

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ERNESTO DA SILVEIRA GOULART GUIMARÃES

**OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-
TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS PARA TECIDO EPITELIAL
ALVEOLAR EM MICROGRAVIDADE MODELADA UTILIZANDO
COLÁGENO COMO MATRIZ DE MICROENCAPSULAMENTO**

Juiz de Fora

2015

UFJF	Ernesto da Silveira Goulart Guimarães	OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE DIFERENCIAÇÃO...	2015
-------------	--	--	-------------

ERNESTO DA SILVEIRA GOULART GUIMARÃES

**OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
EMBRIONÁRIAS MURINAS PARA TECIDO EPITELIAL ALVEOLAR EM
MICROGRAVIDADE MODELADA UTILIZANDO COLÁGENO COMO MATRIZ DE
MICROENCAPSULAMENTO**

Dissertação de Mestrado do Curso
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Área: Genética e
Biotecnologia, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências
Biológicas: Área: Genética e
Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Raúl Marcel González Garcia

Co-orientador: Prof. Dr. Peter I. Lelkes

Juiz de Fora

2015

Dedicado à minha Mãe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, sob a luz de minha própria concepção de sua natureza, por me prover força e inteligência para seguir minha carreira profissional e minha vida pessoal. Agradeço a UFJF e a Temple University, assim como o CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio em minha formação.

Sou muito grato a minha mãe e a Soraia por todo esforço e amor incondicional e por partilhar comigo os mais importantes valores da vida. Sou muito honrado de dividir minha vida com uma pessoa tão especial, gentil e brilhante quanto é Tábata. Sou muito grato pelo seu amor e ternura que você e toda sua família me dão.

Agradeço ao Dr. Raúl Garcia por sempre acreditar em meu potencial e por sempre me apoiar na busca de meus sonhos. Também sou grato a Dr. Ana Eliza Andreazzi por todo conhecimento e suporte no começo de minha carreira. Da mesma forma, agradeço ao Dr. Carlos Maranduba e ao Dr. Luiz Caires.

Terceiro e não menos importante agradeço ao Dr. Peter I. Lelkes por ser uma pessoa tão atenciosa e uma inspiração para mim. Sou muito grato por ter sido aceito e trabalhado sobre sua orientação. É uma grande honra e responsabilidade ter sido seu aluno. Obrigado por compartilhar um pouco de seu conhecimento e por me introduzir o tema de engenharia de tecidos. Pelos mesmos motivos sou grato ao futuro doutor Collin Stabler, meu grande amigo e quem aceitou compartilhar sua bancada.

Agradeço a todos meus amigos, familiares e colegas, em especial ao grupo de pesquisadores e profissionais do Departamento de Bioengenharia da Universidade de Temple e do Departamento de Biologia e Fisiologia da UFJF.

“Imaginação é mais importante que conhecimento. Conhecimento é limitado. Imaginação envolve o mundo”.

Albert Einstein (1930).

RESUMO

A doença obstrutiva pulmonar crônica é quarta maior causa de morte no mundo. Abordagens utilizando a engenharia de tecidos para tratar tal condição estão ganhando destaque na comunidade acadêmica. Uma fonte viável de células-tronco pluripotentes, assim como protocolos de diferenciação altamente eficientes são necessários para dar sustentação à regeneração do tecido alveolar lesados. O cultivo de células-tronco embrionárias microencapsuladas em hidrogéis tridimensionais em microgravidade modelada recentemente mostrou ser mais eficaz para a diferenciação de células epiteliais alveolares que protocolos bidimensionais padrões. Tendo em vista este protocolo, o objetivo deste trabalho foi de avaliar a influencia de uma nova matriz de encapsulamento feita de colágeno tipo I comparado à matriz de encapsulamento padrão de alginato para diferenciação e crescimento de células tronco embrionárias de camundongos (E14 12 delta S) para um fenótipo de células epiteliais alveolares, utilizando meio condicionado de células A549 como indutor de diferenciação. Foi realizada a caracterização físico-química do novo material hidrogélico (deformação por secagem, percentual de água, análise topográfica e cinética de transporte molecular), determinação do crescimento dos agregados celulares e o numero total final de células viáveis ao final do experimento. Foram analisamos marcadores gênicos de diferenciação para endoderme (FOXA2, SOX17 e CXCR4) e tecido epitelial pulmonar (SPA, SPB e SPC) na metade e ao final do experimento. O novo material apresentou uma capacidade aprimorada de transporte de massas devido à natureza de sua estrutura mais porosa e hidrofílica, com fibras aparentes bem definidas. As células apresentaram uma maior curva de crescimento dentro do novo material assim como maior numero total de células viáveis ao final do experimento. A análise genética de marcadores de endoderme mostrou que a nova matriz de colágeno propicia uma aparente diferenciação mais rápida em endoderme que na matriz de alginato, assim como, inicia mais rapidamente a expressão aparente de marcadores de células epiteliais alveolares (SPA e SPB, mas não SPC). Este trabalho mostra que microcápsulas de colágeno tipo I são aparentemente uma matriz melhor para crescimento e diferenciação em microgravidade modelada de células-tronco embrionárias para a produção *in vitro* de células epiteliais alveolares.

Palavras Chaves: Engenharia de tecido pulmonar, células-tronco embrionárias de camundongo, hidrogéis, microgravidade, cultura tridimensional.

ABSTRACT

Chronic obstructive pulmonary disease is the fourth leading cause of death worldwide. Approaches using tissue engineering to treat this condition have recently gained prominence in the academic community. A viable source of pluripotent stem cells, as well as highly efficient differentiation protocols is needed to support the regeneration of injured alveoli. Culture of embryonic stem cells in three-dimension microencapsulated hydrogels in modeled microgravity has recently been shown to be more effective for the differentiation of alveoli epithelium cells than standard two-dimensional protocols. Given this protocol, the aim of this study was to evaluate the influence of a new encapsulation matrix made of collagen type I compared to standard encapsulation material of alginate for the differentiation and growth of mouse embryonic stem cells (E14 12 delta S) towards alveoli epithelium phenotype using A549-cells conditioned medium as inducer of the differentiation. Was performed a physical-chemical characterization of the new hydrogel material (drying deformation, water percentage, topographical analysis and molecular transport kinetics analysis) as well as the growth of cellular aggregates and total number of viable cells at the end of the experiment. Gene markers were analyzed for endoderm differentiation (FOXA2, SOX17 and CXCR4) and alveoli epithelial tissue (SPA, SPB and SPC) at the middle and at the end of the experiment. The new material shows an enhanced mass transport ability due to its own porously and hydrophilic structure nature with well-defined apparent fibers. Cells exhibited a higher growth curve as well as a higher total number of viable cells at the end of the experiment. Genetic analysis for markers of endoderm showed that new collagen matrix apparently provides a faster endoderm differentiation than the alginate matrix, and starts the apparent expression of alveolar epithelium markers (SPA and SPB, but not SPC) sooner. This work showed that collagen type I microcapsules are apparently a better matrix for growth and differentiation in modeled microgravity of embryonic stem cells for *in vitro* production of alveolar epithelial cells.

Keys words: Lung tissue engineering, mouse embryonic stem cells, hydrogels, microgravity, three-dimensional culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura anatômica-funcional pulmonar.....	2
Figura 2: Representação dos componentes celulares do pulmão.....	3
Figura 3: Representação do alvéolo pulmonar e membrana respiratória	4
Figura 4: Representação do biorreator HARV.....	15
Figura 5: Representações matemáticas das variáveis envolvidas no sistema HARV ..	16
Figura 6: Representação dos protocolos de produção das microcápsulas.....	20
Figura 7: Cultura e obtenção de meio condicionado de células A549.....	25
Figura 8: Representação da análise da área dos esferoides-celulares	28
Figura 9: Caracterização dos hidrogéis.....	31
Figura 10: Absorção de FITC-Dextrana 150 KDa.	32
Figura 11: Cinética de liberação de FITC-Dextrana 150 kDa.....	33
Figura 12: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura dos hidrogéis.....	34
Figura 13: Cultura e caracterização das células E14 12 delta S.....	35
Figura 14: Área dos esferoides celulares ao longo do tempo de cultura.....	36
Figura 15: Contagem de células extraídas de 20 microcápsulas depois de 11 dias. ...	37
Figura 16: Expressão de NANOG.....	38
Figura 17: Expressão de FOXA2	39
Figura 18: Expressão de SOX17	40
Figura 19: Expressão de CXCR4	41
Figura 20: Expressão de marcadores de epitélio pulmonar.....	42

LISTA DE ABREVIACOES

2D = Bi-dimensional

3D = Tri-dimensional

ALG = Microcápsula(s) de alginato

BMP4 = Proteína morfognica derivada de osso 4 (do inglês: *Bone-derived Morphogenic Protein 4*)

CD = Marcador de diferenciao (do inglês: *Cluster of Differentiation*)

CE = Corpos embrionários

CEA = Célula(s) epitelial(ais) alveolar (es)

CEAI/II = Célula(s) epitelial(ais) alveolar (es) tipo I/tipo II

CM = Meio condicionado

COL = Microcápsula(s) de colágeno

CTE = Célula(s)-tronco embrionária(s)

CXCR4 = Receptor de Quimiocina 4 (do inglês: *Chemokine Receptor 4*)

DMEM = (Meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*))

DPOC = Doença Pulmonar Obstrutiva Crnica

FBS = Soro Fetal Bovino (do inglês: *Fetal Bovine Serum*)

FITC = Isotiocianato de Fluoresceína (do Inglês: *Fluorescein Isothiocyanate*)

FOXA2 = *Forkhead Box A2*

HARV/HV = Recipiente de parede rotatória de alto aspecto (do inglês: *High-Aspect Rotating-wall Vessel*) Cultivo em microgravidade

iPSCs = Células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês: *Induced Pluripotent Stem Cell*)

L-glu = L-Glutamina

LIF = Fator inibidor de leucemia (do inglês: *Leukemia inhibitory factor*)

MEC = Matriz extracelular

Nanog = *Homeobox protein nanog*

NASA = Agência nacional aero-espacial americana (do Inglês: *National Air-Space Agency*)

PBS = Tampão fosfato de sódio

Penn/Strep = Penicilina e Streptomicina (do inglês: *Penicillin/Streptozotocin*)

qRT-PCR = Reação em cadeia de polimerase-trascriptase reversa em tempo real quantitativa (do inglês: *Real time quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*)

rpm = Rotações por minuto

SOX17 = *SRY (sex determining region Y)-box 17*

SOX2 = *SRY (sex determining region Y)-box 2*

SP = Grupo de diferenciação espontânea

SPA = Proteína surfactante A (do inglês: *Surfactant Protein A*)

SPB = Proteína surfactante B (do inglês: *Surfactant Protein B*)

SPC = Proteína surfactante C (do inglês: *Surfactant Protein C*)

ST = Cultivo estático

TGF β = Fator de crescimento transformador β (do inglês: *Transforming Growth Factor β*)

TN-C = Tenascina C

TTF1 = Fator de transcrição da tireoide 1 (do inglês: *Thireoid Transcription Factor 1*)

LISTA DE SÍMBOLOS

K _m	Constante de Michaelis
m/v	Massa por volume
n	Número de repetições experimentais experimentais
p	Valor de <i>p</i> estatístico
r _q	Quantificação relativa
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O pulmão	1
1.2 O epitélio e o desenvolvimento pulmonar	4
1.3 Doença pulmonar obstrutiva crônica.....	6
1.4 Abordagens de engenharia tecidual pulmonar	9
1.5 Cultura de células-tronco embrionárias.	10
1.6 Diferenciação de células-tronco embrionárias em tecido epitelial alveolar	12
1.7 Encapsulamento e cultura tridimensional	13
1.8 Cultura celular em microgravidade modelada.....	14
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo específico 1: Caracterização de materiais	18
2.2 Objetivo específico 2: Proliferação celular	18
2.3 Objetivo específico 3: Diferenciação celular	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Formação das microcápsulas de hidrogél	19
3.1.1 Microcápsulas de alginato	19
3.1.2 Microcápsulas de colágeno	19
3.2 Caracterização dos materiais.....	21
3.2.1 Peso e diâmetro hidratado.....	21
3.2.2 Peso e diâmetro seco	21
3.2.3 Ensaio de absorção de FITC-dextrana	22
3.2.3.1 Cinética de liberação de FITC-dextrana	22
3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura	23
3.3 Declaração de ética e cultura celular	24
3.3.1 Células A549 e obtenção de meio condicionado	24
3.3.2 Cultura de E14 12 delta S	25
3.4 Cultura experimental.....	26
3.4.1 Estática	26
3.4.2 HARV	27

3.5 Medida da área dos esferoides-celulares	27
3.6 Contagem de células	28
3.7 qRT-PCR	29
3.8 Citometria de fluxo	30
3.9 Análise estatística	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Caracterização dos materiais.....	31
4.1.1 Ensaio de absorção FITC-Dextrana.....	32
4.1.2 Cinética de liberação de FITC-Dextrana.....	32
4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura	33
4.2 Caracterização da cultura de E14 12 delta S.....	35
4.3 Proliferação celular	36
4.4 Diferenciação celular	38
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÃO	50
7. REFERENCIAS	51
8. ANEXOS.....	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 O pulmão

O pulmão é uma estrutura complexa e organizada em compartimentos hierárquicos. Ele é composto por mais de 40 tipos diferentes de células especializadas, tais como fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliais vasculares, células endoteliais linfáticas e nervos, além de populações residentes de células do sistema imunológico (FRANKS *et al.*, 2008; SILVERTHORN, 2006). As principais células epiteliais pulmonares são: células ciliadas, células caliciformes, células basais, as células da escova, as células serosas, células neuroendócrinas pulmonares, células da clara e as células epiteliais alveolares (FRANKS *et al.*, 2008). O desenvolvimento das células epiteliais alveolares é o foco central deste trabalho.

Anatomicamente, o pulmão pode ser dividido em duas subunidades anatômicas principais, o pulmão proximal e o distal (Figura 1). Na respiração normal, o ar é inspirado e distribuído pela porção proximal para porção distal. A região proximal é a região das vias aéreas que não realizam troca gasosa, sendo composta pela traqueia, brônquios e bronquíolos. A região distal, por sua vez é a porção respiratória, onde ocorre a troca gasosa, sendo composta de bronquíolos respiratórios, ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos. Os alvéolos são as menores estruturas das vias aéreas e a mais importante na realização de troca de gases. Bronquíolos respiratórios se ramificam consecutivamente em vários ductos alveolares e eventualmente em alvéolos, formado a árvore respiratória. Células da clara são uma das principais células epiteliais que recobrem os bronquíolos respiratórios. Células da clara secretam a Proteína Secretada pelas Células da Clara (CCSP ou CC10) para proteger o epitélio bronquiolar. Elas servem, como as células progenitoras do epitélio bronquiolar. Porém, como já dito, os alvéolos são considerados a unidade funcional mais essencial da fisiologia do pulmão distal (SILVERTHORN, 2006; FISHER, 2009).

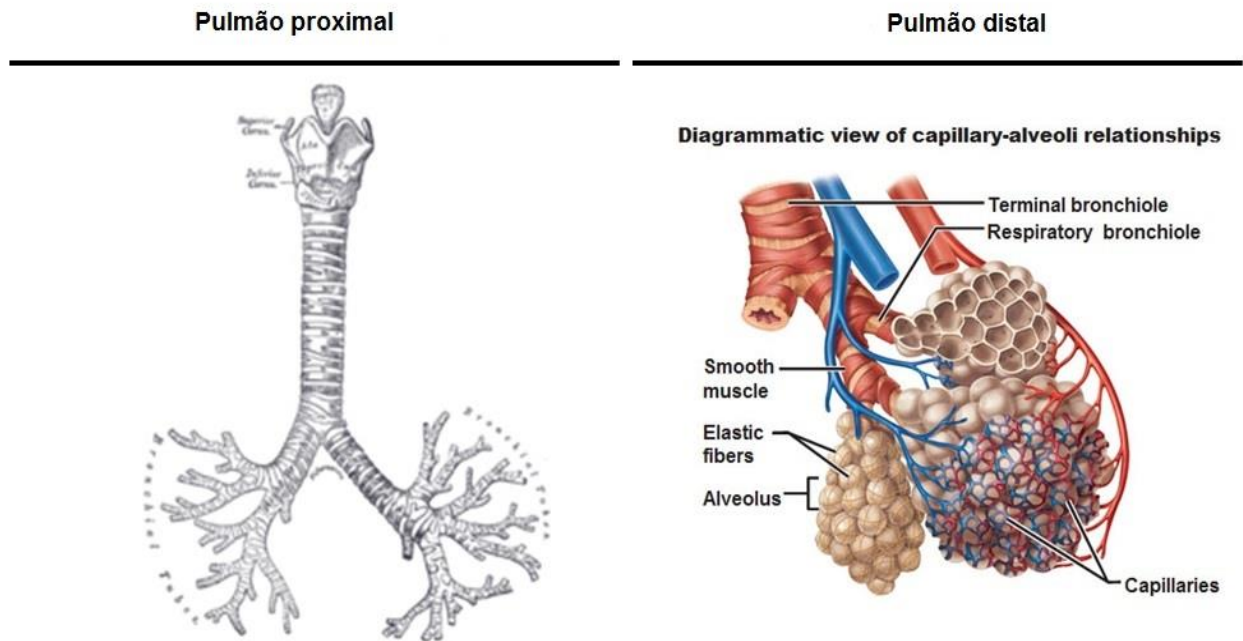


Figura 1: Estrutura anatômica-funcional pulmonar. Fontes: http://www.thefullwiki.org/Respiratory_tree <https://www.studyblue.com/notes/note/n/chapter-25-structure-and-function-of-the-pulmonary-system/deck/6303325>, acessado em 19/02/2015. Modificado pelo autor.

O ser humano adulto contém cerca de 480 milhões de alvéolos, representando uma área transversal total de mais do que 1 milhão de centímetros quadrados (SILVERTHORN, 2006; OCHS *et al.*, 2004). Alvéolos são formados para aumentar a área de superfície de troca gasosa (NOLEN-WALSTON *et al.*, 2008). Os alvéolos são sacos de ar separados entre si por uma membrana basal extremamente fina, ou septo alveolar, rodeado por estruturas de fibras elásticas e de uma rede de capilares pulmonares alveolares em íntimo contato com a parede externa do alvéolo (SILVERTHORN, 2006). Esta fina membrana basal que separa o alvéolo e o capilar, serve como uma barreira de difusão de gás entre o epitélio alveolar e endotélio capilar, também chamada de membrana respiratória (SILVERTHORN, 2006). Alvéolos têm uma estrutura arquitetônica complexa. Eles são formados a partir da interação de múltiplos tipos de células, incluindo Células Epiteliais Alveolares (CEA), fibroblastos intersticiais, miofibroblastos, células musculares lisas e células endoteliais capilares. Existem dois tipos de CEA (também conhecidos como pneumócitos); tipo I (CEAI) e tipo II (CEAII) (Figura 2).

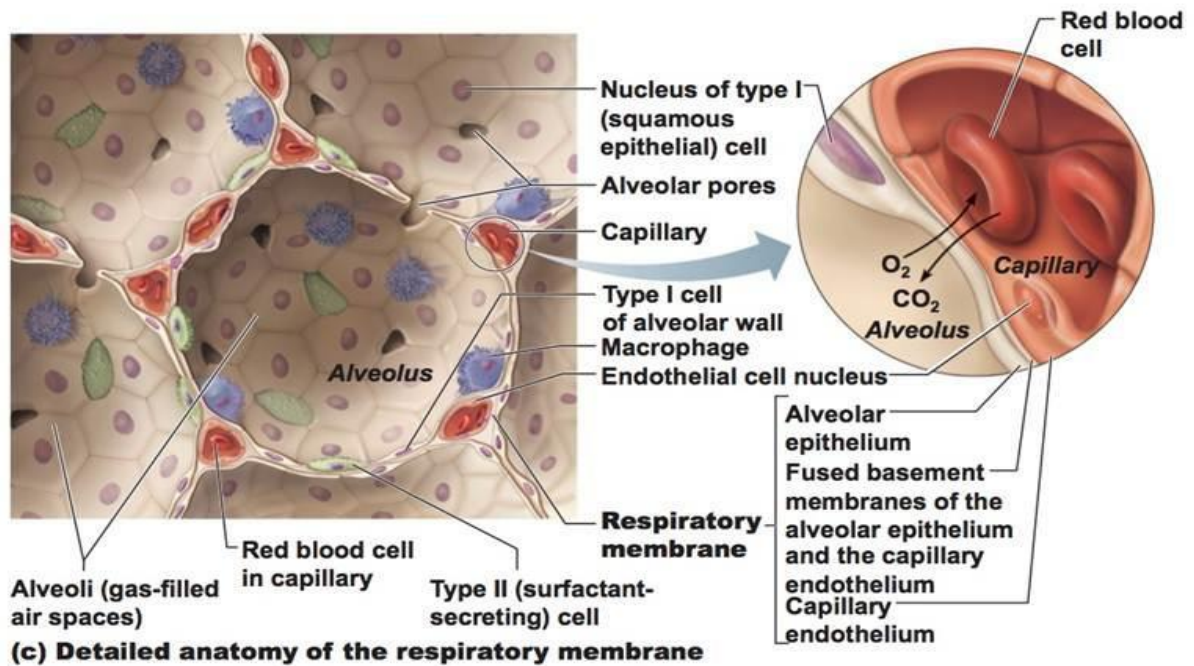


Figura 3: Representação esquemática do alvéolo pulmonar e membrana respiratória. Fonte: <http://antranik.org/the-respiratory-system/>, acessado em 19/02/2015.

Assim, a organogênese alveolar, tendo em vista sua refinada arquitetura, é complexa e qualquer tentativa de regenerar e desenvolver este tecido exige uma população numerosa e diferenciada de células pulmonares. Desta forma, a investigação de mecanismos de sinalização envolvidos na diferenciação e desenvolvimento deste tecido pode fornecer novas perspectivas de regeneração bem-sucedida de alvéolos pulmonares.

1.2 O epitélio e o desenvolvimento pulmonar

Como já dito, o alvéolo possui duas células epiteliais distintas, as CEAs tipo I e tipo II. As células do tipo I são planas e correspondem à maior parte da superfície alveolar. Células do tipo II são células cúbicas que secretam surfactante pulmonar. As CEAs tipo II são consideradas como progenitoras do epitélio alveolar, pois desempenham um papel importante na re-epitelização após a lesão alveolar local, passando por uma breve expansão clonal mitótica e posterior diferenciação em CEAs tipo I (NOLAN-WALSTON *et al.*, 2008). Vários estudos demonstraram que a entrega local de

CEAll pode promover a regeneração alveolar em modelos animais de lesão pulmonar (SERRANO-MOLLAR *et al.*, 2007; GUILLAMAT *et al.*, 2010; SAMADIKUCHAKSARAEI e BISHOP, 2007).

Evolutivamente, células epiteliais alveolares são oriundas de um sítio na região *foregut* da endoderme (região anterior), que surge a partir da endoderme definitiva e que se desenvolve e interioriza na gastrulação. Inicialmente, após a gastrulação, o embrião dobra-se para formar um tubo endodérmico primitivo, que é dividido anatomicamente em *foregut* (anterior), *midgut* (medial) e *hindgut* (posterior). Cada região é então determinada a se comprometer a sítios específicos de órgãos por meio de sinalização parácrina da mesoderme circundante (WEIBEL, 2008). O família dos Fatores de Crescimento de Fibroblasto (FGF) derivado da mesoderme esplâncnica e a Proteína Morfogênica Óssea 4 (BMP4), também derivada de mesoderme, são os principais fatores parácrinos que diferenciam a distribuição de sítios-específicos dentro da região de endoderme anterior. A diferenciação e distribuição celular podem ser identificadas pela expressão e transcrição do Fator de Transcrição Tireoide 1 (TTF-1, também conhecido como Nkx2.1) e FOXA2 e a redução da expressão do fator de transcrição de SOX2 na endoderme anterior no *foregut* no nono dia embrionário em camundongos ou quarta semana em humanos. Após a este período, ocorre a formação dos dois corpúsculos pulmonares primitivos. Cada corpúsculo então sofrerá um programa de morfogênese e ramificação repetitivo, dando origem à árvore respiratória altamente ramificada e, eventualmente, os alvéolos imaturos. A ramificação pulmonar também é também regulada por sinalização de FGF a partir da mesoderme esplâncnica circundante. Durante a ramificação e morfogênese, um evento importante envolve a diferenciação das linhagens celulares, que continua até o período pós-natal precoce para gerar eventualmente os diferentes tipos de células epiteliais que revestem o parênquima pulmonar maduro (WEIBEL, 2008).

