



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO



CAMPUS UFRJ DUQUE DE CAXIAS

PROFESSOR GERALDO CIDADE

**Avaliação da Adesão de Células-Tronco de Pluripotência Induzida sobre
Microcarregadores: Aplicação em Biorreatores visando a produção de
Vesículas Extracelulares.**

INGRID MARIA MELO FERREIRA PONCIANO E SILVA

Duque de Caxias

2023

INGRID MARIA MELO FERREIRA PONCIANO E SILVA

**Avaliação da Adesão de Células-Tronco de Pluripotência Induzida sobre
Microcarregadores: Aplicação em Biorreatores visando a produção de
Vesículas Extracelulares.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal do
Rio de Janeiro como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas -
Biotecnologia.

Orientadora: Tais Hanae Kasai Brunswick
Coorientadora: Michelle Lopes Araújo Christie

CIP - Catalogação na Publicação

586a Silva, Ingrid Maria Melo Ferreira Ponciano e
Avaliação da Adesão de Células-Tronco de
Pluripotência Induzida sobre Microcarregadores:
Aplicação em Biorreatores visando a produção de
Vesículas Extracelulares. / Ingrid Maria Melo
Ferreira Ponciano e Silva. -- Rio de Janeiro, 2023.
66 f.

Orientadora: Tais Hanae Kasai Brunswick.
Coorientadora: Michelle Lopes Araújo Christie.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus
Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, Bacharel
em Ciências Biológicas: Biotecnologia, 2023.

1. Células-tronco de pluripotência induzida. 2.
Cultivo 3D. 3. Microcarregadores. 4. Adesão
celular. 5. Vesículas extracelulares. I. Brunswick,
Tais Hanae Kasai, orient. II. Christie, Michelle
Lopes Araújo, coorient. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS DUQUE DE CAXIAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOTECNOLOGIA

Aluno(a): **Ingrid Maria Melo Ferreira Ponciano e Silva**


Registro na DRE: **117090237**

Título: "Avaliação da adesão de células-tronco de pluripotência induzida sobre microcarregadores: aplicação em biorreatores visando a produção de Vesículas"

MEMBRO DA BANCA	NOTA
Melissa Limoeiro Estrada Gutarra	9,0
Samir Pereira da Costa Campos	9,0
Tais Hanae Kasai Brunswick (Orientadora)	9,0
Nota Final	9,0

Declaro que a aluna **Ingrid Maria Melo Ferreira Ponciano e Silva** foi aprovada com nota 9,0 (nove), por esta banca.

Duque de Caxias, 07 de agosto de 2023.



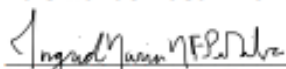
Melissa Limoeiro Estrada Gutarra



Samir Pereira da Costa Campos

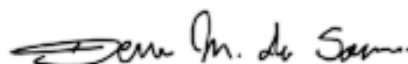


Tais Hanae Kasai Brunswick



Ingrid Maria Melo Ferreira Ponciano e Silva





Vice-Coordenador Denis Mota de Sousa
Curso de Ciências Biológicas: Biotecnologia

AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração a todos aqueles que contribuíram para a realização desta monografia, pois sem o apoio e incentivo de pessoas especiais como vocês, esse trabalho não seria possível.

Em primeiro lugar, gostaria de expressar minha profunda gratidão aos meus pais. Vocês têm sido minha fonte inesgotável de amor, apoio e encorajamento ao longo de toda a jornada acadêmica. A confiança de vocês em mim foram fundamentais para superar os desafios e me manter motivado em todos os momentos. Sou imensamente grata por ter pais tão maravilhosos como vocês.

Além disso, quero expressar minha sincera gratidão ao meu melhor amigo Gabriel Tachibana. Nossa amizade tem sido uma bênção e uma inspiração ao longo dessa jornada. Você tem sido meu pilar, oferecendo apoio incondicional e estando ao meu lado em todas as adversidades. Em meio às incertezas da vida, você tem sido minha fonte de esperança e força, mostrando que há beleza mesmo nas circunstâncias mais desafiadoras. Amo você mais do que qualquer céu azul.

Agradeço também aos meus orientadores, professores e demais membros da banca examinadora, pela orientação, conhecimentos transmitidos e valiosas contribuições que enriqueceram este trabalho.

Por fim, agradeço a todos que estiveram ao meu lado, oferecendo apoio moral e torcendo pelo meu sucesso.

A dedicação e o apoio de cada um de vocês foram fundamentais para alcançar este momento importante. Serei eternamente grato por todas as contribuições que fizeram para o sucesso desta monografia.

Obrigado a todos de coração!

RESUMO

SILVA, Ingrid Maria Melo Ferreira Ponciano. Avaliação da Adesão de Células-Tronco de Pluripotência Induzida sobre Microcarregadores: Aplicação em Biorreatores visando a produção de Vesículas Extracelulares. Rio de Janeiro, 2023. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas – Biotecnologia) – Campus Duque de Caxias – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Orientadora: Tais Hanae Kasai Brunswick. Co-orientadora: Michelle Lopes Araújo Christie.

As células-tronco têm sido estudadas como uma abordagem promissora para a medicina regenerativa. Os benefícios terapêuticos observados em diversos ensaios que utilizam células-tronco ou seus derivados com o objetivo restaurar ou reparar lesões podem ser atribuídos não à enxertia destas células no tecido lesionado, mas principalmente à sinalização celular desencadeada por vesículas secretadas por estas células. As vesículas extracelulares (VEs) desempenham um importante papel na comunicação entre as células, por serem carreadores de fatores como proteínas, lipídeos, RNAs, miRNAs, dentre outros. Por essa razão o papel terapêutico das VEs tem sido alvo de investigação na área da medicina regenerativa. Um dos grandes desafios da atualidade consiste na obtenção de grande quantidade de VEs de forma consistente. Isso se deve ao fato de que métodos tradicionais de cultivo bidimensional apresentam limitações na quantidade de VEs obtidas, são extremamente laboriosos e pouco reprodutíveis. Desta forma, o objetivo deste trabalho consiste em estabelecer o cultivo de células-tronco de pluripotência induzida (iPS) em biorreator para gerar quantidades relevantes de VEs e oferecer maior escalabilidade em um ambiente altamente controlado que preserva as características moleculares das VEs. Para isso foram avaliadas a adesão das células iPS sobre três tipos de matrizes extracelulares diferentes sob a plataforma de superfície de microcarregadores de poliestireno USP Classe VI. Foram utilizados dois tipos de microcarregadores comercializados pela Corning, revestidos por matrizes extracelulares, como a vitronectina – nos microcarregadores Synthemax II; e revestidos por colágeno – nos microcarregadores Collagen. Esses microcarregadores também foram submetidos a uma etapa adicional de tratamento *in house* com Geltrex, uma matriz extracelular de origem animal amplamente utilizada no cultivo de células iPS em culturas celulares bidimensionais. Como resultados conseguimos estabelecer o cultivo de iPS em suspensão de forma que a condição que apresentou melhor adesão e

proliferação foi no microcarregador revestido por vitronectina pós-revestido com a matriz extracelular comercial Geltrex. Esse trabalho estabelece as bases para escalabilidade do cultivo de iPS para utilização em biorreatores.

Palavras-chave: células-tronco de pluripotência, cultivo 3D, microcarregadores, adesão celular, vesículas extracelulares.

ABSTRACT

SILVA, Ingrid Maria Melo Ferreira Ponciano. Assessment of Induced Pluripotent Stem Cell Adhesion on Microcarriers: Application in Bioreactors for Extracellular Vesicle Production. Rio de Janeiro, 2023. Monograph (Bachelor of Biological Sciences - Biotechnology) – Duque de Caxias Campus – Federal University of Rio de Janeiro. Supervisor: Tais Hanae Kasai Brunswick. Co-supervisor: Michelle Lopes Araújo Christie.

Stem cells have been investigated as a promising approach for regenerative medicine. The therapeutic benefits observed in various trials utilizing stem cells or their derivatives to restore or repair injuries may not solely be attributed to the engraftment of these cells into the injured tissue, but largely to the cellular signaling triggered by vesicles secreted by these cells. Extracellular vesicles (EVs) play a crucial role in cell-to-cell communication, as they transport factors such as proteins, lipids, RNAs, miRNAs, among others. Therefore, the therapeutic potential of EVs has become a subject of investigation in the field of regenerative medicine. A significant contemporary challenge lies in obtaining a substantial quantity of EVs consistently. This challenge stems from the fact that conventional two-dimensional culture methods exhibit limitations in the yield of EVs, proving to be extremely labor-intensive and less reproducible. Accordingly, the aim of this study is to establish the cultivation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) in a bioreactor to generate relevant quantities of EVs, providing enhanced scalability within a tightly controlled environment that preserves the molecular characteristics of EVs. To achieve this, the adherence of iPSCs onto three distinct types of extracellular matrices was evaluated using the USP Class VI polystyrene microcarrier surface platform. Two types of commercially available microcarriers provided by Corning were employed, coated with extracellular matrices, namely vitronectin-coated microcarriers (Synthemax II) and collagen-coated microcarriers (Collagen). These microcarriers underwent an additional in-house treatment step with Geltrex, an animal-derived extracellular matrix widely utilized in the two-dimensional cell culture of iPSCs. As a result, we successfully established the suspension culture of iPSCs, with the best adhesion and proliferation observed on the vitronectin-coated microcarrier post-treated with the commercial extracellular matrix, Geltrex. This work lays the foundation for scaling iPSC cultivation for utilization in bioreactors.

Keywords: pluripotent stem cells, 3D culture, microcarriers, cell adhesion, extracellular vesicles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado da potencialidade das células-tronco.

Figura 2. Os fatores que influenciam a interação VE-Célula.

Figura 3. O mundo das vesículas extracelulares (VEs) e nanopartículas (NPs).

Figura 4. Representação das vias de biogênese de vesículas extracelulares (VEs) e nanopartículas selecionadas (NPs).

Figura 5. Uma introdução geral às VEs, incluindo composição, processos fisiológicos e patológicos relacionados e suas aplicações clínicas.

Figura 6. Desenho esquemático da câmara de Neubauer.

Figura 7. Representação do desenho experimental para cultivo de iPS sobre microcarregadores.

Figura 8: Representação do desenho experimental para isolamento e análise por NTA de VEs secretadas por células iPS em cultivo sobre microcarregadores.

Figura 9: Representação do desenho experimental para contagem do núcleo de iPS cultivado sobre microcarregadores.

Figura 10. Fotomicrografia das células iPS em cultivo 2D.

Figura 11. Fotomicrografia em das células iPS, 24h, 48h e 120h após o cultivo estático com 1g/L de microcarregadores Synthemax II sem revestimento de geltrex (S-GT).

Figura 12. Fotomicrografia em das células iPS, 24h, 48h e 120h após o cultivo estático com 1g/L de microcarregadores Synthemax II com revestimento de geltrex (GT).

Figura 13: Fotomicrografia em das células iPS 120h após o cultivo estático com 1.5g/L e 2g/L de microcarregadores Synthemax II com e sem revestimento de geltrex (S-GT / GT).

Figura 14. Fotomicrografia da contagem de núcleo de células iPS corados.

Figura 15. Análise por NTA de VEs liberadas a cada 24h.

Figura 16. Fotomicrografia das células iPS, 24h, 48h e 120h após o cultivo com 1g/L de microcarregadores de colágeno sem revestimento de geltrex.

Figura 17. Fotomicrografia das células iPS, 24h, 48h e 120h após o cultivo com 1g/L de microcarregadores de colágeno com revestimento de geltrex

Figura 18. Fotomicrografia em das células iPS, 24h após o cultivo sob agitação com 1g/L, 1.5g/L e 2g/L de microcarregadores sem revestimento de Geltrex (S-GT).

Figura 19. Fotomicrografia em das células iPS, 24h após o cultivo sob agitação com 1g/L, 1.5g/L e 2g/L de microcarregadores com revestimento de Geltrex (GT).

Figura 20. Fotomicrografia em das células iPS, 120h após o cultivo sob agitação com 1g/L, 1.5g/L e 2g/L de microcarregadores sem revestimento de Geltrex (S-GT).

Figura 21. Fotomicrografia em das células iPS, 120h após o cultivo sob agitação com 1g/L, 1.5g/L e 2g/L de microcarregadores com revestimento de Geltrex (GT).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

c-Myc	Família de oncogenes MYC
CTE	Células-tronco embrionária
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EVs	Vesículas extracelulares
IM	Infarto do miocárdio
iPS	Célula-tronco de pluripotência induzida (do inglês <i>induced pluripotent stem cells</i>)
iPS-VEs	Vesículas extracelulares derivadas de célula iPS
ISEV	Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (do inglês <i>International Society for Extracellular Vesicles</i>)
KLF4	Fator tipo <i>Krüppel</i> 4 (do inglês <i>Krüppel-like factor 4</i>)
MEC	Matriz extracelular
MIR	Isquemia-Reperusão Miocárdica (do inglês <i>Myocardial ischemia-reperfusion</i>)
MISEV	Informações Mínimas para Estudos de Vesículas Extracelulares (do inglês <i>Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles</i>)
mRNAs	RNA mensageiro
MVs	Microvesículas
NPs	Nanopartículas (do inglês <i>nanoparticles</i>)
NVEPs	Nanopartículas extracelulares não vesiculares (do inglês <i>non-vesicular extracellular NPs</i>)
OCT3/4	Fator de transcrição ligador de octâmero 3/4 (do inglês <i>octamer-binding transcription factor 3/4</i>)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico (do inglês <i>potential of hydrogen</i>)

RNAi RNA de interferência

RNAs Ácido ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*)

SOX2 Região do cromossomo Y determinante do sexo – 2 (do inglês *sex determining region Y-box 2*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 DEFINIÇÃO E CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS-TRONCO	13
1.1.1 História e descoberta das células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) 14	
1.1.2 iPS e vesículas extracelulares.....	15
1.2 CONCEITO E FUNÇÃO BIOLÓGICA DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES (VES)	17
1.2.1 Classificação das Vesículas Extracelulares (VEs).....	19
1.2.2 Uso terapêutico das Vesículas Extracelulares (VEs).....	22
1.3 CONTEXTUALIZAÇÃO DO CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO IPS ...	23
1.3.1 Contextualização do cultivo em 3D de células-tronco ips.....	24
1.3.2 Uso de microcarregadores no cultivo de células iPS.....	25
1.3.3 Vantagens da cultura em suspensão de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS)	25
2 OBJETIVO	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 CULTIVO CELULAR	28
3.2 CONTAGEM CELULAR EM CULTIVO 2D.....	28

3.3 CULTIVO SOBRE MICROCARREGADORES.....	29
3.3.1 Microcarregadores: superfície de adesão.....	30
3.3.2 Microcarregadores: condições experimentais e tratamento por <i>Geltrex</i> ®.....	31
3.4 ISOLAMENTO DAS VES POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO.....	32
3.5 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS NO CULTIVO EM SUSPENSÃO	33
3.6 ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS.....	33
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 CULTIVO PRÉVIO EM 2D DE CÉLULAS IPS	35
4.2 CULTIVO ESTÁTICO DE CÉLULAS IPS SOBRE MICROCARREGADORES SYNTHEMAX® II E SYNTHEMAX® II TRATADO COM <i>GELTREX</i> ®.....	36
4.2.1 Avaliação do número de células no cultivo de células iPS sobre microcarregadores Synthemax® II e Synthemax® II tratado com <i>Geltrex</i> ®	40
4.3 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE VESÍCULAS SECRETADAS NO CULTIVO CELULAR ESTÁTICO SOBRE MICROCARREGADORES SYNTHEMAX® II E SYNTHEMAX® II TRATADO COM <i>GELTREX</i> ®.....	42
4.4 AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE CÉLULAS IPS EM MICROCARREGADORES DE COLÁGENO	43

4.5 CULTIVO SOB AGITAÇÃO DE CÉLULAS IPS SOBRE MICROCARREGADORES SYNTHEMAX® II E SYNTHEMAX® II TRATADO COM <i>GELTREX</i> ®	46
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÃO	55
7 REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO E CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são células indiferenciadas caracterizadas por sua capacidade de auto-renovação, isto é, de se dividir gerando células iguais a si mesmas e por sua capacidade em se diferenciar em células especializadas, característica denominada plasticidade (figura 1) (WATT *et al.*, 2000).

A plasticidade das células-tronco varia de acordo com o microambiente em que estão localizadas. Durante o processo de desenvolvimento embrionário, na etapa de gastrulação até a fase de mórula, encontra-se as células-tronco totipotentes, que podem formar um organismo por inteiro, pois são capazes de se diferenciar em todos os tipos de células, e podem formar os anexos embrionários, que são estruturas acessórias essenciais que relacionam a funções como nutrição, respiração, excreção e proteção do feto (GAGE, 2000).

Conforme o desenvolvimento progride, essas células vão perdendo gradativamente sua potencialidade (ROBEY, 2000). No estágio embrionário de blastocisto, na massa interna de células, encontramos as células-tronco embrionárias (CTE), que possuem capacidade pluripotente, ou seja, elas são capazes de se diferenciar em qualquer tipo de célula dos três folhetos embrionários:

- Mesoderma: Dá origem aos sistemas muscular, esquelético, cardiovascular, urinário e reprodutor.
- Ectoderma: Formam-se a epiderme e o sistema nervoso.
- Endoderma: Formam-se o tubo digestório e as glândulas anexas, origina também o revestimento interno de várias estruturas respiratórias.

No entanto, elas não são capazes de formar os anexos embrionários e, portanto, não têm a capacidade de formar um organismo por completo (ODORICO *et al.*, 2001; THOMSON *et al.*, 1998)

Já as células-tronco adultas são multipotentes, e podem ser encontradas na medula óssea por exemplo. Elas possuem a capacidade de se diferenciar apenas em tipos de células relacionados ao tecido de origem. (GALLACHER *et al.*, 2000; GRITTI *et al.*, 2002; VOGEL, 2000).

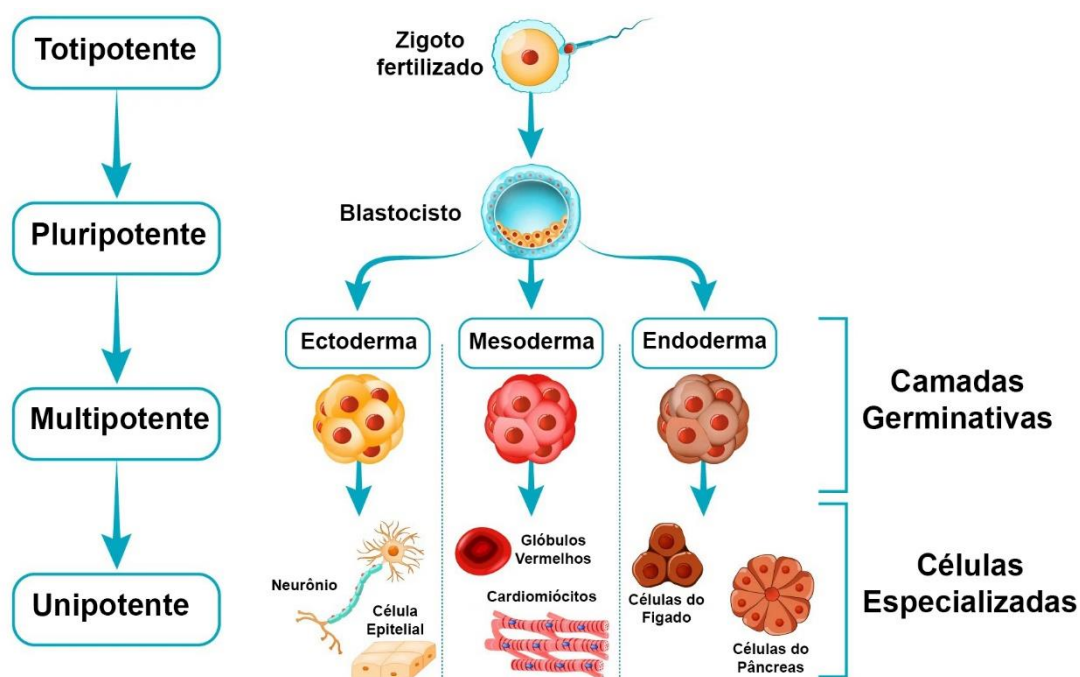


Figura 1: Esquema simplificado da potencialidade das células-tronco. As células-tronco classificam-se de acordo com sua potencialidade de diferenciação, que vai diminuindo à medida que se tornam mais especializadas. Após a fertilização o zigoto totipotente se divide em células mais especializadas e forma o blastocisto que contém as células pluripotentes ou embrionárias, capazes de se transformar em qualquer célula, podendo gerar qualquer tecido do organismo. Essas células se diferenciam em uma das três camadas germinativas, que produzem células e tecidos diferenciados (MACNEIL, 2022).

