

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**EXPANSÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
CULTIVADAS EM BIORREATOR DE FIBRA OCA.**

**Amanda Mizukami**

SÃO CARLOS

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**EXPANSÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
CULTIVADAS EM BIORREATOR DE FIBRA OCA.**

Amanda Mizukami

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
para a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia.

Orientadores: Prof. Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo  
Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça

SÃO CARLOS  
2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M685ev

Mizukami, Amanda.

Expansão *in vitro* de células-tronco mesenquimais cultivadas em biorreator de fibra oca / Amanda Mizukami. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

144 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Biotecnologia. 2. Célula animal. 3. Células-tronco mesenquimais. 4. Biorreatores. 5. Biorreator de fibra oca. I. Título.

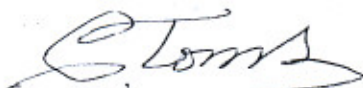
CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

**Amanda Mizukami**

Dissertação de Mestrado submetida  
à Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia


**Aprovado em: 25/08/2011**

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dr. ~~Claudio~~ Claudio Alberto Torres Suazo (Orientador)  
(UFSCar)



---

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga  
(UNESP)



---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Teresa Cristina Zangrolami  
(UFSCar)

## AGRADECIMENTOS

*À minha família: meus pais, pelo que sou, valores adquiridos e amor incondicional; irmã e avó pela compreensão e paciência.*

*Ao Teto pelo apoio em todos os momentos que precisei.*

*Ao André, meu companheiro, pelo amor, dedicação, carinho que acompanhou esta trajetória.*

*Ao professor Cláudio pela orientação, por sempre acreditar no meu potencial e conhecimentos adquiridos.*

*À Cíntia e Marina, companheiras de moradia, pela amizade, companhia, paciência e apoio fraterno em longos anos de amizade.*

*Ao professor Sérgio pela ajuda, idéias e disponibilização de materiais para realização dos experimentos.*

*Aos amigos de laboratório: Ana Carolina, Camilo, Henrique, Sandra, Thaís e principalmente Simone, Marlei e Thaila pelas valiosas contribuições, amizade e apoio.*

*Ao KK e Cíntia que me forneceram idéias e auxiliaram na montagem do biorreator.*

*Aos demais amigos de graduação e pós-graduação dedicados, auxiliando constantemente com saber e amizade.*

*Aos funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto-USP pela ajuda, idéias e conhecimentos compartilhados.*

*Aos funcionários Amadeus, Ademir e Edilson pelo auxílio constante e por fornecer condições para eu dar continuidade no trabalho.*

*Ao CNPQ pela bolsa concedida.*

*“Não quero ter a terrível limitação de quem  
vive apenas do que é passível de fazer sentido.  
Eu não: quero uma verdade inventada.”*

*Clarice Lispector*

## RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células-tronco multipotentes que podem se diferenciar em diversos tipos de tecido, característica que as torna interessantes em aplicações de terapia celular. Além disso, são células dependentes de ancoramento (capacidade de aderir em superfícies), de fácil isolamento e de rápida expansão *in vitro*. As culturas tradicionais de células animais dependentes de ancoramento, geralmente cultivadas em monocamadas, resultam em baixo rendimento de cultivo e de recuperação celular, inviabilizando o uso das CTMs em aplicações terapêuticas. A necessidade de técnicas de cultivo alternativas para expansão de CTMs em larga escala têm levado pesquisadores à utilização de “tecnologia de biorreatores”, na qual tem-se destacado dos biorreatores: frasco spinner com microcarregadores e hollow fiber (fibra oca). Assim, o objetivo deste trabalho foi o de desenvolver uma metodologia de cultivo da linhagem de CTM conhecida como hMSC-TERT em frasco spinner com microcarregadores para posterior inoculação em biorreator de fibra-oca, visando a expansão eficiente e a posterior recuperação das CTMs de tal forma que, preservassem seu potencial de diferenciação para poderem ser utilizadas na terapia celular. Nos cultivos, utilizou-se o microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F em frasco spinner de 100 mL com o meio de cultura  $\alpha$ -MEM com 15% de soro fetal bovino, mantidos em incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C e pH entre 7,2 e 7,4. Nos cultivos em frasco spinner adotaram-se estratégias como suplementação do meio de cultura, trocas de meio de cultura durante o cultivo, adição de reagentes para diminuição de aglomerados de microcarregadores, visando aumentar a produtividade celular para a posterior inoculação em biorreator de fibra oca. A utilização dessas estratégias permitiram aumentar a produtividade celular, obtendo-se como melhor resultado um fator de multiplicação celular (FMC) de 5,79. Contudo, a obtenção de FMC maiores foi drasticamente limitada pela formação de aglomerados de microcarregadores num gel de matriz extracelular. A recuperação celular foi baixa e a análise da manutenção do fenótipo antigênico por citometria de fluxo comprovaram a conservação das características fenotípicas da hMSC-TERT. O biorreator de fibras ocas é uma alternativa em relação aos aglomerados de microcarregadores, pois permite a oxigenação e suprimento adequado de nutrientes. Sendo assim, nos experimentos realizados no biorreator de fibras-ocas utilizou-se o  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% SFB (v/v), 2,0 g/L de glicose, 2,50 mM de glutamina, 2,60 mM de arginina, 0,07 % do antiespumante PPG. As células foram inoculadas após 48 horas de cultivo em frasco spinner em um gel composto por colágeno: ácido hialurônico: ágar (1,5%) na proporção 0,75: 0,037: 0,21 em pH = 7,2-7,4. Assim, o gel resultante foi misturado com meio de cultura  $\alpha$ -MEM na proporção 1:3, para proporcionar melhor aderência nas fibras. O fator de expansão total, ou seja, aquele calculado desde a inoculação do spinner até o final do cultivo no biorreator de fibra oca, foi de 11, 2, que pode ser considerado o maior valor atingido neste trabalho. Convém esclarecer que este fator de expansão ainda pode ser facilmente superado ao se adotarem estratégias de cultivo com trocas mais frequentes de meio de cultura. Esta hipótese é reforçada pelo fato comprovado de os microcarregadores ainda não estarem saturados de células no final do experimento.

## ABSTRACT

The mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent stem cells that can differentiate into various types of tissue, a characteristic that makes them interesting for applications in cell therapy. Moreover, cells are anchorage-dependent (ability to adhere to surfaces), easy isolation and rapid expansion in vitro. The traditional cultures of anchorage-dependent animal cells, usually grown in monolayers, resulting in low crop yield and cell recovery, preventing the use of MSCs in therapeutic applications. The need for alternative farming techniques for expansion of MSCs in a large scale have led researchers to the use of "bioreactor technology," which has been seconded from the bioreactor, spinner flask with microcarriers and hollow fiber (hollow fiber). The objective of this work was to develop a method of cultivation known as mesenchymal stem cell line hMSC-TERT in spinner flasks with microcarriers for subsequent inoculation into hollow-fiber bioreactor, aiming at the efficient expansion and the subsequent recovery of MSCs so that preserve their differentiation potential in order to be used in cell therapy. In cultured, we used the microcarrier Pronectin® F 100 mL spinner flasks with culture medium  $\alpha$ -MEM with 15% fetal calf serum, kept in a CO<sub>2</sub> incubator at 37 ° C and pH between 7.2 and 7.4. In cultures in spinner flasks were adopted strategies such as supplementation of the culture medium, exchanges of culture medium during cultivation, addition of reagents to reduce clusters of microcarriers, to increase productivity for the subsequent cell inoculation in hollow fiber bioreactor. The use of these strategies has increased productivity cell, achieving a best result of cell multiplication factor (MCF) of 5.79. However, obtaining higher FMC was drastically limited by the formation of clusters of microcarriers in a gel matrix. The cell recovery was low maintenance and analysis of the antigenic phenotype by flow cytometry confirmed the conservation of phenotypic characteristics of hMSC-TERT. The hollow fiber bioreactor is an alternative to the clusters of microcarriers, it allows oxygenation and adequate supply of nutrients. Thus, in experiments carried out in hollow-fiber bioreactor used the  $\alpha$ -MEM supplemented with 15% FBS (v / v), 2.0 g / L glucose, 2.50 mM glutamine, 2.60 mM arginine, 0.07% antifoam PPG. The cells were inoculated after 48 hours of cultivation in spinner flasks in a gel composed of collagen, hyaluronic acid, agar (1.5%) in the proportion 0.75: 0.037: 0.21 at pH 7.2 to 7.4 . Thus, the resulting gel was mixed with culture medium in  $\alpha$ -MEM 1:3 ratio, to provide better grip on the fibers. The total expansion factor, ie the one calculated from the inoculation of the spinner to the end of cultivation in hollow fiber bioreactor was 11, 2, which can be considered the greatest value achieved in this work. It is clear that this expansion factor can still be easily overcome by adopting strategies to grow more frequent replacement of culture medium. This hypothesis is strengthened by the proven fact that the microcarriers are not yet saturated with cells at the end of the experiment.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Padrão de curva de crescimento para células animais em cultura. A fase lag (A) representa um período de adaptação da cultura seguida por uma fase de proliferação exponencial (B), até alcançar uma fase de platô ou estacionária (C), na qual não há um aumento na concentração celular. A cultura atinge uma fase de declínio (D), quando as células começam a morrer.....	9
<b>Figura 2</b> - Esquema da via glicolítica e do ciclo das pentoses fosfato (ALTAMIRANO <i>et al.</i> , 2008). .....	11
<b>Figura 3</b> - Ilustração do potencial de diferenciação da célula-tronco embrionária. Estão exemplificados apenas alguns dos 220 diferentes tipos celulares do corpo humano em que é capaz de se diferenciar (JENSEN <i>et al.</i> , 2009).....	14
<b>Figura 4</b> - Processo mesengênico (CAPLAN e BRUDER, 2001).....	17
<b>Figura 5</b> - Diagrama simplificado do método por fluorescência na seleção celular (PUNTOS <i>et al.</i> , 2007).....	18
<b>Figura 6</b> - Ação da onda no crescimento celular no biorreator wave (GE Healthcare). .....	24
<b>Figura 7</b> - Frasco spinner utilizado para cultivo de células animais (WHEATON). .....	24
<b>Figura 8</b> – Microscopia eletrônica de varredura do microcarregador Cytodex-1 colonizado com célula suína em 72 horas de cultivo (GE HEALTHCARE). .....	26
<b>Figura 9</b> – Microscopia eletrônica de varredura do microcarregador Cytoline-1 colonizado com célula CHO (AMERSHAN BIOSCIENCES).....	26
<b>Figura 10</b> - Esquema típico do sistema de perfusão utilizando dispositivo de retenção celular externo (CATAPANO <i>et al.</i> , 2008). .....	29
<b>Figura 11</b> - Ilustração das células crescendo ao redor das fibras ocas no EEC e o fluxo de nutrientes e de gases em um biorreator de fibra oca (WHITFORD e CADWELL, 2009). .....	30
<b>Figura 12</b> - Ilustração geral do funcionamento do biorreator de fibra oca.....	30
<b>Figura 13</b> - Esquema dos diferentes modos de operação do biorreator de fibra oca: (a) fluxo no módulo apenas uma vez, (b) continuamente recirculando e (c) contínua adição de meio de cultura fresco e remoção de meio cultivado contendo células (CATAPANO <i>et al.</i> , 2008).....	31
<b>Figura 14</b> - Biorreator de fibra oca utilizada no experimento com microcarregador Cytodex-1 e fibroblastos da medula óssea, sendo que (1) cilindro de policarbonato, (2) portas para EIC, (3) portas para EEC e (4) retirada de amostras.....	35
<b>Figura 15</b> – Número de células quantificadas pelo corante Alamar blue, sendo que: não-perfusão e perfusão. ....	36
<b>Figura 16</b> - Microscopia eletrônica de varredura do sistema do biorreator de fibra oca, sendo que M = microcarregador, C = colágeno e HF = fibras. ....	36
<b>Figura 17</b> - Ilustração do biorreator de fibra oca utilizado no experimento.....	37
<b>Figura 18</b> - Biorreator de fibra oca utilizada no experimento de cultivo de linhagens leucêmicas. ....	38
<b>Figura 19</b> – Gráfico de crescimento celular obtido no experimento, sendo que crescimento celular, produção de lactato e consumo de glicose. ....	38
<b>Figura 20</b> - Princípio da engenharia de tecidos. A) material biocompatível, B) células adequadas (célula-tronco) e C) substâncias bioativas para estimular a diferenciação específica (CSAKI <i>et al.</i> , 2008). ....	40
<b>Figura 21</b> - Representação da reação enzimática em que se fundamenta o método do MTT. 50	
<b>Figura 22</b> - Representação das reações enzimáticas envolvidas no método da LDH.....	51
<b>Figura 23</b> - Montagem do biorreator de fibra oca .....	54
<b>Figura 24</b> - Representação esquemática do procedimento de cultura padrão de células-tronco mesenquimais. ....	56

<b>Figura 25</b> - Representação esquemática do procedimento de cultura padrão em biorreator de fibra oca de células-tronco mesenquimais. ....	58
<b>Figura 26</b> – Sistema montado para cultivo de hMSC-TERT com microcarregador Pronectin <sup>®</sup> F no biorreator de fibra oca. ....	59
<b>Figura 27</b> – Sistema montado para cultivo de hMSC-TERT com microcarregador Pronectin <sup>®</sup> F no biorreator de fibra oca. ....	60
<b>Figura 28</b> - Resultados obtidos no experimento 1 com a linhagem hMSC-TERT. ....	63
<b>Figura 29</b> - Imagens de microscopia ótica do microcarregador Pronectin <sup>®</sup> F com células no decorrer do experimento 1.....	65
<b>Figura 30</b> - Resultados obtidos no experimento 2 com a linhagem hMSC-TERT. ....	66
<b>Figura 31</b> - Imagens de microscopia ótica do microcarregador Pronectin <sup>®</sup> F com células no decorrer do experimento 2.....	68
<b>Figura 32</b> - Resultados obtidos no experimento 3 com a linhagem hMSC-TERT. ....	70
<b>Figura 33</b> - Comparação da produção de ácido láctico (mM) entre os experimentos E1 (experimento1), E2 (experimento 2) e E3 (experimento 3). ....	71
<b>Figura 34</b> - Imagens de microscopia ótica do microcarregador Pronectin <sup>®</sup> F com células no decorrer do experimento 3.....	72
<b>Figura 35</b> - Resultados obtidos no experimento 4 com a linhagem hMSC-TERT.....	74
<b>Figura 36</b> - Imagens de microscopia ótica do microcarregador Pronectin <sup>®</sup> F com células no decorrer do experimento 4. ....	75
<b>Figura 37</b> - Resultados das análises de citometria de fluxo para a linhagem hMSC-TERT recuperada do microcarregador Pronectin <sup>®</sup> F após o cultivo em frasco spinner no experimento 4. ....	76
<b>Figura 38</b> - Resultados obtidos no experimento 5 com a linhagem hMSC-TERT. ....	77
<b>Figura 39</b> - Imagens de microscopia ótica do microcarregador Pronectin <sup>®</sup> F com células no decorrer do experimento 5.....	78
<b>Figura 40</b> - Imagens de microscopia ótica baseada em fluorescência do microcarregador Pronectin <sup>®</sup> F com células no decorrer do experimento 5.....	79
<b>Figura 41</b> - Imagens de microscopia eletrônica de varredura do microcarregador Pronectin <sup>®</sup> F com CTMs do experimento 5. ....	79
<b>Figura 42</b> - Esquema da inoculação celular do biorreator de fibra oca. ....	81
<b>Figura 43</b> – Valores de pH, glicose (g/L) e % oxigênio dissolvido durante o experimento 6.82	
<b>Figura 44</b> - Resultados obtidos no experimento 6 com a linhagem hMSC-TERT. ....	83
<b>Figura 45</b> - Sedimentação dos microcarregadores colonizados com células hMSC-TERT durante o experimento 6 no biorreator de fibra oca.....	84
<b>Figura 46</b> - Resultados das análises de citometria de fluxo para a linhagem hMSC-TERT recuperada do microcarregador Pronectin <sup>®</sup> F após o cultivo em biorreator de fibra oca no experimento 6. ....	86
<b>Figura 47</b> – Células imobilizadas no gel e distribuídas uniformemente no biorreator de fibra oca. ....	87
<b>Figura 48</b> - Valores de pH, glicose (g/L) e % oxigênio dissolvido durante o experimento 7. A seta TM indica troca de meio de cultura. ....	88
<b>Figura 49</b> - Resultados obtidos no experimento 7 com a linhagem hMSC-TERT. ....	89
<b>Figura 50</b> - Resultados da estimativa do crescimento celular durante o cultivo da linhagem hMSC-TERT no biorreator de fibra oca do experimento 7.....	92
<b>Figura 51</b> - Imagens de microscopia ótica baseada em fluorescência do microcarregador Pronectin <sup>®</sup> F com células no final (193 horas) do experimento do biorreator de fibra oca. ....	93
<b>Figura A1</b> - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento1. Equação da reta $y = ax + b$ , ( $a = 6,33 \times 10^{-7}$ e $b = -0,065$ ), com coeficiente de correlação de 0,9960. ....	109

<b>Figura A2</b> - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento 2. Equação da reta $y = ax + b$ , ( $a = 7,780 \times 10^{-7}$ e $b = -0,014$ ), com coeficiente de correlação de 0,9944.....	109
<b>Figura A3</b> - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento 3. Equação da reta $y = ax + b$ , ( $a = 9,152 \times 10^{-7}$ e $b = -0,016$ ), com coeficiente de correlação de 0,995. ....	110
<b>Figura A4</b> - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento 4. Equação da reta $y = ax + b$ , ( $a = 9,645 \times 10^{-7}$ e $b = -0,0219$ ), com coeficiente de correlação de 0,9823...	110
<b>Figura A5</b> - Curva padrão do método do LDH (kit Sigma) para o experimento 4. Equação da reta $y = ax + b$ , ( $a = 1,755 \times 10^{-6}$ e $b = -0,01032$ ), com coeficiente de correlação de 0,9968.	111
<b>Figura A6</b> - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento 5. Equação da reta $y = ax + b$ , ( $a = 8,246 \times 10^{-7}$ e $b = -0,01038$ ), com coeficiente de correlação de 0,9933.	111
<b>Figura A7</b> - Curva padrão do método do LDH (kit Sigma) para o experimento 5. Equação da reta $y = ax + b$ , ( $a = 5,693 \times 10^{-6}$ e $b = 0,000308$ ), com coeficiente de correlação de 0,997. .	112
<b>Figura A8</b> - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento 6. Equação da reta $y = ax + b$ , ( $a = 8,9815 \times 10^{-7}$ e $b = -0,02844$ ), com coeficiente de correlação de 0,99946. ....	112
<b>Figura A9</b> - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento 7. Equação da reta $y = ax + b$ , ( $a = 7,320 \times 10^{-7}$ e $b = -0,05053$ ), com coeficiente de correlação de 0,99725. ....	113
<b>Figura B1</b> - Curva padrão para análise de amônio referente ao experimento 1. Equação da reta $y = ax + b$ , ( $a = 2,84919$ e $b = 0,15296$ ) com coeficiente de correlação de 0,9961.....	114
<b>Figura B2</b> - Curva padrão para análise de amônio referente ao experimento 2. Equação da reta $y = ax + b$ , ( $a = 4,3118$ e $b = 0,21249$ ) com coeficiente de correlação de 0,9968.....	114
<b>Figura B3</b> - Curva padrão para análise de amônio referente ao experimento 3. Equação da reta $y = ax + b$ , ( $a = 2,3116$ e $b = 0,18357$ ) com coeficiente de correlação de 0,9760.....	115

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais eventos históricos no cultivo de célula animal. ....	8
<b>Tabela 2</b> - Principais diferenças entre célula-tronco adulta (CTA) e célula-tronco embrionária (CTE) (BONGSO e RICHARDS, 2004). ....	16
<b>Tabela 3</b> - Perfil fenotípico de CTMs (POUNTOS et al., 2007). ....	19
<b>Tabela 4</b> - Classificação dos biorreatores de acordo com o modo de operação (GODARA et al., 2008).....	23
<b>Tabela 5</b> - Microcarregadores comerciais disponíveis e seus fabricantes.....	25
<b>Tabela 6</b> - Cultivos de células-tronco com microcarregadores em frasco spinner encontrados na literatura.....	27
<b>Tabela 7</b> – Características e vantagens em cultivos com o biorreator de fibra oca (WHITFORD e CADWELL, 2009). ....	33
<b>Tabela 8</b> - Composição do meio de cultura $\alpha$ -MEM e suplementos utilizados para o cultivo de células-tronco mesenquimais neste trabalho. ....	45
<b>Tabela 9</b> - Solução de PBS preparada no laboratório e utilizada nesta pesquisa. ....	45
<b>Tabela 10</b> - Características do microcarregador Pronectin <sup>®</sup> F (SIGMA-ALDRICH). ....	46
<b>Tabela 11</b> – Etapas para avaliar a capacidade de diferenciação da linhagem hMSC-TERT em osteócitos e adipócitos após o cultivo m frasco spinner.....	53
<b>Tabela 12</b> – Resumo dos experimentos realizados em frasco spinner.....	57
<b>Tabela 13</b> – Variação da agitação (rpm) com o tempo (hrs.). ....	66
<b>Tabela 14</b> - Resumo dos experimentos realizados. ....	80
<b>Tabela C1</b> - Valores de pH, porcentagem de CO <sub>2</sub> na incubadora e volume de cultivo referentes ao experimento 1.....	116
<b>Tabela C2</b> - Valores de aminoácidos referentes ao experimento 1. ....	117
<b>Tabela C3</b> - Valores de aminoácidos, glicose, ácido lático e amônia referentes ao experimento 1. ....	117
<b>Tabela C4</b> - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Pronectin <sup>®</sup> F no experimento 1. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT. ....	118
<b>Tabela C5</b> - Valores de pH, porcentagem de CO <sub>2</sub> na incubadora e volume de cultivo referentes ao experimento 2.....	119
<b>Tabela C6</b> - Valores de aminoácidos referentes ao experimento 2. ....	120
<b>Tabela C7</b> - Valores de aminoácidos, glicose, ácido lático e amônia referentes ao experimento 2. ....	121
<b>Tabela C8</b> - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Pronectin <sup>®</sup> F no experimento 2. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT. ....	122
<b>Tabela C9</b> - Valores de pH, porcentagem de CO <sub>2</sub> na incubadora e volume de cultivo referentes ao experimento3. ....	123
<b>Tabela C10</b> - Valores de aminoácidos referentes ao experimento 3.....	124
<b>Tabela C11</b> - Valores de aminoácidos, glicose, ácido lático e amônia referentes ao experimento 3. ....	125
<b>Tabela C12</b> - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Pronectin <sup>®</sup> F no experimento 3. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT. ....	126
<b>Tabela C13</b> - Valores de pH, porcentagem de CO <sub>2</sub> na incubadora e volume de cultivo referentes ao experimento 4.....	127
<b>Tabela C14</b> - Valores de aminoácidos referentes ao experimento 4.....	128

<b>Tabela C15</b> -Valores de aminoácidos, glicose e ácido láctico referentes ao experimento 4.	129
<b>Tabela C16</b> - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Pronectin <sup>®</sup> F no experimento 4. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT. ....	130
<b>Tabela C17</b> - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Pronectin <sup>®</sup> F no experimento 4. Os resultado para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do LDH. ....	131
<b>Tabela C18</b> - Valores de pH, porcentagem de CO <sub>2</sub> na incubadora e volume de cultivo referentes ao experimento 5.....	132
<b>Tabela C19</b> - Valores de aminoácidos referentes ao experimento 5.....	133
<b>Tabela C20</b> - Valores de aminoácidos, glicose e ácido láctico referentes ao experimento 5. ....	134
<b>Tabela C21</b> - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Pronectin <sup>®</sup> F no experimento 5. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT. ....	135
<b>Tabela C22</b> - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Pronectin <sup>®</sup> F no experimento 5. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do LDH. ....	136
<b>Tabela C23</b> - Valores de pH, porcentagem de CO <sub>2</sub> na incubadora e volume de cultivo referentes ao experimento 6 em frasco spinner. ....	137

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mAb: Anticorpos Monoclonais;

ATP: Adenosina Trifosfato;

BPM: Boas Práticas de Manufatura;

CHO: *Chinese Hamster Ovary*;

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

CTAs: Células-Tronco Adultas;

CTEs: Células-Tronco Embrionárias;

CTMs: Células-Tronco Mesenquimais;

CTs: Células-Tronco;

DMEM: *Dubelco's Modified Essential Medium*;

DMSO: Dimetilsulfóxido;

EEC: Espaço Extra-Capilar;

EIC: Espaço Intra-Capilar;

EGF: *Epidermal Growth Factor*;

EMEM: *Eagle Minimum Essential Medium*;

FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorting*;

FGF: *Fibroblast Growth Factor*;

G6P: Glicose-6-fosfato;

HIV: *Human immunodeficiency virus*;

hMSC-TERT: Linhagem *human Mesenchymal Stem Cells* imortalizada pela *Telomerase Reverse Transcriptase*;

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*;

LDH: Lactato Desidrogenase;

MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio;

MWCO: *Molecular Weight Cut Off*;

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo;

NGF: *Nervous Growth Factor*;

PBS: *Phosphate Buffer Saline*;

PCR: *Polymerase Chain Reaction*;

PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor*;

PL: *Platelet Lysates*;

PPC: Ciclo das Pentoses Fosfato

RTA: Ruptura no Tendão de Aquiles;

RWV: *Rotating-Wall Vessel*;

SFB: Soro Fetal Bovino;

TAC: Transplante Autólogo de Condrócito;

TCA: Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos;

TERT: *Telomerase Reverse Transcriptase*;

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	6
3.1 Tecnologia de cultivo de células animais .....	6
3.2 Crescimento celular .....	9
3.3 Metabolismo de células de mamíferos em cultura .....	10
3.4 Células-Tronco (CT) .....	12
3.5 Células-Tronco Embrionárias (CTEs).....	14
3.6 Células-Tronco Adultas (CTAs) .....	15
3.7 Células-tronco Mesenquimais (CTMs) .....	16
3.7.1 Definição .....	17
3.7.2 Fontes de célula-tronco mesenquimal .....	17
3.7.3 Isolamento.....	18
3.7.4 Expansão.....	19
3.7.4.1 Número de passagens de CTMs .....	19
3.7.4.2 Meio de cultura .....	20
3.7.4.3 Fatores de crescimento .....	21
3.7.4.4 Biorreatores.....	22
3.7.5 hMSC-TERT.....	39
3.7.6 Aplicações terapêuticas .....	39
3.7.6.1 CTMs nos defeitos ósseos .....	40
3.7.6.2 CTMs nos defeitos condrogênicos .....	41
3.7.6.3 CTMs na engenharia do tendão.....	42
3.8 Comentários sobre a revisão bibliográfica .....	43
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 Material.....	44
4.1.1 Célula-tronco mesenquimal: preservação e condições de cultivo .....	44
4.1.2 Meio de cultura .....	44
4.1.3 Solução tampão de fosfato PBS ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> ).....	45
4.1.4 Corante .....	45
4.1.5 Tryple™ Express .....	46
4.1.6 Microcarregador.....	46
4.1.7 Antiaderente Sigmacote® .....	46
4.1.8 Reagente MTT para quantificação de células viáveis .....	46
4.1.9 Reagente Lactato Desidrogenase (LDH) para quantificação de células viáveis .....	47
4.1.10 Reagente manose.....	47
4.1.11 Cola epóxi .....	47
4.1.12 Frascos de cultura.....	47
4.1.13 Frasco Spinner.....	47
4.1.14 Biorreator de fibra oca.....	48
4.2 Métodos analíticos .....	48
4.2.1 Preservação das células .....	48
4.2.2 Descongelamento de células e ativação .....	48
4.2.3 Análise de densidade e viabilidade celular .....	49
4.2.4 Determinação da densidade celular total pelo método baseado no MTT .....	50
4.2.5 Determinação da Densidade Celular pelo Método baseado na LDH.....	50
4.2.6 Análise de glicose e ácido lático .....	51
4.2.7 Análise de aminoácidos .....	51
4.2.8 Análise de amônia .....	52



4.2.9 Análise de Citometria de Fluxo .....	52
4.2.10 Diferenciação Celular .....	53
4.2.11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	54
4.2.12 Montagem do biorreator de Fibra Oca (Hollow fiber) .....	54
4.2.13 Procedimento experimental .....	56
4.2.14 Tratamento dos Dados Experimentais .....	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	63
5.1 Experimento 1 .....	63
5.2 Experimento 2 .....	65
5.3 Experimento 3 .....	69
5.4 Experimento 4 .....	73
5.5 Experimento 5 .....	77
5.6 Experimento 6 .....	80
5.7 Experimento 7 .....	86
6 CONCLUSÕES .....	94
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	95
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	96
APÊNDICE A – Curva padrão referente aos métodos de MTT e LDH para os experimentos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7. ....	109
APÊNDICE B: Curvas de calibração para análise de amônio através do método eletrodo íon seletivo. ....	114
APÊNDICE C – Tabelas dos valores do pH do meio de cultivo, porcentagem de CO <sub>2</sub> na incubadora, volume do cultivo, concentração de aminoácidos, de glicose, de ácido lático e de amônia, de números de células em suspensão e células aderidas no microcarregador para os experimentos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7. ....	116



## 1 INTRODUÇÃO

Desde os experimentos realizados há mais de dez anos com modelos animais, os estudos com células-tronco têm feito enormes avanços no sentido de torná-las uma opção de tratamento clinicamente aceitável para vários tipos de doenças como regeneração do sistema hematopoiético, doenças crônico-degenerativas, doenças auto-imunes e na engenharia de tecidos (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Uma abundância de dados pré-clínicos em doenças como infarto do miocárdio (PLEWKA *et al.*, 2009), doença de Crohn's (GARCIA-OLMO *et al.*, 2009), osteogênese imperfeita (PANARONI *et al.*, 2009), doença do enxerto contra o hospedeiro (LEBLANC *et al.*, 2008) e acidente vascular cerebral (LEE *et al.*, 2010) tem demonstrado segurança, viabilidade e eficácia, justificando a recente incorporação de técnicas que utilizam células-tronco na terapia celular.

A terapia celular consiste em restaurar a função de um órgão ou tecido para tratar doenças e lesões através da substituição de tecidos doentes por células saudáveis (ZATZ, 2004). Entretanto, a utilização da terapia celular em pacientes necessita satisfazer os padrões de boas práticas de manufatura (BPM) e órgãos regulatórios. Os princípios de BPM são aplicados na manufatura, que asseguram alta qualidade e mínimo risco de contaminação no produto final (BOSSE *et al.*, 2000). Ainda assim, é de extrema importância um vasto conhecimento e entendimento do processo de cultura *in vitro*, sendo necessário lançar mão de uma gama de disciplinas para aplicar um processo de fabricação definido e técnicas de engenharia para um desenvolvimento bem caracterizado e economicamente viável de processos de cultura *in vitro* para a terapia celular poder ser utilizada como recurso médico contra doenças graves (THOMAS *et al.*, 2008). Como parte dessa expansão da terapia celular, consideráveis esforços têm sido dedicados ao uso de células-tronco mesenquimais (CTMs) (KIM *et al.*, 2010; RASTEGAR *et al.*, 2010; MAUMUS *et al.*, 2011; IQBAL *et al.*, 2011; DAZZI E KRAMPERA, 2011).

As células-tronco mesenquimais (CTMs) foram originalmente localizadas na medula óssea de adultos e podem se diferenciar em tecido conjuntivo, esquelético, ósseo, cartilaginoso e adiposo (CAPLAN e BRUDER, 2001). As CTMs podem ainda dar origem a músculo sarcomérico (esquelético e cardíaco), células endoteliais, e algumas células de origem não-mesodérmica, como hepatócitos e células neurais (DEANS e MOSELEY, 2000). Além disso, são células dependentes de ancoramento (capacidade de aderir em superfícies), de fácil isolamento e de rápida expansão *ex vivo* (DAI *et al.*, 2011). Essas características

associadas ao potencial de alterar doenças patológicas através de secreção de citocinas, imunomodulação e interação direta célula-célula, e devido ao grande potencial para terapia celular, as CTMs tornaram-se o primeiro tipo de célula-tronco a ser utilizada na medicina regenerativa (RASTEGAR *et al.*, 2010).

Porém, a quantidade de CTMs encontrada nos tecidos é baixa (de 0,00001 à 0,0002%) e não se sabe ao certo como diferenciá-las em tecidos específicos para utilização na terapia celular (ZATZ, 2004). Isso tem sido a principal motivação dos pesquisadores, visando o entendimento do processo de diferenciação, aspectos morfológicos e expansão em sistemas de cultivos adequados visando a utilização das CTMs em terapia celular.

Apesar do notável interesse no desenvolvimento de tecnologias de cultivo de células-tronco, existe pouca informação bibliográfica sobre técnicas e equipamentos para sua expansão *in vitro* em larga escala. Grande parte da produção científica mundial nessa área está concentrada nos últimos oito anos (2003-2011), período em que vários estudos (WU *et al.*, 2003; STUTE *et al.*, 2004; FRAUENSCHUH *et al.*, 2007; PHILLIPS *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2009; EIBES *et al.*, 2010; BOO *et al.*, 2011) têm avaliado a expansão e/ou diferenciação de células-tronco embrionárias e adultas usando vários tipos de biorreatores (MARTIN *et al.*, 2004; KING e MILLER, 2007; GODARA *et al.*, 2008). Os biorreatores são equipamentos que garantem um ambiente físico-químico (pH, temperatura, teor de oxigênio dissolvido) homogêneo para toda a população celular, evitando a existência de gradientes drásticos que podem resultar na morte não desejada das células (CHICO, 2008).

Assim, é necessário o desenvolvimento de técnicas de cultivo em biorreatores apropriados para expansão de um estoque básico (suficientes para serem utilizadas em terapia celular) de células-tronco com sistemas de cultivo alternativos que permitam controle do equilíbrio ácido-base (pH) do meio de cultivo, controle de temperatura, troca de gases que permita um suprimento adequado de oxigênio (O<sub>2</sub>), assim como a eliminação do excesso de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), suprimento de nutrientes (meios de cultivo com formulação adequada), suprimento de suporte para adesão celular (células aderentes) e manutenção da assepsia, garantindo assim, maior produtividade celular (CHICO *et al.*, 2008).

Frascos spinner (recipiente de vidro ou plástico com um agitador magnético central e braços laterais para adição e remoção de meio e células) juntamente com microcarregadores oferecem diversas vantagens como: maior controle em cultura homogênea, simplicidade e facilidade no manuseamento e baixo risco de contaminação. Os

microcarregadores são partículas geralmente esféricas, que servem como suporte de adesão em cultivos de células dependentes de ancoramento. Podem ser feitos de diversos materiais como celulose, dextrana, vidro, poliestireno, colágeno ou gelatina. Os microcarregadores oferecem a vantagem de fornecer uma grande área superficial para crescimento celular durante a proliferação de uma cultura homogênea em suspensão (SCHOP *et al.*, 2008).

Diversos estudos utilizando frasco spinner com microcarregadores têm sido utilizados com células-tronco embrionária humana (FERNANDES *et al.*, 2009; PHILLIPS *et al.*, 2008; PHILLIPS *et al.*, 2008), células-tronco mesenquimais (FRAUENSCHUH *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007; WEBER *et al.*; 2007; SCHOP *et al.*; 2008; EIBES *et al.*, 2010, BOO *et al.*; 2011) e células-tronco adultas (SERRA *et al.*, 2009), porém, com resultados de expansão celular ainda modestos. Alguns são proclamados como excelentes para expansão com célula-tronco mesenquimal, mas esta questão é controversa pois alguns possuem na sua composição ingredientes de origem animal (risco de transmissão de doenças, contaminação) ou apresentam pequenos rendimentos na etapa de recuperação celular (SANCHES, 2010), dificultando sua utilização nas aplicações de terapia celular. Nessas avaliações comparativas, o microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F apresenta vantagens que o tornam muito interessante na expansão de CTMs como não ter componente de origem animal na sua formulação e ser eletricamente neutro. Mais importante ainda é o dado fornecido por Sato *et al.* (2007), após avaliarem o polímero comercial Pronectin<sup>®</sup>F, descobrindo que a utilização desse material como superfície aderente não estimula a diferenciação celular, como acontece com outros materiais similares.

Outra alternativa da engenharia para suprir limitações de não homogeneidade que resultam em gradientes de concentração (ex: pH, oxigênio dissolvido e metabólitos) no meio de cultivo (PORTNER *et al.*, 2005), foi a utilização do biorreator hollow fiber, que traduzindo para o português significa fibra oca. O biorreator de fibras ocas é um sistema que tem sido amplamente utilizado em cultura de célula animal para diversos fins, porém não existem na literatura trabalhos que relatam seu uso com células-tronco. De forma resumida e básica, o biorreator de fibras ocas consiste de um cilindro composto de membranas semipermeáveis na forma de capilares dos mais diversos materiais, denominado EIC (espaço intra-capilar) confinadas dentro de uma carcaça cilíndrica, pelo qual o meio de cultura flui em seu interior. As fibras são fabricadas de diversos materiais, tais como ésteres de celulose e polissulfona, e o caráter poroso das mesmas, permite a troca de nutrientes e metabólitos. As moléculas de glicose e amônia (baixa massa molar) podem mover-se livremente através dos

poros das fibras. O espaço extra-capilar (EEC), entre os capilares e a carcaça cilíndrica é, normalmente, o local onde as células proliferam em condições parecidas as de seu ambiente fisiológico no tecido de origem. As células são inoculadas no EEC e crescem nessa região (CHICO, 2008). O funcionamento detalhado biorreator de fibra oca será explicado no item 3.7.4.4.3.

Assim, a população celular cresce no EEC do cartucho de fibras ocas ao receber os nutrientes provenientes do meio intracapilar que se difundem através das fibras do biorreator. Os produtos metabólicos inibitórios (gerados como consequência do crescimento celular), difundem-se na direção oposta e se diluem no meio que circula no EIC. O biorreator de fibra oca apresenta inúmeras vantagens como: alta concentração de produto (acúmulo de produto no espaço extra-capilar (EEC) e não há diluição do produto como em sistemas homogêneos); cultura celular protegida do estresse mecânico (o fluxo de meio de cultura é separado das células por uma membrana capilar); altas densidades celulares ( $\geq 10^7$ - $10^8$  cél/mL); a cultura celular é mantida em um ambiente fisiológico apropriado permitindo suprimento de nutrientes e remoção de metabólitos (DAVIS, 2007).

Os trabalhos referentes a expansão de células-tronco mesenquimais em biorreatores são muito incipientes e as informações bibliográficas mostram baixos fatores de expansão celulares e dificuldades na recuperação celular, sendo ambas características consideradas essenciais para utilização das CTMs em terapia celular. Assim, neste trabalho se desenvolveu uma metodologia de cultivo de CTMs em frasco spinner com microcarregadores para posterior inoculação em biorreator de fibra-oca, visando a expansão eficiente e a posterior recuperação das CTMs de tal forma que preservassem seu potencial de diferenciação para poderem ser utilizadas em aplicações de terapia celular.

## **2 OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de cultivo de células-tronco mesenquimais (CTMs) em frasco spinner com o microcarregador Pronectin<sup>®</sup> F, para posterior inoculação em biorreator de fibra oca que permita sua intensiva expansão *in vitro* preservando seu potencial de diferenciação em várias linhagens de grande interesse para uso em terapia celular.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Tecnologia de cultivo de células animais**

Embora o cultivo de células animais tenha exercido importante papel em escala laboratorial nos últimos cem anos, foi apenas em 1950 que os bioprocessos em larga escala com células animais se desenvolveram acentuadamente, principalmente devido a necessidade de produção de vacinas virais (particularmente para poliomielite). A partir de então, vem desempenhando um amplo percurso comercial e significado social, com importantes aplicações na biotecnologia moderna, especialmente no que se refere à produção de enzimas, hormônios, anticorpos e proteínas. Esses produtos são amplamente utilizados nas áreas biomédicas (terapia celular), de alimentos, agropecuária e farmacológica, indústria de vacinas e em bioindústrias (BUTLER, 2005).

A história do cultivo de células animais tem início em 1907, com a demonstração de Ross e Harrison (Apud WIGLEY, 2001) no explante de um tecido neural de embrião de sapo. Em seu experimento, conseguiram finalmente quebrar a maior controvérsia da neurobiologia, mostrando claramente que cada fibra nervosa é consequência de um único nervo celular. Alexis Carrel em 1912 cultivou células do tecido conjuntivo por extensos períodos e mostrou a contração do músculo cardíaco por 2 a 3 meses (WIGLEY, 2001).

Outro marco importante aconteceu em meados de 1940, quando Earle e colaboradores desenvolveram a técnica de estoque indefinido de células em nitrogênio líquido a - 196°C (WIGLEY, 2001).

Porém, o grande impulso para aplicação de células animais em larga escala deu-se com a necessidade de produção de vacinas virais. A maior epidemia de poliomielite em meados de 1940-50 provocou a concentração de muitos esforços para o desenvolvimento de uma vacina eficiente. Assim, em 1940, Enders conseguiu pela primeira vez isolar os vírus da vaccínia e da gripe em culturas de tecidos mantidas em tubos de ensaio. Com a colaboração dos pediatras Tom Weller e Fred Robbins, Enders semeou o vírus da poliomielite em tecidos fetais mantidos em tubo de ensaio, na presença de um corante que mudava de cor de acordo com a acidez ou alcalinidade do meio. Verificou que, enquanto as células não-infectadas liberavam ácidos no meio de cultura tornando o corante amarelo, as que continham o vírus não modificavam a cor do corante. Através desse método simples conseguiram demonstrar que era possível propagar o vírus da pólio em cultura de tecidos. E que, ao



transferir o vírus de uma cultura para outra em sucessivas passagens, ocorria diminuição progressiva da virulência, passo essencial para o desenvolvimento da vacina. A vacina da pólio se tornou um dos primeiros produtos comerciais oriundos do cultivo de célula animal (BUTLER, 2004).

Em 1952, George Gey isolou e caracterizou diversos tipos celulares com boas características de crescimento. Isso incluiu a célula do carcinoma humano, HeLa, cujo nome derivou-se de sua doadora Helen Lane (BUTLER, 2004).

Em 1955, Earle e Eagle focaram a atenção no desenvolvimento de formulações de nutrientes para crescimento celular. O meio de cultura quimicamente definido foi denominado *EMEM* (*Eagle's Minimum Essential Medium*) e foi o primeiro amplamente utilizado em cultura celular (BUTLER, 2004).

Em 1961, Hayflick e Moorhead estudaram o crescimento de células embrionárias. Em seus experimentos, mostraram que essas células podiam crescer continuamente através de subculturas e condições estabelecidas por até 50 gerações (KRETZMER, 2002).

A utilização das linhagens de células humanas WI-38 e MRC-5 aumentaram a produção de vacinas para uso humano: sarampo (1963), raiva (1964), caxumba (1969) e rubéola (1969). Todos estes processos foram realizados em cultivos descontínuos (batelada), onde as células cresciam até altas densidades para depois serem infectadas com determinado vírus (KRETZMER, 2002).

Contudo, uma aplicação original da técnica de fusão celular foi descrita em 1975 por Kohler e Milstein. Eles obtiveram sucesso na fusão de linfócitos com células de mieloma, originando os hibridomas. Essa técnica possibilitou a produção de anticorpos monoclonais (mAb) contra os antígenos conhecidos, através da fusão de linfócitos, produtores de anticorpo, com células originárias de tumor, os mielomas. A expressão de mAb em hibridomas resultou em um significativo aumento na produção de testes para diagnósticos médicos. A alta seletividade dos mAbs permite uma vasta aplicação, como por exemplo, a identificação de vírus, bactérias ou parasitas, aumento do nível de determinadas enzimas (doenças coronárias) e reagentes para tipagem sanguínea ABO (BUTLER, 2004).

Outro marco histórico extremamente importante foi o desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante em meados de 1980. Isso permitiu que o DNA fosse isolado e inserido em qualquer célula. Inicialmente, essa técnica foi utilizada para expressão de genes de mamíferos em bactéria (particularmente a *E. coli*) (BUTLER, 2004). A primeira proteína

terapêutica humana licenciada através dessa tecnologia foi a insulina recombinante em 1982. Desde 1996, os anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados tem dominado esse grupo de produtos como: Rituxan, Remicade, Synagis e Herceptin (BUTLER, 2005).

Podemos identificar três categorias majoritárias de produtos valiosos oriundos de células animais nos últimos 40 anos: vacinas virais, anticorpos monoclonais e glicoproteínas recombinantes. A pesquisa desses biológicos tem crescido rapidamente nos últimos anos (BUTLER, 2005).