Interações através de sinalização parácrina múltipla entre endoderme anterior e sua mesoderme circundante governam processos de síntese (WEIBEL, E.R. 2008). Os fatores regulatórios principais são membros da família do fator transformador de crescimento beta (TGF β), membros da família do FGF, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), Wnts, *Sonic hedgehog* (Shh), Notch, e componentes da Matriz

Extracelular (MEC), tais como: lamininas, fibronectina, colágenos, tenascina-C (TN-C), sulfato de condroitina e proteoglicanos (WEIBEL, 2008; GEBB e JONES, 2003). Enquanto a endoderme anterior desenvolve-se no revestimento epitelial, o mesênquima envolvente dá origem a fibroblastos, que sintetizam a matriz extracelular e as células do sistema vascular, que são constituídas por células de músculo liso, células endoteliais e pericitos (WEIBEL, 2008). Tradicionalmente, uma vez que o desenvolvimento alveolar normal é completado, é extremamente difícil de regenerar novos alvéolos funcionais *in situ* para substituir o tecido danificado (MORRISEY e HOGAN, 2010; MURRAY, 1986). Alternativamente, a fim de restaurar a função normal de troca de gases do epitélio danificado, os tecidos alveolares saudáveis remanescentes passam por um processo chamado de crescimento compensatório (PAVELKA e ROTH, 2005). Alguns exemplos de crescimento compensatório incluem rearranjo de elementos da matriz dentro dos septos alveolares ou alterações no tamanho dos sacos alveolares visando à redistribuição de superfície (MURRAY, 1986). Os novos alvéolos só podem ser formados quando o processo de desenvolvimento de ramificações e morfogênese se condensam (HSIA, 2004).

1.3 Doença pulmonar obstrutiva crônica

Perturbações da fisiologia e do desenvolvimento das vias aéreas distais têm consequências profundas sobre a homeostase de organismos complexos. A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é patologicamente definida como a ocorrência de bronquite crônica e enfisema, um par de doenças pulmonares comumente coexistentes em que as vias aéreas estreitam-se ao longo do tempo (JORGENSEN, 2014). Isso limita o fluxo de ar para os pulmões, diminuindo a capacidade de troca de gases (dispnéia).

Estimase-se que a DPOC afeta mais 329 milhões de pessoas, cerca de 5% da população mundial (WHO, 2013). Em 2011, foi classificada como a quarta principal causa de morte no mundo, matando mais de 3 milhões de pessoas e segundo projeções será a terceira maior causa de morte em 2030 (WHO, 2013). Este número deverá aumentar devido ao aumento populacional dos tabagistas e ao envelhecimento da população em muitos países (MATHERS e LONCAR, 2006). A DPOC resultou em um

custo estimado de US\$ 2,1 trilhões em 2010 mundialmente (BJORN, 2013). No Brasil, no ano de 2008, a DPOC atingia mais 7 milhões de pessoas, sendo que somente 12% dos pacientes portadores eram diagnosticados, e destes, apenas 18% recebiam tratamento (WHO, 2008).

A bronquite crônica é causada pela recorrente lesão ou irritação no epitélio dos brônquios, resultando em inflamação crônica com infiltração de células T CD8+, macrófagos e neutrófilos, edema (inchaço), e engrossamento fibrótico das paredes brônquicas com estreitamento luminal (RABE *et al.*, 2007; NATHELL *et al.*, 2007; WHO, 2013). O aumento do número de células produtoras de muco nos brônquios e bronquíolos e aumento das glândulas mucosas traqueais resulta em uma secreção de muco aumentada (RABE *et al.*, 2007). A resistência ao fluxo de ar, característica da bronquite crônica, é principalmente devido à metaplasia de células caliciformes, criando tampões de muco nos bronquíolos, que apresentam fibrose bronquiolar concorrente e inflamação (RABE *et al.*, 2007; WHO, 2013).

Quando toxinas, como componentes da fumaça de cigarro são levada para os pulmões, as partículas nocivas ficam presas nos alvéolos, provocando uma resposta inflamatória localizada (HOGG e TIMENS, 2009). Enzimas liberadas pela resposta inflamatória (por exemplo, elastases) pode fazer com que o septo alveolar eventualmente desintegrar-se, sendo este o conceito patofisiológico da enfisema (HOGG e TIMENS, 2009). Esta condição, conhecida como ruptura do septo, leva à deformação significativa da arquitetura alveolar (RABE *et al.*, 2007; NATHELL *et al.*, 2007) com consequências funcionais importantes. O evento chave e consequente da ruptura mecânica do septo é uma cavidade alveolar resultante maior do que a soma dos dois espaços alveolares prévios, devido à falta de apoio mecânico dos septos. A expansão da cavidade alveolar adicional é criada à custa do parênquima saudável circundante (HOGG e TIMENS, 2009). Em outras palavras, a consequência imediata e espontânea da ruptura do septo, o recolhimento elástico, redefine a expansão do parênquima saudável em um nível inferior, em proporção à quantidade de perturbação septal. As grandes cavidades deixadas pela ruptura do septo são conhecidas como bolhas. Este fenômeno resulta em uma deformação e diminuição de uma grande área superficial dos alvéolos utilizado para a troca de gases, bem como a diminuição da

ventilação do parênquima saudável circundante. Isso resulta em uma diminuição da taxa transferência do monóxido de carbono do sangue para o pulmão (HOGG e TIMENS, 2009).

Para compensar a diminuição da área de superfície de troca gasosa alveolar funcional, ocorre a expansão da caixa torácica (tórax em barril) e contração do diafragma (achatamento). Em consequência da perda de elasticidade, o recolhimento elástico pulmonar é cada vez mais dependente da caixa torácica e da ação muscular abdominal, particularmente na fase final da expiração (HOGG e TIMENS, 2009). Devido à diminuição da ventilação, a capacidade de eliminação de dióxido de carbono é significativamente prejudicada. Nos casos mais graves, o consumo de oxigênio é, portanto, prejudicado. Como os alvéolos continuam a “quebrar”, a hiperventilação é incapaz de compensar o problema. Progressivamente à diminuição da área de superfície alveolar, o corpo não é capaz de manter os níveis de oxigênio suficientemente elevados no sangue. Último recurso é vasoconstrição. Isto leva a hipertensão pulmonar, o que aumenta a tensão no lado direito do coração, o lado responsável para bombear o sangue oxigenado aos pulmões (HOGG e TIMENS, 2009). O músculo cardíaco engrossa a fim de bombear mais sangue. Esta condição é muitas vezes acompanhada de distensão venosa jugular aparente. Eventualmente, como o coração continua a falhar, este se torna maior, realizando o backup de sangue hepático (HOGG e TIMENS, 2009).

Quando ocorre então a falência do órgão, em pacientes que sofrem de DPOC em estágio final, a única alternativa disponível atualmente é o transplante bilateral ou unilateral do órgão. Entretanto, o número de pacientes adultos ativos na lista de espera para transplante de pulmão aumentou em 1,6 vezes no período de 2005 até 2014, e o número de pacientes adultos ativos no final do mesmo período aumentou 1,4 vezes em todo o mundo (JORGEN, 2014). Estes dados indicam que a oferta de doadores saudáveis de pulmões para transplante é discrepante com o aumento do número de pacientes que estão sendo adicionados à lista de espera. Isto resulta em uma alta demanda e longa espera para o transplante do órgão, causando alta mortalidade, redução da qualidade de vida dos pacientes e gerando altos custos médicos.

1.4 Abordagens de engenharia tecidual pulmonar

Uma solução potencial para o dilema da escassez de órgãos para transplante envolve abordagens de engenharia tecidual. A fim de se recriar as porções distais do pulmão, precisaremos necessariamente de uma fonte de obtenção/proliferação de células adequadas, bem como desenvolver o melhor substrato, ou matriz, para crescimento celular tridimensional no qual essas células irão crescer, organizar-se e interagir com sinais indutivos.

A utilização de células fetais pulmonares foi relatada como sendo capaz de reconstruir estruturas ramificadas semelhantes aos alvéolos, utilizando cultura 3D em hidrogéis em combinação com sinais indutivos derivados da organogênese (DOUGLAS, MOORMAN e TEEL, 1976; CHEN *et al.*, 2005, MONDRINOS *et al.*, 2006).

A utilização de células fetais em ensaios clínicos em seres humanos não é adequada. Para superar este problema, pesquisadores têm utilizado diferentes abordagens, como o uso de células do epitélio das vias aéreas inferiores, que demonstraram capacidade de auto-renovação e são um forte candidato para uma possível utilização como células-tronco (ANDRADE *et al.*, 2007). Porém, existe muita controvérsia em relação a sua função tecidual e aplicabilidade. Células-tronco Embrionárias (CTE) vem sendo bastante estudadas como possível fonte para obtenção em larga escala de CEAs. As CTE devem, entretanto, para terem aplicabilidade e segurança clínica, necessariamente passar por um rigoroso procedimento prévio para diferenciação *in vitro* em endoderme e posteriormente nos fenótipos celulares desejados, além de separação/purificação das populações celulares resultantes para evitar a formação de tumores (teratoma) no paciente receptor.

Diversas abordagens para recriar estruturas, biorreatores ou arcabouços (ou do inglês *scaffold*), simuladores da arquitetura e função da MEC alveolar já foram relatadas (O'LEARY *et al.*, 2015). Entretanto, a busca de arcabouços naturais vem ganhando maior destaque visando possíveis aplicações clínicas bem sucedidas. Dentre os protocolos de obtenção de arcabouços naturais, o processo de decelularização, uma técnica em que as células e outros componentes teciduais imunogênicos são suavemente removidos do tecido tratado por meio de agentes químicos, tais como

detergentes, deixando a MEC e sua ultraestrutura 3D complexa bem preservada, vêm sendo bastante utilizada ao longo dos últimos 10 anos. A recelularização do substrato acelular tridimensional residual, oriundo tanto de humanos quanto de animais, utilizando células fetais pulmonares humanas demonstrou uma reconstrução funcional alveolar, porém com um grau limitado de troca gasosa duas semanas pós-implantação, mas novamente, não são adequadas para uso clínico (FRANZDOTTIR *et al.*, 2010). O estado da arte da técnica baseia-se na utilização de células progenitoras e/ou oriundas de CTE para repovoar o arcabouço decelularizado. Alguns pesquisadores têm demonstrado resultados positivos deste procedimento em ratos (SONG *et al.*, 2011; JENSEN *et al.*, 2012).

As CTE possuem um grande potencial para se diferenciar em fenótipos celulares alveolares em modelos murinos (LONGMIRE *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2010) e humanos (ROSZELL *et al.*, 2009; SAMADIKUCHAKSARAEI e BISHOP, 2006). Contudo, os protocolos *in vitro* para gerar CEAll, fenótipo celular mais desejado da diferenciação de CTE neste caso, ainda não são totalmente eficazes e a produção numérica final destas células é insuficiente para uso clínico. Por conseguinte, vários grupos têm se concentrado no desenvolvimento de protocolos de produção em larga escala destas células para utilização no tratamento de doenças respiratórias e abordagens de engenharia tecidual. A maioria dos protocolos de síntese tem focado na derivação de CEAll a partir de células-tronco, em especial CTE e pluripotentes induzidas (iPSCs) (LONGMIRE *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2010; ROSZELL *et al.*, 2009; O'LEARY *et al.*, 2015).

1.5 Cultura de células-tronco embrionárias.

Células-tronco embrionárias são as células obtidas nas primeiras divisões celulares após a fecundação. Refere-se a CTE as células obtidas da massa interna do blastocisto. Estas células são caracterizadas como células indiferenciadas, que possuem um alto potencial de se proliferar (auto renovação), além da capacidade de se diferenciar nas três camadas germinativas e posteriormente todos os tecidos que compõe o organismo adulto. O potencial de diferenciação destas células é guiado por

fatores de crescimento solúveis em gradientes de concentração, sinalizações parácrinas e célula-célula e, muitas vezes, por componentes de matriz extracelular, *in vitro* e *in vivo* (SAMADIKUCHAKSARAEI *et al.*, 2006). No entanto, a produção, obtenção e utilização destas células possuem graves limitações éticas e práticas. O estado indiferenciado de CTE em cultura experimental é mantido por uma rede de vias de sinalização que promovem a proliferação e impedem a diferenciação celular. Dentre as diversas estratégias de manter a pluripotência de uma cultura de CTE, temos a utilização de uma camada alimentadora (do inglês *feeder-layer*) de fibroblastos embrionários de camundongos, utilização de revestimento especial de recipientes de cultura celular, etc. Dentre estas abordagens, destaca-se a adição de fatores específicos ao meio de cultura, por exemplo, o Fator Inibidor da Leucemia (LIF) e a proteína morfogénica óssea 4 (BMP4) em meio de cultura livre de soro e quimicamente definido.

LIF funciona através da via JAK-STAT para promover a auto renovação das CTE (BURDON, SMITH e SAVATIER, 2002). LIF se liga ao receptor de LIF e associados ativam Janus tirosina quinase-associados (JAK), que fosforila o fator de transcrição STAT3 (BURDON, SMITH e SAVATIER, 2002). STAT3 fosforilado em seguida, transloca-se homodimerizado para o núcleo. Dímeros STAT3 ligam-se em sítios de DNA controlando a transcrição de genes importantes para a auto renovação e supressão da diferenciação para endoderme e mesoderme (BURDON, SMITH e SAVATIER, 2002).

BMP4, por sua vez, promove a auto renovação de CTE e inibe a diferenciação em ectoderme por meio da ativação da via SMAD (YING *et al.*, 2013). LIF ou BMP4 individualmente são insuficientes para promover a auto renovação. A interação entre LIF e BMP4 é essencial para auto renovação e manutenção da indiferenciação de CTE. A retirada de LIF e BMP4, na ausência de fatores de crescimento, permite que as CTE se diferenciem espontaneamente. Dependendo das condições de cultura e suplementações com fatores solúveis, CTE são capazes de se diferenciar *in vitro* em uma ampla gama de tipos celulares, como: cardiomiócitos, neurônios, células-beta pancreáticas, células alveolares do tipo II, entre outros; podendo em seguida, serem

implantadas respectivamente em modelos experimentais de enfarte cardíaco, doença de Parkinson, diabetes, fibrose pulmonar, entre outros (YING *et al.*, 2013).

1.6 Diferenciação de células-tronco embrionárias em tecido epitelial alveolar

Várias estratégias e protocolos foram utilizados para a diferenciação de CTE para células epiteliais pulmonares, incluindo: a utilização de um meio comercial projetado para manutenção *in vitro* de linhagens de células epiteliais das vias aéreas distais (SERRANO-MOLLAR *et al.*, 2007; GUILLAMAT *et al.*, 2010; SAMADIKUCHAKSARAEI e BISHOP, 2007; BURDON, SMITH e SAVATIER, 2002; YING *et al.*, 2013; RIPPON *et al.*, 2004; COHEN *et al.*, 2006), pré-diferenciação em endoderme definitiva (RIPPON *et al.*, 2006), co-cultura com mesênquima fetal (VAN VRANKEN *et al.*, 2007), utilização de extrato citoplasmático de células epiteliais alveolares maduras (QIN *et al.*, 2005), utilização de componentes da membrana basal (LIN *et al.*, 2010), utilização de diversos fatores de crescimento (LIN *et al.*, 2010) e a manipulação genética (WANG *et al.*, 2007), porém o rendimento destes protocolos, que em geral exigem várias etapas de diferenciação, são baixos e o custo é elevado, além de não serem passíveis de automação ou *scale-up* (produção em larga escala).

As etapas de diferenciação, na maioria dos protocolos, incluem a expansão da forma indiferenciada de CTE e/ou corpos embrionários (CE), e diferenciação terminal em direção ao tipo de celular desejado. CE são estruturas celulares esféricas resultantes da proliferação e/ou diferenciação de CTE em condições de cultura não aderentes. São compostas por um conjunto de células das três camadas germinativas. A sua formação se assemelha ao desenvolvimento de tecidos embrionários, mas o processo de diferenciação é limitado por causa das variações de tamanho e escassez de sinais indutores adequados (MAGYAR *et al.*, 2001). A formação de CE precisa da intervenção do operador, o que dificulta o processo de automação. Estas medidas são adotadas na maioria dos protocolos projetados para direcionar a diferenciação de CTE na maioria das linhagens celulares.

O encapsulamento de células dentro de um hidrogel é uma abordagem atraente, visto que facilita e aumenta o contato célula-célula e as interações célula-matriz. Além

disso, proporciona um ambiente personalizado tridimensional (3D), podendo suportar altas densidades celulares com limitações de transporte de massas, de acordo com o material utilizado. Isto resulta em comportamentos celulares que mais se assemelham ao comportamento celular em um tecido natural. A facilidade de manuseio e a diminuição da senescência são outros benefícios adicionais (GASPERINI, MANO e REIS, 2014).

1.7 Encapsulamento e cultura tridimensional

A integração bem sucedida das várias etapas de protocolos de diferenciação de CTE em condições de cultura 3D pode ser atribuída ao desenvolvimento de interações célula-célula e as interações célula-matriz, que se assemelham ao ambiente fisiológico celular natural, diferentemente da cultura 2D. A utilização de uma matriz adequada é necessária para permitir uma cultura de células dependentes de ancoragem em condições 3D (KHARKAR, KIICK e KLOXIN, 2013). Microcápsulas esféricas são usadas extensivamente para cultura de células, porque elas fornecem grandes áreas de superfície para o crescimento celular em cultura. Vários materiais para esta finalidade vêm sendo utilizados, como polissacarídeos, gelatina e colágeno (ALTANKOV, BRODVAROVA e RAHKOV 1991; CAHN, 1990). Entre as diferentes matrizes utilizadas para este fim, o alginato tem se mostrado ser um material interessante. A semipermeabilidade do alginato permite a difusão de oxigênio e nutrientes para as células e a eliminação de resíduos/metabólitos celulares depois da encapsulação. O alginato é facilmente polimerizado numa esfera, simplesmente deixando uma solução de ácido algínico ser gotejada em um reservatório contendo íons cálcio, que imediatamente polimeriza os monômero sacárides em fibras de alginato insolúveis microporosas em uma forma esférica semelhante a uma gota. Porém, dúvidas sobre a imunogenicidade do material, e sua eficiência sobre cultura de células extremamente susceptíveis a estímulos como as CTE tem sido levantadas (DUSSEAULT *et al.*, 2006)

A matriz formada por colágeno tem as características distintas de ser macroporosa e conter microestrutura fibrosa, mais semelhante aos tecidos *in natura* (LANGER e VACANTI, 1993). Além disso o colágeno é uma estrutura molecular comum

entre mamíferos, diferente do alginato, que é uma molécula encontrada apenas em algas. É possível reproduzir as complexas etapas da morfogênese alveolar utilizando células fetais pulmonares cultivadas em hidrogéis de colágeno suplementadas com fatores de crescimento da família FGF (MONDRINOS, *et al.*; 2007). As microcápsulas (do inglês *beads*) de colágeno são normalmente preparadas a partir da suspensão de colágeno de extratos brutos. As partículas esféricas de colágeno podem ser formadas através do disparo de uma suspensão de fibras de colágeno em azoto líquido, seguido por reações de desidratação e de reticulação do gel com os vapores de formaldeído ou glutaraldeído (DEAN, 1989; YANNAS, KIRK, 1984). Estes procedimentos empregam condições adversas e, aparentemente, não são apropriados para aprisionar células *in situ* para posterior cultivo. O alginato, por outro lado, pode ser formado em condições suaves, ao entrar em contato com íons cálcio (SMIDSRÖD e SKJAK-BREK, 1990). Utilizando esta propriedade de gelificação, uma nova abordagem de produção de *beads* hidrogélicos de colágeno, na presença de alginato como material de sacrifício foi desenvolvido. Tsai *et al* demonstrou que *beads* de colágeno podem ser reconstituídos em formato esférico após a liquefação de alginato utilizando uma solução de citrato, formando um *bead* esférico (TSAI *et al.*, 1998). Os dados obtidos pelo grupo de Tsai mostram proliferação celular aumentada dentro do *bead* em condição estática, comparada ao padrão de alginato, este resultado foi obtido novamente usando diferente linhagem celular anos mais tarde (TEBB *et al.*, 2006).

1.8 Cultura celular em microgravidade modelada

O HARV (do inglês *High Aspect Rotating Vessel*) é um tipo de biorreator de parede rotativa (do Inglês *Rotating Wall Vessel*, ou RWV) desenvolvido pela NASA (*National Aeronautics and Space Administration*) para simular microgravidade em cultura de células (Figura 4). A microgravidade no HARV é simulada pela rotação do fluido no interior do biorreator que se movimenta como um corpo sólido, evitando fluxos turbulentos e stress hidrodinâmico devido à baixa fricção sentida nas extremidades. A velocidade de rotação pode ser ajustada para atingir um ponto em que os vetores de força sobre as células são essencialmente anulados. Quando otimizado, as células

crecem num meio em queda livre constante, sem sentir os efeitos da gravidade puxando-as de encontro a uma superfície. A rotação em corpo sólido permite assim, um ambiente minimamente turbulento para o crescimento celular. Este ambiente de cultura em suspensão suave conduz a uma elevada eficiência de crescimento das células (HAMMOND e HAMMOND, 2001; AYYASWAMY e MUKUNDAKRISHNAN, 2002).

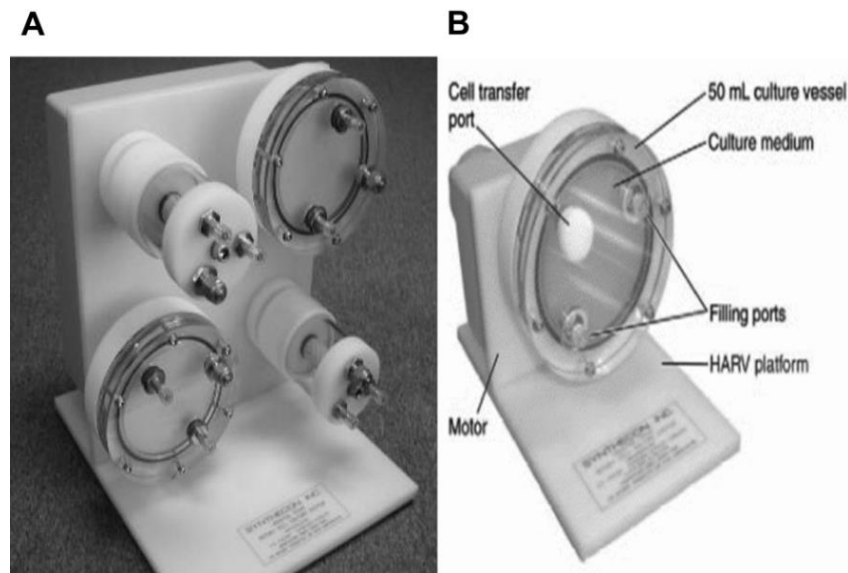


Figura 4: Representação do biorreator HARV. (A) Imagem real de um aparelho padrão produzido pela Synthecom®. (B) Representação dos componentes do sistema dinâmico do biorreator HARV.

