

# Superfície Nunclon™ Vita Thermo Scientific

## Cultura de Células-Tronco Pluripotente Humana Livre de Camada de Sustentação e Matriz Extracelular Utilizando Tratamento de Superfície Nunclon™ Vita e Inibidor de Rho quinase

### Introdução

Em sua essência, uma célula-tronco pluripotente possui capacidade de diferenciação em qualquer célula ou tecido do organismo. Entretanto, o seu processo de crescimento envolve métodos de alta estabilidade e reprodutibilidade. Os métodos convencionais baseiam-se em células de sustentação e uso de proteínas de matriz extracelular para cobertura da superfície de crescimento do material de cultura, e ainda seleção manual ou dissociação enzimática para repiques e cultura celular. Esta nota técnica descreve um método bastante simples para o crescimento de células-tronco pluripotente sem uso de camadas de sustentação ou proteínas de matriz extracelular.

### Métodos

#### Cultura de ESC Humana

Células-tronco embrionárias humanas (ESC) com 49 passagens (linha H1 da WiCELL, USA) foram mantidas com fibroblastos de embrião de camundongo (MEF)-condicionados em superfície Nunclon™ (Thermo Fisher Scientific, Denmark) e incubados com fator de crescimento reduzido Matrigel™ (Becton Dickinson, USA) em diluição de 1:30. As células foram dissociadas da superfície para passagem por meio de tratamento

com 1mg/ml de colagenase, e então semeadas em superfície Nunclon™ Vita com e sem inibidor de Rho quinase diluído em meio, como descrito a seguir.

Cultivo sem inibidor Rho quinase. ESC's H1 foram cultivadas por 4 passagens em meio MEF condicionado em superfície Nunclon™ Vita. As células foram dissociadas da superfície para repique por meio de tratamento com 1mg/ml de colagenase. O tempo padrão para passagem de ESC's H1 foi estabelecido em 4 dias com Matrigel™. Entretanto, células plaqueadas em superfície Nunclon™ Vita teve o seu tempo de crescimento padrão estabelecido em 7 dias de cultura antes de estarem prontas para repique, também sendo observado uma taxa de redução de crescimento espontâneo ao longo das passagens.

Cultivo com inibidor de Rho quinase. ESC's H1 foram cultivadas em meio MEF condicionado suplementado com Rho quinase, Y-27632 (10uM indicação do fabricante; Sigma-Aldrich, USA). As células foram dissociadas da superfície para passagem por meio de tratamento com 1mg/ml de colagenase. Células plaqueadas em meio de crescimento com 1uM de Y-27632 em superfície Nunclon™ Vita estavam prontas para repique

após 4 dias de cultura. As células foram cultivadas dentro da indicação limítrofe de passagens já estabelecida.

#### Caracterização de ESC's Humanas

Presença de colônias e respectivas características morfológicas foram determinadas através de microscopia de contraste de fase, e a olho nú após as colônias serem coradas com cristal violeta a 0,5%.

O potencial de pluripotência celular foi determinado pela presença de marcadores de pluripotência através de técnicas de qRT-PCR para expressão gênica, citometria de fluxo para expressão dos marcadores de superfície celular, e imunofluorescência para proteínas de superfície celular e nuclear.

A estabilidade cariotípica foi determinada por meio de análises citogenéticas de 20 células metafásicas de banda G, e por hibridização fluorescente in situ (FISH) em 200 núcleos interfásicos utilizando sondas para o gene ETV6 BAP (TEL) localizados no cromossomo 12 e centrômero do cromossomo 17.

Contudo, a habilidade de formação de corpos embrionados foi determinado por meio de incubação das ESC's em placa de baixa adesão por dez dias em meio DMEM/F12 com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS).

ESC's humanas poderão ter algumas passagens em superfície Nunclon™ Vita antes da redução espontânea da taxa de crescimento.

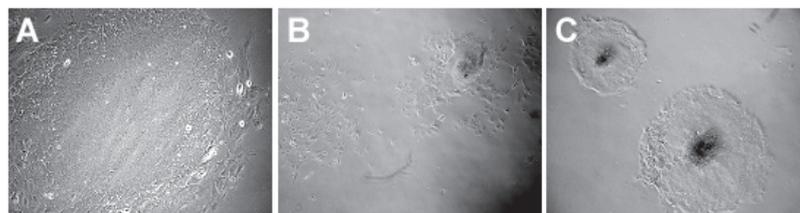


FIGURA 1. Micrografia de ESC's humanas por contraste de fase com duas passagens em diluição de 1:30 de Matrigel (A), superfície de cultura celular padrão (B), superfície Nunclon Vita (C).

