

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

**EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM FRASCO
SPINNER COM MICROCARREGADORES**

Simone Sanches

SÃO CARLOS

2010

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

**EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM FRASCO
SPINNER COM MICROCARREGADORES**

Simone Sanches

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

Orientadores: Prof. Dr. Cláudio A. T. Suazo

Prof. Dr. Fernando M. A. Moreira

SÃO CARLOS

2010

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

S211ec	<p>Sanches, Simone. Expansão de células-tronco mesenquimais em frasco spinner com microcarregadores / Simone Sanches. -- São Carlos : UFSCar, 2011. 112 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.</p> <p>1. Biotecnologia. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Microcarregadores. 4. Frasco spinner. 5. Células aderentes. 6. Cultivo celular. I. Título.</p> <p>CDD: 660.6 (20^a)</p>
--------	---

Simone Sanches

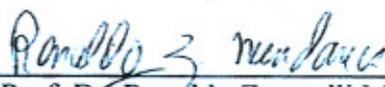
Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Aprovado em: 07/10/2010

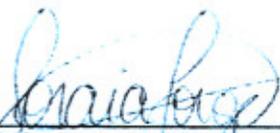
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo
(DEQ/UFSCar - Orientador)



Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça
(Instituto Butantan)



Profa. Dra. Soraia Attie Calil Jorge
(Instituto Butantan)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à minha família pelo apoio constante nas minhas decisões. Principalmente, aos meus pais, Ademir e Fátima, por todo o amor, carinho e dedicação na formação do meu caráter. Além dos meus irmãos, Susana e Sandro, pelo incentivo na conclusão de mais esta etapa da minha vida.

Ao Guilherme, meu eterno companheiro, pelo amor, pelo apoio nas horas difíceis e pela abnegada companhia nesta cidade.

Ao professor Cláudio pela sua orientação e pela confiança na minha capacidade para realizar este trabalho.

Aos amigos de laboratório: Amanda, Ana Carolina, Bruna, Camilo, Henrique, Marlei, Sandra, Thaila e Thaís pelo aprendizado em equipe e por compartilhar os momentos de dificuldades.

E, agradeço a todos aqueles que compartilharam o cotidiano nestes anos de trabalho.

“Somos o que, repetidamente, fazemos. A excelência, portanto, não é um feito, mas sim um hábito”.

Aristóteles

RESUMO

As Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) de tecido adulto são na atualidade uma fonte atrativa para aplicações na engenharia de tecidos e em terapias celulares. Apresentam um potencial de diferenciação em diversas linhagens celulares como adipócitos, condrócitos, osteócitos e miócitos. Devido à baixa disponibilidade nos tecidos e ao fato da demanda para aplicações terapêuticas ser muito maior do que a capacidade de fornecimento tornou-se necessária sua expansão *in vitro* fortemente condicionada à conservação do seu potencial de diferenciação. As CTMs são dependentes de ancoramento, ou seja, possuem a característica de aderir a um substrato sólido para posterior proliferação. O procedimento convencional de expansão em frascos T, com crescimento em monocamadas, geralmente envolve um processo de difícil monitoramento e controle, com maior índice de contaminação, de baixo rendimento celular e de alto custo. No presente trabalho, avaliou-se uma metodologia de expansão da linhagem hMSC-TERT em frasco spinner com microcarregadores (pequenas partículas com propriedades favoráveis para adesão e proliferação celular). Nos cultivos foram utilizados dois tipos de microcarregadores, Cytodex 1, não poroso e com carga elétrica positiva, e Cultispher S, macroporoso e eletricamente neutro, ambos em frasco spinner agitado de 100 mL, com o meio de cultura α -MEM com 15% de soro fetal bovino, mantidos em incubadora de CO₂ a 37°C e pH entre 7,2 e 7,4. Para aumentar a produtividade celular, algumas estratégias foram adotadas durante a pesquisa como balanceamento nutricional do meio de cultura, adição de microcarregadores e a diluição e/ou a troca do meio durante o cultivo. Auxiliado pela análise de metabólitos por cromatografia líquida de alta eficiência e por microscopia ótica, os resultados obtidos mostraram que foi possível cultivar as CTMs com os dois microcarregadores mantendo boas condições para o crescimento tridimensional. Contudo, o rendimento celular foi limitado, principalmente, pela formação de aglomerados de microcarregadores/matriz extracelular sendo possível obter um fator de expansão celular de 4,98 com o Cytodex 1 e de 9,70 com o Cultispher S. A fácil recuperação da célula, vantagem oferecida por este microcarregador, foi aproveitada para realizar a análise da manutenção do fenótipo antigênico por citometria de fluxo e por indução da diferenciação em adipócitos e osteócitos. Os resultados comprovaram a conservação das características fenotípicas da hMSC-TERT com a técnica de cultivo avaliada neste trabalho.