A Tabela 1 abaixo mostra resumidamente os principais marcos históricos no cultivo de células animais.

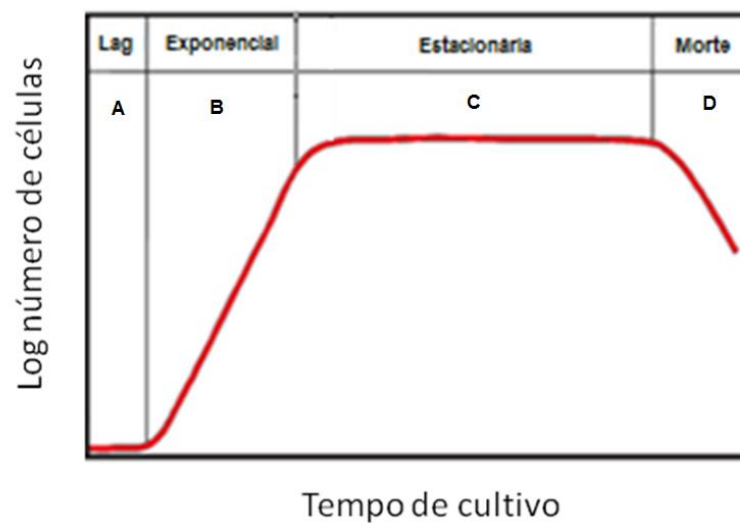
**Tabela 1** - Principais eventos históricos no cultivo de célula animal.

<b>ANO</b>	<b>EVENTO HISTÓRICO</b>
1907	Ross e Harrison publicaram experimentos mostrando o explante de um tecido neural de embrião de sapo.
1912	Alexis Carrel cultivou células de tecido conjuntivo por um extenso período.
1940	Earle e colaboradores desenvolveram a técnica de estoque indefinido de células em nitrogênio líquido a $-196^{\circ}\text{C}$ .
1949	Enders desenvolveu a vacina da poliomelite.
1952	George Gey estabeleceu a linhagem HeLa
1955	Earle e Eagle desenvolveram um meio quimicamente definido ( <i>EMEM</i> ).
1961	Hayflick e Moorhead estudaram o crescimento de células embrionárias.
1975	Kohler e Milstein – produção de hibridomas.
1980	Tecnologia do DNA recombinante.
1982	Primeira proteína recombinante licenciada

### 3.2 Crescimento celular

Células em diferentes fases do ciclo de crescimento se comportam diferentemente em relação à proliferação, atividade enzimática, glicólise e respiração, síntese de produtos especializados e muitas outras propriedades (LÉO *et al.*, 2008).

As fases de crescimento celular em cultura se dividem em fase lag, fase exponencial ou logarítmica (log) de crescimento, fase estacionária ou platô e fase de declínio, como mostra a Figura 1.



**Figura 1** - Padrão de curva de crescimento para células animais em cultura. A fase lag (A) representa um período de adaptação da cultura seguida por uma fase de proliferação exponencial (B), até alcançar uma fase de platô ou estacionária (C), na qual não há um aumento na concentração celular. A cultura atinge uma fase de declínio (D), quando as células começam a morrer.

A fase lag (A) ocorre logo em seguida à inoculação das células. Nessa fase, as células não se dividem ou o fazem em baixas taxas específicas. É um período de adaptação. A duração dessa fase é dependente de pelo menos dois fatores: a fase de crescimento na qual estava a subcultura precedente e a concentração celular do inóculo. A fase exponencial ou logarítmica (log) (B) é um período de proliferação ativa durante o qual a concentração de células aumenta exponencialmente. Nessa fase, as células estão em seu melhor estado fisiológico, e portanto, ideais para estudos de função celular. Na fase estacionária (C), em razão das baixas concentrações de nutrientes e acúmulo de metabólitos inibitórios, a taxa de crescimento do cultivo é reduzida e, em alguns casos, a proliferação celular cessa por completo. Nessa fase, a taxa de morte = taxa de crescimento (BUTLER, 2004). A fase de morte (D) é um período de declínio na concentração de células, ocasionado pela morte celular

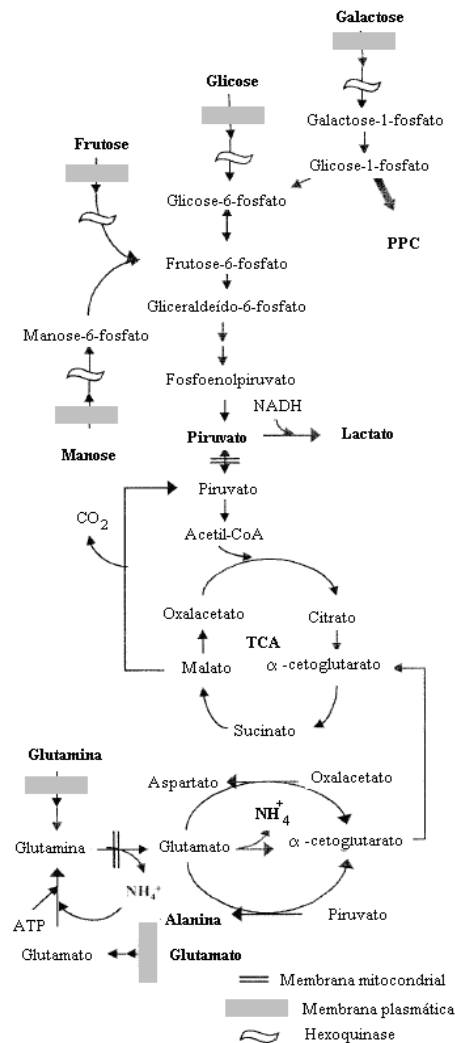
não compensada por células em proliferação. A morte pode ser ocasionada por apoptose ou agressão letal (LÉO *et al.*, 2008).

A determinação de uma curva de crescimento é importante para avaliação das características específicas de uma cultura celular. O comportamento e a bioquímica celular alteram-se significativamente em cada fase da curva. Conhecendo-se o ciclo de crescimento de cada linhagem celular é possível prever a densidade do inóculo mais adequada, a duração prevista dos experimentos e os intervalos mais apropriados para amostragem ou adição de reagentes a serem testados (LÉO *et al.*, 2008).

### **3.3 Metabolismo de células de mamíferos em cultura**

Em geral, as células de mamífero apresentam metabolismo altamente desregulado quando cultivadas *in vitro*. Este se caracteriza basicamente pelo consumo elevado e ineficiente de alguns aminoácidos, como alanina, aspartato e glicina, das fontes de carbono, nitrogênio e energia, mais especificamente glicose e glutamina, o que conduz à geração de metabólitos indesejáveis como lactato e amônio (ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

Na maioria das células de mamíferos, o mecanismo de transporte da glicose é a difusão facilitada, que se caracteriza por ser saturável, bidirecional e controlada pelo gradiente de concentração. Uma vez que, normalmente, a concentração de glicose livre no citosol é muito baixa e o transporte ocorre em direção ao interior da célula. Quando a glicose entra no citosol, ela é rapidamente fosforilada por hexoquinases para produzir glicose-6-fosfato (G6P) que é logo catabolizada, principalmente através de duas vias: glicólise e ciclo das pentoses fosfato (PPC). Na glicólise, a G6P é transformada em piruvato, gerando uma série de outros intermediários biossintéticos, duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) e duas de nicotina adenina dinucleotídeo (NADH) (ALTAMIRANO *et al.*, 2008). O NADH, por sua vez, atua como agente redutor do piruvato em lactato, catalisado pela enzima lactato desidrogenase presente no citosol, como mostra a Figura 2.



**Figura 2** - Esquema da via glicolítica e do ciclo das pentoses fosfato (ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

A glutamina é o segundo componente principal dos meios de cultura empregados para o cultivo de células de mamíferos e a principal fonte de geração de amônio (nocivo às células). Em condições normais de cultivo a 37°C, a glutamina sofre, parcialmente, uma decomposição química a ácido pirrolidina carboxílico e amônio. Além do seu importante papel como fonte de energia para a célula, através do fornecimento ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCAc), ela é também um importante bloco estrutural para o metabolismo celular, sendo requerida como fonte de nitrogênio na síntese de pirimidinas e purinas, açúcares aminados,  $\text{NAD}^+$  e asparagina. Similarmente ao que ocorre com a glicose na maioria das linhagens celulares utilizadas industrialmente, a glutamina é consumida a uma elevada velocidade, associada à alta concentração de glutamina que normalmente se utiliza na formulação do meio de cultivo (ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

Em geral, os aminoácidos devem ser adicionados aos meios de cultivo de maneira equilibrada, pois a ausência de qualquer aminoácido essencial aciona o início de morte celular. Quando as células animais são cultivadas *in vitro*, exibem diversos perfis de consumo de aminoácidos, embora se possam verificar variações para cada linhagem em particular. De fato, na maioria dos casos, os aminoácidos podem ser divididos em três grupos. Primeiro, o grupo daqueles que são rapidamente consumidos: valina, isoleucina, leucina, lisina e cisteína. Em segundo lugar, estão os aminoácidos consumidos em baixa proporção: treonina, arginina, fenilalanina, serina, histidina, metionina e glicina. O terceiro grupo é constituído pelos aminoácidos que são produzidos e secretados pela célula: alanina, prolina, aspartato, asparagina e glutamato (ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

Em consequência da desregulação metabólica das células de mamíferos cultivadas *in vitro*, ocorre um rápido esgotamento da glicose e da glutamina, produzindo grandes quantidades de ácido láctico e íon amônio que são metabólitos tóxicos (substâncias indesejadas ao cultivo celular). As células *in vivo* convertem uma proporção de piruvato gerado pela glicólise em ácido láctico, em uma reação catalisada pela enzima lactato desidrogenase. No caso de células animais cultivadas *in vitro*, o ácido láctico é acumulado no meio de cultura. Essa geração de lactato requer o uso de métodos eficientes para o controle do pH para evitar o efeito negativo da acidificação do meio no crescimento celular. Os efeitos negativos da concentração de lactato no crescimento celular são observados claramente para concentrações iguais ou superiores a 40 mM (AMABLE e BUTLER, 2008). A amônia (NH<sub>3</sub>) e o íon amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) são altamente tóxicos para células animais, sendo que os efeitos negativos no metabolismo celular são observados a níveis baixos de concentração (2mM). O íon amônio é oriundo do metabolismo da glutamina e sua decomposição espontânea a 37°C (ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

### **3.4 Células-Tronco (CT)**

O estudo das células-tronco (CTs) tem-se mostrado uma área bastante explorada nos últimos dez anos. Esse crescente interesse está relacionado às possibilidades que as CTs oferecem em terapias celulares, representando uma revolução no entendimento dos mecanismos de reparo e regeneração tecidual. Destaca-se ainda o fato de poderem ser aplicadas em terapias para diversas doenças para as quais não há tratamento eficaz (SCHWINDT *et al.*, 2005).

As CTs podem ser definidas segundo três propriedades: I) auto-renovação, ou seja, capacidade de originar outra CT com características idênticas; II) habilidade de se diferenciar em mais de uma linhagem celular; e III) capacidade de originar células funcionais nos tecidos derivados da mesma linhagem. Assim, as CTs são células indiferenciadas capazes de se diferenciar originando progenitores maduros, bem como células efetoras completamente diferenciadas (SCHWINDT *et al.*, 2005).

O modo de divisão característica das CTs é denominada divisão assimétrica e origina uma célula idêntica a ela (auto-renovação) e uma célula especializada. Essa divisão é o mecanismo fisiológico necessário para manter a composição celular de tecidos e órgãos no corpo humano (BONGSO e RICHARDS, 2004).

Levando-se em consideração algumas distinções, como o nível de plasticidade que estas células possuem e para qual porção de um organismo funcional elas podem contribuir, as células-tronco classificam-se em totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As células-tronco totipotentes podem originar tanto um organismo totalmente funcional, como qualquer tipo celular do corpo, inclusive todo o sistema nervoso central e periférico. Correspondem às células do embrião recém-formado e têm potencial para originar até mesmo as células do folheto extra embrionário que formarão a placenta. Entretanto, estas células são efêmeras e desaparecem poucos dias após a fertilização. As pluripotentes são células capazes de originar qualquer tipo de tecido sem, no entanto, originar um organismo completo, visto que não podem gerar a placenta e outros tecidos de apoio ao feto. Formam a massa celular interna do blastocisto depois dos quatro dias de vida e participam da formação de todos os tecidos do organismo. Já as células-tronco multipotentes são um pouco mais diferenciadas, presentes no indivíduo adulto, com capacidade de originar apenas um limitado número de tipos teciduais. Estas células são designadas de acordo com o órgão de que derivam e podem originar apenas células daquele órgão, possibilitando a regeneração tecidual (SOUZA *et al.*, 2003).

As células-tronco podem ser obtidas de vários locais como: embriões, sangue de cordão umbilical, medula óssea, células mesenquimais, células de tecidos e órgãos, células do sangue periférico e células hematopoiéticas (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

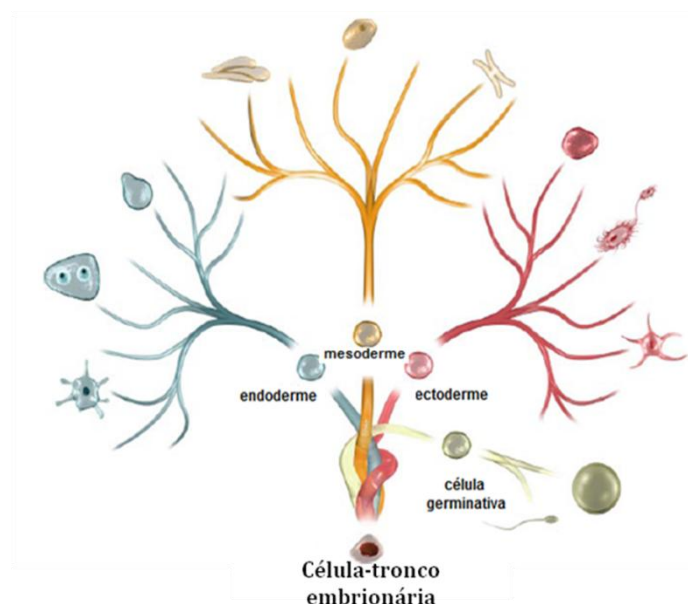
O termo célula-tronco se refere a uma gama variada de diferentes tipos de células que possuem essa propriedade, então para simplificar, as células-tronco são usualmente divididas em: células-tronco embrionárias e células-tronco adultas.

### 3.5 Células-Tronco Embrionárias (CTEs)

As células-tronco embrionárias (CTEs) são definidas como células pluripotentes que podem se manter em um estado indiferenciado *in vitro*, e são caracterizadas por auto-renovação, imortalidade e pluripotência (BRIGNIER *et al.*, 2010).

Tipicamente, as CTEs são derivadas do interior da massa celular do quinto dia do blastocisto. Células derivadas de estágios de desenvolvimento anteriores também podem ser utilizadas. No entanto, outras estratégias foram e tem sido desenvolvidas com diferentes métodos e fontes de células (BRIGNIER *et al.*, 2010). Podem ser isoladas de: blastocistos doados, embriões descartados de baixa qualidade, embriões com defeitos genéticos seguido de pré-implantação de diagnóstico genético e zigotos aneuplóides (GERECHT-NIR e ITSKOVITZ-ELDOR, 2004).

As CTEs são capazes de se desenvolver em três camadas primárias – ectoderme, mesoderme e endoderme – tanto *in vivo* como *in vitro*. A Figura 3 abaixo ilustra o potencial de diferenciação da célula-tronco embrionária. Isso abre possibilidades visionárias, tal como: o crescimento de tecidos em laboratório para o tratamento de uma variedade de doenças, sendo uma poderosa fonte para obter um grande número de células para transplantes na medicina regenerativa (GERECHT-NIR e ITSKOVITZ-ELDOR, 2004).



**Figura 3** - Ilustração do potencial de diferenciação da célula-tronco embrionária. Estão exemplificados apenas alguns dos 220 diferentes tipos celulares do corpo humano em que é capaz de se diferenciar (JENSEN *et al.*, 2009).



Além de seus principais atributos como expansão ilimitada e pluripotência, as CTEs têm gerado especial interesse no setor biofarmacêutico para uso em descoberta de fármacos e desenvolvimento de células saudias para terapia. Desse modo, a célula-tronco embrionária será uma poderosa fonte para medicina regenerativa, utilização como fármacos e toxicologia *in vitro* (SERRA *et al.*, 2010).

Assim, após a validação da Lei de Biossegurança do Brasil em 29 de maio de 2008, o Supremo Tribunal Federal (STF) liberou as pesquisas científicas com as células-tronco de embriões obtidos por fertilização *in vitro* ou que estejam congelados há três anos ou mais, exigindo também a autorização do casal. Decorrente desse avanço, o Brasil tornou-se independente da necessidade de importação de culturas primárias de CTE, facilitando o desenvolvimento de novas pesquisas no país. Ademais, os futuros resultados poderão ser compartilhados com todos os cientistas brasileiros, por meio da Rede Nacional de Terapia Celular, com a finalidade de centralizar as informações, além de oferecer treinamento aos pesquisadores que desejarem realizar cultivo de novas linhagens de CT (CARLO *et al.*, 2009).

### **3.6 Células-Tronco Adultas (CTAs)**

As células-tronco adultas (CTAs) surgem ainda na fase de formação do embrião, persistindo por toda a vida em pequenas quantidades no organismo. Por isso, são raras e de difícil isolamento. Portanto, essas células estão presentes tanto em tecidos de indivíduos adultos, quanto em tecidos de fetos, crianças e adolescentes. A principal função dessas células é manter os tecidos saudáveis e eventualmente reparar lesões nos mesmos (PESSOLATO *et al.*, 2010).

Pesquisadores do mundo todo já conseguiram localizar as células-tronco adultas em órgãos como medula óssea, fígado, vasos sanguíneos, sangue de cordão umbilical, músculo esquelético, pâncreas, sistema digestivo, epitélio da pele, córnea, polpa dentária, retina e cérebro (SOUZA *et al.*, 2003).

Na terapia celular, as CTAs podem ser retiradas do organismo de um paciente e aplicadas no próprio indivíduo (transplante autólogo) ou em outros indivíduos (transplante heterólogo). Um exemplo disso é o transplante de CTA hematopoiéticas (transplante de medula óssea), o qual representa a forma mais antiga de terapia celular e ainda hoje a mais amplamente realizada no mundo todo. Este transplante geralmente é empregado no tratamento

de doenças hematológicas (doenças do sangue), como leucemias, linfomas, talassemia, anemia falciforme, entre outras (PESSOLATO *et al.*, 2010).

As principais diferenças entre célula-tronco adulta (CTA) e célula-tronco embrionária (CTE) estão descritas na Tabela 2 abaixo:

**Tabela 2** - Principais diferenças entre célula-tronco adulta (CTA) e célula-tronco embrionária (CTE) (BONGSO e RICHARDS, 2004).

CTAS	CTES
Célula-tronco de órgãos são de difícil acesso e purificação	Uma vez derivada e propagada, a célula-tronco exibe um crescimento profílico e abundante
Multipotente	Pluripotente
Baixos níveis de telomerase	Altos níveis de telomerase e auto-renovação ilimitada das células
Apoptose rápida	Apoptose tardia
Nenhum risco de indução de teratoma depois de um transplante	Riscos de indução de teratoma depois do transplante, se não purificado
Nenhum problema ético	Problemas éticos limitados para alguns países e instituições
Aplicações: Terapias de transplante	Aplicações: (1) terapia de transplante, (2) screening farmacêutico, (3) produção de gametas, (4) estudos no desenvolvimento humano, anomalias congênitas e câncer.

Diversas outras denominações de células-tronco estão sendo descritas, tais como as células-tronco hematopoiéticas, células-tronco endoteliais e células-tronco mesenquimais. Dessas três, são as células-tronco mesenquimais que guardam ainda maiores segredos e possuem aparentemente a mais ampla capacidade de diferenciação. Assim, as células-tronco mesenquimais serão discutidas mais detalhadamente a seguir.

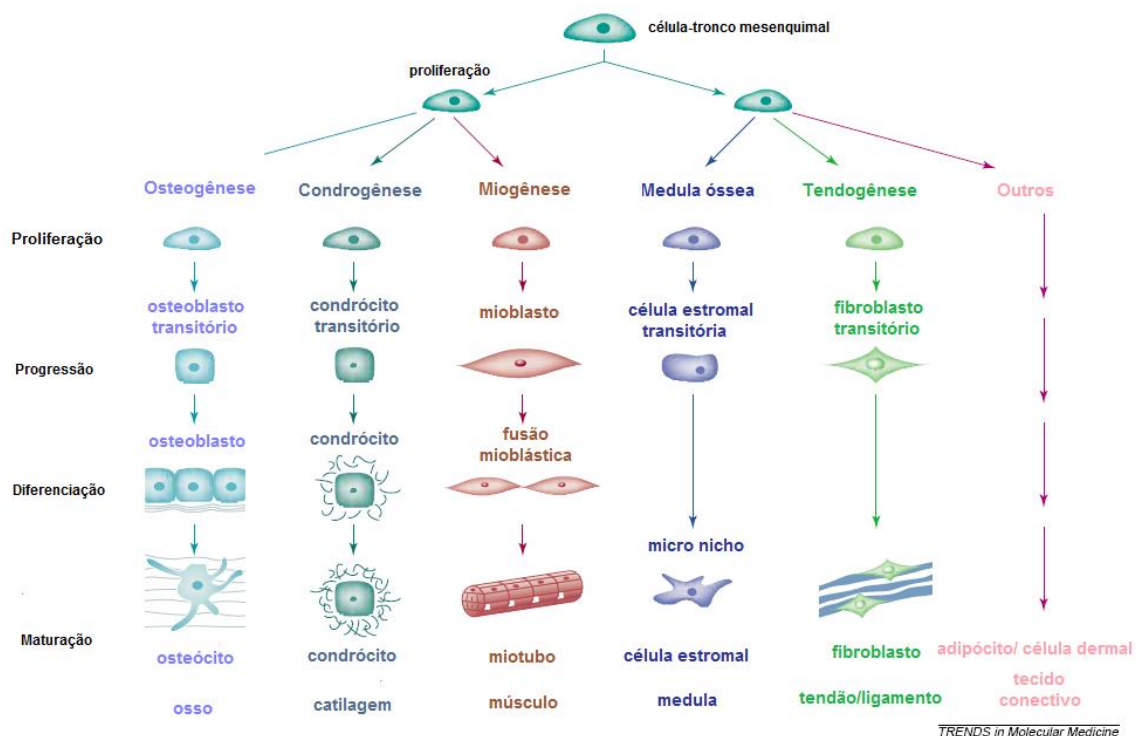
### 3.7 Células-tronco Mesenquimais (CTMs)

O uso e a manipulação de células-tronco mesenquimais (CTMs) pela Engenharia de Tecidos se aplicam em diversos tratamentos em uma gama variada de patologias. As vantagens dessa sinergia são numerosas: alta qualidade no reparo com a regeneração de tecidos lesados, sem a formação de tecido fibroso; o local danificado é mínimo quando comparado com o autoenxerto de osso e cartilagem; o risco de imunorejeição

e transmissão do patógeno são muito baixos. Além disso, as CTMs tem um grande potencial de proliferação, podendo ser facilmente manipuladas e manuseadas (POUNTOS *et al.*, 2007).

### 3.7.1 Definição

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células-tronco multipotentes que podem se diferenciar em diversos tipos de tecidos, como adiposo, ósseo, muscular, cartilaginoso como mostrado na Figura 4 (DEANS e MOSELEY, 2000). Podem se diferenciar ainda em tendão, medula e tecido conjuntivo (CAPLAN e BRUDER, 2001).



**Figura 4** - Processo mesengênico (CAPLAN e BRUDER, 2001).

### 3.7.2 Fontes de célula-tronco mesenquimal

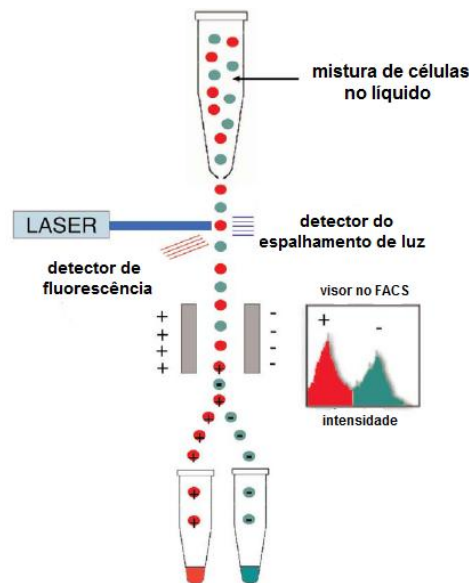
A medula óssea ainda é a fonte mais comum de CTMs, considerando o seu fácil isolamento e a proporção celular lá encontrada. Vários métodos tem sido desenvolvidos para o isolamento de CTMs multipotentes da medula óssea de humanos e de animais, incluindo ratos, cachorros, gatos, ovelhas, cavalos e gado (PAYUSHINA *et al.*, 2006). Algumas células com propriedades de CTMs têm sido isoladas de outros tecidos mesenquimais. Podem ser encontradas também no tecido adiposo, parede vascular, osso trabecular, articulação sinovial, placenta, fígado, pulmão, baço, cordão umbilical, gordura de

lipoaspiração e veia safena (KRAMPERA *et al.*, 2006; BROOKE *et al.*, 2007; COVAS *et al.*, 2005).

### 3.7.3 Isolamento

Não existe um protocolo definido para o isolamento de CTMs, mas há uma grande variedade na literatura. O primeiro método e mais simples é baseado nas propriedades aderentes da CTMs, cujo pioneiro do trabalho foi o Friedenstein *et al.* (1976). Nesse estudo, todo sangue da medula óssea foi colocada em um frasco de cultura e após quatro horas, as células não aderentes foram descartadas. As células permaneceram latentes por 2-4 dias e depois elas proliferavam rapidamente, sendo assim isoladas (BARRY e MURPHY, 2004).

Fluorescence-activated cell sorting (FACS) é um método alternativo para isolamento de CTMs. Nessa técnica, uma população heterogênea de células são caracterizadas e separadas baseada na intensidade da fluorescência que emite quando passa por um feixe de luz. O citômetro irá apenas isolar células cujo espalhamento de luz tiver um parâmetro definido. A metodologia é ilustrada na Figura 5.



**Figura 5** - Diagrama simplificado do método por fluorescência na seleção celular (POUNTOS *et al.*, 2007).

Mais precisamente, um ou múltiplos anticorpos monoclonais marcados com fluorescência são ligados a uma população específica de células. Células que serão positivas ou negativas para esses anticorpos, serão incluídas ou excluídas do seu respectivo tubo coletor. Uma grande variedade de anticorpos tem sido utilizados nessa técnica baseado no perfil fenotípico das CTMs, como mostra a Tabela 3 (POUNTOS *et al.*, 2007).

Tabela 3 - Perfil fenotípico de CTMs (POUNTOS *et al.*, 2007).

	Detecção		Detecção
<i>Receptores</i>	-	<i>Fatores de crescimento</i>	
<i>hematopoiéticos</i>		<i>e citocinas</i>	
CD1a (T6)	-	CD25	-
CD14	-	CD71	+
CD34	-	CD114	-
CD45	-	CD117	-
CD133	-	CDw119	+
		CD120	+
<i>Moléculas</i>		CD121	+
<i>adesivas</i>		CD123	+
CD31	-	CD124	+
CD44	+	CD126	+
CD50	+	CD127	+
CD54	+	CD140a	+
CD56	+	FGFR	+
CD58	+	CD271	+
CD62E	-		
CD62L	+	<i>Outros marcadores</i>	
CD62P	-	CD3	-
CD102	+	CD9	+
CD106	+	CD13	+
CD144	-	CD19	-
CD166	+	CD73	+
<i>Integrinas</i>		CD80	-
CD11a	-	CD83	-
CD11b	-	CD86	-
CD11c	-	CD90	+
CD18	-	CD105	+
CD29	+	CD146	+
CD49	+	CD157	+
CD51	-	SH3	+
CD61	+	D7-FIB	+
CD104	+	STRO-1	+
		HLA-A,B,C	+
		SSEA-3,4	+

### 3.7.4 Expansão

A expansão *ex vivo* das CTMs é o próximo passo após o isolamento das células. Esse estágio permite a auto replicação de CTMs em número suficiente para uso clínico, que requer produção reprodutível em um grande número de células bem caracterizadas sob condições controladas. Diversos fatores podem influenciar no rendimento da expansão *ex vivo*. Esses fatores são dependentes do doador (idade, sexo, presença de traumas e doenças sistêmicas) e de técnicas como: número de passagens de CTMs, meio de cultura, fatores de crescimento e biorreator utilizado na expansão (SENSEBÉ, 2002).

#### 3.7.4.1 Número de passagens de CTMs

Pelo fato das CTMs serem células aderentes, o número de passagens é um parâmetro crítico para garantir uma boa razão de expansão e a manutenção do potencial de

diferenciação. Pesquisas (COLTER, 2001; SEKIYA, 2002) mostraram que a multipotencialidade e a alta razão de expansão são melhores quando se tem menos passagens e inóculos menores ( $1 \times 10^3$  cél/mL). Porém, no contexto de aplicação terapêutica, a utilização de poucas passagens se torna muito difícil, uma vez que se faz necessário grandes quantidades de células viáveis (SENSEBÉ, 2002).

#### **3.7.4.2 Meio de cultura**

É um dos fatores mais importantes no cultivo de células animais. Sua função é proporcionar pH e osmolalidade apropriados para a sobrevivência e multiplicação da célula e fornecer todas as substâncias químicas requeridas pela célula, as quais não é capaz de sintetizar. Algumas dessas substâncias podem ser fornecidas por um meio de cultura constituído de substâncias de baixa massa molar, geralmente conhecido como meio basal (MORAES *et al.*, 2008). No caso das CTMs, o meio basal contém glicose, aminoácido e íons incluindo cálcio, magnésio, potássio, sódio e fosfato, e soro fetal na concentração de 10-20%. O meio basal e o soro podem afetar significativamente no rendimento da expansão de CTMs (PUNTOS *et al.*, 2007). Os meios de cultura comerciais mais utilizados são D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle medium),  $\alpha$ -MEM (Alpha Modified Eagle's Medium) (SENSEBÉ, 2002) e atualmente o MesenPro (2% SFB), específico para células-tronco mesenquimais.

Sotiropoulou *et al.* (2006), comparou oito diferentes meios basais em termos de eficácia na aderência, índice de crescimento e número final de células-tronco mesenquimais obtidos na cultura. Os resultados mostraram grandes diferenças entre os meios. O meio alpha Modified Eagle's ( $\alpha$ -MEM) contendo glutamax obteve o melhor resultado.

Os compostos importantes em um meio de cultura são soro fetal bovino (SFB) e fatores de crescimento (SENSEBÉ, 2002). O soro fetal bovino contém um elevado número de fatores de crescimento e moléculas da matriz extracelular que aumentam a aderência das células em frascos de culturas para proliferação celular. Contudo, há controvérsias de seu uso em terapia celular, como a transmissão de doenças e reações imunes e, adicionalmente, as CTMs podem incorporar proteínas animais que podem gerar reações alérgicas (ALDAHMAH, 2011).

Diversos estudos têm explorado a possibilidade de utilização de meio de cultura contendo substitutos para o SFB. Entre eles, estão a trombina ativada de plaquetas do plasma, lisado de plaquetas humanas, plaquetas ricas em plasma, soro humano (HuS) e

plasma derivado no cordão umbilical. O soro humano e plasma são boas alternativas para substitutos do SFB pela sua disponibilidade e possibilidade de testes para patógenos humanos antes do uso (ALDAHMAH, 2011).

Koller *et al.* (1998) estudaram os efeitos do soro autólogo e alogênico humano juntamente com soro fetal animal e oito meios livres de soro. Os resultados sugerem que os níveis de performance entre soro animal é superior ao soro humano. O meio livre de soro se mostrou ineficaz.

Lange *et al.* (2007) realizaram um estudo utilizando um possível substituto do soro fetal bovino, o lisado de plaquetas humanas (PL) obtido de concentrado de trombócito humano para expansão de CTMs. Esse estudo mostrou um aumento na expansão das CTMs utilizando o meio proposto quando comparado com DMEM – 10% soro fetal bovino.

Aldahmah (2011) investigou a utilização do soro humano como substituto do soro fetal bovino em hMSC-TERT (célula-tronco mesenquimal imortalizada). Em seu estudo, não observou diferenças na morfologia, tamanho celular, taxa de crescimento a pequeno (10 dias) e longo prazo (100 dias) e a célula não perdeu sua capacidade de diferenciação quando cultivada em soro humano.

Como pode ser notado, há muitas controvérsias em relação ao uso de um substituto para o soro fetal bovino, mas nota-se que há uma grande tendência ao desenvolvimento de outras fontes de meios livres de soro. Ainda assim, a adequação de tais substitutos para usos clínicos ainda deve ser testada.

### **3.7.4.3 Fatores de crescimento**

São proteínas que se ligam aos receptores da superfície celular que resulta na ativação da proliferação celular e/ou diferenciação (SONG e SOYAMA, 2008). Podem ser usados durante a expansão para melhorar o rendimento celular. O conceito acerca desse procedimento é a alteração da capacidade das CTMs. FGF (Fibroblast Growth Factor) é um conhecido mitógeno para algumas células conectivas, incluindo osteoblastos e condrócitos. Outros fatores de crescimento podem ser citados, incluindo EGF (Epidermal Growth Factor), NGF (Nervous Growth Factor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) e os compostos semelhantes à insulina (insulin-like growth factor) IGF-1 e IGF-2 e as interleucinas (TSUTSUMI *et al.*, 2001).

Além desses compostos, podem-se também adicionar antibióticos ao meio de cultivo, como a penicilina, estreptomicina e a anfotericina B, para prevenir o crescimento microbiano. Entretanto, seu uso deve ser o mínimo possível, pois alguns antibióticos podem ter efeito citotóxico, mesmo quando elevadas concentrações de soro são empregadas (MORAES *et al.*, 2008).

#### **3.7.4.4 Biorreatores**

Devido à baixa frequência de células-tronco nos tecidos (de 0,0002 à 0,00001%) e pelo fato da demanda de células-tronco para aplicações terapêuticas ser muito maior que a capacidade de fornecimento, é necessário o desenvolvimento de técnicas de cultivo em biorreatores apropriadas para expansão de um estoque básico (suficientes para serem utilizadas em terapia celular) de células-tronco (BROOKE *et al.*, 2007).

Os biorreatores têm sido utilizados em fermentação industrial, tratamento de água, processamento de alimentos e principalmente na produção de medicamentos, proteínas recombinantes e na engenharia de tecidos. Por fornecer um nível considerável de monitoramento e controle de fatores específicos em cultura 3D, os biorreatores podem fornecer a tecnologia necessária para realizar um estudo controlado com o objetivo de entender os parâmetros biológicos, químicos e físicos (MARTIN *et al.*, 2004).

Para garantir o desempenho eficiente dos fenômenos de proliferação das células e obtenção do produto celular de interesse, devem-se assegurar as seguintes funções: controle do equilíbrio ácido-base (pH) do meio de cultivo, controle de temperatura, troca de gases que permita um suprimento adequado de oxigênio (O<sub>2</sub>), assim como a eliminação do excesso de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), suprimento de nutrientes (meios de cultivo com formulação adequada), suprimento de suporte para adesão celular (células aderentes) e manutenção da assepsia (CHICO *et al.*, 2008).

O crescimento celular pode ser inibido pela falta de nutrientes ou pelo excesso de metabólitos. Durante o crescimento celular, nutrientes como glicose, glutamina e outros aminoácidos são consumidos. Enquanto isso, metabólitos como lactato e amônia são produzidos pelas células. Para evitar a inibição do crescimento por esses fatores, o regime de alimentação no sistema deve ser ótimo (SCHOP *et al.*, 2008). Assim, o modo de operação dos biorreatores pode ser: cultivo descontínuo (batelada), descontínuo alimentado (batelada alimentada), cultivo contínuo e perfusão (CHICO, 2008).



A batelada é um modo de operação descontínuo, no qual ocorre crescimento da população celular sem qualquer suplemento adicional de substrato após a inoculação de células. Já na batelada alimentada, administra-se um ou mais nutrientes durante o cultivo, para repôr aqueles consumidos pelas células. O cultivo contínuo caracteriza-se pela contínua adição de meio de cultura fresco e remoção de meio cultivado contendo células, ambas operações ocorrendo à mesma vazão, de tal forma que se mantém o volume do biorreator constante. A perfusão é o modo de cultivo mais produtivo, pois é possível resolver a maior limitação do sistema contínuo, que é a reduzida produtividade decorrente da perda de células na saída do biorreator. Na perfusão, essa questão é superada por meio da retenção das células dentro do biorreator, empregando-se um dispositivo de retenção celular (CHICO, 2008).

Os biorreatores utilizados para células animais podem ser classificados de diferentes formas. Uma das formas úteis é baseada na geometria do aparelho, como mostra a Tabela 4 abaixo.

**Tabela 4** - Classificação dos biorreatores de acordo com o modo de operação (GODARA *et al.*, 2008).

ESTÁTICO	AGITADO	PERFUSÃO
Frascos	Spinner	Coluna
Placas	Ondas	Tanque agitado
	Rotativo	Fibra oca
	Microcarregadores	

#### 3.7.4.4.1 Estático

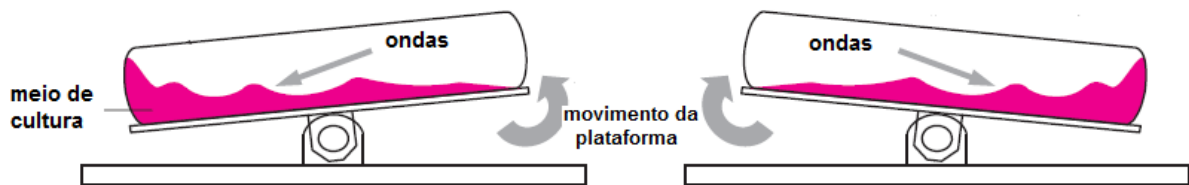
Os biorreatores mais simples são os de cultura estática (frascos e placas), que consistem em um compartimento único e não agitado, onde os nutrientes difundem para as células. A troca de gases ( $O_2$  e  $CO_2$ ) ocorre na interface gás/meio (GODARA *et al.*, 2008).

#### 3.7.4.4.2 Agitado

O outro tipo de biorreator é aquele que utiliza a agitação. A agitação tem a função de manter as células em suspensão, homogeneizar o fluido para evitar a formação de zonas mortas e de gradientes de nutrientes, metabólitos e temperatura promovendo a transferência de calor e de massa das várias espécies químicas presentes, entre elas o  $O_2$  (ondas, frasco Spinner, rotativo, e sistemas com microcarregadores) (CHICO *et al.*, 2007).

### a) Biorreator de ondas (wave)

O biorreator de ondas (wave) é um aparelho para cultura de células apropriado para aplicações em terapia celular e medicina regenerativa. O meio de cultura e as células são colocados em contato em uma câmara pré-esterilizada e descartável, em uma plataforma agitada. O movimento da plataforma induz a formação de ondas para auxiliar a transferência de oxigênio para o meio de cultura e criar um ambiente homogêneo para o crescimento celular (Figura 6). Tem a grande vantagem de operar em sistema fechado, diminuindo assim, o risco de contaminação. Além disso, o material da câmara é biocompatível (GE Healthcare).



**Figura 6** - Ação da onda no crescimento celular no biorreator wave (GE Healthcare).

### b) Frasco spinner

O frasco spinner é um recipiente de vidro ou plástico com um agitador magnético central e braços laterais para adição e remoção de meio e células, como mostra a Figura 7. Sua utilização aumenta a eficiência e crescimento celular em comparação com cultura estática (KING e MILLER, 2007).



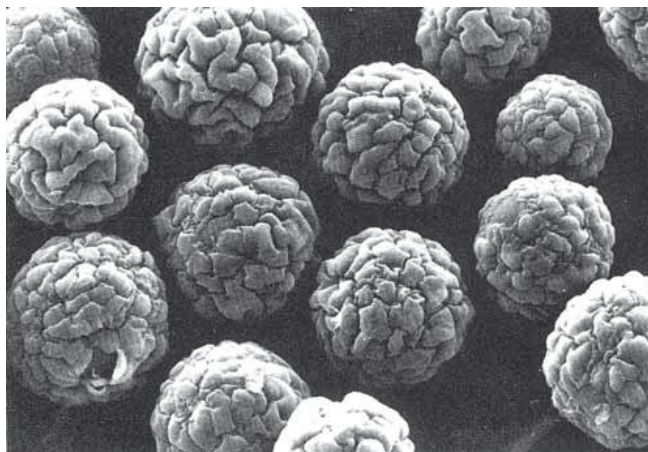
**Figura 7** - Frasco spinner utilizado para cultivo de células animais (WHEATON).

Como já mencionado, as células-tronco mesenquimais (CTMs) são células dependentes de ancoramento, ou seja, necessitam de uma área específica para se aderir e proliferar dentro do biorreator. Uma boa aproximação para esse fim é o uso de microcarregadores. Os microcarregadores são partículas geralmente esféricas, que servem como suporte para a adesão das células dependentes de ancoramento. São feitos de diversos materiais como celulose, dextrana, vidro, poliestireno, colágeno ou gelatina. Podem ser classificados como microporosos (diâmetro do poro menor que 1  $\mu\text{m}$ ), permitindo o crescimento celular apenas na superfície externa, ou macroporosos, permitindo a proliferação celular na superfície interna (diâmetro do poro de 10-50  $\mu\text{m}$ ) (CHICO *et al.*, 2008). Os microcarregadores oferecem a vantagem de fornecer uma grande área de superfície para crescimento celular durante a proliferação em uma cultura homogênea em suspensão (SCHOP *et al.*, 2008). Uma grande variedade de microcarregadores comerciais para cultivo de células animais está disponível no mercado, diferindo na composição química, carga, porosidade e cobertura superficial, conforme listado na Tabela 5.

**Tabela 5** - Microcarregadores comerciais disponíveis e seus fabricantes.

MICROCARREGADOR	MATERIAL	CARGA	POROSIDADE	FABRICANTE
Cytodex <sup>TM</sup> 1	Matriz de dextrana com grupo DEAE	+	Não	GE Healthcare
Cytodex <sup>TM</sup> 3	Matriz de dextrana coberta com camada de colágeno	---	Não	GE Healthcare
Cytoline <sup>TM</sup>	Polietileno/Sílica	---	Sim	GE Healthcare
Cytopore <sup>TM</sup>	Matriz de celulose com grupo DEAE	+	Sim	GE Healthcare
Pronectin <sup>®</sup> F	Poliestireno recoberto com fibronectina	---	Não	SoloHill
HyQ Sphere <sup>TM</sup>	Poliestireno com diferentes opções de carga e superfície			Hyclone/SoloHill
Hillex	Poliestireno modificado	+	Não	SoloHill
Plastic Plus (PP)	Poliestireno	+	Não	SoloHill
Collagen (C)	Poliestireno recoberto com colágeno tipo I	---	Não	SoloHill
FACT III (F)	Poliestireno com colágeno porcino tipo I	+	Não	SoloHill
Cultispher-S	Gelatina Porcina	---	Sim	PerCELL Biolytica
Cultispher-G	Gelatina Porcina (maior estabilidade térmica e mecânica)	---	Sim	PerCELL Biolytica
GEM <sup>TM</sup>	Partícula magnética de alginato coberta com gelatina	----	Sim	Hamilton

Os microcarregadores têm sido usados intensamente para várias aplicações e tipos de células diferentes. Exemplos incluem a expansão em larga escala para produção de fatores de crescimento, vacinas e anticorpos (PHILLIPS *et al.*, 2008). A Figura 8 mostra um exemplo do microcarregador microporoso Cytodex 1 utilizado no cultivo de células de rim suíno em 72 horas de cultivo. Já a Figura 9 mostra um exemplo do microcarregador macroporoso Cytoline 1 colonizado com células CHO (Chinese Hamster Ovary).



**Figura 8** – Microscopia eletrônica de varredura do microcarregador Cytodex-1 colonizado com célula suína em 72 horas de cultivo (GE HEALTHCARE).



**Figura 9** – Microscopia eletrônica de varredura do microcarregador Cytoline-1 colonizado com célula CHO (AMERSHAN BIOSCIENCES).