A otimização da cultura em suspensão no HARV é conseguida através da aplicação de três conceitos. Em primeiro lugar, a velocidade terminal deve ser minimizada pela escolha de uma matriz de encapsulamento e meios de cultura tão próximos de densidade possível. Em segundo lugar, a rotação do recipiente induz o efeito Coriolis que por sua vez induz força centrífuga. Ambas as forças são diretamente dependentes da velocidade terminal e são minimizadas quando a velocidade terminal é reduzida. Em terceiro lugar o transporte de massa (de nutrientes) para uma célula em cultura em suspensão depende da velocidade terminal e da difusão de nutrientes (HAMMOND e HAMMOND, 2001). Como a velocidade terminal é minimizada, entrega de nutrientes por fluxo de massa é, portanto, reduzida. A difusão depende das propriedades tanto da partícula quanto do meio de cultura (Figura 5). A microgravidade

simulada em um HARV, melhora a interação célula-célula no ambiente 3D, que é um fator importante na diferenciação de CTE.

Terminal Velocity	$V_s = [2gr^2(\rho_p - \rho_f)]/(9\mu\rho_f)$
Shear Stress	$\tau_{\max} = \frac{3\mu V_s}{2r}$

Parameter	Description	Relationship	Power
<i>Terminal velocity</i>			
g	Gravity	Direct	1
r	Radius of particles	Direct square	2
$\rho_p - \rho_f$	Difference in density between culture particles and medium	Direct	1
μ	Viscosity of cell culture medium	Inverse	-1
ρ_f	Density of culture medium	Inverse	-1
<i>Shear stress</i>			
μ	Viscosity of cell culture medium	Direct	1
V_s	Terminal velocity	Direct	1
r	Particle radius	Inverse	-1

Figura 5: Representações matemáticas das variáveis envolvidas no sistema HARV. Extraído do trabalho de Hammond e Hammond, 2001.

Embora a diferenciação de CTE encapsuladas ter sido relatada em uma grande variedade de fenótipos celulares, como cartilagem, osso e células pancreáticas, apenas recentemente, Siti-Ismail *et al*, 2012 (SITI-ISMAIL *et al.*, 2012) relatou que CTE encapsuladas em alginato em ambiente de microgravidade, usando como indutor de diferenciação o meio condicionado obtido a partir da linhagem celular A549 (adenocarcinoma pulmonar humano), apresentam como resultado final, células com expressão da proteína surfactante C (do inglês SPC), um marcador bem estabelecido das CEAll.

A aplicação do meio condicionado-A549 em diferenciação em CEA foi relatada como uma alternativa eficiente e de baixo custo, comparado aos protocolos de diferenciação endodermal e posterior epitelial alveolar utilizando meios quimicamente definidos e com adição de fatores de diferenciação específicos (ROSZELL *et al.*, 2009; RIPPON *et al.*, 2008). Em particular, Roszell *et al*, 2009 relatou diferenciação em condições 2D e mantidas em meio condicionado-A549 por 11 dias, gerando 37,6% de células SPC-positivas, que é mais baixo do que o rendimento de aproximadamente

50% obtido pelo sistema de cultura 3D relatado por Siti-Ismail et al, 2012. Além disso, o sistema de cultura 3D resultou em CEAll com uma morfologia mais definida, tal como evidenciado pelas microvilosidades mais pronunciadas do que as obtidas por cultura 2D. Dados recentemente publicados de nosso laboratório demonstraram que esse meio condicionado de A549 apresenta como possível fator indutor da diferenciação, a subunidade $\alpha 5$ da laminina (LECHT *et al.*, 2014).

O colágeno tipo I é encontrado em abundância no pulmão. Além das características já descritas anteriormente, o colágeno tipo I possui sítios para ligação de outras moléculas de MEC, que são potenciais fatores presentes no meio condicionado-A549 indutores da diferenciação celular, como a própria subunidade $\alpha 5$ da laminina (cadeia α , isoforma 5). Além disso, assim como o alginato, hidrogéis de colágeno são facilmente produzidos em laboratório, a baixo custo operacional e com fácil controle de suas características físicas sendo, portanto, um potencial candidato para servir como material de encapsulamento celular para diferenciação de CTE, apesar de até presente data não ter sido ainda descrito para tal finalidade.

Este trabalho teve como objetivo obter um protocolo que forneça uma fonte abundante de CEAll com baixo custo operacional e em tempo eficiente, sendo o agente de diferenciação escolhido para tal o meio condicionado-A549. A hipótese testada é de que a porosidade do hidrogel de colágeno pode ser controlada mediante a utilização de um material de sacrifício como o alginato, sendo o colágeno tipo I o arcabouço permanente. A maior porosidade, em combinação com o ambiente dinâmico do HARV, proporciona um ambiente com melhor propriedade de transporte de massas para as células que, por sua vez, permite o aumento da proliferação celular, conseqüentemente uma produção mais rápida e eficiente de um grande número de células. Da mesma forma, encapsular as CTE em um material fisiológico, como o colágeno, pode ser capaz de melhorar o direcionamento da diferenciação celular para um fenótipo de CEAll

Com base no já descrito anteriormente, este trabalho testa a hipótese de que o encapsulamento em uma matriz microesférica de colágeno seria mais eficiente para o protocolo de proliferação e diferenciação de CTE visando à produção em larga escala de CEAll em microgravidade modelada, comparada ao material padrão já utilizado para tal, o alginato.

2. OBJETIVOS

Otimizar o protocolo atual para diferenciação e produção de fenótipos de endoderme definitiva e CEAll, a partir de CTE usando um novo material de microencapsulamento de colágeno tipo I otimizado para cultura 3D em microgravidade modelada.

2.1 Objetivo específico 1: Caracterização de materiais

Caracterizar as propriedades físicas e químicas, tais como: teor de água, deformação causada pela retirada de água do material, cinética de absorção e liberação de moléculas e análise da topologia do novo material de encapsulamento de colágeno tipo I e microcápsulas controle com composições variadas de material.

2.2 Objetivo específico 2: Proliferação celular

Avaliar a proliferação celular dentro das microcápsulas de colágeno tipo I e seus respectivos controles em um ambiente estático e em um ambiente dinâmico, avaliado o crescimento dos agregados celulares encapsulados ao longo do tempo, assim como o número total de células viáveis extraídas após o protocolo.

2.3 Objetivo específico 3: Diferenciação celular

. Caracterizar da diferenciação celular para linhagem de endoderme definitiva (FOXA2, SOX17 e CXCR4) e posterior desenvolvimento de fenótipo epitelial alveolar (SPA, SPB, SPC) nas microcápsulas de hidrogel de colágeno e seus respectivos controles.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Formação das microcápsulas de hidrogél

3.1.1 Microcápsulas de alginato

Foi preparada uma solução de 1,2% m/v de ácido algínico de baixa viscosidade (Sigma), diluído em água deionizada, acrescentada ou não de: 0,1% m/v de gelatina (Sigma) diluída em PBS sem cálcio e magnésio (Cellgro), ou 0,1% m/v de colágeno tipo I de cauda de rato (BD Bioscience). Este material foi preparado com ou sem células, de acordo com o teste a que seria submetido. A solução de polimerização foi preparada, sendo composta de uma solução 1,5% m/v de cloreto de cálcio (Sigma) (pH 7,2); agitada lentamente em um becker de 50 ml. A solução de ácido algínico foi gotejada na solução de polimerização a uma altura de aproximadamente 5 cm, utilizando uma seringa de 5 ml e uma agulha de calibre 25 ligada a uma bomba de seringa ajustada a uma vazão de 1 ml/min. As microcápsulas esféricas foram mantidas na solução de cloreto de cálcio sob agitação durante 5 minutos a temperatura ambiente. Subsequentemente, as microcápsulas foram lavadas três vezes com PBS 1X sem cálcio e magnésio, pH 7,2.

3.1.2 Microcápsulas de colágeno

Uma solução de 1,2% m/v de ácido algínico de baixa viscosidade (Sigma), dissolvido em PBS sem cálcio e magnésio, adicionada de 1,9 mg/ml de colágeno tipo I de cauda de rato (BD Bioscience), foi produzida e mantida a 4°C, assim como todo o protocolo aqui descrito a seguir. Para melhor solubilidade da solução o tubo foi levado ao vórtex por 2 minutos. Após a adição de duas gotas de vermelho de fenol, o pH da solução foi neutralizado utilizando hidróxido de sódio 1 M, até a cor da solução tornar-

se vermelho/púrpura, quando então as células seriam adicionadas, ou não, de acordo com o teste a que o material seria submetido. A solução foi gotejada dentro de uma solução 1,5% m/v de cloreto de cálcio (pH 7,2), conforme descrito anteriormente para as microcápsulas de alginato. Subsequentemente, as microcápsulas foram lavados com um tampão, de pH 7,2, contendo 1,1% m/v de cloreto de cálcio e 0,1% m/v de CHES [(2 (N-ciclo-hexilamino)-etano ácido sulfúrico)]. Os *beads*, em seguida foram imerso numa solução de tampão sódio-CHES (Na-CHES) (0,15 M de cloreto de sódio e 1,1% m/v de CHES, pH 7,2) contendo 0,05% m/v de L-lisina por 10 a 15 segundos. Logo após, repetiu-se o processo de lavagem com Na-CHES e então as microcápsulas foram incubadas em uma solução 50 mM de citrato de sódio, pH 7,2, durante 10 min. Por fim, as microcápsulas foram lavadas com Na-CHES e ressuspendidas no meio de cultura. A ligação cruzada do colágeno foi completada por incubação a 37°C durante 2 horas, ver Figura 3.

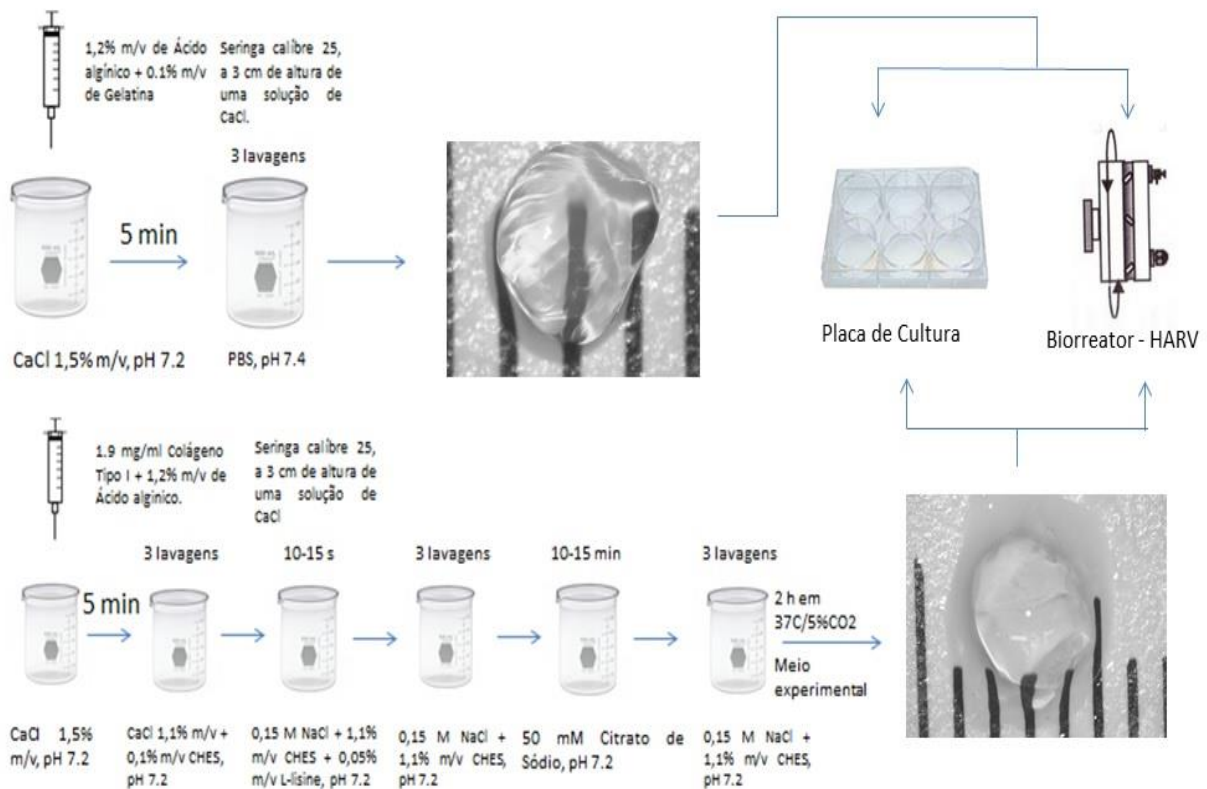


Figura 6: Representação dos protocolos de produção das microcápsulas. Na parte superior da figura está uma representação esquemática do protocolo utilizado para produzir as microcápsulas de alginato. Na parte inferior da figura está uma representação esquemática do protocolo utilizado para produzir as microcápsulas de colágeno.

3.2 Caracterização dos materiais

Para esta seção decidimos comparar o efeito da incorporação de diferentes matrizes nas propriedades físicas de hidrogéis microesféricos, por isso foram analisados quatro diferentes composições destes materiais:

(1) 1,2% de alginato, (2) 1,2% de alginato + 0,1% de gelatina, (3) 1,2% de alginato + 0,1% de colágeno tipo I e (4) microcápsula de colágeno tipo I.

3.2.1 Peso e diâmetro hidratado

Logo após as microcápsulas serem produzidas elas foram pesadas em uma balança analítica em grupos de cinco microcápsulas ($n = 7$). Para garantir que nenhum líquido residual aderido à parede externa do material fosse medido, o excesso de água foi removido colocando delicadamente o material em um lenço seco por uma única vez, repetindo isso para todas as condições. Assim sendo, os materiais foram fotografados em um microscópio estéreo e o diâmetro calculado com a ajuda de um paquímetro. Uma vez que a borda do paquímetro tocou a superfície do material, o diâmetro foi registrado. O mesmo procedimento foi realizado entre os diferentes materiais ($n = 7$). Ver Imagem 1 na sessão Anexos para mais detalhes.

3.2.2 Peso e diâmetro seco

Após a formação das microcápsulas, elas foram previamente desidratadas em gradiente crescente de etanol (10 minutos em solução, começando a 40°GL, variando 10°GL até 100°GL) em seguida, desidratadas por secagem em ponto-crítico, de acordo com protocolo estabelecido pelo fabricante (CPD; Polaron CPD7591®). Após este procedimento os materiais foram pesados em grupos de cinco microcápsulas em uma balança analítica ($n = 7$). As medições do diâmetro seco foram realizadas como descrito para o material hidratado ($n = 7$).

A fim de estimar o conteúdo de água dos materiais testados e o percentual de encolhimento foi realizado um tratamento matemático dos conjuntos de dados. O percentual de encolhimento foi calculado da seguinte forma:

$$\frac{[\text{Diâmetro hidratado (mm)} - \text{Diâmetro seco (mm)}] \times 100}{\text{Diâmetro hidratado (mm)}}$$

E o percentual de retenção de água calculado da seguinte forma:

$$\frac{[\text{Peso total (g)} - \text{Peso seco (g)}] \times 100}{\text{Peso total (g)}}$$

3.2.3 Ensaio de absorção de FITC-dextrana

Para este protocolo foi preparada uma solução de FITC-dextrana 150 kDa (Sigma®) a uma concentração de 1 mg/ml (HINES e KAPLAN, 2011). Os diferentes tipos de microcápsulas foram incubadas em grupos de cinco por uma hora em 1 ml da solução de FITC-dextrana em um tubo de 1,5 ml, à temperatura ambiente em lenta agitação. Depois de uma hora, 200 µl da solução foi removida e colocada em uma placa de 96 poços em triplicata. Este experimento foi repetido três vezes para todos os grupos (n = 3). A análise foi realizada utilizando um espectrofluorímetro (Tecan M200 Pro® *infinite*) com um comprimento de onda de 490 nm para excitação e 525 nm de comprimento de onda para a emissão. Para quantificação, uma curva padrão foi construída com diluições em série de FITC-dextrana 150 kDa (1 mg/ml). A massa de FITC-dextrana removida do meio pelas microcápsulas foi calculada e, em seguida, dividida pelo peso úmido médio respectivo de cada grupo.

3.2.3.1 Cinética de liberação de FITC-dextrana

De acordo com o método descrito anteriormente, foi medido o esgotamento de FITC-dextrana a partir do sobrenadante. Nesta sessão, nosso objetivo foi de analisar a

cinética de liberação ao longo do tempo das microcápsulas carregadas com FITC-dextrana. Mais uma vez foi utilizada uma solução de 1 mg/ml de FITC-dextrana 150 kDa (Sigma) (HINES e KAPLAN, 2011). As microcápsulas foram incubadas em grupos de cinco em 1 ml da solução de FITC-dextrana em um tubo de 1,5 ml, à temperatura ambiente sob lenta agitação durante uma hora. As microcápsulas foram então cuidadosamente lavadas uma vez com água deionizada e, em seguida, incubadas em 3 ml de água deionizada, sob leve agitação. Para a amostragem, 200 μ l foram retirados em 15, 30, 45, 60 e 120 minutos de incubação e colocados em uma placa transparente e de fundo plano de 96 poços para análise por espectrofluorimetria utilizando um espectrofluorímetro (Tecan M200 Pro® *infinite*) calibrado para um comprimento de onda de 490 nm para excitação e 525 nm para emissão. Os dados obtidos foram divididos pelos valores respectivos de captação média de cada grupo e o gráfico plotado. O modelo de cinética de Michaelis-Menten foi utilizado e o valor de K_m (constante de Michaelis), que é o tempo necessário para que as microcápsulas liberassem 50% da sua carga total foi obtido para análise quantitativa. Este experimento repetido três vezes para todos os grupos ($n = 3$).

3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura

Imediatamente após a formação das microcápsulas, elas foram fixadas em solução de glutaraldeído (grau II) 2,5% diluído em água deionizada, por 24 horas. Logo então estas microcápsulas foram desidratadas utilizando gradiente de etanol e, posteriormente secas por secagem em ponto-crítico (Polaron CPD7591®). Para avaliar a morfologia da área superficial, todas microcápsulas foram montadas em uma etiqueta de carbono e receberam um revestimento por plasma de ouro em atmosfera de argônio por 3 minutos, a uma distância de 10-15 cm entre a amostra e a placa de ouro (ver Imagem 2 sessão de Anexos). As imagens foram tiradas por um microscópio eletrônico de varredura (Agilent Technologies - 8500 Field Emission Scanning Electron Microscope®).

3.3 Declaração de ética e cultura celular

Este trabalho foi desenvolvido em estrito acordo com os princípios éticos e de biossegurança de cultura de células (NIH, 2009). Este trabalho utilizou apenas linhagens celulares previamente estabelecidas e caracterizadas. O laboratório de bioengenharia da Universidade de Temple possui certificação para experimentação e estoque de células humanas e de animais pelo NIH (National Institute of Health). Durante a cultura de manutenção e experimental, todas as células do foram mantidas em um protocolo padrão para cultura de células. Em especial, as CTE foram mantidas em uma incubadora separada e designada exclusivamente. Em ambos os casos fora fornecido os parâmetros controlados de ambiente, tais como: temperatura constante de 37°C e atmosfera de CO₂ a 5%, bem como umidade adequada. Todas as células foram manipuladas usando capela de fluxo laminar biológico padrão e respeitando as técnicas estéreis de cultivo.

3.3.1 Células A549 e obtenção de meio condicionado

Células A549 (células derivadas de adenocarcinoma pulmonar humano, ATCC CCL-185), foram cultivadas em meio de cultura DMEM com alta concentração de glicose (4,5 g/L) (Corning), suplementado com 10% de FBS (Soro Fetal Bovino) (Benchmark®), 1% Pen/Strep (100X) (Corning), e 1% de L-glutamina (100X) (Corning). As células foram passadas utilizando tripsina padrão (Corning) numa razão de protocolo de divisão de 1:10. As células foram expandidas para garrafas de cultura T175 (BD Falcon) para o condicionamento do meio. Uma vez que as células cultivadas atingiram 95-100% de confluência, usualmente em 2-3 dias, os meios foram recolhidos e filtrados através de um filtro de baixa ligação à proteínas (Corning) e armazenados a -20°C em tubos Falcon de 50 ml, por não mais do que 2 meses. Este meio seria utilizado posteriormente para confecção do meio de cultura enriquecido com 50% (v/v) de meio condicionado para os experimentos de diferenciação celular, conforme será mostrado

adiante. Ver Figura 7, a seguir, para demonstração da morfologia aparente da cultura de A549 assim como representação da obtenção do meio condicionado.

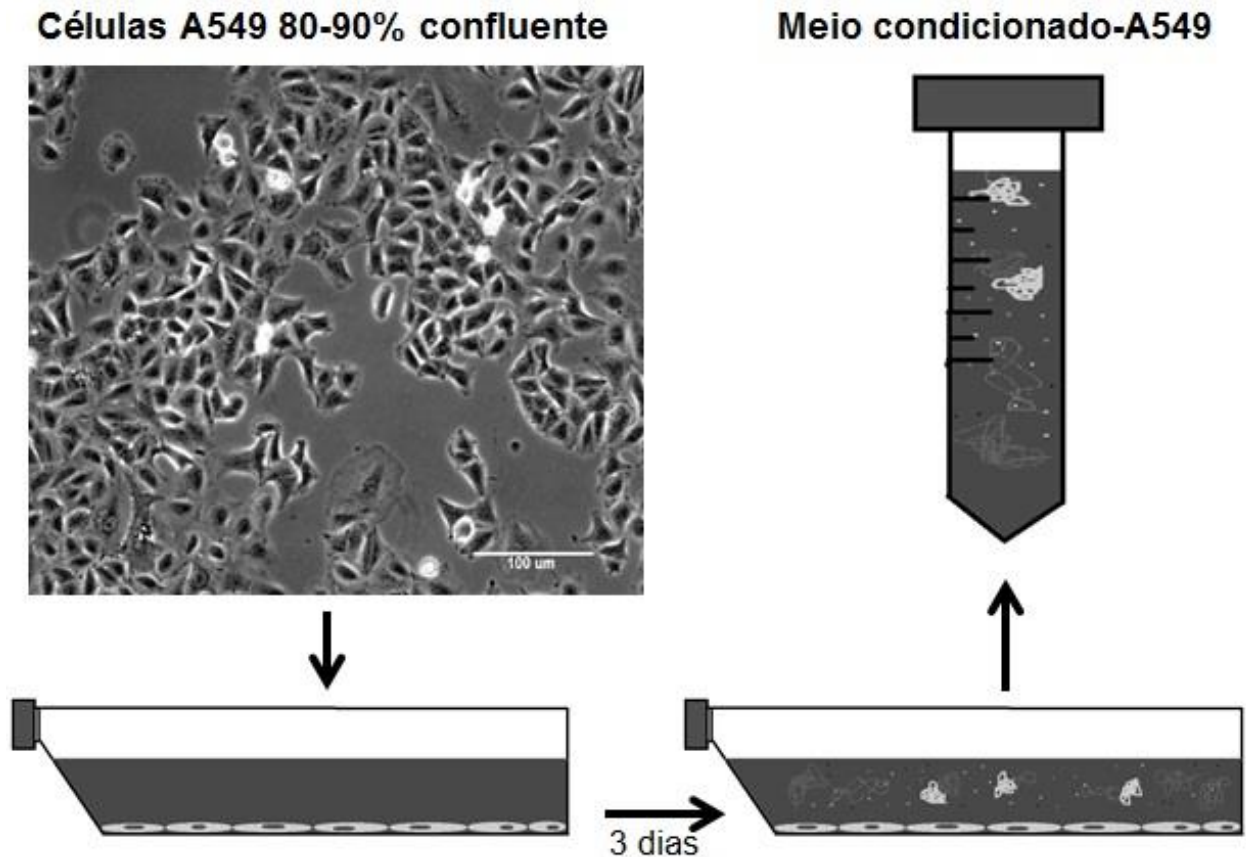


Figura 7: Cultura e obtenção de meio condicionado de células A549 em cultura de manutenção. Figura representando a cultura de células A549. A confluência aqui é estimada em 90%. As células apresentaram uma morfologia característica de células epiteliais, conforme o esperado. Diagrama explicativo da obtenção do meio condicionado de A549

3.3.2 Cultura de E14 12 delta S

E14 (células-tronco embrionárias de camundongos) foram geneticamente modificadas pelo laboratório do Dr. Paul Gadue na Universidade da Pensilvânia (GADUE *et al.*, 2006). O gene de CD4 foi transfectado (*knock-in*) para ser conjugado no mesmo quadro de leitura do gene de FOXA2 (marcador endoderme) e, da mesma forma, o gene da GFP (proteína fluorescente verde, do inglês *green fluorescent*

protein), foi transfectado para o mesmo quadro de leitura do gene *Brachyury T* (marcador de mesoderme).