ABSTRACT

The Mesenchymal Stem Cells (MSCs) from adult tissues are at present an attractive source for applications in tissue engineering and cellular therapies. It presents a potential to differentiate into different cell lines as adipocytes, chondrocytes, osteocytes and myocytes. Due to low availability in the tissues and the fact that the demand for therapeutic applications is much larger than the supply capacity has become necessary to expand them in vitro strongly dependent on conservation of their differentiation potential. The MSCs are anchorage dependent, they have the characteristic of adhering to a solid substrate for subsequent proliferation. The conventional procedure of expansion in T-flasks with growth in monolayers, usually involves a difficult monitoring and control process, with high contamination index, low cell yield and high cost. In this work, we evaluated a methodology of expansion of hMSC-TERT line in spinner flask with microcarriers (small particles with properties favorable for cell adhesion and proliferation). In the experiments, two type of microcarriers were used, Cytodex 1 non-porous and with positive electric charge and Cultispher S, macroporous and electrically neutral, both in stirred spinner flask of 100 mL in culture medium α -MEM with 15% fetal calf serum, maintained in a CO₂ incubator at 37°C and pH between 7.2 and 7.4. To increase productivity, some strategies were adopted during the research as a nutritional balance of the culture medium, addition of microcarriers and dilution and/or replacement of medium during cultivation. Aided by analysis of metabolites by high performance liquid chromatography and optical microscopy, the results showed that it was possible to grow hMSC-TERT with two microcarriers while maintaining good conditions for growth in three dimensions. However, the cell yield was limited mainly by the formation of clusters of microcarriers/extracellular matrix and is possible to obtain a cellular expansion factor of 4.98 with Cytodex 1 and 9,70 with Cultispher S. Because of the easy recovery of the cell showed by later microcarrier, it was performed an analysis of the maintenance of antigenic phenotype by flow cytometry and induction of differentiation into adipocytes and osteocytes. The results confirmed the conservation of phenotypic characteristics of hMSC-TERT with the cultivation technique evaluated in this work.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curva de crescimento padrão para células animais em cultura.	15
Figura 2 - Representação simplificada do metabolismo da glicose e da glutamina em uma célula animal (ALTAMIRANO <i>et al.</i> , 2000).....	17
Figura 3 - Exemplos de alguns biorreatores para o cultivo de células animais.	24
Figura 4 – Imagem de microscopia eletrônica (MEV) do cultivo de células-tronco mesenquimais da medula óssea suína com o microcarregador Cytodex 1 após 14 dias de expansão em frasco spinner (FRAUENSCHUH <i>et al.</i> , 2007).	25
Figura 5 - Imagem de microscopia eletrônica (MEV) do microcarregador macroporoso Cytopore (GE HEALTHCARE, 2005).	25
Figura 6 – Representação do microcarregador Cytodex 1 (GE HEALTHCARE, 2005)	35
Figura 7 - Representação da reação enzimática em que se fundamenta o método do MTT.	41
Figura 8 - Representação das reações enzimáticas envolvidas no método da LDH.	42
Figura 9 – Representação esquemática dos procedimentos utilizados nos cultivos com a linhagem hMSC-TERT para experimentos em frascos T e em frasco spinner.	47
Figura 10 – Diagrama de fluxo do tratamento das amostras. Em (A), representa as amostras com o microcarregador Cytodex 1 e, em (B), as amostras com o Cultispher S.	49
Figura 11 – Resultados obtidos no experimento E1 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner de 100 mL, com 50 mL de meio α -MEM suplementado com 15% (v/v) de SFB, 6,44 mM de glicose, 2 mM de glutamina e 0,38 mM de arginina. O sistema de cultivo foi colocado em incubadora de CO ₂ a 37°C sob agitação de 50 rpm. Em (A), estão representados os valores do número de células na suspensão e no microcarregador Cytodex 1, assim como, os valores de pH do meio de cultivo. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas. Em (B), estão representados as concentração dos nutrientes chave e dos metabólitos. As setas indicam a diluição (D) e as trocas de meio (TM) feitas com meio fresco. As análises dos nutrientes e dos metabólitos foram feitas depois da diluição e antes das trocas de meio.	53
Figura 12 – Imagens de microscopia ótica do microcarregador Cytodex 1 com células no decorrer do experimento E1. O tempo de cultivo em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) foi de 71, 96, 6, 121 121 e de 121 horas, respectivamente. A magnificação foi de 40x para (A) e (D), de 100x para (B) e (E) e de 200x para (C) e (F).	56
Figura 13 - Resultados obtidos no experimento E2 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner de 100 mL, com 50 mL de meio α -MEM suplementado com 15% (v/v) de SFB, 6,44 mM de glicose, 2 mM de glutamina e 0,89 mM de	

arginina. O sistema de cultivo foi colocado em incubadora de CO₂ a 37°C sob agitação de 50 rpm. Em (A), estão representados os valores do número de células na suspensão e no microcarregador Cytodex 1, assim como, os valores de pH do meio. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas. Em (B), estão representadas as concentrações dos nutrientes chave e dos metabólitos. As setas indicam a diluição (D) e as trocas de meio (TM) com meio fresco. As análises dos nutrientes e dos metabólitos foram feitas depois da diluição e antes das trocas de meio.....58

Figura 14. - Imagens de microscopia ótica do microcarregador Cytodex 1 com células no decorrer do experimento E2. O tempo de cultivo em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) foi de 48, 73, 73, 97,5, 145 e de 169 horas, respectivamente. A magnificação foi de 40x para (A) e (D), de 100x para (B) e (E) e de 200x para (C) e (F).59