O declínio da taxa de crescimento de ESC's humanas em superfície Nunclon Vita não é observado caso o meio de cultura for suplementado com inibidor de Rho quinase Y-27632

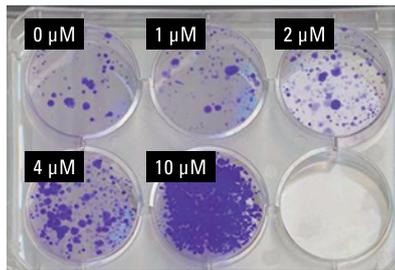


FIGURA 2.

Efeito dose dependente do inibidor de Rho quinase sobre a adesão de células tronco embrionárias humanas em superfície Nunclon Vita. Y-27632 foi adicionado à cultura em uma concentração específica (0, 1, 2, 4, ou 10uM) no momento do plaqueamento. As células foram mantidas a partir do segundo dia em meio contendo 10uM de Y-27632. Dentro de um período de 5 dias foram realizadas trocas diárias do meio de cultura, com subsequente coloração com cristal violeta.

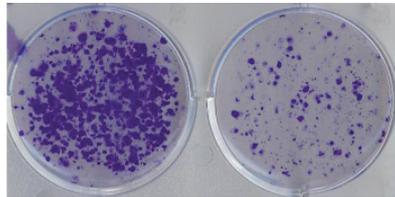


FIGURA 3.

Descolamento de células tronco embrionárias humanas da superfície Nunclon Vita após inativação do inibidor de Rho quinase. Células foram semeadas e cultivadas por 4 dias em meio contendo 10uM de Y-27632 (poço esquerdo) ou Y-27632 foi removido do meio de cultura por 24 horas no terceiro dia (poço direito). Após 4 dias de cultura, as células foram coradas com cristal violeta.

ESC's humanas crescidas em superfície Nunclon Vita na presença de Y-27632 possui cariótipo normal, expressa marcadores de pluripotência, e podem ser diferenciados em corpos embrionários

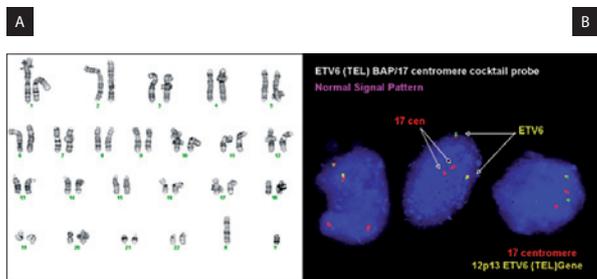


FIGURA 4.

Cariótipo normal (A) e padrão FISH (B) para ESC's humanas após 11 passagens em superfície Nunclon Vita.

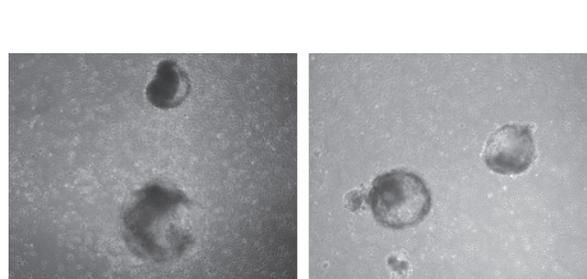
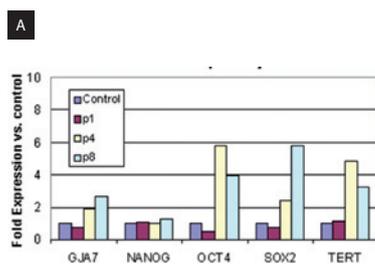


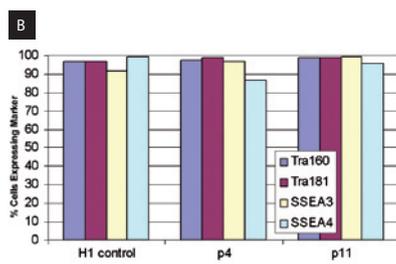
FIGURA 5.

ESC's humanas podem formar corpos embrionados após 11 passagens em superfície Nunclon Vita.

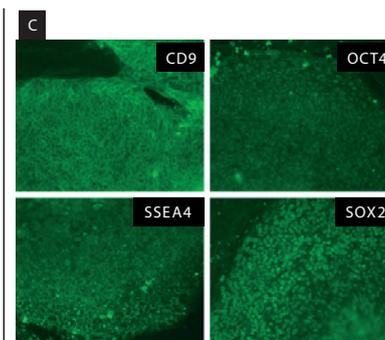
FIGURA 6.



A. Expressão de marcadores de pluripotência de ESC's humanas determinado por qRT-PCR após 1 passagem (p1), 4 passagens (p4), e 8 passagens (p8) sobre a superfície Nunclon Vita.