1.1.1 História e descoberta das células-tronco pluripotentes induzidas (iPS)

As células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês, *induced pluripotent stem cells* - iPSs), são células somáticas que foram reprogramadas em laboratório, tornando-se pluripotentes (capazes de se diferenciar em todas as células especializadas do organismo), característica somente encontrada na natureza em células-tronco embrionárias (TAKAHASHI *et al.*, 2007).

A descoberta e definição de iPS foi um marco importante no campo da medicina regenerativa, abrindo novas perspectivas na área e trazendo uma solução para as questões éticas. Em 2006, Takahashi e Yamanaka publicaram um estudo revolucionário descrevendo a reprogramação de células adultas somáticas em células pluripotentes através da introdução de quatro fatores de transcrição específicos: Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc. Esses fatores foram selecionados com base em seu papel crítico na manutenção da pluripotência durante o desenvolvimento embrionário. Sua

capacidade de se diferenciar em diferentes tipos de células permite a geração de tecidos e órgãos *in vitro* para estudos funcionais, modelagem de doenças e testes de fármacos (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006)

A descoberta das iPS ajudou a contornar questões éticas envolvidas no uso de células-tronco embrionárias, já que a obtenção dessas envolvia a utilização de embriões humanos, assim como contornou os problemas de rejeição pensando em sua aplicação clínica futura, uma vez que por sua origem ser autóloga, são compatíveis com o sistema imunológico do paciente

As iPS têm sido amplamente utilizadas em pesquisas em áreas como biologia do desenvolvimento e da patologia humanas, além de estudos que visam desenvolver novas estratégias terapêuticas para as mais diversas doenças (HIRSCHI *et al.*, 2014).

1.1.2 iPS e vesículas extracelulares

As células iPS têm um papel promissor na medicina de precisão uma vez que se tornam fontes inesgotáveis de células especializadas que podem ser utilizadas para terapia celular, permitindo a substituição de tecidos danificados ou perdidos devido a lesões ou doenças. A possibilidade de gerar iPS a partir de células somáticas do próprio paciente também abre caminho para a medicina personalizada, permitindo a produção de células especializadas autólogas, minimizando os riscos de rejeição e efeitos colaterais (YU *et al.*, 2007).

Os efeitos terapêuticos das células-tronco também podem ser atribuídos à secreção de fatores bioativos, chamados de secretoma. O secretoma consiste em todos os fatores liberados de forma ativa e passiva pela célula e inclui, entre outros, fatores de proteína solúvel, como fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e vesículas extracelulares (VEs), sendo estas subdivididas com base em sua biogênese, tamanho, densidade e marcadores de superfície (SIMEONE *et al.*, 2020). Vários estudos têm demonstrado que o papel benéfico das células-tronco, especialmente na reparação de tecidos danificados, não depende de seu enxerto e diferenciação no local da lesão, mas sim de sua atividade parácrina. (HAN *et al.*, 2016; MARINARO *et al.*, 2019; SIMEONE *et al.*, 2020)

O efeito parácrino das iPS tem sido amplamente descrito na literatura, e é fortemente associado a secreção de vesículas extracelulares por sua capacidade de modular seletivamente a sinalização celular e interagir com células-alvo, dessa forma

elas desempenham um papel fundamental na comunicação intercelular e estão diretamente envolvidas na regeneração tecidual, esse papel parácrino das VEs foi descrito pela primeira vez por Gneccchi e colaboradores (GNECCHI *et al.*, 2016).

Estudos demonstraram os efeitos terapêuticos de vesículas extracelulares derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS-VEs) em diversos modelos de doenças, evidenciando suas propriedades relacionadas à angiogênese, proliferação celular e inibição da apoptose (WANG, 2021). No contexto das doenças cardiovasculares, pesquisas emergentes indicam que as iPS-VEs promovem o reparo endógeno, resultando em melhorias na função cardíaca após um infarto do miocárdio (IM) (KHAN *et al.*, 2015).

Estudos conduzidos por Wang e Yingjie demonstraram que a administração intramiocárdica de iPS-VEs em um modelo animal de miocárdio isquêmico proporcionou proteção cardíaca contra lesão de isquemia/reperfusão miocárdica (MIR, do inglês *Myocardial ischemia-reperfusion*) (WANG *et al.*, 2015). Gao e colaboradores também demonstraram que vesículas extracelulares derivadas de cardiomiócitos de células iPS (iCM-VEs) exibem efeitos cardioprotetores em um modelo de infarto do miocárdio (IM) em suínos. Essas iCM-VEs demonstraram propriedades angiogênicas e antiapoptóticas, promovendo uma recuperação miocárdica melhorada, sem aumentar a incidência de complicações arritmogênicas (GAO *et al.*, 2020). Santoso e colaboradores também utilizaram a terapia com iCM-VEs em um modelo de infarto do miocárdio em camundongos, observando melhorias significativas na lesão do miocárdio, com redução da apoptose e da fibrose (SANTOSO *et al.*, 2020).

Os resultados dessas pesquisas indicam que as VEs secretadas por iPS ou cardiomiócitos derivados de iPS apresentam efeitos protetores para o coração, por meio da entrega de moléculas protetoras às células danificadas, regulando processos como a apoptose, inflamação, fibrose e angiogênese.

As iPS também produzem determinados fatores moduladores que atuam na regulação direta das células adjacentes. Um estudo conduzido por Loh, Charles Yuen Yung e colaboradores demonstrou que as iPS regulam os fatores de crescimento do nervo, como o fator neurotrófico 3, promovendo a recuperação e regeneração do nervo ciático (LOH *et al.*, 2016). Esses fatores moduladores liberados pelas iPS podem ser encontrados na forma de vesículas extracelulares (iPS-VEs). Desse modo,

as iPS-VEs podem ser consideradas uma estratégia terapêutica que dispensa a administração de células em pacientes enfermos. Além disso, pequenas VEs derivados das iPS também têm sido evidenciados como portadores de fatores pluripotentes, apresentando um grande potencial para aplicações na medicina regenerativa sem a necessidade de uso de células.

Os principais efeitos das vesículas como imunomoduladores no campo da medicina regenerativa, em estudos *in vivo* utilizando VEs em modelos murinos, foram descritos em uma revisão por Silva e colaboradores, estão relacionados na modulação da atividade de células imunes, como também seu possível papel na remodelação de matriz extracelular, ambos relacionados a reparação tecidual no processo inflamatório (SILVA *et al.*, 2017).

1.2 CONCEITO E FUNÇÃO BIOLÓGICA DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES (VES)

As vesículas extracelulares são definidas como pequenas estruturas membranosas formadas por uma bicamada lipídica composta por fosfolipídios, colesterol e proteínas que são secretadas por todos os tipos celulares. Essa membrana protege o conteúdo interno das VEs e permite sua interação com outras células (COLOMBO *et al.*, 2014; THÉRY *et al.*, 2018).

As VEs liberadas pelas células para o meio extracelular desempenham um importante papel na comunicação intercelular e na transferência de informações biológicas, atuando como vetores de transporte ou transdutores de sinal que podem fornecer informações biológicas específicas por serem carreadores de fatores, como mediadores lipídicos, proteínas (citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento ou outros mediadores de transdução de sinal), material genético (mRNAs, RNAs não codificantes longos/curtos, DNA nuclear) dentre outras moléculas bioativas (LV *et al.*, 2019; PARAYATH *et al.*, 2020; VAN NIEL *et al.*, 2018). O conteúdo da vesícula recebe o nome de carga, de forma que a carga é heterogênea e varia dependendo do tipo de célula, das variações do microambiente e dos agentes que desencadeiam a liberação dessas (figura 2). Elas podem ser liberadas por células saudáveis ou células em condições patológicas, como células cancerosas, células infectadas por vírus ou células inflamatórias (SIMEONE *et al.*, 2020).

A estabilidade estrutural das VEs mantém sua carga protegida contra a degradação por enzimas extracelulares presentes nos fluidos biológicos, mantendo assim a sua estabilidade biológica por períodos mais longos. Dessa forma as VEs conseguem circular sistemicamente modulando o comportamento, função e resposta fisiológica, podendo ser detectadas praticamente em todos os fluidos corporais, incluindo sangue, linfa, urina, líquido cefalorraquidiano, saliva, leite, lágrimas e outros fluidos corporais (KOMURO *et al.*, 2022; PIERAGOSTINO *et al.*, 2018). Ainda que os mecanismos responsáveis por mediar os efeitos biológicos das VEs em seus alvos celulares sejam pouco compreendidos, está claro que as VEs estão envolvidas na maioria, senão em todos os processos fisiopatológicos, incluindo transdução de sinal, crescimento e diferenciação celular, regulação de processos metabólicos, desenvolvimento embrionário, organogênese, homeostase e reparo/regeneração tecidual. É importante ressaltar que as características específicas das VEs podem variar dependendo do tipo de VE, da célula de origem e do contexto fisiológico ou patológico (COLOMBO *et al.*, 2014; LO CICERO *et al.*, 2015; PANAGIOTOU *et al.*, 2018; YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015) .

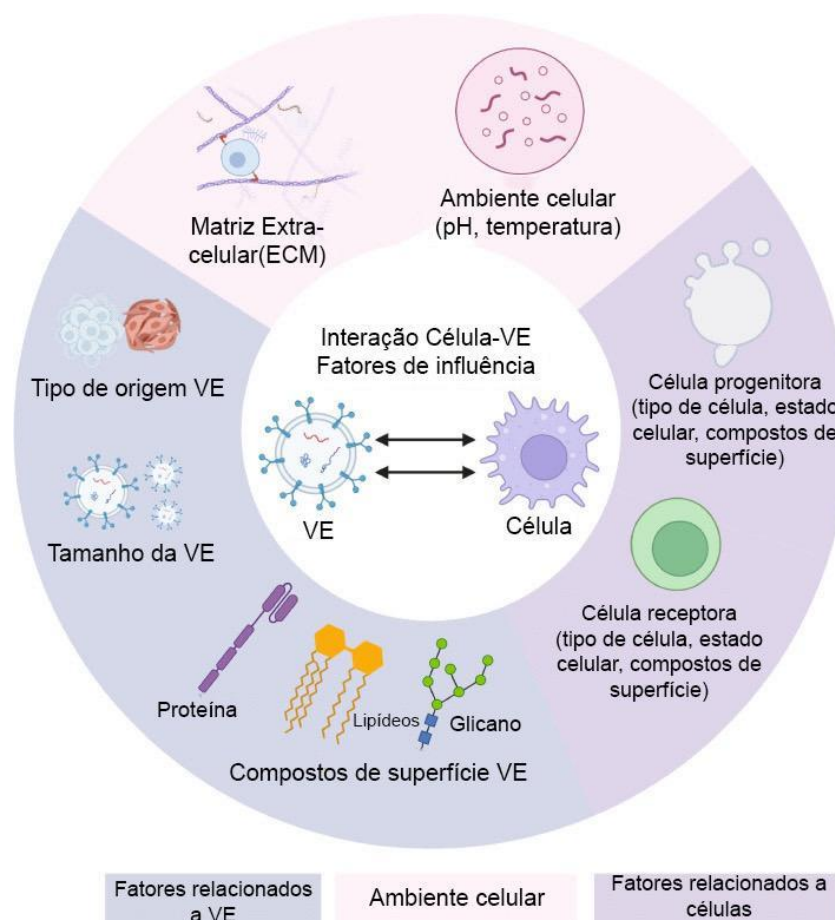


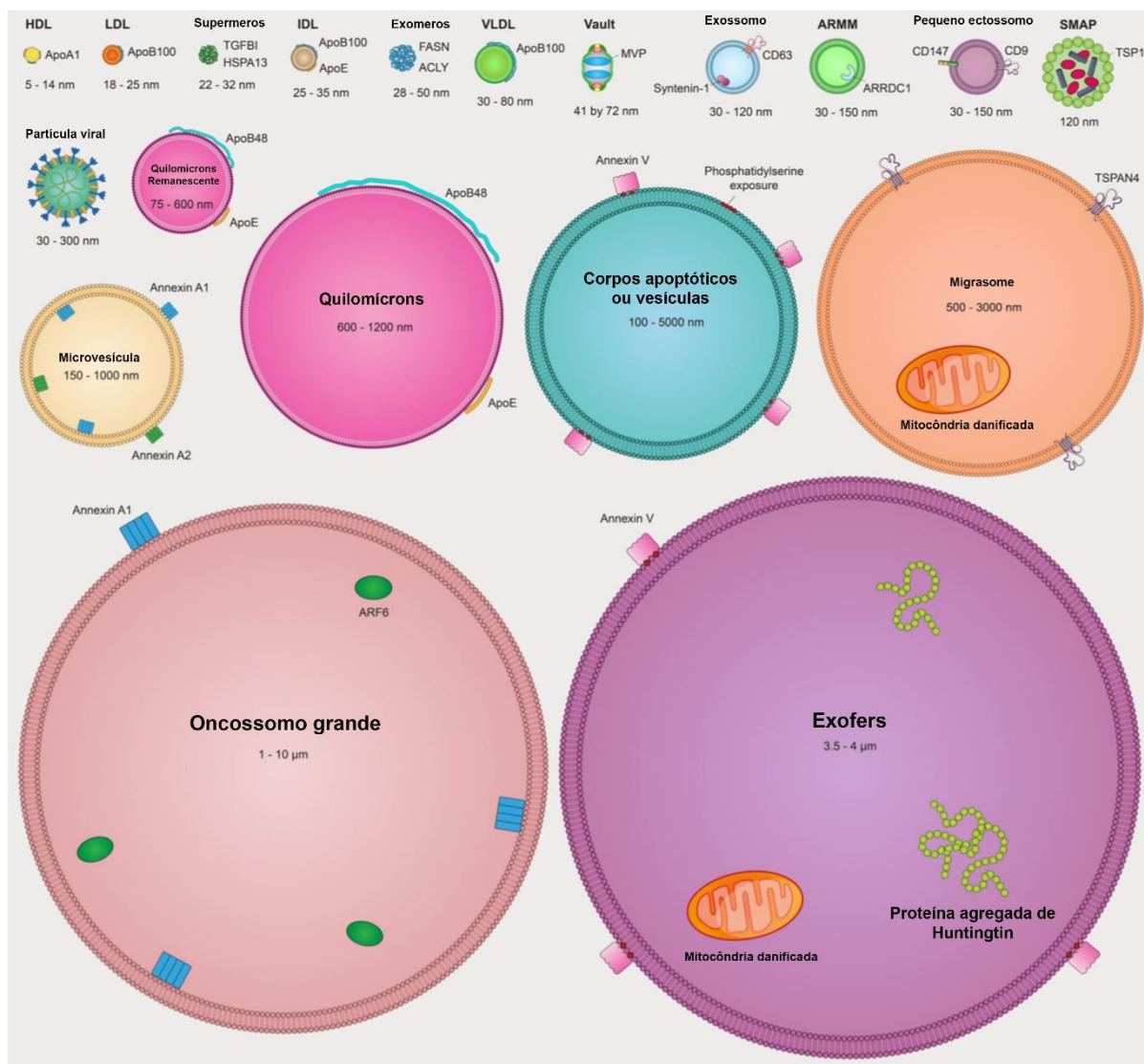
Figura 2: Os fatores que influenciam a interação VE-Célula. Os fatores de influência incluem as moléculas características expostas relacionadas a VE, célula progenitora e célula receptora; e os ambientes celulares das VEs. As moléculas de superfície características incluem proteína, lipídio e glicano, enquanto os ambientes celulares incluem temperatura, pH e matriz extracelular (MEC). (LIU; WANG, 2023).

1.2.1 Classificação das Vesículas Extracelulares (VEs)

As VEs são classificadas em diferentes subtipos com base em sua biogênese, marcadores de superfície, função e tamanho. As principais vias de biogênese estudadas são as dos exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos.

Os avanços recentes em métodos analíticos e de isolamento levaram à identificação de um número crescente de tipos de VEs, mudando a compreensão do campo de vesículas extracelulares (VEs) e nanopartículas (NPs), demonstrando uma diversidade e complexidade muito maiores de transportadores extracelulares de proteínas e ácidos nucleicos (figura 3). As células liberam no espaço extracelular e fluidos corporais não apenas VEs de bicamada lipídica, como exossomos, mas também NPs extracelulares não vesiculares (do inglês, *non-vesicular extracellular NPs*), como exômeros e supermeros, ambos contendo proteínas distintas e ácidos

nucleicos. Supermeros são um tipo recém-descoberto de NP extracelular amembranoso de 15 a 25 nm que contém RNA e muitas proteínas previamente associadas a exossomos e outras VEs (figura 4). (COLOMBO *et al.*, 2014; JEPPESEN *et al.*, 2023; THÉRY *et al.*, 2018).



Trends in Cell Biology

Figura 3: O mundo das vesículas extracelulares (VEs) e nanopartículas (NPs). A maioria das células de mamíferos tem entre 10 e 100 µm de diâmetro e pode liberar uma diversidade de VEs heterogêneas e NPs extracelulares não vesiculares (NVEPs) variando em tamanho de ~ 5 nm até > 5 µm. Os tamanhos sobrepostos de muitos VEs e NVEPs tornam difícil separá-los completamente. (JEPPESEN *et al.*, 2023)“Extracellular Vesicles and Nanoparticles: Emerging Complexities.” *Trends in Cell Biology*, vol. 0, no. 0, Feb. 2023, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.01.002>.

Devido à falta de consenso em relação a marcadores específicos para subtipos de vesículas extracelulares, como nos “exossomos” de origem endossomal e “ectossomas” derivados da membrana plasmática (como as

microvesículas/micropartículas), atribuir um VE a uma determinada via de biogênese segue sendo extremamente difícil, pois necessitaria que a VE seja pego no ato de sua biogênese (figura 4), dessa forma, a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) propôs então Informações Mínimas para Estudos de Vesículas Extracelulares (MISEV) em 2014, essas diretrizes foram atualizadas em 2018, para garantir e melhorar a qualidade da pesquisa de VE.