Figura 15 - Resultados obtidos no experimento E3 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner de 100 mL, com 50 mL de meio α -MEM suplementado com 15% (v/v) de SFB, 6,44 mM de glicose, 2,5 mM de glutamina e 1,39 mM de arginina. O sistema de cultivo foi colocado em incubadora de CO₂ a 37°C. Em (A), estão representados os valores do número de células na suspensão e no microcarregador Cytodex 1, assim como, os valores de pH do meio. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas. Em (B), estão representadas as concentrações dos nutrientes chave e dos metabólitos. As setas indicam as trocas de meio (TM) feitas com meio fresco e as diluições (D) com 10 mL de meio contendo 3 g.L⁻¹ de Cytodex 1. As análises dos nutrientes e dos metabólitos foram feitas antes das trocas de meio.61

Figura 16 - Imagens de microscopia ótica do microcarregador Cytodex 1 com células no decorrer do experimento E3. O tempo de cultivo em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) foi de 4, 24, 72, 218, 120 e 218 horas, respectivamente. A magnificação foi de 40x para (A) e (D), de 100x para (B) e (E) e de 200x para (C) e (F).....62

Figura 17 - Resultados de densidade celular relativa obtidos pelo método da LDH do sobrenadante de cultivos em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C de três frascos T de 25 cm² com a linhagem hMSC-TERT cultivada com o meio α -MEM, sem vermelho de fenol, suplementado com 15% (v/v) de SFB, 6,44 mM de glicose, 2,50 mM de glutamina e 1,39 mM de arginina. Depois da fase de adesão de 4 horas, a solução de Tryple foi diluída 5 e 10 vezes separadamente em dois frascos T. O terceiro frasco T foi deixado como controle do experimento. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.65

Figura 18 - Resultados obtidos no experimento E4 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner de 100 mL, com 50 mL de meio α -MEM suplementado com 15% (v/v) de SFB, 6,44 mM de glicose, 2,52 mM de glutamina e 1,39 mM de arginina. O sistema de cultivo foi colocado em incubadora de CO₂ a 37°C sob agitação de 50 rpm. Em (A), estão representados os valores do número de células na suspensão e no microcarregador Cytodex 1, assim como, os valores de pH do meio. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas. Em (B), estão representadas as concentrações dos nutrientes chave e dos metabólitos.

- As setas indicam as trocas de meio (TM) feitas com meio fresco, contendo as enzimas Tryple e Hyalozima diluídas. As análises dos nutrientes e dos metabólitos foram feitas antes das trocas de meio.67
- Figura 19 - Imagens de microscopia ótica do microcarregador Cytodex 1 com células no decorrer do experimento E4. O tempo de cultivo em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) foi de 4, 48, 72, 120, 145 e 192 horas, respectivamente. A magnificação foi de 40x para (A) e (D), de 100x para (B) e (E) e de 200x para (C) e (F).....68
- Figura 20 - Resultados obtidos no experimento E5 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner de 100 mL, com volume de 50 mL de meio α -MEM suplementado com 15% (v/v) de SFB, 6.44 mM de glicose, 2,50 mM de glutamina e 1,39 mM de arginina. O sistema de cultivo foi colocado em incubadora de CO₂ a 37°C sob agitação de 50 rpm. Em (A), estão representados os valores do número de células na suspensão, no microcarregador Cultispher S e na recuperação celular, com as enzimas Tripsina e Tryple, assim como, valores do pH do meio de cultivo. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas. Em (B), estão representadas as concentrações dos nutrientes chave e dos metabólitos. As setas indicam as trocas de meio (TM) feitas com meio fresco. As análises dos nutrientes e dos metabólitos foram feitas antes das trocas de meio.,70
- Figura 21 – Correlação entre o número de células recuperadas (Tryple/Tripsina) com o número de células aderidas no microcarregador Cultispher S (MTT). A curva em vermelho representa a regressão linear Tryple/MTT ($y=0,7794x$ e $R^2=0,7975$). A curva em preto representa a regressão linear Tripsina/MTT ($y=0,5566x$ e $R^2=0,8999$). A curva tracejada representa a regressão linear ideal ($y=x$)......72
- Figura 22 - Imagens de microscopia ótica do microcarregador *Cultispher S* com células em amostras do experimento E5 após 4 horas com MTT. O tempo de cultivo em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) foi de 4, 24, 24, 71, 95 e de 95 horas, respectivamente. A magnificação foi de 40x para (A) e (D), de 100x para (B) e (E) e de 200x para (C) e (F).....73
- Figura 23 – Resultados das análises de citometria de fluxo para a linhagem hMSC-TERT recuperada do microcarregador Cultispher S após o cultivo em frasco spinner no E5. 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.74
- Figura 24 - Imagens de microscopia ótica da diferenciação celular em osteócitos (A) e em adipócitos, destacados em (B)......75
- Figura 25 - Resultados obtidos no experimento E6 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner com meio α -MEM suplementado com 15% (v/v) de SFB, 6.44 mM de glicose, 2,50 mM de glutamina e 1,39 mM de arginina. O sistema de cultivo foi colocado em incubadora de CO₂ a 37°C e sob agitação. Em (A), estão representados os valores do número de células na suspensão, no microcarregador Cultispher S, assim como, os valores do pH do meio de cultivo. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas. Em (B), estão

representadas as concentrações dos nutrientes chave e dos metabólitos. As setas indicam as adições de meio (AM), as trocas de meio (TM) feitas com meio fresco e o tratamento com Tryple (T). As análises dos nutrientes e dos metabólitos foram feitas antes das adições e trocas de meio e dos tratamentos com Tryple.76