### ***Cultivos de Células-Tronco utilizando o sistema de cultivo microcarregadores em frasco Spinner***

A expansão de células-tronco em frascos convencionais de cultura é um método amplamente utilizado, mas é limitado pela restrita área de superfície para seu crescimento. Isso resulta na necessidade de utilização de incubadoras de grande capacidade e intensivo trabalho para conseguir um elevado número de células. Culturas em suspensão baseada no uso de microcarregadores em frasco spinner é uma alternativa viável devido a sua elevada área de superfície por volume (WEBER *et al.*, 2007). O frasco spinner representa uma melhoria significativa em técnicas de cultura comparado com sistemas estáticos e oferecem diversas vantagens como: maior controle em cultura homogênea, simplicidade e facilidade no manuseamento e baixo risco de contaminação (FERNANDES *et al.*, 2009).

Diversos trabalhos têm sido descritos na literatura utilizando células-tronco em sistemas de cultivo com microcarregadores em frasco spinner, como mostra a Tabela 6.

**Tabela 6** - Cultivos de células-tronco com microcarregadores em frasco spinner encontrados na literatura.

	<b>EIBES <i>et al.</i>, 2010</b>	<b>YANG <i>et al.</i>, 2007</b>	<b>SANCHES, 2010</b>	<b>FRAUENSCHUH <i>et al.</i>, 2007</b>
<b>Nome da revista/jornal</b>	Journal of Biotechnology	Biomaterials		Biotechnology Progress
<b>Tipo de célula Origem Espécie</b>	CTMs Medula óssea Humana	CTMs Medula óssea Ratos	CTMs Medula óssea Humana	CTMs Medula óssea Suína
<b>Concentração Celular ou número de células inicial</b>	$5,25 \cdot 10^4$ células/mL	$1,5 \cdot 10^7$ células	$1,25 \cdot 10^5$ células/mL	$1,0 \cdot 10^5$ células/mL
<b>Tipo de microcarregador</b>	Cultispher – S	CultiSpher-S	Cultispher-S	Cytodex-1
<b>Duração do experimento (dias)</b>	8	35	15	28
<b>Concentração celular ou número de células final</b>	$4,2 \cdot 10^5$ células/mL	$1,24 \cdot 10^8$ células	$6,06 \cdot 10^7$ células	$3,6 \cdot 10^5$ células/mL
<b>Fator de expansão</b>	8,4	8,3	9,7	3,6

Como pode-se notar na Tabela 6, diversos tipos de microcarregadores têm sido utilizados visando uma expansão eficiente dessas células preservando o seu potencial de

diferenciação. Não há trabalhos na literatura envolvendo o uso do microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F com células-tronco, por isso o estudo da célula-tronco mesenquimal com esse microcarregador torna o trabalho interessante, devido ao seu ineditismo. Além disso, o Pronectin<sup>®</sup>F apresenta vantagens por não apresentar carga superficial, favorecendo a recuperação das células e é feito de material de origem não-animal, evitando assim, riscos de contaminação ou doenças.

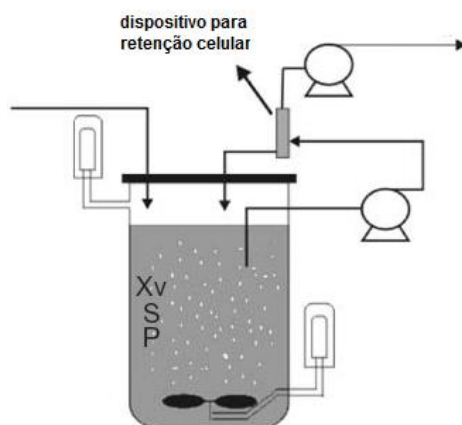
Porém, um problema envolvendo o uso desse sistema de cultivo é a formação de agregados de microcarregadores, fato já relatado por Frauenschuh *et al.* (2007), Weber *et al.* (2007) e Sanches (2010). Uma possível solução para diminuir esse problema é a utilização de um biorreator de fibras ocas, em que a difusão dos nutrientes e oxigênio não é afetada pela formação dos aglomerados.

#### **3.7.4.4.3 Perfusão**

O sistema de perfusão é o modo de cultivo mais produtivo e também o mais complexo. Nesse biorreator, ocorre distribuição de meio de cultura que aumentam a transferência de massa por uma contínua troca de meio (GODARA *et al.*, 2008). As principais características são: maior produtividade volumétrica, tempo de residência curto, operacionalmente mais complexo, escalas geralmente até cerca de 2000 L (CHICO *et al.*, 2008). Nesse sistema temos os biorreatores: tipo tanque agitado e fibra-oca (hollow fiber).

##### **a) Biorreator do tipo tanque agitado**

Os biorreatores do tipo tanque agitado são bastante utilizados na biotecnologia moderna. A maior parte dos produtos oriundos do cultivo de células animais em grande escala é fabricada nesse biorreator. Em geral, são muito semelhantes aos fermentadores, sendo de projeto simples, em forma de tanque, os quais se empregam impelidores para promover a mistura (CATAPANO *et al.*, 2008). A Figura 10 a seguir ilustra a configuração de um biorreator do tipo tanque agitado operando em perfusão, com dispositivo de retenção celular.



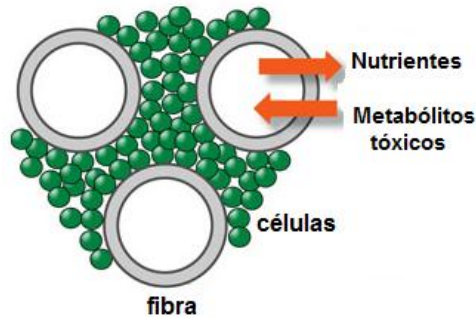
**Figura 10** - Esquema típico do sistema de perfusão utilizando dispositivo de retenção celular externo (CATAPANO *et al.*, 2008).

### b) Biorreator de fibras ocas

O biorreator de fibras ocas têm sido amplamente utilizado em cultura de célula animal para produção de proteínas recombinantes, desde sua utilização por Knazek *et al.* (1972), que descobriu um método de crescimento celular com densidade perto daquele encontrado *in vivo*, isto é,  $10^8$  cél/mL (CADWELL, 2004). O biorreator de fibras ocas para culturas celulares foi criado para imitar o ambiente celular *in vivo*. Nos tecidos, as células estão imobilizadas em altas densidades e são irrigadas via capilares através de suas paredes semipermeáveis. O líquido (sangue) circulando através dos capilares fornecem oxigênio e nutrientes, removendo o  $\text{CO}_2$  e outros produtos tóxicos. Essa descrição se aplica de maneira equivalente ao sistema de fibras ocas, mas com meio de cultura ao invés de sangue e com capilares feitos de membranas de micro e ultrafiltração (DAVIS, 2007).

O biorreator de fibras ocas é basicamente um cilindro composto de membranas semipermeáveis na forma de capilares dos mais diversos materiais, denominado EIC (espaço intracapilar) confinadas dentro de uma carcaça cilíndrica, pelo qual o meio de cultura flui em seu interior. As fibras são fabricadas de diversos materiais, tais como ésteres de celulose e polissulfona, e o caráter poroso das mesmas, permite a troca de nutrientes e metabólitos. As moléculas de glicose e amônia (baixa massa molar) podem mover-se livremente através dos poros das fibras. O espaço extracapilar (EEC), entre os capilares e a carcaça cilíndrica é, normalmente, o local onde as células proliferam em condições parecidas as de seu ambiente fisiológico no tecido de origem (CHICO, 2008).

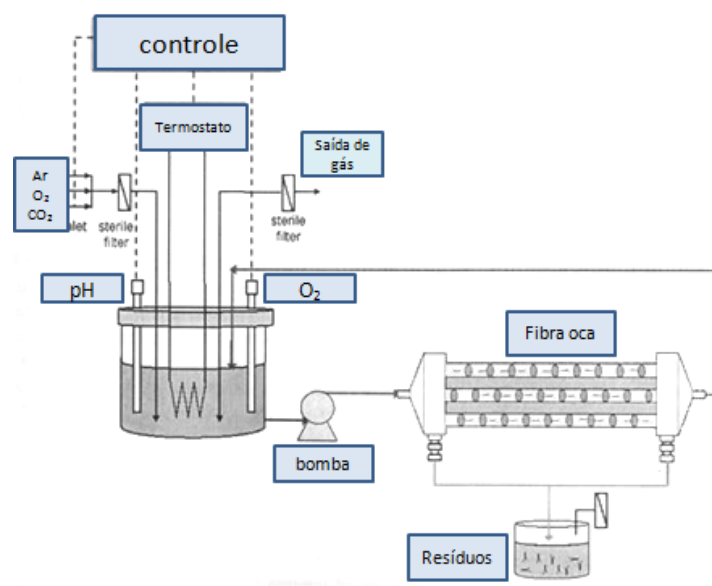
Assim, a população celular cresce no EEC do cartucho de fibras ocas ao receber os nutrientes provenientes do meio intracapilar que se difundem através das fibras do biorreator. Os produtos metabólicos inibitórios (gerados como consequência do crescimento celular), difundem-se na direção oposta e se diluem no meio que circula no EIC, como mostra a Figura 11(CHICO, 2008).



**Figura 11** - Ilustração das células crescendo ao redor das fibras ocas no EEC e o fluxo de nutrientes e de gases em um biorreator de fibra oca (WHITFORD e CADWELL, 2009).

Com o propósito de garantir um funcionamento ótimo desses biorreatores, podem-se modificar alguns parâmetros como material das fibras, quantidade das fibras, dimensões do cartucho, tamanho dos poros, etc. Além disso, há diversas possibilidades de controle de temperatura, pH, transferência de  $O_2$  que assegurem condições ótimas para o crescimento celular (CATAPANO *et al.*, 2008).

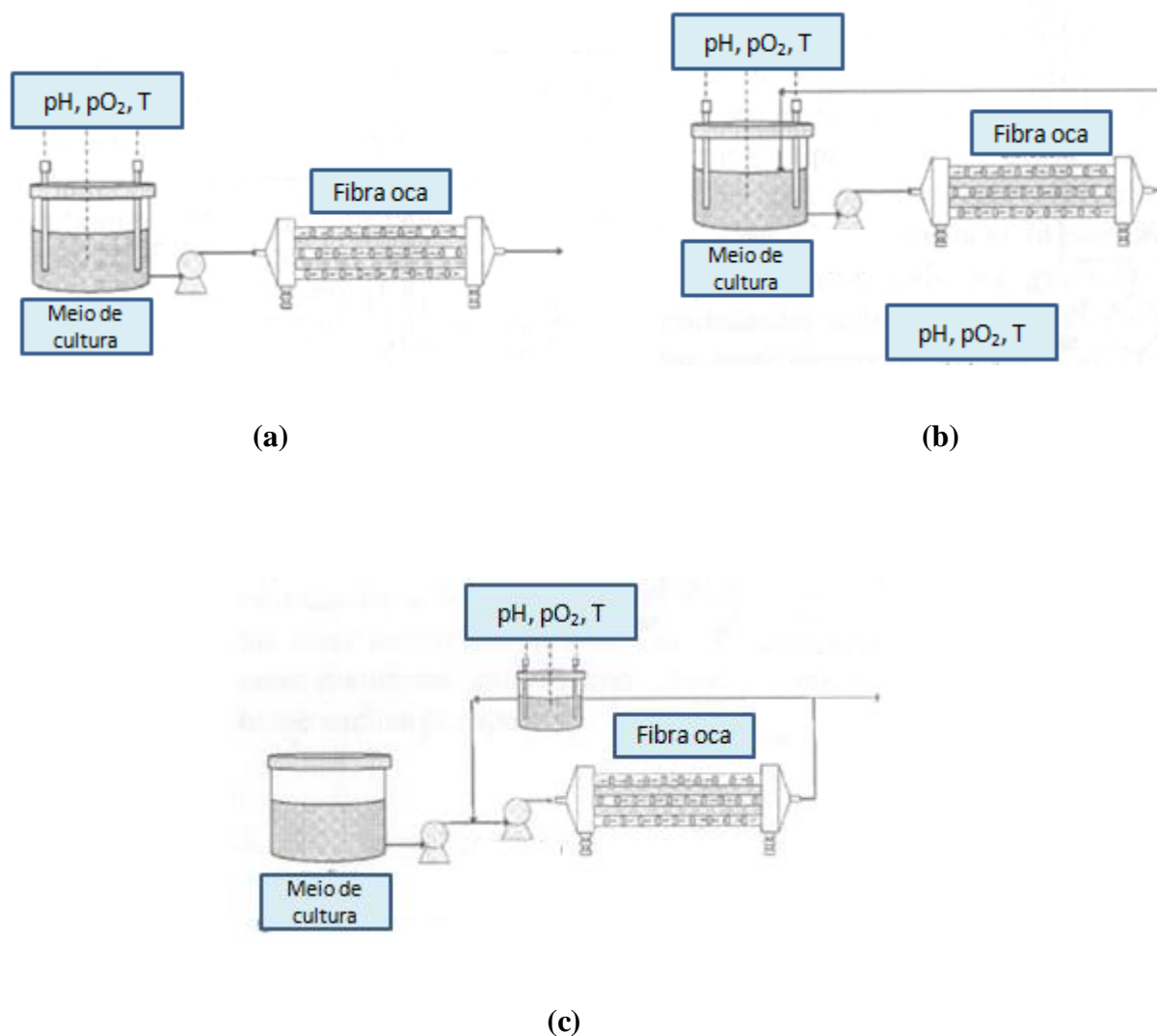
A Figura 12 abaixo ilustra um cultivo celular geral utilizando o biorreator de fibra oca, com as células crescendo no EEC.



**Figura 12** - Ilustração geral do funcionamento do biorreator de fibra oca.



Podem ser utilizadas outras configurações do funcionamento do biorreator de fibra oca como: meio de cultura com controle de pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido fluindo pelo módulo (a) apenas uma vez, (b) continuamente recirculando e (c) contínua adição de meio de cultura fresco e remoção de meio cultivado contendo células, ambas operações ocorrendo à mesma vazão, como mostra a Figura 13.



**Figura 13** - Esquema dos diferentes modos de operação do biorreator de fibra oca: (a) fluxo no módulo apenas uma vez, (b) continuamente recirculando e (c) contínua adição de meio de cultura fresco e remoção de meio cultivado contendo células (CATAPANO *et al.*, 2008).

O biorreator de fibra oca apresenta inúmeras vantagens como: alta concentração de produto (acúmulo de produto no espaço extracapilar (EEC) e não há diluição do produto como em sistemas homogêneos); cultura celular protegida do estresse mecânico (o fluxo de meio de cultura é separado das células por uma membrana capilar; altas densidades celulares ( $\geq 10^7$ - $10^8$  cél/mL); a cultura celular é mantida em um ambiente fisiológico

apropriado permitindo suprimento de nutrientes e remoção de metabólitos; sistema barato e simples, pois exige apenas suplemento de CO<sub>2</sub> e eletricidade, quando comparado com o tanque agitado (DAVIS, 2007).

Apresenta inúmeras aplicações como: produção de anticorpos monoclonais (DEWAR *et al.*, 2005), produção de proteínas recombinantes (CADWELL 2004; BAXTER *et al.*), produção de vírus (BILLELO *et al.*, 1994; LEONG *et al.*, 2007; JARDIN *et al.*, 2008), engenharia de tecidos (YE *et al.*, 2007); cultivos de células animais (HOESLI *et al.*, 2009) e mais recentemente na expansão de células-tronco (HOESLI *et al.*, 2009).

O seu uso com células-tronco é muito incipiente, mas apresenta características essenciais para expansão como: altas densidades celulares, pouco estresse mecânico, constante alimentação nutricional e pelo fato de apresentar fibras para aderência das células nas mesmas (WHITFORD e CADWELL, 2009).

### ***Cultivos celulares utilizando o biorreator de fibra oca***

A expansão extensiva *in vitro* de células tem uma forte dependência de fatores técnicos, especialmente do procedimento de isolamento e das condições de expansão no biorreator (DIGIROLAMO *et al.*, 1999).

Em particular, as condições de expansão exercem uma influência de extrema relevância na velocidade de proliferação e no potencial de diferenciação das células-tronco. Apesar do amplo uso de sistemas de culturas estáticas, como frascos T ou placas de Petri para cultivo de células, estes apresentam sérias limitações de não homogeneidade que resultam em gradientes de concentração (ex: pH, oxigênio dissolvido e metabólitos) no meio de cultivo (PORTNER *et al.*, 2005).

Uma alternativa da engenharia para suprir tais limitações é a utilização do biorreator de fibra oca. Diversos trabalhos têm sido descritos na literatura utilizando esse biorreator com células distintas e para fins variados. A Tabela 7 abaixo apresenta as características e vantagens em um cultivo com o biorreator de fibra oca.

**Tabela 7** – Características e vantagens em cultivos com o biorreator de fibra oca (WHITFORD e CADWELL, 2009).

CARACTERÍSTICAS	VANTAGENS
100x densidade celular	Aumento da eficiência na expansão celular
Facilidade de operação e controle automatizado	Redução de treinamento pessoal e requisitos
Redução de resíduo operacional	Diminuição nos custos de operação e preocupação ambiental
Risco de contaminação reduzido	Redução nos custos de operação e tempo de trabalho
Fornecer um ambiente espacial orientado e controlado	Permite estruturação do trabalho
Geração de baixa turbulência e forças de cisalhamento	Redução do estresse celular; não é necessário o uso de proteção para as células
Contínua reposição de meio de cultura fresco	Permite melhor crescimento celular
Sistema fechado	Fornecer aumento na biossegurança e reduz o risco de contaminação

A primeira aplicação do biorreator de fibra oca em larga escala foi para produção de anticorpos monoclonais utilizando hibridomas. As vantagens da utilização desse biorreator para esse fim são: concentração de anticorpos tipicamente 100 vezes maiores do que outros sistemas de cultivo; adaptação de meio livre de soro é facilitada por altas densidades celulares; anticorpos quiméricos, humanizados e não-murinos podem ser facilmente produzidos e os anticorpos podem ser produzidos em um único cartucho por mais de seis meses de cultura contínua (CADWELL, 2004).

Dewar *et al.* (2005) estudaram a produção de anticorpos monoclonais em hibridomas utilizando o biorreator de fibra oca para fins industriais. Nesse estudo, eles compararam a produção de anticorpos monoclonais (mAb) *in vitro* utilizando o biorreator de fibra oca e *in vivo* por tumores ascíticos. Concluíram que o sistema de biorreator de fibra oca é um alternativa viável para produção de anticorpos monoclonais em larga escala quando comparado ao método convencional. Assim, a existência de um método *in vitro* validado para produção de mAb iria forçar o governo europeu a banir a produção de anticorpos com a utilização de animais. Obviamente que a produção *in vitro* de mAb requer tecnologias mais complexas e requerem uma cultura celular adicional, porém tem a vantagem clara de evitar a dor e o estresse animal. Handa-Corrigan *et al.* já havia feito o mesmo estudo em 1995, utilizando a mesma linhagem celular, porém dizia que era necessário maiores aprimoramentos para o processo de validação.

Outra razão pela qual o biorreator de fibra oca vem ganhando especial interesse é o seu uso para produção de proteínas recombinantes. Células CHO e HEK 293 são as utilizadas, mas outros tipos celulares tem sido usados, incluindo células de inseto, como a *Drosophila*. De acordo com Cadwell (2004), o biorreator de fibra oca é útil para produção de 10-100mg de proteína recombinante (CADWELL, 2004).

Baxter *et al.*, demonstraram em seu estudo que o biorreator de fibra oca é uma poderosa ferramenta para produção de proteína recombinante de *Drosophila*. Mostraram que é possível a produção funcional de proteína recombinante continuamente por vários meses com a necessidade mínima de manutenção. A célula de inseto cresce com altas densidades e produz proteínas funcionais concentradas em um pequeno volume, simplificando e economizando a purificação.

A produção de vírus também tem sido uma aplicação atrativa para o uso do biorreator de fibra oca. O crescimento celular com alta densidade pode fornecer uma cinética de infecção rápida e única para propagação do vírus. Protocolos efetivos para produção de diferentes vírus tem sido elucidados. As primeiras tentativas para produção de vírus nesse biorreator foram realizadas com as linhagens 3T3 ou PA317, células de origem fibroblástica extremamente aderentes. Os resultados foram ótimos, pois houve um rápido crescimento celular na membrana, reduzindo o volume de 10-15 mL para 0,5 mL. Porém, a propagação do vírus por infecção não foi tão efetiva, pois apenas a camada exterior de células pôde ser infectada (CADWELL, 2004).

Outros tipos de vírus tem sido muito estudados nesse biorreator, incluindo hepatite C, Epstein-Barr, baculovírus, *Vaccinia* e HIV.

Jardin *et al.* (2008) estudou a expressão da proteína SEAP por baculovírus na célula HEK 293 em biorreator de fibra oca. Os seus resultados foram promissores e mostraram que a produção da proteína recombinante pôde ser mantida e estendida por um período de 30 dias no biorreator.

Leong *et al.* (2007) desenvolveram um método para expansão do vírus HIV-1 em linfócito humano utilizando um biorreator de fibra oca com MWCO (Molecular Weight Cut Off) de 20kDa. Seus resultados mostraram que o biorreator é capaz de suportar o crescimento da célula sob condições ótimas.

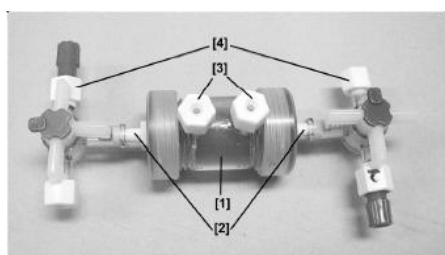
Billelo *et al.* (1994) realizou um estudo para validação de um método *in vitro* utilizando o biorreator de fibra oca para efeito de agentes antiretrovirais. Para isso, utilizaram a célula CEM não-infectada e infectada com o vírus HIV tipo 1 no biorreator de fibra oca.

Administraram então a droga 2',3'-Didehydro-3'-Deoxythymidine e avaliaram a infecção viral e a desintegração do DNA do HIV por PCR. Com seus resultados, chegaram a uma dose mínima de medicamento para administração em pacientes portadores de HIV-1 e concluíram que o biorreator de fibra oca é uma poderosa ferramenta para estudos de modelos farmacodinâmicos, podendo ser extremamente útil em processos de evolução clínica.

Em uma recente pesquisa realizada por McSharry *et al.* (2009) investigaram a aplicação de uma nova droga Cidofovir para tratamento da varíola. Eles utilizaram um método original com o uso do biorreator de fibra oca para determinar a farmacodinâmica da infecção pelo vírus Vaccinia das células HeLa-S3 tratadas com cidofovir. A partir desse estudo, conseguiram determinar a dose da droga recomendada para o tratamento da varíola e abriram portas para uso desse sistema para testes de novas drogas para diversas doenças.

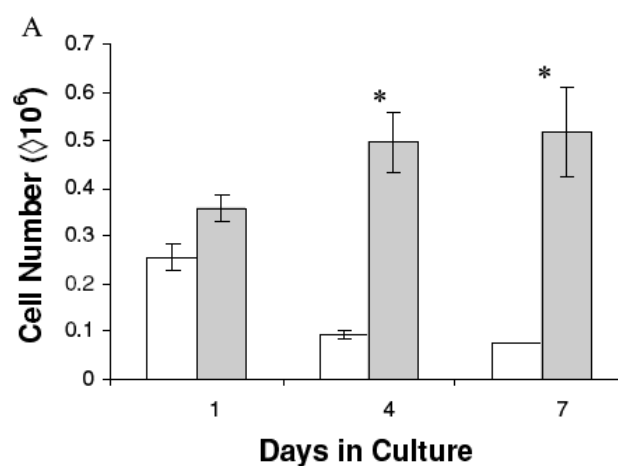
Novos desenvolvimentos no campo da engenharia de tecidos estão relacionados com formação de tecidos e órgãos. Alguns tecidos engenheirados já estão disponíveis comercialmente ou estão sob triagem clínica. No entanto, atualmente, apenas cartilagem e tecidos da pele são capazes de serem produzidos com sucesso. A massa de tecido 3D que pode ser produzido *in vitro*, principalmente tecidos densos, são muito limitados. Para desenvolver um tecido 3D, os problemas de suprimento de nutrientes e oxigênio para as células e remoção de resíduos tóxicos devem ser solucionados. Então, uma solução da engenharia para suprir a necessidade de oxigênio e nutrientes necessários para crescimento de tecidos *in vitro*, concomitante com remoção dos resíduos tóxicos as células, é o uso do biorreator de fibra oca (Ye *et al.*, 2007).

Para resolver tais limitações, Ye *et al.* (2007) desenvolveram um biorreator de fibra oca com scaffolds para produção de tecidos. O cilindro do biorreator foi confeccionado de policarbonato (13 mm I.D.; 22 mm O.D.; 40 mm L.), as membranas de acetato de celulose (200µm I.D. e 10kD MWCO), a distância entre as fibras de 400 µm e o volume externo de 3,5 mL, como ilustra a Figura 14 a seguir.



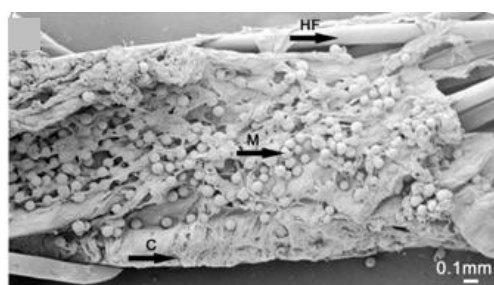
**Figura 14** - Biorreator de fibra oca utilizada no experimento com microcarregador Cytodex-1 e fibroblastos da medula óssea, sendo que (1) cilindro de policarbonato, (2) portas para EIC, (3) portas para EEC e (4) retirada de amostras.

Para isso, utilizaram gel de colágeno e microcarregador Cytodex 1 como substrato 3D. Fibroblastos da medula óssea de ratos foram pré-inoculadas com microcarregador Cytodex 1 em frasco spinner para permitir a proliferação celular e subsequentemente inoculadas no biorreator com gel de colágeno. O biorreator foi alimentado com meio de cultura através das membranas por um período de 7 dias. Outro biorreator contendo uma cultura celular com as mesmas condições, porém sem perfusão, foi utilizado como controle. A proliferação, viabilidade, metabolismo e aparência morfológica das células com perfusão e o controle foram comparados. O crescimento celular foi mensurado pelo reagente Alamar blue. A Figura 15 mostra o gráfico de crescimento celular durante o experimento.



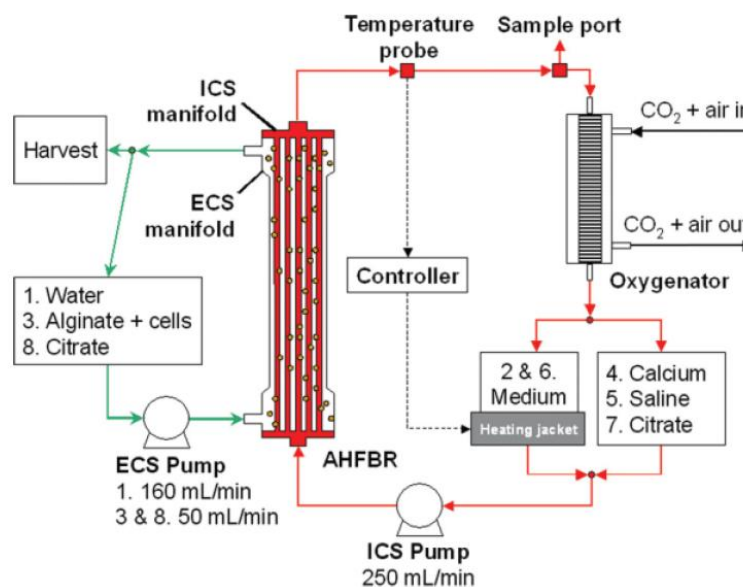
**Figura 15** – Número de células quantificadas pelo corante Alamar blue, sendo que: □ não-perfusão e ■ perfusão.

Com esse trabalho, concluíram que o sistema de perfusão no biorreator de fibra oca combinado com microcarregador e colágeno resultam em um aumento (fator de expansão = 1,6) na sobrevivência das células aderentes nas estruturas 3D com formação de tecido. A Figura 16 mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura do sistema do biorreator de fibra oca com microcarregadores e colágeno.



**Figura 16** - Microscopia eletrônica de varredura do sistema do biorreator de fibra oca, sendo que M = microcarregador, C = colágeno e HF = fibras.

Outro trabalho significativo foi desenvolvido por Hoesli *et al.* (2009), em que se utilizou uma matriz de alginato como scaffold 3D para imobilização de células CHO e posterior recuperação em biorreator de fibra oca. O sistema montado pelo pesquisador em questão está ilustrado na Figura 17 abaixo.

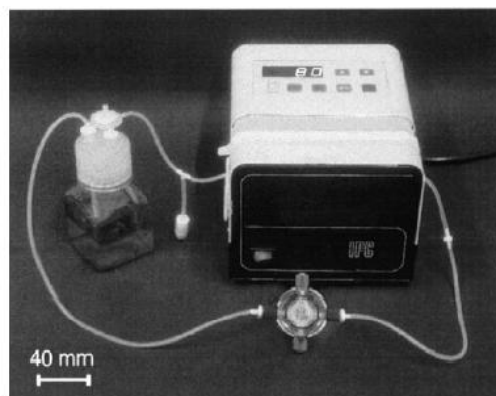


**Figura 17** - Ilustração do biorreator de fibra oca utilizado no experimento.

A camada de alginato sobre as fibras do biorreator foi feita passando-se o alginato (3%) no EEC e cloreto de cálcio no EIC. O resultado foi o recobrimento das fibras com o gel de alginato. As células foram inoculadas no EEC na concentração de  $1 \times 10^5$  cél/mL. Para recuperação celular, injetou-se citrato de sódio no EIC, gerando a dissolução do alginato (o citrato captura os íons cálcio, responsáveis pela formação do gel de alginato). A recuperação celular foi de 83%.

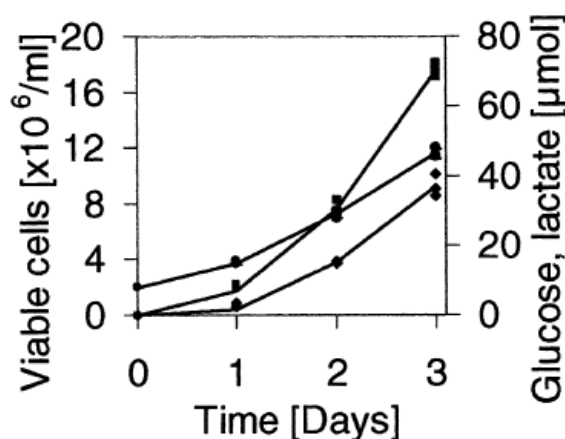
Assim, sistema de biorreator de fibra oca recoberto com alginato foi utilizado com sucesso para cultura de células pancreáticas para produção de insulina. Com esse método foi possível intensificar a produção de insulina *in vitro*, e sua posterior utilização em pacientes para o tratamento de diabetes.

Gloeckner *et al.* (2001) confeccionou seu próprio biorreator de fibra oca para cultivo de linhagens leucêmicas. O cilindro do biorreator foi feito de policarbonato, fibras de acetato de celulose (16 $\mu$ m I.D) e volume externo de 1 mL. A Figura 18 ilustra o sistema de cultivo montado.



**Figura 18** - Biorreator de fibra oca utilizada no experimento de cultivo de linhagens leucêmicas.

A quantificação celular foi realizada pelo método Alamar blue. A linhagem leucêmica CCRF-CEM gerou o melhor resultado de expansão celular. A célula foi inoculada no EEC na concentração de  $2 \times 10^6$  cél/mL e o meio de cultura recirculado no EIC. O experimento teve duração de 3 dias. A Figura 19 mostra o gráfico de crescimento celular obtido no experimento.



**Figura 19** – Gráfico de crescimento celular obtido no experimento, sendo que ● crescimento celular, ■ produção de lactato e ◆ consumo de glicose.

O fator de expansão celular obtido no experimento foi de 5,5.

Como pode ser visto, os trabalhos envolvendo esse tipo de biorreator é extremamente abrangente, envolvendo diversos tipos de células e aplicações. No que diz respeito ao seu uso com células-tronco, poucas informações bibliográficas são encontradas. Porém, segundo Hoesli (2009), esse sistema de cultivo fornece inúmeras vantagens para utilização em cultivos com células-tronco e constitui uma alternativa viável para sua expansão.



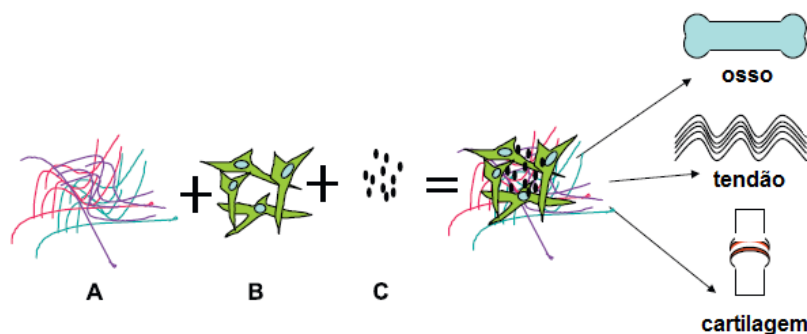
### 3.7.5 hMSC-TERT

A célula hMSC-TERT é uma linhagem de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana e imortalizadas por expressão da transcriptase reversa da telomerase (TERT). Como se sabe há muito tempo, o comprimento dos telômeros vai progressivamente diminuindo durante sucessivos ciclos de divisão celular, levando as células à senescência e esta, finalmente, à interrupção das divisões celulares. Os telômeros podem chegar a um tamanho que os torna ineficientes para a proteção das extremidades cromossômicas, resultando na crise – ou seja, em fusão dos cromossomos e morte celular apoptótica (JARDIM *et al.*, 2009). Assim, a célula hMSC-TERT é imortalizada pela expressão da TERT, uma proteína do complexo da telomerase que impede o encurtamento dos telômeros após cada ciclo celular e pode ser usada para gerar linhagens de células capazes de se expandir indefinidamente, mas que mantêm a sua taxa de crescimento fisiológico e as características funcionais (JARDIM *et al.*, 2009). Essa linhagem é considerada como modelo, no sentido de que uma pequena ou nenhuma alteração em seus atributos ocorre em um número crescente de passagens (WEBER *et al.*, 2007).

### 3.7.6 Aplicações terapêuticas

Uma vez que o isolamento *ex vivo* e a expansão das CTMs esteja bem definido, a próxima fronteira para fornecer aplicação terapêutica está concentrada na entrega adequada de células viáveis ao local desejado (PUNTOS *et al.*, 2007).

A área mais explorada para uso clínico das CTMs é o uso em protocolo na Engenharia de Tecidos. A Engenharia de Tecidos está envolvida em um novo campo que é a promessa da construção *in vitro* de tecidos para serem transplantados. Basicamente, três componentes principais são necessários para o sucesso da engenharia de tecidos. Primeiramente, um suporte tridimensional adequado. Segundo, células apropriadas capazes de se diferenciar e manter o perfil fenotípico da célula (célula-tronco). E por último, a adição de substâncias bioativas ideais como fatores de crescimento, citocinas e hormônios como estímulo apropriado para diferenciação específica das células, como mostra a Figura 20 (CSAKI *et al.*, 2008).



**Figura 20** - Princípio da engenharia de tecidos. A) material biocompatível, B) células adequadas (célula-tronco) e C) substâncias bioativas para estimular a diferenciação específica (CSAKI *et al.*, 2008).

A Engenharia de Tecidos com CTMs estão sendo largamente utilizadas para doenças locais como: defeitos ósseos, defeitos na cartilagem e tendão. As células injetadas são bem toleradas e bons resultados estão sendo obtidos nesses experimentos (ABDALLAH e KASSEM, 2007).

### 3.7.6.1 CTMs nos defeitos ósseos

Diversos estudos têm mostrado a eficácia do uso de CTMs no tratamento de defeitos ósseos. Os defeitos ósseos representam o maior desafio para engenharia de tecidos. A primeira demonstração de que as CTMs poderiam ser úteis nos casos de defeitos ósseos vieram de estudos realizados com pacientes com a doença osteogênese imperfeita (doença genética caracterizada por fraturas repetidas nos ossos) que receberam implantação alogênica total da medula óssea. O tratamento resultou no enxerto de osteoblastos, aumentando o conteúdo mineral de osso no corpo e crescimento no esqueleto (JORGENSEN *et al.*, 2004).

Shrouji e Livne (2005) demonstraram em seu estudo a seleção de uma subpopulação osteogênica de células-tronco da medula óssea de ratos e a posterior implantação em ratos que sofriam a doença da perda mássica de osso da idade avançada. Imagens de radiografia mostraram calcificação no local doente e nova formação de osso depois de 6 semanas do enxerto.

Promessas para aplicações ortopédicas, especialmente para formação óssea, é o uso natural de biomateriais para carreamento das CTMs. Avanços recentes no campo de biomateriais tem determinado a transição do uso de materiais não-porosos e inertes (cerâmica e titânio) para porosos e biomateriais osteocondutivos (hidroxiapatita e fosfato de tricálcio). Compósitos de matriz-célula, compostos de cerâmica hidroxiapatita/fosfato tricálcio

carregados com CTMs autólogas expandidas *in vitro*, tem mostrado resultados positivos para defeitos ósseos (KRAMPERA *et al.*, 2006).

Yoshikawa *et al.* (1996) expandiu CTMs de rato *in vitro* dentro de hidroxiapatita porosa. Após uma semana de implantação subcutânea, a formação e maturação do osso já pôde ser vista.

### 3.7.6.2 CTMs nos defeitos condrogênicos

A promessa da engenharia de tecidos mais relevante são os defeitos condrogênicos, devido ao fato da cartilagem ter um baixo potencial de autocura, no caso de danos severos, causados por anormalidades, trauma, ou degeneração causado pela idade como osteoartrite (WANG *et al.*, 2005).

A engenharia de tecidos *in vitro* de cartilagem usando CTMs autólogas e suportes porosos 3D tem um poderoso potencial de reparo nos danos. Idealmente, tais suportes devem ter estrutura ótima e propriedades mecânicas, excelente biocompatibilidade e controle da razão de degradação (WANG *et al.*, 2005). Numerosas investigações *in vitro* e *in vivo* têm sido feitas com suportes biocompatíveis contendo agarose, ácido hialurônico e cola fibrina autóloga (HEDRICK e DANIELS, 2003).

CTMs de cabra derivados da medula óssea foram injetados com carreadores hialurônicos nos joelhos das cabras depois de um ressecção do ligamento. Os resultados mostraram a evidência de regeneração do menisco quando comparado com o controle. Em alguns animais, os resultados ainda mostraram um significativo remodelamento do osso subcondral, formação de cartilagem e preservação do revestimento da junta (KRAMPERA, 2006).

Wang *et al.*, (2005) desenvolveu um suporte para CTMs através de um processo aquoso com fibroína e adicionou dexametasona e TGF-  $\beta$ 3 para sobrevivência, proliferação e condrogênese de CTMs. Depois de 3 semanas de cultivo, o suporte exibiu características nativas da cartilagem.

Uma das melhores estratégias da medicina regenerativa para realizar um reparo na cartilagem defeituosa é o método de Transplante Autólogo de Condrócitos (TAC). O TAC foi introduzido em 1980 por um grupo sueco como um tratamento original para reparo da cartilagem na tentativa de resolver o problema da degeneração progressiva. Essa evidência tem levado ao desenvolvimento de CTMs baseada em estratégias da engenharia de tecidos que induzem a diferenciação *in situ* de progenitores mesenquimais em cartilagem. Em

pacientes humanos, o TAC tem sido realizado com 12000 pacientes em todo o mundo. Resultados depois de 3-9 anos são muito encorajadores, com uma redução significativa na dor em pacientes tratados (CSAKI *et al.*, 2008).

### 3.7.6.3 CTMs na engenharia do tendão

A habilidade das CTMs na diferenciação tendogênica tem sido demonstrada em diversos estudos. Um suporte carreador biocompatível é um pré-requisito para engenharia de tendão. Por exemplo, materiais naturais modificados como colágeno tipo I, dura-máter humana ou bovina e vários polímeros biossintéticos incluindo ácido poliglicólico, ácido polilático e polipropileno tem sido utilizados extensivamente para esse fim (HUANG *et al.*, 2006).

Zhao *et al.* (2009) investigou o efeito do uso das CTMs na cura do tendão em um modelo canino *ex vivo*. As células foram colocadas em gel de colágeno e implantadas no tendão dilacerado do cão. Após quatro semanas, o tendão reparado evoluiu em relação à força e rigidez. Os pesquisadores concluíram que o transplante tem um grande potencial para cura do tendão e os próximos testes serão realizados *in vivo*.

A Ruptura no Tendão de Aquiles (RTA) é a ruptura do tendão mais comum em humanos e a sua incidência está aumentando cada vez mais. Compósitos de colágeno e CTMs foram implantados em coelhos com RTA. Análises bioquímicas e histológicas revelaram uma melhora nas propriedades biomecânicas, na arquitetura do tecido, e na funcionalidade do tendão após a injúria (RINGE *et al.*, 2002).

Dressler *et al.*, (2005) isolou CTMs de coelhos com um ano de idade e expandiu com colágeno tipo I. Este compósito foi implantado em coelhos com defeito no terceiro tendão central. Duas semanas após a cirurgia, já se notou diferenças nas propriedades do material incluindo estresse máximo, módulo e força. Os resultados demonstraram que o modelo CTMs coelho é efetivo no reparo de injúrias leves no tendão.

### 3.8 Comentários sobre a revisão bibliográfica

Há um grande número de trabalhos na literatura envolvendo as células-tronco visando o entendimento do processo de diferenciação, aspectos morfológicos e expansão em sistemas de cultivo *in vitro* adequados, principalmente para a sua utilização na medicina regenerativa. Os estudos com células-tronco tem feito enormes avanços e, atualmente, é uma opção viável para diversos tipos de doenças.

Dessa forma, para utilização da célula-tronco na terapia celular, se faz necessário lançar mão de uma gama de disciplinas para um desenvolvimento bem caracterizado e economicamente viável de processo de cultura *in vitro* para expansão celular. Frascos spinner com microcarregadores tem sido o sistema de cultivo mais utilizado para expansão de células-tronco embrionárias e adultas. Mas apresentam limitações como estresse mecânico, acúmulo de metabólitos tóxicos e baixas densidades celulares. O biorreator de fibra oca supera essas limitações, pois a cultura fica protegida do estresse mecânico (fluxo do meio de cultura é separado das células por uma membrana capilar), a cultura celular é mantida em um ambiente fisiológico apropriado permitindo suprimento de nutrientes e remoção de metabólitos, além de permitir a obtenção de altas densidades celulares ( $10^7$ - $10^8$  cél/mL).

Não há trabalhos na literatura envolvendo expansão de células-tronco em biorreator de fibra oca. Assim, o presente trabalho se torna muito interessante devido ao seu potencial de contribuição na expansão de CTMs e ao ineditismo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Célula-tronco mesenquimal: preservação e condições de cultivo

Utilizou-se a linhagem de Células-Tronco Mesenquimais (*human Mesenchymal Stem Cells – hMSC*) derivadas da medula óssea humana, imortalizadas por expressão da transcriptase reversa da telomerase (*Telomerase Reverse Transcriptase -TERT*), hMSC-TERT, uma proteína catalítica da subunidade do complexo da telomerase que impede o encurtamento dos telômeros após cada ciclo celular, podendo ser usada para gerar linhagens de células capazes de se expandir indefinidamente, mas que mantêm a sua taxa de crescimento fisiológico e as características funcionais (JARDIM *et al.*, 2009). Como já dito na revisão bibliográfica, essa linhagem é considerada como modelo, no sentido de que uma pequena ou nenhuma alteração em seus atributos ocorre em um número crescente de passagens (WEBER *et al.*, 2007). Dessa forma, foi possível a comparação dos resultados experimentais. As células foram conservadas em nitrogênio líquido a -196°C, ativadas e multiplicadas a 37°C.

A linhagem hMSC-TERT foi fornecida pelo Dr. Dimas Tadeu Covas e sua equipe do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP).

#### 4.1.2 Meio de cultura

Para cultivo das células-tronco mesenquimais foi utilizado meio de cultura  $\alpha$ -MEM (*Minimum Essential Medium*) (Gibco) com adição de glicose, glutamina e arginina. Na Tabela 8 são apresentadas as composições dos meios de cultura utilizados.

**Tabela 8** - Composição do meio de cultura  $\alpha$ -MEM e suplementos utilizados para o cultivo de células-tronco mesenquimais neste trabalho.