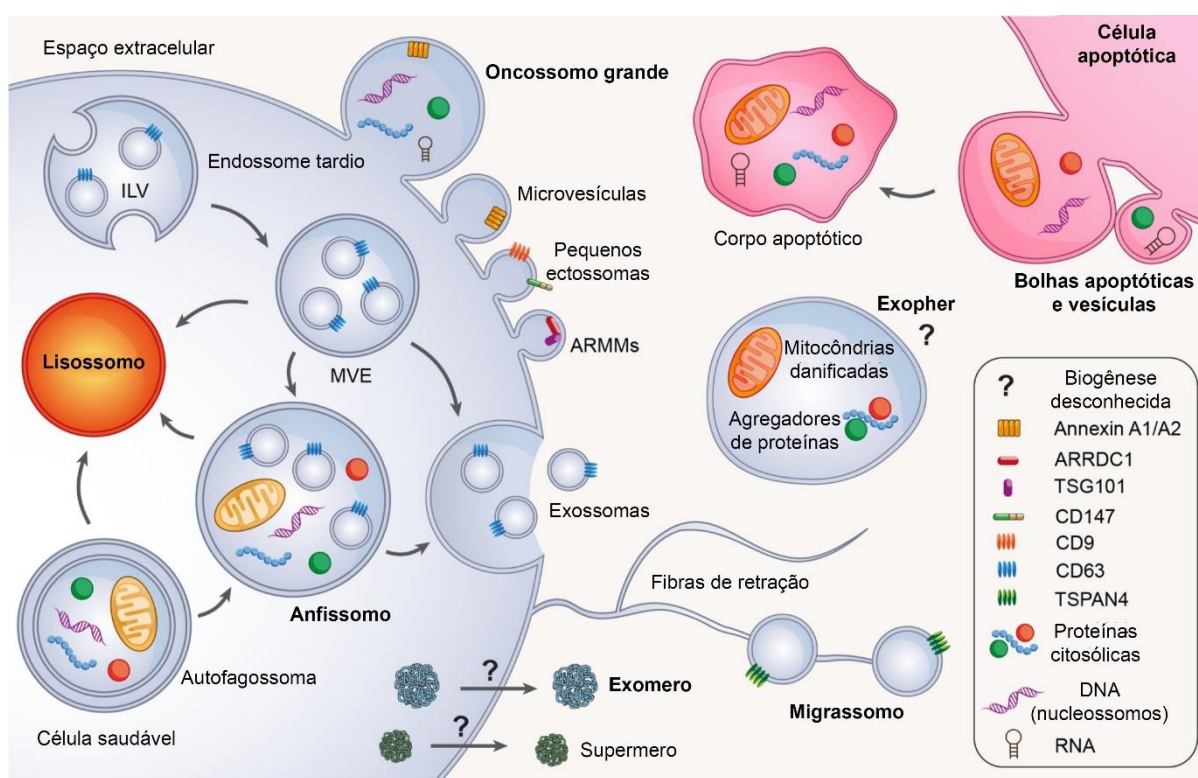


Figura 4: Representação das vias de biogênese de vesículas extracelulares (VEs) e nanopartículas selecionadas (NPs). O estudo de vesículas extracelulares (EVs) e nanopartículas (NPs) está em rápido crescimento devido a descobertas recentes que revelaram uma maior complexidade e diversidade dessas partículas membranosas. (JEPPESEN et al., 2023) "Extracellular Vesicles and Nanoparticles: Emerging Complexities." *Trends in Cell Biology*, vol. 0, no. 0, Feb. 2023, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.01.002>.

Portanto, a menos que se estabeleça marcadores específicos de origem subcelular que sejam confiáveis dentro do sistema(s) experimental(is) utilizados, o termo a ser utilizado de acordo com as diretrizes da MISEV 2018 para descrever os subtipos de VEs, é baseado em suas características físicas, como:

- Tamanho (pequenas VEs (do inglês "small EVs" (sEVs)) e médio/grandes VEs (do inglês "medium/large EVs" (m/IEVs)), com intervalos definidos, por exemplo, respectivamente, < 100 nm ou < 200

- nm [pequenas vesículas], ou > 200 nm [grandes e/ou médias vesículas] ou densidade (baixa, média, alta, com cada intervalo definido);
- b) Composição bioquímica (CD63+/CD81+ VEs, VEs marcadas com Anexina A5, etc.); ou
 - c) Descrições das condições ou célula de origem (VEs de podócitos, VEs hipóxicas, oncosomas grandes, corpos apoptóticos), em substituição aos termos como exossomo e microvesícula, que historicamente têm sido associados a múltiplas e contraditórias definições e expectativas imprecisas de biogênese única.

Se a confirmação da identidade VE não puder ser alcançada de acordo com os requisitos mínimos da publicação MISEV 2018, outros termos, como partícula extracelular (EP - do inglês *extracellular particle*), serão mais apropriados (*THÉRY et al., 2018*).

1.2.2 Uso terapêutico das Vesículas Extracelulares (VEs)

Devido à sua capacidade de transportar moléculas biologicamente ativas, as VEs podem ser exploradas para uma ampla gama de aplicações terapêuticas (figura 5) (*GURUNATHAN et al., 2019*):

1. Diagnóstico: elas podem servir como marcadores de diagnóstico para várias condições de saúde, pois seu conteúdo reflete o estado atual das células originais. Essa análise do conteúdo das VEs fornece então informações sobre doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e neoplasias (*SAHOO et al., 2021*);
2. Transporte de fármacos: As VEs podem ser veículos de entrega de fármacos e direcioná-las a células específicas no organismo. Devido a sua natural biocompatibilidade e sua capacidade de atravessar barreiras biológicas, como a barreira hematoencefálica, elas podem ser carreadoras eficientes de moléculas terapêuticas para locais específicos no organismo. Permitindo assim uma melhor eficiência e precisão de entrega de medicamentos e reduzindo os efeitos colaterais indesejados. (*PARAYATH et al., 2020*);
3. Terapia gênica: As VEs podem carregar ácidos nucleicos, como RNA e DNA, que podem ser transferidos para células-alvo. Essa transferência de material genético pode influenciar a expressão gênica e a função celular, oferecendo

potenciais benefícios terapêuticos. Por exemplo, as VEs podem ser utilizadas para entregar RNA de interferência (RNAi) ou microRNAs com propriedades terapêuticas específicas, como a inibição de genes associados a doenças, isso abre caminho para a terapia gênica, em que genes com alterações patogênicas podem ser corrigidos ou sequências corretas podem ser introduzidas para tratar doenças genéticas (FRENCH *et al.* 2017; MULCAHY *et al.*, 2014)

4. Imunoterapia: As VEs podem modular o sistema imunológico, seja estimulando ou suprimindo a resposta imune. Isso pode ser explorado no desenvolvimento de terapias imunomoduladoras para doenças autoimunes, câncer e outras condições relacionadas ao sistema imunológico (FUJITA *et al.*, 2018)

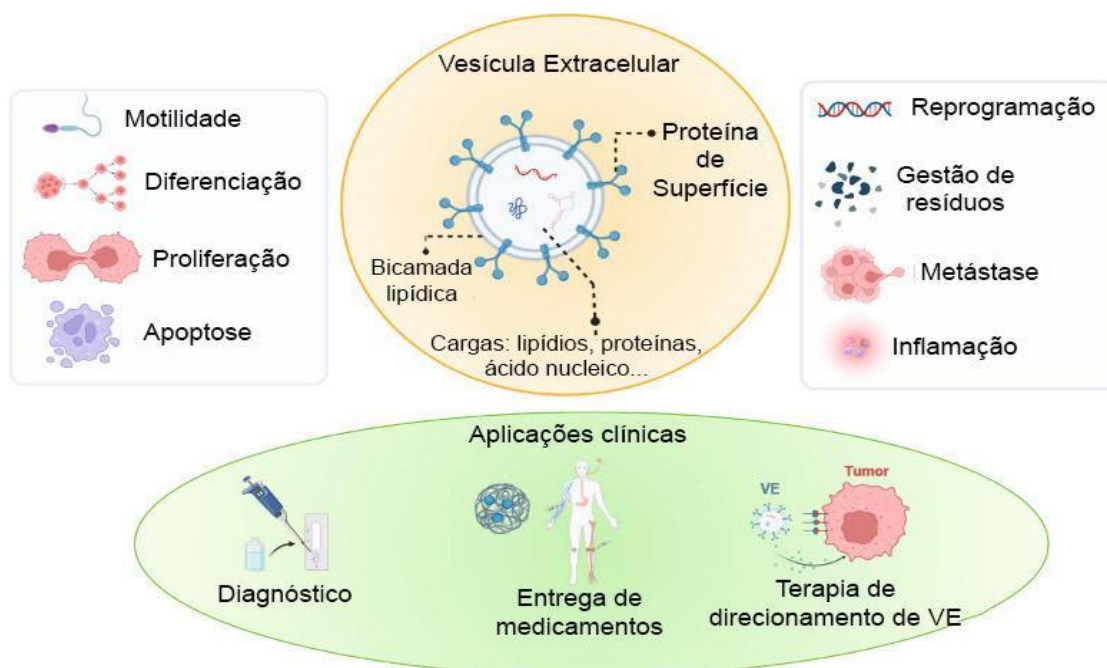


Figura 5: Uma introdução geral as VEs, incluindo composição, processos fisiológicos e patológicos relacionados e suas aplicações clínicas. Os processos biológicos associados as VEs são relevantes para o seu potencial clínico, como o diagnóstico baseado em suas propriedades de biomarcadores, administração de drogas com propriedades de direcionamento e terapia direcionada usando suas propriedades de comunicação. (LIU; WANG, 2023), “A Review of the Regulatory Mechanisms of Extracellular Vesicles-Mediated Intercellular Communication.”

1.3 CONTEXTUALIZAÇÃO DO CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO IPS

O cultivo de células iPS é tradicionalmente feito em monocamada (2D) sobre matriz extracelular. No cultivo em 2D, as células são dispostas em uma única camada uniforme em uma superfície plana, como uma placa de cultura, onde essa superfície

é tratada posteriormente com uma solução contendo a matriz extracelular que seja compatível com o cultivo da célula de interesse para adesão e proliferação celular.

A matriz extracelular (MEC) é uma rede tridimensional dinâmica de macromoléculas que fornece suporte estrutural para as células e tecidos. E desempenha papéis reguladores importantes, uma vez que orquestra a sinalização celular, funções, propriedades e morfologia. Em culturas de células-tronco, a ancoragem a um substrato é especialmente importante para manter as células-tronco em um estado não diferenciado (pluripotente) (KARAMANOS et al., 2021).

A MEC pode ser de origem sintética como o Synthemax, matriz comercial sintética baseado em peptídeo sintético de vitronectina humana; ou de origem animal como Matrigel ou Geltrex, que são matrizes derivadas de membrana basal do tumor de sarcoma de camundongo Engelbreth-Holm-Swarm, cultivado e extraído diretamente de camundongos, que contém uma mistura de proteínas de camundongo (incluindo proteínas ECM) e fatores de crescimento que variam de lote para lote (BARNES et al., 2022).

1.3.1 Contextualização do cultivo em 3D de células-tronco ips

A cultura de células em 3 dimensões (3D), é uma abordagem para cultivo celular em que as células são mantidas em um meio de cultura líquido, permitindo que elas cresçam e interajam em um ambiente tridimensional. Nesse método, ao contrário das culturas de células tradicionais, onde as células estão aderidas a uma superfície sólida em placas de cultura bidimensionais, as células em cultura 3D estão aderidas em uma matriz ou suporte tridimensional (scaffolds), podendo ser biológica ou sintética.

A cultura em 3D tem uma grande relevância no cenário da terapia celular e medicina regenerativa por promover uma interação célula-célula e célula-matriz de forma mais completa e eficaz. Por simular um ambiente natural, as células em um ambiente tridimensional têm uma organização espacial mais próxima daquela

encontrada nos tecidos e órgãos do corpo humano, permitindo a formação de estruturas multicelulares, uma melhor recapitulação das características fisiológicas e funcionais dos tecidos (YLOSTALO, 2020).

1.3.2 Uso de microcarregadores no cultivo de células iPS

Microcarregadores são partículas ou estruturas tridimensionais, são pequenas esferas (podendo variar de 100 a 300 microns) capazes de permanecer em suspensão durante a agitação e podem ser utilizados como suportes 3D no cultivo em suspensão de células. Esses microcarregadores são geralmente feitos de materiais biocompatíveis, como polímeros ou vidro, e possuem uma superfície que permite a adesão das células, podendo ter diversas características como porosa, texturizada, revestidas por biopolímeros ou outras matrizes de interesse.

Os sistemas de cultura de células baseados em microcarregadores são relativamente flexíveis, pois promovem um maior rendimento celular e também podem ser integrados a sistemas de fabricação de bioprocessos existentes, como biorreatores agitados e frascos giratórios. Como as células-tronco requerem uma superfície de suporte para a divisão celular, os microcarregadores são frequentemente adicionados aos meios de cultura para fornecer a superfície de fixação adequada para iPS em cultura tridimensional em suspensão (RAFIQ *et al.*, 2013; YEKRANGSAFAKAR *et al.*, 2018).

1.3.3 Vantagens da cultura em suspensão de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS).

O cultivo em suspensão baseados em microcarregadores apresenta vantagens significativas em relação às culturas em placas tradicionais, destacando-se a escalabilidade do processo.

Os microcarregadores fornecem um suporte tridimensional que permite a fixação de células aderentes, formando complexos célula-microcarregador suspensos em meio de cultura. Essa configuração tridimensional propicia um ambiente favorável para o crescimento células aderentes em cultivo em suspensão (HANDRAL *et al.* 2023; KOMURO *et al.*, 2022). Esses microcarregadores aumentam a área de superfície disponível para essas células, facilita sua distribuição, coleta e transferência

entre diferentes sistemas de cultura, como os biorreatores, permitindo a escalabilidade do processo de cultivo em suspensão e a produção em larga escala de células-tronco ou outros tipos de células (HANDRAL *et al.*, 2023).

O uso de biorreatores proporciona um ambiente no qual as condições de cultura podem ser controladas e monitoradas, pois permitem a otimização dos parâmetros de cultivo, como o pH, a temperatura, a taxa de agitação, a aeração e a oferta de nutrientes, melhorando a taxa de crescimento e a viabilidade das células (CUESTA-GOMEZ *et al.*, 2023) resultando em uma maior padronização e reprodutibilidade do processo de cultivo. Isso promove a expansão das células iPS e a produção das VEs de forma mais eficiente e padronizada, assegurando a qualidade e a uniformidade das VEs produzidas, especialmente em relação ao seu conteúdo bioativo (KOH *et al.*, 2020; OLMER *et al.*, 2012; TSAI *et al.*, 2021; ZWEIGERDT *et al.*, 2011).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é a avaliação da adesão de células iPS no cultivo sobre microcarregadores para posterior utilização em cultivo de células em biorreator para obtenção de vesículas extracelulares derivadas dessas células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) para fins terapêuticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivo bidimensional das células iPS;
- Cultivo em microcarregadores Synthemax II e Collagen;
- Avaliar adesão célula-microcarregador nos diferentes revestimentos de matrizes extracelulares – vitronectina, colágeno e Geltrex;
- Tratamento de microcarregadores Synthemax II e Collagen por Geltrex;
- Análise de VEs secretadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTIVO CELULAR

Neste estudo foi utilizado uma linhagem de iPS proveniente de um doador saudável, que foi previamente gerada e caracterizada quanto à pluripotência, expandidas e criopreservadas pelo nosso grupo (KASAI-BRUNSWICK, 2018).

As iPS foram descongeladas e cultivadas a 37 °C, em atmosfera úmida e na presença de 5% CO₂, em placas de 100 mm tratadas previamente com *Geltrex*® (Gibco, cat. A1413202; diluição 1:100) em meio StemFlex (Thermo Scientific, cat. A3349401), e para minimizar a mortalidade celular é acrescido 10 µM de *Y-27632 dihydrochlorid*. O *Y-27632* é um agente inibidor de apoptose que atua como um antagonista competitivo do sítio de ligação de ATP da Rho quinase, exercendo uma ação inibitória nas atividades da p160-Rho (também conhecida como ROCK1) (DARENFED *et al.*, 2007).

As células iPS foram cultivadas utilizando 6 mL do meio Stemflex, com trocas diárias de meio, o inibidor foi adicionado ao meio apenas durante as primeiras 24 horas após as células serem plaqueadas. As células são mantidas em cultivo até atingirem uma confluência de 90-100%, o que normalmente ocorreu em um período de 4-5 dias. Após a obtenção dessa confluência, as células iPS foram dissociadas para posterior utilização em microcarregadores

3.2 CONTAGEM CELULAR EM CULTIVO 2D

A contagem de células para cultivo sobre microcarregadores foi feita na câmara de Neubauer. As células iPS dissociadas foram retiradas da placa de cultivo, transportadas para um tubo cônico de 15 mL (descritos no item 3.2). Foi retirado 10 µL da suspensão celular e homogeneizado com 10 µL de azul de tripan (SIGMA, cat. T6146, do inglês *Trypan Blue*) e transferido 10 µL dessa nova solução para a câmara de Neubauer. A contagem das células foi feita nas 4 áreas demonstradas na Figura 7 (A, B, C e D) no microscópio invertido *EVOS Cell Imaging System*. O valor obtido em cada quadrante é somado e dividido por 4 para se obter a média. A média foi multiplicada pelo fator de diluição e pelo volume que as células foram ressuspensas. Para obter o número de células/ml, o valor obtido foi corrigido multiplicando por 10.000 (10⁴).

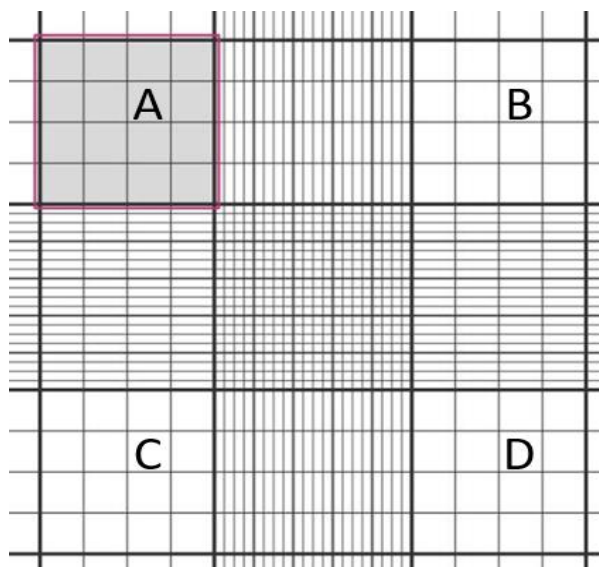


Figura 6. Desenho esquemático da câmara de Neubauer.

Dessa forma temos:

$$\text{n}^{\circ} \text{ de células/ml} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ total de células}}{\text{n}^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times \text{volume de ressuspensão} \times 10.000$$

3.3 CULTIVO SOBRE MICROCARREGADORES

Para os testes de cultivo 3D de células iPS (figura 6), as células iPS plaqueadas anteriormente em placas de 100 mm foram dissociadas, e coradas utilizando azul de tripan para contagem e viabilidade dessas células (descrito no item 3.2) em câmara de Neubauer e cultivadas sobre microcarregadores em placas de 6 poços não aderente (Corning, cat. 3471).

Para a dissociação dessas células aderidas à placa, o meio de cultura foi descartado e foram adicionados 3ml da enzima recombinante TrypLE™ Express (Gibco, cat.12604013) e incubadas na estufa a 37 °C por cinco minutos. Após isso, foi adicionado o dobro do volume de solução salina tamponada com fosfato (PBS; LGC Biotecnologia, cat. 13-30258-05), o conteúdo foi recolhido e despejado em um tubo tipo falcon de 15mL. As iPS foram contadas na câmara de Neubauer (discutido no item 3.2), foi separado o número adequado de células a serem cultivadas ao microcarreador (discutido no item 3.2.1).

As iPS foram centrifugadas a 300 x g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuscitado em 1ml de meio StemFlex para cada condição de cultivo; os microcarregadores também foram previamente diluídos em água para injeção conforme as instruções do fornecedor, separados na quantidade adequada (discutido no item 3.2.1) em tubos tipo falcon de 15mL, deixados em descanso por 5-10 minutos para que as partículas decantem, o sobrenadante foi descartado e os microcarregadores foram ressuscitados em 1ml de meio StemFlex para cada condição. Esses microcarregadores foram então colocados em placas de 6 poços, após isso as células são cultivadas, somando um volume final de 2ml de meio para cada poço, após é acrescido 10 μ M do inibidor de apoptose (iRock) e foram mantidas em cultivo por 120 horas (5 dias) com trocas diárias de meio.

