo trabalho aqui descrito, estudos prévios e análise de experimentos produzidos por outros pesquisadores, acredita-se elaborar futuramente materiais que permitam maiores taxas de adesão e proliferação celular, assim como sejam propícios à manutenção do estado indiferenciado das colônias de células-tronco embrionárias geradas sob condições definidas.

Espera-se ainda que os substratos a base de PVA reticulados com BTCA possam ser incubados com as células embrionárias por períodos maiores do que 48 horas, de forma a serem realizados testes de pluripotência e acompanhamento do desenvolvimento das potenciais colônias e linhagens de CTE estabelecidas sob condições definidas.

## 5 CONCLUSÃO

Em conclusão, os presentes resultados indicam que hidrogéis produzidos em laboratório não são citotóxicos para cultivo de células do cumulus nem para células extraídas da massa celular interna de embriões bovinos. As massas celulares embrionárias demonstraram uma satisfatória taxa de aderência, quando o PVA é suplementado com BTCA, entretanto sua expansão e formação de colônia primárias de células tronco-embrionárias parece estar ainda inibida nas condições cultivo ora utilizadas. Entretanto, biomateriais compostos por PVA reticulados com BTCA não parecem diminuir a viabilidade e a capacidade de proliferação das células somáticas. Assim, nossa meta é aumentar a biocompatibilidade dos hidrogéis às células-tronco embrionárias de maneira que elas, além de reconhecerem o substrato, entrem em processo de proliferação e expansão, mantendo seu estado indiferenciado.

Mais estudos estão sendo realizados para melhorar os resultados de adesão e proliferação de células da massa celular interna, para criação de linhagens de células tronco embrionárias em condições de grau clínico para futura extrapolação dos resultados à medicina regenerativa humana.

## REFERÊNCIAS

- BRAFMAN, D. A. et al. Long-term human pluripotent stem cell self-renewal on synthetic polymer surfaces. **Biomaterials**, Oxford, v. 31, n. 34, p. 9135–9144, Dez. 2010.
- BRIMBLE, S. N. et al. Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. **Stem cells and development**, New Rochelle, v. 13, n. 6, p. 585–597, Dez. 2004.
- BOS- MIKICH, A. et al. Emprego de oócitos de descarte como fonte de blastocistos partenotes para geração de linhagens de células-tronco embrionárias humanas com grau clínico. **Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida**, Porto Alegre, v.15, p. 38-40, jul. 2011
- BURDICK, J. A.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. **Tissue engineering. Part A**, New Rochelle v. 15, n. 2, p. 205–219, Mar. 2009.
- CROCCO, M. C.; FRATNZ, N.; BOS-MIKICH, A. Substrates and supplements for hESCs: a critical review. **Journal of assisted reproduction and genetics**, New York, v. 30, n. 3, p. 315–323, Mar. 2013.
- GERECHT, S. et al. Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, New York, v. 104, n. 27, p. 11298–11303, 3 July. 2007.
- HIRANO, Y. et al. Cell-attachment activities of surface immobilized oligopeptides RGD, RGDS, RGDV, RGDT, and YIGSR toward five cell lines. **Journal of biomaterials science. Polymer edition**, Ah Zeist, v. 4, n. 3, p. 235–243, Jan. 1993.
- IRWIN, E. F. et al. Engineered polymer-media interfaces for the long-term self-renewal of human embryonic stem cells. **Biomaterials**, Oxford, v. 32, n. 29, p. 6912–6919, Out. 2011.
- KIRSCHNER, C. M.; ANSETH, K. S. Hydrogels in Healthcare: From Static to Dynamic Material Microenvironments. **Acta materialia**, Oxford, v. 61, n. 3, p. 931–944, 1 Feb. 2013.
- KLIMANSKAYA, I. et al. Human embryonic stem cells derived without feeder cells. **Lancet**, London, v. 365, n. 9471, p. 1636–1641, May. 2005.
- LEE, SUNRAY; KIM, JIHOON; PARK, T. J. ET AL. The effects of the physical properties of culture substrates on the growth and differentiation of human embryonic stem cells. **Biomaterials**, Oxford, v. 32, n. 34, p. 8816– 8829, Dec. 2011.
- LEI, Y. et al. The spreading, migration and proliferation of mouse mesenchymal stem cells cultured inside hyaluronic acid hydrogels. **Biomaterials**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 39–47, Jan. 2011.

LEVENBERG, S; HUANG, NF; LAVIK, E. ET AL. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA**, Washington, v. 100, n. 22, p. 12741– 12746, Aug. 2003.

LIM, H. L. et al. Dynamic Electromechanical Hydrogel Matrices for Stem Cell Culture. **Advanced functional materials**, Weinheim, v. 21, n. 1, p. 55- 63, Jan. 2011.

LIU, Y. et al. Modified hyaluronan hydrogels support the maintenance of mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. **Macromolecular bioscience**, Weinheim, v. 12, n. 8, p. 1034–1042, Ago. 2012.

LU, J. et al. Defined culture conditions of human embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 15, p. 5688–93, Abr. 2006.

MARTIN, M. J. et al. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. **Nature medicine**, New York, v. 11, n. 2, p. 228–232, Fev. 2005.

PIERSCHBACHER, M. D.; RUOSLAHTI, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. **Nature**, London, v. 309, n. 5963, p. 30– 33, May 1984 .

PLACZEK, M. R. et al. Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, London, v. 6, n. 32, p. 209–232, Mar. 2009.

RASIA, Marschner Gisele. **Dissertação de Mestrado**: Síntese e funcionalização e hidrogéis de poli (álcool vinílico). Porto Alegre: UFRGS, Faculdade Química, PPGCIMAT, 2014. 2 p.

RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. Biomaterials: where we have been and where we are going. **Annual review of biomedical engineering**, Palo Alto, v. 6, p. 41–75, Jan. 2004.

RUGGERI, R. R. et al. The use of parthenotegenetic and IVF bovine blastocysts as a model for the creation of human embryonic stem cells under defined conditions. **Journal of assisted reproduction and genetics**, New York, v. 29, n. 10, p. 1039–1043, Out. 2012.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, New York, v. 282, n. 5391, p. 1145–1147, 6 Nov. 1998.

WANG, X. et al. Effect of RGD nanospacing on differentiation of stem cells. **Biomaterials**, Oxford, v. 34, n. 12, p. 2865–2874, Abr. 2013.