As células foram cultivadas em meio Knockout DMEM/F-12 (50:50) suplementado com 0,5% v/v de N2 (50X) (Life Technology®, Cat # 1705-048) e 1% B27 (100X) (Life Technology®, Cat # 17504 -044), 0,05% de BSA (albumina de soro de bovino, do inglês *Bovine Serum Albumin*) [solução de albumina bovina fracção V (7,5%) - Life Technology®, Cat # 15260037], 1 ng/ml de LIF (Esgro-Millipore, Cat # ESG1106), 10 ng/ml de BMP4 (R&D® Cat # 5020-BP-010) e 0,15 ml de 1-tioglicerol (Sigma®). As garrafas de cultura foram revestidas previamente com gelatina (água ultra-pura, com 0,1% de gelatina, Embriomax®, Millipore) durante 30 minutos a 37°C antes de as células serem semeadas. As células foram expandidas até atingirem 70-80% de confluência e depois foram divididas usando TrypLE Express (Invitrogen) por não mais do que 60 segundos.

3.4 Cultura experimental

3.4.1 Estática

Para encapsulamento celular, as células foram ressuspendidas no hidrogel previamente a sua polimerização em uma concentração de 2×10^6 células/ml. Após o procedimento para gerar as microcápsulas de hidrogel (ver sessão 3.1), 50-80 microcápsulas foram divididas em dois poços de uma placa cultura de 6 poços. Um dos poços recebeu a mesma composição do meio de cultura de E14 12 delta S estando ausentes apenas os inibidores da diferenciação (LIF e BMP4), também chamado de meio E1412 delta S (-), este grupo foi chamado estático-espontâneo (ST-SP). O outro grupo recebeu uma mistura de 50% de meio condicionado e A549 e 50% (2X) E1412dS (-). Esse grupo foi chamado de estático-condicionado (ST-CM). Os meios de cultura foram trocados a cada dois dias.

3.4.2 HARV

Assim como anteriormente, para encapsulamento celular, as células foram ressuspensas no hidrogel previamente a sua polimerização em uma concentração de 2×10^6 células/ml. Após o procedimento para gerar as microcápsulas de hidrogel (ver sessão 3.1), 50-80 microcápsulas foram divididas em dois biorreatores HARVs de 10 ml (Syntechon®). Um biorreator recebeu o meio E1412dS (-), sendo chamado de HARV-espontâneo (HV-SP). O outro biorreator recebeu uma mistura de 50% de meio condicionado de A549 e 50% (2X) E1412dS (-), sendo chamado de HARV-condicionado (HV-CM). Os meios de cultura foram trocados a cada dois dias. A velocidade de rotação dos biorreatores foi iniciada em 17 rpm e aumentada conforme necessário para manter as microcápsulas em rotação na posição adequada, simulando um ambiente de microgravidade.

3.5 Medida da área dos esferoides-celulares

Amostras das microcápsulas foram fotografadas a cada dois dias usando um microscópio de contraste de fase (FSX100-Olympus®) com aumento de 100x. As médias das áreas dos esferoides celulares formados dentro das microcápsulas foram analisadas usando o software Imagem-J®. A média da área dos esferoides-celulares foi usada como uma estimativa da proliferação celular durante o experimento. Foi medido aproximadamente 1-10 esferoides por campo. Dez imagens foram tomadas em cada tempo para cada grupo em microcápsulas aleatórias. No mínimo cinco imagens foram analisadas em cada tempo para cada grupo, com 3 medições individuais de cada esferoide por imagem. A delimitação do esferoide a ser analisado e de sua área foi delimitada como sendo o ponto focal médio (em foco) de um esferoide em posição espacial randômica. A figura seguinte é uma representação da medição do tamanho dos esferoides utilizando o software ImageJ foi realizada (n=20)

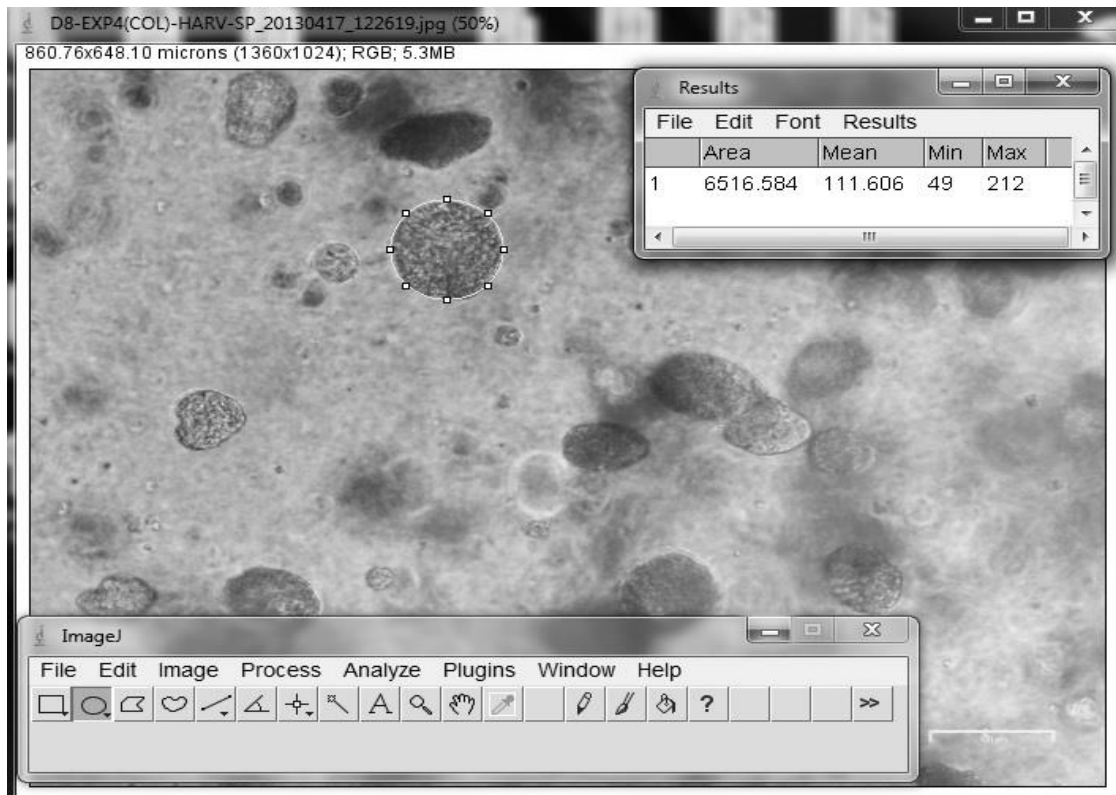


Figura 8: Representação da análise da área dos esferoides-celulares. A área de 1-10 esferoides por campo foram medidas. Foram analisadas 10 imagens em cada ponto de tempo, para cada grupo, n=20.

3.6 Contagem de células

No dia 11, as células foram desencapsulados utilizando os seguinte protocolos:

a) os hidrogéis de alginato foram desencapsulados usando uma solução de 1,5% m/v de citrato de sódio durante 5 minutos em temperatura ambiente, seguido por 10-15 segundos de agitação em vórtex e três lavagens em PBS s/CaMg. b) os hidrogéis de colágeno foram desencapsulados utilizando uma solução de tripsina padrão para cultura de tecidos durante 5-7 minutos em 37°C, seguidos por 10-15 segundos de vórtex e uma lavagem com meio de cultura e três lavagens com PBS s/CaMg (n = 3).

Após o procedimento desencapsulamento, o número de células viáveis foi calculado utilizando um hemocitômetro de Neubauer otimizado. Foi adicionado o corante *Trypan Blue* para diferenciar células vivas de mortas e obter o índice de mortalidade celular.

3.7 qRT-PCR

Após o procedimento desencapsulamento, um pellet de células foi obtido e separado por centrifugação, 800 rpm, sendo congelado a -80°C até posterior processamento. O RNA total foi isolado utilizando as colunas de separação QIAshredder e as colunas RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de RNA foi determinado usando NanoDrop ND-3300 espectrofluorímetro com o software 3300 (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

Um micrograma de RNA total foi submetido à transcrição reversa com primers aleatórios usando o kit *High Capacity Reverse Transcriptase* cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA) para que então gerar uma biblioteca de cDNA.

A análise quantitativa de PCR em tempo real (qRT-PCR) do cDNA foi realizada em sistema *Eppendorf Mastercycler ep realplex II* (Eppendorf, Alemanha), com rápido ciclo térmico utilizando o inventário de primers Taqman (Applied Biosystems): Nanog (Ensaio ID: Mm02019550_s1), Foxa2 (Ensaio ID: Mm00839704_mH), Sox17 (Ensaio ID: Mm00488363_m1), CXCR4 (Ensaio ID: Mm00839704_mH), SPA (Ensaio ID: Mm00776876_m1), SPB (Ensaio ID: Mm02059886_s1) e SPC (Ensaio ID: Mm00488144_m1). As reações foram realizadas em triplicata. Os níveis de expressão dos genes foram normalizados para a expressão do gene *GAPDH* (Ensaio ID: Mm02342430_g1). Para os genes de endoderme, os níveis de expressão relativa para quantificação (do inglês *relative quantification* ou rq) foram obtidos normalizando os dados com os valores de expressão, de cada gene individual, em células-tronco embrionárias indiferenciadas obtidas no dia 0 do experimento (antes de serem encapsulados). Já para marcadores de epitélio alveolar, esse mesmo procedimento foi realizado, porém sendo normalizado pela expressão em células epiteliais pulmonares fetais de camundongos. A quantificação foi realizada pelo método CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$), conforme detalhado no boletim de usuário #2, de acordo com o especificado pelo fabricante, Applied Biosystems.

Devido ao fato de até a presente data, apenas 1-2 estudos independentes (a depender do grupo testado) terem sido realizados, devido a questões técnicas relativas à cultura das CTE, não realizamos análise estatística nos dados obtidos nesta sessão.

Os dados são representados como a média \pm erro padrão da média, sendo o conjunto de dados composto de todas as repetições técnicas processadas (3-6 dependendo do experimento).

3.8 Citometria de fluxo

As células E14 12 delta S foram marcadas com anticorpos anti-SSEA-1 e OCT3/4 para avaliar o grau de indiferenciação, como um controle de qualidade para os experimentos. Todo o trabalho foi realizado em gelo (incluindo centrifugação a 4°C). As células foram coletadas pelo método de TrypLE e contadas. As células foram divididas entre tubos de 1,5 ml (500 mil células cada), e lavadas três vezes com PBS sem cálcio e magnésio + 2% de FBS. As células foram bloqueadas durante 20 min à temperatura ambiente em PBS s/CaMg + 2% de FBS. Após este procedimento os grupos foram divididos em: A) não marcados B) FITC-anti-SSEA-1 e Alexafluor 586-anti-Oct3/4 murino (1:5) (eBioscience) C) FITC-IgM, isótipo K murino como controle (1:5) (BD Pharmingen). As amostras foram lavadas três vezes com PBS sem cálcio e magnésio + 2% de FBS. As amostras foram analisadas em um citômetro BD Accuri C6 em fluxo lento; limiar de 80.000 sendo 10.000 eventos analisados por leitura.

3.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o software Graphpad Prism 5®. Todos os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Para a análise inferencial foi definido um nível de significância de 5%. Os conjuntos de dados foram testados para normalidade com o teste de D'Agostino e Pearson. O teste estatístico escolhido para amostras com distribuição normal foi o ANOVA one-way com pós-teste de Tukey.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização dos materiais

Os resultados da caracterização do material estão representados na Figura 9. As microcápsulas de colágeno mostraram, respectivamente, um diâmetro hidratado maior ($55,6 \pm 6,7\%$ maior) do que a média dos grupos de alginato, assim como o peso hidratado ($113,6 \pm 9,4\%$ mais pesado) também em comparação com a média dos grupos de alginato. Quando as microcápsulas foram secas utilizando a secagem em ponto-crítico, as microcápsulas de colágeno mostraram um diâmetro reduzido ($37,3 \pm 8,8\%$ menor) comparado à média dos grupos de alginato, assim como seu peso ($56,9 \pm 10,4\%$ mais leve), também comparado à média dos grupos de alginato.

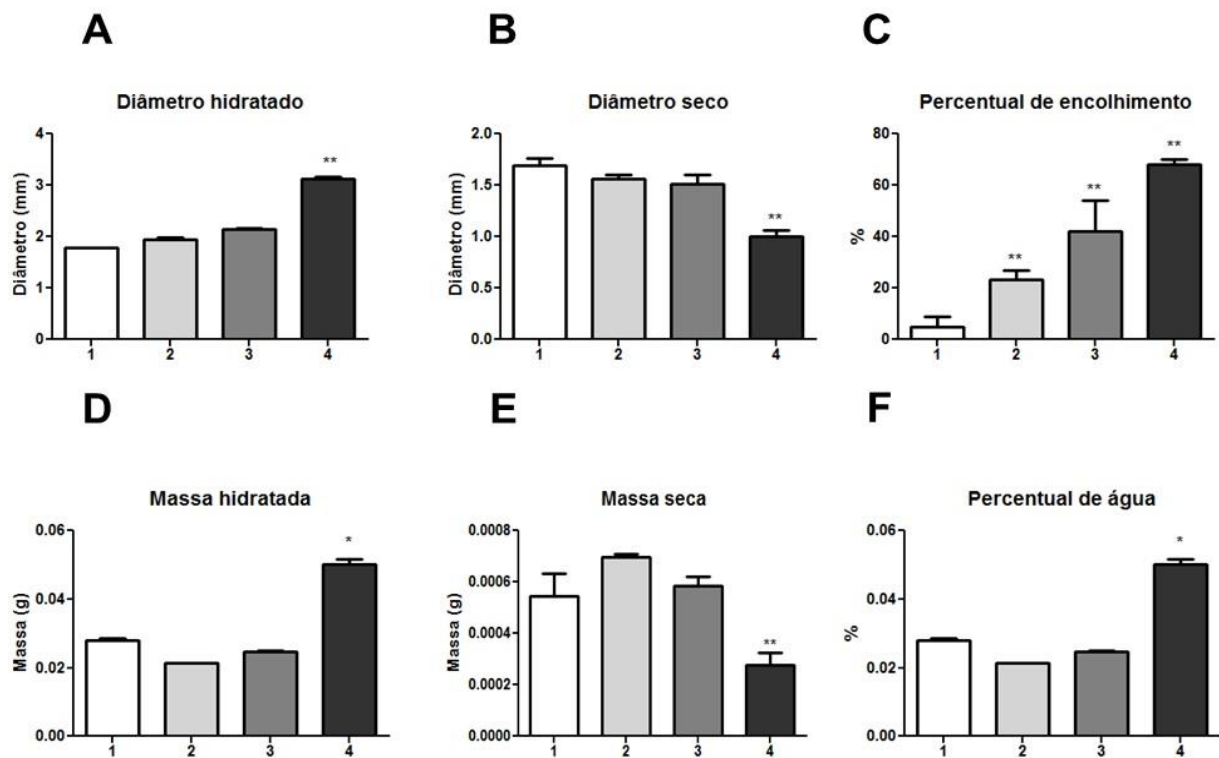


Figura 9: Caracterização dos hidrogéis. (A) Diâmetro das microcápsulas hidratadas. (B) Diâmetro das microcápsulas após desidratação. (C) Percentual de encolhimento das microcápsulas. (D) Peso das microcápsulas hidratadas. (E) Peso das microcápsulas após desidratação. (F) Teor de água das microcápsulas, dados mostrados de 99-100%. (n=7, **=p < 0,01 e *=p < 0,05).

4.1.1 Ensaio de absorção FITC-Dextrana.

Depois de as microcápsulas serem incubadas na solução de FITC-dextrana, a capacidade de absorver o corante fluorescente foi avaliada. A Figura 10 representa o a absorção do corante após incubação. As microcápsulas de colágeno mostraram um aumento significativo ($166,6 \pm 15,8\%$ maior) na absorção do corante fluorescente comparado à média de todos os grupos de alginato.

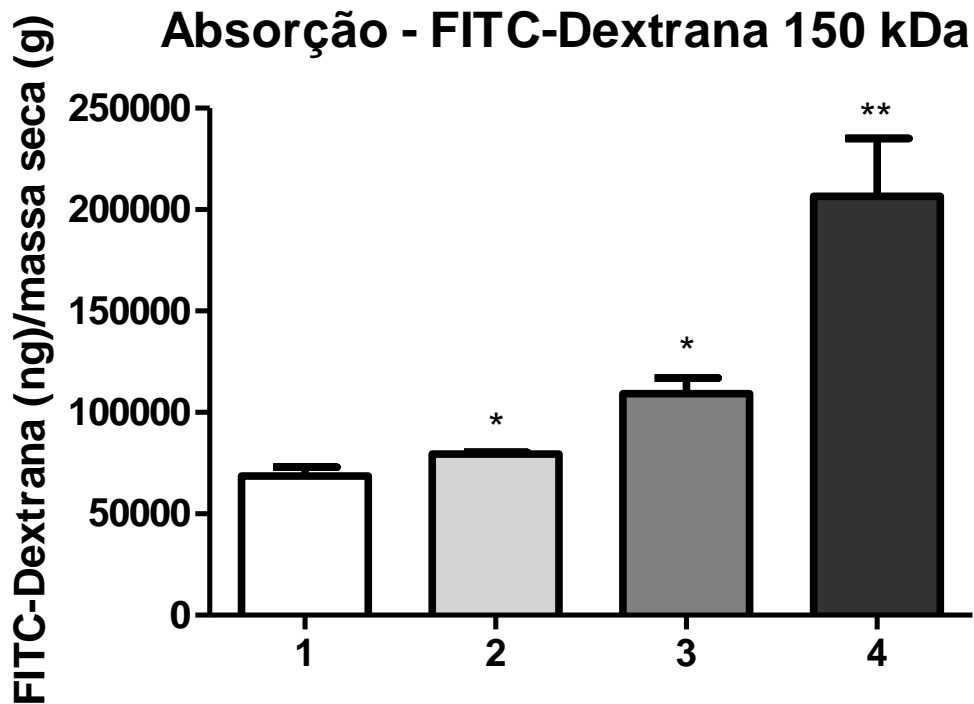


Figura 10: Absorção de FITC-Dextrana 150 kDa. Microcápsulas de colágeno mostraram um aumento de capacidade de absorção de moléculas de FITC-dextrana a partir do meio em comparação com os grupos de alginato. (n = 3, **=p <0,01 e *=p <0,05).

4.1.2 Cinética de liberação de FITC-Dextrana

As curvas de cinética de liberação de FITC-Dextrana 150 kDa estão representadas na Figura 11. Amostras de sobrenadante foram retiradas a cada 50 min, e com a concentração determinada a partir de uma curva padrão. O valor de Km indica

o tempo que levou para as microcápsulas liberarem 50% da quantidade total de FITC-dextrana. As microcápsulas de colágeno apresentaram um valor de K_m significativamente reduzido ($55,6 \pm 11,2\%$ menor) em relação à média dos grupos de alginato.

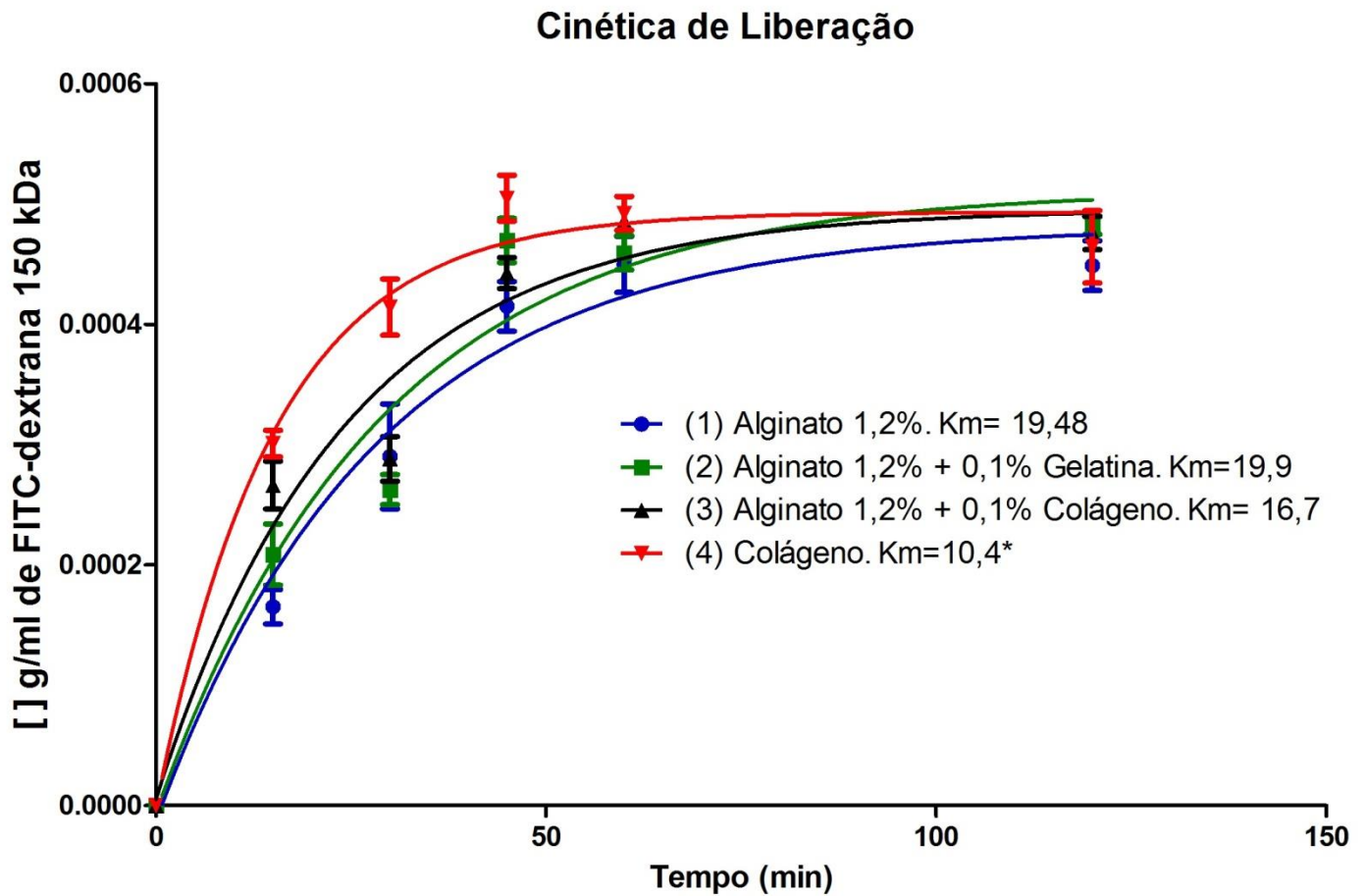


Figura 11: Cinética de liberação de FITC-Dextrana 150 kDa. Representação gráfica da cinética de liberação de FITC-Dextrana 150 kDa. O grupo Colágeno mostrou uma liberação mais rápida das moléculas carregadas em comparação aos grupos de alginato. Valores de K_m estão indicados ao lado do nome de cada grupo ($n = 3$, $*=p<0,05$).