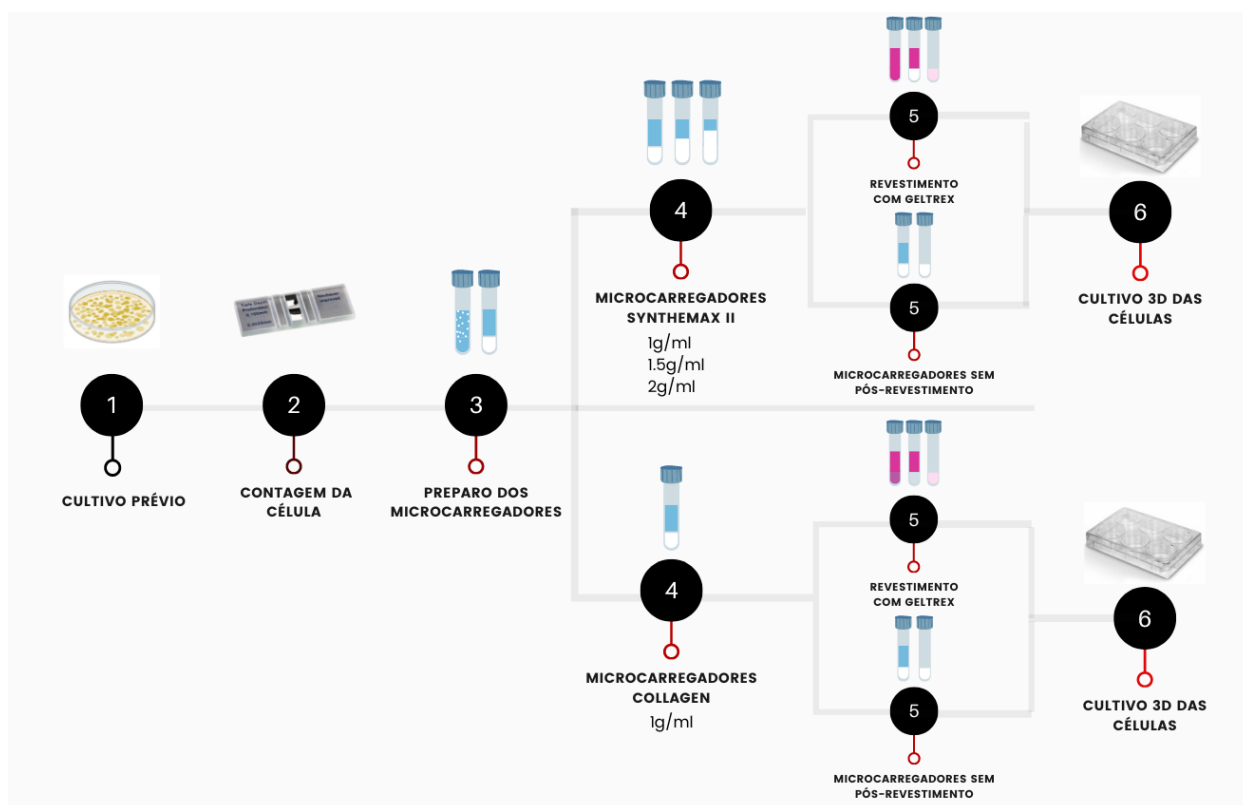


Figura 7: Representação do desenho experimental para cultivo de iPS em microcarregadores.

3.3.1 Microcarregadores: superfície de adesão

Foram utilizados microcarregadores Synthemax® II (Corning, cat. 7288) e Collagen® (Corning, cat. 7285), que atuaram como suporte físico para células cultivadas ajudando em sua adesão e proliferação.

Para avaliar o desempenho desses microcarregadores, como suporte de cultivo 3D, dividimos em 4 grupos experimentais: Synthemax® II (S-GT), Collagen®, Synthemax® II com tratamento por *Geltrex*® (GT) e Collagen® com tratamento por *Geltrex*®.

O Synthemax® II é feito de poliestireno USP Classe VI e sua superfície é revestida com um acrilato de peptídeo sintético patenteado otimizado para expansão de células-tronco para melhorar a fixação celular, maximizando o rendimento e a viabilidade celular. Já o Collagen®, também feito de poliestireno USP Classe VI, tem sua superfície revestida por colágeno tipo I.

Também avaliamos o tratamento desses microcarregadores, Synthemax® II e Collagen®, com a matriz *Geltrex*® da Gibco/Thermo Fisher Scientific® que consiste em um extrato de membrana basal que contém laminina, colágeno IV, entactina e proteoglicanos de sulfato de heparina, e suporta o crescimento de uma variedade de células em cultura celular 2D e 3D, como células primárias e células-tronco.

3.3.2 Microcarregadores: condições experimentais e tratamento por *Geltrex*®

Para avaliação da adesão das células iPS, utilizamos 3 concentrações diferentes nos microcarregadores Synthemax® II (S-GT) e Synthemax® tratado com a matriz *Geltrex*® (GT), 1g/L, 1.5g/L e 2g/L; para cada concentração definimos um número de célula a ser cultivado, $3,8 \times 10^5$, $7,6 \times 10^5$ e $1,14 \times 10^6$, respectivamente – a proporção microcarregador x célula foi definida em estudos anteriores feitos em nosso laboratório, onde foi levado em consideração o dobro da área de superfície dos microcarregadores para um cultivo em suspensão ideal – ambas condições experimentais (S-GT e GT) dos microcarregadores Synthemax® II foram cultivadas em agitação e estáticas.

Para avaliação do desempenho tratamento por *Geltrex*® utilizamos os microcarregadores de Collagen®. Utilizamos a concentração de 1g/L para $3,8 \times 10^5$ de célula, nas condições com e sem tratamento por *Geltrex*® em cultivo estático.

Os microcarregadores Synthemax® e Collagen® que receberam o tratamento com *Geltrex*®, foram separados nas concentrações experimentais citadas anteriormente (1g/L, 1.5g/L e 2g/L) e deixados em descanso por 5-10 minutos para que as partículas decantem, o sobrenadante foi descartado e os microcarregadores

foram ressuspensos em 0,5ml da solução de *Geltrex*® durante 24h na estufa a 37°C sob lenta agitação em um aparelho homogeneizador/agitador (do tipo gangorra). Em seguida, foram deixados em descanso para que decantassem e assim retirar a solução e ressuspendemos em 1ml de meio StemFlex.

3.4 ISOLAMENTO DAS VES POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO

Para o processo de isolamento das vesículas extracelulares, o meio de cultivo, em que as células foram mantidas nos grupos Synthemax® II S-GT e GT, foi recolhido a partir das 48h, onde o meio está livre do inibidor de apoptose, e a cada troca de meio, que ocorre a cada 24h, o meio foi recolhido e assim em diante até o quinto e último dia de cultivo, completando 120 horas.

O meio recolhido passou por um processo de centrifugação à 2000xg por 20min, o sobrenadante foi preservado, e posteriormente submetido a ultracentrifugação à 100.000xg por 3h. Ao final da ultracentrifugação, obtemos um pellet e as vesículas foram ressuspensas em 100 µL de meio RPMI1640 (Sigma-Aldrich, cat. R8755), livre de vermelho de fenol, com 1% de DMSO (SIGMA, cat. D2660-100ML) e armazenadas no freezer a -80°C para posterior análise.

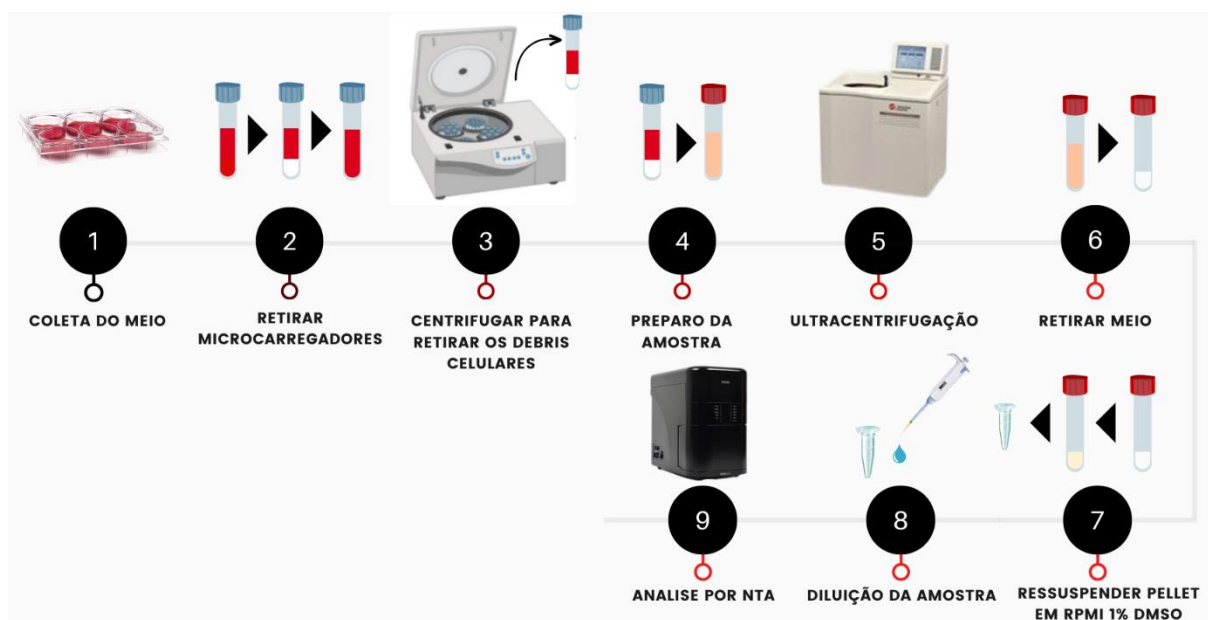


Figura 8: Representação do desenho experimental para isolamento e análise por NTA de VEs secretadas por células iPS em cultivo sobre microcarregadores.

3.5 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS NO CULTIVO EM SUSPENSÃO

A determinação do número de células em suspensão sobre microcarregadores Synthemax® II dos grupos S-GT e GT em cultivo estático ao final dos 5 dias de cultivo (120 horas) foram avaliadas por contagem de núcleos corados com cristal violeta em câmara de Neubauer. Uma alíquota de 200µL foi retirada direto de cada poço contendo as células aderidas aos microcarregadores e transferidas para microtubos do tipo eppendorf de 1,5ml, e foi adicionado 800µL da solução composta por 0,1% de cristal violeta, 0,1M de ácido cítrico (Vetec, cat. 00237.08) e 0,1% de triton (Riedel-de Haën™, cat. 56029), responsável por lisar essas células, e cristal violeta que irá corar o núcleo, possibilitando assim sua contagem. A amostra deve descansar a 37°C por 1h e depois agitada no vórtex por 20s, posteriormente 10 µL dessa nova solução é transferido para a câmara de Neubauer.

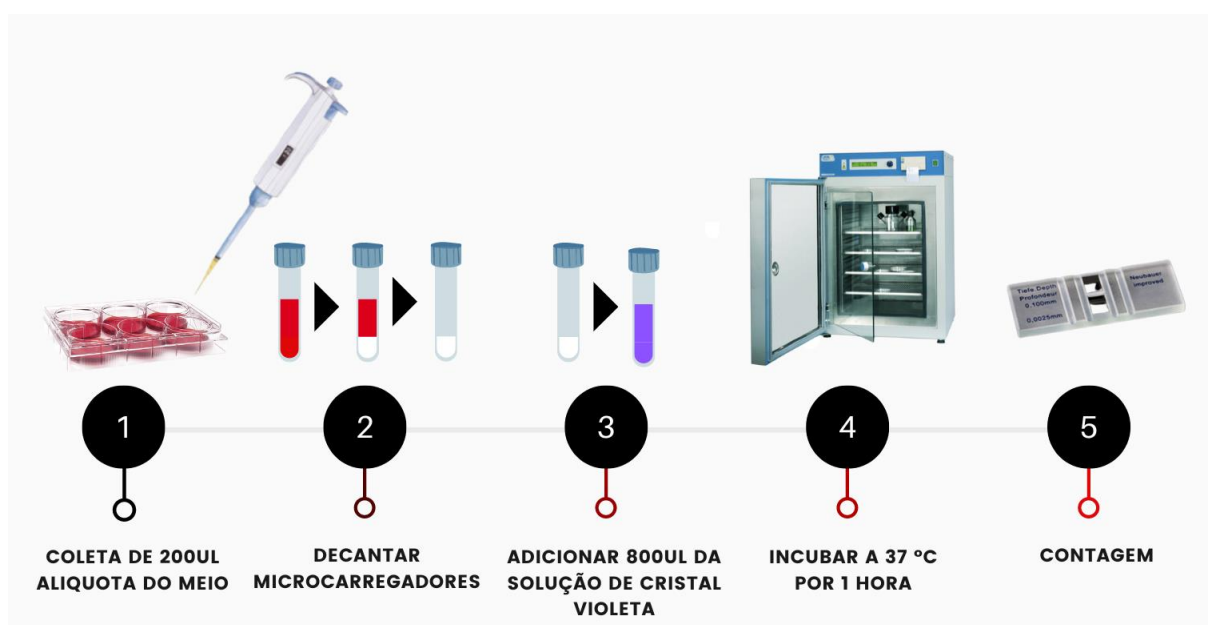


Figura 9: Representação do desenho experimental para contagem do núcleo de iPS cultivado sobre microcarregadores.

3.6 ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS

A VEs isoladas (descritas no item 3.4) foram provenientes de uma triplicata da condição de 1g/L de Synthemax® II dos grupos S-GT e GT. Para a quantificação, 20µL das VEs isoladas foram diluídas em 680µL de PBS filtrado duas vezes, e foram

quantificadas e caracterizadas pelo diâmetro através do programa de Análise de Rastreamento de Nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis - NTA) no NanoSight NS300. Classificadas de acordo com as diretrizes descritas no MISEV 2018 (discutidas no item 1.2.1) como *small EVs* (sEVs) (100nm - 200nm) e *médium/large EVs* (m/lEVs) (> 200 nm).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os foram expressos como média \pm desvio padrão e foram avaliadas com o teste one-way e 2way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Um valor de P menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 CULTIVO PRÉVIO EM 2D DE CÉLULAS IPS

A primeira etapa deste estudo consistiu em expandir previamente as células IPS em cultura 2D, para isso foi descongelado iPS criopreservadas para expandi-las na placa de 100 mm por 4-5 dias, tempo necessário para se obter uma confluência em torno de 90-100%. A morfologia das iPS em monocamada, antes de atingirem alta confluência, consiste em colônias compactas com bordas bem definidas, características semelhantes às das células-tronco embrionárias (CTE).

Ao observar sua morfologia após o plaqueamento, as iPS exibem uma forma alongada semelhante à de fibroblastos após 24h de descongelamento. Essa forma pode ser atribuída à presença do iROCK, um inibidor de apoptose, nas primeiras 24 horas de cultivo (figura 10: A-B). No entanto, com o passar do tempo, as iPS se organizam em colônias com morfologia semelhante às CTE, com bordas definidas e células justapostas (figura 10: C-D). Tais características são comumente documentadas na literatura científica.

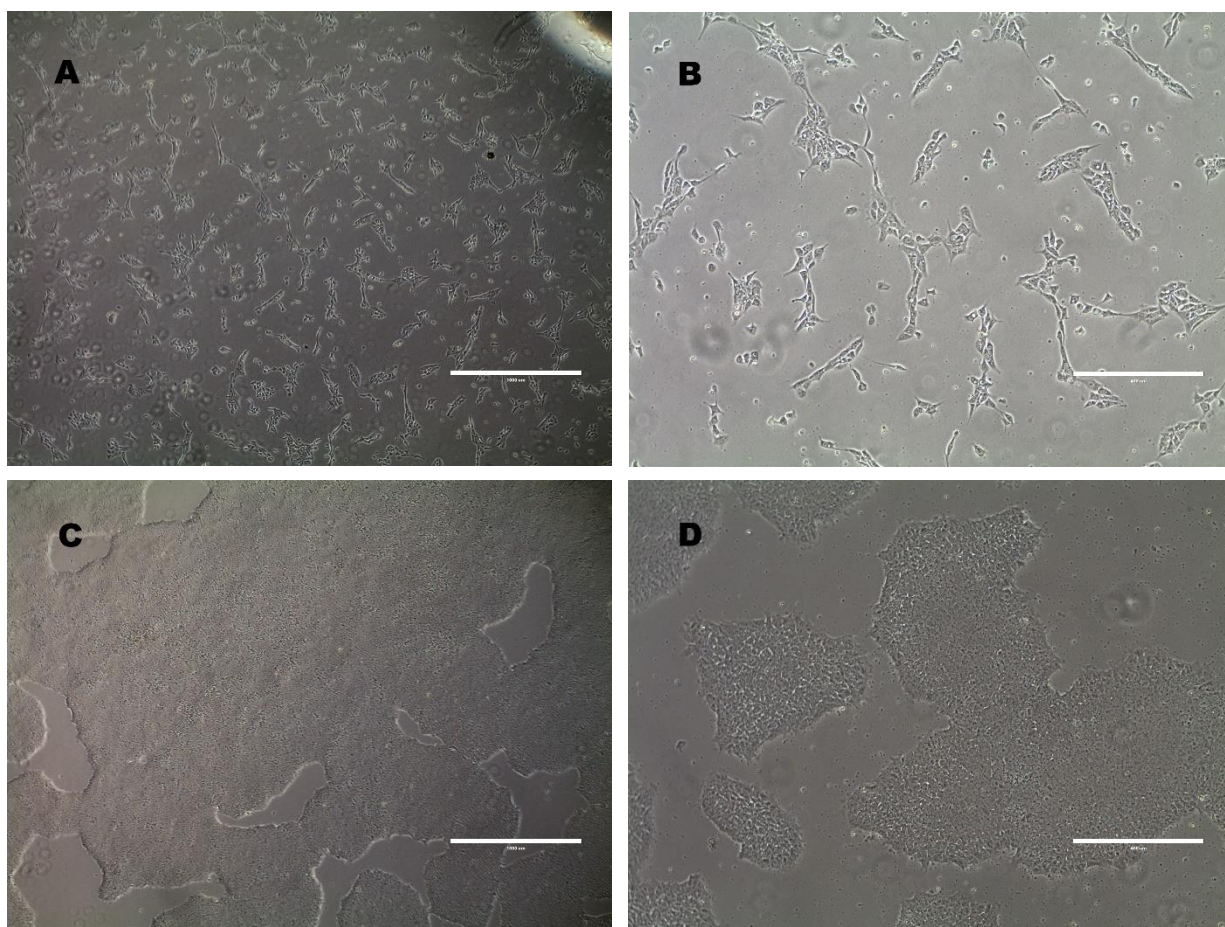


Figura 10: Fotomicrografia das células iPS em cultivo 2D. 24h e 96h após o plaqueamento das células iPS. A - B 24h após o descongelamento e plaqueamento das células, em aumento de 4x e 10x respectivamente; C - D 96h de cultivo, em aumento de 4x e 10x respectivamente.

4.2 CULTIVO ESTÁTICO DE CÉLULAS IPS SOBRE MICROCARREGADORES SYNTHEMAX® II E SYNTHEMAX® II TRATADO COM GELTREX®

Com o objetivo de avaliar se haveria adesão de células aos microcarregadores e se essa adesão poderia ser amplificada por influência do revestimento por *Geltrex*®, amplamente utilizado em cultura 2D de células iPS, foram testados, nas condições de 1g/L, 1.5g/L e 2g/L, microcarregadores Synthemax® II e Synthemax® II tratados com *Geltrex*® sob cultivo estático.

Nas primeiras 24h (figura 11: A-B; figura 11: A-B) após as células serem cultivadas em 1g/L de microcarregadores, foi observado que houve adesão das células pluripotentes em ambos microcarregadores, Synthemax® II (S-GT) que não

recebeu o revestimento e Synthemax® II (GT) que foi revestido com a camada de Geltrex® (descrito no item 3.2.1 e 3.2.2).