Figura 26 - Imagens de microscopia ótica do microcarregador Cultispher S com células em amostras do experimento E6 após 4 horas com MTT. O tempo de cultivo em (A), (B), (D), (E) e (F) foi de 6, 3, 14, 9 e de 7 dias, respectivamente. Em (C) o tempo foi de 6 horas. A magnificação foi de 40x para (A) e (D), de 100x para (B) e (E) e de 200x para (C) e (F).78

Figura A1 - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o E1. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 4,33 \times 10^{-7}$ e $b = -0,01$), com coeficiente de correlação de 0,9961. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.89

Figura A2 - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o E2. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 5,24 \times 10^{-7}$ e $b = -0,06$), com coeficiente de correlação de 0,9947. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.90

Figura A3 - Curva padrão do método do MTT (kit Invitrogen) para o E3. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 8,94 \times 10^{-8}$ e $b = -0,02$), com coeficiente de correlação de 0,9772. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.90

Figura A4 - Curva padrão do método da LDH (kit Sigma) para o E4. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 7,56 \times 10^{-6}$ e $b = -0,02$), com coeficiente de correlação de 0,9968. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.91

Figura A5 - Curva padrão do método do MTT (kit Invitrogen) para o E4. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 6,88 \times 10^{-8}$ e $b = -0,02$), com coeficiente de correlação de 0,9994. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.91

Figura A6 - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o E5. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 7,64 \times 10^{-7}$ e $b = -0,04$), com coeficiente de correlação de 0,9930. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.92

Figura A7 - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o E6. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 6,33 \times 10^{-7}$ e $b = -0,04$), com coeficiente de correlação de 0,9960. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Marcos na produção de produtos industrialmente relevantes (KRETZMER, 2002).....	7
Tabela 2 - Aplicações terapêuticas potenciais de células-tronco para o tratamento de diversas doenças patológicas humanas (MIMEAULT <i>et al.</i> , 2007).....	8
Tabela 3 – Faixa de valores de pH, temperatura e osmolalidade utilizada no cultivo das células animais (LÉO <i>et al.</i> , 2007).	13
Tabela 4 – Influência das diferentes concentrações de ácido láctico e de amônia na expansão de células animais (adaptado de AMABLE & BUTLER, 2008).....	19
Tabela 5 – Classificação dos biorreatores segundo a homogeneidade do sistema (CHICO <i>et al.</i> , 2007).	21
Tabela 6 – Cultivos de células-tronco com microcarregadores em frasco spinner encontrados na literatura.	29
Tabela 7 – Meio de cultura e os suplementos utilizados no cultivo de CTMs no presente trabalho.	34
Tabela 8 - Solução de PBS preparada no laboratório e utilizada nesta pesquisa.	34
Tabela 9 - Características do microcarregador Cytodex 1 (GE HEALTHCARE, 2005).	35
Tabela 10 – Características do microcarregador Cultispher S.	35
Tabela 11 - Filtros utilizados para a preparação do meio de cultura e de amostras para análises.	37
Tabela 12 – Etapas para avaliar a capacidade de diferenciação da linhagem hMSC-TERT em osteócitos e adipócitos após o cultivo em frasco spinner.	45
Tabela 13 - Resultados finais de densidade e de viabilidade celular dos cultivos em frascos T de 25 cm ² para analisar o efeito da enzima Tryple na integridade das células hMSC-TERT. No cultivo utilizou-se o meio α -MEM sem vermelho de fenol suplementado como no E3. O cultivo foi realizado numa incubadora com 5% de CO ₂ à 37°C com uma duração de 59 horas.....	64
Tabela 14 - Tempos de cultivo e fatores de diluição das enzimas Tryple e hialuronidase no meio de cultura fresco utilizado no E4.	66
Tabela C1 - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Cytodex 1 no E1. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.	94
Tabela C2 - Valores da porcentagem de CO ₂ na incubadora, do pH no meio de cultivo e do volume no E1.	94
Tabela C3 – Valores de aminoácidos referentes ao E1.	95
Tabela C4 – Valores de aminoácidos, de glicose, de ácido láctico e de amônia no E1	95

Tabela C5 - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Cytodex 1 no E2. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.	96
Tabela C6 - Valores da porcentagem de CO ₂ na incubadora, do pH no meio de cultivo e do volume no E2.	97
Tabela C7 - Valores de aminoácidos referentes ao E2.	98
Tabela C8 - Valores de aminoácidos, de glicose, de ácido láctico e de amônia no E2.	98
Tabela C9 - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Cytodex 1 no E3. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.	99
Tabela C10 - Valores da porcentagem de CO ₂ na incubadora, do pH no meio de cultivo, do volume no e da agitação no E3.	100
Tabela C11 - Valores de aminoácidos referentes ao E3.	101
Tabela C12 - Valores de aminoácidos, de glicose, de ácido láctico e de amônia no E3.	101
Tabela C13 - Valores das análises de células mortas no sobrenadante dos cultivos em frasco T obtidos pelo método da LDH.	102
Tabela C14 - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Cytodex 1 no E4. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.	102
Tabela C15 - Valores da porcentagem de CO ₂ na incubadora, do pH no meio de cultivo e o do volume no E4.	103
Tabela C16 - Valores de aminoácidos referentes ao E4.	104
Tabela C17 - Valores de aminoácidos, de glicose, de ácido láctico e de amônia no E4.	104
Tabela C18 - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Cultispher S no E5. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.	105
Tabela C19 - Valores do número de células recuperadas do Cultispher S e da viabilidade no E5, após o tratamento com as enzimas tripsina e tryple.	105
Tabela C20 - Valores da porcentagem de CO ₂ na incubadora, do pH no meio de cultivo e do volume no E5.	106
Tabela C21 - Valores de aminoácidos referentes ao E5.	107
Tabela C22 - Valores de aminoácidos, de glicose, de ácido láctico e de amônia no E5.	107
Tabela C23 - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Cultispher S no E6. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.	108
Tabela C24 - Valores da porcentagem de CO ₂ na incubadora, do pH no meio de cultivo e do volume no E6,	109
Tabela C25 – Continuação da Tabela 24.	110
Tabela C26 - Valores de aminoácidos referentes ao E6.	111