COMPONENTES	QUANTIDADE	FABRICANTE
$\alpha$ -MEM em pó	10,2 g/L	GIBCO, EUA
Soro fetal bovino caracterizado	0,150 L	HyCLone, EUA
Hepes (1M)	0,016 L	GIBCO, EUA
Bicarbonato de sódio	1,2601 g/L	CULTILAB, Brasil
Penicilina e Streptomicina	0,01 L	GIBCO, EUA
Água Milli-Q*	1L	MILLIPORE, ALEMANHA
Glicose	0,464 g/L	SIGMA-ALDRICH, EUA
Glutamina	0,1472 g/L	SIGMA-ALDRICH
Arginina	0,444g/L	SIGMA-ALDRICH

\*Filtrada através de membranas de resina de 0,22  $\mu$ m (Millipore).

#### 4.1.3 Solução tampão de fosfato PBS (*Phosphate Buffer Saline*)

A solução de PBS utilizada foi preparada no laboratório. O pH foi ajustado entre 7,2 e 7,4 mediante o uso de solução de HCl 1M e de NaOH 1M. A Tabela 9 apresenta a composição do PBS.

**Tabela 9** - Solução de PBS preparada no laboratório e utilizada nesta pesquisa.

COMPONENTE	QUANTIDADE
NaCl	8 g/L
KCl	0,2 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g/L
Água Milli-Q*	1L

\*Filtrada através de membranas de resina de 0,22  $\mu$ m (Millipore).

#### 4.1.4 Corante

O azul de tripan é um corante diazo usado para distinguir células viáveis de células mortas. A solução aquosa de azul de tripan 0,4% (v/v) (GIBCO, EUA) foi utilizada para determinar a densidade e a viabilidade celular no hemacitômetro.

#### 4.1.5 Tryple™ Express

A Tryple™ Express (GIBCO) é uma enzima recombinante derivada de fermentação microbiana e foi utilizada para desaderir as células de frascos T e microcarregadores nos experimentos.

#### 4.1.6 Microcarregador

O microcarregador utilizado nos cultivos foi o Pronectin®F. O pronectin®F (SIGMA-ALDRICH, EUA) é um microcarregador de poliestireno com um fina camada de um polímero recombinante de origem não animal com ligantes de fibronectina humana e unidades RGD interespaçados com unidades de peptídeos, promovendo a adesão de células de diferentes linhagens.

**Tabela 10** - Características do microcarregador Pronectin®F (SIGMA-ALDRICH).

CARACTERÍSTICAS	VALOR
Densidade (g/mL)	1,02
Diâmetro (µm)	125-212
Concentração de microcarregador utilizado (g/L)	20,0

#### 4.1.7 Antiaderente Sigmacote®

O Sigmacote® (SIGMA-ALDRICH, EUA) é uma solução especial de heptano que forma um filme neutro e hidrofóbico (ligações covalentes) com o vidro para impedir a adesão de células e microcarregadores nas paredes do frasco spinner.

#### 4.1.8 Reagente MTT para quantificação de células viáveis

O kit baseado no MTT ou Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (SIGMA-ALDRICH, EUA) é um método colorimétrico que mensura a atividade da enzima mitocondrial desidrogenase que reduz o MTT (amarelo) ao formazan (roxo). Foi utilizado para determinar indiretamente a densidade celular dos cultivos em frasco



spinner, por espectrofotometria ( $\lambda = 570$  nm), em função da atividade mitocondrial das células vivas.

#### **4.1.9 Reagente Lactato Desidrogenase (LDH) para quantificação de células viáveis**

O kit baseado na LDH (SIGMA-ALDRICH, EUA) é um método colorimétrico em que através da lise celular (solução de lise), o  $\text{NAD}^+$  (proveniente do kit) é reduzido pela LDH à NADH. O NADH é então, utilizado na conversão estequiométrica do corante tetrazólio (kit), formando um derivado de formazan vermelho. Assim, o método foi utilizado para determinar indiretamente a densidade celular do cultivo em frasco spinner, por espectrofotometria ( $\lambda = 492$  nm), em função da quantidade da enzima lactato desidrogenase (LDH) citoplasmática liberada no meio de cultivo proveniente de células lisadas.

#### **4.1.10 Reagente manose**

O reagente D-manose (SIGMA-ALDRICH, EUA) foi utilizada nos cultivos 4 e 5 na tentativa de evitar a formação de aglomerados de microcarregadores.

#### **4.1.11 Cola epóxi**

O adesivo estrutural LOCTITE E - 40FL epóxi (HENKEL) foi utilizado para colar os aparatos do biorreator de fibra oca. Esse adesivo é coesivo e possui alta resistência a altas temperaturas.

#### **4.1.12 Frascos de cultura**

Foram utilizados frascos de cultura celular (frascos T) com área superficial de  $25 \text{ cm}^2$  e de  $75 \text{ cm}^2$  de poliestireno (TPP, EUA) para a expansão de células em cultura estática.

#### **4.1.13 Frasco Spinner**

Foi utilizado Frasco Spinner de 100 mL (BELLCO, EUA) para os cultivos com microcarregador.

#### **4.1.14 Biorreator de fibra oca**

O biorreator de fibra oca foi montado no laboratório com fibras de polissulfona e cilindro de policarbonato cedidas pela GE Healthcare. Os demais aparatos foram fabricados pela oficina mecânica do Departamento de Química, UFSCar.

#### **4.2 Métodos analíticos**

Os métodos analíticos utilizados nos experimentos realizados foram os seguintes:

##### **4.2.1 Preservação das células**

As células foram preservadas em tubos de criogenia em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Para o congelamento, as células foram retiradas de culturas na fase de crescimento exponencial e centrifugadas a 1600 rpm por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio de congelamento (90% v/v de meio de cultura  $\alpha$ -MEM e 10% v/v de DMSO) a uma densidade de  $1 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>. Foram congeladas primeiramente em ultrafreezer durante 24 horas em uma taxa de congelamento constante de  $-1^{\circ}\text{C}$  por minuto promovida pela utilização de reservatório específico (para condicionamento dos vials) contendo álcool isopropílico, e então armazenadas em nitrogênio líquido.

##### **4.2.2 Descongelamento de células e ativação**

Para o descongelamento das células, o tubo de criogenia foi retirado do nitrogênio líquido e, após o descongelamento a temperatura ambiente, a suspensão de células foi transferida para um tubo Falcon contendo 10mL de meio de cultura e centrifugada a 1600 rpm por 5 minutos. O meio de cultura foi em seguida descartado para remoção do DMSO (dimetilsulfóxido), o pellet de células ressuspensado em 1 mL de meio de cultura e transferido para uma garrafa de cultura de 25 cm<sup>2</sup> contendo 4mL de meio de cultura.

### 4.2.3 Análise de densidade e viabilidade celular

Para a análise de viabilidade e densidade de células foi utilizado o método de exclusão do corante azul de tripan em hemacitômetro (DOYLE & GRIFFITHS, 1998). Foram contados 16 quadrantes (8 quadrantes/câmara) para diminuir os erros de contagem. A média e o desvio padrão das medidas de densidade e viabilidade celular foram determinados considerando 4 eventos de contagem, sendo cada evento representado pela contagem de 4 quadrantes.

A densidade celular foi determinada pela contagem em hemacitômetro. Foram retiradas alíquotas de 20 µL do recipiente em questão e, em seguida, foi acrescentado 20µL de uma solução etfílica 0,4% (m/v) azul de Tripan preparado previamente.

A densidade celular total é dada pelo somatório do número de células não coradas (viáveis) somado com o número de células coradas (não viáveis), multiplicado pelo fator de diluição e pelo volume de um quadrante da câmara de Neubauer, como mostra a equação 4.1.

$$(n_v + n_d) \times FD \times V_c = X \text{ (células} \cdot \text{mL}^{-1}) \quad (4.1)$$

A densidade de células viáveis é dada pelo número de células viáveis, multiplicado pelo fator de diluição e pelo volume de um quadrante da câmara de Neubauer, de acordo com a equação 4.2.

$$n_v \times FD \times V_c = X \text{ (células} \cdot \text{mL}^{-1}) \quad (4.2)$$

Já a viabilidade celular é dada pela razão entre o número de células viáveis e o número de células total no meio (células viáveis e inviáveis), multiplicados por 100, como mostrado na equação 4.3.

$$\frac{n_v}{n_v + n_d} \times 100 = \% \text{ de células viáveis} \quad (4.3)$$

Onde  $n_v$  é o número total de células viáveis,  $n_d$  é o número total de células mortas,  $X$  é a densidade celular,  $V_c$  é o volume de um quadrante da câmara de Neubauer e  $FD$  é o fator de diluição da suspensão de células. O volume de um quadrante da câmara de contagem é de  $10^{-4}$  mL.

#### 4.2.4 Determinação da densidade celular total pelo método baseado no MTT

Para a aplicação do método baseado no MTT foi necessária a preparação de uma curva de calibração da densidade celular em função da absorbância antes de iniciar um experimento de expansão de CTMs. As curvas de calibração utilizadas nos experimentos realizados são mostradas no Apêndice A.

Para reação, 20µL da solução MTT foi adicionada em 200 µL de amostra que foram, em seguida, homogeneizadas e colocadas na incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 4 horas. Após esse período de reação, uma solução ácida de isopropanol foi adicionada para a solubilização do cristal de formazan azul escuro. Em seguida, a amostra foi centrifugada, para a sedimentação dos microcarregadores e dos restos celulares, e o sobrenadante foi analisado, em triplicata, no espectrofotômetro de placas de 96 poços. A Figura 21 apresenta a reação envolvida no método descrito.

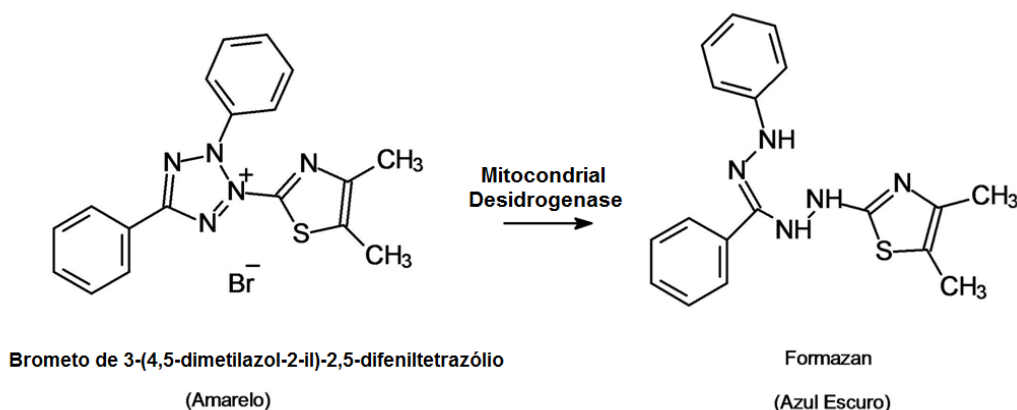
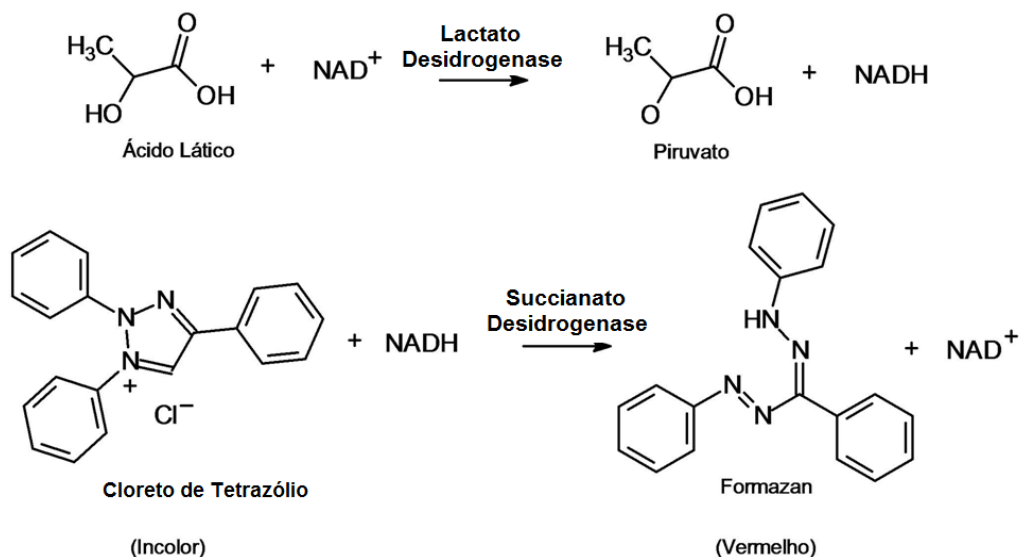


Figura 21 - Representação da reação enzimática em que se fundamenta o método do MTT.

#### 4.2.5 Determinação da Densidade Celular pelo Método baseado na LDH

Para a aplicação do método baseado na LDH foi necessária a preparação de uma curva padrão da densidade celular em função da absorbância. Os valores dos parâmetros da equação linear que correlaciona essas duas grandezas estão apresentados no Apêndice A. Em amostras do sobrenadante, foram adicionados alíquotas iguais de solução de ácido láctico, de NAD<sup>+</sup> e de cloreto de tetrazólio provenientes do kit da Sigma. Nas reações, o NAD<sup>+</sup> foi reduzido pela LDH à NADH. O NADH foi, então, utilizado na conversão estequiométrica do corante tetrazólio, formando um derivado de formazan vermelho que foi homogeneizado por agitação da solução. Posteriormente, a solução foi centrifugada para a sedimentação dos

restos celulares e o sobrenadante foi analisado por espectrofotometria, em triplicata, em uma placa de 96 poços. As medidas foram realizadas no comprimento de onda de 492 nm. A Figura 22 mostra as reações enzimáticas envolvidas no método descrito.



**Figura 22** - Representação das reações enzimáticas envolvidas no método da LDH.

#### 4.2.6 Análise de glicose e ácido láctico

Para análise de carboidratos utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com coluna de resina Aminex HPX-87H (Bio-rad), fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM, temperatura de 65°C e fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> em cromatógrafo Waters com detecção através do índice de refração (W410, Waters) para carboidratos e UV 210 nm para ácido láctico.

#### 4.2.7 Análise de aminoácidos

Durante os cultivos em frasco spinner, amostras do sobrenadante foram separadas e congeladas a -20°C para posteriores análises dos aminoácidos.

A análise foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), baseada no método proposto por Henrikson e Meredith (1984). Uma coluna pico-tag (Waters, Ireland) foi utilizada como fase estacionária e como eluente um gradiente constituído por duas fases móveis A e B. A fase A é composta de acetato de sódio tri-hidratado, trietilamina, água milli-Q e acetonitrila. A fase B apenas água e acetonitrila. As condições de operação do cromatógrafo da Waters foram: temperatura de 36 °C, tempo de corrida de 45 minutos e

gradiente com vazão pré-determinada. Os picos foram detectados no comprimento de onda 254 nm.

As amostras do sobrenadante do cultivo foram preparadas segundo as etapas de filtração, secagem, reidratação, derivatização até sua diluição em tampão antes da injeção no equipamento. Uma curva padrão foi preparada para cada aminoácido a partir de uma solução padrão da Waters. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

#### **4.2.8 Análise de amônia**

As análises de amônia foram feitas nas amostras do sobrenadante do meio de cultivo em eletrodo íon seletivo. O medidor da Thermo Scientific (EUA), modelo ORION 710A, foi utilizado para obter as medidas de milivoltagem. Foi preparada uma curva padrão a partir de uma solução padrão contendo amônia (cloreto de amônia - SIGMA-ALDRICH, EUA).

#### **4.2.9 Análise de Citometria de Fluxo**

As células recuperadas do microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F, após o cultivo em frasco spinner e biorreator de fibra oca, foram descongeladas e cultivadas em frasco T até atingir 80% de confluência. Em seguida, foram desaderidas do frasco T com Tryple<sup>™</sup> e divididas em alíquotas de 100 µL de PBS com  $2 \times 10^5$  células. Uma imunomarcção com os seguintes anticorpos monoclonais foi realizada por 15 minutos na temperatura ambiente, com a ausência de luz: Anti-CD73-PE, Anti-CD105-PerCP, Anti-CD90-PE, Anti-HLA-ABC-PE, Anti-CD31-PE, Anti-CD45-APC, Anti-CD14-PE e Anti-HLA-DR (PerCP). Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS para análise no citômetro de fluxo (FASCalibur BD, EUA) utilizando o software *CELLQuest™*. As análises foram realizadas pela gerente do laboratório de citometria de fluxo Patrícia Palma Bonini do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto.

#### 4.2.10 Diferenciação Celular

A diferenciação celular consistiu em suplementar o meio de cultura com indutores específicos de acordo com o tipo de diferenciação. Em uma microplaca de 24 poços, foram inoculadas  $4 \times 10^4$  células por poço com o meio de cultura  $\alpha$ -MEM suplementado com 7,5% (v/v) de SFB e 1% (v/v) de solução contendo penicilina/streptomicina. Apenas 8 poços foram utilizados: 3 para a indução em osteócitos, 2 em adipócitos e 3 para o controle do procedimento. Cada poço continha uma lamínula de vidro (13 mm de diâmetro) previamente alocada no fundo. A placa de poços foi mantida na incubadora úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

O cultivo foi dividido em 3 fases: adesão, pré-indução e diferenciação propriamente dita. Na Tabela 11 estão representadas as condições utilizadas em cada fase.

**Tabela 11** – Etapas para avaliar a capacidade de diferenciação da linhagem hMSC-TERT em osteócitos e adipócitos após o cultivo m frasco spinner.

	Adesão	Pré-indutora	Diferenciação
<b>Duração</b>	24 horas	10 dias	14 dias
<b>suplementação do meio de cultura</b>	-	osteócitos: $10^{-8}$ M de dexametasona e 50 mM de ác. ascórbico-2-fosfato; adipócitos: $10^{-8}$ M de dexametasona e 5 $\mu$ M de rosiglitazona;	osteócitos: 2 mM de $\beta$ -glicerolfosfato adipócitos: 2,5 mg.mL <sup>-1</sup> de insulina
<b>troca de meio de cultivo</b>	-	metade a cada 2-3 dias	metade a cada 2-3 dias

No final da análise, uma coloração citoquímica foi realizada nas lamínulas de vidro para confirmar a diferenciação da linhagem hMSC-TERT em osteócitos e adipócitos.

Para os osteócitos, as lamínulas de vidro foram lavadas em PBS e mantidas imersas em solução de nitrato de prata durante 5 minutos. Em seguida, as amostras foram fixadas em álcool 70% (v/v). O excesso do nitrato de prata foi removido por sucessivas lavagens com água destilada. Após a fixação, foram colocadas por 2 minutos em hematoxilina, sendo posteriormente lavadas com água destilada.

Para os adipócitos, gotas do corante Sudan escarlat foram adicionadas sobre as lamínulas de vidro por 5 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada e as amostras foram fixadas em álcool 70% (v/v). Após a fixação, foram colocadas por 2 minutos em hematoxilina, sendo posteriormente lavadas com água destilada.

#### 4.2.11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Avaliou-se a adesão da célula-tronco mesenquimal no microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F através da microscopia eletrônica de varredura.

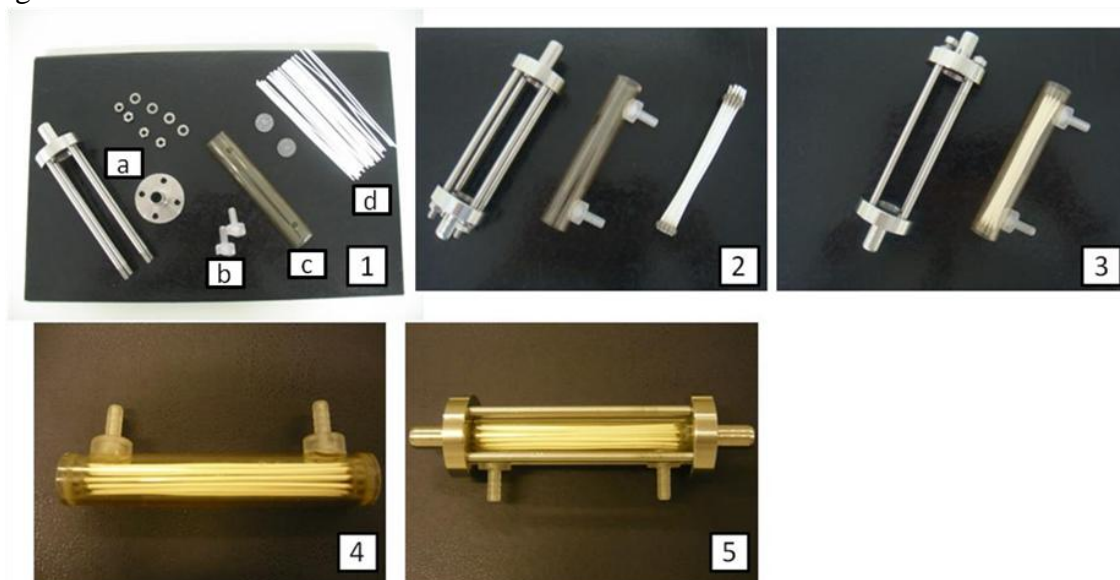
Para o preparo da amostra, realizou-se lavagem salina (0,9%) das células no microcarregador e fixou-se a amostra por 2 horas a 4°C com glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato (0,1M). Após esse período, lavou-se a amostra com tampão fosfato (0,1M e pH = 7,3) e iniciou-se um processo de desidratação. Para isso, mergulhou-se a amostra em um gradiente de etanol: 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100% por 10 minutos cada. A amostra foi então seca através do reagente hexametildissilano (HMDS) por 30 segundos.

Por fim, colocou-se a amostra no porta-amostras de prata e foi coberta com ouro. A cobertura foi realizada por Everaldo Gallo, técnico do Instituto de Biofísica Molecular na USP São Carlos.

A análise de MEV foi realizada pela técnica Luciana Fernandes do Departamento de Biologia Evolutiva da UFSCar.

#### 4.2.12 Montagem do biorreator de Fibra Oca (Hollow fiber)

Montou-se um protótipo de biorreator de fibra oca para testes iniciais com células-tronco mesenquimais. Montagens semelhantes já foram relatados na literatura por Ye *et al.* (2007) e Gloeckner *et al.* (2001). Os passos para montagem do biorreator se encontram na Figura 23.



**Figura 23** - Montagem do biorreator de fibra oca: (1) peças independentes (a) peças de inox, (b) orifícios de polipropileno, (c) cilindro de polissulfona e (d) fibras de polissulfona ; (2) montagem do cilindro externo e colagem das fibras; (3) encaixe das fibras no cilindro externo; (4) visão do cilindro montado e (5) biorreator pronto.



Para o adequado funcionamento do biorreator de fibra oca foi necessário fazer uma montagem com distanciamento apropriado das fibras ocas já que no módulo comercial as fibras ficam juntas, encostadas umas nas outras dificultando a passagem e distribuição dos microcarregadores no EEC. A distância foi escolhida de tal forma que permitisse facilmente a passagem dos microcarregadores maiores de aproximadamente 300  $\mu\text{m}$  e ao mesmo tempo que não dificultasse a oxigenação das células mais afastadas das fibras. Para atender estes requisitos definiu-se 1 mm como sendo a distância mais conveniente. Estimativas feitas sobre a disponibilidade de oxigênio para a célula mostram que a quantidade de oxigênio sendo transportada por difusão da parede externa da fibra até uma célula situada a uma distância crítica  $L/2$ , onde  $L$  é a separação entre as fibras, é suficiente para atender o consumo ou demanda de oxigênio pela célula. Os cálculos foram feitos utilizando as constantes de tempo dos dois fenômenos, mediante as seguintes expressões:

No caso de transporte de oxigênio:

$$\tau_D = (L/2)^2/D_{O_2} = \text{constante de tempo do fenômeno difusivo, onde:}$$

$L$  = distância que separa duas fibras,  $\text{cm} = 0,1 \text{ cm}$

$D_{O_2}$  = Difusividade de oxigênio em água pura a 37 °C,  $\text{cm}^2/\text{s} = 0,117 \text{ cm}^2/\text{h}$

No caso do consumo de oxigênio pela célula:

$$\tau_R = q_{O_2} \cdot X / C_{O_2, \text{sat}} = \text{constante de tempo do fenômeno "consumo de oxigênio na respiração"},$$

onde:

$q_{O_2}$  = consumo específico de oxigênio pela célula,  $\text{moles/célula/h} = 0,8 \times 10^{-12} \text{ moles/célula/h}$

$X$  = concentração celular, número de células /mL =  $10^6 \text{ células/mL}$

$C_{O_2, \text{sat}}$  = concentração de saturação de oxigênio em água pura =  $2 \times 10^{-7} \text{ mol de } O_2/\text{mL}$

Assim, os valores das constantes de tempo resultaram em:

$$\tau_D = (L/2)^2/D_{O_2} = (0,05)^2/0,117 = 0,021 \text{ h}$$

$$\tau_R = (0,8 \times 10^{-12} \times 10^6) / 2 \times 10^{-7} = 4,0 \text{ h}$$

Como se pode observar o processo difusivo é 200 vezes mais rápido que o processo de respiração nas condições mais críticas de uso do biorreator. Isto significa que

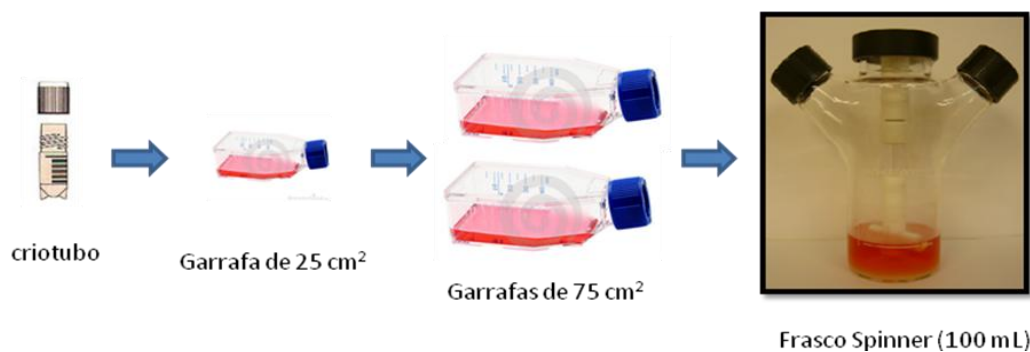
mesmo a célula sendo inoculada com  $10^5$  células/mL e atingindo um fator de expansão de 10X não vai estar limitada pelo transporte de oxigênio por difusão com a separação das fibras utilizadas. Convém lembrar que o valor de  $q_{O_2}$  utilizado no cálculo corresponde ao maior valor encontrado na literatura para uma célula animal. Há evidências de que este valor possa ser razoavelmente menor devido a seu maior tamanho e a relatos de alta capacidade de crescer em condições hipóxicas.

O cilindro externo (comprimento 11,2 cm x 2,0 cm D.E. x 1,5 cm D.I.) foi gentilmente doado pela GE Healthcare. As peças de inox e de plástico foram confeccionadas em uma oficina mecânica da UFSCar. As peças de plástico foram fixadas com cola epóxi. O volume do espaço extracapilar do biorreator é de aproximadamente 15 mL.

#### 4.2.13 Procedimento experimental

##### a) Procedimento experimental para cultivos em frasco Spinner

O procedimento padrão para o cultivo das células-tronco mesenquimais visando sua expansão em frasco Spinner nos experimentos realizados, foi dividido em 4 etapas como mostrado na Figura 24.



**Figura 24** - Representação esquemática do procedimento de cultura padrão de células-tronco mesenquimais.

As células foram descongeladas e transferidas para frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> para expansão, mantidas em incubadora a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingir a confluência de aproximadamente 80%, as células foram desaderidas com Tryple™ e inoculadas em frascos T de 75 cm<sup>2</sup> com maior área para o crescimento celular. A morfologia celular durante a expansão foi observada com a utilização de um microscópio ótico. A quantificação e viabilidade celular foram obtidas através do método de exclusão do corante azul de Tripán em hemacitômetro.

Para inoculação das células em frasco spinner, alguns procedimentos foram adotados. No dia anterior ao início do experimento, aplicou-se Sigmacote<sup>®</sup> no frasco Spinner para impedir a adesão das células no frasco, como descrito no item 4.1.7. O microcarregador pronectin<sup>®</sup>F foi pesado (20,0 g/L), devidamente esterilizado em autoclave em PBS, e colocado em meio de cultura  $\alpha$ -MEM para seu condicionamento no meio. Além disso, o meio de cultura foi colocado na incubadora a 37°C, sob 50 rpm de agitação e com 12-14% de CO<sub>2</sub>, dependendo do experimento, por aproximadamente 12 horas para estabilizar o pH entre 7,2 e 7,4.

Dessa forma, após atingir o número de células suficientes ( $6,25 \times 10^6$  células), estas foram inoculadas em frasco spinner já contendo meio de cultura e microcarregador. Os experimentos foram divididos em 2 fases: a fase para a adesão e a fase para a expansão celular. Na fase para a adesão, agitou-se por 8 horas de 30 em 30 minutos por 30 segundos; e por mais 4 horas de 1 em 1 hora por 30 segundos com a agitação distinta a cada experimento, visando facilitar o processo de adesão. Já na fase para a expansão, as condições experimentais também foram distintas a cada experimento.

Os experimentos realizados diferiram em relação ao volume de trabalho, trocas de meio, com o intuito de evitar o esgotamento de nutrientes e de diluir os metabólitos considerados tóxicos (amônia e ácido lático), adição de aminoácidos e adição de reagente (manose) na tentativa de evitar a formação de aglomerados celulares. A tabela abaixo mostra um resumo dos experimentos (E) realizados.

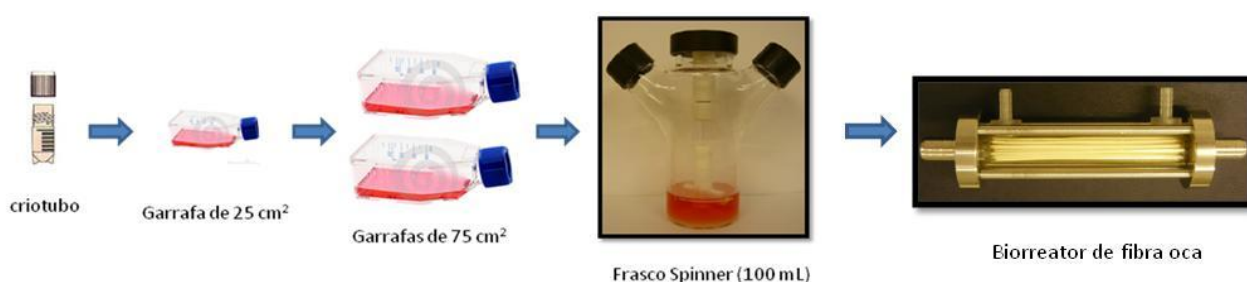
**Tabela 12**– Resumo dos experimentos realizados em frasco spinner.

	E1	E2	E3	E4	E5
<b>Volume de trabalho (mL)</b>	50	100	50	50	50
<b>Trocas de meio</b>	-	-	A partir de 48 hrs.	A partir de 72 hrs.	A partir de 72 hrs.
<b>Adição de aminoácidos</b>	-	-	0,40 mM de Arg. e 0,035 mM de Cis.	0,40 mM de Arg. e 0,035 mM de Cis.	0,40 mM de Arg. e 0,035 mM de Cis.
<b>Adição de reagentes</b>	-	-	-	15mM de manose	15mM de manose
<b>Duração (hrs)</b>	120	120	216	168	192

Para acompanhar o desenvolvimento do cultivo durante a fase para a expansão, foram retiradas amostras de 8 em 8 horas para verificar o pH. A cada 24 horas foram retiradas amostras para quantificação celular e para posteriores análises de carboidratos, aminoácidos e amônia. As células livres em suspensão foram quantificadas utilizando o método de exclusão pelo corante azul de tripan. Já para as células aderidas no microcarregador, a quantificação foi determinada através do método LDH apenas nos experimentos 4 e 5 e pelo método MTT em todos os experimentos. Foram adquiridas imagens de microscopia ótica e fluorescência para acompanhamento do crescimento celular no cultivo.

### b) Procedimento experimental para cultivo em biorreator de fibra oca (Hollow fiber)

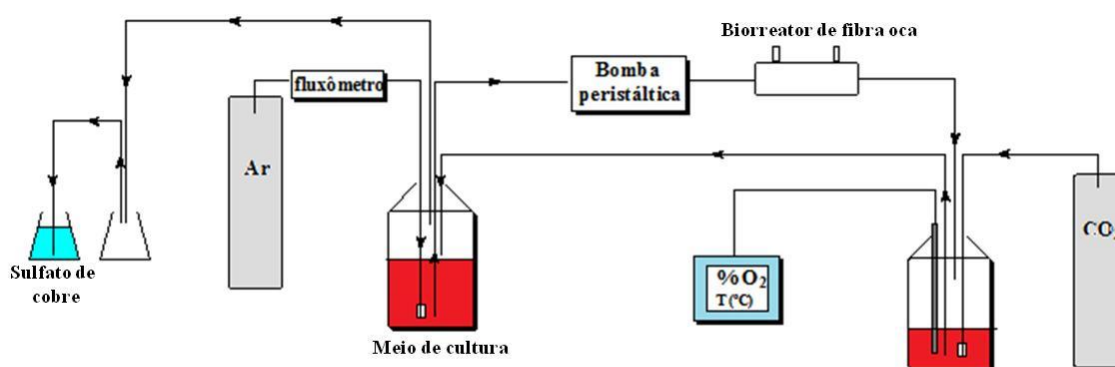
O procedimento para o cultivo das células-tronco mesenquimais visando sua expansão em biorreator de fibra oca nos experimentos foi dividido em 5 etapas como mostrado na Figura 25 a seguir.



**Figura 25** - Representação esquemática do procedimento de cultura padrão em biorreator de fibra oca de células-tronco mesenquimais.

O procedimento experimental até o cultivo em frasco spinner foi realizado de maneira similar ao experimento 3 (maior fator de expansão celular), assim: fase de adesão de 12 horas com agitação de 28 rpm na suplementação do meio de cultura com arginina e cisteína, trocas de meio de cultura em 48 horas), porém com o dobro da concentração de microcarregadores (40,0 g/L) para aumentar a área superficial para crescimento celular quando inoculado no biorreator de fibras ocas. Realizou-se dois experimentos em biorreator de fibras ocas, diferindo na configuração do sistema e gel de inoculação, como mostrado abaixo.

**b.1)** No primeiro experimento, após 72 horas de cultivo em frasco spinner, já em fase exponencial de crescimento, as células foram inoculadas no biorreator de fibra oca. O inóculo foi coletado do frasco spinner e ressuspendido em meio de cultura com gelatina (SIGMA ALDRICH) (1%), pH 7,3 e temperatura de 37°C. A gelatina foi adicionada para propiciar uma distribuição uniforme dos microcarregadores por causa da viscosidade alta originada pelo colágeno, assim como também para fornecer um microambiente apropriado para as células hBMSC-TERT, simulando condições mais próximas de tecidos *in vivo*. O sistema montado para o experimento no biorreator de fibra oca se encontra na Figura 26.



**Figura 26** – Sistema montado para cultivo de hMSC-TERT com microcarregador Pronectin<sup>®</sup> F no biorreator de fibra oca.

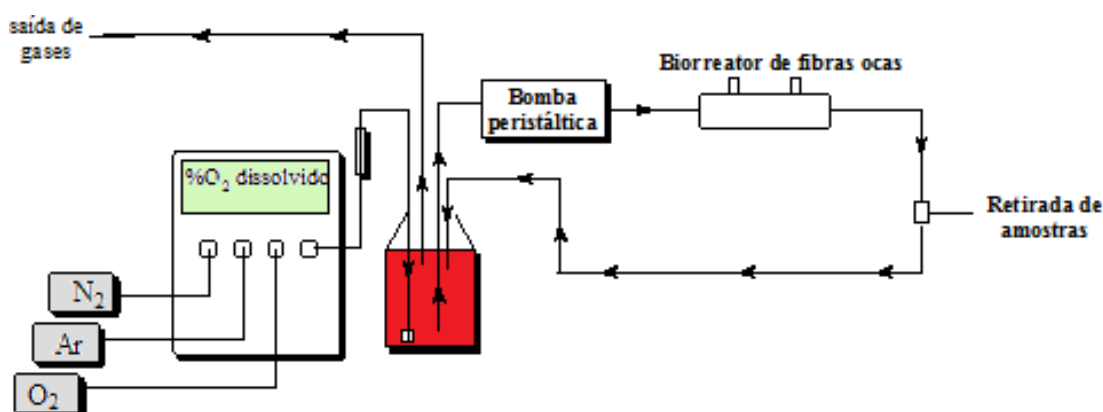
O sistema possuía dois frascos de meio de cultura, onde num deles ocorria a injeção de oxigênio no meio de cultura com auxílio de um fluxômetro e no outro, injeção de CO<sub>2</sub> que, juntamente com NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, permitiram o controle do pH do meio. O monitoramento da temperatura do meio e do oxigênio dissolvido foi realizado simultaneamente através de um eletrodo específico para O<sub>2</sub> dissolvido. Manteve-se o oxigênio dissolvido em torno de 70% da saturação com ar e o monitoramento foi realizado 24 horas por dia.

Com o auxílio de uma bomba peristáltica, o meio de cultura era continuamente recirculado no sistema, permitindo a passagem de meio de cultura oxigenado no biorreator de fibra oca. O sistema formava um circuito fechado, com apenas uma saída de gases que borbulhavam num erlenmeyer contendo solução bactericida de sulfato de cobre.

As retiradas de amostras foram realizadas assepticamente na câmara de fluxo laminar a cada 24 horas para monitoramento do pH com pH metro e de glicose no meio através de glicosímetro para posteriores análises de carboidratos, aminoácidos e amônia.

Após o término do experimento, retirou-se as células aderidas ao microcarregador do EEC com o auxílio de uma seringa. Ressuspendeu-se com meio de cultura  $\alpha$ -MEM sem vermelho de fenol para análise de quantificação celular através de método do MTT. Para recuperação celular, adicionou-se 1 mL de Tryple<sup>TM</sup>, deixou-se em repouso por 45 minutos e realizou-se a contagem com azul de tripan em câmara hemacitômetro.

**b.2)** No segundo experimento, após 48 horas de cultivo em frasco spinner (fase exponencial de crescimento), as células foram inoculadas no biorreator de fibra oca. Para inoculação das células foi preparado um gel composto por colágeno: ácido hialurônico: ágar (1,5%) na proporção 0,75: 0,037: 0,21 em pH = 7,2-7,4. Assim, o gel resultante foi misturado com meio de cultura  $\alpha$ -MEM na proporção 1:3. As células foram retiradas do spinner, misturadas no gel e inoculadas no biorreator de fibra oca. O sistema montado para realização do experimento se encontra na Figura 27.



**Figura 27** – Sistema montado para cultivo de hMSC-TERT com microcarregador Pronectin<sup>®</sup> F no biorreator de fibra oca.

O sistema possuía apenas um frasco com meio de cultura  $\alpha$ -MEM, diferentemente do experimento anterior, diminuindo assim o volume de meio de cultura utilizado. Nesse frasco, ocorria a injeção de gases (nitrogênio, ar, oxigênio) para manter a saturação do O<sub>2</sub> em 70% através de um controlador de gases (Bioflo). O monitoramento do oxigênio dissolvido foi realizado de 8 em 8 horas.

Com o auxílio de uma bomba peristáltica, o meio de cultura era continuamente recirculado no sistema, permitindo a passagem de meio de cultura oxigenado no biorreator de

fibra oca. O sistema formava um circuito fechado, com apenas uma saída de gases que era eliminado para o ambiente externo do laboratório.

Após 72 horas de cultivo, realizou-se a troca de 100% do meio de cultura, para reposição dos nutrientes e diluição dos metabólitos tóxicos.

As retiradas de amostras foram realizadas assepticamente na câmara de fluxo laminar a cada 24 horas para monitoramento do pH com pH metro e de glicose no meio através de glicosímetro para posteriores análises de carboidratos, aminoácidos e amônia.

Após o término do experimento, retirou-se as células aderidas ao microcarregador do EEC com o auxílio de uma seringa. Ressuspendeu-se com meio de cultura  $\alpha$ -MEM sem vermelho de fenol para análise de quantificação celular através de método do MTT. Para recuperação celular, adicionou-se 1 mL de Tryple<sup>TM</sup>, deixou-se em repouso por 30 minutos e realizou-se a contagem com azul de tripan em câmara hemacitômetro.

#### **4.2.14 Tratamento dos Dados Experimentais**

Nos experimentos realizados em frasco spinner, uma amostra diária foi retirada para a quantificação das células na suspensão e aderidas no microcarregador, para verificar o pH e para as análises posteriores dos nutrientes (carboidratos e aminoácidos) e dos metabólitos tóxicos (ácido láctico e amônia). Também foram retiradas outras duas amostras diárias, apenas do sobrenadante do cultivo, para o monitoramento do pH a cada 8 horas.

Para a quantificação das células na suspensão, quatro contagens foram realizadas no hemacitômetro. Sendo assim, a média e o desvio padrão foram calculados para cada uma das amostras.

Para a quantificação das células viáveis pelo método do MTT e para células totais pelo método do LDH, as medidas de absorbância (métodos colorimétricos) foram realizadas em triplicata. Novamente, a média e o desvio padrão foram calculados para cada uma das amostras.

Para os valores de pH, de aminoácidos, de glicose, de ácido láctico e de amônia somente uma medida foi realizada.

No experimento no biorreator de fibra oca, foi realizada apenas amostragens diárias (a cada 24 horas) para monitoramento do pH e glicose (glicosímetro).

No final do experimento, a quantificação celular foi realizada pelo método do MTT e as medidas de absorbância foram realizada em triplicata. Para a quantificação das

células após a recuperação com Tryple<sup>TM</sup> quatro contagens foram realizadas no Hemacitômetro. A média e o desvio padrão foram calculados para cada uma das amostras.

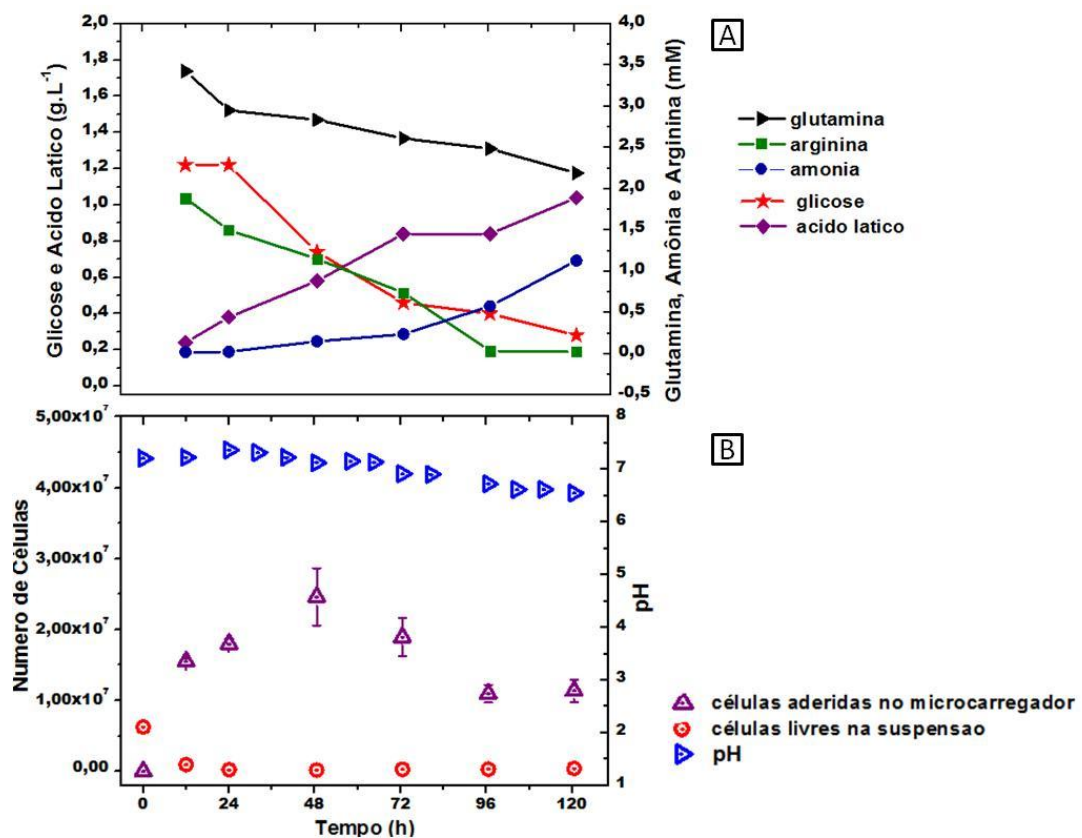


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Experimento 1

O experimento 1 foi realizado como controle, de caráter exploratório, em virtude do pouco conhecimento acerca do comportamento dessa célula com o microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F. Assim, o meio de cultura  $\alpha$ -MEM utilizado foi o descrito no item 4.1.2.