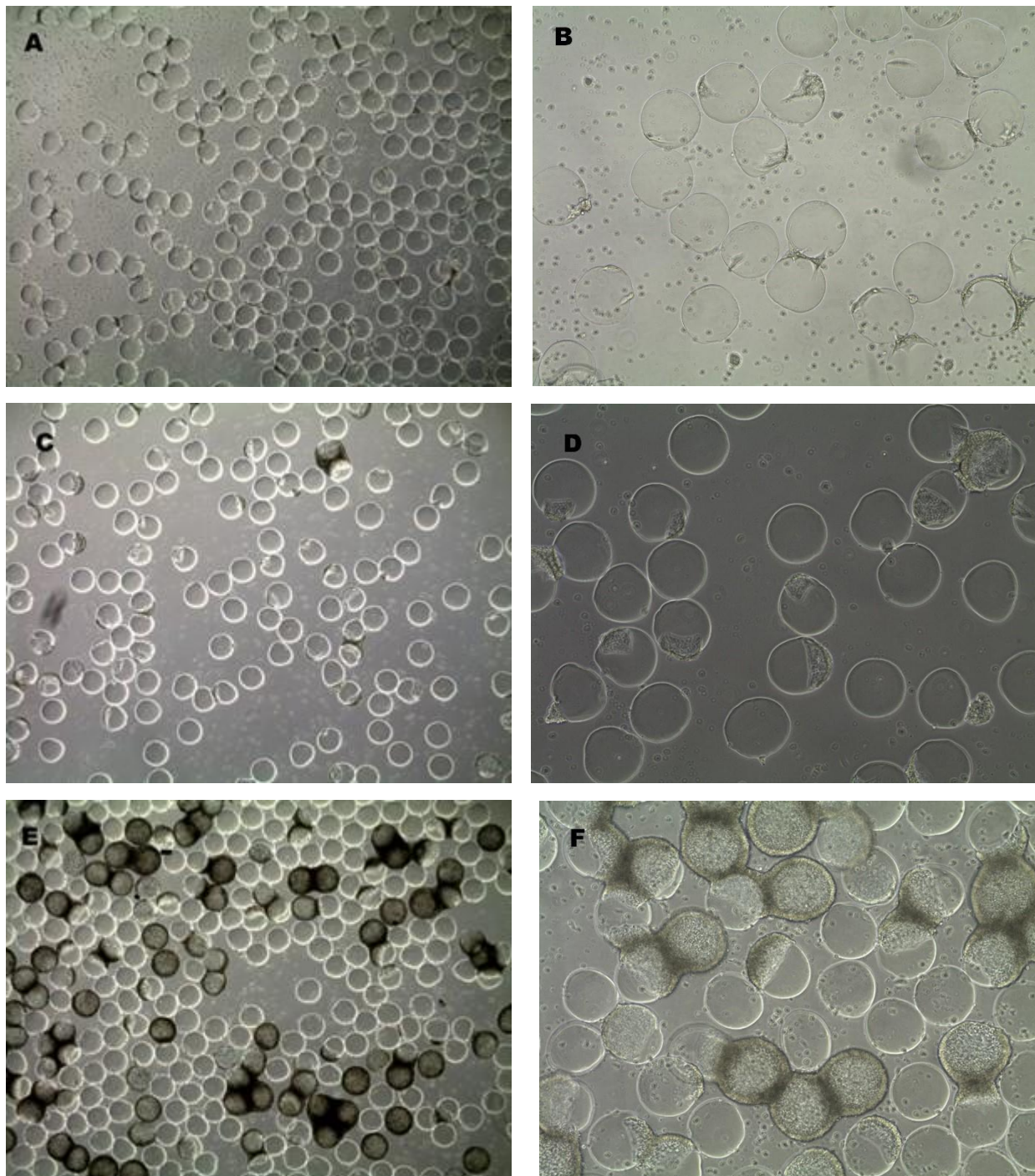
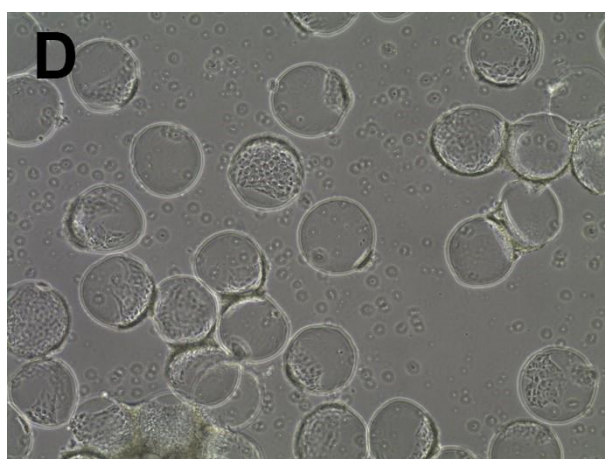
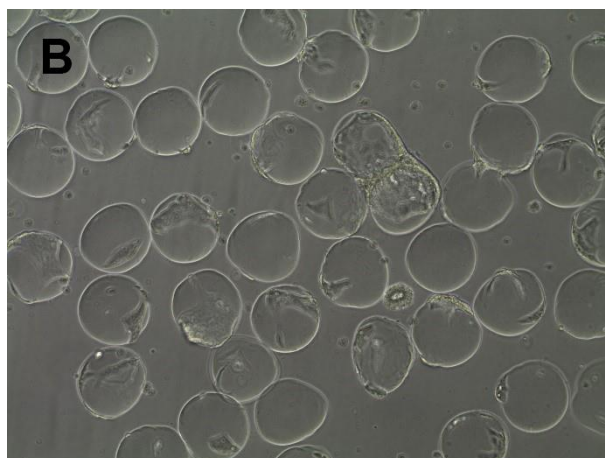
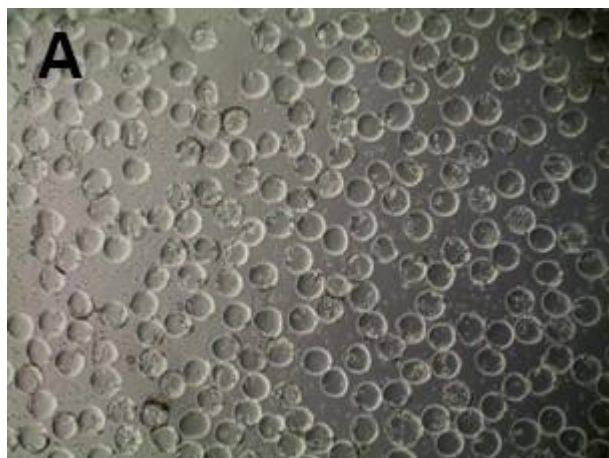


Figura 11: Fotomicrografia em das células iPS, 24h, 48h e 120h após o cultivo estático com 1g/L de microcarregadores sem revestimento de geltrex (S-GT). (A - B) 24h após células serem cultivadas sobre microcarregadores Synthemax II não tratados (S-GT); (C - D) 48h após em microcarreadores S-GT; (E - F) Ao final de 5 dias (120h) do cultivo sem o tratamento. Fotos em aumento de 4x e 10x, respectivamente.

Após as 24h o meio é trocado pela primeira vez e assim, retirado o inibidor de apoptose, nas 48h de cultivo as células já não estão mais sob influência do inibidor, dessa forma elas adquirem a organização semelhante ao visto em cultivo em monocamada, com colônias se expandindo pela superfície do microcarregador (figura 11: C-D; figura 11: C-D).

Ao final de 5 dias (120h) observamos microcarreadores S-GT e GT revestidos por grandes colônias de células, apresentando uma coloração mais escura indicando uma maior densidade de célula aderida, e com pequenos e médios grupamentos de microcarreadores aderidos uns aos outros pelas células (figura 11: E-F; figura 12: E-F).



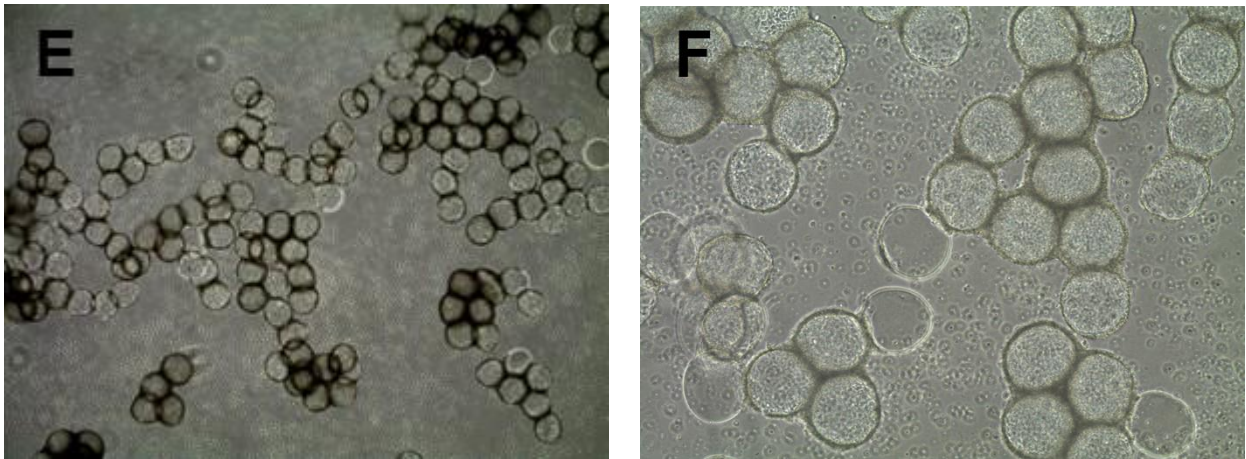
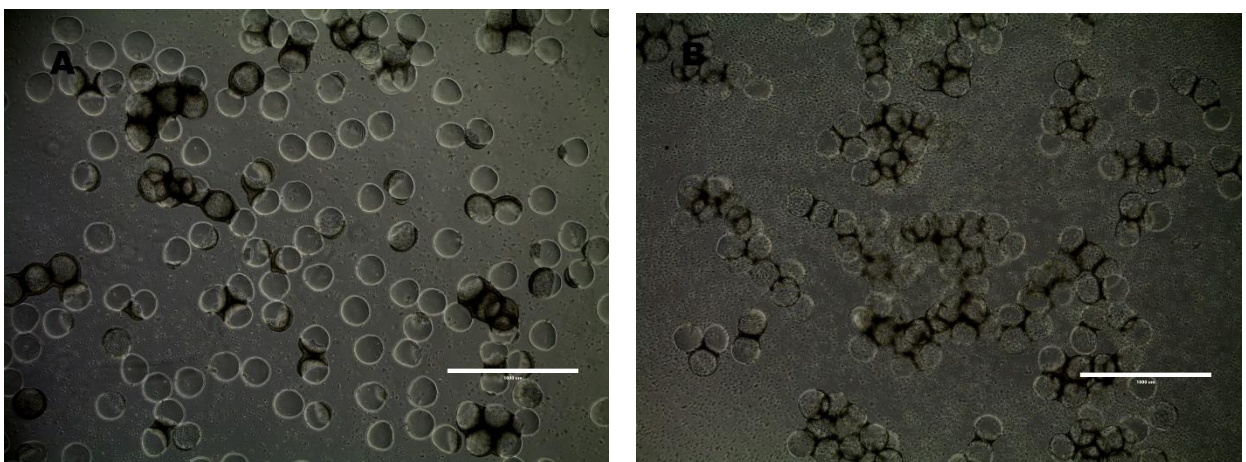


Figura 12: Fotomicrografia em das células iPS, 24h, 48h e 120h após o cultivo estático com 1g/L de microcarregadores com revestimento de geltrex (GT). (A - B) 24h após células serem cultivadas sobre microcarregadores Synthemax II tratados com Geltrex (GT); (C - D) 48h após em microcarreadores tratados; (E - F) Ao final de 5 dias (120h) do cultivo com o tratamento. Fotos em aumento de 4x e 10x, respectivamente.

Já nas condições de 1.5g/L e 2g/L (figura 13), como esperado, foi observado as mesmas características vistas na condição inicial de 1g/L/L (figura 11 e 12), proporcionalmente adequada a quantidade celular cultivada nessas condições. Ao final de 5 dias (120h) observamos a condição de 1.5g/L de microcarreadores S-GT (figura 13, A) e GT (figura 13, B) e na condição de 2g/L de microcarregadores S-GT (figura 13, C) e GT (figura 13, D) microcarregadores revestidos por pelas colônias de células iPS, apresentando uma coloração mais escura indicando uma maior densidade de célula aderida, e com maiores grupamentos de microcarregadores aderidos uns aos outros pelas células.



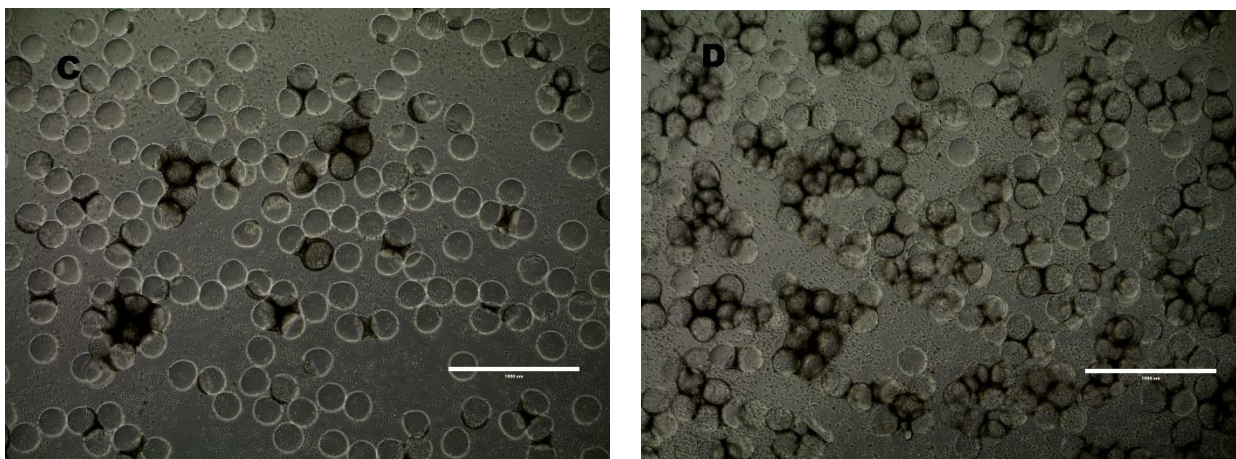


Figura 13: Fotomicrografia em das células iPS 120h após o cultivo estático com 1.5g/L e 2g/L de microcarregadores com e sem revestimento de geltrex. (A - B) 120h após células serem cultivadas em 1.5g/L de microcarregadores Synthemax II não tratados (A) e tratados com geltrex (B); (C - D) 120h após células serem cultivadas em 2g/L de microcarregadores Synthemax II não tratados (C) e tratados com geltrex (D). Fotos em aumentado de 4x.

4.2.1 Avaliação do número de células no cultivo de células iPS sobre microcarregadores Synthemax® II e Synthemax® II tratado com Geltrex®

Para avaliarmos o crescimento dessas células no cultivo estático sobre os microcarregadores Synthemax® II (S-GT) que não recebeu o revestimento e Synthemax® II (GT) que foi revestido com a camada de *Geltrex*®, foi realizada a coloração dos núcleos celulares da iPS após os 5 dias (figura 14: A-B).

A contagem feita em câmara de Neubauer (descrito no item 3.4), os núcleos se apresentam como pequenos pontos de cor roxa devido a coloração com cristal violeta, com cada ponto correspondendo a uma célula iPS (figura 14: B). O número de células absoluto nas 3 condições de cultivo, 1g/L, 1.5g/L, 2g/L, em ambos microcarregadores S-GT e GT (não tratados, em azul; e tratados, em rosa; respectivamente) após 120h de cultivo foram comparados a quantidade inicial de células cultivadas em cada condição (controle, em preto) são representadas no gráfico (figura 14: C).

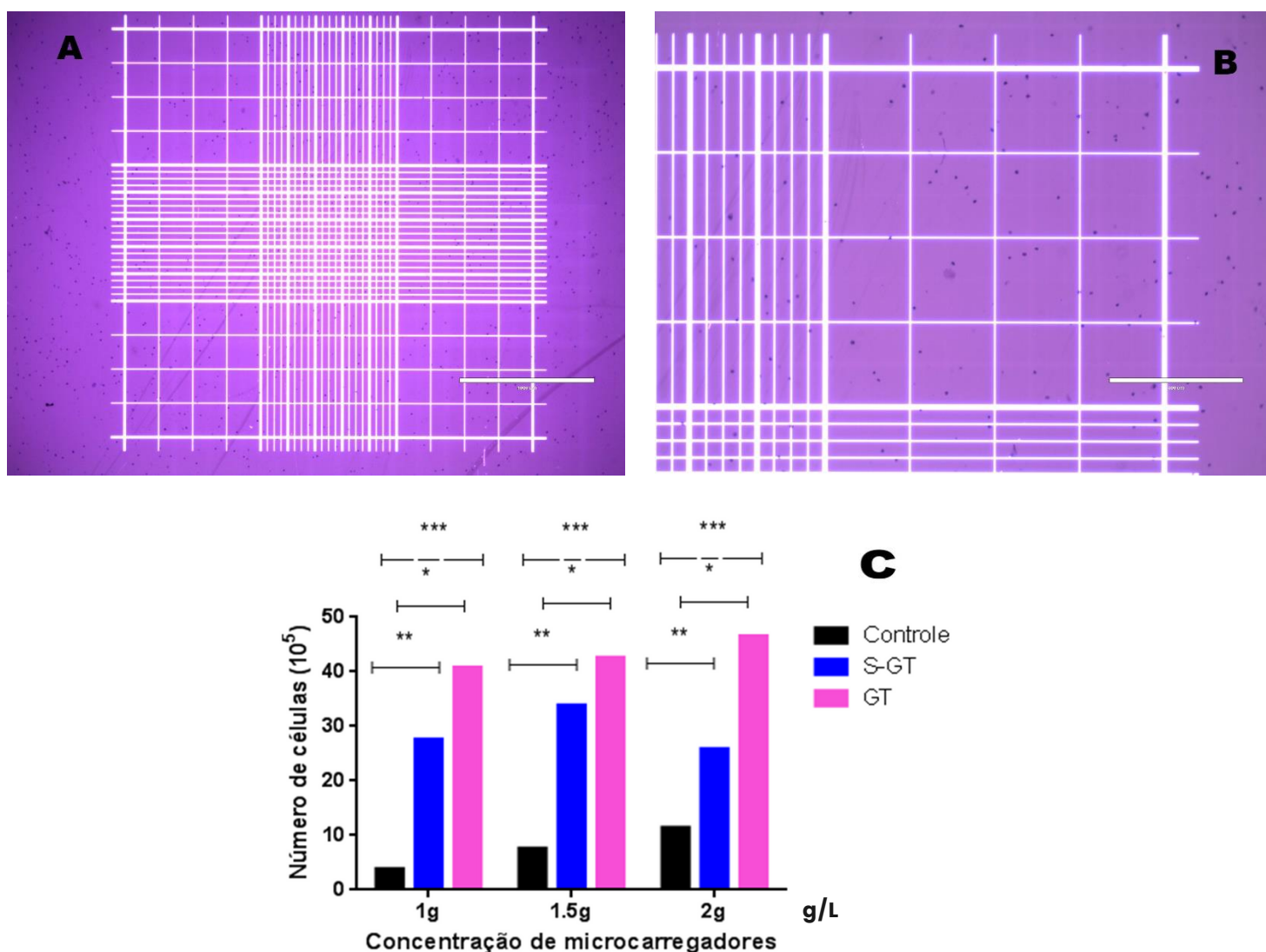


Figura 14: Fotomicrografia da contagem de núcleo de células iPS corados. (A - B) Núcleo das células iPS na câmera de Neubauer, em 10x e 20x respectivamente; (C) Contagem do núcleo celular após 120h de cultivo estático sobre microcarregadores Synthemax II com tratamento (GT, em rosa) e sem tratamento por getrex (S-GT, em azul), e comparados junto a concentração inicial cultivada de células (controle, em preto) da densidade celular de acordo com a concentração de microcarregadores (1g/L $3,8 \times 10^5$; 1.5g/L $7,6 \times 10^5$; e 2g/L $1,14 \times 10^6$). ($p > 0,05$); (**) $p < 0,01$ (***) $p < 0,001$

A contagem de células demonstrou que o tratamento com Geltrex (GT) influenciou numa melhor expansão celular quando comparamos ao grupo sem tratamento (S-GT) (figura 14: C). Ao analisar as diferentes concentrações (1g/L, 1.5g/L e 2g/L) no grupo tratado (GT) observamos que o aumento da concentração de microcarregadores de vitronectina com tratamento (GT) não promoveu maior rendimento celular, ao comparar esses resultados temos que a concentração de 1g/ml promoveu a melhor relação custo/benefício (figura 14: C - GT).