Tabela C27 - Valores de aminoácidos, de glicose, de ácido láctico e de amônia no E6.	112
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACIs: Aglomerados de Células da Ilhota;
ADP: Adenosina Difosfato;
AMs: Anticorpos Monoclonais;
ATP: Adenosina Trifosfato;
BVDV: Bovine Viral Diarrhea Virus;
CEAs: Células Epiteliais Amnióticas;
COHs: Células Ovais Hepáticas;
CPEs: Células Progenitoras Endoteliais;
CPMs: Células Progenitoras Multipotentes;
CTBAs: Células-Tronco BrônquioAlveolar;
CTEbs: Células-Tronco Epiteliais do bojo
CTECNs: Células-Tronco Epidérmicas da Crista Neural;
CTECRs : Células-Tronco Epiteliais da Córnea e da Retina;
CTECs: Células-Tronco Epiteliais da Córnea;
CTEs: Células-Tronco Embrionárias;
CTHs: Células-Tronco Hematopoiéticas;
CTMs: Células-Tronco Mesenquimais;
CTMAs: Células-Tronco Mesenquimais Amnióticas;
CTMOs: Células-Tronco derivadas da Medula Óssea;
CTMPs: Células-tronco Multipotentes derivadas da Placenta;
CTNs: Células-Tronco Neurais;
CTPs: Células-Tronco Pancreáticas;
CTQs: Células-Tronco dos queratinócitos;
CTs: Células-Tronco;
CTTAs: Células-Tronco derivadas do Tecido Adiposo;
CTTMs: Células-Tronco derivadas do Tecido Muscular;

DECH: Doença de Enxerto Contra o Hospedeiro;

EMEM: Eagle Minimum Essential Medium;

EPO: Eritropoetina;

G6P: Glicose 6 Fosfato;

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

LDH: enzima Lactato Desidrogenase;

LP: Lisado de Plaqueta

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

NAD⁺: Nicotina Adenina Dinucleotídeo;

PBS: *Phosphate Buffer Saline*;

SCU: Sangue do Cordão Umbilical;

SFB: Soro Fetal Bovino;

TCAc: ciclo dos ácidos tricarbóxicos;

tPA: tissue Plasmogen Activator;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Células Animais	4
2.1.1 Células-Tronco.....	7
2.1.2 Células-Tronco Embrionárias.....	9
2.1.3 Células-Tronco Adultas.....	10
2.1.4 Células-Tronco Mesenquimais.....	11
2.2 Crescimento Celular.....	12
2.3 Metabolismo de Células em Cultura	16
2.4 Processos de Cultivo com Células Animais	20
2.4.1 Tipos de Biorreatores.....	21
2.4.2 Modos de Operação dos Biorreatores	26
2.4.3 Aeração e Agitação.....	28
2.4.4 Cultivos com Células-Tronco	28
2.5 Considerações Gerais sobre a Revisão Bibliográfica	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Materiais.....	33
3.1.1 Linhagem Celular.....	33
3.1.2 Meios de Cultura.....	33
3.1.3 Solução Tampão de Fosfato – PBS (<i>Phosphate Buffer Saline</i>).....	34
3.1.4 Microcarregadores	34
3.1.5 Enzimas de Dissociação Celular.....	36
3.1.6 Corante	36
3.1.7 Reagente MTT	36
3.1.8 Reagente Lactato Desidrogenase (LDH)	36
3.1.9 Silicone	37
3.1.10 Filtros	37
3.1.11 Frascos de Cultura.....	37
3.2 Equipamentos	38

3.2.1 Câmara Asséptica.....	38
3.2.2 Incubadora de CO ₂	38
3.2.3 Microscópios Óticos.....	38
3.2.4 Câmara de Neubauer ou Hemacitômetro	38
3.2.5 Centrífugas	39
3.2.6 Medidor de pH	39
3.2.7 Espectrofotômetros de Microplacas.....	39
3.3 Métodos	39
3.3.1 Determinação da Densidade Celular e da Viabilidade em Suspensão	39
3.3.2 Recuperação das Células do Microcarregador Cultispher S	40
3.3.3 Determinação da Densidade Celular Total pelo Método baseado no MTT.....	40
3.3.4 Determinação da Densidade Celular pelo Método baseado na LDH.....	41
3.3.5 Determinação da Densidade de Células Aderidas.....	42
3.3.6 Análise de Aminoácidos.....	42
3.3.7 Análise de Glicose e de Ácido Lático.....	43
3.3.8 Análise de Amônia.....	44
3.3.9 Análise de Citometria de Fluxo	44
3.3.10 Diferenciação Celular.....	44
3.3.11 Tratamento com Tryple de todos os Microcarregadores do Cultivo.....	46
3.3.12 Procedimento Experimental.....	47
3.3.13 Tratamento dos Dados Experimentais.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
4.1 Experimento 1	51
4.2 Experimento 2	56
4.3 Experimento 3	60
4.4 Experimento 4	63
4.5 Experimento 5	69
4.6 Experimento 6	75
4.7 Análise Geral dos Experimentos Realizados	79
5. CONCLUSÕES	81
6 Sugestões para os Próximos Trabalho.....	82
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICE A – Curva padrão para o método do MTT para o E1, E2, E3, E4, E5 e E6 e curva padrão para o método do LDH para o E4.....	89