4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura

A análise morfo-topológica das microcápsulas revelou que os grupos de alginato não mostraram quaisquer diferenças perceptíveis entre si. No entanto, a topologia das

microcápsulas de colágeno é notavelmente diferente. As imagens representativas estão mostradas na Figura 12. As microcápsulas de colágeno mostram uma superfície fibrilar nítida, enquanto os grupos de alginato aparecem mais densos e compactos e com fibras não aparentes. As microcápsulas de colágeno mostraram uma porosidade aparentemente maior em comparação com as microcápsulas de alginato.

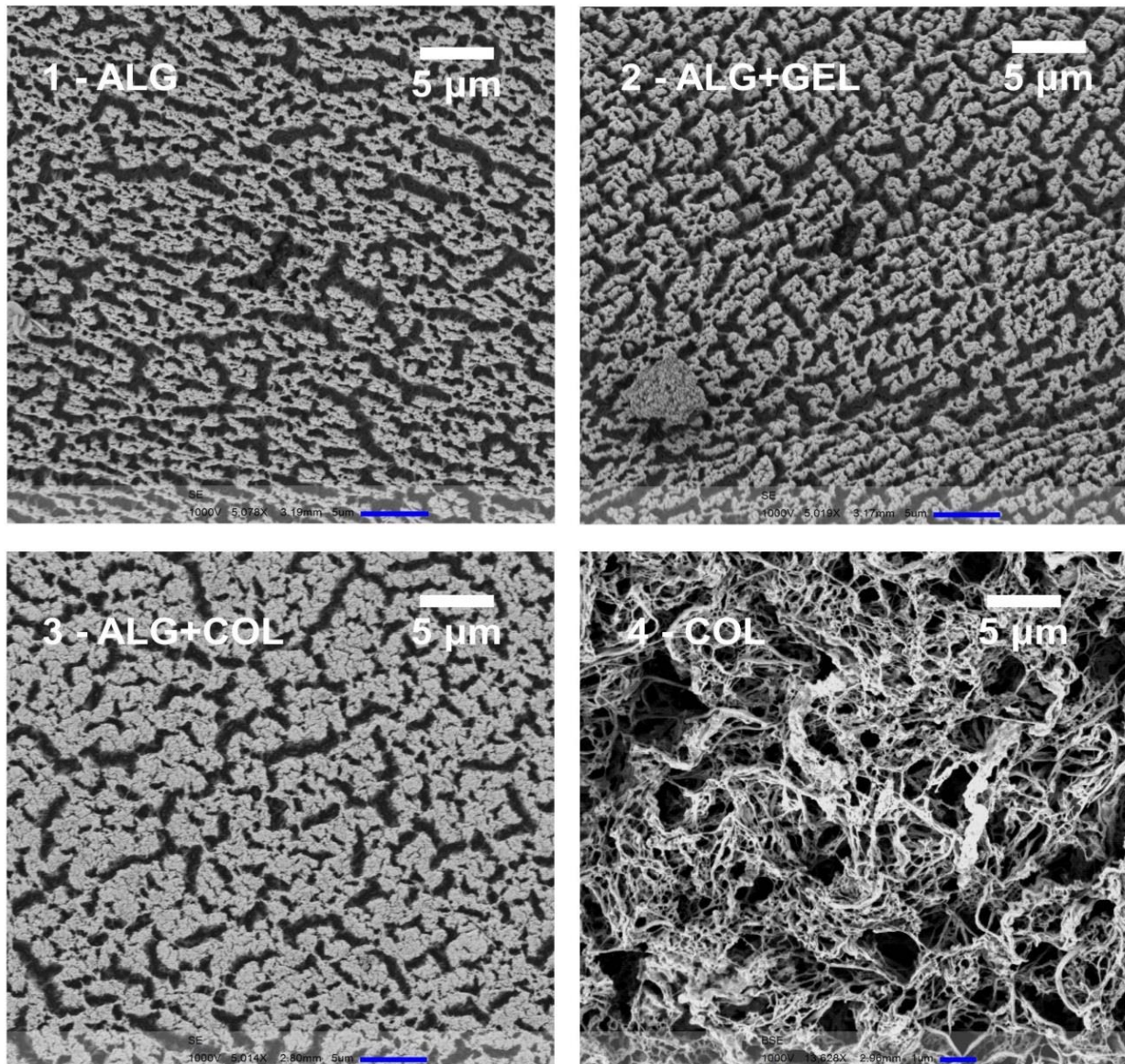


Figura 12: Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos hidrogéis. Imagens representativas obtidas para estudo morfo-topológico das microcápsulas de alginato e colágeno (5000X). Uma clara diferença pode ser observada entre a morfologia superficial das microcápsulas de alginato (1-3) e de colágeno (4).

4.2 Caracterização da cultura de E14 12 delta S

A análise por citometria de fluxo e morfologia aparente da cultura de manutenção de E14 12 delta S está mostrada na Figura 13. O *gate* foi definido na população principal de células vivas (*gate* 1) no gráfico de dispersão lateral (SSC) vs linear (FSC). Outro *gate* foi colocado sobre a principal subpopulação do *gate* 1 (*gate* 2) no gráfico FL-1 vs FL-4 em relação aos grupo controle-isótipo. Os resultados indicam um total de 88,45% de eventos de co-expressão de OCT3/4 e SSEA-1 e apenas 0,48% dos eventos não registraram nenhum sinal. Este teste foi repetido três vezes, previamente a três experimentos independentes. Consolidando os dados foi se obtido uma média de $85,6 \pm 4,5\%$ de co-expressão de Oct3/4 e SSEA-1 e $0,72 \pm 0,3\%$ de duplos negativos.

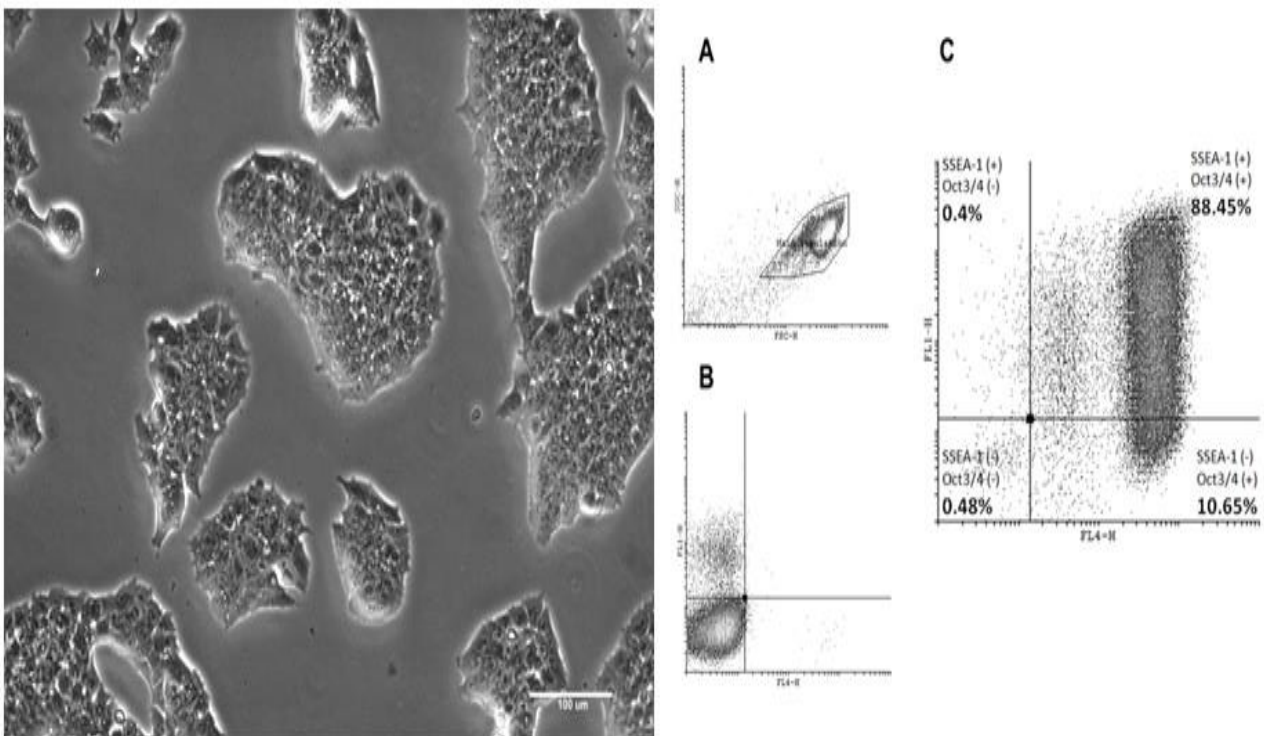


Figura 13: Cultura e caracterização das células E14 12 delta S. À esquerda: Imagem de microscopia de contraste de fase da cultura de manutenção de E14 12 delta S, 100X. As células crescem em colônias e mostram morfologia como esperado de células embrionárias em cultura. À direita: (A) Gráfico representativo de dispersão lateral vs linear e obtenção do *gate* 1. (B) FL-1 (Oct3/4) vs FL-4 (SSEA-1) e a obtenção do *gate* 2, ajustado na população controle isótipo. (C) A análise quantitativa dos eventos por quadrantes/expressão das proteínas marcadas.

4.3 Proliferação celular

A área dos esferoides-celulares ao longo do tempo de cultura está indicada na Figura 14. Em ambas as microcápsulas de alginato e de colágeno, os esferoides-celulares cultivados em meio de diferenciação espontânea cresceram em média de $78 \pm 11,1\%$ mais do que aquelas em meio condicionado. Além disso, as células cultivadas em ambiente de microgravidade cresceram em média $82,5 \pm 14,8\%$ mais do que em cultura estática. O colágeno parece proporcionar uma melhor matriz para o crescimento celular em comparação ao alginato. Os esferoides-celulares cultivados em colágeno cresceram $54,9 \pm 13,34\%$ mais do que em alginato (ver também Imagem 5 na sessão Apêndice). As células cultivadas em meio condicionado parecem atingir um patamar de crescimento por volta do dia 6, enquanto os grupos espontâneos não.

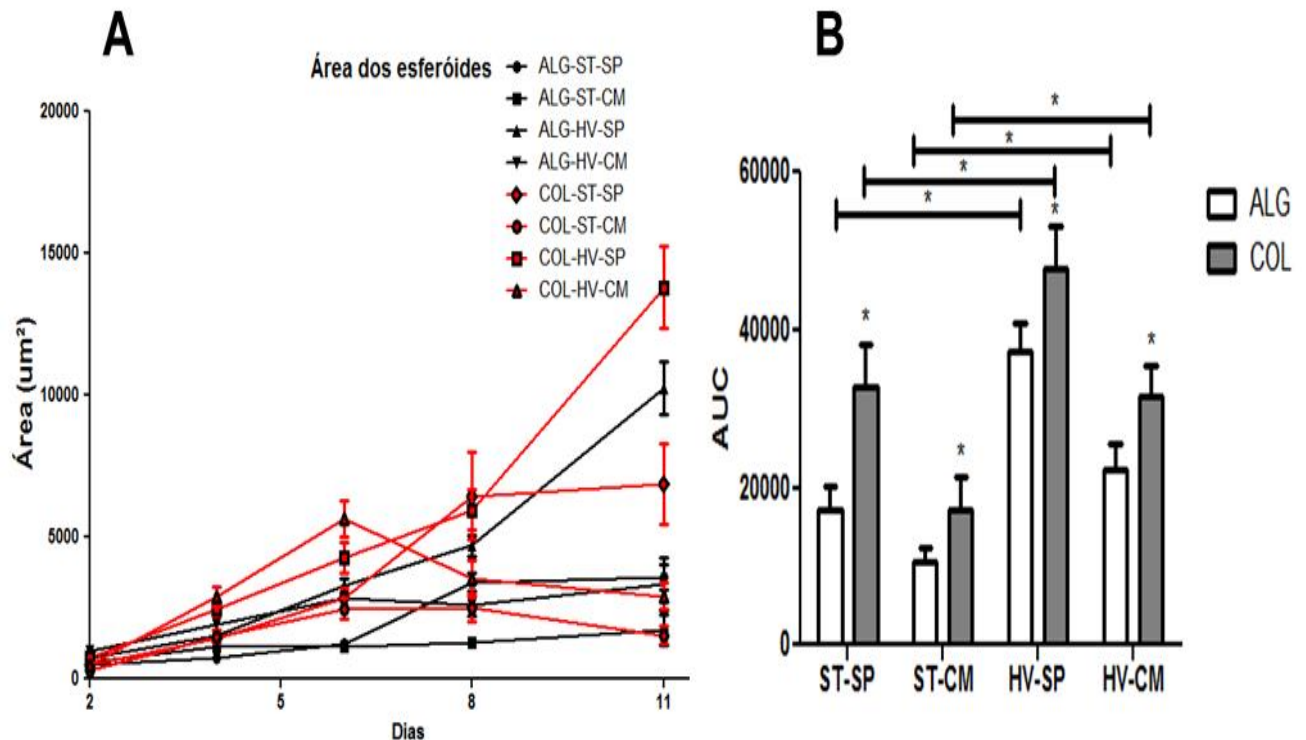


Figura 14: Área dos esferoides celulares ao longo do tempo de cultura. (A) Representação da proliferação celular através da medição da área dos esferoides-celulares ao longo do tempo em todas as condições ($n = 20$, $* p < 0,05$). (B) A área sob a curva da área dos esferoides-celulares ao longo do tempo (A). 3 experimentos independentes, $n=3$. ($* = p < 0,05$).

A contagem de células viáveis totais em 20 microcápsulas após 11 dias em cultura está representada na figura 15. A tendência do número de células no final do experimento se relaciona diretamente com as medidas dos esferoides-celulares feitas acima (Figura 14). Em ambas as microcápsulas, de alginato e do colágeno, o número total de células viáveis extraídas a partir de cultura de diferenciação espontânea era, em média $206,9 \pm 13,0\%$ superior do que aquelas em meio condicionado. Além disso, o número de células extraídas de cultura microgravidade foi, em média, $32,9 \pm 15,9\%$ maior do que em cultura estática. Mais uma vez, o colágeno parece proporcionar uma melhor matriz para o crescimento celular em comparação com o alginato. O número total de células viáveis extraídas das microcápsulas de colágeno foi em média de $46,9 \pm 16,0\%$ maior do que em alginato. A viabilidade não foi afetada de forma significativa em nenhum grupo (ver imagem 4 na sessão Anexos).

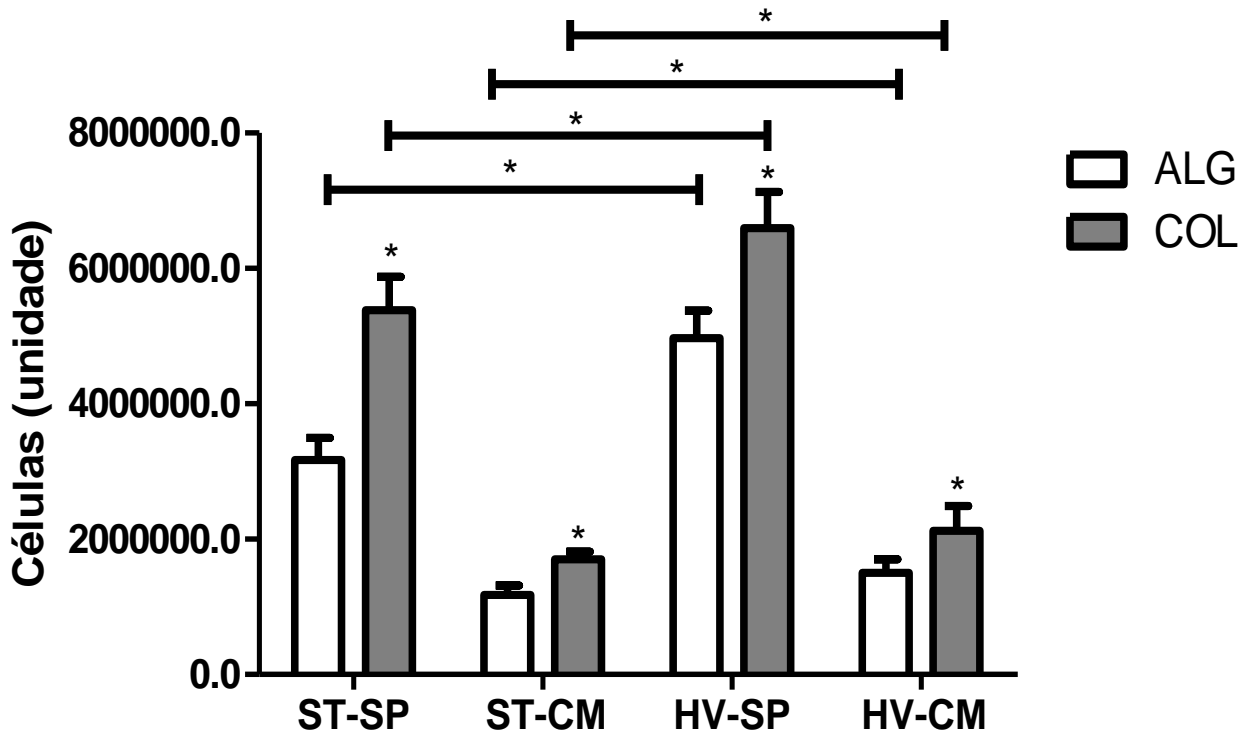


Figura 15: Contagem de células extraídas de 20 microcápsulas depois de 11 dias. Células viáveis totais em 20 microcápsulas após 11 dias em cultura. Observa-se o mesmo padrão observado na medida das áreas dos esferoides celulares ($n = 3$, $*=p<0,05$).

4.4 Diferenciação celular

A análise genética de marcadores de pluripotência (Figura 16), endoderme (Figura 17,18,19) e epitélio pulmonar (Figura 20) estão detalhadas a seguir. Todos os grupos apresentaram redução da expressão de NANOG no dia 11, ver Figura 16.

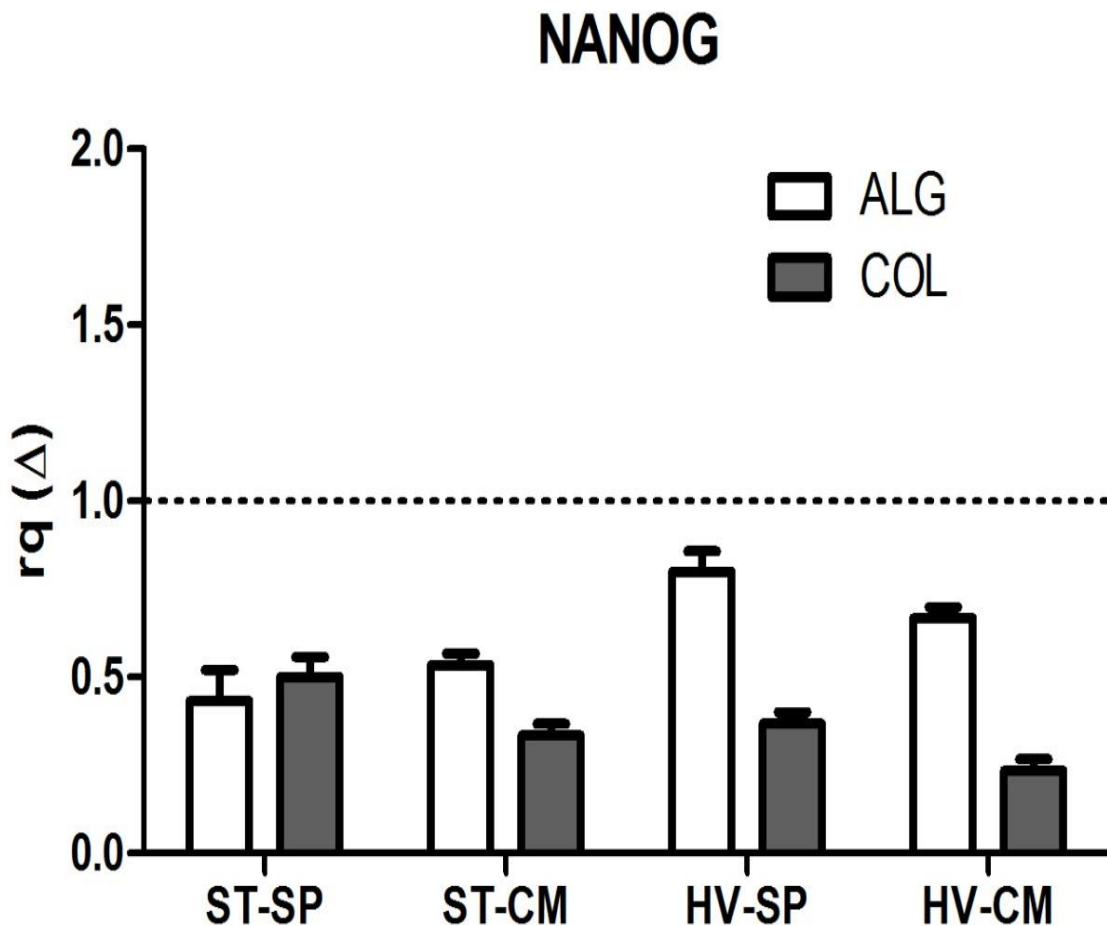


Figura 16: Expressão de NANOG. A quantificação relativa da expressão do gene NANOG no dia 11 (comparação entre D0 e todos os grupos). Linha pontilhada indica a expressão relativa da cultura usada para normalização (cultura indiferenciada de E14 12 delta S)

A análise genética mostrou que FOXA2 no dia 6, em células cultivadas microcápsulas de colágeno expressam aparentemente menos FOXA2 do que a cultura de células em alginato. Um aumento aparente significativo na expressão do gene é

observado no dia 11, onde novamente o grupo alginato mostrou uma expressão maior de FOXA2. As células cultivadas em meio condicionado aumentaram a expressão de FOXA2, bem como a cultura em ambiente de microgravidade modelada em todos os grupos testados no dia 11. A Figura 17, a seguir, assim como em todos os genes analisados posteriormente, mostra os resultados obtidos separados em dois grupos (dia 6 e dia 11).