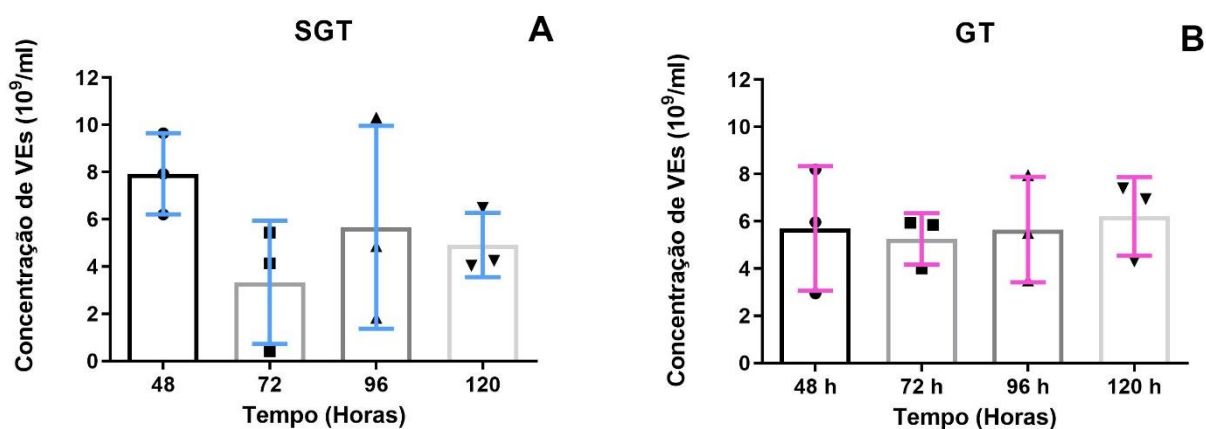
4.3 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE VESÍCULAS SECRETADAS NO CULTIVO CELULAR ESTÁTICO SOBRE MICROCARREGADORES SYNTHEMAX® II E SYNTHEMAX® II TRATADO COM GELTRETREX®

A partir dos resultados observados anteriormente, as vesículas extracelulares secretadas pelas células iPS a cada 24h ao longo das 120h de cultivo na condição estática de 1g/L de microcarregadores de vitronectina com e sem tratamento por geltrex foi avaliada através de Rastreamento de Nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis - NTA).

Os resultados obtidos nos grupos Synthemax® II (S-GT) (figura 15: A) e Synthemax® II tratados com *Geltrex*® (GT) (figura 15: B) em cultivo estático, demonstraram que análise de partículas apresentou uma alta dispersão em ambos os grupos e por isso não foi observado diferença estatística significativa na quantidade de vesículas extracelulares entre e intragrupos S-GT e GT a cada 24h. O aumento de células aderidas no decorrer do tempo não foi acompanhado de aumento na concentração de VEs. ao longo dos 5 dias de cultivo (120 h).

Ao compararmos a média de VEs secretadas ao longo do tempo (figura 15: C) em ambos os grupos não observamos diferenças na concentração de partículas entre os grupos analisados em nenhum dos tempos de observação.

Esses resultados demonstraram que o maior número de células aderidas na condição com tratamento com Geltrex não refletiu um aumento na concentração de VEs (figura 15: B e C).



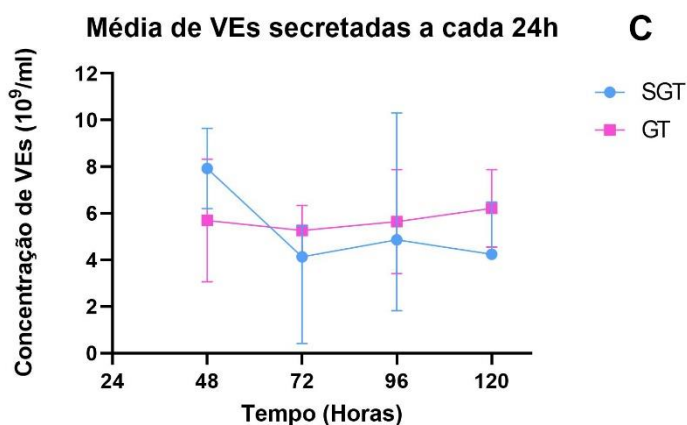


Figura 15: Análise por NTA de VEs liberadas a cada 24h. A concentração de vesículas extracelulares liberadas foi analisada a partir do meio de cultivo coletado a cada 24h, as VEs isoladas por ultracentrifugação foram avaliadas por NTA; GT (em rosa): comparação da concentração de VEs liberadas pelas células iPS em microcarreadores tratados ao longo de 5 dias; S-GT (em azul): comparação da concentração de VEs liberadas pelas células iPS em microcarreadores não tratados ao longo de 5 dias; Média de VEs secretadas: comparação das VEs liberadas a cada 24h entre os grupos tratados e não tratados. ($p > 0,05$)

4.4 AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE CÉLULAS IPS EM MICROCARREGADORES DE COLÁGENO

Com os resultados obtidos anteriormente, observamos que há visualmente uma melhor adesão das células iPS após os microcarregadores de vitronectina serem tratados com *Geltrex*[®]. Utilizamos então microcarregadores revestidos por uma matriz de colágeno tipo I que são mais baratos que os revestidos por vitronectina, mas não possuem uma matriz adequada para expansão de células iPS; para avaliar a eficácia do tratamento com *Geltrex*[®] nesses microcarregadores, utilizamos a condição de 1g/L nos microcarregadores Collagen[®] da Corning[®]. Dessa forma, poderíamos avaliar a diferença que o pós-revestimento com *Geltrex*[®] poderia viabilizar o uso de microcarregador e se o pós-revestimento influenciaria na adesão das células iPS sobre a superfície dessa matriz de colágeno tratada, também nos servindo como controle para comparação da adesão de células após o tratamento com *Geltrex*[®] em ambas as matrizes até agora testadas, Synthemax e Collagen, e como esse revestimento sobre os microcarregadores Collagen se comportam ao longo dos 5 dias de cultivo.

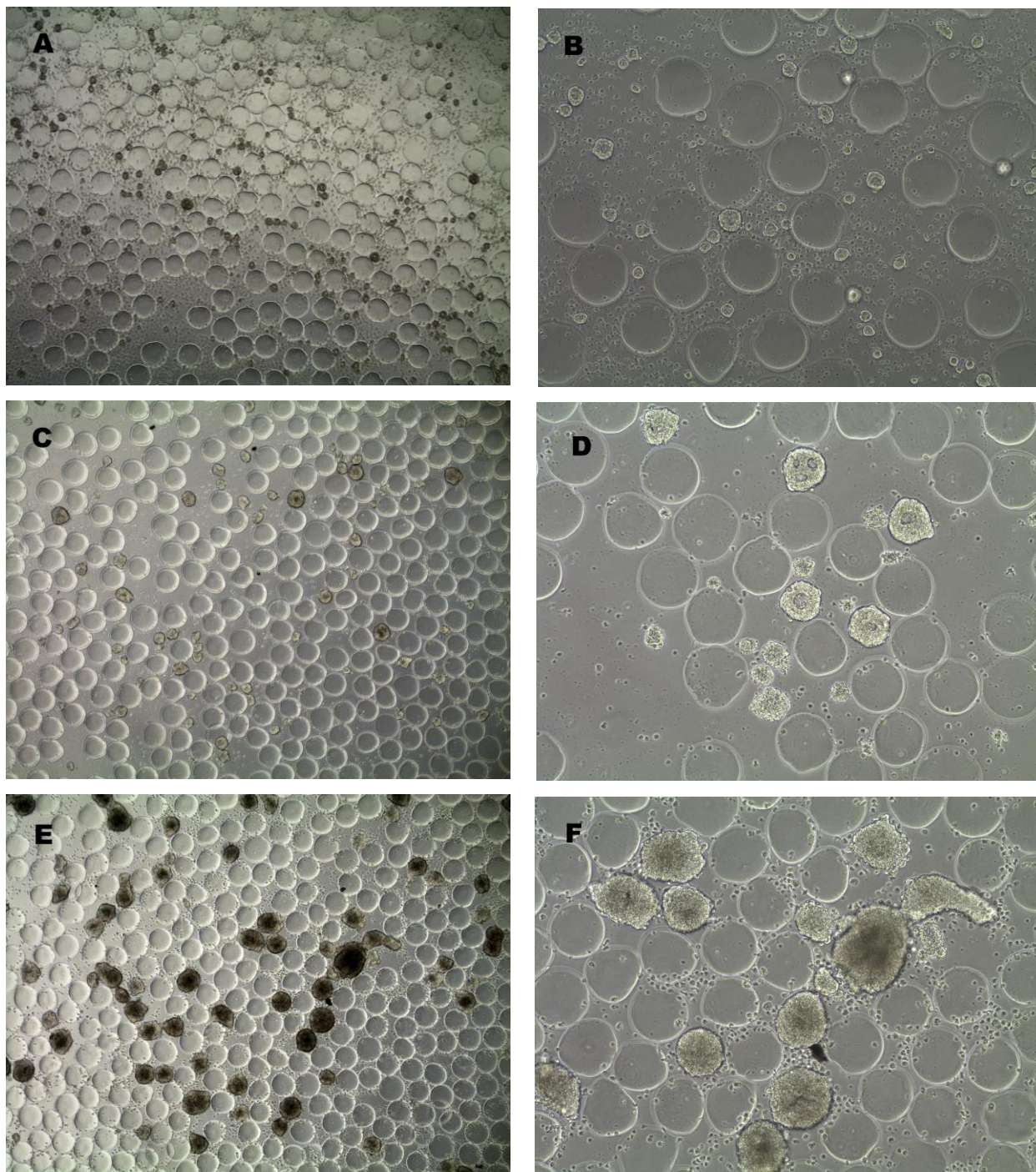
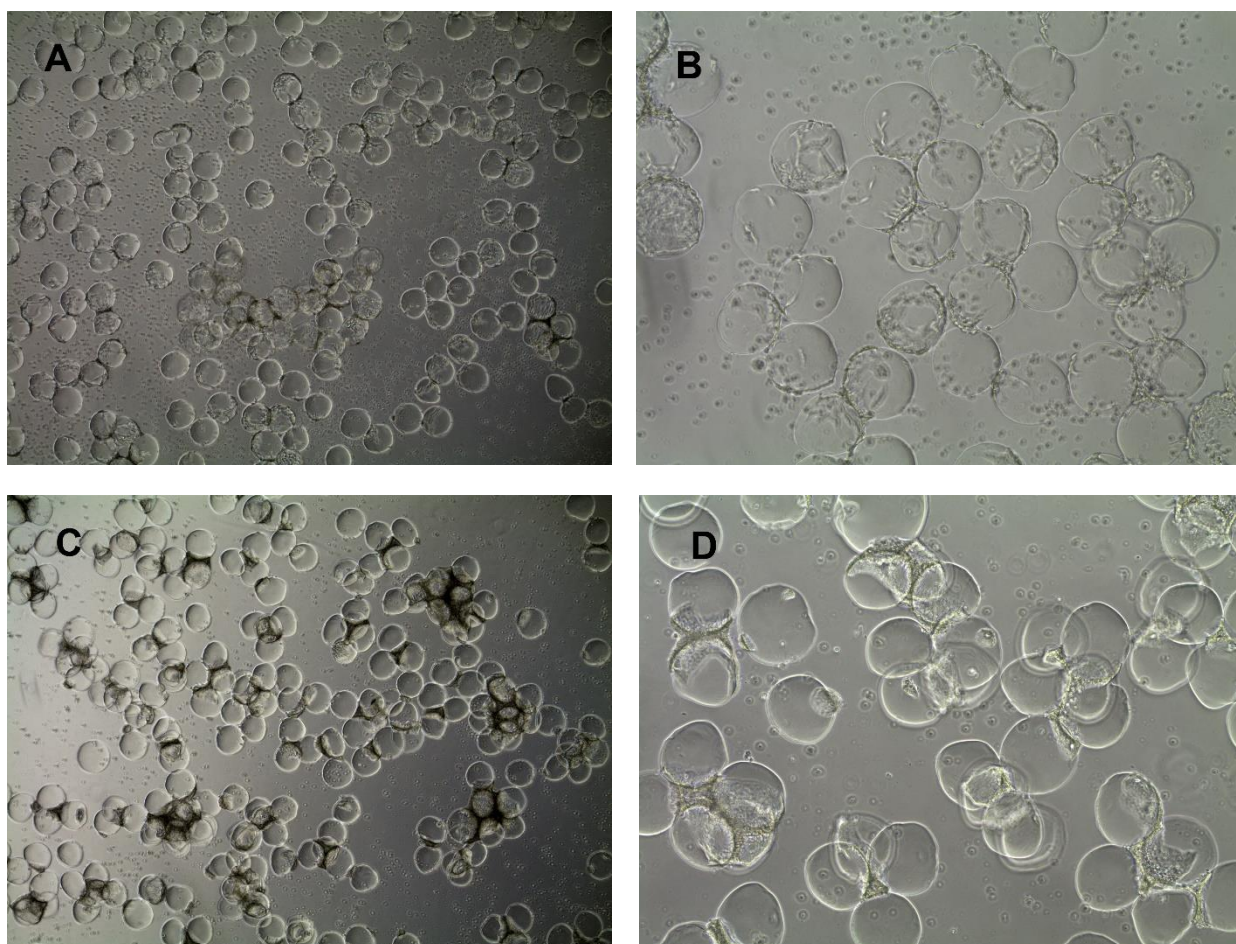


Figura 16: Fotomicrografia das células iPS, 24h, 48h e 120h após o cultivo com 1g/L de microcarregadores de colágeno sem revestimento de Geltrex. (A - B) 24h após células serem cultivadas sobre microcarregadores de colágeno não tratados; (C - D) 48h após em microcarregadores não tratados; (E - F) Ao final de 5 dias (120h) do cultivo sem o tratamento. Fotos em 4x e 10x, respectivamente

A partir dos resultados obtidos, podemos observar que os microcarregadores de colágeno que não receberam o revestimento da matriz *Geltrex®* não conseguiram promover a adesão das células iPS, levando essas células a formar agregados (figura

16: A-B), que ao longo do tempo de cultivo foram crescendo de maneira disforme e heterogênea (figura 16: C-D; E-F.). Em comparação, os que receberam o revestimento conseguiram promover a adesão passadas 24h do cultivo das células (figura 17: A-B), conseguindo promover a expansão dessas células ao longo dos 5 dias de cultivo (figura 17: C-D; E-F). Apesar de promover a adesão dessas células foi observado, quando comparado as 24h e 120H, uma diminuição de microcarregadores com células aderidas em comparação ao último dia de cultivo (figura 16: A; figura 17: F).



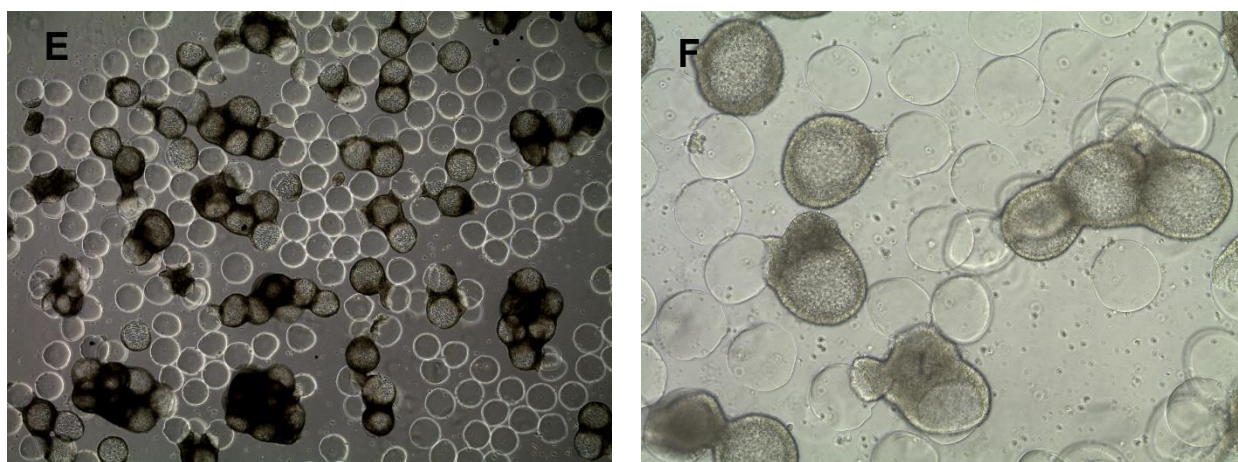
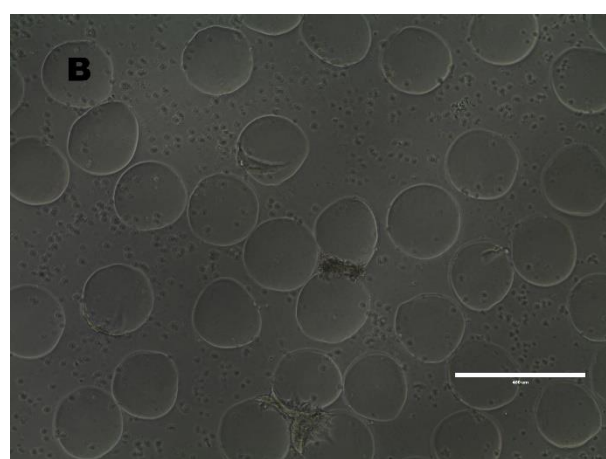
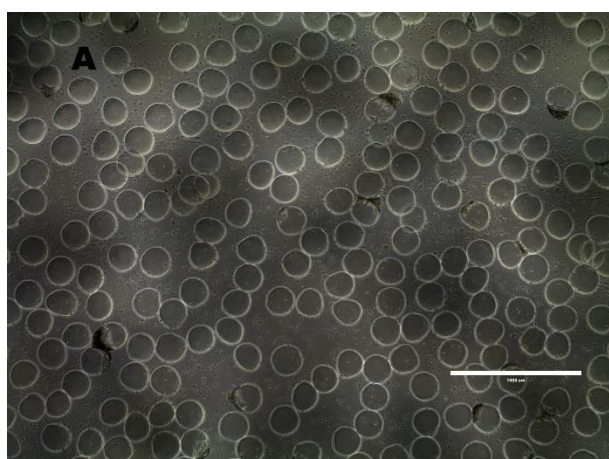


Figura 17: Fotomicrografia das células iPS, 24h, 48h e 120h após o cultivo com 1g/L de microcarregadores de colágeno com revestimento de Geltrex. (A - B) 24h após células serem cultivadas sobre microcarregadores de colágeno tratados com Geltrex; (C - D) 48h após em microcarregadores tratados; (E - F) Ao final de 5 dias (120h) do cultivo com o tratamento. Fotos em 4x e 10x, respectivamente

4.5 CULTIVO SOB AGITAÇÃO DE CÉLULAS IPS SOBRE MICROCARREGADORES SYNTHEMAX® II E SYNTHEMAX® II TRATADO COM GELTREX®

Com o objetivo de mimetizar o ambiente sob agitação de um biorreator, foi avaliado o desempenho da adesão dessas células sobre os microcarregadores Synthemax® II (S-GT) e Synthemax® II tratados com *Geltrex*® (GT) sob cultivo em lenta agitação em aparelho homogeneizador/agitador (tipo gangorra).

A partir dos resultados obtidos observamos que após 24h de cultivo houve uma evidente diminuição na adesão das células pluripotentes nos microcarregadores que não receberam revestimento por *Geltrex*® (S-GT) (figura 17).