A fase de adesão celular (agitação por 8 horas de 30 em 30 minutos por 30 segundos a 50 rpm; e por mais 4 horas de 1 em 1 hora por 30 segundos a 50 rpm) teve duração de 12 horas e não houve troca de meio de cultura, com o objetivo de verificar o comportamento dessa célula com o microcarregador utilizado. A agitação foi mantida constante em 50 rpm e temperatura 37°C. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 28.



**Figura 28** - Resultados obtidos no experimento 1 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner de 100 mL, com volume de trabalho de 50 mL de meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% (v/v) de SFB, 2,0 g/L de glicose, 2,50 mM de glutamina e 2,08 mM de arginina. O sistema de cultivo foi colocado em incubadora a 37°C sob agitação de 50 rpm. Em (A) estão representados as concentração dos nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e dos metabólitos (ácido láctico e amônia). Em (B) estão representados os valores do número de células na suspensão e no microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F, assim como os valores de pH do meio de cultivo. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.

Os resultados obtidos pelo método do MTT mostram que houve crescimento celular até as 48 horas do cultivo. Após esse período, o número de células quantificadas decresceu, por uma série de motivos: pH fora do valor ótimo (atingindo valores de pH = 6,5 no final do cultivo) e esgotamento de algum nutriente, por não haver reposição de meio de cultura como pode ser visto na Figura 28 (A).

Analisando-se a Figura 28 (B), observa-se que o número de células em suspensão permaneceu baixo após a fase de adesão, evidenciando que o tempo estimado (12 horas) para adesão das células no microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F foi suficiente para adesão da maioria das células. O pH manteve-se na faixa ótima de 7,2-7,4 até 40 horas, modificando-se a porcentagem de CO<sub>2</sub> na incubadora. Porém, a partir desse período, não foi possível mantê-lo nessa faixa, pois a porcentagem de CO<sub>2</sub> já estava zerada e não houve troca de meio por ser um experimento controle.

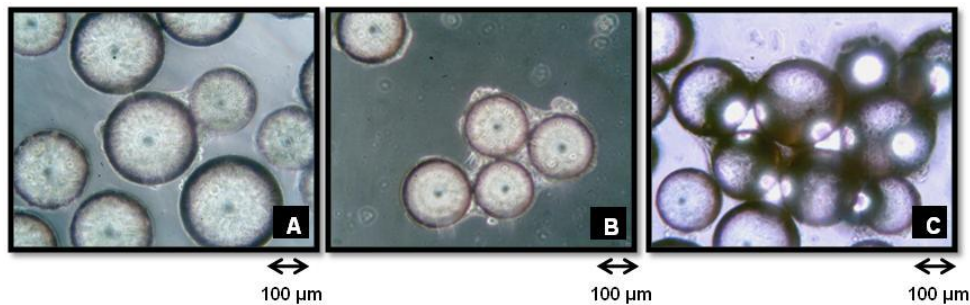
Como pode ser observado, a glicose decresceu durante o cultivo, chegando a um valor mínimo de 1,56 mM em 120 horas, não havendo portanto, esgotamento. Já a produção de metabólitos tóxicos (amônia e ácido láctico), observou-se um aumento gradativo, chegando a valores de 11,55 mM de ácido láctico e 1,13 mM de amônia em 120 horas. Na literatura, o valor de ácido láctico considerado inibitório em células-tronco mesenquimais é acima de 28,0 mM (SCHOP, 2008.), o que não foi o observado nesse experimento. Já a amônia, um subproduto da glutamina, tem efeitos mais danosos para célula animal do que o ácido láctico, sendo que valores acima de 3 mM é considerado tóxico (FERNANDES *et al.*, 2007). No cultivo, esse valor permaneceu abaixo do considerado inibitório.

Em 96 horas, a arginina já havia sido totalmente consumida. Esse alto consumo de arginina já foi observado em cultivos com essa mesma célula com os microcarregadores Cytodex-1 e Cultispher-S (SANCHES, 2010). Segundo Durante *et al.*, (2001) o aminoácido arginina é um dos precursores da síntese do colágeno tipo-1 (através da enzima ornitina aminotransferase), componente essencial da matriz extracelular. Assim, o alto consumo de arginina pode estar relacionado à elevada produção de matriz extracelular, gerando os aglomerados de microcarregadores.

Outro fato que pode ter gerado morte celular foi a formação de aglomerados de microcarregadores a partir de 48 horas, período que houve maior crescimento celular. Esse fato também já foi relatado por pesquisadores em cultivos com células-tronco (SANCHES, 2010; FRAUENSCHUH *et al.*, 2007, WEBER *et al.*, 2007) e justificaram o aumento dos aglomerados no período de expansão celular pelo fato de que as células-tronco não param de

crescer com a confluência e crescem em multicamadas, provavelmente, atribuídas à produção de matriz extracelular pelas próprias células. Sendo assim, explica-se a inibição do crescimento pelo fato de que as células que ficam presas no interior dos aglomerados não recebem nutrientes e oxigenação, causando a morte celular.

As imagens de microscopia ótica tiradas no decorrer do cultivo mostram claramente os agregados de microcarregadores.



**Figura 29** - Imagens de microscopia ótica do microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F com células no decorrer do experimento 1 (temperatura: 37°C, meio de cultura  $\alpha$ -MEM, agitação 50 rpm) . O tempo de cultivo em (A), (B), (C) foi de 48, 72, 96 horas, respectivamente. A magnificação foi de 100x para todas as imagens.

O número máximo de células quantificado foi de  $2,47 \times 10^7$  células em 48 horas pelo método MTT. Adotando como medida de eficiência do cultivo o fator de expansão celular, ou seja, a relação do número de células máximo quantificado dividido pelo número de células inoculadas no cultivo, pode-se dizer que esse experimento atingiu um fator de 3,95.

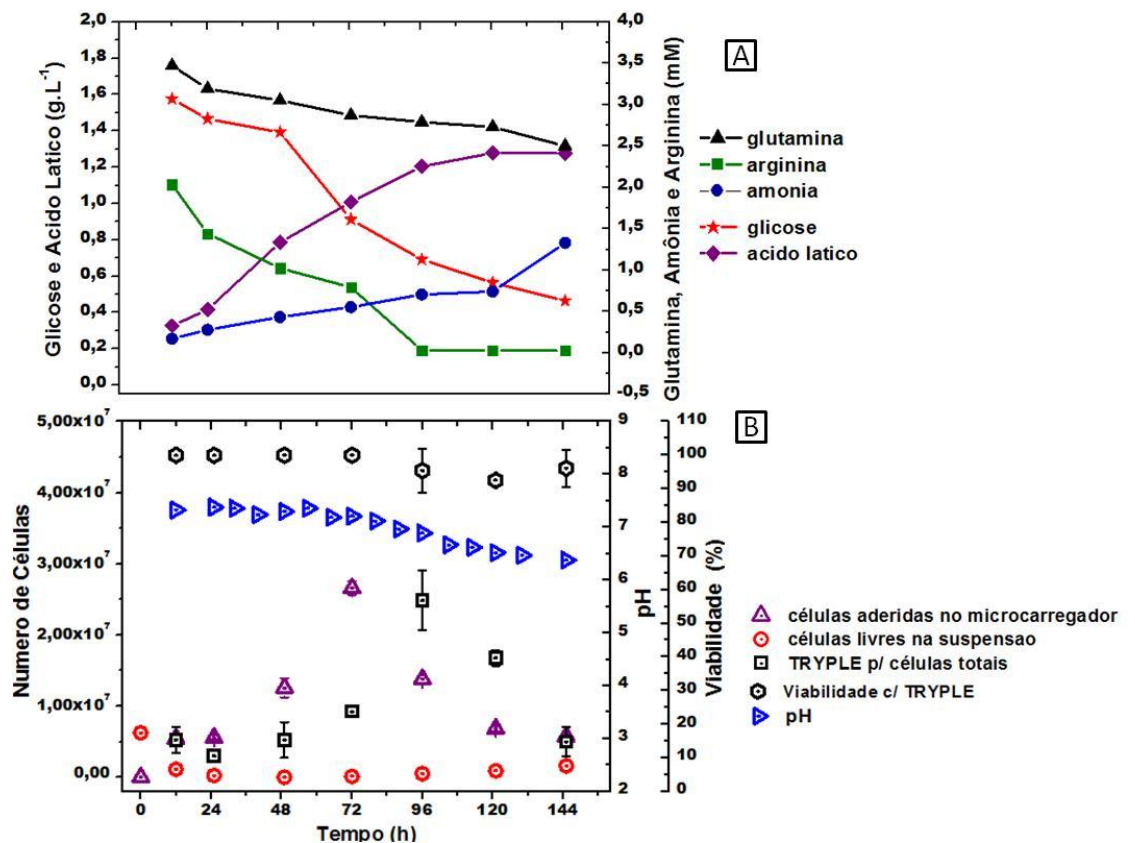
## 5.2 Experimento 2

O experimento 2 foi realizado de modo similar ao experimento 1, porém modificaram-se algumas condições como: (a) dobrou-se o volume de trabalho de 50 mL para 100 mL com o objetivo de diluir os microcarregadores, para diminuir o número de colisões entre eles e evitar a formação dos aglomerados que prejudicaram o experimento anterior; (b) diminuiu-se a agitação de 50 rpm para 28 rpm na fase de adesão, para aumentar a adesão celular; (c) aumentou-se gradativamente a agitação (na proporção do aumento do volume) para evitar a formação de aglomerados de microcarregadores de acordo com Abranches *et al.* (2007), da seguinte forma:

Tabela 13 – Variação da agitação (rpm) com o tempo (hrs.).

Tempo (horas)	Agitação (rpm)
12	50
24	75
48	90
56	96

(d) antes da inoculação do frasco spinner, o inóculo foi filtrado em filtro de 100  $\mu\text{m}$  de poro para a retirada de matriz extracelular formada durante o cultivo em frasco T na tentativa de retardar a aglomeração dos microcarregadores no cultivo e (e) adicionou-se 1 mL da enzima dissociadora Tryple<sup>TM</sup> por 30 minutos na amostra retirada do biorreator na tentativa de recuperação das células. Essas células recuperadas foram contadas com azul de tripan em câmara de Neubauer. Os resultados obtidos estão na Figura 30.



**Figura 30** - Resultados obtidos no experimento 2 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner de 100 mL, com volume de trabalho de 100 mL de meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% (v/v) de SFB, 2,0 g/L de glicose, 2,50 mM de glutamina e 2,08 mM de arginina. Em (A) estão representados as concentrações dos nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e dos metabólitos tóxicos (ácido láctico e amônia). Em (B) estão representados os valores do número de células na suspensão e no microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F, assim como os valores de pH do meio de cultivo, Tryple para células totais bem como sua viabilidade. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.

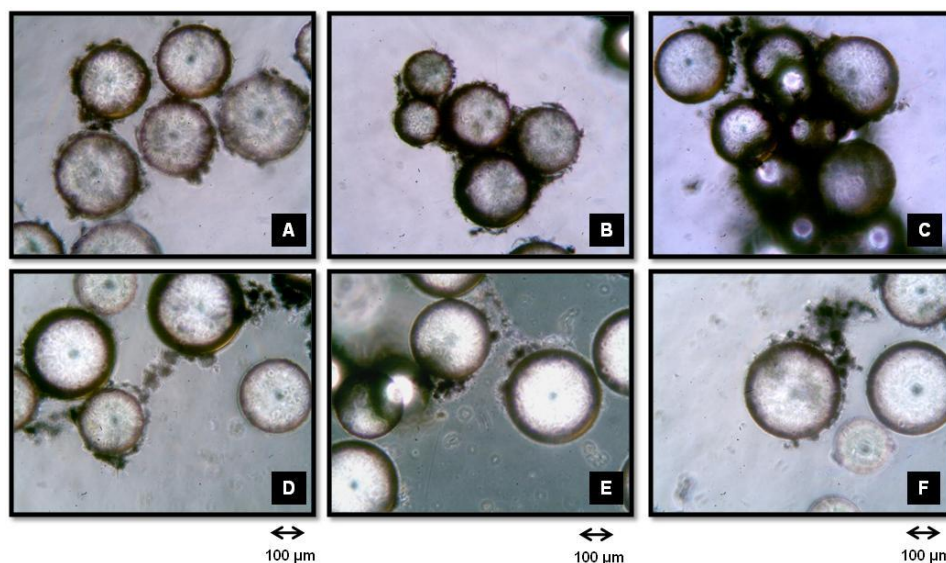
Com os dados obtidos, observa-se novamente que o número de células livres na suspensão permaneceram baixos no início do experimento, aumentando no final do cultivo, evidenciando que as células aderidas se soltaram dos microcarregadores. O pH manteve-se na faixa ótima de 7,2-7,4 até as 80 horas, tempo em que atingiu valor de pH=7,12. Após esse período, o pH só apresentou valores baixos, pois não houve trocas de meio nesse experimento.

O maior valor quantificado do número de células aderidas com o método MTT foi de  $2,66 \times 10^7$  células em 72 horas, com um fator de expansão celular de 4,26.

Os dados referentes a recuperação celular com a enzima Tryple™ não seguem o mesmo comportamento de quantificação celular pelo método MTT. Observa-se que os valores pelo método MTT e Tryple™ se aproximam nas medidas realizadas em 12 e 24 horas, se distanciando nas outras medidas. Uma explicação plausível é novamente devido a formação dos aglomerados de microcarregadores. No período de maior crescimento celular em 72 horas, o reagente MTT consegue penetrar nos aglomerados e quantificar células, ainda que de forma subestimada. Já para recuperação com a Tryple™, o reagente não consegue retirar as células que estão no centro dos aglomerados, subestimando assim, os valores de células quantificados.

Em 96 horas, os valores quantificados pelos dois métodos apresentam uma inversão de comportamento. As células no interior dos aglomerados morrem devido a depleção de nutrientes e de oxigênio provocando uma desaglomeração dos microcarregadores fazendo com que a recuperação com a enzima Tryple™ seja facilitada. Isso pode ser comprovado na amostra das 144 horas, pois os valores de MTT e Tryple™ coincidem novamente como no início do experimento, momento esse em que as células estão livres novamente, sem aglomerados de microcarregadores. Isso pode ser comprovado pelas imagens de microscopia ótica na Figura 31.

A porcentagem de recuperação celular com a enzima Tryple™ foi de 93,2%. Em seus estudos, Weber *et al.* (2007) conseguiu recuperação celular de 100% utilizando a enzima tripsina por 6 minutos com o microcarregador Rapidcell.



**Figura 31** - Imagens de microscopia ótica do microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F com células no decorrer do experimento 2 (temperatura: 37°C, meio de cultura  $\alpha$ -MEM, agitação 50 rpm). O tempo de cultivo em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) foi de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas, respectivamente. A magnificação foi de 100x para todas as imagens.

As células estão coradas com o reagente MTT, mostrando assim somente as células viáveis. Nota-se que em (C) referente a 72 horas, os aglomerados eram muito grandes, sendo que já em 96 horas, devido a falta de nutrientes e de oxigênio no interior dos aglomerados, as células começam a morrer e se soltar dos microcarregadores.

As Tabelas (Apêndice C) mostram os resultados de todos os aminoácidos analisados no experimento 2. A Figura 30 (A) mostra os principais substratos consumidos e os metabólitos tóxicos produzidos nesse experimento.

É possível observar que as concentrações de glicose e glutamina decresceram com o tempo como era de se esperar, atingindo os menores valores em 144 horas; 2,58 mM de glicose e 1,76 mM de glutamina. Já os metabólitos tóxicos produzidos foi de 1,33 mM de amônia e 14,19 mM de ácido láctico, valores não considerados inibitórios. Novamente o aminoácido arginina zerou em 96 horas como no experimento 1, evidenciando a limitação estequiométrica desse composto e, portanto, a necessidade de suplementação do meio de cultura.

Não foi possível observar diminuição na formação de aglomerados de microcarregadores dobrando-se o volume de trabalho. Porém, as medidas adotadas nesse experimento foram positivas, como diminuição da agitação na fase de adesão (gerando a adesão de 91% das células em 12 hrs., comparado com o experimento 1 que apresentou

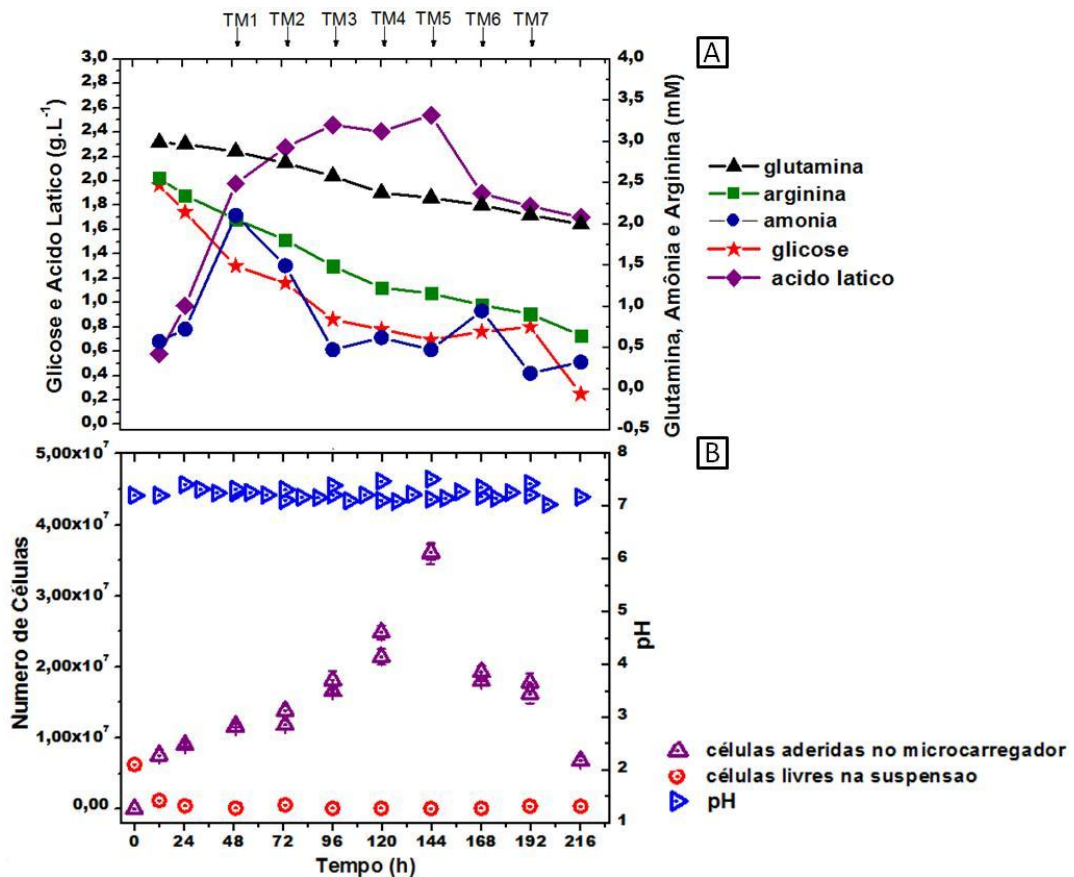
adesão de 85% das células) e tratamento da amostra com a enzima Tryple<sup>TM</sup>, mostrando que é possível a recuperação das células desse microcarregador.

### **5.3 Experimento 3**

Novamente, o experimento 3 foi realizado com os procedimentos que geraram mudanças positivas do experimento 2 como: agitação intermitente após a fase de adesão e tratamento da amostra com Tryple<sup>TM</sup> para recuperação celular. Nesse experimento, utilizou-se volume de trabalho de 50 mL, por não ter tido resultados positivos dobrando-se o volume de trabalho para 100 mL no experimento 2.

Além disso, suplementou-se o meio de cultura com adição de 0,5254 mM de arginina para não haver esgotamento como nos experimentos anteriores e foi realizada trocas de meio diárias a partir de 48 horas, com a finalidade de diluir os metabólitos tóxicos, evitar o esgotamento de substrato e para permitir o melhor monitoramento do pH na faixa ótima de 7,2-7,4. Nas trocas de meio de cultura, 50 % do meio era retirado do cultivo e substituído por meio de cultura fresco. As trocas de meio foram realizadas com uma pipeta de vidro, à qual se fixou um filtro na ponta que só permitia a passagem de partículas menores que 100 µm. O filtro teve a função de não permitir a retirada de microcarregadores colonizados com células e permitir somente a passagem do meio de cultura puro e células mortas.

Os dados obtidos se encontram na Figura 32.



**Figura 32** - Resultados obtidos no experimento 3 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner de 100 mL, com volume de trabalho de 50 mL de meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% (v/v) de SFB, 2,0 g/L de glicose, 2,50 mM de glutamina e 2,60 mM de arginina. Em (A) estão representados as concentrações dos nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e dos metabólitos tóxicos (ácido láctico e amônia). Em (B) estão representados os valores do número de células na suspensão e no microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F, assim como os valores de pH do meio de cultivo. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas. As setas TM indicam trocas de meio de cultura.

De acordo com a Figura 32 (A), a glutamina e a glicose atingiram os menores valores em 216 horas, com 2,0 mM e 1,38 mM respectivamente, não havendo esgotamento. A arginina não esgotou como nos experimentos anteriores, constatando que a suplementação realizada foi eficiente. A concentração de amônia atingiu valor mais elevado em 48 horas antes da troca de meio com 2,10 mM, permanecendo baixa durante todo o cultivo. Já a concentração de ácido láctico atingiu valores muito altos, chegando a um valor máximo de 28,2 mM em 144 horas. Esse valor segundo Fernandes *et al.*(2007) é considerado inibitório para célula animais, fato que pode ter contribuído com a queda ser comprovado pela queda na quantificação celular após esse tempo.

Com a realização das trocas de meio a partir de 48 horas, obteve-se um número máximo de células quantificadas pelo método MTT de  $3,62 \times 10^7$  células em 144 horas, com um fator de expansão celular de 5,79.

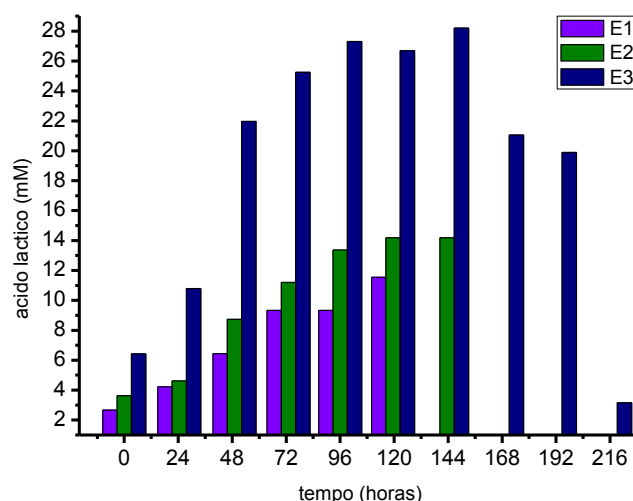


O pH manteve-se na faixa ótima de 7,2-7,4 devido ao monitoramento a cada 8 horas e pelas trocas de meio de cultura, sendo que o menor valor de pH= 7,04 foi atingido apenas no final do cultivo, em 200 horas.

Através da Figura 32 (B), observa-se que o crescimento celular baseado no método do MTT teve uma fase lag maior que o observado nos outros experimentos, provavelmente devido as trocas de meio de cultura realizadas. As trocas de meio de cultura, permitem a reposição de nutrientes e diluição dos metabólitos tóxicos. Mas também provocam a diluição de fatores de crescimento, hormônios, liberados pelas próprias células, justificando assim, a fase lag maior observada nesse experimento.

A recuperação das células aderidas com a enzima Tryple™ não foi efetiva (dados não mostrados), uma vez que as células estavam aderidas fortemente ao microcarregador. Esse mesmo problema já havia sido relatado por Sanches (2010) com a mesma célula no microcarregador Cytodex-1, com baixa porcentagem de recuperação celular. A recuperação total das células foi relatado por Sanches (2010) com o microcarregador Cultispher-S, pois a ação enzimática dissolve o microcarregador, liberando todas as células. Fernandes *et al.* (2007) utilizaram uma solução de Tripsina 1% (v/v) por 10 minutos para a recuperação de CTEs de camundongos após a dissolução da matriz do Cultispher-S.

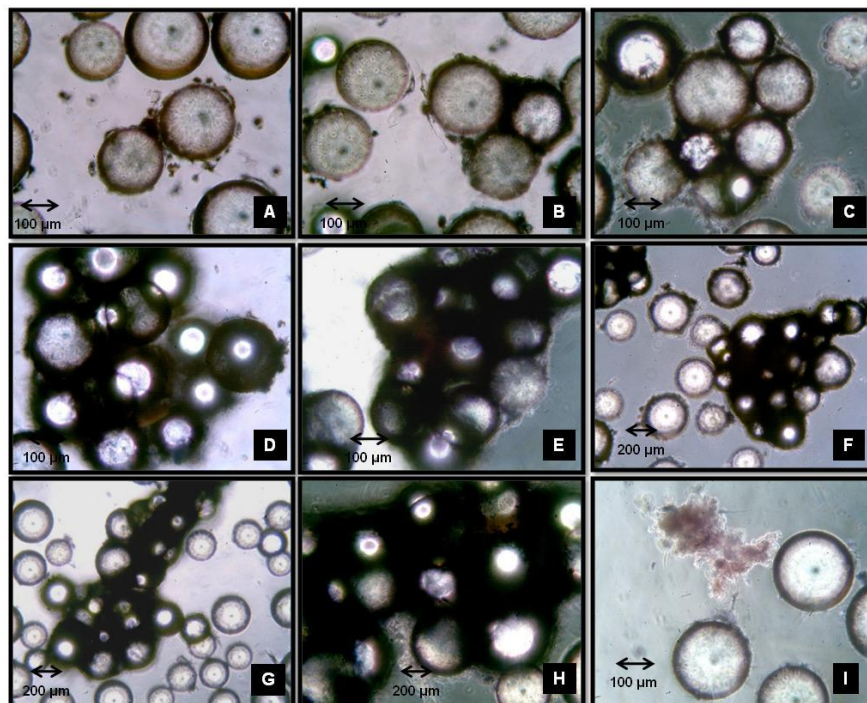
A Figura 33 ilustra a produção de ácido láctico nos três experimentos.



**Figura 33-** Comparação da produção de ácido láctico (mM) entre os experimentos E1 (experimento1), E2 (experimento 2) e E3 (experimento 3).

Como pode-se observar, a produção de ácido láctico nesse experimento 3 é maior nos outros experimentos, devido ao fato das células terem tido um crescimento celular bem maior, havendo por consequência maior produção de ácido láctico.

Novamente, observou-se a formação de aglomerados de microcarregadores no cultivo, fato que pode ser comprovado pelas imagens de microscopia ótica apresentadas a seguir.



**Figura 34** - Imagens de microscopia ótica do microcarregador Pronectin®F com células no decorrer do experimento 3. O tempo de cultivo em (A), (B), (C), (D), (E), (F), (G), (H) e (I) foi de 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 e 216 horas, respectivamente. A magnificação foi de 100x para as imagens (A), (B), (C), (D), (E) e (I) e de 40x para (F), (G) e (H).

De acordo com as imagens, pode-se perceber que os aglomerados aumentaram gradativamente com o tempo e que as células realmente começam a se soltar, devido a falta de oxigenação nas células no interior dos microcarregadores, como pode ser visto pela imagem (I), em que as células estão mortas e livres em suspensão.

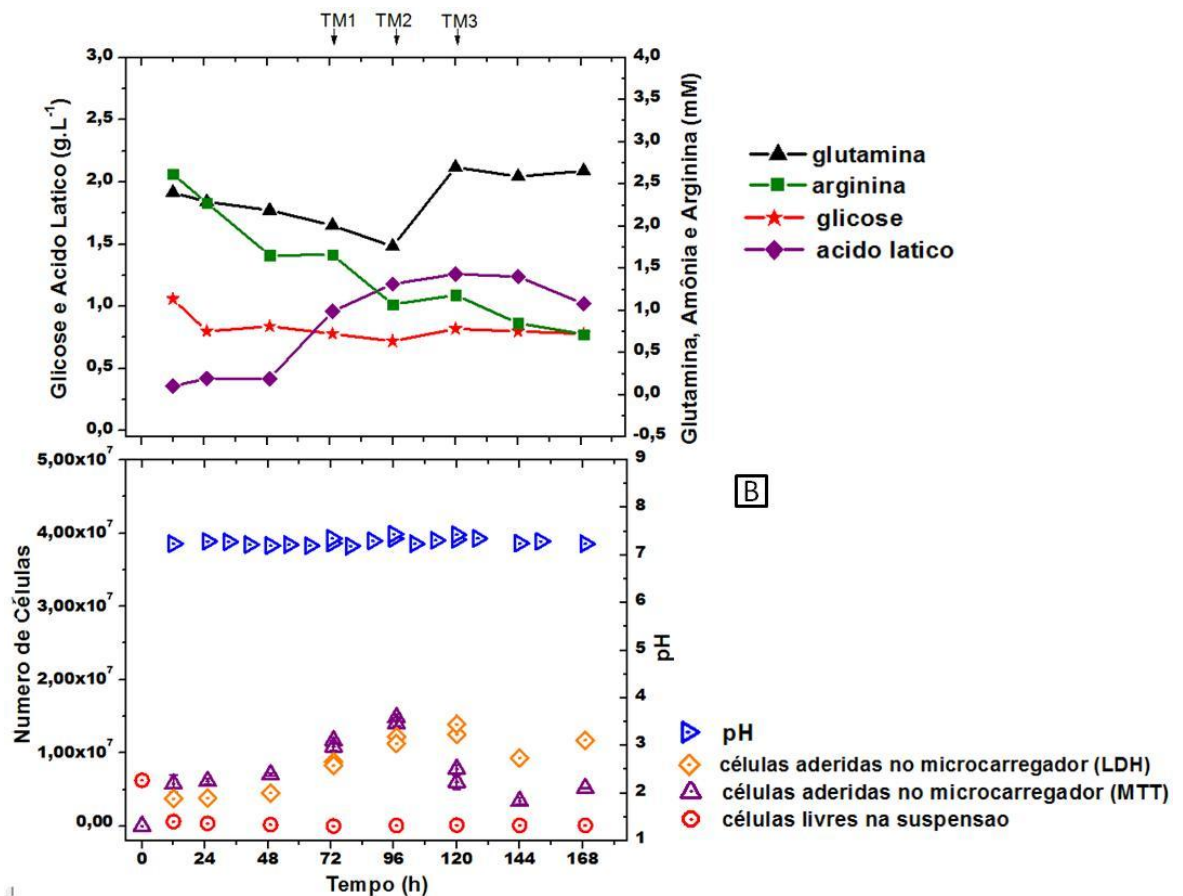
Os procedimentos adotados nesse experimento como trocas de meio de cultura, monitoramento do pH a cada 8 horas, e suplementação do meio com arginina, geraram resultados positivos, visto que o fator de expansão celular aumentou 1,5 vezes em relação ao primeiro experimento.

Mais uma vez, os aglomerados atrapalharam na quantificação celular e no prosseguimento do cultivo. O próximo passo para aumentar o fator de expansão celular foi a adoção de medidas que diminuíssem a formação desses aglomerados.

#### 5.4 Experimento 4

O experimento 4 foi realizado com as mesmas condições estabelecidas no experimento 3, porém foi adicionado o reagente manose na tentativa de evitar a formação dos aglomerados de microcarregadores. Segundo Weber *et al.* (2007), os aglomerados de células se originam a partir da matriz extracelular das próprias células. A matriz extracelular é uma estrutura constituída por várias proteínas e polissacarídeos distribuída de forma diferente entre os vários tecidos do organismo. A constituição básica da matriz é de proteínas fibrosas como o colágeno e elastina, e de glicoproteínas alongadas como a fibronectina e laminina, que têm uma função de proporcionar adesão célula-matriz, além de glicosaminoglicanas e proteoglicanas que formam um leito constituído por um gel, onde se encontram imersos todos os constituintes da matriz (PEREIRA *et al.*, 2005). Dentre os componentes da matriz extracelular também se encontra o ácido hialurônico. O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano e está relacionado com adesão, migração e proliferação das células e pesquisas recentes demonstram que o ácido hialurônico está relacionado com a aderência em células-tronco mesenquimais. Segundo Jokela *et al.* (2008) a adição de 15-20 mM de manose diminui a síntese de ácido hialurônico pelas células através da regulação do UDP-hexNAc. As células descritas na literatura que exibiram esse comportamento foram: fibroblastos, queratinócitos e células de melanoma.

Assim, nesse experimento, adicionou-se 15mM de manose no meio de cultura para observar o seu efeito na diminuição dos aglomerados de microcarregadores. A adição do meio de cultura com a manose foi realizada desde a fase de adesão. Foi também utilizado o método da lactato desidrogenase (LDH) para quantificação celular para ratificar o método MTT já utilizado nos experimentos anteriores. O gráfico obtido se encontra na Figura 35.



**Figura 35** - Resultados obtidos no experimento 4 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner de 100 mL, com volume de trabalho de 50 mL de meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% (v/v) de SFB, 2,0 g/L de glicose, 2,50 mM de glutamina e 2,60 mM de arginina. Em (A) estão representados as concentrações dos nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e dos metabólitos tóxicos (ácido láctico e amônia). Em (B) estão representados os valores do número de células na suspensão e no microcarregador Pronectin®F, assim como os valores de pH do meio de cultivo, Tryple para células totais bem como sua viabilidade. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas. As setas TM indicam trocas de meio de cultura.

De acordo com a Figura 35 (A), não houve esgotamento dos substratos glutamina e glicose, que atingiram valores mínimos de 1,76 mM e 4,0 mM em 72 horas, respectivamente. A arginina também não esgotou, atingindo um valor mínimo de 0,32 mM em 168 horas. Em relação a formação de metabólitos tóxicos, o ácido láctico atingiu um valor máximo de 15,54 mM no final do cultivo em 168 horas, não sendo um valor inibitório.

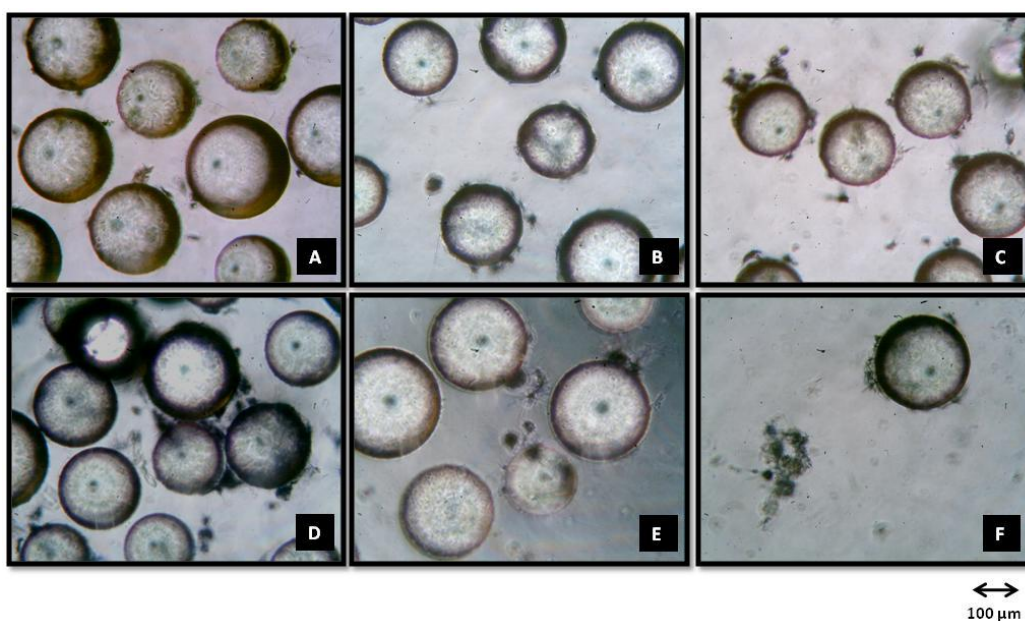
De acordo com a Figura 35 (B), podemos notar que houve morte celular nas primeiras 12 horas, isto é, 8% de acordo com o método MTT e 40% segundo o método LDH. Essa morte celular pode ser devido a adição de manose no experimento. O pH manteve-se na faixa ótima durante o experimento, porém atingiu um valor de pH=7,44 em 96 horas. Esse fato pode ter ocasionado a morte celular após esse período.

Os métodos de MTT e LDH se mostraram eficientes na quantificação celular, uma vez que as medidas se aproximaram muito em alguns pontos. Porém, a partir de 120

horas, o método LDH apresentam maiores valores que o método MTT. Uma explicação plausível é devido ao fato de que a partir das 120 horas, há um intenso processo de morte celular e o método LDH nos um valor de células totais, incluindo as células mortas. Já o método MTT fornece apenas valores de células viáveis.

Obteve-se um número máximo de células quantificadas pelo método MTT de  $1,48 \times 10^7$  células em 96 horas, com um fator de expansão celular de 2,37. E pelo método LDH, obteve-se um número máximo de células de  $1,39 \times 10^7$  em 120 horas, com um fator de expansão celular de 2,22.

Nesse experimento não observou-se a formação de aglomerados de microcarregadores. Esse fato pode ser devido a adição de manose, mas também pode ser atribuído ao fato das células não terem crescido de maneira eficiente para ter a formação dos aglomerados. Um estudo mais detalhado de quantificação de ácido hialurônico deve ser feito para comprovar sua eficácia na diminuição de formação de aglomerados. A Figura 36 abaixo ilustra esse fato.



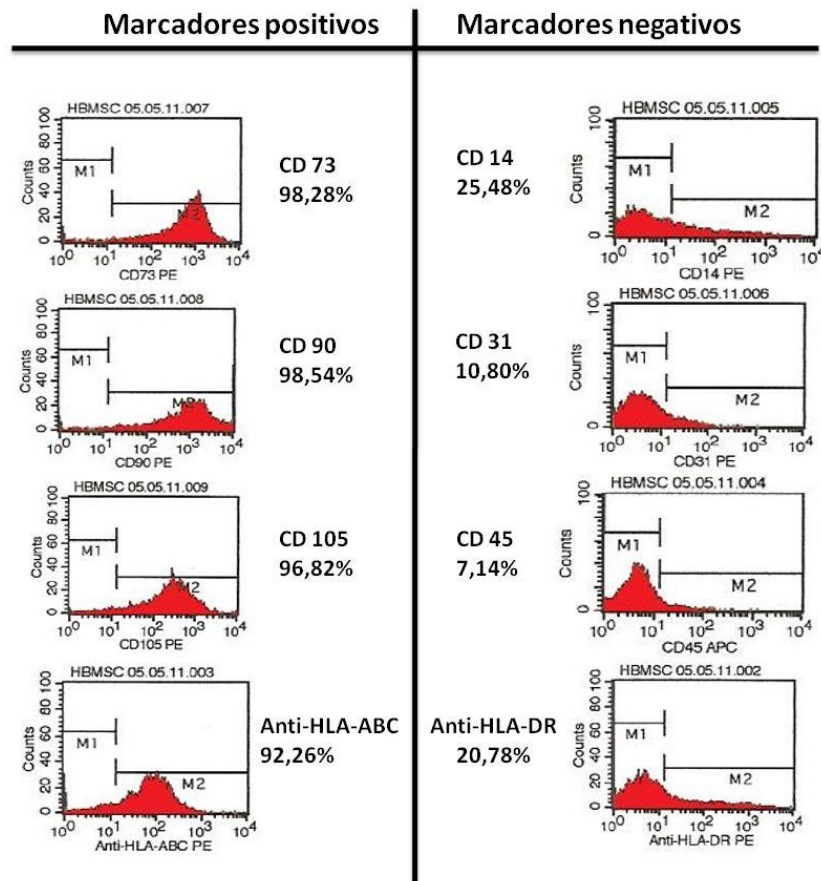
**Figura 36** - Imagens de microscopia ótica do microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F com células no decorrer do experimento 4. O tempo de cultivo em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) foi de 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas, respectivamente. A magnificação foi de 100x para todas as imagens.

Esse experimento teve um fator de expansão de 2,37 e não houve a formação desses aglomerados. Mas como dito anteriormente, é necessário um estudo aprofundado para obter tirar conclusões mais sustentáveis.

A fim de avaliar a conservação do perfil fenotípico de CTMS, recuperou-se as células aderidas no microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F após 96 horas. Para isso, uma amostra foi

retirada do cultivo e tratada com Tryple™. As células foram congeladas para posteriores análises de citometria de fluxo.

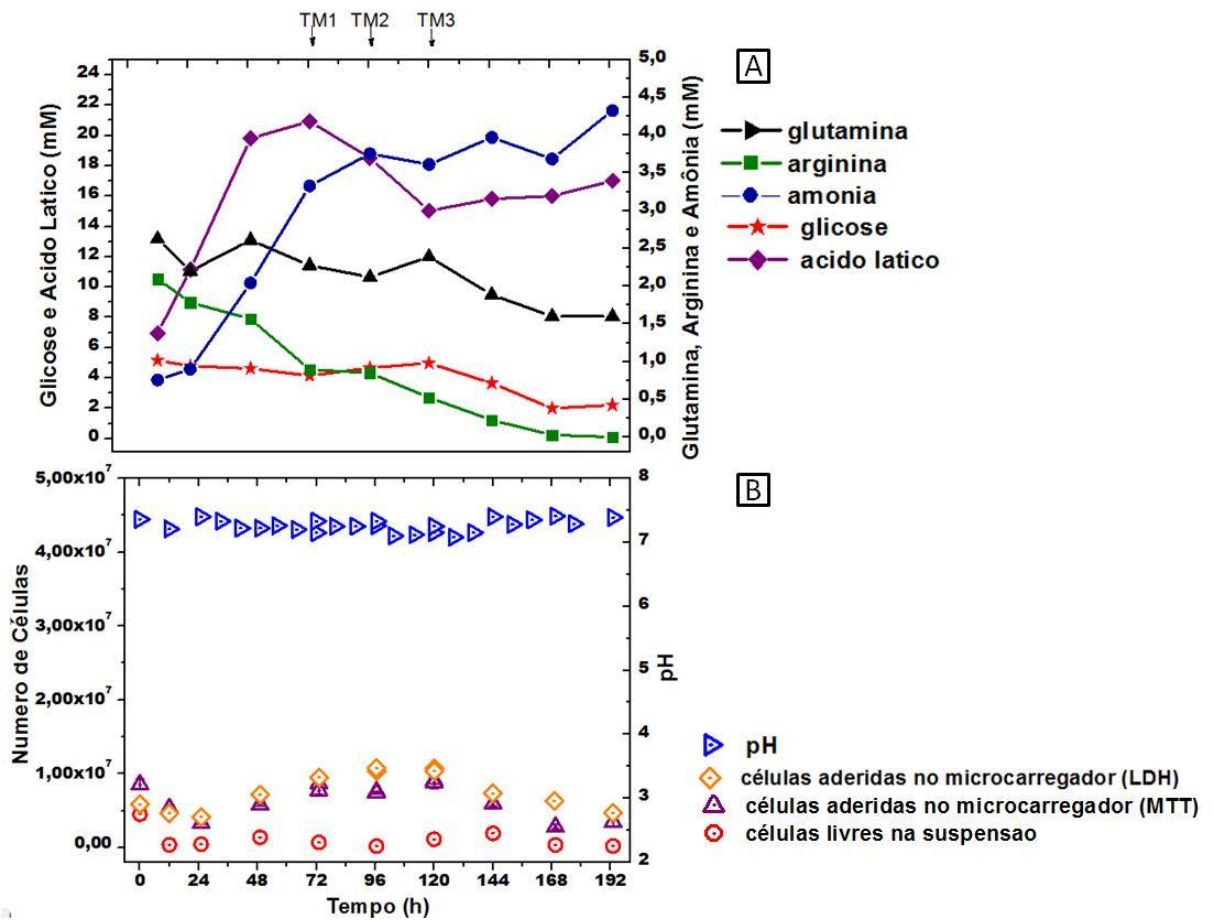
No citômetro de fluxo, as células foram analisadas com relação aos seus antígenos de superfície, por meio de uma marcação com anticorpos monoclonais específicos. Para a realização do controle negativo, foram utilizados os anticorpos Anti-Mouse IgG1-FITC, Anti-Mouse IgG2a-PE, Anti-Mouse IgG-APC e Anti-Mouse IgG1-PerCP (BD Pharmingen, EUA). Foram estabelecidos 8 anticorpos monoclonais para a imunomarcação da linhagem: Anti-CD14-PE, Anti-CD31-PE, Anti-CD45-APC, Anti-CD73-PE, Anti-CD90-PE, Anti-CD105-PerCP, Anti-HLA-ABC-PE e Anti-HLA-DR-PerCP. Os resultados da imunofenotipagem, representados na Figura 37, revelaram que a população de células foi positiva para os marcadores comuns às células-tronco derivadas da medula óssea: CD73, CD90, CD105 com expressão de mais de 95%; e negativa para os marcadores de superfície de células hematopoiéticas: CD14, CD31, CD45 e HLA-DR.