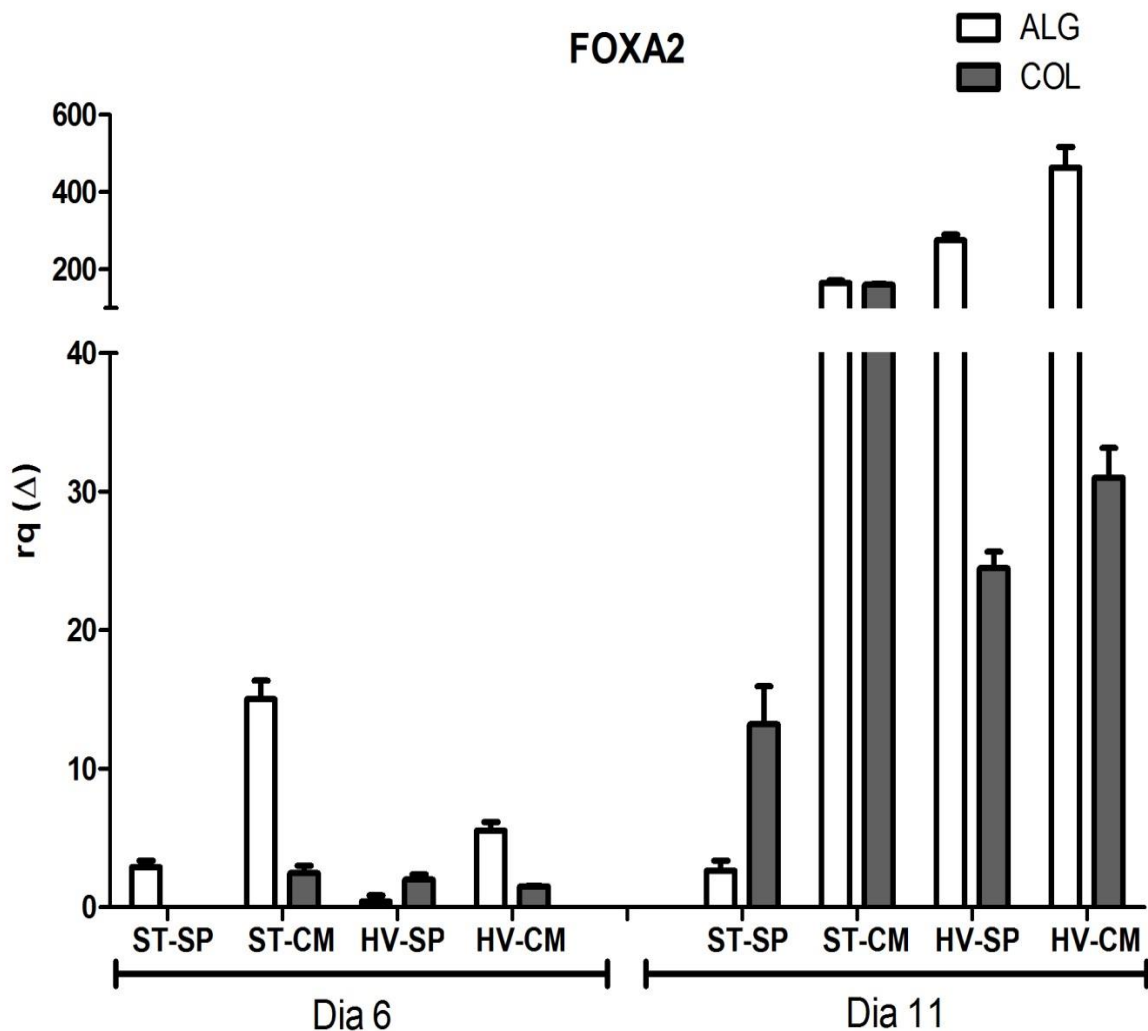


Figura 17: Expressão de FOXA2. (A) A quantificação relativa de expressão de genes FOXA2 no dia 6 (esquerda) e 11 (à direita).

A expressão de SOX17 revelou um padrão semelhante ao de FOXA2. No entanto, a análise do gene SOX17 mostrou que no dia 6 as células cultivadas em

esferas de colágeno expressam aparente mais SOX17 do que a cultura de células em microcápsulas de alginato. Novamente, um aumento significativo na expressão de genes fora obtido no dia 11, porém o grupo colágeno mostrou uma maior expressão de SOX17, exceto no grupo HV-CM. As células cultivadas em meio condicionado aumentaram a expressão de SOX17 bem como a cultura em microgravidade, exceto o grupo HV-CM, no dia 11. Ver Figura 18.

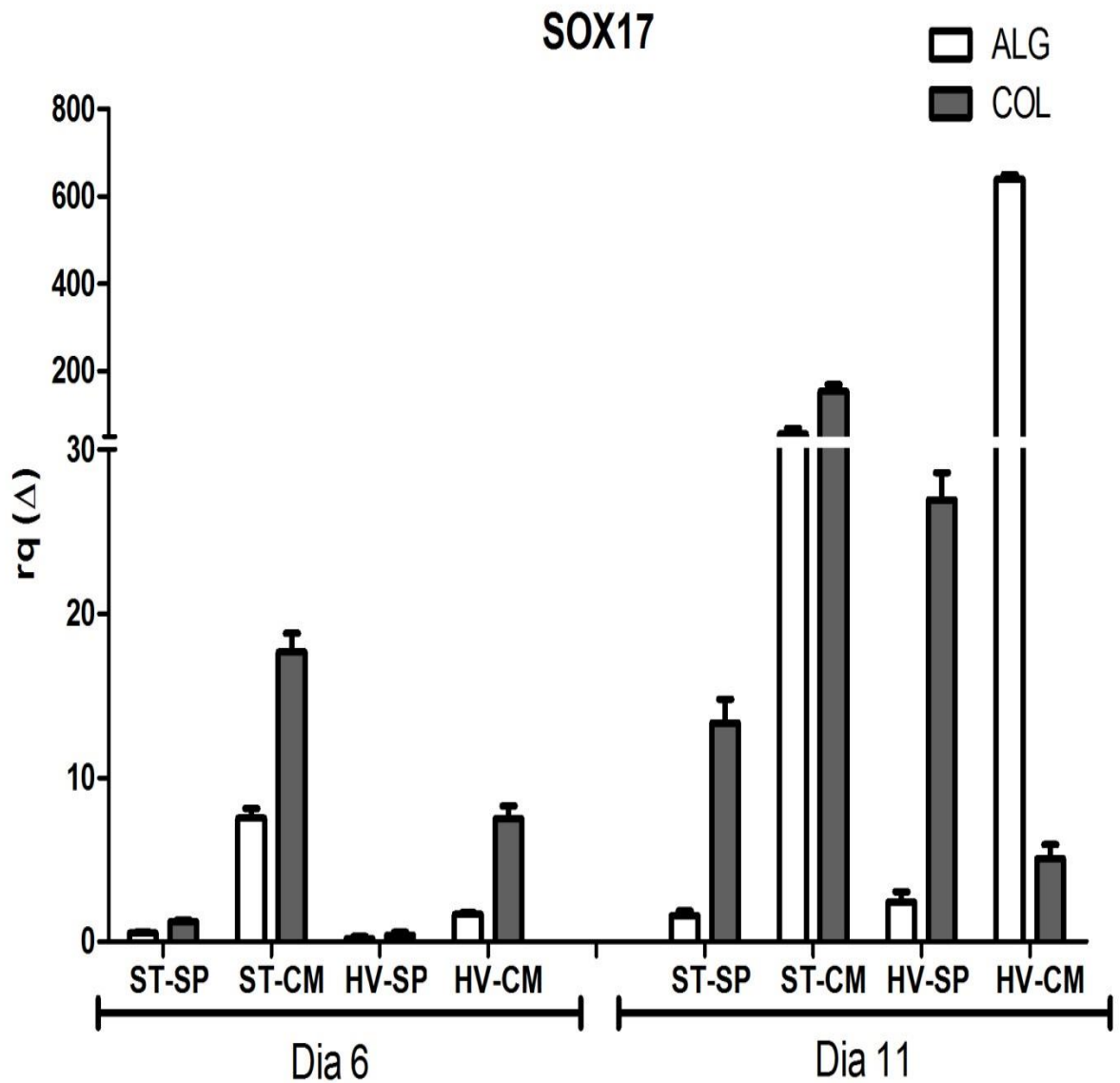


Figura 18: Expressão de SOX17. A quantificação relativa da expressão do gene SOX17 no dia 6 (esquerda) e 11 (à direita).

A expressão de CXCR4 mostrou um padrão distinto de FOXA2 e SOX17. No dia 6, as células cultivadas em microcápsulas de colágeno expressam aparente mais CXCR4 do que a cultura de células em alginato, exceto no grupo ST-SP. No entanto no dia 11, o grupo colágeno em meio condicionado param de expressar CXCR4 e grupo alginato reduz a sua expressão em relação ao dia 6. No dia 6, as células cultivadas em meio condicionado aumentaram a expressão de CXCR4, bem como a cultura em ambiente de microgravidade. No dia 11 deste padrão não foi observado. Ver Figura 19.

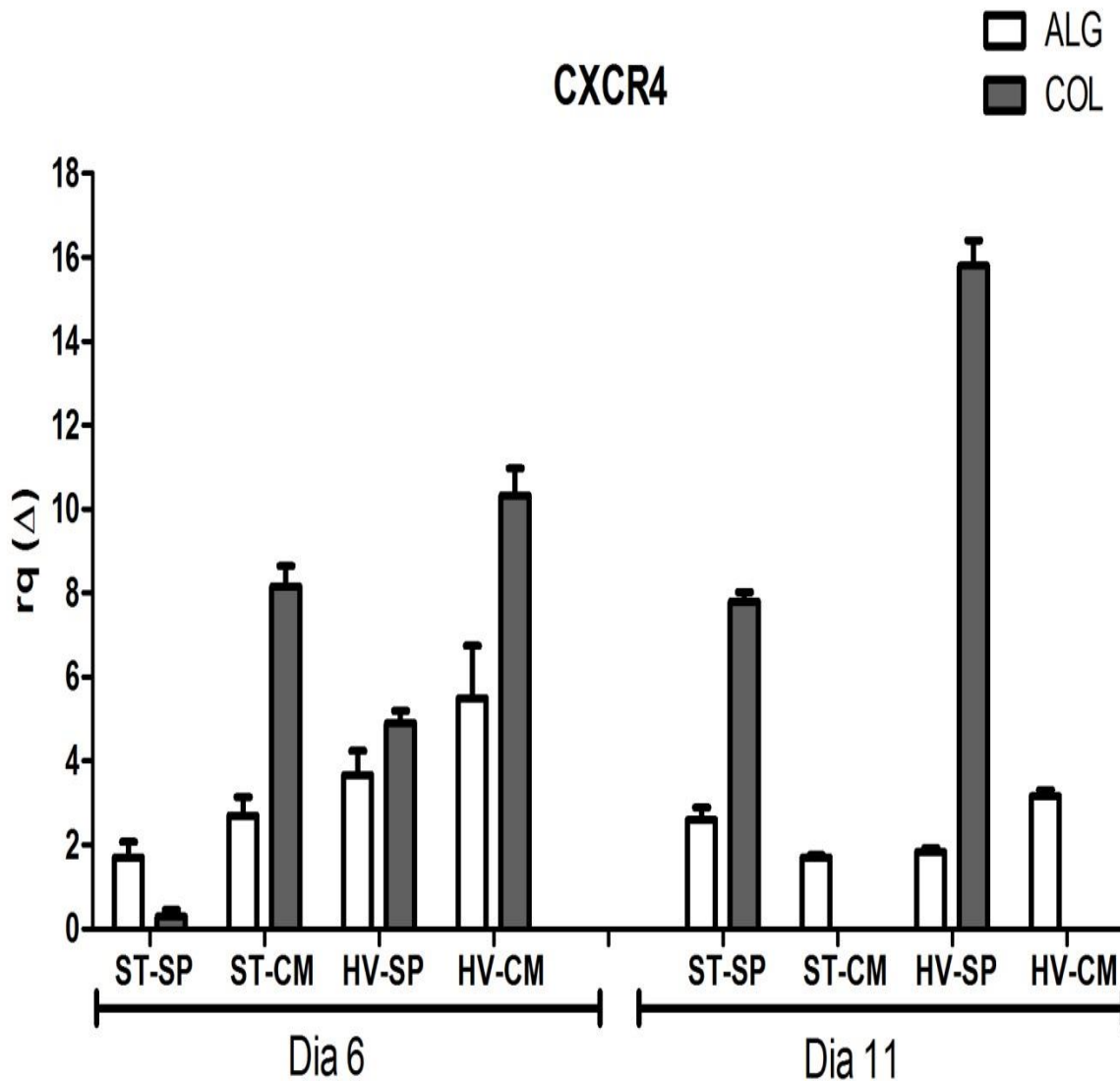


Figura 19: Expressão de CXCR4. A quantificação relativa de expressão do gene receptor CXCR4 no dia 6 (esquerda), e 11 (à direita).

A expressão de marcadores de epitélio pulmonar (SPA, SPB e SPC) após 6 e 11 dias em cultura, estão representados na Figura 20. Todos os grupos não apresentaram expressão do marcador para o tipo 2 de células epiteliais alveolares (SPC). No entanto, a expressão SPA e SPB em microcápsulas de colágeno foram aparentemente aumentadas pela cultura celular na combinação de microgravidade e meio condicionado (HV-CM).

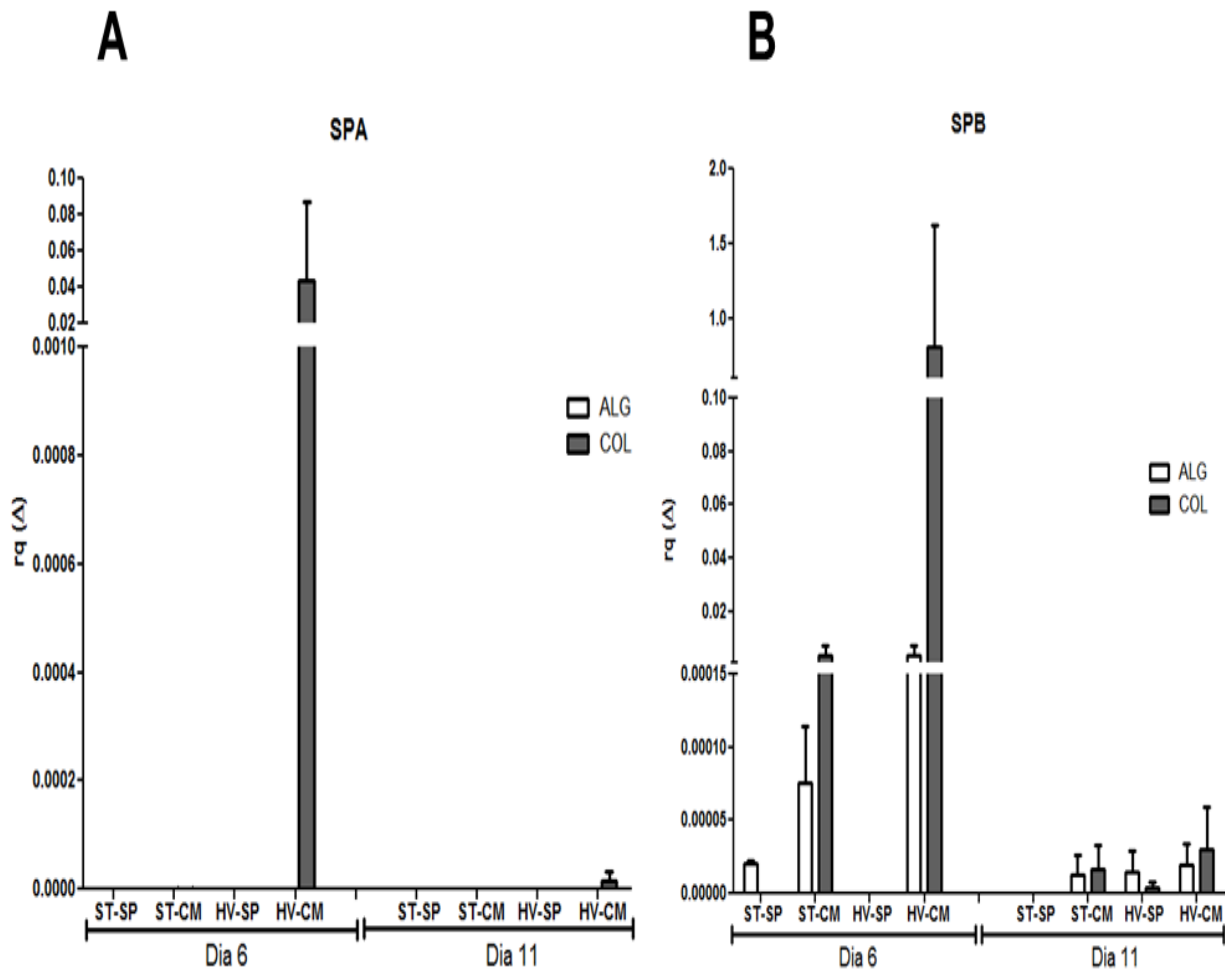


Figura 20: Expressão dos marcadores de epitélio pulmonar. (A) expressão quantificação relativa de SPA no dia 6 e dia 11 (B) expressão quantificação relativa de SPB no dia 6 e 11.

5. DISCUSSÃO

Até o presente momento, este trabalho é pioneiro ao descrever e caracterizar as propriedades físicas de microcápsulas esféricas de colágeno tipo I, assim como sua influencia no crescimento e diferenciação de CTE em microgravidade modelada.

A sessão de caracterização de material avaliou as propriedades físico-químicas dos hidrogéis utilizados como matrizes para o crescimento de células em 3D. A Figura 9 representa a caracterização de quatro tipos de microcápsulas: O alginato (1), alginato adicionado de por gelatina (2), ou o colágeno (3) equimolar à 1% m/m. Esta foi uma tentativa de avaliar a influência do material incorporado na matriz de alginato sobre as propriedades físicas dos materiais. O quarto tipo foi a microcápsulas de colágeno tipo 1, que é o alvo do presente trabalho.

A retenção de água em um hidrogel é constituída por duas partes principais: a água que reside nos poros do hidrogel e as moléculas de água associadas quimicamente com a rede polimérica hidrofílica do material. A água retida nos poros do hidrogel torna-se a maior parte da água presente em hidrogéis, e, por conseguinte, vemos pouco efeito na determinação percentual do conteúdo de água entre diversos hidrogéis. No caso da incorporação de moléculas de água no interior do material, as microcápsulas de colágeno mostraram um percentual estatisticamente maior de retenção de água em comparação com os grupos de alginato.

O percentual de encolhimento está relacionado com a deformação total do hidrogel quando a água é removida, relacionando-se diretamente com sua própria capacidade de retenção de água em sua estrutura. Os resultados indicam que as microcápsulas de colágeno tipo I têm uma maior capacidade de retenção de água dentro de sua rede polimérica hidrofílica em comparação com alginato. A gelatina é simplesmente colágeno desnaturado, e sua incorporação nas microcápsulas também aumenta a retenção de água, mas em menor escala em comparação com colágeno tipo I. O material incorporado pode estar causando maiores deformações nas redes de alginato, permitindo mais ligações de hidrogênio com moléculas de água circundantes.

A estimativa de porosidade em hidrogéis é muito difícil devida sua natureza hidratada. A desidratação altera a estrutura terciária das proteínas fibrosas, bem como

a arquitetura de hidrogéis. Esta mudança na arquitetura geralmente causa o encolhimento em tamanho, que por sua vez leva ao encolhimento do tamanho do poro. A limitação técnica atual está na incapacidade de visualizar o tamanho dos poros de um hidrogel hidratado, e, portanto, as medições de porosidade por estes métodos serão tipicamente relativas. No entanto, uma forma interessante de avaliar a porosidade de hidrogéis hidratados é por estudos cinéticos utilizando macromoléculas desafiadoras de tamanhos variados, estudando a capacidade destas de entrarem/saírem do material. Quanto maior for o tamanho dos poros, mais moléculas e/ou de forma mais rápida, saem/penetram o material (HINES e KAPLAN, 2011).

A difusão de nutrientes e moléculas de sinalização celular para as células encapsuladas dentro do hidrogel é crítica para o desempenho destes materiais. Um dos objetivos de usar uma matriz de colágeno tipo I foi de aumentar a capacidade de difusão do hidrogel aumentando sua porosidade. Quando exposto a uma solução quase saturada de FITC-dextrana, as microcápsulas porosas de hidrogel devem ser capazes absorver solutos a partir do meio devido um gradiente de difusão gerado pela diferença de energia livre de Gibbs entre o meio interior e exterior do material. Quando normalizada ao peso do material, a difusão para dentro do material foi determinada e apresentada na Figura 10. As microcápsulas de colágeno apresentaram um aumento significativo na capacidade de absorção. Uma vez que todos os materiais têm a mesma forma hidrodinâmica esférica favorável, e o experimento foi realizado numa solução em agitação, os resultados indicam que as microcápsulas de colágeno permite um melhor fluxo de moléculas para dentro de sua matriz, podendo proporcionar uma melhor formação de gradientes de difusão.

A cinética de liberação, mostrado na Figura 11, representa a capacidade do material para liberar moléculas solúveis de dentro de sua matriz pelo gradiente de difusão gerado, novamente, pela diferença na energia livre com a solução circundante. As microcápsulas de colágeno mostraram um perfil cinético mais eficiente em comparação com os grupos de alginato. Isso indica que o colágeno proporciona uma melhor matriz de efluxo, ou que permite um maior, ou mais rápido, estabelecimento de gradientes de difusão.

Os resultados combinados de absorção e liberação de FITC-Dextrana corroboram com a ideia de que as microcápsulas de colágeno possuem uma estrutura mais porosa, permitindo a formação mais rápida e eficiente de gradientes de difusão.

As imagens microscopia eletrônica de varredura revelaram a topologia das microcápsulas, Figura 12. As imagens mostraram nenhuma diferença entre todas as matrizes de alginato testadas, o que indica que o material incorporado aparentemente não altera a morfologia da matriz de alginato, em relação à sua topologia. As imagens das matrizes de alginato mostraram uma baixa porosidade e uma morfologia aparente não fibrilar. A matriz de alginato se assemelha a outro trabalho que utilizou a mesma técnica para avaliar sua morfologia (DANDOY *et al.*, 2011)

A análise topológica de colágeno mostrou, como esperado para a sua natureza, uma estrutura fibrosa com poros amorfos. Este resultado é ilustrado em outro trabalho que utilizou o colágeno tipo I para a formação de hidrogéis (TSAI *et al.*, 1998).

Como a análise por microscopia eletrônica de varredura utiliza os hidrogéis desidratados (Figura 12), não foi quantificado o tamanho dos poros por meio de análise de imagem utilizando softwares padrões. A deformação dos poros dos hidrogéis não é capaz de ser controlada em processo de desidratação padrão para microscopia eletrônica de varredura. Porém, há a necessidade de se avaliar a morfologia do interior das microcápsulas. Contudo o seccionamento dos materiais desidratados, utilizando uma lâmina fina, causou uma deformação das fibras tão significativa que sua análise foi considerada inapropriada (ver Imagem 3 na sessão Anexos). Diferentes abordagens para avaliar a estrutura morfológica do interior de hidrogéis, sem danos significativos à sua estrutura, estão atualmente em investigação por nosso grupo.

Finalizando a caracterização de materiais, conclui-se que as microcápsulas de colágeno tipo I possuem uma melhor propriedade de difusão em um sistema hidrodinâmico em comparação com alginato, bem como a morfologia aparente mais porosa que poderia assemelhar se a estrutura do tecido conectivo e conjuntivo.

A análise de citometria de fluxo da cultura de E14 12 delta S (Figura 13) mostra que as células utilizadas para estes experimentos mantiveram sua pluripotência na presença de LIF e BMP4. SSEA-1 é uma proteína de membrana expressa em CTE de camundongos e é utilizada como um marcador de pluripotência (KNOWLES, ADEN e

SOLTER, 1978). Oct-3/4 é uma proteína nuclear, também expressa em CTE, que também é utilizada como um marcador de pluripotência (NIWA, MIYAZAKI e SMITH, 2000). A análise de citometria de fluxo destes dois marcadores mostrou 88% de co-expressão e menos de 0,5% de duplos negativos.

A proliferação celular foi avaliada através da evolução da área dos esferoides-celulares individuais dentro das várias microcápsulas a cada dois dias (Figura 14). Foram observados três padrões distintos: primeiro, a diferenciação espontânea leva as células a crescer continuamente dentro da matriz 3D enquanto que em meio condicionado atinge um patamar de crescimento por volta do dia 6. Em segundo lugar, os esferoides-celulares crescem mais rápido no HARV do que em condições de cultura estática. Por último, esferoides celulares crescem em 3D mais rápido em microcápsulas de colágeno do que alginato.