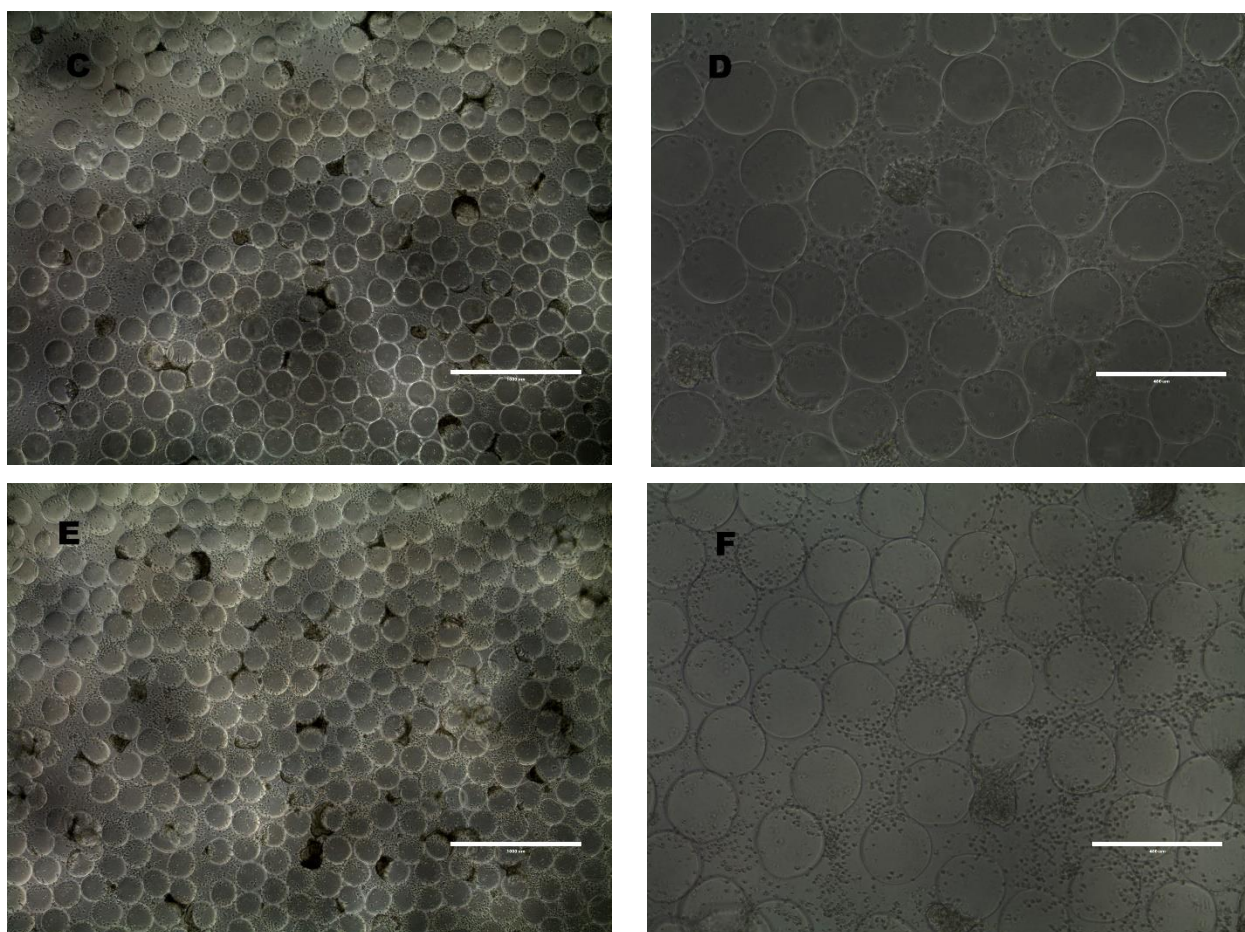


Figura 17: Fotomicrografia em das células iPS, 24h após o cultivo sob agitação com 1g/L, 1.5g/L/L e 2g/L de microcarregadores sem revestimento de Geltrex (S-GT). (A - B) 24h após células serem cultivadas 1g/L de microcarregadores Synthemax II não tratados; (C - D) 24h após em 1.5g/L de microcarreadores não tratados; (E - F) 24h do cultivo em 2g/L/L de microcarregadores sem o tratamento. Fotos em aumento de 4x e 10x, respectivamente.

Quando comparamos as fotomicrografias de ambos os grupos, S-GT e GT (figura 18 e 19), observamos uma maior adesão aos microcarregadores tratados (GT) em todas as concentrações de microcarreadores (figura 19), principalmente na concentração de 2g/L (figura 19: E-F) onde proporcionalmente mais células foram cultivadas (descrito no item 3.2).

No experimento descrito no item 4.2, onde os microcarregadores foram cultivados de forma estática, o grupo na condição de 1g/L sem tratamento, S-GT, demonstrou uma maior adesão celular (figura 11: A-B) quando comparado ao cultivo sob agitação (figura 18: A-B) após as 24h de cultivo.

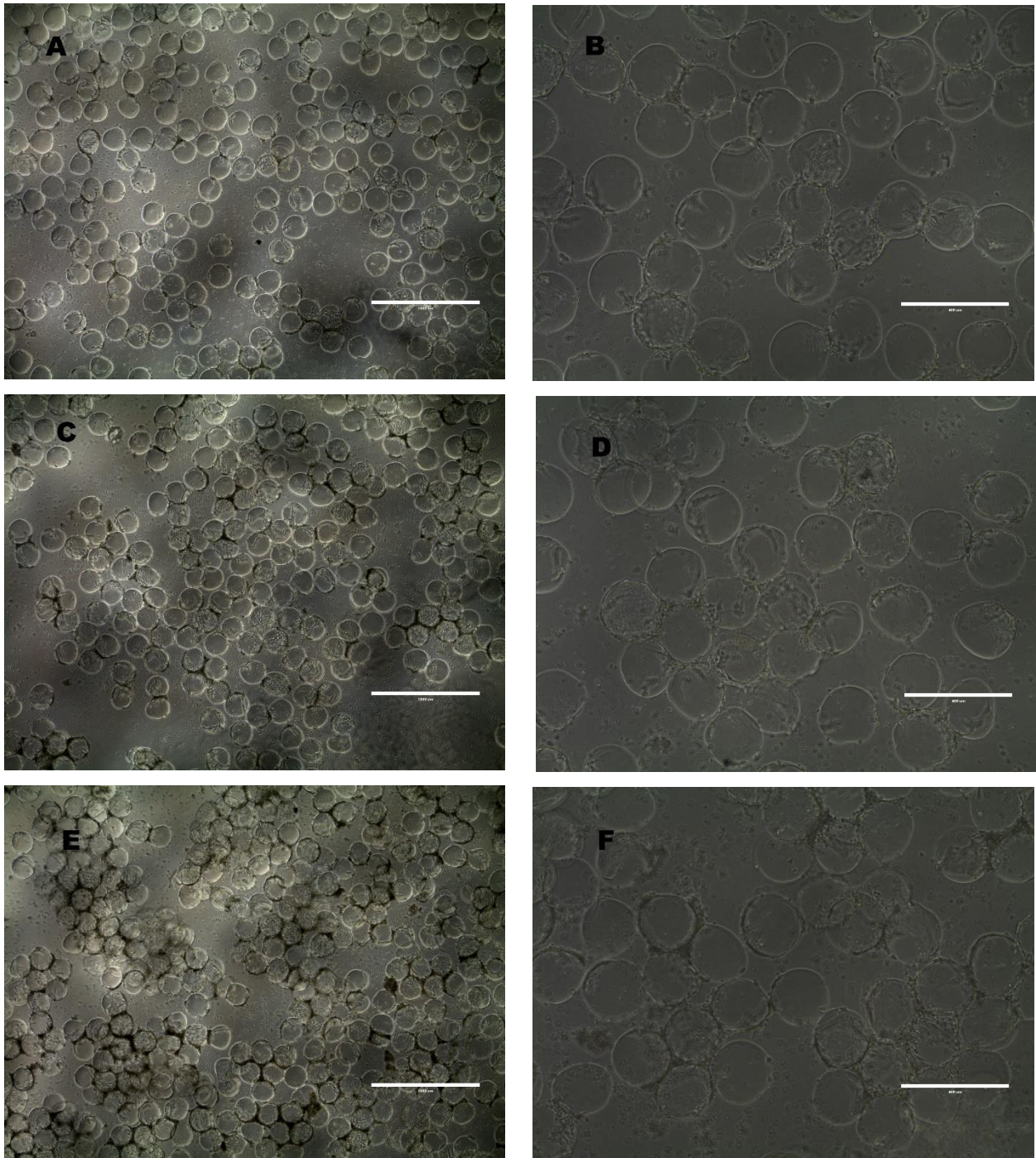


Figura 19: Fotomicrografia em das células iPSC, 24h após o cultivo sob agitação com 1g/L, 1.5g/L e 2g/L de microcarregadores com revestimento de Geltrex (GT). (A - B) 24h após células cultivadas 1g/L de microcarregadores Syntemax II tratados; (C - D) 24h após em 1.5g/L de microcarreadores tratados; (E - F) 24h após em 2g/L de microcarregadores com o tratamento. Fotos em aumento de 4x e 10x, respectivamente.

Ao final dos 5 dias de cultivo (120 horas) de ambos os grupos (S-GT e GT) (figura 20 e figura 21) observamos com mais clareza a interferência da agitação, mesmo que lenta, sobre o cultivo. No grupo S-GT (figura 20), podemos observar, em

todas as concentrações, uma grande quantidade de microcarregadores vazias, sem célula aderida, e uma tendência das células de formarem aglomerados de células-microcarregador, de cor enegrecida demonstrando uma alta densidade celular. Tendência que vai aumentando proporcionalmente quando comparamos as concentrações de 1g/L, 1.5g/L e 2g/L, respectivamente (figura 20: A, C e E).

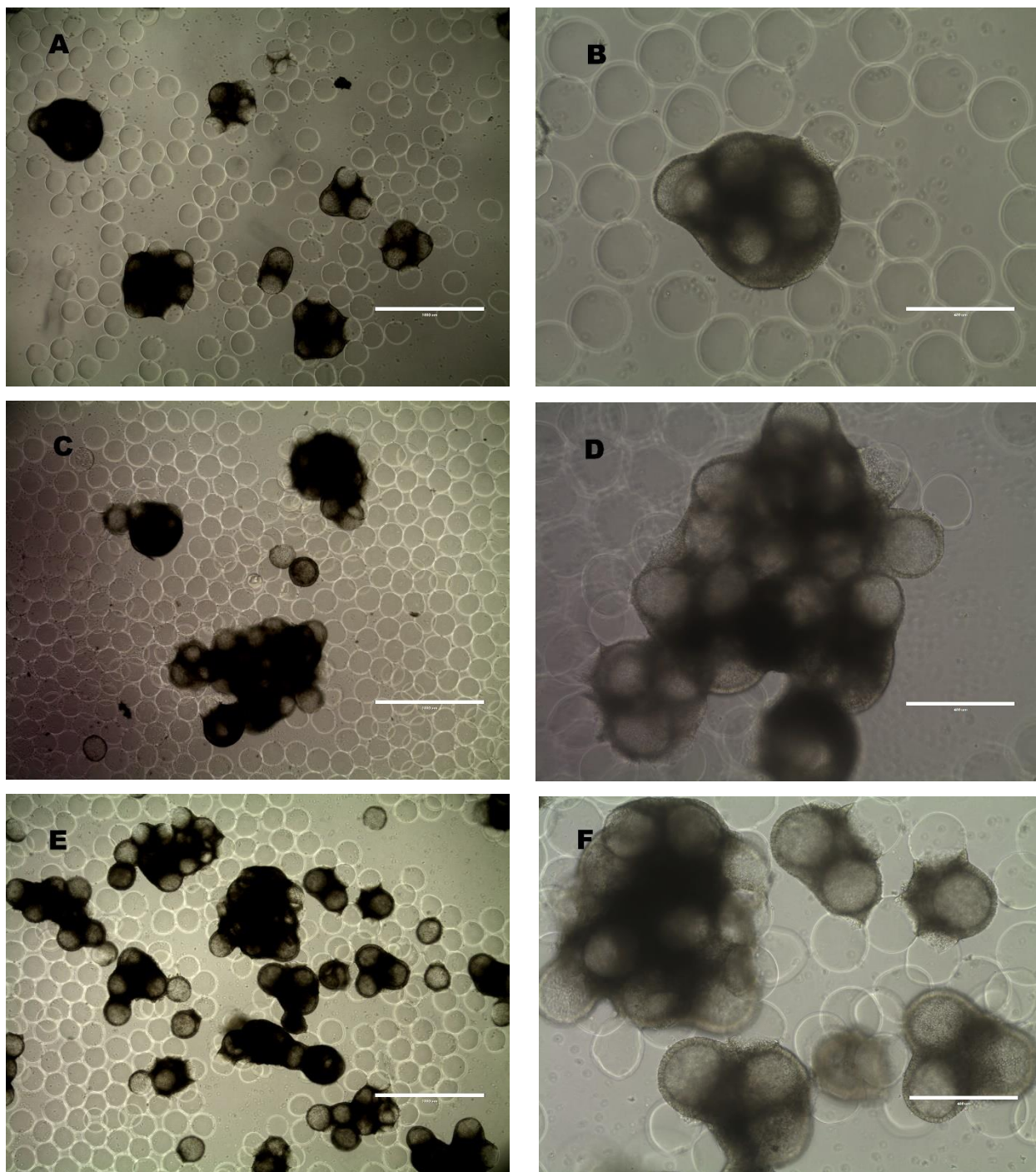
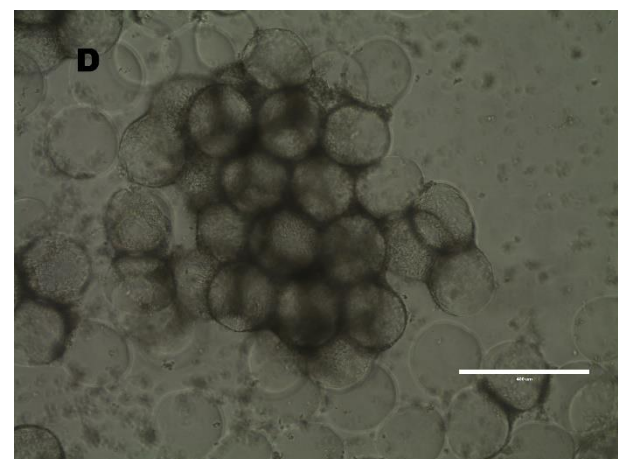
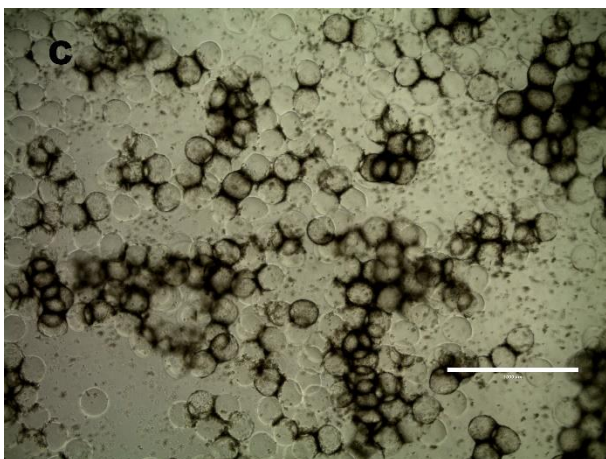
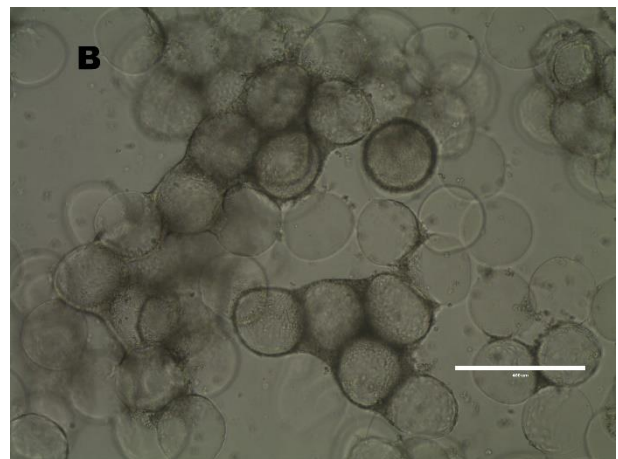
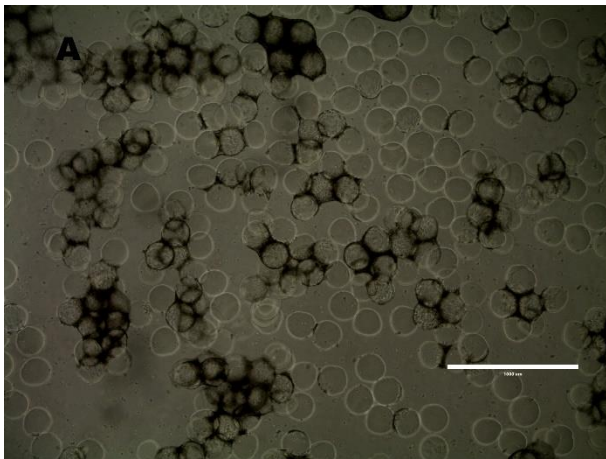


Figura 20: Fotomicrografia em das células iPS, 120h após o cultivo sob agitação com 1g/L, 1.5g/L e 2g/L de microcarregadores sem revestimento de Geltrex (S-GT). (A - B) 120h após células

serem cultivadas 1g/L de microcarregadores Synthemax II não tratados; (C - D) 120h após em 1.5g/L de microcarreadores não tratados; (E - F) 120h após em 2g/L de microcarregadores sem tratamento. Fotos em aumento de 4x e 10x, respectivamente.

Nos resultados obtidos no grupo GT, observamos o aumento da adesão nas primeiras 24h (figura 19), entretanto, ao longo das 120 horas de cultivo (figura 21: F) a adesão das células não se sustenta, culminando no desprendimento dessas células da superfície das esferas tratadas com a matriz *Geltrex*[®] (figura 21). Esse desprendimento foi observado nas concentrações onde a maior quantidade de microcarregadores, 1.5g/L e 2g/L (figura 21: C-D; E-F) aumentando gradualmente em cada condição (figura 20: B, D e F) podendo observar essas células já soltas e individualizadas (figura 21: F).



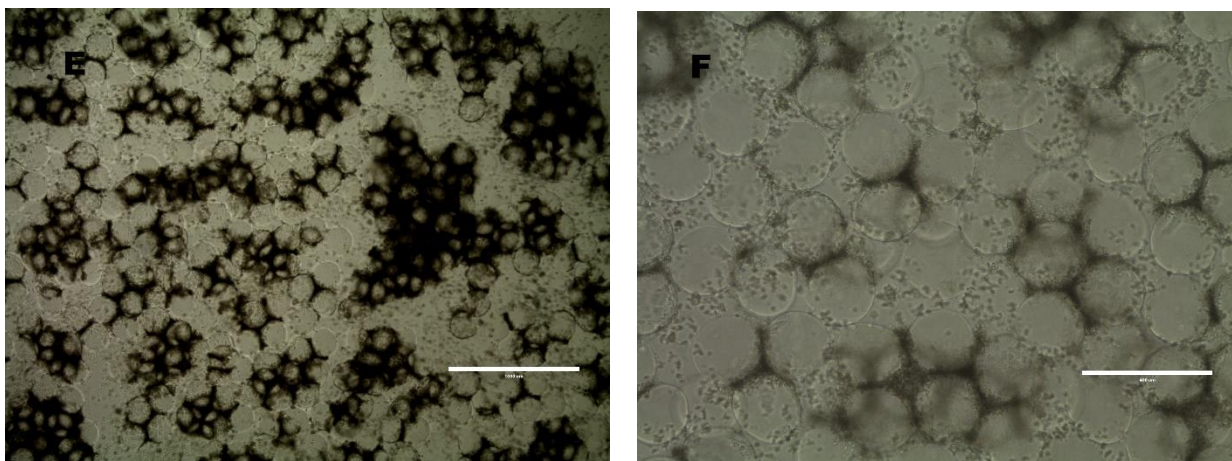


Figura 21: Fotomicrografia em das células iPS, 120h após o cultivo sob agitação com 1g/L, 1.5g/L e 2g/L de microcarregadores com revestimento de Geltrex (GT). (A - B) 120h após células serem cultivadas 1g/L de microcarregadores Synthemax II tratados; (C - D) 120h após em 1.5g/L de microcarreadores tratados; (E - F) 120h após em 2g/L de microcarregadores com tratamento. Fotos em aumento de 4x e 10x, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

As células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de células mononucleares do sangue periférico de doadores, por meio de reprogramação realizada em nosso laboratório. Para essa reprogramação, empregamos uma combinação dos quatro fatores de pluripotência essenciais: cMYC, KLF-4, OCT3/4 e SOX2 (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). A fim de caracterizar a pluripotência dessas iPS, foram realizados ensaios conforme descritos na literatura científica padrão (KASAI-BRUNSWICK, 2018) as iPS que atenderam aos critérios de qualidade adequada foram então submetidas à criopreservação.