APÊNDICE B – Correção do número de células totais pelo método da massa seca 93

APÊNDICE C – Tabelas dos valores de números de células em suspensão, células aderidas no microcarregador, pH do meio de cultivo, porcentagem de CO₂ na incubadora, volume do cultivo, concentração de aminoácidos, de glicose, de ácido láctico e de amônia para os experimentos E1, E2, E3, E4, E5 e E6.....94

1. INTRODUÇÃO

A demanda crescente por tecidos e órgãos para aplicações na terapia celular tem exigido o desenvolvimento de substitutos biológicos que possam restaurar, manter ou melhorar as suas funções (GODARA *et al.*, 2008). Devido à necessidade de garantir um número suficiente de células de tecidos específicos para aplicações nesta área da medicina, muita atenção tem sido dada às células-tronco (KING & MILLER, 2007). Especialmente, às células-tronco mesenquimais (CTMs) presentes em diversos tecidos adultos. A medula óssea é a principal fonte dessas células em diferentes espécies (RINGE *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2007). A busca por fontes de fácil acesso resultou no desenvolvimento de métodos para o isolamento dessas células da placenta, do sangue do cordão umbilical, da camada subendotelial da veia umbilical, do líquido amniótico e da gordura de lipoaspiração (BROOKE *et al.*, 2008; PANEPUCCI *et al.*, 2004, PAYUSHINA *et al.*, 2006). As CTMs apresentam um potencial de diferenciação em diversas linhagens celulares, tais como, adipócitos (EIBES *et al.*, 2010), condrócitos (FRAUENSCHUH *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007), osteócitos (EIBES *et al.*, 2010; FRAUENSCHUH *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007) e miócitos. Devido à baixa disponibilidade nos tecidos e o fato da demanda para aplicações terapêuticas ser muito maior que a capacidade de fornecimento tornou-se necessária a sua expansão *in vitro* sob a indispensável condição de preservar o seu potencial de diferenciação (SCHOP *et al.*, 2008).

As CTMs são dependentes de ancoramento, ou seja, possuem a característica condicional de aderir a um substrato sólido para posterior proliferação. No sistema de cultivo convencional *in vitro*, essas células são expandidas em monocamadas, ou seja, uma camada de células sobre uma superfície (YANG *et al.*, 2007). Entretanto, esses sistemas de cultivo estático têm várias limitações como a falta de homogeneidade, que ocasiona gradientes de concentração de nutrientes e de metabólitos, a falta de condições para o monitoramento e controle das condições ambientais, que limitam muito a expansão celular (YU *et al.*, 2009), e a pouca área disponível para a adesão que resulta na necessidade de incubadoras de grande

capacidade e extenso trabalho de manipulação para atingir um elevado número de células (WEBER *et al.*, 2007).

Uma tecnologia cada vez mais difundida no cultivo de células dependentes de ancoramento é o uso de microcarregadores. Os microcarregadores são pequenas partículas, com diâmetro entre 100 e 400 μm , que servem como suporte para a adesão das células. Uma grande variedade de microcarregadores comerciais está disponível para aplicações em cultivo de células, diferenciando-se pela composição química, carga elétrica, revestimento superficial e porosidade (SCHOP *et al.*, 2008).

Os microcarregadores são utilizados, principalmente, em sistemas agitados como em frascos spinner. Geralmente de vidro, esses frascos possuem um eixo central com um agitador magnético e braços laterais para a adição e remoção de células ou do meio de cultura (GODARA *et al.*, 2008). O sistema de cultivo em suspensão homogênea com microcarregadores em frasco spinner agitado tem sido utilizado para a expansão de células-tronco embrionárias de camundongos (ABRANCHES *et al.*, 2007; FERNADES *et al.*, 2007) e, principalmente, de CTMs de diversas espécies e de diferentes fontes (EIBES *et al.*, 2010; FRAUENSCHUH *et al.*, 2007; SCHOP *et al.*, WEBER *et al.*, 2007, 2008; YANG *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2009).

O objetivo principal do cultivo de células-tronco em microcarregadores está baseado na obtenção de células saudáveis e não diferenciadas para o uso em transplantes. Sendo assim, é desejável que se encontre um microcarregador capaz de preencher todos os requisitos técnicos para poder viabilizar uma expansão de CTMs eficiente e com alta viabilidade. Para tanto, os trabalhos científicos nesta linha de pesquisa buscam selecionar microcarregadores e condições experimentais que possibilitem a expansão e posterior recuperação das células no final do cultivo, preservando o seu potencial de diferenciação. Alguns dos microcarregadores selecionados por esses pesquisadores como, por exemplo, o Cytodex 1 (FRAUENSCHUH *et al.*, 2007; SCHOP *et al.*, 2008), apresentaram bons resultados quanto à adesão e à proliferação celular. Porém, a baixa eficiência de recuperação das células no final do cultivo e a formação de aglomerados de microcarregadores colonizados com células, dois problemas complexos inerentes à técnica de cultivo utilizada, não foram adequadamente resolvidos.