A primeira observação pode ser explicada devido à influência dos fatores de diferenciação presentes no meio condicionado que, em um determinado ponto, induzem as células a iniciar a diferenciação. O crescimento das células diminui quando estas estão se diferenciando, um processo fisiológico chamado de *switch* proliferação/diferenciação (LIM e KLADIS, 2012; WEI *et al.*, 2013; KAI *et al.*, 2006; STREHL *et al.*, 2002). Os resultados indicam que o meio de cultura condicionado pode estar induzindo uma diferenciação celular direcionada e aparentemente sincronizada, em comparação com uma diferenciação randômica e dessincronizada no meio de cultura de diferenciação espontânea.

A segunda observação é o reflexo das propriedades físicas de crescimento de células provido pelo sistema HARV, tais como a melhor propriedade de transporte de massas com baixo stress hidrodinâmico (HAMMOND e HAMMOND, 2001). As células tendem a crescer mais rapidamente em um ambiente dinâmico do que em uma condição estática. Uma vez não estando em movimento, estabelece-se um equilíbrio osmótico e de difusão (diferencial de energia livre de Gibbs é nulo) entre as fases fazendo com que o sistema reduza as propriedades de transporte de massas. As células recebem mais nutrientes e dispõem metabólitos mais rapidamente em um sistema hidrodinâmico do que em um ambiente estático, permitindo um melhor crescimento celular (HAMMOND e HAMMOND, 2001).

A terceira observação pode ser explicada pela natureza do material de matriz de encapsulamento utilizado. Como observou a seção de caracterização do material, o colágeno é um melhor sistema termodinâmico que, conseqüentemente proporciona melhores propriedades de transporte de massas. As células são então fornecidas com mais nutrientes e seus metabólitos exauridos mais rapidamente. Este fenômeno é associado a um baixo stress hidrodinâmico, facilitando o crescimento em 3D. Esse resultado corrobora com os relatados anteriormente sobre o crescimento de células em hidrogéis de colágeno (TSAI *et al.* 1998; TEBB *et al.*, 2006).

Após o desencapsulamento, as células viáveis foram contadas (figura 15). Os resultados corroboraram com a análise da área dos esferoides-celulares. O percentual de viabilidade mostrou nenhuma diferença significativa entre todos os grupos (Ver seção de Anexo, Imagem 4). A representação das imagens do cultivo 3D nos dias 6 e 11 estão mostradas na Imagem 5 da sessão Anexos. Como os esferoides-celulares crescem em tamanho, as células no núcleo dos esferoides recebem menos nutrientes e gases (FRIEDRICH *et al.*, 2007) e um núcleo necrótico é criado proporcional ao aumentam do raio do agregado celular. Uma vez que o crescimento do núcleo necrótico é proporcional ao crescimento do raio do agregado, nenhuma diferença foi observada quando normalizada para a área dos agregados-celulares no dia 11 em todos os grupos. Ao final do protocolo (dia 11), as células foram desencapsuladas e mantidas em cultura por 15 dias para observar sua morfologia aparente (ver Imagem 6 da seção Anexos).

Resumindo o ensaio de proliferação celular, conclui-se que, em comparação, o colágeno é aparentemente uma matriz melhor para o crescimento experimental 3D de CTE do que o alginato.

Diferenciação celular foi avaliada com qRT-PCR. Primeiro, fora analisada a expressão de um marcador de pluripotência, o gene NANOG (MITSUI *et al.*, 2003), Figura 16. Observou-se que no dia 11, como esperado, todos os grupos reduziram a expressão deste gene em relação ao controle, dia 0, mostrando uma pluripotência reduzida ao final do experimento, como era de se esperar. Marcadores de endoderme como FOXA2 e SOX17 (YOSHIMI *et al.*, 2005; SCHOROEDER *et al.*, 2011) e o marcador de endoderme definitiva CXCR4 foram avaliados (YASUNAGA *et al.*, 2005;

KUBO *et al.*, 2004; TADA *et al.*, 2005). A progressão da expressão dos genes durante os experimentos (dias 6 e 11) dos marcadores da endoderme (figura 17-19) revelaram o seguinte perfil: Em primeiro lugar, o meio condicionado, de maneira geral aumenta a expressão dos marcadores da endoderme, também como esperado (ROSZELLE *et al.*, 2009). Em segundo lugar, a cultura em HARV parece fornecer o melhor ambiente para a expressão destes genes. Por último, em terceiro lugar, o alginato parece ser uma melhor matriz para a expressão destes mesmos marcadores do que o colágeno.

O meio de cultivo condicionado por A549 causou o aumento da expressão de marcadores de endoderme, observado pela diferença com os grupos cultivados em meio de cultivo espontâneo, como já era esperado, devido a presença de moléculas indutoras da diferenciação endodermal, como a subunidade $\alpha 5$ de laminina (SITI-ISMAIL *et al.*, 2012; LECHT, *et al.* 2014).

A cultura em HARV demonstrou uma maior expressão de marcadores da endoderme do que a cultura estática em meio condicionado. Dados recentes da literatura já demonstraram esse mesmo fenômeno (SITI-ISMAIL *et al.*, 2012). A melhoria do sistema de transporte de massa poderia estar permitindo melhor contato das células com fatores químicos indutores de diferenciação presentes no meio de cultura, aumentando então a expressão de marcadores de endoderme.

Um ponto interessante é levantado quando analisamos a expressão de marcadores de endoderme nos dias 6 e 11 em microcápsulas de colágeno em comparação com o alginato. Uma vez que, como já mencionada, a matriz de colágeno é um melhor sistema para o crescimento de células, e que possui sítios de ligação para moléculas como a subunidade $\alpha 5$ de laminina, poderia se esperar uma maior expressão de marcadores de endoderme em tal grupo. Acontece que, aparentemente de maneira geral, em colágeno as células expressam marcadores de endoderme mais rapidamente do que em alginato, principalmente evidenciado pela expressão do gene CXCR4, um marcador de endoderme definitiva. No dia 11, as células expressam menos o mesmo marcador.

Duas hipóteses possíveis poderiam explicar tal fenômeno. Em primeiro lugar, o colágeno pode ser uma matriz tão melhor para diferenciação para endoderme que, no dia 11, as células já passaram do fenótipo de endoderme e estão mais próximas de um

fenótipo celular de epitélio pulmonar. A segunda hipótese seria de que, uma vez que as células proliferam mais rapidamente em colágeno, isto pode dificultar os processos intracelulares de sinalização para a diferenciação, o que explicaria a menor expressão relativa de marcadores de endoderme em comparação com o alginato.

Para testar tais hipóteses foi verificada a expressão de marcadores epiteliais pulmonares, como SPC (CEAII) (SITI-ISMAIL *et al.*, 2012), SPA e SPB (CEAI e II), (KHUBCHANDANI e SNYDER, 2001; COCHRANE e REVAK, 1991), no dia 6 e dia 11 (Figura 20). Todos os grupos não apresentaram qualquer expressão de SPC em 6 e 11 dias, apesar de alguma expressão de SPA e SPB ter sido notada.

Os resultados de SPA e SPB revelaram que no dia 6 há uma pequena expressão de SPB em todos os grupos de meio condicionado, sendo mais pronunciado nos grupos usando a matriz de colágeno, especialmente o grupo HV-CM. Todos os grupos também expressaram muito pouco de SPA. No dia 11, alguns grupos expressaram SPB, mas sem diferença notória entre os mesmos. Como no dia 6 os grupos de colágeno estão expressando marcadores endoderme e marcadores de epitélio pulmonar. Pode-se especular que o colágeno possa ser então uma melhor matriz para a diferenciação em fenótipo celular de epitélio pulmonar.

Este trabalho não foi possível de refutar ou aceitar a hipótese 2 (que as células estão se proliferando mais e diferenciando menos em matriz de colágeno) porque até a presente data, não foi realizado qualquer teste que possa elucidar este mecanismo, como a análise de outros genes e proteínas importantes reguladoras de processos de diferenciação e ciclo celular.

Embora este trabalho seja o primeiro a avaliar a influência da matriz de colágeno em cultura de microgravidade de CTE visando a produção de CEA, é observado a necessidade de mais experimentos confirmatórios. Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho são encorajadores e devem ser discutidos futuramente visando o progresso da técnica e possível aplicação clínica.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou a influência de uma nova matriz de encapsulamento, feita de colágeno tipo I, para o crescimento e diferenciação de CTE em microgravidade modelada visando à produção em larga escala de CEA. Foi obtida uma microcápsula de colágeno tipo I favorável para o cultivo celular em ambiente dinâmico e mais eficiente no transporte de massas. Os resultados obtidos indicam que este material possui características físico-químicas superiores em relação às microcápsulas clássicas de alginato. As microcápsulas de colágeno mostraram ser significativamente uma matriz melhor para a expansão e, aparentemente, para a diferenciação de CTE em CEA.

As CTE são uma fonte potencial de células para as terapias de regeneração tecidual para uma variedade de doenças. No entanto, há um forte debate ético sobre sua utilização em pesquisa e possíveis aplicações clínicas. Essas controvérsias devem ser abordadas antes da aplicação clínica generalizada de produtos e/ou serviços médicos derivados de tais células; alternativamente, diferentes fontes de células-tronco pluripotentes, tais como células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês iPSCs, *induced pluripotent stem cell*), estão sendo desenvolvidas e que não apresentam as mesmas graves considerações éticas (SUAUDEAU, 2011). O potencial de utilização clínica de células derivadas de células-tronco vai depender necessariamente da produção de um número suficientemente grande de células de alta qualidade para regeneração tecidual pulmonar, que foi o objetivo deste trabalho.

Apesar dos promissores resultados, observa-se a necessidade de projetos complementares futuros. A avaliação de outros parâmetros do material, como a dureza da matriz e sua possível manipulação para melhorar a diferenciação celular se mostra necessária (ENGLER *et al.*, 2006). Nosso grupo está atualmente investigando mais profundamente os efeitos deste material novo em outras culturas de células-tronco, incluindo células humanas e iPSCs. Experimentos mais aprofundados de análise molecular devem ser realizados, tais como: Análise de genes marcadores para outras camadas germinativas (ectoderme e mesoderme) e de tecido epitelial alveolar, além de análise de expressão proteica confirmatória.

7. REFERENCIAS

ALTANKOV, G.; BRODVAROVA, I.; RAHKOV, I. 1991. Synthesis of protein-coated gelatin microspheres and their use as microcarriers for cell culture. Part I. Derivatization with native collagen. **Journal Biomaterial Science Polymers Edition 2(2)**: 81-89.

ANDRADE, C.F.; WONG, A.P.; WADDELL, T.K; KESHAVJEE, S.; LIU, M. 2007. Cell-based tissue engineering for lung regeneration. **American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology 292(2)**: 510-518.

AYYASWAMY, P.S; MUKUNDAKRISHNAN, K. 2002. Optimal conditions for simulating microgravity employing NASA designed rotating wall vessels. **Acta Astronautica 60**: 397-405.

BJORN, L. 2013. **Global problems, local solutions: costs and benefits**. Cambridge University Pres. p143.

BURDON, T.; SMITH, A.; SAVATIER, P. 2002. Signaling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. **Trends in Cell Biology 12 (9)**: 432–438.

CAHN, F. 1990. Biomaterials aspects of porous microcarriers for animal cell culture. **Trends in Biotechnology 8**: 131–136.

CHEN, P., MARSILIO, E.; GOLDSTEIN, R.H.; YANNAS, I.V.; SPECTOR, M. 2005. Formation of lung alveolar-like structures in collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro. **Tissue engineering 11(9-10)**: 1436-1448.

COCHRANE, C.G.; REVAK, S.D. 1991. Pulmonary surfactant protein B (SP-B): structure-function relationships. **Science 254**: 566-568.

COHEN, S.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; POLAK, J.M.; BISHOP, A.E. 2006. Antibiotics reduce the growth rate and differentiation of embryonic stem cell cultures. **Tissue Engineering 12**: 2025-2030.

DANDOY, P.; MEUNIER, C.F.; MICHIELES, C.; SU, B.L. 2011. Hybrid shell engineering of animal cells for immune protections and regulation of drug delivery: towards the design of "artificial organs". **PLoS One 6(6)**:20983.

DEAN, R. 1989. Weighted collagen microsp sponge for immobilizing bioactive materials. **US Patent, 4,863,856**.

DOUGLAS, W.H.; MOORMAN, G.W., TEEL, R.W. 1976. The formation of histotypic structures from monodisperse fetal rat lung cells cultured on a three-dimensional substrate. **In Vitro 12(5)**: 373-381.

DUSSEAULT, J.; TAM, S.K.; MÉNARD, M.; POLIZU, S.; JOURDAN, G.; YAHIA, L.; HALLÉ, J.P. 2006. Evaluation of alginate purification methods: effect on polyphenol, endotoxin, and protein contamination. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A: 76(2):** 243-251.

ENGLER, A.J.; SEN, S.; SWEENEY, H.L.; DISCHER, D.E. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. **Cell 126(4):**677-689.

FISHER, H., Mechanisms and function of DUOX in epithelia of the lung. 2009. **Antioxidant Redox Signalling, 11(10):** 2453-65.

FRANKS, T.J.; COLBY T.V.; TRAVIS, W.D.; TUDER, R.M.; REYNOLDS, H.Y.; BRODY, A.R.; CARDOSO, W.V.; CRYSTAL, R.G.; DRAKE, C.J.; ENGELHARDT, J.; FRID, M.; HERZOG, E.; MASON, R.; PHAN, S.H.; RANDELL, S.H.; ROSE, M.C.; STEVENS, T.; SERGE, J.; SUNDAY, M.E.; VOYNOW, J.A.; WEINSTEIN, B.M.; WHITSETT, J.; WILLIAMS, M.C. 2008. Resident cellular components of the human lung: current knowledge and goals for research on cell phenotyping and function. **Procedures American Thoracic Society, 5(7):** 763-766.

FRANZDOTTIR, S.R., AXELSSON, I.T.; ARASON, A.J.; BALDURSSON, O.; GUDJONSSON, T.; MAGNUSSON, M.K. 2010. Airway branching morphogenesis in three dimensional culture. **Respiratory Research 11:** 162.

FRIEDRICH, J.; EDER, W.; CASTANEDA, J.; DOSS, M.; HUBER, E.; EBNER, R., KUNZ-SCHUGHART, L.A. 2007. A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay. **Journal of Biomolecular Screening 12(7):** 925-937.

GADUE, P. HUBER, T.L.; PADDISON, P.J.; KELLER, G.M. 2006. Wnt and TGF-beta signaling are required for the induction of an in vitro model of primitive streak formation using embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 103(45):** 16806-16811.

GASPERINI, L.; MANO J.F.; REIS, R.L. 2014. Natural polymers for the microencapsulation of cells. **Journal of the Royal Society, Interface 11(100):** 20140817.

GEBB, S.A.; JONES, P.L. 2003. Hypoxia and lung branching morphogenesis. **Advances in Experimental Medical Biology 543:** 117-125.

GUILLAMAT, R.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, L.; SIRENKO, V.; XAUBET, A.; BULBENA, O.; SERRANO-MOLLAR, A. 2010. Transplant of alveolar type II cells restore pulmonary surfactant levels in lung fibrosis. **Journal of Heart and Lung Transplantation 33(7):** 758-765.

HAMMOND, T.G; HAMMOND, J.M. 2001. Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel. **American Journal of Physiology: Renal Physiology 281:**12-25.

HINES, D.J.; KAPLAN, D.L. 2011. Mechanisms of controlled release from silk fibroin films. **Biomacromolecules** **12(3)**:804-812.

HOGG, J.C.; TIMENS, W. 2009. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. **Annual Review of Pathology** **4**:435-459.

HSIA, C.C. 2004. Signals and mechanisms of compensatory lung growth. **Journal of Applied Physiology** **97(5)**: 1992-1998.

JENSEN, T.; ROSZELL, B.; ZANG, F.; GIRARD, E.; MATSON, A.; THRALL, R.; JAWORSKI, D.M.; HATTON, C.; WEISS, D.J.; FINCK, C. 2012. A rapid lung decellularization protocol supports embryonic stem cell differentiation in vitro and following implantation. **Tissue Engineering Part C: Methods** **18(8)**: 632-646.

JORGEN, V. 2014. "Definition and Overview". **Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease.** p1–7.

KAI, X.; HUILING, X.; DONG, D.; SHANSHAN, Z.; JIAMU, W.; QINGPENG Z.; LEI, H.; HUA, C.; RAN, T.; ZHENG, H.; ZHENG, F.; YE-GUANG, C.; JING-DONG, J.; HAN, M. 2006. Identification of the Proliferation/Differentiation Switch in the Cellular Network of Multicellular Organisms. **PLOS Computational biology** **24(2)**: 145.

KHUBCHANDANI, K.R.; SNYDER, J.M. 2001. Surfactant protein A (SP-A): the alveolus and beyond. **FASEB Journal** **15(1)**: 59-69.

KHARKAR, P.M.; KIICK, K.L.; KLOXIN, A.M. 2013. Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments. **Chemical Society Reviews** **42(17)**: 7335–7372.

KNOWLES, B.B.; ADEN, D.P.; SOLTER, D. 1978. Monoclonal antibody detecting a stage-specific embryonic antigen (ssea-1) on preimplantation mouse embryos and teratocarcinoma cells. **Current Topics in Microbiology and Immunology** **8**: 51–53.

KUBO, A.; SHINOZAKI, K.; SHANNON J.M.; KOUSKOFF, V.; KENNEDY, M.; WOO, S.; FEHLING, H.J.; KELLER, G. 2004. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. **Development** **131(7)**: 1651-1662.

KUBO, H. 2012. Tissue engineering for pulmonary diseases: Insights from the laboratory. **Respirology** **17(3)**: 445-454.

LANGER, R.; VACANTI, J. 1993. Tissue Engineering. **Science**, **260**: 920–926.

LECHT, S.; GERSTENHABER, J.A.; STABLER, C.T.; PIMTON, P.; KARAMIL, S.; MARCINJEWICZ, C.; SCHULMAN, E.S.; LELKES, P.I. 2014. Heterogeneous mixed-

lineage differentiation of mouse embryonic stem cells induced by conditioned media from a549 cells. **Stem Cells and Development** **23(16)**:1923-36.

LIM, S.; KLADIS, P. 2012. Loss of Cdk2 and Cdk4 induces a switch from proliferation to differentiation in neural stem cells. **Stem Cells** **30(7)**:1509-1520.

LIN, Y.M.; ZHANG, A.; BISMARCK, A.; BISHOP, A.E. 2010. Effects of fibroblast growth factors on the differentiation of the pulmonary progenitors from murine embryonic stem cells. **Experimental Lung Research** **36**: 307-320.

LIN, Y.M.; ZHANG, A.; RIPPON, H.J.; BISMARCK, A.; BISHOP, A.E. 2010. Tissue engineering of lung: the effect of extracellular matrix on the differentiation of embryonic stem cells to pneumocytes. **Tissue Engineering Part A** **16**: 1515-1526.

LONGMIRE, T.A.; IKONOMOU, L.; HAWKINS, F.; CHRISTODOULOU, C.; CAO, Y.; JEAN, J.C.; KWOK, L.W.; MOU, H.; RAJAGOPAL, J.; SHEN, S.S.; DOWTON, A.A.; SERRA, M.; WEISS, D.J.; GREEN, M.D.; SNOECK, H.W.; RAMIREZ, M.I.; KOTTON, D.N. 2012. Efficient Derivation of Purified Lung and Thyroid Progenitors from Embryonic Stem Cells. **Stem Cell** **10(4)**: 398-411.

MAGYAR, J.P.; NEMIR, M.; EHLER, E.; SUTER, N.; PERRIAD, J.C.; EPPENBERGER, H.M. 2001. Mass production of embryoid bodies in microbeads. **Annals of the New York Academy of Sciences** **944**: 135-143.

MATHERS C.D.; LONCAR, D. 2006. "Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030". **PLoS Medicine**. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030442.

MITSUI, K.; TOKUSAWA, Y.; ITOH, H.; SEGAWA, K.; MURAKAMI, M.; TAKAHASHI, K.; MARUYAMA, M.; MAEDA, M.; YAMANAKA, S. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell** **113 (5)**: 631-42

MONDRINOS, M.J. KOUTZAKI, S.; JIWANMALL, E.; LI, M.; DECHADAREVIAN, J.P.; LELKES, P.I.; FINCK, C.M. 2006. Engineering three-dimensional pulmonary tissue constructs. **Tissue engineering** **12(4)**: 717-728.

MONDRINOS, M.J.; KOUTZAKI S.; LELKES, P.I.; FINCK, C.M. 2007. A tissue-engineered model of fetal distal lung tissue. **American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology** **293(3)**:639-50.

MORRISEY, E.E; HOGAN B.L. 2010. Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. **Developmental Cell** **18(1)**: 8-23.

MURRAY, J.F. **The normal lung: the basis for diagnosis and treatment of pulmonary disease**. Segunda edição 1986, Philadelphia: Saunders. XI, p377.

NATHELL, L.; NATHELL, M.; MALMBERG, P. LARSSON, K. 2007. COPD diagnosis related to different guidelines and spirometry techniques. **Respiratory Research 8(1)**: 89.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH: Guidelines for human embryonic stem cell research. 2009. **Federal Register (74)**:77. Thursday, April 23, 2009.

NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; SMITH, A.G. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nature Genetics 24(4)**: 372–376

NOLEN-WALSTON, R.D.; KIM, C.F.; MAZAN, M.R, INGENITO, E.P.; GRUNTMAN, A.M.; TSAI, L.; BOSTON, R.; WOOLFENDEN, A.E.; JACKS, T.; HOFFMAN, A.M. 2008. Cellular kinetics and modeling of bronchioalveolar stem cell response during lung regeneration. **American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology 294**: 1158–1165.

OCHS, M.; NYENGAARD, J.R; JUNG, A.; KNUDSEN, L.; VOIGT, M.; WAHLERS, T.; RICHTER, J.; GUNDERSEN, H.J. 2004. The Number of Alveoli in the Human Lung. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 169(1)**: 120-124.

O'LEARY, C.; GILBERT, J.L.; O'DEA, S.; O'BRIEN, F.J.; CRYAN, S.A. 2015. Respiratory Tissue Engineering: Current Status and Opportunities for the Future. **Tissue Engineering Part B Reviews**. Jan 14, doi:10.1089/ten.TEB.2014.0525.

PAVELKA, M.; ROTH, J. 2005. **Functional ultrastructure: an atlas of tissue biology and pathology**. Primeira edição. Wien; New York: Springer-Verlag. XV, p326.

QIN, M.; TAI, G.; COLLAS, P.; POLAK, J.M.; BISHOP, A.E. 2005. Cell extract-derived differentiation of embryonic stem cells. **Stem Cells 23**: 712-718.

RABE, K.F.; HURD, S.; ANZUETO, A.; BARNES, P.J.; BUIST, S.A.; CALVERLEY, P.; FUKUCHI, Y., JENKINS, C. RODRIGUEZ-ROISIN, R.; VAN WEEL, C; ZIELINSKI, J. 2007. "Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary". **American Journal of Respiratory Critical Care and Medicine.176(6)**: 532–555

RIPPON, H.J.; ALI, N.N.; POLAK, J.M.; BISHOP; A.E. 2004. Initial observations on the effect of medium composition on the differentiation of murine embryonic stem cells to alveolar type II cells. **Cloning Stem Cells 6**: 49-56.

RIPPON, H.J.; LANE, S.; QIN, M.; ISMAIL, N.S.; WILSON, M.R., TAKATA, M.; BISHOP, A.E. 2008. Embryonic stem cells as a source of pulmonary epithelium in vitro and in vivo. **Proceedings of the American Thoracic Society 5(6)**: 717-722.

RIPPON, H.J.; POLAK, J.M.; QIN, M.; BISHOP, A.E. 2006. Derivation of distal lung epithelial progenitors from murine embryonic stem cells using a novel three-step differentiation protocol. **Stem Cells 24**: 1389-1398.