**Figura 37** - Resultados das análises de citometria de fluxo para a linhagem hMSC-TERT recuperada do microcarregador Pronectin® F após o cultivo em frasco spinner no experimento 4. As análises mostraram que a reatividade foi positiva para marcadores de superfície CD73, CD90, CD105 e HLA-ABC e negativa para marcadores CD14, CD31, CD45 e HLA-DR.

## 5.5 Experimento 5

Nesse experimento, repetiu-se as condições do experimento 4 anterior para comprovar a diminuição dos aglomerados de microcarregadores e foram feitas as seguintes modificações: (a) o meio de cultura suplementado com 15 mM de manose foi adicionado desde o cultivo em frascos T para ter uma melhor adaptação das células e evitar a morte celular no início do experimento e (b) para aplicação dos métodos MTT e LDH, utilizou-se uma pipeta com um filtro adaptado na ponta para permitir apenas a passagem de partículas de tamanho maior que 100µm para a retirada de células livres mortas. Os dados obtidos se encontram na Figura 38.



**Figura 38-** Resultados obtidos no experimento 5 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner de 100 mL, com volume de trabalho de 50 mL de meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% (v/v) de SFB, 2,0 g/L de glicose, 2,50 mM de glutamina e 2,60 mM de arginina. Em (A) estão representados as concentrações dos nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e dos metabólitos tóxicos (ácido láctico e amônia). Em (B) estão representados os valores do número de células na suspensão e no microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F, assim como os valores de pH do meio de cultivo. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas. As setas TM indicam trocas de meio de cultura.

Como pode-se notar, há morte celular nas primeiras 24 horas de acordo com os dois métodos MTT (15,2% de morte celular) e LDH (25,6% de morte celular), ocorrendo uma

recuperação das células em 48 horas. O motivo da intensa morte celular no início do experimento pode ser explicado pela troca de incubadora e agitador. O agitador utilizado esquentou o meio de cultura para 39°C, fato percebido durante o cultivo.

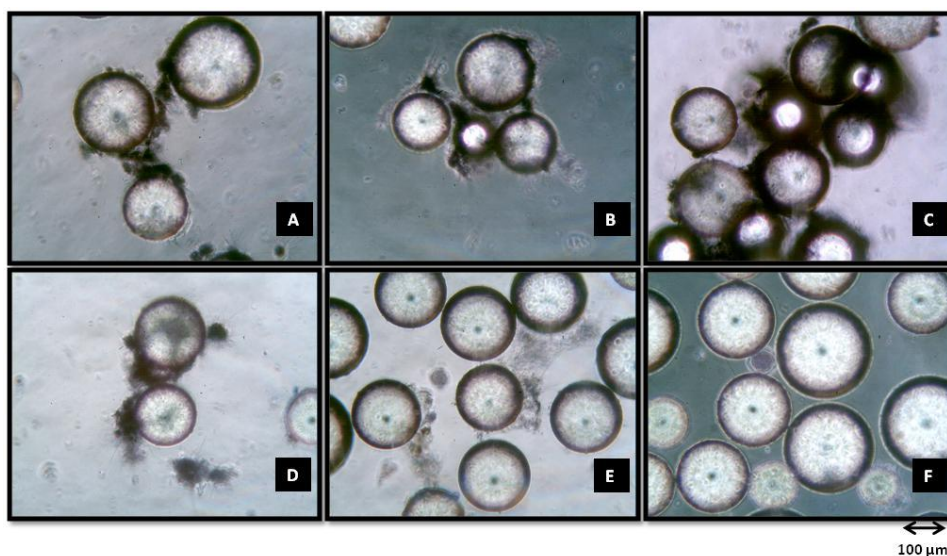
O pH atingiu valores baixos em 103 horas (pH = 7,10) e em 128 horas (pH = 7,08). A medida adotada de filtração da amostra antes da aplicação dos métodos MTT e LDH se mostrou eficaz, uma vez que os valores quantificados pelos dois métodos se aproximaram muito.

Obteve-se um número máximo de células quantificadas pelo método MTT de  $9,04 \times 10^6$  células em 120 horas, com um fator de expansão celular de 1,44. E pelo método LDH, obteve-se um número máximo de células de  $1,07 \times 10^7$  em 120 horas, com um fator de expansão celular de 1,71. Os valores dos substratos consumidos e metabólitos produzidos se encontra na Figura 38 (A).

Como podemos notar, não houve esgotamento de glicose, atingindo valores mínimos de 2,0 mM em 168 horas. A arginina esgotou em 168 horas, podendo ter sido o motivo da morte celular nesse período.

Além disso, em relação aos metabólitos inibitórios, a amônia atingiu valores considerados inibitórios a partir de 72 horas (acima de 3 mM), podendo ser também o motivo da inibição do crescimento celular após esse período. O ácido láctico atingiu um valor máximo de 20,94 mM em 72 horas, valor ainda dentro do considerado não-inibitório.

Apesar de não ter tido um alto fator de expansão celular, houve uma pequena formação de aglomerado de microcarregadores, como pode ser visto na Figura 39.

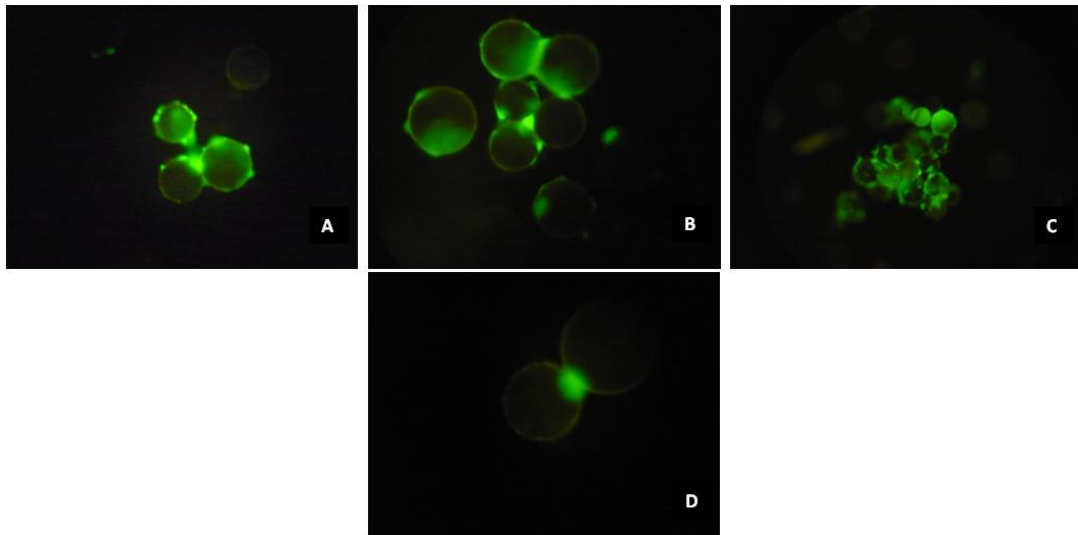


**Figura 39** - Imagens de microscopia ótica do microcarregador Pronectin®F com células no decorrer do experimento 5. O tempo de cultivo em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) foi de 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas, respectivamente. A magnificação foi de 100x para todas as imagens.



Em 120 horas, período em que houve o maior crescimento celular, houve a maior formação de aglomerados de microcarregadores, sendo que após esse tempo, as células começaram a se soltar dos microcarregadores e morrer.

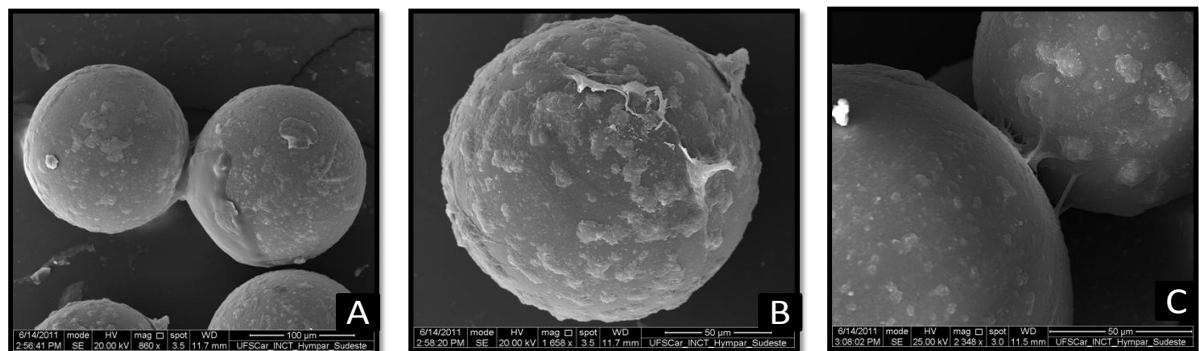
A Figura 40 abaixo ilustra as imagens tiradas em microscópio ótico com fluorescência. As células utilizadas nesse experimento são marcadas com GFP, uma proteína verde fluorescente, que emite fluorescência na luz verde do espectro visível quando vivas.



**Figura 40** - Imagens de microscopia ótica baseada em fluorescência do microcarregador Pronectin®F com células no decorrer do experimento 5. O tempo de cultivo em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) foi de 72, 96, 120 e 144 horas, respectivamente.

Podemos observar as células colonizando os microcarregadores e formando aglomerados. A imagem C ilustra o tempo de maior formação de aglomerados, em 120 horas. Já a imagem D nos mostra células unindo dois microcarregadores.

Foram realizadas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das CTMs aderidas ao microcarregador Pronectin®F no cultivo. A Figura 41 abaixo mostra as imagens adquiridas.



**Figura 41**- Imagens de microscopia eletrônica de varredura do microcarregador Pronectin®F com CTMs do experimento 5. A figura A tem magnificação de 880x, B de 1650x e C de 2348x.

A Figura A ilustra dois microcarregadores unidos através das células, sendo que a Figura C nos mostra claramente esse fato devido a uma maior magnificação.

A Tabela 14 mostra o resumo dos experimentos realizados.

**Tabela 14-** Resumo dos experimentos realizados.

	E1	E2	E3	E4	E5
<b>Volume de trabalho (mL)</b>	50	100	50	50	50
<b>Trocas de meio</b>	-	-	A partir de 48 hrs.	A partir de 72 hrs.	A partir de 72 hrs.
<b>Fator de expansão</b>	3,95	4,26	5,79	2,37	1,44
<b>Duração (hrs)</b>	120	120	216	168	192

Assim, através desses experimentos realizados e estratégias traçadas para diminuição dos aglomerados, selecionamos o experimento que obtivemos o melhor resultado (experimento 3), com maior fator de expansão celular para ser utilizado como inóculo no biorreator de fibra oca.

## 5.6 Experimento 6

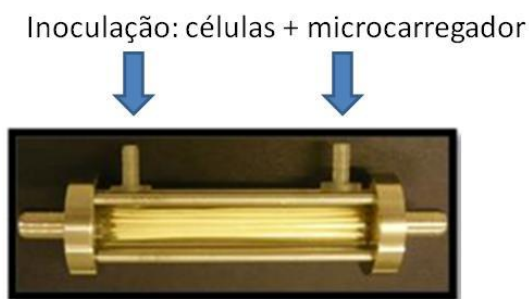
Para inoculação no biorreator de fibra oca, selecionaram-se as condições experimentais estabelecidas no experimento 3, que foi o que gerou maior fator de expansão celular (5,79).

Assim, para o cultivo em frasco spinner, utilizou-se o meio de cultura suplementado para não haver esgotamento da arginina e foi realizada uma troca de meio em 48 horas, com a finalidade de diluir os metabólitos tóxicos, evitar o esgotamento de substrato e permitir melhor monitoramento do pH na faixa ótima de 7,2-7,4. Além disso, dobrou-se a concentração de microcarregadores (Pronectin<sup>®</sup>F) para 40,0 g/L. Essa estratégia foi adotada para aumentar a área superficial para crescimento celular quando da inoculação do biorreator de fibra oca. O inóculo foi de  $1,25 \times 10^5$  cél/mL e a fase de adesão teve duração de 12 horas, como nos experimentos anteriores.

Após 73 horas de cultivo em frasco spinner, as células aderidas ao microcarregador foram inoculadas no biorreator de fibra oca. O meio de cultura utilizado no biorreator de fibra oca foi o  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% (v/v) SFB, 2,0 g/L de glicose, 2,50 mM de glutamina e 2,60 mM de arginina. Houve mudança no tamponamento do meio, sendo que se aumentou a quantidade de HEPES (25mM) e diminuiu-se a quantidade de bicarbonato de sódio (4mM); com o intuito de melhorar o controle do pH do meio durante o cultivo, sem haver a necessidade de injeção de CO<sub>2</sub>. Adicionou-se ainda no meio de cultura 0,07% do antiespumante PPG (polipropilenoglicol), para evitar a formação de espuma devido a injeção de ar sintético para oxigenação do meio por borbulhamento.

Algumas medidas foram adotadas no dia anterior à inoculação no biorreator, como saturação do meio de cultura com ar sintético para calibração do eletrodo de O<sub>2</sub> dissolvido.

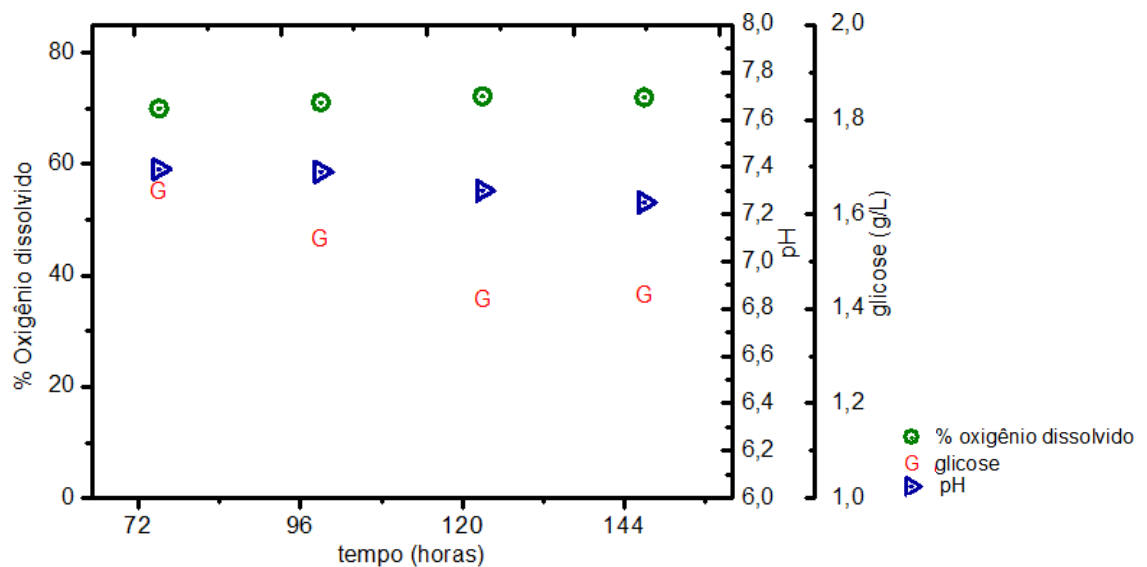
Para inoculação no biorreator, misturou-se as células aderidas no microcarregador provenientes do frasco spinner com gelatina (SIGMA-ALDRICH) 1% (m/v). O pH da mistura foi ajustado em 7,3. A mistura foi injetada no EEC com o auxílio de uma seringa (15mL), como ilustra a Figura 42.



**Figura 42-** Esquema da inoculação celular do biorreator de fibra oca.

O sistema foi colocado na incubadora a 37°C e o meio de cultura começou a ser recirculado através de uma bomba peristáltica. A oxigenação do meio de cultura se manteve a 70% e o monitoramento foi realizado continuamente, 24 horas por dia. O controle foi realizado de maneira manual, com injeção de ar sintético e nitrogênio medindo o fluxo de ambos com um fluxômetro.

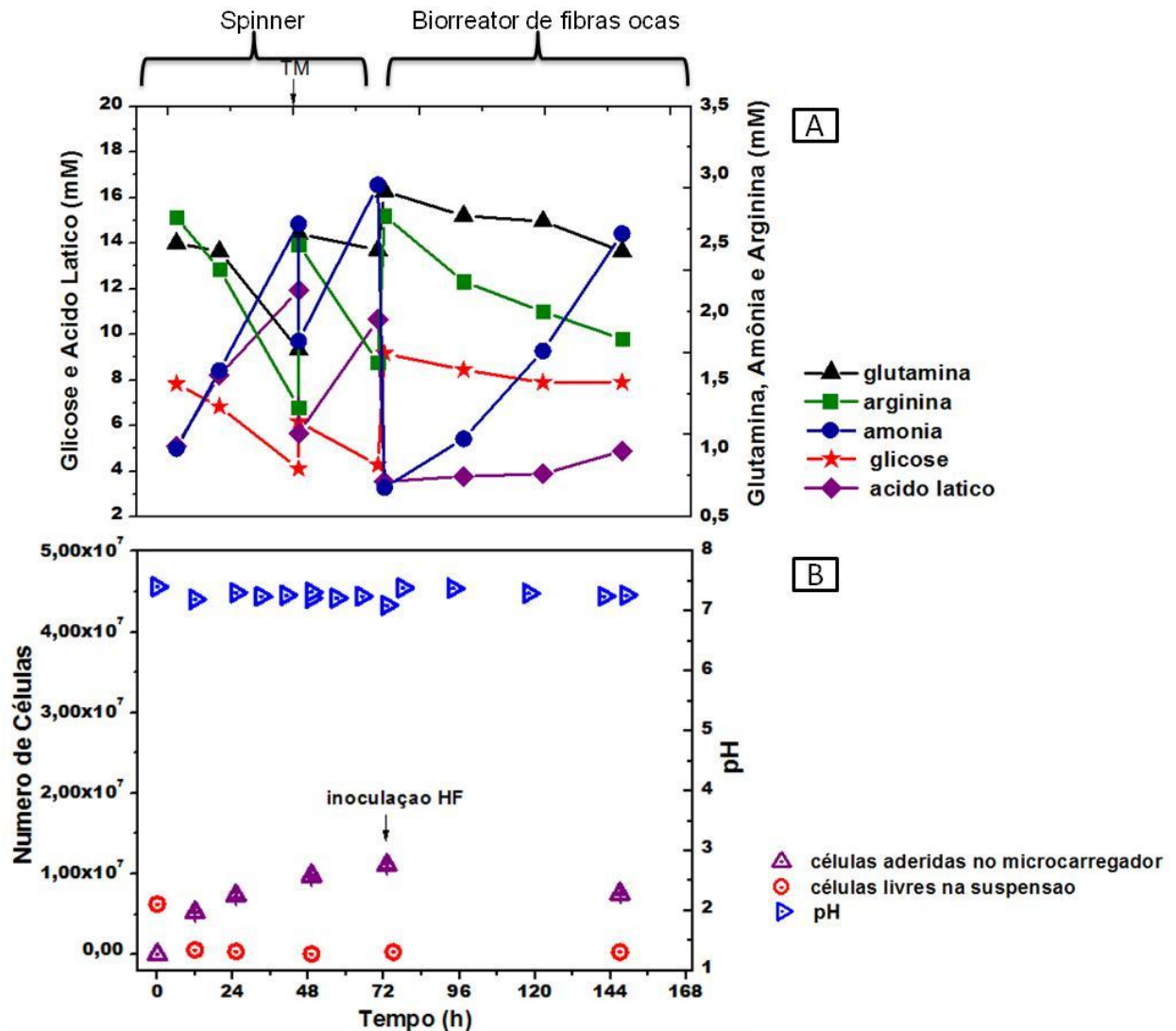
A retirada de amostras de meio de cultura para análise de nutrientes e metabólitos após o experimento foi realizada a cada 24 horas. Uma pequena parte da mesma era imediatamente utilizada para realizar medidas de pH e glicose. Como as células no biorreator são de difícil acesso, a amostragem da biomassa é extremamente difícil, sendo o crescimento celular estimado indiretamente a partir do consumo da glicose no meio de cultura. A Figura 43 mostra os resultados de pH, glicose e oxigênio dissolvido durante o cultivo.



**Figura 43** – Valores de pH, glicose (g/L) e % oxigênio dissolvido durante o experimento 6.

Como se pode observar na Figura 43, a porcentagem de oxigênio dissolvido permaneceu na faixa de 70%, com a injeção manual desse gás. O pH se manteve na faixa ótima de 7,2-7,4 e as medidas de concentração de glicose por CLAE mostram a existência de consumo nos três primeiros dias de funcionamento do biorreator.

O gráfico obtido para o experimento se encontra na Figura 44 abaixo.



**Figura 44-** Resultados obtidos no experimento 6 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner de 100 mL, com volume de trabalho de 50 mL e biorreator de fibra oca. Em (A) estão representados as concentrações dos nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e dos metabólitos tóxicos (ácido láctico e amônia). Em (B) estão representados os valores do número de células na suspensão e no microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F, assim como os valores de pH do meio de cultivo. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas. A seta TM indica troca de meio de cultura.

Com os dados obtidos, percebe-se que o número de células na suspensão permaneceu baixo durante o experimento. Com a realização da troca do meio de cultura em 48 horas e controle do CO<sub>2</sub> na incubadora, o pH permaneceu na faixa ótima (7,2-7,4) no decorrer do experimento no frasco spinner. O pH no biorreator de fibra oca também manteve-se na faixa ótima, devido a eficácia do novo tamponamento do meio de cultura.

Não houve esgotamento de glicose, atingindo valores mínimos de 4,11 mM em 49 horas no frasco Spinner e 7,88 mM em 147 horas no biorreator de fibra oca. A arginina também não esgotou como nos experimentos anteriores.

Em relação aos metabólitos tóxicos, a amônia atingiu valores de 2,92 mM em 73 horas no frasco Spinner e 2,57 mM em 147 horas no biorreator de fibra oca, não sendo considerado inibitório (acima de 3 mM). Já o ácido láctico atingiu um valor máximo de 11,94 mM em 49 horas no frasco Spinner e 4,89 mM em 147 horas no biorreator de fibra oca, valor dentro do considerado não-inibitório (inferior a 28 mM).

Observou-se que a gelatina se liquefez durante o cultivo, provavelmente devido ao aumento de temperatura de ambiente para 37° C, fazendo com que os microcarregadores sedimentassem no interior do biorreator, como pode ser observado na Figura 45.



**Figura 45** - Sedimentação dos microcarregadores colonizados com células hMSC-TERT durante o experimento 6 no biorreator de fibra oca.

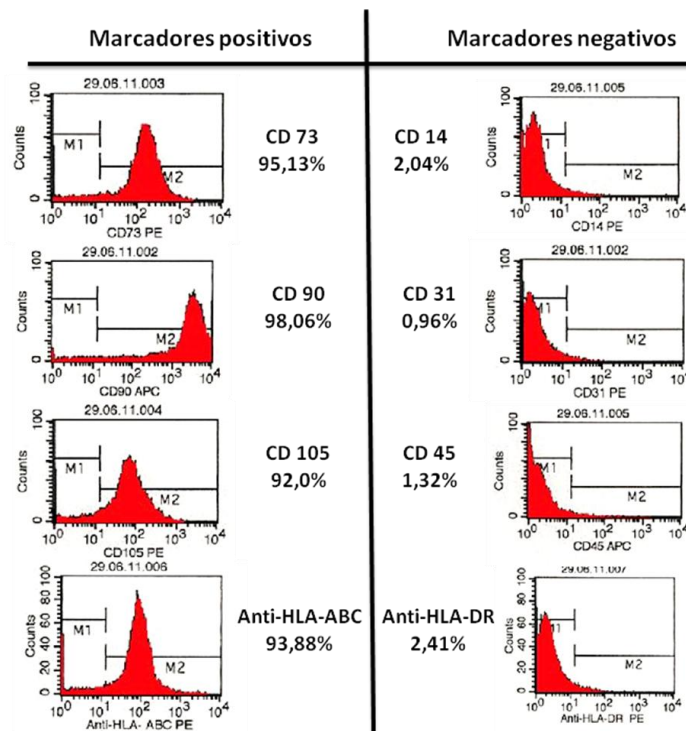
Após 123 horas de cultivo, não observou-se queda significativa da glicose como mostra a Figura 43, permitindo deduzir que o crescimento celular havia cessado. Assim, com 147 horas de cultivo terminou-se o experimento e realizou-se a quantificação celular. As células foram retiradas do EEC com o auxílio de uma seringa de 15 mL e o meio de cultura foi ressuspensionado com meio de cultura fresco sem vermelho de fenol para quantificação celular através do método colorimétrico do MTT.

Realizou-se também o tratamento enzimático da amostra com Tryple™ por 30 minutos e obteve-se um valor de número de células de  $2,3 \times 10^5$  células. Um valor muito baixo, visto que foi inoculado no biorreator de fibra oca  $1,10 \times 10^7$  células. Esse valor baixo está relacionado ao fato das células estarem aderidas fortemente ao microcarregador, não permitindo a liberação das mesmas após o tratamento enzimático.

O valor de células quantificado pelo método do MTT foi de  $7,55 \times 10^6$  células. Com um fator de expansão ainda baixo ( $\sim 1,5$ ), pode-se afirmar que, apesar de ter-se conseguido fazer funcionar o biorreator de fibra oca, o mesmo está longe de suas melhores condições de uso. Os maiores problemas foram provocados, provavelmente, pela decantação dos microcarregadores colonizados, impedindo a oxigenação e suprimento de nutrientes.

A fim de avaliar a conservação do perfil fenotípico de CTMs, realizou-se uma análise de citometria de fluxo com a recuperação parcial das células aderidas no microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F no final do experimento.

No citômetro de fluxo, as células foram analisadas com relação aos seus antígenos de superfície, por meio de uma marcação com anticorpos monoclonais específicos. Para a realização do controle negativo, foram utilizados os anticorpos Anti-Mouse IgG1-FITC, Anti-Mouse IgG2a-PE, Anti-Mouse IgG-APC e Anti-Mouse IgG1-PerCP (BD Pharmingen, EUA). Foram estabelecidos 8 anticorpos monoclonais para a imunomarcação da linhagem: Anti-CD14-PE, Anti-CD31-PE, Anti-CD45-APC, Anti-CD73-PE, Anti-CD90-PE, Anti-CD105-PerCP, Anti-HLA-ABC-PE e Anti-HLA-DR-PerCP. Os resultados da imunofenotipagem, representados na Figura 46, revelaram que a população de células foi positiva para os marcadores comuns às células-tronco derivadas da medula óssea: CD73, CD90, CD105 com expressão de mais de 95%; e negativa para os marcadores de superfície de células hematopoiéticas: CD14, CD31, CD45 e HLA-DR.



**Figura 46** - Resultados das análises de citometria de fluxo para a linhagem hMSC-TERT recuperada do microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F após o cultivo em biorreator de fibra oca no experimento 6. As análises mostraram que a reatividade foi positiva para marcadores de superfície CD73, CD90, CD105 e HLA-ABC e negativa para marcadores CD14, CD31, CD45 e HLA-DR.

Esse resultado nos mostra que após o cultivo no frasco spinner e biorreator de fibras ocas, a CTM conserva suas características fenotípicas.

## 5.7 Experimento 7

O experimento 7 foi realizado com o intuito de fazer modificações no sistema de cultivo para propiciar um melhor aproveitamento do potencial do biorreator de fibra oca. Para isso, o sistema foi simplificado como ilustrado no item 4.2.13 (b.2). O cultivo em frasco spinner foi realizado da mesma maneira do experimento anterior, assim: utilizou-se o meio de cultura suplementado para não haver esgotamento da arginina, dobrou-se a concentração de microcarregadores (Pronectin<sup>®</sup>F) para 40,0 g/L para aumentar a área superficial de crescimento celular quando da inoculação do biorreator de fibra oca, o inóculo foi de  $1,25 \times 10^5$  cél/mL e a fase de adesão teve duração de 12 horas. A quantificação celular foi realizada pelo método enzimático MTT.



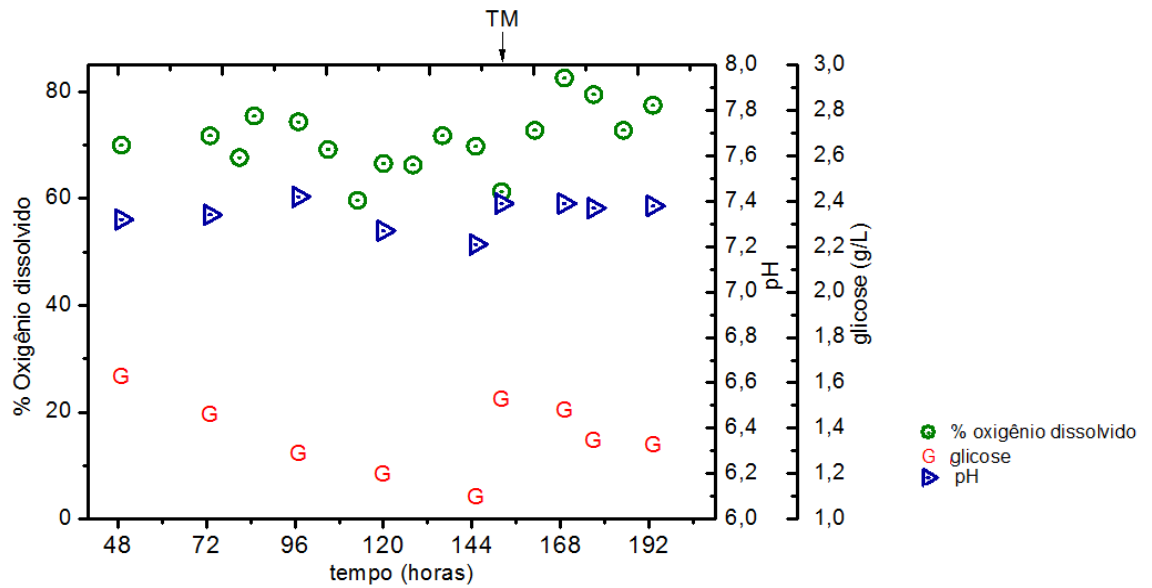
Após 48 horas de cultivo em frasco spinner, as células aderidas ao microcarregador foram inoculadas no biorreator de fibra oca. O meio de cultura utilizado no biorreator de fibra oca foi o  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% (v/v) SFB, 2,0 g/L de glicose, 2,50 mM de glutamina e 2,60 mM de arginina. Para inoculação das células foi preparado um gel composto por colágeno: ácido hialurônico: ágar (1,5%) na proporção 0,75: 0,037: 0,21 em pH = 7,2-7,4. Assim, o gel resultante foi misturado com meio de cultura  $\alpha$ -MEM na proporção 1:3. As células foram retiradas do spinner, dispersas no gel e inoculadas no biorreator de fibra oca.

Diferentemente do experimento anterior, as células ficaram imobilizadas no gel preparado e distribuídas uniformemente, conforme ilustra a Figura 47.



**Figura 47** – Células imobilizadas no gel e distribuídas uniformemente no biorreator de fibra oca.

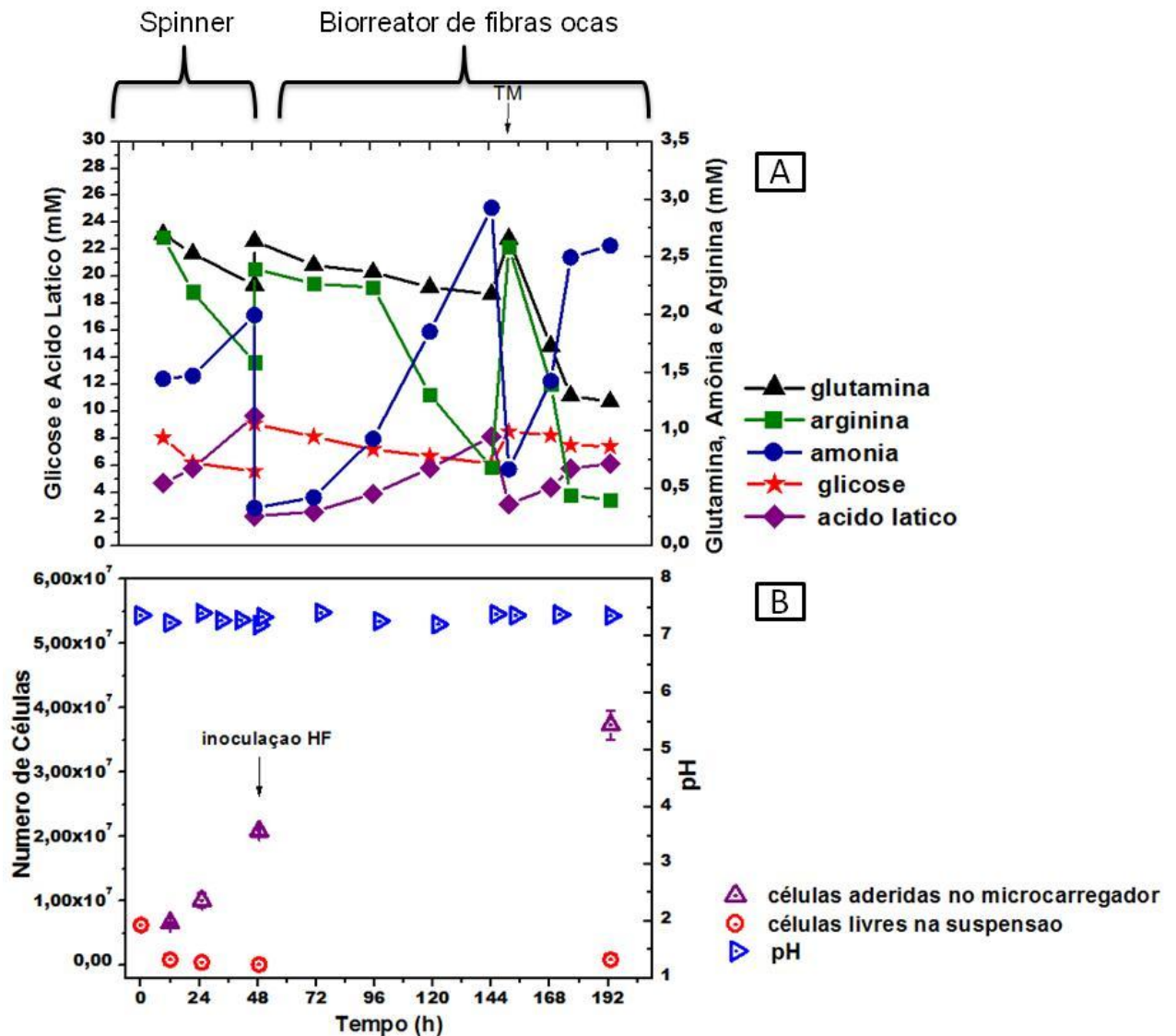
A retirada de amostras foi realizada a cada 24 horas, destinando uma fração das mesmas para medidas imediatas de pH e glicose. O monitoramento do oxigênio dissolvido foi realizado de 8 em 8 horas. A Figura 48 mostra os resultados de pH, glicose e oxigênio dissolvido durante o cultivo.



**Figura 48** - Valores de pH, glicose (g/L) e % oxigênio dissolvido durante o experimento 7. A seta TM indica troca de meio de cultura.

Como pode-se observar, a porcentagem de oxigênio dissolvido manteve-se na faixa de 60-80% e foi monitorado de 8 em 8 horas. A glicose decresceu durante o cultivo, como era de se esperar, permanecendo constante a partir de 170 horas.

O gráfico obtido durante todo o experimento se encontra na Figura 49.



**Figura 49** - Resultados obtidos no experimento 7 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner de 100 mL, com volume de trabalho de 50 mL e em biorreator de fibra oca. Em (A) estão representados as concentrações dos nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e dos metabólitos tóxicos (ácido láctico e amônia). Em (B) estão representados os valores do número de células na suspensão e no microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F, assim como os valores de pH do meio de cultivo. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas. A seta TM indica troca de meio de cultura.

Observa-se que o pH permaneceu na faixa ótima durante todo o cultivo. De acordo com a Figura 49 (A), os substratos (glicose, glutamina e arginina) não esgotaram durante o experimento. Em relação aos metabólitos tóxicos, o ácido láctico atingiu valores de 9,66 mM em 49 horas no frasco Spinner e 8,10 mM em 145 horas no biorreator de fibra oca, não considerados inibitórios para a célula. Já a amônia atingiu valores de 1,99 mM em 49 horas no spinner e 2,49 mM em 177 horas no biorreator de fibra oca, também não considerado inibitório.

Como o único conhecimento acerca do crescimento celular durante o cultivo era realizado pelas medidas de glicose fornecidas pelo glicosímetro, a partir de 152 horas (após a troca de meio) o valor da concentração de glicose tendeu a ficar estacionário, com consumo quase nulo. Isso nos permitiu deduzir que o crescimento também estava cessando. Ao analisar os resultados das análises cromatográficas, constatou-se que o causante dessa forte limitação do crescimento foi o aminoácido arginina, o qual estava se esgotando como consequência de um alto consumo pelas células.

Assim, em 193 horas, terminou-se o experimento e realizou-se a quantificação celular pelo método enzimático com MTT. O valor obtido foi de  $3,74 \times 10^7$  células, com um fator de expansão de 5,98. Esse fator de expansão foi o melhor obtido até então e o sucesso do experimento foi principalmente devido ao gel em que as células ficaram imobilizadas. Com o gel composto de colágeno e ácido hialurônico, propiciamos um ambiente favorável e muito próximo do sistema *in vivo*, permitindo um elevado crescimento celular.

Para ter uma idéia mais exata de como foi o crescimento celular, utilizou-se a informação fornecida pelo fator de rendimento  $Y_{N/s}$  utilizando um substrato limitante que mantivesse um consumo proporcional ao crescimento. Dos três substratos mais consumidos (glicose, glutamina e arginina), a glicose foi escolhida não só porque há farta informação sobre sua evolução ao longo do experimento como porque é um substrato importante como fonte de carbono para célula. A glutamina é outro substrato interessante e diretamente ligado ao crescimento por ser a principal fonte de nitrogênio da célula, porém as informações disponíveis com relação a esse substrato são mais limitadas. A arginina foi descartada porque percebeu-se que o perfil de consumo pela célula mudou durante o cultivo, sendo o nutriente que chegou mais próximo do esgotamento total. A relação da dupla função deste aminoácido como substrato na proliferação celular e na síntese de colágeno (CURRAN *et al.*; 2005) pode ter-se modificado durante o cultivo como se pode observar na Figura 49. O perfil de consumo da arginina se mostra bem diferente do da glutamina e da glicose.

A idéia central da utilização do fator de rendimento  $Y_{N/Gli}$  é estimar a quantidade de célula produzida através da quantidade de glicose consumida durante o cultivo no biorreator de fibra oca. Para tal, se partiu da hipótese comumente utilizada (Doyle & Griffiths, 1998) de que o metabolismo da glicose não sofre grandes modificações e, portanto, o valor do fator de rendimento é aproximadamente constante.

Partindo da definição de  $Y_{N/Gli}$ , pode-se estabelecer uma relação direta entre a quantidade de células geradas por crescimento e a quantidade de glicose consumida nesse processo, assim:

$$Y_{N/G} = \frac{N_t - N_o}{m_{Go} - m_{Gt}} \quad (5.7.1)$$

Onde:

$Y_{N/G}$  = fator de rendimento de células em glicose

$N_o$  = quantidade de células no início do processo de crescimento

$N_t$  = quantidade de células depois de um tempo  $t$  de crescimento

$m_{Go}$  = massa de glicose no início do processo crescimento

$m_{Gt}$  = massa de glicose no tempo  $t$  de crescimento

A partir da equação anterior, a quantidade de células em qualquer instante durante o processo de cultivo pode ser estimada com a relação:

$$N_t = N_o + Y_{N/G}(m_{Go} - m_{Gt}) \quad (5.7.2)$$

Para a utilização desta equação é necessário conhecer o valor instantâneo de  $m_{Gt}$ , o qual pode ser facilmente obtido através de um ajuste dos dados experimentais de massa de glicose no biorreator em função do tempo de cultivo. Utilizando os recursos de ajuste de modelos do software Origin<sup>®</sup> 8.0 foi possível obter a seguinte relação funcional entre  $m_{Gt}$  e  $t$ :

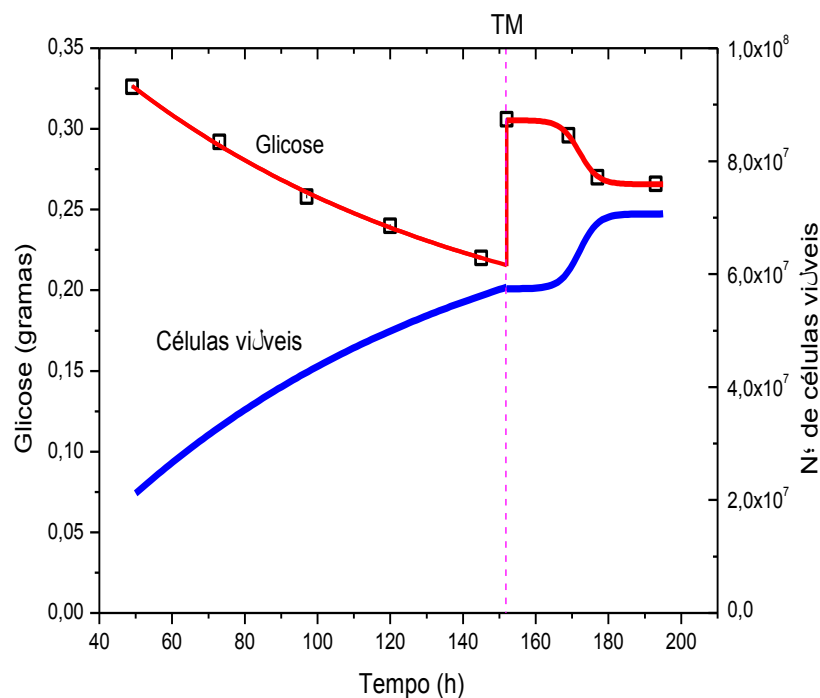
Para  $49 \leq t \leq 152$  antes da troca de meio:

$$m_{Gt} = 0,2819e^{\frac{-t}{99,846}} + 0,1541 \quad (5.7.3)$$

e para  $152 \leq t \leq 193$  para depois da troca de meio:

$$m_{Gt} = 0,04033 - \frac{0,03971}{\left(1 + \ell^{\frac{t-172,01292}{2,5644}}\right)} \quad (5.7.4)$$

O valor de  $Y_{N/G}$  na Equação 5.7.3 foi a média ( $3,340 \times 10^8$  células/grama) calculada com dados dos experimentos em frasco spinner na fase exponencial de crescimento. O valor de  $N_0 = 2,086 \times 10^7$  células corresponde a quantidade de células inoculadas no biorreator de fibra oca em  $t=49$  horas e o valor de  $m_{G0} = 0,3260$  g é o correspondente a quantidade de glicose no momento da inoculação. Com os valores descritos foi possível utilizar a equação de  $N_t$  para estimar a quantidade de células ao longo de cultivo no biorreator de fibra oca. Os dados de  $N_t$  em função do tempo de cultivo podem ser vistos na Figura 50.