Os microcarregadores tem a proposta de servir como um suporte para célula aderentes, onde essas esferas ficam suspensas em meio de cultivo. Esses microcarregadores podem ter diferentes características estruturais para promover a adesão dessas células, como uma superfície porosa ou um revestimento de matriz extracelular adequada (DERAKHTI *et al.*, 2019).

Dessa forma, em relação à morfologia 2D, onde podemos observar que, um dia após o descongelamento, as iPS apresentaram uma forma mais alongada, semelhante à dos fibroblastos - ocorrência atribuída à adição do inibidor de apoptose nas primeiras 24 horas de cultura – também observamos tal morfologia nas iPS aderidas aos microcarregadores Synthemax II e Collagen. À medida que os dias se passam, as células iPS aderidas no cultivo 3D, assim como no 2D, também adquiriram uma organização morfológica semelhante às células-tronco embrionárias (CTE), formando colônias compostas por células justapostas, com margens bem delimitadas. Essas características são consistentes com o que é descrito na literatura (THOMSON *et al.*, 1998) e não se mostraram alteradas com a mudança do suporte de cultivo.

Testamos três tipos de concentrações de microcarregadores (1g/L, 1.5g/L e 2g/L) em condições estáticas e sob agitação, a fim de avaliar o desempenho da adesão de células iPS nos microcarregadores. Se tratando de células iPS que tem por característica serem células aderentes que crescem sob uma matriz e formam extensas colônias de células justapostas, as primeiras 24 horas de cultivo são determinantes para a sobrevivência e expansão dessas células.

A adesão celular a uma superfície envolve um processo em vários estágios. Inicialmente, ocorre uma adesão inicial leve à superfície. Em seguida, no segundo estágio, observa-se um aumento na zona de contato e no número de conexões, resultando em um achatamento das células, embora ainda mantenham sua forma esférica. Posteriormente, ocorre um enfraquecimento da aderência das células à superfície devido à redução das conexões. Finalmente, no quarto estágio, as células se encontram completamente planas e espalhadas sobre a superfície.(GRINNELL, 1978). As células que conseguirem aderir a superfície desses microcarregadores nas primeiras 24h serão responsáveis por promover a expansão dessas células ao longo do tempo de cultivo, enquanto as que não conseguiram aderir acabam por morrer. A baixa taxa de adesão celular leva então ao rendimento celular final reduzido, além do desperdício de inóculo, o que resulta em perda financeira. Além disso, se a ligação celular aos microcarregadores não for forte o suficiente, as células se desprenderão dos microcarregadores quando forem expostas a forças mecânicas em biorreatores. O desprendimento de células de microcarreadores tornou-se um grande desafio nos processos de cultura celular baseados em microcarreadores (DERAKHTI *et al.*, 2019)

No cultivo estático, os microcarregadores Synthemax II e Collagen (nosso controle), foram avaliados de forma a demonstrar se a matriz revestida por eles, em comparação a matriz utilizada tradicionalmente em cultivo em placa, era capaz de sustentar a adesão e expansão de células-tronco iPS. O tratamento das superfícies dos microcarregadores são amplamente utilizadas para promover melhores resultados na adesão das células de interesse na cultura de células (CHEN *et al.*, 2013). Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento por *Geltrex*® nos microcarregadores antes do cultivo das células favoreceu significativamente no processo de adesão – as primeiras 24h de cultivo – e expansão dessas células-tronco iPS – ao longo dos cinco dias de cultivo – na matriz Synthemax II revestida no microcarregador da Corning. A avaliação da eficiência do pós-revestimento por *Geltrex*® nos microcarregadores de colágeno confirmou a influência da matriz na adesão dessas células. Em conjunto com os resultados demonstrados em ambos microcarregadores – Synthemax II e Collagen – podemos observar que o revestimento pela matriz oferece um suporte ajudando na adesão dessas células nas primeiras 24h de cultivo, mas ao longo do tempo de cultivo essa assistência perde a eficiência fazendo as células soltarem – demonstrado nos microcarregadores de colágeno após 120 horas de cultivo – onde observamos que nas 24h é possível ver mais células aderidas, enquanto nas 120h temos muitas das esferas vazias, sem célula aderida, o que pode estar relacionado também a homogeneidade e qualidade do pós-revestimento. Dessa forma, podemos supor que a combinação da matriz sintética do Synthemax II combinada com a matriz *Geltrex* amplifica a eficiência de adesão das células sobre esses microcarregadores. A comparação do número de células do cultivo estático pela contagem de núcleo por cristal violeta confirma o que foi observado em cultura, mostrando um aumento significativo de adesão celular nas condições que receberam o pós-tratamento por *Geltrex* (grupo GT). Entretanto quando comparamos os grupos tratados entre as diferentes concentrações de microcarregadores utilizada (1g/L, 1.5g/L e 2g/L) observamos que não há diferença significativa de número de células absoluto quando aumentamos a concentração desses microcarregadores; dessa forma a condição de 1g/L traz maior custo benefício por utilizarmos uma menor quantidade de célula e microcarregador.

No cultivo em biorreatores e outros sistemas dinâmicos como frascos de agitação, a agitação é necessária para manter os microcarreadores em suspensão

(CARUSO *et al.*, 2014), essa agitação fornece estimulação de cisalhamento fluido-célula, podendo causar danos às células se os fluxos se tornarem muito altos (DE SILVA THOMPSON *et al.*, 2019).

No cultivo sob agitação, foi avaliado como a adesão a esses microcarregadores se comporta quando recebe esse estímulo do movimento fluídico do meio. Nesse experimento podemos observar com mais clareza após as 24h de cultivo o suporte que a matriz Geltrex oferece para essas células. Os microcarregadores Synthemax II que não receberam o pós-revestimento (grupo S-GT) mostraram uma menor quantidade dessas esferas com células aderidas. Entretanto ao longo do cultivo as células foram soltando dos microcarregadores tratados com a matriz Geltrex; nesta condição os tratados com Geltrex mantiveram por mais tempo as células aderidas, mas ao final de 5 dias de cultivo elas foram se despreendendo, enquanto as sem tratamento (S-GT) formaram grandes aglomerados de células, com morfologia disforme e coloração escura, indicando uma alta densidade de células. Avaliando as diferentes concentrações de microcarregador, pode-se observar um melhor resultado com 1g/L, mostrando resultados mais concisos principalmente sob agitação em comparação as concentrações de 1.5g/L e 2g/L, conseguindo manter uma boa adesão celular após os 5 dias (120h) de cultivo; provavelmente relacionado ao menor estresse mecânico imposto às células devido a uma concentração desproporcional de microcarregadores em relação a área da placa.

Na cultura estática, quando visto por microscópio, podemos observar uma tendencia dos microcarregadores aderidos com célula de se aglomerar, formando complexos de dois ou mais microcarregadores interligados pela expansão das células sob sua superfície, podendo também ser vistos a olho nu, uma tendencia já esperada por se tratar de uma cultura estática (FAN *et al.*, 2014), apesar disso, quando colocadas sob agitação também é observado observamos uma forte aglomeração dos microcarregadores entre si, não sendo o padrão ideal almejado para o cultivo.

Os efeitos de um ambiente 3D as células podem experimentar vários tipos de estímulo como, força mecânica, tensão, pressão e força de cisalhamento, que alteram significativamente o comportamento celular (HUANG *et al.*, 2022).

A partir dos resultados obtidos nas diferentes condições, podemos observar uma melhor adesão e expansão das células na condição de cultivo estático em 1g/L de microcarregadores de vitronectina, dessa forma analisamos as nanopartículas

secretadas por essas células nos grupos com e sem tratamento ao longo do tempo de cultivo. Ao analisar por NTA a concentração de vesículas extracelulares liberadas a cada 24h pelas células sob cultivo 3D estático, foi observado uma alta dispersão da concentração de VEs secretas das células aderidas nos microcarregadores Synthemax II e Synthemax tratado com Geltrex, o que impossibilitou uma diferença estatística significativa. Também não foi observado aumento na concentração dessas VEs ao final do cultivo, onde temos uma maior quantidade de células. Em comparação com o grupo tratado o grupo sem tratamento não apresentou diferença significativa mesmo tendo um menor número de células absoluto após as 120h de cultivo o que pode estar relacionado ao estresse causado as células durante o cultivo 3D no processo de adesão e expansão, modulando a secreção dessas vesículas extracelulares. (COLOMBO *et al.*, 2014; KOWAL *et al.*, 2016; TKACH *et al.*, 2016). Para melhor entendimento se faz necessário a análise voltada as ciências ômicas do conteúdo dessas vesículas extracelulares, para que possamos investigar o conteúdo dessas vesículas extracelulares.

Assim, ainda é necessário que outros parâmetros sejam testados e analisados para desenvolver um modelo de cultivo 3D em biorreatores utilizando microcarregadores que possam promover uma adesão eficiente e menos custosa para células iPS.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, conseguimos avaliar a adesão celular sobre microcarregadores revestidos e pós-revestidos pelas matrizes extracelulares comerciais *Synthemax II®*, *Collagen®* e *Geltrex®* para uso no cultivo de células pluripotentes induzidas em modelo 3D escalonável para utilização em biorreatores.

A conclusão deste estudo ressalta que o tratamento dos microcarregadores com a matriz extracelular *Geltrex®* desempenhou um papel significativo no favorecimento da adesão e expansão das células-tronco pluripotentes induzidas (iPS). A condição de cultivo utilizando uma concentração de 1g/L revelou-se particularmente promissora em termos de relação custo-benefício, uma vez que implicou a utilização de uma menor quantidade de células cultivadas e uma menor concentração de microcarregadores, apresentando-se como uma abordagem viável e eficaz.

É importante enfatizar que, apesar desses avanços, o estudo identificou a necessidade de explorar outros parâmetros e estratégias a fim de otimizar ainda mais a adesão e expansão celular durante o cultivo em agitação sobre microcarregadores. A busca por métodos e condições que maximizem esses processos é de relevância crucial para a aplicabilidade clínica e terapêutica das iPS.

Olhando para as perspectivas futuras, destacamos a importância de caracterizar as vesículas extracelulares produzidas no contexto deste estudo. Além disso, a identificação detalhada do conteúdo dessas vesículas extracelulares é um passo essencial para compreender plenamente sua função e potencial terapêutico. A investigação do potencial terapêutico das vesículas extracelulares em um modelo de cardiomiopatia induzida por doxorubicina surge como uma direção promissora para aplicar os achados deste estudo em um contexto clínico relevante.

7 REFERÊNCIAS

BARNES, A. M. et al. Differentiating human pluripotent stem cells to cardiomyocytes using purified extracellular matrix proteins. **Bioengineering (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 12, p. 720, 22 nov. 2022.

CARUSO, S. R. et al. Growth and functional harvesting of human mesenchymal stromal cells cultured on a microcarrier-based system. **Biotechnology progress**, v. 30, n. 4, p. 889–895, 8 jul. 2014.

CHEN, A. K.-L.; REUVENY, S.; OH, S. K. W. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: achievements and future direction. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 7, p. 1032–1046, 15 nov. 2013.

COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 30, n. 1, p. 255–289, 21 ago. 2014.

CUESTA-GOMEZ, N. et al. Suspension culture improves iPSC expansion and pluripotency phenotype. **Stem cell research & therapy**, v. 14, n. 1, p. 154, 6 jun. 2023.

DARENFED, H. et al. Molecular characterization of the effects of Y-27632. **Cell motility and the cytoskeleton**, v. 64, n. 2, p. 97–109, fev. 2007.

DE SILVA THOMPSON, D. et al. Assessing behaviour of osteoblastic cells in dynamic culture conditions using titanium-doped phosphate glass microcarriers. **Journal of tissue engineering**, v. 10, p. 2041731419825772, jan. 2019.

DERAKHTI, S. et al. Attachment and detachment strategies in microcarrier-based cell culture technology: A comprehensive review. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 103, n. 109782, p. 109782, out. 2019.

FAN, Y. et al. Facile engineering of xeno-free microcarriers for the scalable cultivation of human pluripotent stem cells in stirred suspension. **Tissue engineering. Part A**, v. 20, n. 3–4, p. 588–599, fev. 2014.

FRENCH, K. C.; ANTONYAK, M. A.; CERIONE, R. A. Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 67, p. 48–55, jul. 2017.

FUJITA, Y. et al. Clinical application of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle-based therapeutics for inflammatory lung diseases. **Journal of clinical medicine**, v. 7, n. 10, p. 355, 14 out. 2018.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 287, n. 5457, p. 1433–1438, 25 fev. 2000.

GALLACHER, L. et al. Identification of novel circulating human embryonic blood stem cells. **Blood**, v. 96, n. 5, p. 1740–1747, 1 set. 2000.

GAO, L. et al. Exosomes secreted by hiPSC-derived cardiac cells improve recovery from myocardial infarction in swine. **Science translational medicine**, v. 12, n. 561, p. eaay1318, 16 set. 2020.

GNECCHI, M. et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cells in tissue repair. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1416, p. 123–146, 2016.

GRINNELL, F. Cellular adhesiveness and extracellular substrata. **International review of cytology**, v. 53, p. 65–144, 1978.

GRITTI, A.; VESCOVI, A. L.; GALLI, R. Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential. **Journal of physiology, Paris**, v. 96, n. 1–2, p. 81–90, jan. 2002.

GURUNATHAN, S. et al. Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 4, p. 307, 3 abr. 2019.

HAN, C. et al. Exosomes and their therapeutic potentials of stem cells. **Stem cells international**, v. 2016, p. 7653489, 2016.

HANDRAL. Emerging trends in biodegradable microcarriers for therapeutic applications. **Polymers**, v. 15, n. 6, 16 mar. 2023.

HIRSCHI, K. K.; LI, S.; ROY, K. Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. **Annual review of biomedical engineering**, v. 16, n. 1, p. 277–294, 11 jul. 2014.

HUANG, X. et al. Current advances in 3D dynamic cell culture systems. **Gels (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 12, p. 829, 16 dez. 2022.

JEPPESEN, D. K. et al. Extracellular vesicles and nanoparticles: emerging complexities. **Trends in cell biology**, 1 fev. 2023.

KARAMANOS, N. K. et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. **The FEBS journal**, v. 288, n. 24, p. 6850–6912, dez. 2021.

KASAI-BRUNSWICK, T. H. ET AL. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell lines from one patient with Jervell and Lange-Nielsen syndrome, one with type 1 long QT syndrome and two healthy relatives. **Stem Cell Res**, v. 31, p. 174–180, 2018.

KHAN, M. et al. Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction. **Circulation research**, v. 117, n. 1, p. 52–64, 19 jun. 2015.

KOH, B. et al. Three dimensional microcarrier system in mesenchymal stem cell culture: a systematic review. **Cell & bioscience**, v. 10, n. 1, p. 75, 3 jun. 2020.

KOMURO, H. et al. Advances of engineered extracellular vesicles-based therapeutics strategy. **Science and technology of advanced materials**, v. 23, n. 1, p. 655–681, 31 dez. 2022.

KOWAL, J. et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 8, p. E968-77, 23 fev. 2016.

LIU, Y.-J.; WANG, C. A review of the regulatory mechanisms of extracellular vesicles-mediated intercellular communication. **Cell communication and signaling: CCS**, v. 21, n. 1, 13 abr. 2023.

LO CICERO, A.; STAHL, P. D.; RAPOSO, G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. **Current opinion in cell biology**, v. 35, p. 69–77, ago. 2015.

LOH, C. Y. Y. et al. Episomal induced pluripotent stem cells promote functional recovery of transected Murine peripheral nerve. **PloS one**, v. 11, n. 10, p. e0164696, 13 out. 2016.

LV, Y. et al. The role of microvesicles and its active molecules in regulating cellular biology. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 23, n. 12, p. 7894–7904, dez. 2019.

MACNEIL, D. **Brush Up: What is stemness and pluripotency?** Disponível em: <<https://www.the-scientist.com/university/brush-up-what-is-stemness-and-pluripotency-70571>>.

MARINARO, F. et al. Unraveling the molecular signature of extracellular vesicles from endometrial-derived Mesenchymal Stem Cells: Potential modulatory effects and therapeutic applications. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 7, p. 431, 20 dez. 2019.

MULCAHY, L. A.; PINK, R. C.; CARTER, D. R. F. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. **Journal of extracellular vesicles**, v. 3, n. 1, p. 24641, 4 ago. 2014.

ODORICO, J. S.; KAUFMAN, D. S.; THOMSON, J. A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 19, n. 3, p. 193–204, 2001.

OLMER, R. et al. Suspension culture of human pluripotent stem cells in controlled, stirred bioreactors. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 18, n. 10, p. 772–784, out. 2012.

PANAGIOTOU, N. et al. Extracellular vesicles, ageing, and therapeutic interventions. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 8, 18 ago. 2018.

PARAYATH, N. N.; PADMAKUMAR, S.; AMIJI, M. M. Extracellular vesicle-mediated nucleic acid transfer and reprogramming in the tumor microenvironment. **Cancer letters**, v. 482, p. 33–43, 10 jul. 2020.

PIERAGOSTINO, D. et al. Enhanced release of acid sphingomyelinase-enriched exosomes generates a lipidomics signature in CSF of Multiple Sclerosis patients. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 3071, 15 fev. 2018.

RAFIQ, Q. A. et al. Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor. **Biotechnology letters**, v. 35, n. 8, p. 1233–1245, ago. 2013.

ROBEY, P. G. Stem cells near the century mark. **The journal of clinical investigation**, v. 105, n. 11, p. 1489–1491, jun. 2000.

SAHOO, S. et al. Therapeutic and diagnostic translation of extracellular vesicles in cardiovascular diseases: Roadmap to the clinic. **Circulation**, v. 143, n. 14, p. 1426–1449, 6 abr. 2021.

SANTOSO, M. R. et al. Exosomes from Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes promote autophagy for myocardial repair. **Journal of the American Heart Association**, v. 9, n. 6, p. e014345, 17 mar. 2020.

SILVA, A. M. et al. Extracellular Vesicles: Immunomodulatory messengers in the context of tissue repair/regeneration. **European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 98, p. 86–95, 15 fev. 2017.

SIMEONE, P. et al. Extracellular vesicles as signaling mediators and disease biomarkers across biological barriers. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 7, p. 2514, 4 abr. 2020.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–872, 30 nov. 2007.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, 25 ago. 2006.

THÉRY, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of extracellular vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1535750, 23 nov. 2018.

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

TKACH, M.; THÉRY, C. Communication by extracellular vesicles: Where we are and where we need to go. **Cell**, v. 164, n. 6, p. 1226–1232, 10 mar. 2016.

TSAI, A.-C.; PACAK, C. A. Bioprocessing of human mesenchymal stem cells: From planar culture to microcarrier-based bioreactors. **Bioengineering (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 7, p. 96, 7 jul. 2021.

VAN NIEL, G.; D'ANGELO, G.; RAPOSO, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 19, n. 4, p. 213–228, abr. 2018.

VOGEL, G. Can old cells learn new tricks? **Science (New York, N.Y.)**, v. 287, n. 5457, p. 1418–1419, 25 fev. 2000.

WANG, A. Y. L. Human induced pluripotent stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for various diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 4, p. 1769, 10 fev. 2021.

WANG, Y. et al. Exosomes/microvesicles from induced pluripotent stem cells deliver cardioprotective miRNAs and prevent cardiomyocyte apoptosis in the ischemic myocardium. **International journal of cardiology**, v. 192, p. 61–69, 1 ago. 2015.

WATT, F. M.; HOGAN, B. L. Out of Eden: stem cells and their niches. **Science (New York, N.Y.)**, v. 287, n. 5457, p. 1427–1430, 25 fev. 2000.

YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of extracellular vesicles**, v. 4, n. 1, p. 27066, 14 maio 2015.

YEKRANGSAFAKAR, A. et al. Hollow microcarriers for large-scale expansion of anchorage-dependent cells in a stirred bioreactor. **Biotechnology and bioengineering**, v. 115, n. 7, p. 1717–1728, jul. 2018.

YLOSTALO, J. H. 3D stem cell culture. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 10, p. 2178, 27 set. 2020.

YU, J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 318, n. 5858, p. 1917–1920, 21 dez. 2007.

ZWEIGERDT, R. et al. Scalable expansion of human pluripotent stem cells in suspension culture. **Nature protocols**, v. 6, n. 5, p. 689–700, maio 2011.