ROSZELL, B.R.; MONDRINOS, M.J.; SEATON, A.; SIMONS, D.M.; KOUTZAKI, S.H.; FONG, G.H.; LELKES, P.I.; FINCK, C.M. 2009. Efficient Derivation of Alveolar Type II Cells from Embryonic Stem Cells for In Vivo Application. **Tissue Engineering. Part A 15(11)**: 3351-3365.

SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; BISHOP, A.E. 2007. Effects of growth factors on the differentiation of murine ESC into type II pneumocytes. **Cloning Stem Cells 9**: 407-416

SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; COHEN, S.; ISAAC, K.; RIPPON, H.J.; POLAK, J.M.; BIELBY, R.C.; BISHOP, A.E. 2006. Derivation of distal airway epithelium from human embryonic stem cells. **Tissue Engineering 12**: 867-875.

SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; BISHOP, A.E. 2006. Derivation and characterization of alveolar epithelial cells from murine embryonic stem cells in vitro. **Methods in Molecular Biology 330**: 233-246.

SCHROEDER, I.S.; SULZBACHER, S.; NOLDEN, T.; FUCHS, J.; CZARNOTA, J.; MEISTERFELD, R.; HIMMELBAUER, H.; WOBUS, A.M. 2011. Induction and Selection of Sox17-Expressing Endoderm Cells Generated From Murine Embryonic Stem Cells. **Cells Tissues Organs 195(6)**: 507-23.

SERRANO-MOLLAR, A.; NACHER, M.; GAY-JORDI, G.; CLOSA, D.; XAUBET, A.; BULBENA, O. 2007. Intratracheal transplantation of alveolar type II cells reverses bleomycin-induced lung fibrosis. **American Journal of Respiratory Critical Care and Medicine 176**: 1261-1268.

SILVERTHORN, D.U. **Human physiology: an integrated approach**. 2006. Quarta edição, San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings. p859-895.

SITI-ISMAIL, N.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; BISHOP, A.E.; POLAK, J.M.; MANTALARIS, A. 2012. Development of a novel three-dimensional, automatable and integrated bioprocess for the differentiation of embryonic stem cells into pulmonary alveolar cells in rotating vessel bioreactor system. **Tissue Engineering Part C: Methods. 18(4)**: 263-72.

SMIDSROD, O.; SKJAK-BREK, G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotechnology 8**: 71-78.

SONG, J.J., KIM, S.S.; LIU, Z.; MADSEN, J.C.; MATHISEN, D.J.; VACANTI, J.P.; OTT, H.C. 2011. Enhanced in vivo function of bioartificial lungs in rats. **The Annals of Thoracic Surgery 92(3)**: 998-1005.

STREHL, R.; SCHUMACHER, K.; DE-VRIES, U.; MINUTH, W. 2002. Proliferating Cells versus Differentiated Cells in Tissue Engineering. **Tissue Engineering** **8(1)**: 37-42.

SUAUDEAU, J. 2011. From embryonic stem cells to iPS - an ethical perspective. **Cellular Proliferation** **44(1)**: 70-84.

TADA, S.; ERA, T.; FURUSAWA, C.; SAKURAI, H.; NISHIKAWA, S.; KINOSHITA, M.; NAKAO, K.; CHIBA, T.; NISHIKAWA, S. 2005. Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture. **Development** **132(19)**: 4363-4374.

TEBB, T.A.; TSAI, S.W.; GLATTAUER, V.; WHITE, J.F.; RAMSHAW, J.A.; WERKMEISTER, J.A. 2006. Development of porous collagen beads for chondrocyte culture. **Cytotechnology** **52(2)**:99-106.

TSAI, S.W.; JENG, M.J.; TSAY, R.Y.; WANG, Y.J. 1998. Gel beads composed of collagen reconstituted in alginate. **Biotechnology Techniques** **12(1)**: 21–23.

VAN VRANKEN, B.E.; RIPPON, H.J.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; TROUNSON, A.O.; BISHOP, A.E. 2007. The differentiation of distal lung epithelium from embryonic stem cells. **Current Protocols in Stem Cell Biology**. Capítulo 1.

WANG, D.; HAVILAND, D.L.; BURNS, A.R.; ZSIGMOND, E.; WETSEL, R.A. 2007. A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** **104**: 4449-4454.

WANG, D.; MORALES, J.E.; CALAME, D.G.; ALCORN, J.L.; WETSEL, R.A. 2010. Transplantation of human embryonic stem cell-derived alveolar epithelial type II cells abrogates acute lung injury in mice. **Molecular Therapy: The Journal of American Society of Gene Therapy** **18**: 625-634.

WEI, W.; HE, H.B.; ZHANG, W.Y.; ZHANG, H.X.; BAI, J.B.; LIU, H.Z.; CAO, J.H.; CHANG, K.C.; LI, X.Y.; ZHAO, S.H. 2013. miR-29 targets Akt3 to reduce proliferation and facilitate differentiation of myoblasts in skeletal muscle development. **Cell Death and Disease** **13;4(6)**: 668.

WEIBEL, E.R. 2008. How to make an alveolus. **European Respiratory Journal** **31(3)**: 483-485.

WHO. 2008. Factsheet No 315 Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **World Health Organization**. Acessado em 29 de Novembro de 2013

WHO. 2013. "The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2011". **World Health Organization**. Acessado em 29 de Novembro de 2013.

YANNAS, I.; KIRK, J. 1984. Method for the preparation of collagen-glycosaminoglycan composite materials. **US Patent, 4,448,718.**

YASUNAGA, M.; TADA, S.; TORIKAI-NISHIKAWA, S.; NAKANO, Y.; OKADA, M.; JAKT, L.M.; NISHIKAWA, S.; CHIBA, T.; ERA, T.; NISHIKAWA, S. 2005. Induction and monitoring of definitive and visceral endoderm differentiation of mouse ES cells. **Nature Biotechnology 23(12): 1542-1550.**

YING, Q.L.; NICHOLS, J.; CHAMBERS, I.; SMITH, A. 2003. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. **Cell 115(3): 281-292.**

YOSHIMI, T.; NAKAMURA, N.; SHIMADA, S.; IGUCHI, K.; HASHIMOTO, F.; MOCHITATE, K.; TAKAHASHI, Y.; MIURA, T. 2005. Homeobox B3, FoxA1 and FoxA2 interactions in epithelial lung cell differentiation of the multipotent M3E3/C3 cell line. **European Journal of Cell Biology 84: 555-566.**

8. ANEXOS

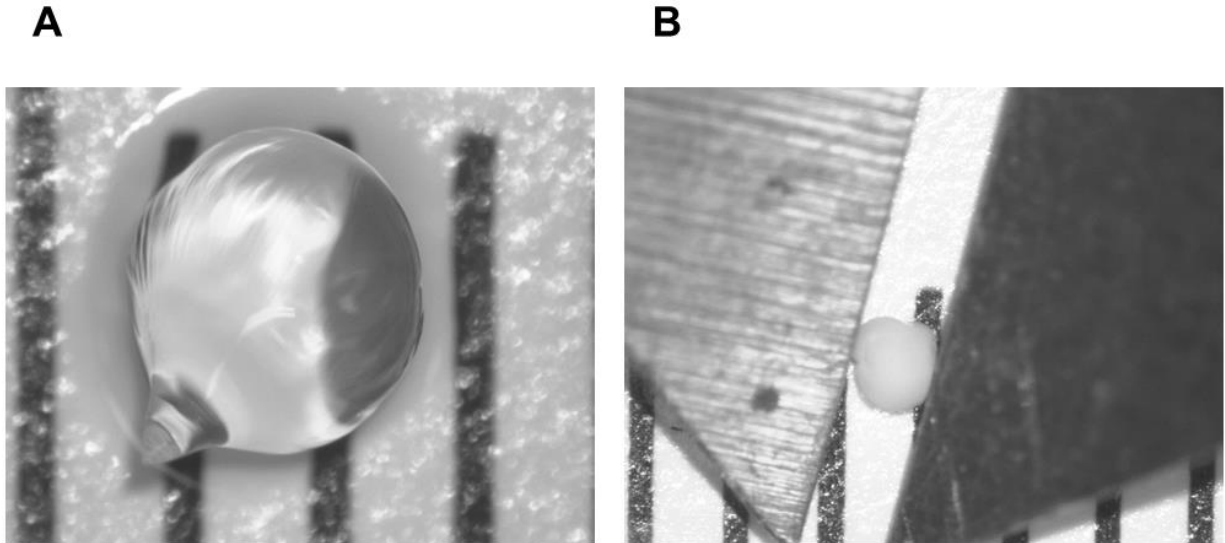


Imagem 1: Imagem representativa da medição do diâmetro das microcápsulas de hidrogel. (A) A medição do diâmetro hidratado usando software ImajeJ. No fundo está uma régua calibrada usada para referência de tamanho. (B) Medição do diâmetro das microcápsulas desidratadas com um paquímetro calibrado. Uma vez que o equipamento tocasse suavemente as bordas do material, os dados eram coletados.

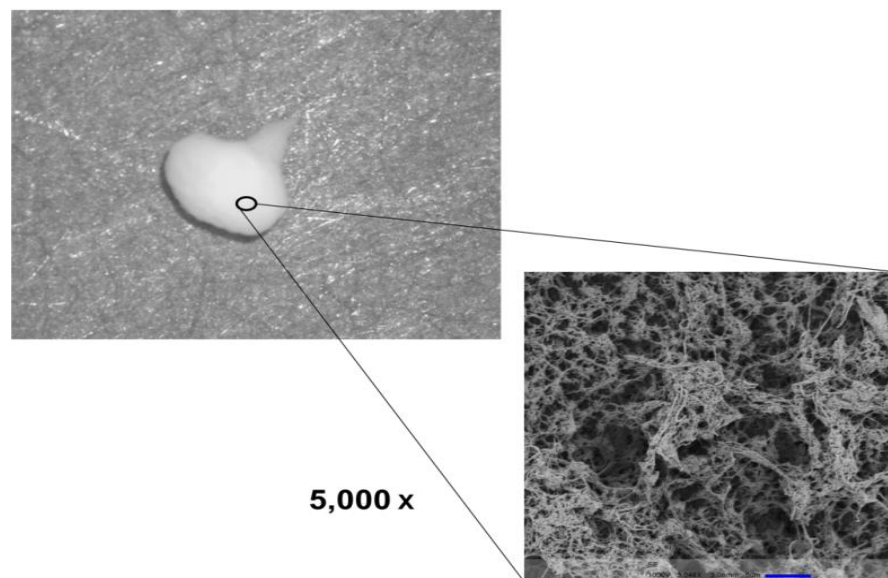


Imagem 2: Representação da análise de topologia por microscopia eletrônica de varredura. Superfície do material foi fotografada usando SEM.

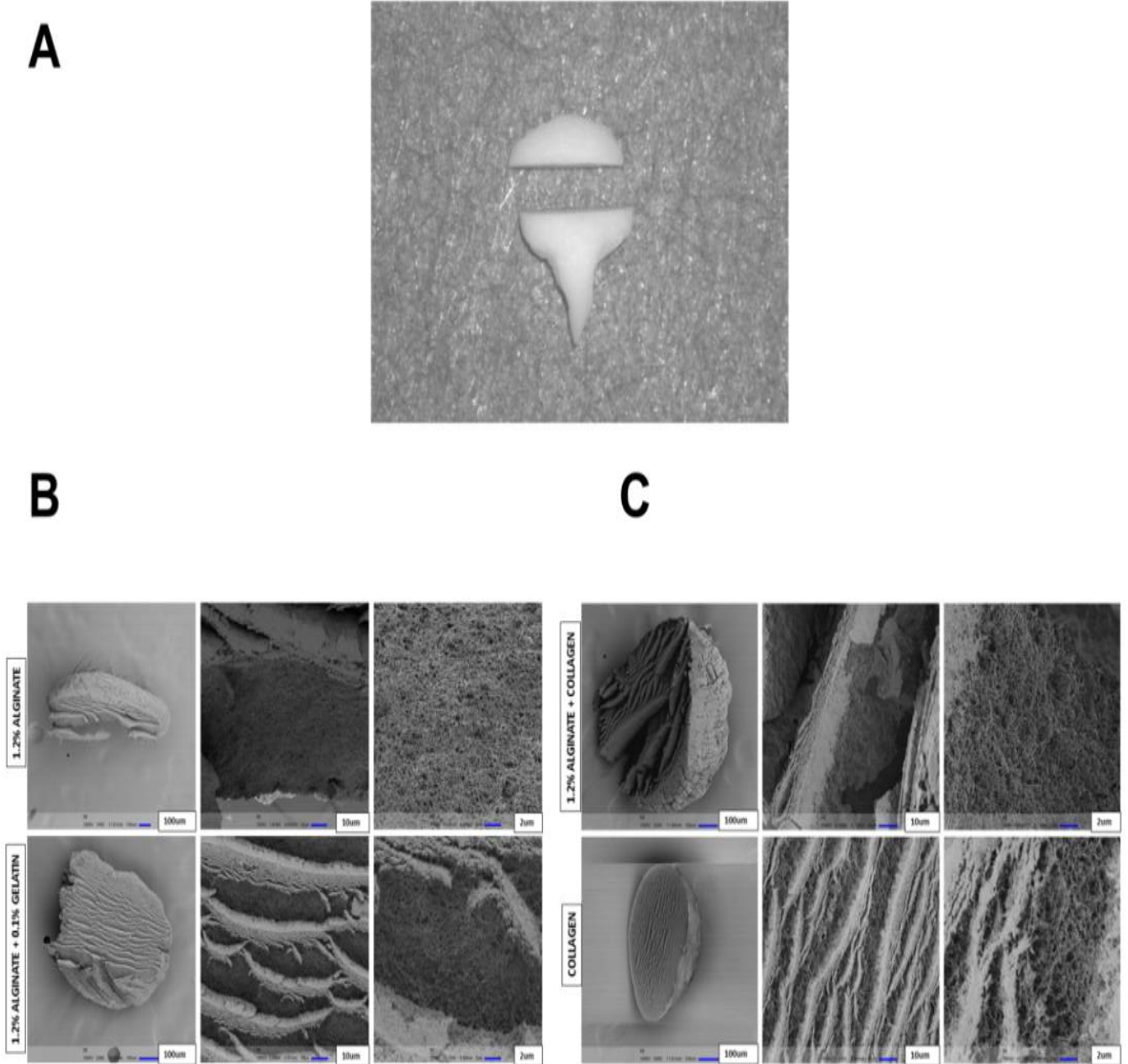


Imagem 3: Corte dos materiais e análise por microscopia eletrônica de varredura. Imagem representativa da tentativa de visualizar a morfologia do núcleo das microcápsulas. (A) Microcápsulas desidratadas após crio-seção visualizadas em lupa estereoscópica. (B e C) A deformação causada pela lâmina de crio-seção.

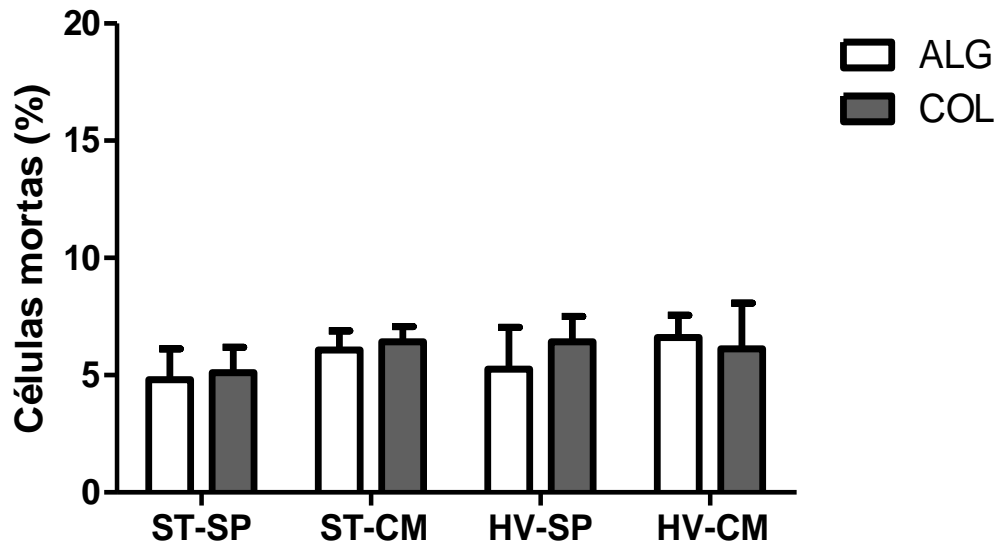


Imagem 4: Viabilidade das células após 11 dias em cultura. Após a extração das células de 20 microcápsulas, a viabilidade foi avaliada utilizando azul de Tripano. Não houve diferença significativa entre os grupos (n = 3).

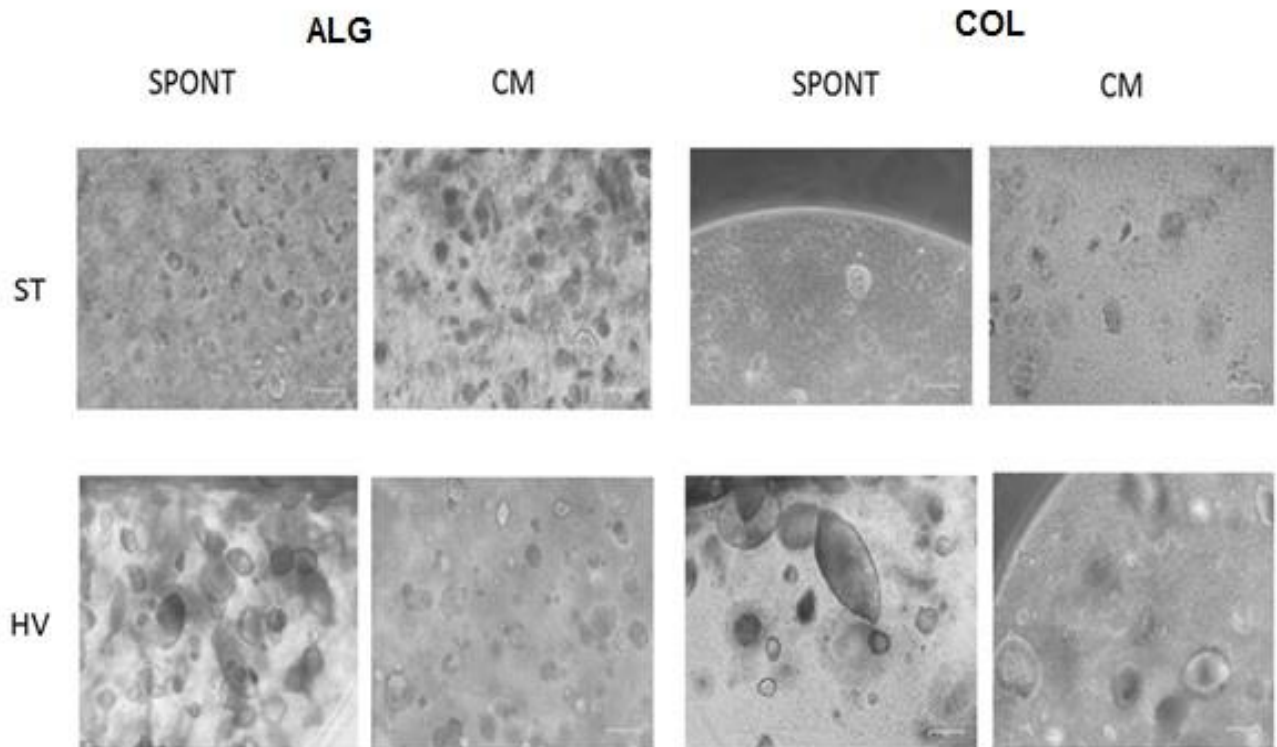


Imagem 5: imagem dos esferoides celulares após 11 dias em cultura. Imagem representativa de todos os grupos testados após 11 dias de protocolo.

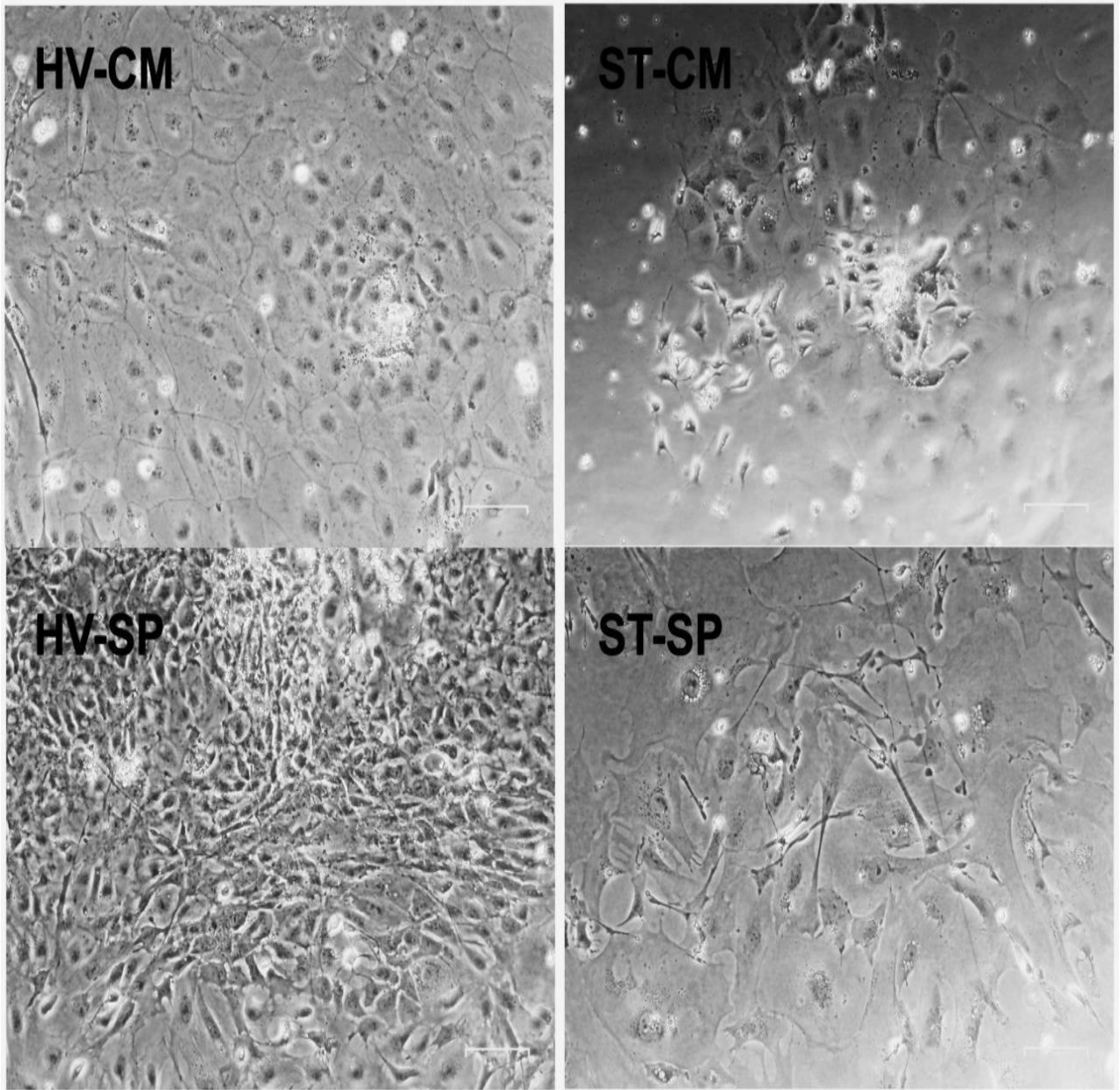


Imagem 6: Imagem representativa da morfologia das células após 15 dias após serem desencapsuladas.