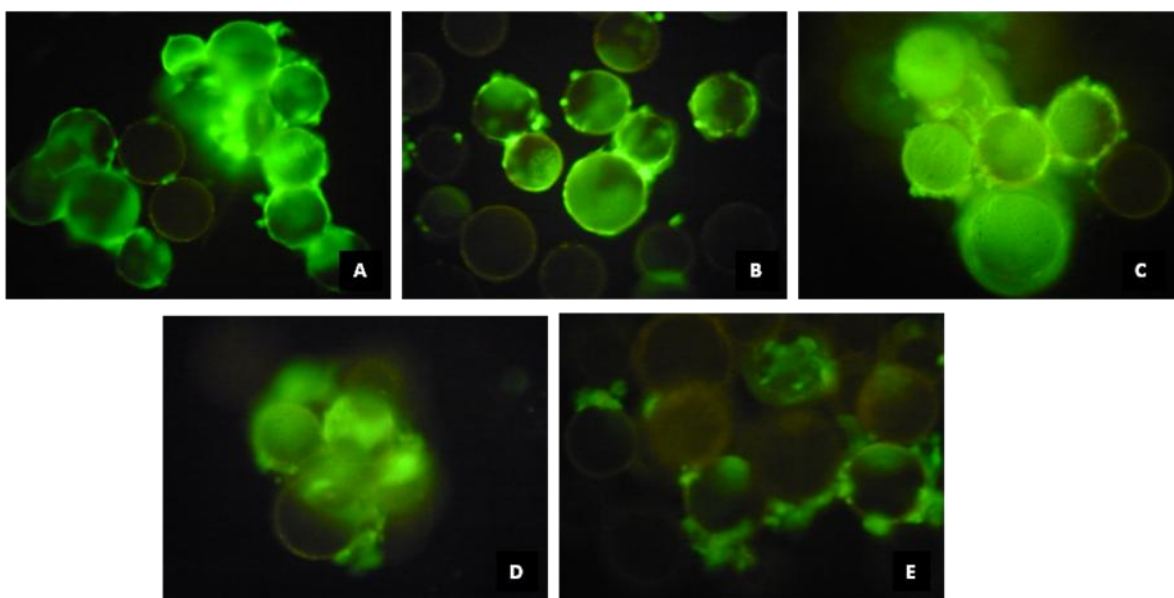
**Figura 50** - Resultados da estimativa do crescimento celular durante o cultivo da linhagem hMSCTERT no biorreator de fibra oca do experimento 7. TM significa troca de meio.

Como se pode observar na Figura 50, o crescimento celular foi bastante intenso, tendo sido interrompido apenas pelo esgotamento da Arg por volta de 193 horas de operação, quando se atingiu  $7 \times 10^7$  células. O fator de expansão total, ou seja, aquele calculado desde a inoculação do spinner até o final do cultivo no biorreator de fibra oca, foi

de 11, 2, que pode ser considerado o maior valor atingido neste trabalho. Convém esclarecer que este fator de expansão ainda pode ser facilmente superado ao se adotarem estratégias de cultivo com trocas mais frequentes de meio de cultura. Esta hipótese é reforçada pelo fato comprovado de os microcarregadores ainda não estarem saturados de células no final do experimento.

Realizou-se também o tratamento enzimático da amostra com Tryple™ e obteve-se um valor de número de células de  $2,4 \times 10^6$  células. Esse valor é extremamente baixo novamente devido a forte interação das células com o microcarregador e a porcentagem de recuperação celular foi de 15,6%.

A Figura 51 abaixo ilustra as imagens tiradas em microscópio ótico com fluorescência após o cultivo no biorreator de fibra oca.



**Figura 51-** Imagens de microscopia ótica baseada em fluorescência do microcarregador Pronectin®F com células no final (193 horas) do experimento do biorreator de fibra oca.

## 6 CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos nos permite concluir o seguinte:

1. Foi possível cultivar a linhagem hMSC-TERT em frasco spinner com o microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F. Esta técnica, após aprimoramentos, permitiu a obtenção de um fator de expansão celular de até 5,79, porém, ainda limitado por causa da formação de aglomerados de microcarregadores com células. Ainda assim, com a recuperação parcial das células foi possível a análise de citometria de fluxo para comprovação da conservação das características fenotípicas da hMSC-TERT.
2. Os cultivos realizados no biorreator de fibra oca revelaram um potencial interessante deste para diminuir o problema gerado pelos aglomerados. Preparando o inóculo no frasco spinner e cultivando a continuação as células aderidas ao microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F num biorreator de fibra oca com espaçamento adequado das fibras, foi possível realizar o cultivo da hMSC-TERT sem influência da aglomeração. Com o preenchimento do espaço extracápsular com gel composto de uma mistura de colágeno e ácido hialurônico foi possível atingir um fator de expansão de 11,2. Esse fator de expansão foi o melhor obtido neste trabalho e o sucesso do experimento foi, principalmente, devido ao gel em que as células ficaram imobilizadas durante o cultivo. O gel propiciou um ambiente favorável e muito próximo do ambiente *in vivo*, permitindo uma intensa proliferação celular e isenta de diferenciação.
3. O microcarregador Pronectin<sup>®</sup>F apesar de ter mostrado qualidades boas como substrato para ancoramento, crescimento e diferenciação celular, sua utilidade é questionável devido a presença de componente não biodegradável (poliestireno) e a baixa eficiência apresentada na recuperação final das células.



## **7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Para futuros trabalhos, sugere-se:

1. Para conseguir recuperação celular mais eficiente, utilizar a enzima dissociadora Tryple™ na sua versão comercial mais concentrada que a utilizada neste trabalho.
2. Dar continuidade aos experimentos no biorreator de fibra oca:
  - a) Otimizando o processo com microcarregadores que permitam melhor recuperação celular;
  - b) com meios de cultura livres de soro ou com meios definidos;
  - c) com reposição contínua ou semi-contínua do meio de cultura.
3. Testar outras moléculas adesivas como componentes do gel utilizado para imobilizar as células no espaço extracapilar (Ex: laminina e pronectina) para incrementar a adesão celular e, talvez, dispensar a utilização de microcarregadores.

**8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABRANCHES, E.; BEKMAN, E.; HENRIQUE, D.; CABRAL, J. M. S.; Expansion of Mouse Embryonic Stem Cells on Microcarriers. **Biotechnology and Bioengineering**, Portugal, v. 96, p. 1211-1221, 2007.

ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: form basic biology to clinical applications. **Gene Therapy**, p. 1-8, 2007.

ALDAHMAH, A.; HAACK-SORENSEN, M.; AL-NBANEEN, M.; HARKNESS, L.; ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M. Human serum is as efficient as fetal bovine serum in supporting proliferation and differentiation multipotent stromal (mesenchymal) stem cells in vitro and in vivo. **Stem cell rev. and rep.**, 2011.

ALTAMIRANO, C.; GÒDIA, F; CAIRÓ, J. J. Metabolismo de Células de Mamíferos Cultivada *In Vitro*. In: MORAES, A. M.; MENDONÇA, R. Z.; SUAZO, C. A. T. Meios de Cultura para Células-Animais. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. São Paulo: Editora Roca, p. 81-104, 2008.

AMABLE, P.; BUTLER, M. Cell metabolism and its control in culture. In: CASTILHO, L. R.; MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; BUTLER, M. **Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy**. New York: Taylor & Francis Group, p. 95-97, 2008.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, p. 568-584, 2004.

BILLELO, J. A.; BAUER, G.; DUDLEY, M. N.; COLE, G. A.; DRUSANO, G. L. Effect of 2',3'-Didehydro-3'-Deoxythymidine in an In Vitro Hollow-Fiber Pharmacodynamic Model System Correlates with Results of Dose-Ranging Clinical Studies. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 38, p. 1386-1391, 1994.

BONGSO, A.; RICHARDS, M. History and perspective of stem cell research. **Best practice and research clinical obstetrics and gynaecology**, v. 18, p. 827-842, 2004.

BOSSE, R.; KULMBURG, P.; KALLE, C.; ENGELHARDT, M.; DWENGER, A.; ROSENTHAL, F.; SCHULZ, G. Production of stem-cell transplants according to good manufacturing practice. **Ann. Hematol.**, v. 79, p. 469-476, 2000.

BOO, L.; SELVARATNAM, L.; TAI, C. C.; AHMAD, T. S.; KAMARUL, T. Expansion and preservation of multipotentiality of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells in dextran-based microcarrier spin culture. **J Mater Sci: Mater Med**, 2011.

BRIGNIER, A. C.; GEWIRTZ, A. M. Embryonic and adult stem cell therapy. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 125, p. 336-344, 2010.

BROOKE, G.; COOK, M.; BLAIR, C.; HAN, R.; HEAZLEWOOD, C.; JONES, B.; KAMBOURIS, M.; KOLLAR, K.; MCTAGGART, S.; PELEKANOS, R.; RICE, A.; ROSSETTI, T.; ATKINSON, K. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. **Cell and developmental biology**, v.18, p. 846-858, 2007.

BUTLER, M. Introduction: The use of animal cell culture. In: **Animal Cell culture and technology**. USA: BIOS Scientific Publishers, p. 1-9, 2004.

BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. **Applied Microbiology Biotechnology**, Canadá, v. 68, p. 283-291, 2005.

CADWELL, J. J. S. New developments in Hollow-fiber cell culture. **American Biotechnology Laboratory**, 2004.

CAPLAN, A. I.; BRUDER, S. P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21<sup>st</sup> century. **Trends in molecular medicine**, v. 7, p. 259-264, 2001.

CARLO, R. J. D.; MONTEIRO, B. S.; NETO, N. M. A. Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicações. **Ceres**, v. 56(4), p. 446-450, 2009.

CATAPANO, G.; CZERMAK, P. EIBL, R.; EIBL D.; PÖRTNER, R. Bioreactor design and scale-up. In: EIBL, R.; EIBL, D.; PÖRTNER R.; CATAPANO, G.; CZERMAK, P. **Cell and tissue reaction engineering**. Alemanha: Springer, p. 222-224, 2008.

CHICO, E.; RODRIGUEZ, G.; FIGUEREDO, A. Biorreatores para células animais. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais**. São Paulo: Roca, p. 216-217, 2008.

COLTER, D. C.; SEKLIA, I.; PROCKOP, D. J. Identification of a subpopulation of rapidly selfrenewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. **PNAS**, v. 98, p. 7841-7845, 2001.

CORRIGAN-HANDA, A.; NIKOLAY, S.; FERGUSON, C. Monoclonal antibody production in hollow-fiber bioreactors: Process control and validation strategies for manufacturing industry. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 225-230, 1995.

COVAS, D. T.; PICCINATO, C. E.; ORELLANA, M. D.; SIUFI, J. L.C; SILVA, W. A.; PROTO-SIQUEIRA, R.; RIZZATTI, E. G.; NEDER, L.; SILVA, A. R. L.; ROCHA, V.; ZAGO, M. A. Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. **Experimental Cell Research**, v. 309, p. 340-344, 2005.

CSAKI, C.; SCHNEIDER, P. R. A.; SHAKIBAEI, M. Mesenchymal stem cells as a potential pool for cartilage tissue engineering. **Annals of Anatomy**, v. 190, p. 395-412, 2008.

CURRAN, J. N.; WINTER, D. C.; HAYES, D. B. Biological fate and clinical implications of arginine metabolism in tissue healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 74, p. 376-386, 2005.

DAI, L-J.; MONIRI, M. R.; ZENG, Z-R.; ZHOU, J. X.; RAYAT, J.; WARNOCK, G. L. Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy. **Cancer Letters**, 2011.

DAVIS, J. M. Hollow fiber cell culture. In: Pörtner, R. **Animal Cell Biotechnology: methods and protocols**. USA: Humana Press, p.337, 2007.

DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology**, v. 28, p. 875-884, 2000.

DEWAR, V.; VOET, P.; DENAMUR, F.; SMAL, J. Industrial Implementation of in Vitro Production of Monoclonal Antibodies. **ILAR Journal**, v. 46, p. 307-313, 2005.

DIGIROLAMO, C. M.; STOKES, D.; COLTER, D.; PHINNEY, D. G.; CLASS, R.; PROCKOP, J. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. **Br J Haematol.**, v. 107, p. 275-281, 1999.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J.B. **Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology**, John Wiley & Sons, Canadá, 1998.

DRESSLER, M. R.; BUTLER, D. L.; BOIVIN, G. P. Effects of age on the repair ability of mesenchymal stem cells in rabbit tendon. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, p. 287-293, 2005.

DURANTE, W.; LIAO, L.; REYNA, S. V.; PEYTON, K. J.; SCHAFER, A. I. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Stimulates L-Arginine Transport and Metabolism in Vascular Smooth Muscle Cells Role in Polyamine and Collagen Synthesis. **Circulation**, p. 1121-1127, 2001.

EIBES, G.; SANTOS, F.; ANDRADE, P. Z.; BOURA, J. S.; ABECASIS, M. M. A.; SILVA, C. L.; CABRAL, J. M. S. Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system. **Journal of Biotechnology**, v. 146, p. 194-197, 2010.

FERNANDES, A. M.; FERNANDES, T. G.; DIOGO, M. M.; SILVA, C. L.; HENRIQUE, D.; CABRAL, J. M. S. Mouse embryonic stem cell expansion in a microcarrier-based stirred culture system. **Journal of Biotechnology**, v. 132, p. 227-236, 2007.

FERNANDES, A. M.; MARINHO, P. A. N.; SARTORE, R. C.; PAULSEN, B. S.; MARIANTE, R. M.; CASTILHO, L. R.; REHEN, S. K. Successful scale-up of human embryonic stem cell production in a stirred microcarrier culture system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 515-522, 2009.

FRAUENSCHUH, S.; REICHMANN, E.; IBOLD, Y.; GOETZ, P. M.; SITTINGER, M.; RINGE, J. A Microcarrier-Based Cultivation System for Expansion of Primary Mesenchymal Stem Cells. **Biotechnology Progress**, Germany, v. 23, p. 187-193, 2007.

GERECHT-NIR, S.; ITSKOVITZ-ELDOR, J. The promise of human embryonic stem cells. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 18, p. 843-852, 2004.

GARCIA-OLMO, D.; HERREROS, D.; PASCUAL, I.; PASCUAL, J. A.; DEL-VALLE, E.; ZORRILLA J.; DE-LA-QUINTANA, P.; PASCUAL M. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. **Dis Colon Rectum**, v. 52, p. 79-86, 2009.

GLOECKNER, H.; JONULEIT, T.; LEMKE, H-D. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue<sup>TM</sup>. **Journal of Immunological Methods**, v. 252, p.131-138, 2001.

GODARA, P.; MCFARLAND, C. D.; NORDON, R. E. Design of bioreactors for mesenchymal stem cell tissue engineering. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 408-420, 2008.

GORBA, T.; ALLSOPP, T. E. Pharmacological potential of embryonic stem cells. **Pharmacological Research** , v. 47, p. 269-278, 2003.

HEDRICK, M. H.; DANIELS, E. J. The use of adult stem cells in regenerative medicine. **Clinics in plastic surgery**, v. 30, p. 499-505, 2003.

HOESLI, C. A.; LUU, M.; PIRET, J. M. A novel alginate hollow fiber bioreactor process for cellular therapy applications. **Biotechnology Prog.**, v.25, p. 1740-1751, 2009.

HUANG, D.; BALIAN, G.; CHHABRA, B. Tendon Tissue Engineering and Gene Transfer: The Future of Surgical Treatment. **J. Hand. Sur.** , v. 31, p. 693-704, 2006.

IQBAL, S. A.; MANNING, C.; SYED, F.; KOLLURU, V.; HAYTON, M.; WATSON, S.; BAYAT, A. Identification of Mesenchymal Stem Cells in Perinodular Fat and Skin in Dupuytren's Disease: A Potential Source of Myofibroblasts with Implications for Pathogenesis and Therapy. **Stem cells**, 2011.

JARDIM, L. B.; ASHTON-PROLLA, P.; MALUF, S. W. O prêmio nobel de fisiologia e medicina de 2009: o papel dos telômeros e da telomerase na manutenção dos cromossomos. **Rev HCPA**, v. 29(3), p. 271-275, 2009.

JARDIN, B. A.; ZHAO, Y.; SELVARAJ, M.; MONTES, J.; TRAN, R.; PRAKASH, S.; ELIAS, C. B. Expression of SEAP (secreted alkaline phosphatase) by baculovirus mediated transduction of HEK 293 cells in a hollow fiber bioreactor system. **Journal of Biotechnology** , v.135, p. 272-280, 2008.

JORGENSEN, C.; GORDELADZE, J.; NOEL, D. Tissue engineering autologous mesenchymal stem cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p. 406-410, 2004.

KING, J. A.; MILLER, W. M. Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation. **Current opinion in Chemical Biology**, v. 11, p. 394-398, 2007.

KIM, J-Y.; JEON, H. B.; YANG, Y. S.; OH, W.; CHANG, J. W. Application of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in disease models. **World J Stem Cells**, v.2, p. 34–38, 2010.

KOLLER, M. R.; MAHER, R. J.; MANCHEL, I. Alternatives to animal sera for human bone marrow cell expansion: human serum and serum-free media. **J Hematotherapy**, v.7, p. 413-423, 1998.

KRAMPERA, M.; PIZZOLO, G.; APRILI, G. FRANCHINI, M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. **Bone**, v. 39, p. 678–683, 2006.

LANGE, C.; CAKIROGLU, F.; SPIESS, A-N.; CAPPALLO-OBBERMANN, H.; DIERLAMM, J.; ZANDER, A. R. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. **Journal of cellular physiology**, v. 213, p. 18-26, 2007.

LEBLANC, K.; FRASSONI, F.; BALL, L.; LOCATELLI, F.; ROELOFS, H.; LEWIS, I.; LANINO, E.; SUNDBERG, B.; BERNARDO, M. E.; REMBERGER, M. DINI, G.; BACIGALUPO, A.; FIBBE, W.; RINGDÉN. O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. **The Lancet**, v. 371, p. 1579-1586, 2008.

LEE, J. S.; HONG, J. M.; MOON, G. J.; LEE, P. H.; AHN, Y. H.; BANG, O. Y. A Long-Term Follow-Up Study of Intravenous Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients With Ischemic Stroke. **Stem Cell**, v. 28, p. 1099-1106, 2010.

LÉO, P.; GALES, A. L. L.; SUAZO, C. A. T.; MORAES, A. M. Células animais: conceitos básicos. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais**. São Paulo: Roca, p. 15-41, 2008.

LEONG, M.; BABBITT, W.; VYAS, G. A hollow-fiber bioreactor for expanding HIV-1 in human lymphocytes used in preparing an inactivated vaccine candidate. **Biologicals**, v. 35, p. 227-233, 2007.

MARTIN, I.; WENT, D.; HEBERER, M. The role of bioreactors in tissue engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p. 80-85, 2004.

MAUMUS, M.; GUÉRIT, D.; TOUPET, K.; JORGENSEN, C.; NÖEL, D. Mesenchymal stem cell-based therapies in regenerative medicine: applications in rheumatology. **Stem Cell Res Ther.**, v.2, 2011.



MCSHARRY, J. J.; DEZIEL, M. R.; ZAGER, K.; WENG, Q.; DRUSANO, G. L. Pharmacodynamics of Cidofovir for Vaccinia Virus Infection in an In Vitro Hollow-Fiber Infection Model System. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, p. 129-135, 2009.

MORAES, A. M.; MENDONÇA, R. Z.; SUAZO, C. A. T. Meios de cultura para células animais. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais**. São Paulo: Roca, p. 107, 114, 2008.

OLIVEIRA, L. A. C.; SPONCHIADO, G.; ADAM, M. L. Conceitos e aplicações de célula-tronco em medicina regenerativa: uma revisão. **RUBS**, Curitiba, v.2, p. 32-42, 2006.

PANARONI, C.; GIOIA, R.; LUPI, A.; BESIO, R.; GOLDSTEIN, S. A.; KREIDER, J.; LEIKIN, S.; VERA, J. C.; MERTZ, E. L.; PERILLI, E.; BARUFFALDI, F.; VILLA, I.; FARINA, A.; CASASCO, M.; CETTA, G.; ROSSI, A.; FRATTINI, A.; MARINI, J. C.; VEZZONI, P.; FORLINO, A. In utero transplantation of adult bone marrow decreases perinatal lethality and rescues the bone phenotype in the knockin murine model for classical, dominant osteogenesis imperfecta. **Blood**, v. 114, p. 459–468, 2009.

PAYUSHINA, O. V.; DOMARATSHAYA, E. I.; STAROSTIN, V. I. Mesenchymal Stem Cells: Sources, Phenotype, and Differentiation Potential. **Biology Bulletin**, v. 33, p. 2-18, 2006.

PEREIRA, A. L. A.; VERAS, S. S. L.; SILVEIRA, E. J. D.; SEABRA, F. R. G.; PINTO, L. P.; SOUZA, L. B.; FREITAS, R. A. O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteinases em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 71, nº 1, 2005.

PESSOLATO, A. G. T.; FERREIRA, P. C. G.; JACOB, T. R.; TRISTÃO, W. **Folhetins**, Casa da Ciência, 2010.

PHILLIPS, B. W.; LIM, R. Y. M.; TAN, T. T.; RUST, W. L.; CROOK, J. M. Efficient expansion of clinical-grade human fibroblasts on microcarriers: Cells suitable for ex vivo expansion of clinical-grade hESCs. **Journal of Biotechnology**, 2008.

PHILLIPS, B. W.; LIM, R. Y. M.; TAN, T. T.; RUST, W. L.; CROOK, J. M. Attachment and growth of human embryonic stem cells on microcarriers. **Journal of Biotechnology**, v. 138, p. 24-32, 2008.

PLEWKA, M.; PAKULA, M. K.; LIPIEC, P.; PERUGA, J. Z.; JEZEWski, T.; KIDAEA, M.; WIERZBOWSKA-DRABIK, K.; KORYCKA, A.; ROBAK, T.; KASPRZAK, J. D. Effect of Intracoronary Injection of Mononuclear Bone Marrow Stem Cells on Left Ventricular Function in Patients With Acute Myocardial Infarction. **The American Journal of Cardiology**, v. 104, p. 1336-1342, 2009.

PÖRTNER, R.; NAGEL-HEYER, S.; GOEPFERT, C.; ADAMIETZ, P.; Meenen, N. M. Bioreactor design for tissue engineering. **J. Biosc. Bioeng**, v.100, p. 235-245, 2005.

POUNTOS, I.; CORSCADDEN, D.; EMERY, P.; GIANNOUDIS, P. V. Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. **Injury**, 38S4, p. 23-33, 2007.

RASTEGAR, F.; SHENAQ, D.; HUANG, J.; ZHANG, W.; ZHANG, B-Q.; HE, B-C.; CHEN, L.; ZUO, G-W.; LUO, Q.; SHI, Q.; WAGNER, E. R.; HUANG, E.; GAO, Y.; KIM, S. H.; ZHOU, J-Z.; BI, Y.; SU, Y.; ZHU, G.; LUO, J.; LUO, X.; QIN, J.; REID, R. R.; LUU, H. H.; HAVDON, R. C.; DENG, Z-L.; HE T-C. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. **World J Stem Cells**, v 2, p. 67-80, 2010.

REUBINOFF, B. Human embryonic stem cells-potential applications for regenerative medicine. **International Congress Series**, v. 1266, p. 45-53, 2004.

RINGE, J.; KAPS, C.; BURMESTER, G.; SITTINGER, M. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. **Naturwissenschaften**, v.89, p. 338-351, 2002.

SANCHES, Simone. Expansão de células-tronco mesenquimais em frasco spinner com microcarregadores. 2010. 112 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2010.

SART, S.; SCHNEIDER, Y-J.; AGATHOS, S. N. Ear mesenchymal stem cells: An efficient adult multipotent cell population fit for rapid and scalable expansion. **Journal of Biotechnology**, v. 139, p. 291-299, 2009.

SATO, H.; SUEMORI, H.; TOGUCHIDA, J.; HIROOIWATA, M. Recombinant Matrix Protein for Maintenance of Undifferentiated Primate Embryonic Stem Cells. **Tissue Engineering**, v. 13, p. 1539-1547, 2007.

SEKIYA I.; LARSON, B. L.; SMITH, J. R.; POCHAMPALLY, R.; CUI, J. G.; PROCKOP, D. J. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. **Stem cells**, v. 20, p. 530-541, 2002.

SCHOP, D.; JANSSEN, F. W.; BORGART, E.; BRUIJIN, J. D.; DIJKHUIZEN-RADERSMA R. V. Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: growth and metabolism. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 2, p. 126-135, 2008.

SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G. F.; MELLO, L. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **J Bras Neurocirurg**, v. 16, p. 13-19, 2005.

SENSEBÉ, L. Clinical grade production of mesenchymal stem cells. **Bio-Medical and Materials and Engineering**, v. 00, p. 1-8, 2002.

SERRA, M.; BRITO, C.; LEITE, S. B.; GORJUP, E.; BRIESEN, H. V.; CARRONDO, M. J. T.; ALVES, P. M. Stirred bioreactors for the expansion of adult pancreatic stem cells. **Annals of Anatomy**, v. 191, p. 104-115, 2009.

SERRA, M.; BRITO, C.; SOUSA, M. F. Q.; JENSEN, J.; TOSTÕES, R.; CLEMENTE, J.; STREHL, R.; HYLLNER, J.; CARRONDO, M. J. T.; ALVES, P. M. Improving expansion of pluripotent human embryonic stem cells in perfused bioreactors through oxygen control. **Journal of Biotechnology**, v. 148, p. 208-215, 2010.

SONG, G.; JU, Y.; SOYAMA, H. Growth and proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells affected by type I collagen, fibronectin and bFGF. **Materials Science and engineering C**, v. 28, p.1467-1471, 2008.

SOTIROPOULOU, P. A. ; PEREZ, S. A. ; SALAGIANNI, M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, p. 462-471, 2006.

SOUZA, V. F.; LIMA, L. M. C.; REIS, S. R. A.; RAMALHO, L. M. P.; SANTOS, J. N. Célula-tronco: uma breve revisão. **R. Ci. méd. biol.**, v. 2, p. 251-256, 2003.

SROUJI, S.; LIVNE, E. Bone marrow stem cells and biological scaffold for bone repair in aging and disease. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, p. 281-287, 2005.

STUTE, N.; HOLTZ, K.; BUBENHEIM, M.; LANGE, C.; BLAKE, F.; ZANDER, A. R. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. **Experimental Hematology**, v. 32, p.1212–1225, 2004.

THOMAS, R. J.; HOURD, P. C.; WILLIAMS, D. J. Application of process quality engineering techniques to improve the understanding of the in vitro processing of stem cells for therapeutic use. **Journal of Biotechnology**, v.136, p. 148-155, 2008.

TSUTSUMI, S.; SHIMAZU, A.; MIYAZAKI, K. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 288, p. 413-419, 2001.

WANG, Y.; KIM, U-J.; BLASIOLI, D. J.; KIM, H-J.; KAPLAN, D. L. In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 26, p. 7082-7094, 2005.

WEBER, C.; POHL, S.; PÖRTNER, -IFN R.; WALLRAPP, C.; KASSEM, M.; GEIGLE, P.; CZERMAK, P. Expansion and Harvesting of hMSC-TERT. **The Open Biomedical Engineering Journal**, Germany, v. 1, p. 38-46, 2007.

WHITFORD, W. G., CADWELL, J. S. Interest in Hollow-fiber perfusion bioreactors is growing. **Bioprocess technical**, p. 54-63, 2009.

WIGLEY, C. B. The cell culture laboratory. In: DAVIS, J. M. **Basic cell culture**. New York: Oxford, p. 1-28, 2001.

WU, Q. F.; WU, C. T.; DONG, B.; WANG, L. S. Cultivation of human mesenchymal stem cells on macroporous CultiSpher G microcarriers. **Journal of experimental hematology**, v. 11, p. 15-21, 2003.

YANG, Y.; ROSSI, F. M. V.; PUTNINS, E. E. Ex vivo expansion of rat bone marrow mesenchymal stromal cells on microcarrier beads in spin culture. **Biomaterials**, v. 28, p. 3110-3120, 2007.

YE, H.; XIA, Z.; FERGUSON, D. J. P.; TRIFFITT, J. T.; CUI, Z. Studies on the use of hollow fiber membrane bioreactors for tissue generation by using rat bone marrow fibroblastic cells and a composite scaffold. **Journal of Material Science**, v. 18, p. 641-648, 2007.

YU, Y.; LI, K.; BAO, C.; LIU, T.; JIN, Y.; REN, W.; YUN. Ex Vitro Expansion of Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells in Stirred Bioreactor. **Appl Biochem Biotechnol** , v. 159, p. 110–118, 2009.

YOSHIKAWA, T.; OHGUSHI, H.; TAMAI, S. Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. **J Biomed Mater Res**, v. 32, p. 481-492, 1996.

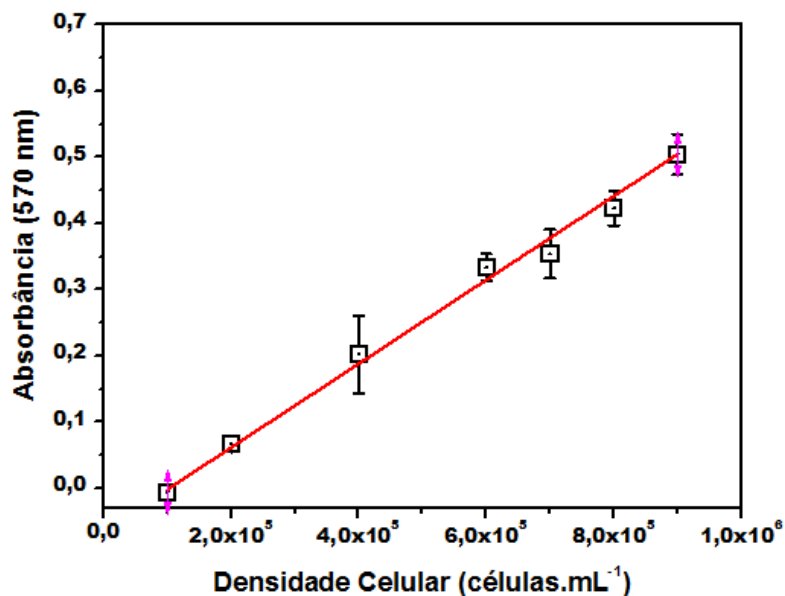
ZATZ, M. Clonagem e células-tronco. **Estudos avançados**, São Paulo, v.18 (51), p. 247-256, 2004.

ZHAO, C.; CHIEH, H-F.; BAKRI, K.; IKEDA, J.; SUN, Y-L.; MORAN, S. L.; AN, K-N.; AMADIO, P. C. The effects of bone marrow stromal cell transplants on tendon healing in vitro. **Medical Engineering & Physics**, v. 31, p. 1271-1275, 2009.

# APÊNDICES

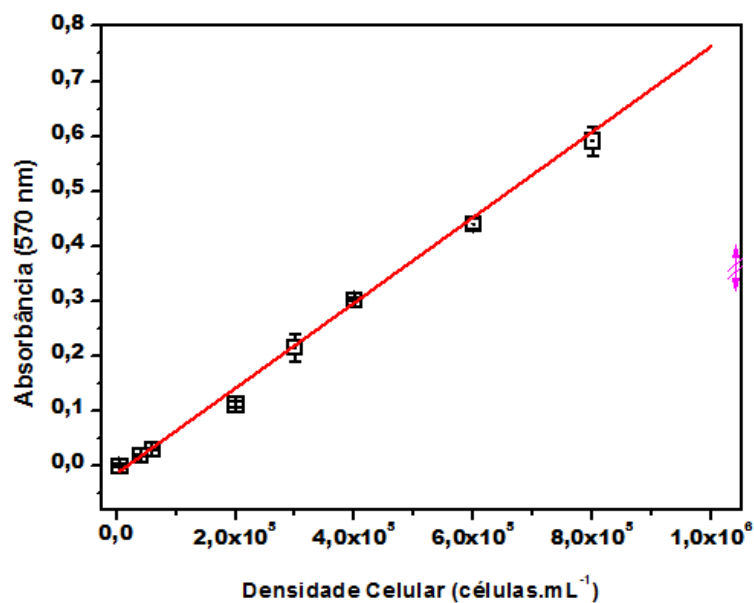
**APÊNDICE A** – Curva padrão referente aos métodos de MTT e LDH para os experimentos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

- **Experimento 1**



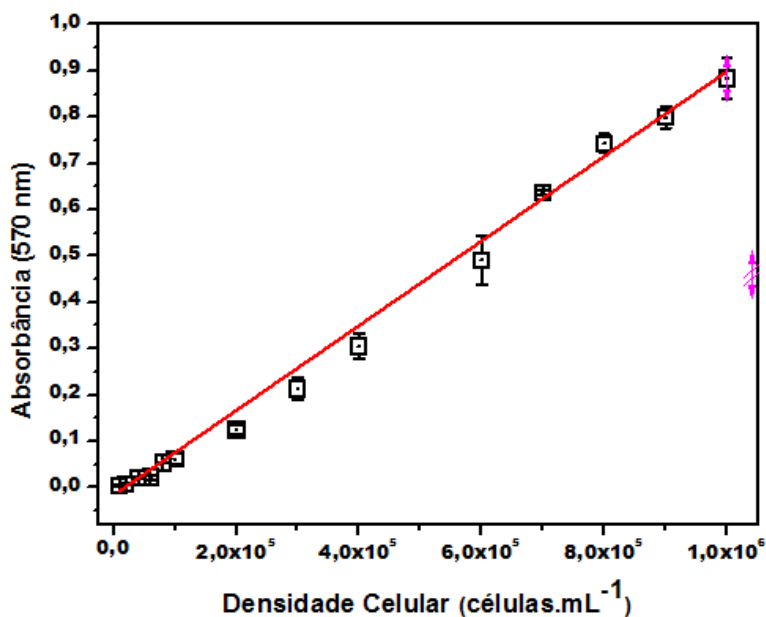
**Figura A1** - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento1. Equação da reta  $y = ax + b$ , ( $a = 6,33 \times 10^{-7}$  e  $b = -0,065$ ), com coeficiente de correlação de 0,9960.

- **Experimento 2**



**Figura A2** - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento 2. Equação da reta  $y = ax + b$ , ( $a = 7,780 \times 10^{-7}$  e  $b = -0,014$ ), com coeficiente de correlação de 0,9944.

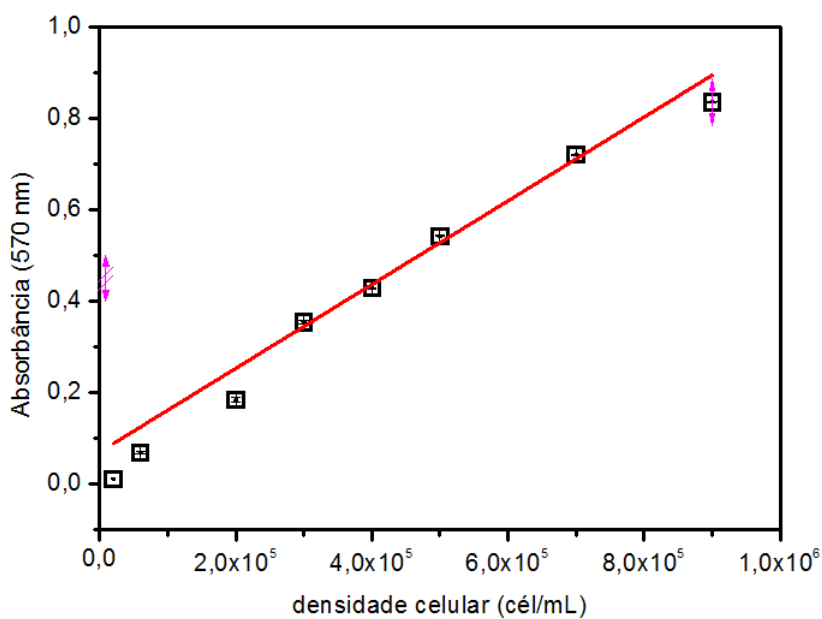
- Experimento 3



**Figura A3** - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento 3. Equação da reta  $y = ax + b$ , ( $a = 9,152 \times 10^{-7}$  e  $b = -0,016$ ), com coeficiente de correlação de 0,995.

- Experimento 4

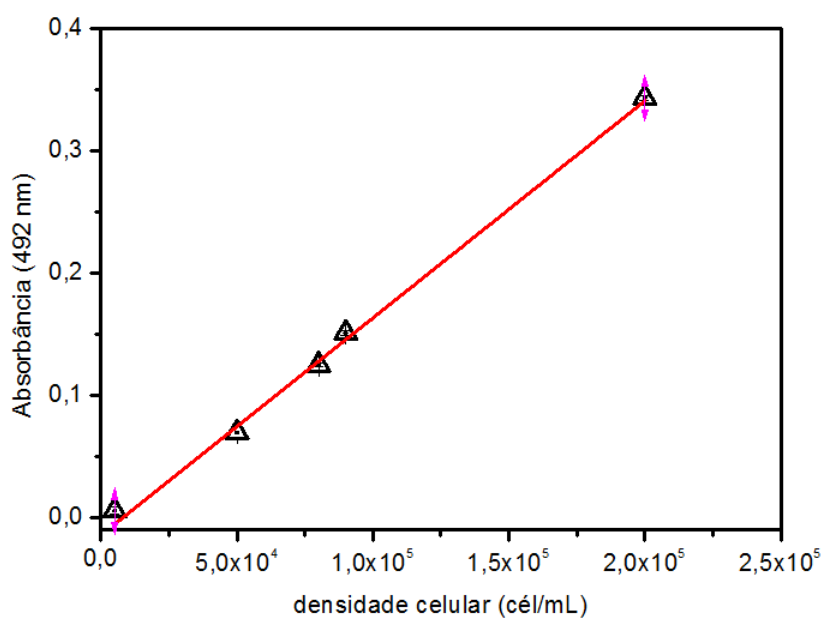
✓ MTT



**Figura A4**- Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento 4. Equação da reta  $y = ax + b$ , ( $a = 9,645 \times 10^{-7}$  e  $b = -0,0219$ ), com coeficiente de correlação de 0,9823.



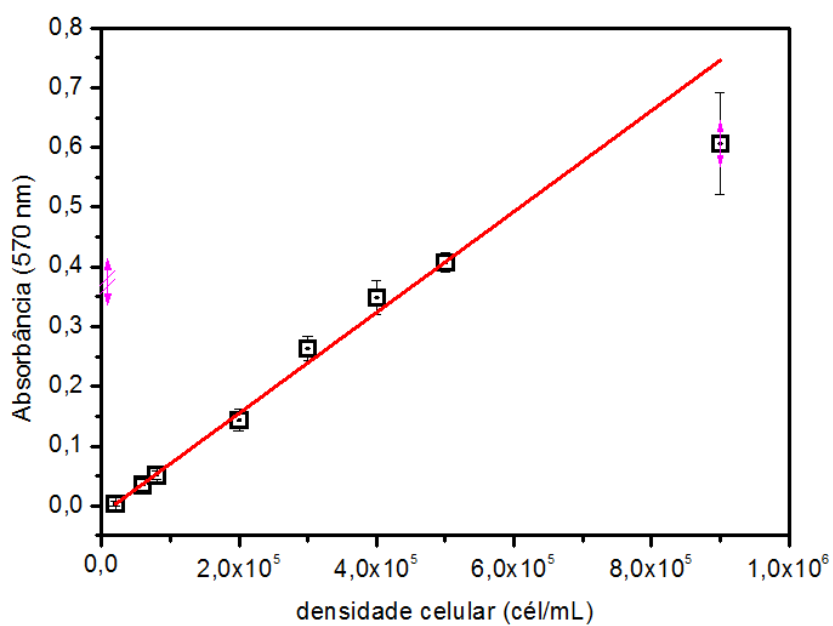
## ✓ LDH



**Figura A5** - Curva padrão do método do LDH (kit Sigma) para o experimento 4. Equação da reta  $y = ax + b$ , ( $a = 1,755 \times 10^{-6}$  e  $b = -0,01032$ ), com coeficiente de correlação de 0,9968.

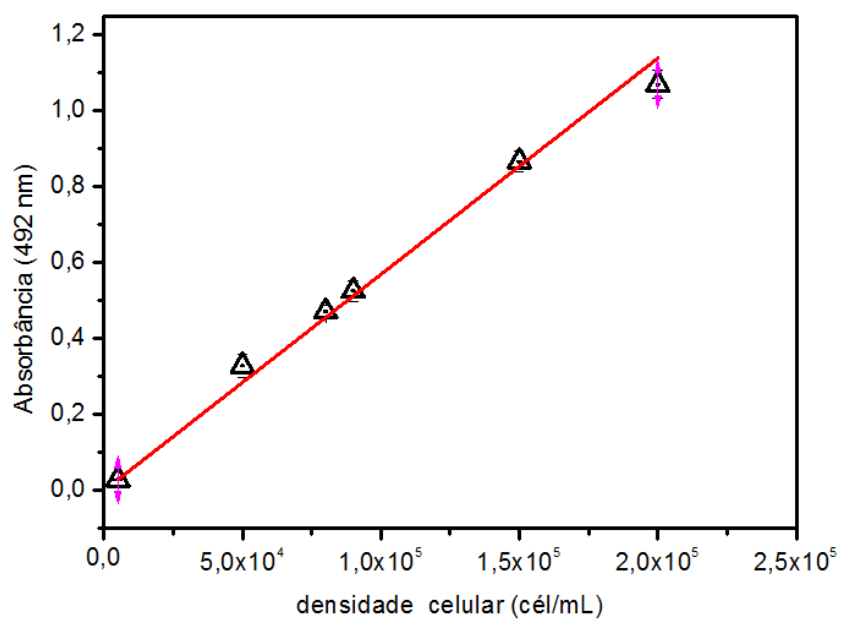
## • Experimento 5

## ✓ MTT



**Figura A6**- Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento 5. Equação da reta  $y = ax + b$ , ( $a = 8,246 \times 10^{-7}$  e  $b = -0,01038$ ), com coeficiente de correlação de 0,9933.

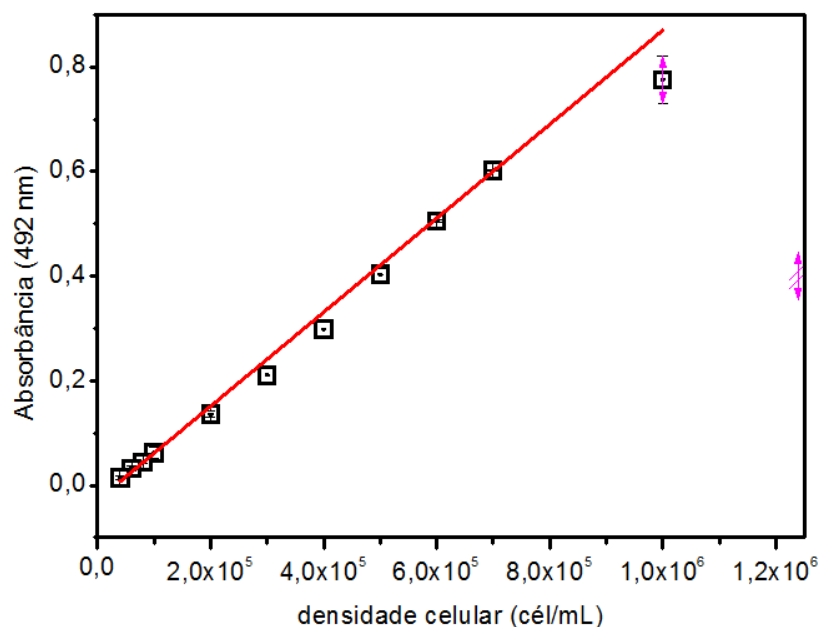
## ✓ LDH



**Figura A7** - Curva padrão do método do LDH (kit Sigma) para o experimento 5. Equação da reta  $y = ax + b$ , ( $a = 5,693 \times 10^{-6}$  e  $b = 0,000308$ ), com coeficiente de correlação de 0,997.

## • Experimento 6

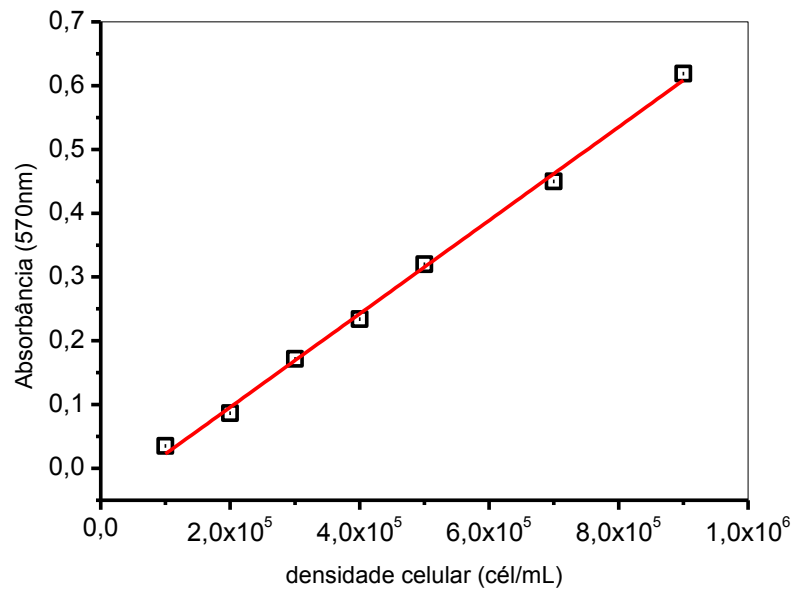
## ✓ MTT



**Figura A8** - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento 6. Equação da reta  $y = ax + b$ , ( $a = 8,9815 \times 10^{-7}$  e  $b = -0,02844$ ), com coeficiente de correlação de 0,99946.