Embora a utilização de microcarregadores para a expansão de células dependentes de ancoramento seja amplamente difundida, desde a década de 1960, as pesquisas com células-tronco nesse sistema de cultivo estão concentradas nos últimos cinco anos. Concomitantemente, a proposta deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de cultivo de CTMs em microcarregadores de forma a obter uma alternativa de expansão celular de utilidade prática envolvendo a expansão e a recuperação de CTMs não diferenciadas em plenas condições de uso terapêutico. Para tanto, a tecnologia a ser desenvolvida neste trabalho tem a perspectiva de ser utilizada no Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto (Faculdade de Medicina, USP) para aplicação na infusão de CTMs, como opção terapêutica no tratamento da doença conhecida como “Doença de Enxerto Contra o Hospedeiro” (DECH), que acomete uma porcentagem considerável de pacientes submetidos ao transplante alogênico de medula óssea (TOUBAI *et al.*, 2008).

Por fim, convém destacar que os conhecimentos tecnológicos gerados por este trabalho poderão ser extrapolados ou validados para aplicações semelhantes.

1.1 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de expansão de CTM em suspensão homogênea com microcarregadores em um biorreator tipo frasco spinner que permita obter células de qualidade terapêutica, em escala de bancada (~50 mL), e atender os princípios de um bioprocessamento reprodutível, econômico, eficiente e, sobretudo, conservativo com relação ao fenótipo original das células.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Inicialmente, nesta revisão bibliográfica, será apresentada uma visão geral da história do cultivo de células animais. Em seguida, os conceitos de células-tronco serão definidos sendo que uma atenção maior foi dada às características das células-tronco mesenquimais, utilizadas neste trabalho. Depois, serão feitas algumas considerações a respeito do crescimento e do metabolismo celular em cultura. Para finalizar, serão apresentados alguns dos processos utilizados para o cultivo de células animais e de células-tronco.

2.1 Células Animais

Mais de um século transcorreu desde o início do cultivo com células animais para a produção de células e produtos. Fundamentalmente, as células podem se desenvolver *in vitro* após dissecação e dispersão total ou parcial do tecido de origem, resultando em uma cultura primária e, posteriormente, em uma linhagem celular (KRETZMER, 2002).

Na última década do século XIX, as primeiras tentativas experimentais para conservar pedaços de tecidos em plasma por alguns dias, ou mesmo semanas, foram limitadas pela qualidade do fluido nutriente, empregado na época como meio de cultura, e pela esterilidade da instalação experimental. Em 1907, Ross Harrison foi o primeiro a registrar a manutenção e o crescimento de células nervosas por um período de até 30 dias, sendo possível observar que as funções normais da célula continuaram *in vitro* e que as condições assépticas foram cruciais para o êxito do experimento. As dificuldades enfrentadas, para se atingir bons níveis de assepsia, restringiram os avanços do cultivo de células nas quatro décadas seguintes. Entretanto, o desenvolvimento de antibióticos no final da década de 1940 facilitou o manuseio dos meios de cultura. Outro fator coadjuvante para a melhora da assepsia, nessa época, foi o desenvolvimento de novas técnicas de esterilidade (KRETZMER, 2002).

Maitland & Maitland (1928) desenvolveram um método simples para a propagação de vírus em cultura de tecidos, levando às descobertas de Enders *et al.* (1949) em que o vírus da poliomielite poderia ser cultivado em células e, posteriormente, usado como uma vacina inativada.

Em 1955, outro avanço importante foi realizado por Eagle que desenvolveu um meio quimicamente definido conhecido como *EMEM* (*Eagles Minimum Essential Medium*) que poderia substituir os fluidos biológicos utilizados como meio de cultura. A única limitação para o seu uso era a necessidade de adição de soro sanguíneo indefinido (KRETZMER, 2002).

Ainda na década de 1950, o primeiro processo industrial de cultivo de células animais foi realizado com a produção da vacina Salk contra a poliomielite em células primárias de rim de macaco. O processo era feito em múltiplas unidades uma vez que essas células eram dependentes de ancoramento (KRETZMER, 2002).

Em 1962, Capstick *et al.* conseguiram cultivar células BHK (Baby Hamster Kidney) em suspensão como microrganismos. Esse sucesso, juntamente com o estabelecimento de linhagens permanentes, significou o avanço para o uso industrial de células animais e o desenvolvimento de processos em larga escala. Entretanto, devido às necessidades de segurança, essas linhagens foram utilizadas apenas para vacina veterinária por um longo período (KRETZMER, 2002).

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

Em 1967, van Wezel deu uma grande contribuição para o desenvolvimento de culturas de células aderentes em alta densidade e em larga escala. Neste sistema, as células puderam ser cultivadas aderidas a micropartículas denominadas de microcarregadores. O primeiro produto produzido industrialmente usando microcarregadores foi a vacina inativada contra a poliomielite, obtida pelo próprio van Wezel (MELLO *et al.*, 2007).