B. Expressão de marcadores de pluripotência em ESC's humanas determinados por citometria de fluxo após 4 passagens (p4) e 11 passagens (p11) sobre a superfície Nunclon Vita.



C. Expressão de marcadores de pluripotência em ESC's humanas determinados por imunofluorescência após 11 passagens em superfície Nunclon Vita.

## Passagem não enzimática de ESC's humanas por inativação de Y-27632

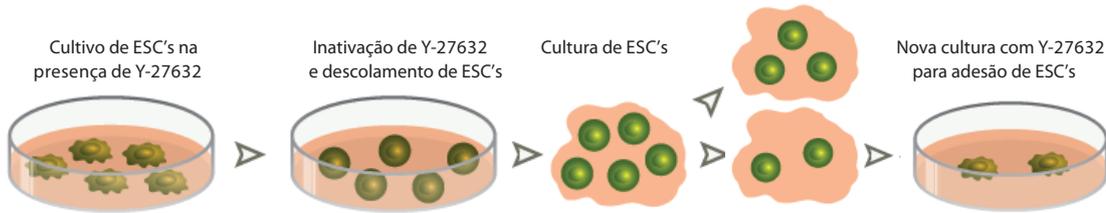


FIGURA 7.

ESC's humanas crescidas na presença de inibidor de Rho quinase poderão ser dissociados da superfície Nunclon Vita através de incubação em meio de crescimento novo, sem inibidor de Rho quinase em período de 15-30 min. As células podem ser mecanicamente dissociadas da placa através de técnicas de pipetagem ou raspagem, brevemente centrifugados, e resuspendidos em meio de crescimento com inibidor de Rho quinase. As ESC's podem ser mecanicamente dissociadas para nova cultura.

### Conclusões

A superfície Nunclon Vita conferiu adesão sem uso de camadas de sustentação e matriz extracelular, com formação e crescimento de colônia de ESC's humanas:

- para algumas passagens em meio condicionado por fibroblasto de embrião de camundongo;

- para diversas passagens em meio condicionado por fibroblastos de embrião de camundongo e suplemento com inibidor de Rho quinase, Y-27632;

ESC's humanas cultivadas com 11 passagens em superfície Nunclon Vita em meio contendo Y-27632 teve cariótipo normal, expressaram marcadores de pluripotência, e podem ser diferenciadas em corpos embrionários.

ESC's humanas poderão ser repicadas sem seleção manual ou enzimática ao inativar o inibidor de Rho quinase presente no meio. As células serão suspensas em superfície Nunclon Vita, seguido por novo plaqueamento na presença de inibidor de Rho quinase.

For research use only

Important information about patents:

Attachment, cultivation and detachment of cells using methods described herein are covered by patent applications WO 2009/105570 and US 12/388,930. A license to use these methods with Nunclon Vita Surface cultureware solely in connection with research is granted with the purchase of Nunclon Vita cultureware.

Inquiries for a license to use these methods for commercial purposes, except for those purposes relating to amelioration of diabetes mellitus, should be sent to: Thermo Fisher Scientific, 81 Wyman Street, Waltham, MA 02451, Attn: Legal Dept.

Inquiries for a license to use these methods directly or indirectly in the amelioration of diabetes mellitus should be sent to: Att. Vice President of BetaLogics Centocor Research & Development, Inc, 145 King of Prussia Road, Radnor, PA 19087, USA.

Particular types of cells, as well as methods for manipulating cells, may be covered by one or more patents held by others. Use of Nunclon Vita cultureware is recommended only for applications which do not violate proprietary rights of others or for which the user has a license or other permission under such proprietary rights.

[www.thermoscientific.com](http://www.thermoscientific.com)

© 2010 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

Austria  
+43 1 801 40 0

Belgium  
+32 53 73 42 41

China  
+86 21 68654588

Denmark  
+45 4631 2000

France  
+33 2 2803 2180

Germany  
+49 6184 90 6940

India  
+91 22 6716 2200

Italy  
+39 02 02 95059 or  
434-254-375

Japan  
+81 3 3816 3355

Netherlands  
+31 76 571 4440

Nordic/Baltic  
countries  
+358 9 329 100

North America  
+1 585-586-8800

Russia/CIS  
+7 (812) 703 42 15

Spain/Portugal  
+34 93 223 09 18

South America  
+1 585 899 7298

Switzerland  
+41 44 454 12 12

UK/Ireland  
+44 870 609 9203

Other Asian countries  
+852 2885 4613

Countries not listed  
+49 6184 90 6940 or  
+33 2 2803 2180

TILSPVITA 0910  
77033