- Experimento 7

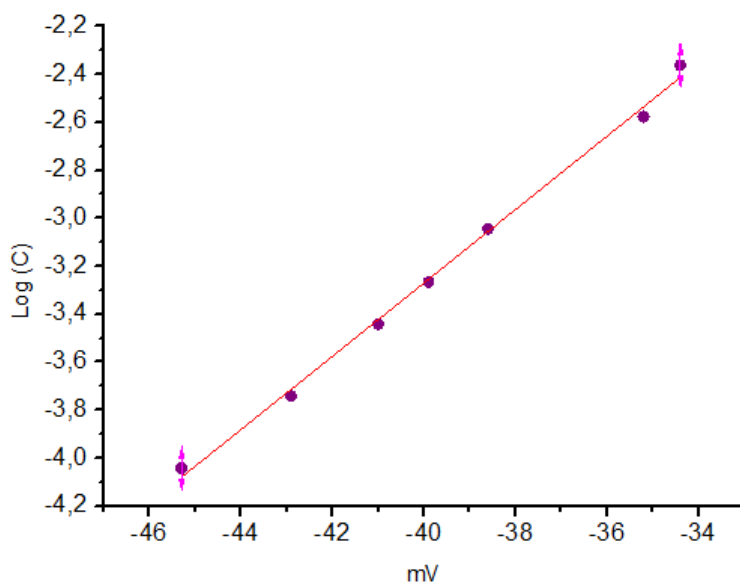
✓ MTT



**Figura A9-** Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento 7. Equação da reta  $y = ax + b$ , ( $a = 7,320 \times 10^{-7}$  e  $b = -0,05053$ ), com coeficiente de correlação de 0,99725.

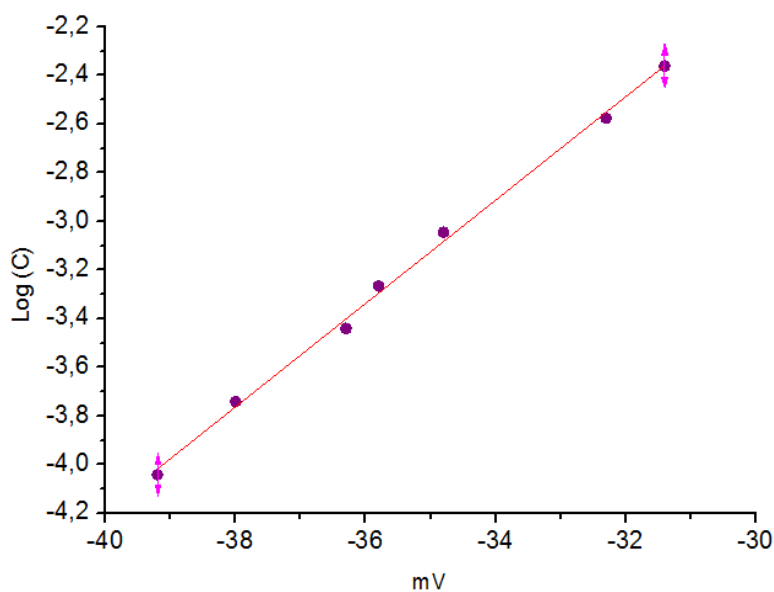
**APÊNDICE B:** Curvas de calibração para análise de amônio através do método eletrodo íon seletivo.

- **Experimento1**



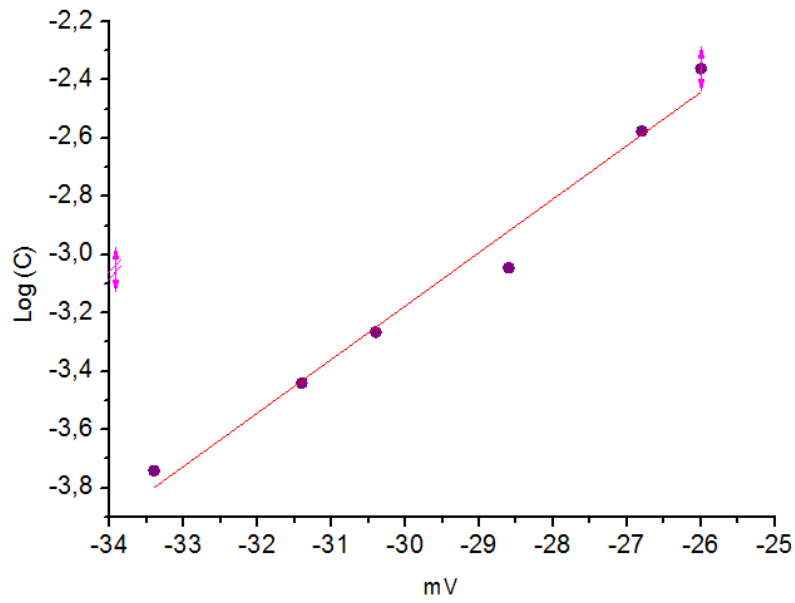
**Figura B1-** Curva padrão para análise de amônio referente ao experimento 1. Equação da reta  $y = ax + b$ , ( $a = 2,84919$  e  $b = 0,15296$ ) com coeficiente de correlação de  $0,9961$ .

- **Experimento 2**



**Figura B2-** Curva padrão para análise de amônio referente ao experimento 2. Equação da reta  $y = ax + b$ , ( $a = 4,3118$  e  $b = 0,21249$ ) com coeficiente de correlação de  $0,9968$ .

- Experimento 3



**Figura B3-** Curva padrão para análise de amônio referente ao experimento 3. Equação da reta  $y = ax + b$ , ( $a=2,3116$  e  $b=0,18357$ ) com coeficiente de correlação de  $0,9760$ .

**APÊNDICE C** – Tabelas dos valores do pH do meio de cultivo, porcentagem de CO<sub>2</sub> na incubadora, volume do cultivo, concentração de aminoácidos, de glicose, de ácido láctico e de amônia, de números de células em suspensão e células aderidas no microcarregador para os experimentos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

**Experimento 1**

**Tabela C1** - Valores de pH, porcentagem de CO<sub>2</sub> na incubadora e volume de cultivo referentes ao experimento 1.

<b>Tempo (horas)</b>	<b>pH</b>	<b>%CO<sub>2</sub></b>	<b>Volume (mL)</b>
<b>0</b>	7,21	13	50
<b>12</b>	7,23	6	50
<b>24</b>	7,37	4	50
<b>32</b>	7,32	4	48
<b>40</b>	7,23	2	50
<b>48,5</b>	7,13	2	50
<b>58</b>	7,16	0	50
<b>64,5</b>	7,14	0	50
<b>72,5</b>	6,92	0	50
<b>80,5</b>	6,91	0	50
<b>96,5</b>	6,73	0	50
<b>104</b>	6,62	0	50
<b>112</b>	6,62	0	50
<b>120</b>	6,55	0	50

**Tabela C2-** Valores de aminoácidos referentes ao experimento 1.

Tempo	Ác. Ascórbico	Ác. Glutâmico	Asparagina	Serina	Glutamina	Glicina	Histidina	Arginina	Treonina	Alanina	Prolina	Tirosina
(h)	Asp (mM)	Glu (mM)	Asn (mM)	Ser (mM)	Gln (mM)	Gly (mM)	His (mM)	Arg (mM)	Thr (mM)	Ala (mM)	Pro (mM)	Tyr (mM)
12	0,145	0,495	0,145	0,82	3,425	0,87	0,15	1,885	0,26	0,45	0,325	0,155
24	0,14	0,505	0,14	0,68	2,95	0,7	0,17	1,5	0,17	0,45	0,3	0,125
48,5	0,14	0,57	0,14	0,65	2,835	0,665	0,135	1,15	0,135	0,535	0,32	0,145
72,5	0,13	0,57	0,13	0,625	2,61	0,725	0,16	0,74	0,125	0,585	0,365	0,155
96,5	0,125	0,58	0,125	0,645	2,485	0,69	0,145	0,035	0,135	0,64	0,335	0,135
120	0,125	0,585	0,125	0,505	2,19	0,585	0,14	0,025	0,205	0,59	0,31	0,13

**Tabela C3-** Valores de aminoácidos, glicose, ácido láctico e amônia referentes ao experimento 1.

Tempo	Valina	Metionina	Cisteína	Isoleucina	Leucina	Fenilalanina	Lisina	Glicose	Ác. Láctico	Amônia
(h)	Val (mM)	Met (mM)	Cys (mM)	Ile (mM)	Leu (mM)	Phe (mM)	Lys (mM)	(mM)	(mM)	(mM)
12	0,335	0,06	0,135	0,32	0,33	0,16	0,305	6,78	2,66	0,021
24	0,29	0,065	0,11	0,275	0,295	0,145	0,275	6,78	4,22	0,0249
48,5	0,305	0,065	0,085	0,27	0,295	0,15	0,28	4,11	6,44	0,151
72,5	0,3	0,065	0,05	0,27	0,295	0,16	0,26	2,56	9,33	0,239
96,5	0,29	0,06	0,015	0,255	0,29	0,15	0,27	2,22	9,33	0,577
120	0,27	0,04	0,005	0,24	0,275	0,145	0,26	1,56	11,55	1,13

**Tabela C4-** Valores do número de células em suspensão e aderidas no Pronectin®F no experimento 1. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Número de células em suspensão</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Número de células MTT</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>0</b>	6,25E+06		0	0
<b>12</b>	9,38E+05	4,27E+05	1,55E+07	5,20E+05
<b>24</b>	2,30E+05	2,66E+05	1,80E+07	8,09E+05
<b>48,5</b>	1,65E+05	2,11E+05	2,46E+07	4,05E+06
<b>72,5</b>	2,81E+05	1,57E+05	1,89E+07	2,68E+06
<b>96,5</b>	3,01E+05	3,25E+05	1,09E+07	1,25E+06
<b>120,5</b>	4,01E+05	3,78E+05	1,13E+07	1,59E+06



## **Experimento 2**

**Tabela C5-** Valores de pH, porcentagem de CO<sub>2</sub> na incubadora e volume de cultivo referentes ao experimento 2.

<b>Tempo (horas)</b>	<b>pH</b>	<b>%CO<sub>2</sub></b>	<b>Volume (mL)</b>
<b>0</b>	7,40	13	100
<b>12</b>	7,33	4	100
<b>25</b>	7,38	4	100
<b>32</b>	7,36	4	100
<b>40</b>	7,24	2	100
<b>49</b>	7,30	2	100
<b>57</b>	7,36	2	100
<b>65</b>	7,19	2	100
<b>72</b>	7,21	0	100
<b>80</b>	7,12	0	100
<b>88</b>	6,97	0	100
<b>96</b>	6,89	0	100
<b>105</b>	6,67	0	100
<b>113</b>	6,62	0	100
<b>121</b>	6,52	0	100
<b>130</b>	6,47	0	100
<b>145</b>	6,38	0	100

Tabela C6 - Valores de aminoácidos referentes ao experimento 2.

Tempo	Ác. Ascórbico	Ác. Glutâmico	Asparagina	Serina	Glutamina	Glicina	Histidina	Arginina	Treonina	Alanina	Prolina	Tirosina
	Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	Gly	His	Arg	Thr	Ala	Pro	Tyr
(h)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)
12	0,164	0,475	0,253	0,802	3,47	0,926	0,199	2,034	0,262	0,445	0,411	0,181
25	0,162	0,245	0,149	0,551	3,192	0,936	0,195	1,023	0,14	0,246	0,403	0,176
49	0,159	0,606	0,246	0,737	3,05	0,933	0,188	1,44	0,197	0,557	0,376	0,171
72	0,148	0,668	0,24	0,906	2,87	0,912	0,172	0,792	0,168	0,65	0,353	0,17
96	0,147	0,698	0,237	0,567	2,79	0,867	0,169	0,031	0,16	0,735	0,342	0,171
121	0,147	0,753	0,239	0,586	2,73	1,02	0,114	0,029	0,227	0,767	0,313	0,132
145	0,146	0,776	0,237	0,735	1,764	0,543	0,161	0,028	0,25	0,818	0,33	0,175

**Tabela C7-** Valores de aminoácidos, glicose, ácido láctico e amônia referentes ao experimento 2.

<b>Tempo</b>	<b>Valina</b>	<b>Metionina</b>	<b>Cisteína</b>	<b>Isoleucina</b>	<b>Leucina</b>	<b>Fenilalanina</b>	<b>Lisina</b>	<b>Glicose</b>	<b>Ac. Láctico</b>	<b>Amônia</b>
<b>(h)</b>	<b>Val</b>	<b>Met</b>	<b>Cys</b>	<b>Ile</b>	<b>Leu</b>	<b>Phe</b>	<b>Lys</b>	<b>(mM)</b>	<b>(mM)</b>	<b>(mM)</b>
<b>12</b>	0,376	0,092	0,147	0,34	0,376	0,193	0,354	8,76	3,62	0,171
<b>25</b>	0,357	0,085	0,076	0,204	0,352	0,185	0,329	8,14	4,62	0,279
<b>49</b>	0,351	0,082	0,131	0,318	0,348	0,188	0,332	7,73	8,73	0,433
<b>72</b>	0,347	0,084	0,1	0,312	0,341	0,184	0,326	5,07	11,19	0,552
<b>96</b>	0,352	0,084	0,042	0,308	0,341	0,176	0,324	3,84	13,37	0,705
<b>121</b>	0,206	0,086	0,012	0,308	0,209	0,137	0,324	3,13	14,19	0,740
<b>145</b>	0,357	0,059	0,013	0,325	0,208	0,135	0,137	2,58	14,19	1,330

**Tabela C8-** Valores do número de células em suspensão e aderidas no Pronectin<sup>®</sup>F no experimento 2. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Número de células em suspensão</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Número de células MTT</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>0</b>	6,25E+06		0	0
<b>12</b>	1,13E+06	3,15E+05	5,45E+06	3,01E+05
<b>25</b>	2,50E+05	2,50E+05	5,57E+06	3,17E+05
<b>49</b>	0,00E+00	0,00E+00	1,26E+07	1,33E+06
<b>72</b>	1,25E+05	1,25E+05	2,66E+07	9,30E+05
<b>96</b>	5,02E+05	2,49E+05	1,38E+07	6,15E+05
<b>121</b>	9,02E+05	4,46E+05	6,83E+06	3,63E+05
<b>145</b>	1,60E+06	5,39E+05	5,76E+06	2,12E+05

### **Experimento 3**

**Tabela C9-** Valores de pH, porcentagem de CO<sub>2</sub> na incubadora e volume de cultivo referentes ao experimento3.

<b>Tempo (horas)</b>	<b>pH</b>	<b>%CO<sub>2</sub></b>	<b>Volume (mL)</b>
12	7,21	6	50
24,5	7,42	4	50
32	7,33	4	50
40	7,26	2	50
49	7,26	2	50
49	7,33	4	50
56	7,27	4	50
64	7,22	2	50
73	7,12	2	50
73	7,32	4	50
81	7,18	2	50
89	7,17	0	50
96	7,22	0	50
96	7,40	4	50
104	7,11	1	50
111,5	7,22	0	50
119,5	7,12	0	50
119,5	7,48	4	50
127	7,1	1	50
134,5	7,23	0	50
143,5	7,14	0	50
143,5	7,52	4	50
150,5	7,16	1	50
157,5	7,28	0	50
168	7,19	0	50
168	7,36	4	50
175	7,16	1	50
182	7,27	0	50
191,5	7,22	0	50
191,5	7,44	4	50
200	7,04	0	50
216	7,18	0	50

Tabela C10 - Valores de aminoácidos referentes ao experimento 3.

Tempo	Ác. Ascórbico	Ác. Glutâmico	Asparagina	Serina	Glutamina	Glicina	Histidina	Arginina	Treonina	Alanina	Prolina	Tirosina
	Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	Gly	His	Arg	Thr	Ala	Pro	Tyr
(h)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)
<b>12</b>	0,12	0,38	0,22	0,52	2,99	0,76	0,16	2,56	0,3	0,44	0,33	0,17
<b>24,5</b>	0,13	0,44	0,23	0,57	2,97	0,74	0,15	2,35	0,26	0,47	0,33	0,16
<b>49</b>	0,16	0,62	0,23	0,51	2,88	0,72	0,15	2,06	0,19	0,58	0,35	0,16
<b>73</b>	0,16	0,67	0,23	0,52	2,74	0,73	0,16	1,81	0,18	0,66	0,36	0,16
<b>96</b>	0,15	0,67	0,22	0,49	2,58	0,73	0,15	1,49	0,16	0,73	0,36	0,16
<b>119,5</b>	0,13	0,67	0,21	0,5	2,38	0,7	0,15	1,23	0,17	0,76	0,36	0,16
<b>143,5</b>	0,14	0,69	0,22	0,42	2,32	0,74	0,16	1,16	0,17	0,81	0,38	0,17
<b>168</b>	0,16	0,75	0,21	0,41	2,23	0,77	0,17	1,02	0,16	0,8	0,38	0,17
<b>191,5</b>	0,15	0,68	0,2	0,42	2,11	0,74	0,15	0,91	0,15	0,76	0,38	0,17
<b>216</b>	0,15	0,72	0,2	0,37	2	0,72	0,16	0,65	0,15	0,74	0,39	0,17

**Tabela C11-** Valores de aminoácidos, glicose, ácido láctico e amônia referentes ao experimento 3.

<b>Tempo</b>	<b>Valina</b>	<b>Metionina</b>	<b>Cisteína</b>	<b>Isoleucina</b>	<b>Leucina</b>	<b>Fenilalanina</b>	<b>Lisina</b>	<b>Glicose</b>	<b>Ác. Láctico</b>	<b>Amônia</b>
<b>(h)</b>	<b>Val</b>	<b>Met</b>	<b>Cys</b>	<b>Ile</b>	<b>Leu</b>	<b>Phe</b>	<b>Lys</b>			
	<b>(mM)</b>	<b>(mM)</b>	<b>(mM)</b>	<b>(mM)</b>	<b>(mM)</b>	<b>(mM)</b>	<b>(mM)</b>	<b>(mM)</b>	<b>(mM)</b>	<b>(mM)</b>
<b>12</b>	0,35	0,09	0,13	0,33	0,34	0,2	0,3	10,92	6,42	0,579
<b>24,5</b>	0,34	0,08	0,12	0,22	0,31	0,19	0,3	9,68	10,79	0,727
<b>49</b>	0,34	0,08	0,11	0,28	0,31	0,19	0,31	7,22	21,96	2,106
<b>73</b>	0,35	0,08	0,1	0,29	0,32	0,2	0,32	6,44	25,24	1,496
<b>96</b>	0,35	0,08	0,07	0,29	0,32	0,2	0,32	4,78	27,31	0,479
<b>119,5</b>	0,34	0,09	0,05	0,29	0,33	0,21	0,32	4,33	26,69	0,624
<b>143,5</b>	0,37	0,08	0,03	0,3	0,34	0,21	0,33	3,86	28,20	0,479
<b>168</b>	0,37	0,09	0,02	0,3	0,34	0,2	0,34	4,22	21,05	0,948
<b>191,5</b>	0,37	0,08	0,03	0,31	0,36	0,2	0,34	4,44	19,89	0,192
<b>216</b>	0,37	0,08	0,02	0,31	0,37	0,21	0,34	1,38	3,15	0,327

**Tabela C12** - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Pronectin®F no experimento 3. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Número de células em suspensão</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Número de células MTT</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>0</b>	6,25E+06		0	0
<b>12</b>	1,19E+06	4,27E+05	7,54E+06	8,02E+05
<b>24,5</b>	4,38E+05	1,25E+05	9,02E+06	1,94E+05
<b>49</b>	1,25E+05	1,44E+05	1,17E+07	2,17E+05
<b>49</b>	--	--	1,15E+07	5,97E+05
<b>73</b>	5,63E+05	5,15E+05	1,39E+07	5,88E+05
<b>73</b>	--	--	1,18E+07	5,76E+05
<b>96</b>	1,01E+05	1,36E+05	1,66E+07	2,41E+05
<b>96</b>	--	--	1,81E+07	1,33E+06
<b>119,5</b>	1,01E+05	1,36E+05	2,14E+07	1,11E+06
<b>119,5</b>	--	--	2,49E+07	9,52E+05
<b>143,5</b>	5,14E+04	1,11E+05	3,60E+07	1,48E+06
<b>143,5</b>	--	--	3,62E+07	1,15E+06
<b>168</b>	1,02E+05	1,35E+05	1,80E+07	1,15E+05
<b>168</b>	--	--	1,93E+07	8,72E+05
<b>191,5</b>	4,02E+05	4,16E+05	1,78E+07	1,26E+06
<b>191,5</b>	--	--	1,62E+07	1,33E+06
<b>216</b>	3,52E+05	4,16E+05	6,81E+06	5,23E+05



### **Experimento 4**

**Tabela C13-** Valores de pH, porcentagem de CO<sub>2</sub> na incubadora e volume de cultivo referentes ao experimento 4.

<b>Tempo (horas)</b>	<b>pH</b>	<b>%CO<sub>2</sub></b>	<b>Volume (mL)</b>
<b>0</b>	7,34	13	50
<b>12</b>	7,24	5	50
<b>25</b>	7,29	4	50
<b>33</b>	7,28	4	50
<b>41</b>	7,22	3	50
<b>49</b>	7,20	2	50
<b>56</b>	7,22	1	50
<b>65</b>	7,20	0	50
<b>72</b>	7,25	0	50
<b>72</b>	7,35	4	50
<b>81</b>	7,19	2	50
<b>88</b>	7,30	1	50
<b>96</b>	7,35	1	50
<b>96</b>	7,44	4,5	50
<b>104</b>	7,24	2	50
<b>112</b>	7,31	1	50
<b>120</b>	7,33	1	50
<b>120</b>	7,43	4	50
<b>128</b>	7,35	3	50
<b>144</b>	7,25	2	50
<b>152</b>	7,29	0	50
<b>169</b>	7,24	0	50

Tabela C14 - Valores de aminoácidos referentes ao experimento 4.

Tempo	Ác. Ascórbico	Ác. Glutâmico	Asparagina	Serina	Glutamina	Glicina	Histidina	Arginina	Treonina	Alanina	Prolina	Tirosina
(h)	Asp (mM)	Glu (mM)	Asn (mM)	Ser (mM)	Gln (mM)	Gly (mM)	His (mM)	Arg (mM)	Thr (mM)	Ala (mM)	Pro (mM)	Tyr (mM)
0	0,17	0,48	0,22	0,58	3,40	0,88	0,15	2,62	0,27	0,49	0,36	0,18
12	0,16	0,57	0,21	0,28	2,19	0,61	0,17	2,28	0,24	0,49	0,36	0,17
25	0,13	0,49	0,20	0,19	2,29	0,57	0,17	1,66	0,18	0,49	0,35	0,18
48	0,17	0,79	0,25	0,10	3,01	0,73	0,29	1,66	0,18	0,70	0,46	0,19
72 A	0,12	0,70	0,22	0,00	1,76	0,63	0,24	1,07	0,12	0,79	0,46	0,18
72D	0,11	0,53	0,16	0,00	2,01	0,50	0,15	1,27	0,12	0,52	0,28	0,13
96A	0,15	0,87	0,26	0,00	2,90	0,82	0,28	1,18	0,14	1,02	0,49	0,21
96D	0,15	0,69	0,23	0,00	2,56	0,67	0,22	1,57	0,14	0,75	0,39	0,18
120A	0,13	0,78	0,22	0,00	2,59	0,70	0,22	0,85	0,14	0,91	0,41	0,18
120D	0,13	0,65	0,23	0,00	2,55	0,73	0,23	1,52	0,16	0,73	0,41	0,19
144	0,16	0,88	0,26	0,34	2,66	0,81	0,27	0,72	0,16	0,96	0,46	0,22
168	0,14	0,88	0,24	0,27	2,49	0,80	0,26	0,32	0,16	1,03	0,47	0,22

A = antes da troca de meio de cultura

D = depois da troca de meio de cultura

**Tabela C15** -Valores de aminoácidos, glicose e ácido láctico referentes ao experimento 4.

<b>Tempo</b>	<b>Valina</b>	<b>Metionina</b>	<b>Cisteína</b>	<b>Isoleucina</b>	<b>Leucina</b>	<b>Fenilalanina</b>	<b>Lisina</b>	<b>Glicose</b>	<b>Ác. Láctico</b>
<b>(h)</b>	<b>Val</b>	<b>Met</b>	<b>Cys</b>	<b>Ile</b>	<b>Leu</b>	<b>Phe</b>	<b>Lys</b>	<b>(mM)</b>	<b>(mM)</b>
	<b>(mM)</b>	<b>(mM)</b>	<b>(mM)</b>	<b>(mM)</b>	<b>(mM)</b>	<b>(mM)</b>	<b>(mM)</b>		
<b>0</b>	0,42	0,10	0,13	0,32	0,37	0,20	0,35	5,89	4,00
<b>12</b>	0,40	0,09	0,10	0,37	0,35	0,17	0,31	4,44	4,66
<b>25</b>	0,36	0,08	0,10	0,29	0,33	0,18	0,30	4,67	4,66
<b>48</b>	0,42	0,10	0,10	0,32	0,39	0,22	0,37	4,33	10,66
<b>72 A</b>	0,37	0,09	0,06	0,27	0,33	0,21	0,33	4,00	13,10
<b>72D</b>	0,29	0,07	0,07	0,23	0,27	0,16	0,26	4,67	9,33
<b>96<sup>a</sup></b>	0,45	0,11	0,09	0,32	0,41	0,25	0,42	4,56	13,99
<b>96D</b>	0,40	0,09	0,10	0,31	0,38	0,20	0,35	6,22	9,55
<b>120<sup>a</sup></b>	0,39	0,09	0,10	0,27	0,35	0,21	0,36	4,44	13,77
<b>120D</b>	0,41	0,10	0,10	0,32	0,39	0,21	0,37	5,11	7,55
<b>144</b>	0,44	0,11	0,10	0,32	0,41	0,24	0,43	4,33	11,32
<b>168</b>	0,45	0,11	0,09	0,30	0,38	0,24	0,43	4,22	15,54

**A = antes da troca de meio de cultura**

**D = depois da troca de meio de cultura**

**Tabela C16** - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Pronectin®F no experimento 4. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Número de células em suspensão</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Número de células MTT</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>0</b>	6,25E+06		0	0
<b>12</b>	6,25E+05	4,33E+05	5,77E+06	1,20E+06
<b>25</b>	3,75E+05	2,50E+05	6,12E+06	3,98E+05
<b>49</b>	1,88E+05	2,39E+05	7,05E+06	2,44E+05
<b>73</b>	0,00E+00	0,00E+00	1,17E+07	4,28E+05
<b>73</b>	--	--	1,08E+07	5,56E+05
<b>97</b>	6,25E+04	1,25E+05	1,48E+07	4,95E+05
<b>97</b>	--	--	1,40E+07	3,80E+05
<b>120</b>	1,25E+05	1,44E+05	7,78E+06	6,30E+05
<b>120</b>	--	--	6,00E+06	9,53E+05
<b>144</b>	1,01E+05	1,36E+05	3,40E+06	4,14E+05
<b>169</b>	1,02E+05	1,35E+05	5,18E+06	2,95E+04

**Tabela C17-** Valores do número de células em suspensão e aderidas no Pronectin®F no experimento 4. Os resultado para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do LDH.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Número de células em suspensão</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Número de células LDH</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>0</b>	6,25E+06		0	0
<b>12</b>	6,25E+05	4,33E+05	3,72E+06	1,36E+04
<b>25</b>	3,75E+05	2,50E+05	3,81E+06	2,27E+05
<b>49</b>	1,88E+05	2,39E+05	4,54E+06	7,64E+04
<b>73</b>	0,00E+00	0,00E+00	8,78E+06	1,33E+05
<b>73</b>	--	--	8,25E+06	3,39E+04
<b>97</b>	6,25E+04	1,25E+05	1,22E+07	3,81E+05
<b>97</b>	--	--	1,13E+07	1,05E+05
<b>120</b>	1,25E+05	1,44E+05	1,25E+07	1,54E+05
<b>120</b>	--	--	1,39E+07	1,35E+05
<b>144</b>	1,01E+05	1,36E+05	9,30E+06	9,56E+04
<b>169</b>	1,02E+05	1,35E+05	1,17E+07	4,23E+05

## Experimento 5

**Tabela C18** - Valores de pH, porcentagem de CO<sub>2</sub> na incubadora e volume de cultivo referentes ao experimento 5.

<b>Tempo (horas)</b>	<b>pH</b>	<b>%CO<sub>2</sub></b>	<b>Volume (mL)</b>
0	7,36	13	50
12	7,21	4	50
25	7,40	3	50
33	7,33	3	50
40	7,22	2	50
48,5	7,22	2	50
56	7,26	1	50
63	7,20	0,5	50
72	7,15	0	50
72	7,33	3	50
80	7,25	3	50
87	7,25	2	50
96,5	7,26	0,7	50
96,5	7,33	3	50
104	7,10	3	50
112	7,12	1	50
120	7,15	0	50
120	7,25	1	50
128	7,08	1	50
136	7,15	1	50
144	7,40	0	50
152	7,28	3	50
160	7,35	1	50
169,5	7,41	1	50
177	7,29	4	50
193	7,39	3	50

Tabela C19 - Valores de aminoácidos referentes ao experimento 5.

Tempo	Ác. Ascórbico	Ác. Glutâmico	Asparagina	Serina	Glutamina	Glicina	Histidina	Arginina	Treonina	Alanina	Prolina	Tirosina
	Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	Gly	His	Arg	Thr	Ala	Pro	Tyr
(h)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)
<b>0</b>	0,165	0,51	0,205	0,38	2,625	0,635	0,155	2,125	0,205	0,445	0,35	0,15
<b>12</b>	0,145	0,54	0,19	0,41	2,2	0,56	0,15	1,785	0,205	0,43	0,32	0,135
<b>25</b>	0,175	0,7	0,225	0,43	2,61	0,69	0,185	2,095	0,22	0,595	0,39	0,165
<b>48,5</b>	0,16	0,735	0,215	0,38	2,275	0,735	0,19	1,565	0,165	0,665	0,37	0,155
<b>72</b>	0,175	0,87	0,28	0,48	2,12	0,61	0,16	0,895	0,145	0,82	0,385	0,16
<b>96,5</b>	0,185	0,9	0,26	0,435	2,39	0,78	0,215	0,85	0,16	0,975	0,43	0,185
<b>120</b>	0,13	0,65	0,205	0,34	1,885	0,635	0,16	0,525	0,215	0,665	0,33	0,15
<b>144</b>	0,14	0,47	0,19	0,40	0	0,66	0,19	0,225	0,26	0,365	0,315	0,165
<b>169,5</b>	0,15	0,065	0,20	0,42	0	0,68	0,085	0,03	0,225	0,065	0,13	0,155
<b>193</b>	0,15	0,165	0,19	0,41	0	0,70	0,195	0	0,35	0,1	0,12	0,215

Tabela C20 - Valores de aminoácidos, glicose e ácido láctico referentes ao experimento 5.

Tempo	Valina	Metionina	Cisteína	Isoleucina	Leucina	Fenilalanina	Lisina	Glicose	Ác. Láctico
(h)	Val (mM)	Met (mM)	Cys (mM)	Ile (mM)	Leu (mM)	Phe (mM)	Lys (mM)	(mM)	(mM)
0	0,38	0,085	0,06	0,35	0,395	0,145	0,28	5,58	4,37
12	0,325	0,075	0,055	0,29	0,33	0,13	0,25	5,16	6,95
25	0,385	0,09	0,07	0,34	0,38	0,16	0,305	4,79	11,15
48,5	0,33	0,075	0,075	0,29	0,33	0,15	0,295	4,62	19,80
72	0,33	0,075	0,065	0,275	0,325	0,155	0,305	4,14	20,94
96,5	0,385	0,095	0,085	0,32	0,37	0,185	0,36	4,67	18,52
120	0,3	0,075	0,075	0,25	0,295	0,145	0,28	4,98	15,03
144	0,355	0,06	0,065	0,26	0,3	0,13	0,255	3,66	15,81
169,5	0,355	0,04	0,025	0,22	0,29	0,105	0,195	2,00	11,12
193	0,475	0,06	0,035	0,325	0,455	0,16	0,275	2,21	4,37



**Tabela C21-** Valores do número de células em suspensão e aderidas no Pronectin<sup>®</sup>F no experimento 5. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Número de células em suspensão</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Número de células MTT</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>0</b>	6,25E+06		8,51E+06	6,98E+05
<b>12</b>	3,75E+05	2,50E+05	5,30E+06	5,19E+05
<b>25</b>	4,38E+05	2,39E+05	3,29E+06	2,01E+05
<b>49</b>	1,38E+06	3,23E+05	5,77E+06	1,68E+05
<b>73</b>	6,88E+05	7,74E+05	8,64E+06	4,03E+05
<b>73</b>	--	--	7,71E+06	5,45E+05
<b>96,5</b>	1,88E+05	3,75E+05	7,55E+06	7,72E+04
<b>96,5</b>	--	--	7,40E+06	2,01E+05
<b>120</b>	1,13E+06	3,23E+05	9,04E+06	4,18E+05
<b>120</b>	--	--	8,80E+06	8,62E+05
<b>144</b>	1,90E+06	1,46E+06	5,92E+06	3,68E+05
<b>169,5</b>	3,52E+05	4,17E+05	2,78E+06	3,06E+05
<b>193</b>	2,02E+05	3,25E+05	3,43E+06	5,40E+05

**Tabela C22** - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Pronectin®F no experimento 5. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do LDH.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Número de células em suspensão</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Número de células LDH</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>0</b>	6,25E+06		5,86E+06	2,28E+05
<b>12</b>	3,75E+05	2,50E+05	4,65E+06	1,29E+05
<b>25</b>	4,38E+05	2,39E+05	4,17E+06	1,92E+05
<b>49</b>	1,38E+06	3,23E+05	7,16E+06	2,43E+05
<b>73</b>	6,88E+05	7,74E+05	9,47E+06	1,41E+05
<b>73</b>	--	--	1,03E+07	7,88E+05
<b>96,5</b>	1,88E+05	3,75E+05	1,08E+07	2,82E+05
<b>96,5</b>	--	--	1,07E+07	3,99E+05
<b>120</b>	1,13E+06	3,23E+05	1,03E+07	5,81E+04
<b>120</b>	--	--	7,35E+06	3,34E+05
<b>144</b>	1,90E+06	1,46E+06	6,31E+06	5,70E+04
<b>169,5</b>	3,52E+05	4,17E+05	4,70E+06	2,59E+05
<b>193</b>	2,02E+05	3,25E+05	5,86E+06	2,28E+05

## Experimento 6

**Tabela C23** - Valores de pH, porcentagem de CO<sub>2</sub> na incubadora e volume de cultivo referentes ao experimento 6 em frasco spinner.

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Ph</b>	<b>%CO<sub>2</sub></b>	<b>Volume (mL)</b>
<b>0</b>	7,41	10	50
<b>12</b>	7,2	4	50
<b>25</b>	7,31	2	50
<b>33</b>	7,25	2	50
<b>41</b>	7,27	1	50
<b>49</b>	7,22	0	50
<b>49</b>	7,32	3	50
<b>57</b>	7,22	2,5	50
<b>65</b>	7,25	2	50
<b>73</b>	7,1	0	50

**Tabela C24** – Valores de O<sub>2</sub> dissolvido no decorrer do experimento em biorreator de fibra oca.

<b>Tempo (horas)</b>	<b>O<sub>2</sub> dissolvido</b>
<b>75 HF</b>	73,6
<b>99 HF</b>	71,1
<b>123 HF</b>	72,2
<b>147 HF</b>	72,0

Tabela C25 - Valores de aminoácidos referentes ao experimento 6.

Tempo	Ác. Ascórbico	Ác. Glutâmico	Asparagina	Serina	Glutamina	Glicina	Histidina	Arginina	Treonina	Alanina	Prolina	Tirosina
	Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	Gly	His	Arg	Thr	Ala	Pro	Tyr
(h)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)
12	0,14	0,60	0,19	0,24	2,5	0,72	0,17	2,69	0,3	0,51	0,48	0,31
25	0,18	0,85	0,74	0,30	2,44	0,93	0,21	2,31	0,26	0,73	0,51	0,33
49	0,10	0,60	0,15	0,16	1,72	0,57	0,15	1,3	0,19	0,53	0,46	0,28
49d*	0,19	0,88	0,26	0,28	2,57	0,94	0,23	2,49	0,18	0,74	0,52	0,36
73	0,20	1,22	0,27	0,62	2,45	1,00	0,24	1,63	0,16	1,07	0,55	0,31
75HF	0,21	0,83	0,27	0,35	2,88	0,99	0,24	2,7	0,17	0,57	0,52	0,32
99HF	0,21	0,89	0,27	0,47	2,69	0,99	0,23	2,22	0,17	0,62	0,50	0,31
123HF	0,17	0,78	0,23	0,28	2,56	0,89	0,20	2	0,16	0,60	0,50	0,28
147HF	0,18	0,93	0,27	0,36	2,44	1,20	0,24	1,8	0,15	0,80	0,65	0,33

\*Depois da troca de meio de cultura

HF = hollow fiber

Tabela C26 - Valores de aminoácidos, glicose e ácido láctico referentes ao experimento 6.

Tempo	Valina	Metionina	Cisteína	Isoleucina	Leucina	Fenilalanina	Lisina	Glicose	Ác. Láctico
(h)	Val (mM)	Met (mM)	Cys (mM)	Ile (mM)	Leu (mM)	Phe (mM)	Lys (mM)	(mM)	(mM)
12	0,43	0,10	0,16	0,42	0,44	0,23	0,35	7,833	5,107
25	0,50	0,12	0,20	0,47	0,50	0,27	0,45	6,833	8,215
49	0,33	0,08	0,08	0,31	0,34	0,20	0,26	4,111	11,945
49d*	0,52	0,12	0,19	0,50	0,54	0,26	0,49	6,167	5,662
73	0,53	0,12	0,11	0,47	0,54	0,26	0,50	4,278	10,657
75HF	0,53	0,13	0,20	0,52	0,56	0,26	0,48	9,167	3,552
99HF	0,52	0,12	0,19	0,49	0,55	0,26	0,50	8,450	3,774
123HF	0,46	0,11	0,16	0,44	0,49	0,23	0,43	7,889	3,885
147HF	0,58	0,14	0,20	0,55	0,63	0,31	0,55	7,900	4,885

\*Depois da troca de meio de cultura

HF = hollow fiber

**Tabela C27** - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Pronectin<sup>®</sup>F no experimento 6. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Número de células em suspensão</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Número de células MTT</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>0</b>	6,25E+06		0	
<b>12</b>	5,63E+05	2,39E+05	5,23E+06	9,23E+04
<b>25</b>	3,75E+05	2,50E+05	7,33E+06	3,04E+05
<b>49</b>	6,25E+04	1,25E+05	9,80E+06	1,74E+05
<b>73</b>	3,13E+05	4,73E+05	9,68E+06	1,85E+05
<b>147*</b>	3,01E+05	3,24E+05	7,53E+06	1,31E+05

\*valor de células quantificadas no experimento no biorreator de fibra oca.

## Experimento 7

**Tabela C28** - Valores de pH, porcentagem de CO<sub>2</sub> na incubadora e volume de cultivo referentes ao experimento 7 em frasco spinner.

<b>Tempo (horas)</b>	<b>pH</b>	<b>%CO<sub>2</sub></b>	<b>Volume (mL)</b>
0	7,37	10	50
12	7,24	3	50
25	7,41	2	50
33	7,28	2	50
41	7,29	2	50
49	7,20	2	50
49	7,37	0	50

**Tabela C29** - Valores de O<sub>2</sub> dissolvido no decorrer do experimento 7 em biorreator de fibra oca.

<b>Tempo (horas)</b>	<b>O<sub>2</sub> dissolvido</b>
0	71,8
8	67,7
12	75,5
24	74,4
32	69,2
40	59,7
48	66,6
56	66,3
64	71,8
73	69,8
80	61,3
81	72,8
89	60,3
96,5	82,6
104	79,5
112	72,8
121	77,5

Tabela C30 - Valores de aminoácidos referentes ao experimento 7.

Tempo	Ác. Ascórbico	Ác. Glutâmico	Asparagina	Serina	Glutamina	Glicina	Histidina	Arginina	Treonina	Alanina	Prolina	Tirosina
	Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	Gly	His	Arg	Thr	Ala	Pro	Tyr
(h)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)
12	0,18	0,78	0,24	0,35	2,70	0,90	0,21	2,67	0,28	0,18	0,78	0,24
24	0,18	0,90	0,24	0,28	2,53	0,85	0,20	2,2	0,28	0,18	0,90	0,24
49	0,17	1,04	0,22	0,23	2,26	0,87	0,20	1,59	0,24	0,17	1,04	0,22
49 HF	0,18	0,78	0,26	0,25	2,64	0,84	0,20	2,40	0,22	0,18	0,78	0,26
73 HF	0,17	0,63	0,24	0,28	2,43	0,86	0,21	2,27	0,28	0,17	0,63	0,24
97 HF	0,20	0,90	0,27	0,33	2,37	0,92	0,22	2,24	0,23	0,20	0,90	0,27
120 HF	0,16	0,87	0,25	0,30	2,24	0,89	0,20	1,31	0,23	0,16	0,87	0,25
145 HF	0,20	1,15	0,30	0,36	2,18	1,13	0,27	0,68	0,26	0,20	1,15	0,30
152 HF	0,21	0,73	0,26	0,30	2,66	0,93	0,21	2,59	0,27	0,21	0,73	0,26
169 HF	0,14	0,60	0,20	0,26	1,73	0,72	0,17	1,40	0,24	0,14	0,60	0,20
177 HF	0,04	0,12	0,20	0,09	1,30	0,70	0,18	0,44	0,38	0,04	0,12	0,20
193 HF	0,02	0,13	0,19	0,08	1,25	0,69	0,17	0,40	0,24	0,02	0,13	0,19



Tabela C31 - Valores de aminoácidos, glicose e ácido láctico referentes ao experimento 7.

Tempo	Valina	Metionina	Cisteína	Isoleucina	Leucina	Fenilalanina	Lisina	Glicose	Ác. Láctico
(h)	Val (mM)	Met (mM)	Cys (mM)	Ile (mM)	Leu (mM)	Phe (mM)	Lys (mM)	(mM)	(mM)
12	0,47	0,12	0,24	0,45	0,50	0,25	0,44	8,06	4,66
24	0,43	0,11	0,23	0,42	0,46	0,23	0,42	6,17	5,77
49	0,42	0,10	0,16	0,39	0,43	0,21	0,41	5,56	9,66
49 HF	0,43	0,12	0,27	0,45	0,48	0,28	0,45	9,06	2,22
73 HF	0,45	0,11	0,19	0,44	0,49	0,23	0,44	8,11	2,55
97 HF	0,48	0,12	0,22	0,46	0,52	0,24	0,47	7,17	3,89
120 HF	0,44	0,12	0,20	0,43	0,49	0,23	0,45	6,67	5,77
145 HF	0,55	0,14	0,26	0,51	0,63	0,28	0,57	6,11	8,10
152 HF	0,47	0,12	0,22	0,45	0,52	0,24	0,45	8,50	3,11
169 HF	0,36	0,10	0,16	0,36	0,42	0,19	0,34	8,22	4,33
177 HF	0,31	0,06	0,04	0,30	0,30	0,14	0,30	7,50	5,77
193 HF	0,41	0,05	0,02	0,26	0,22	0,13	0,19	7,39	6,11

HF = biorreator de fibra oca

**Tabela C32** - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Pronectin<sup>®</sup>F no experimento 7. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Número de células em suspensão</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Número de células MTT</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>0</b>	6,25E+06		0	
<b>12</b>	8,75E+05	6,29E+05	6,57E+06	2,04E+05
<b>25</b>	4,38E+05	7,18E+05	1,01E+07	1,10E+06
<b>49</b>	1,25E+05	1,44E+05	2,09E+07	4,91E+05
<b>193*</b>	8,75E+05	2,50E+05	3,74E+07	2,23E+06

\*valor de células quantificadas no experimento no biorreator de fibra oca.