Em meados de 1970, Köhler e Milstein obtiveram sucesso na fusão de linfócitos com células de mieloma, originando os hibridomas. Essa técnica possibilitou as companhias de produzir anticorpos monoclonais (AMs) contra os antígenos conhecidos, através da fusão de linfócitos, produtores de anticorpo, com células originárias de tumor, os mielomas. A expressão de AMs em hibridomas resultou em um significativo aumento na produção de testes para diagnósticos médicos. A alta seletividade dos AMs 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. No entanto, os problemas relativos à sua utilização foram realmente solucionados com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais quiméricos, anticorpos murinos humanizados e até mesmo anticorpos humanos (KRETZMER, 2002).

Em 1980, um novo tipo de produto foi introduzido na indústria farmacêutica: proteínas recombinantes. A engenharia genética progrediu ao ponto da inserção estável de determinada parte de DNA alvo, em células de mamíferos. O primeiro produto não nativo (os produtos produzidos pela replicação viral e por hibridomas são considerados produtos nativos das células) produzido por células animais foi o tPA (*tissue plasminogen activator*), proteína necessária para dissolução de coágulos sanguíneos para o tratamento de problemas cardíacos. O sucesso do tPA abriu caminho para um significativo número de outras proteínas recombinantes. O próximo produto a ser licenciado foi o eritropoetina (EPO), um hormônio que controla a maturação das células vermelhas do sangue (KRETZMER, 2002).

O desenvolvimento progrediu rapidamente, especialmente no domínio das proteínas do sangue utilizadas como fármacos no tratamento da hemofilia. No final da década de 1980, a disseminação da Aids causou problemas durante a recuperação dessas proteínas do sangue doado, acelerando o desenvolvimento de processos de recombinação de fatores da coagulação sanguínea (por exemplo, fator VII, fator VIII, fator IX, e antitrombina III) (KRETZMER, 2002).

A Tabela 1 apresenta alguns dos produtos obtidos industrialmente a partir de células animais.

Tabela 1 - Marcos na produção de produtos industrialmente relevantes (KRETZMER, 2002).

Ano	Evento
1949	Produção do vírus da poliomielite em tecidos humanos
1954	Vacina Salk contra pólio em células primárias de rim de macaco, licenciada para uso humano
1962	Vacina contra febre aftosa em células BHK para uso veterinário
1980	Interferon humano em células Namalwa
1986	Produção de anticorpos monoclonais para diagnósticos
1986	Produção de tPA em células CHO modificadas geneticamente

Nos últimos anos, as culturas de células livres em suspensão e de células dependentes de ancoramento se mostraram adequadas para diferentes propósitos e esforços têm sido feitos, a fim de otimizar a célula ou o rendimento do produto derivado do cultivo e minimizar os custos da produção (MENDONÇA *et al.*, 1999).

2.1.1 Células-Tronco

As células-tronco (CTs) têm a capacidade de permanecer em um estado indiferenciado, independente do tecido que as circunda. Possuem a capacidade de auto renovação que dão origem à células filhas, que sofrem um processo terminal de diferenciação (RINGE *et al.*, 2002). Para tanto, apresentam uma divisão celular assimétrica, na qual são geradas duas células filhas diferentes. Uma delas é idêntica à mãe e a outra está comprometida com uma via de diferenciação na qual o microambiente celular fornece os sinais que definem a direção da diferenciação (GODARA *et al.*, 2008).

As CTs podem ser subdivididas de acordo com o seu potencial de desenvolvimento em: *Totipotentes*, formadas nas primeiras horas após a fecundação, possuem a capacidade de dar origem a todos os tipos possíveis de células de um organismo, incluindo o tecido extra embrionário, e podem ser transplantadas para o útero e formar um organismo plenamente viável; *pluripotentes*, encontradas no embrião, têm menos capacidade de diferenciação do que as *totipotentes*. Podem originar a maioria dos tipos de célula, mas não podem formar um organismo completo ou tecidos extra embrionários; *multipotentes*, encontradas

no embrião e no adulto, têm um potencial de diferenciação mais limitado e podem produzir múltiplas linhagens celulares (GODARA *et al.*, 2008; RINGE *et al.*, 2002).

Dois métodos principais são utilizados para avaliar o potencial de diferenciação das células-tronco: indução da diferenciação *in vitro* por meio de vários indutores no meio de cultura ou métodos diferentes de transplantes direto das células (PAYUSHINA *et al.*, 2006).

A bem sucedida expansão e/ou diferenciação *ex vivo* das CTs seguida do transplante levaram ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas na medicina regenerativa (MIMEAULT *et al.*, 2007). A Tabela 2 apresenta as potenciais aplicações de CTs para o tratamento de diversas doenças de acordo com o tipo e a fonte das células.

Tabela 2 - Aplicações terapêuticas potenciais de células-tronco para o tratamento de diversas doenças patológicas humanas (MIMEAULT *et al.*, 2007).

Célula-Tronco/Progenitora Tipo e Fonte	Células Diferenciadas	Doenças Patológicas Tratadas
CTEs, tecidos fetais (CTHs), células do SCU (CTHs), CTHs de adulto, CTNs	células hematopoiéticas	doenças hematopoiéticas e imunológicas, anemia displêmica, doenças auto imunes, cânceres
CTEs, fígado fetal (CPEs), CTMAs, Células do SCU (CPEs), CTMOs (CPEs), CTTAs	células endoteliais	doenças do sistema vascular, isquemia cardíaca
CTEs, tecidos fetais (CTMs), Células do SCU (CTMs), CEAs, CTMOs, CTTAs (CTMs), CTTMs	osteoblastos, condrócitos e adipócitos	osteoporose, osteogênese imperfeita, osteoartrite e doenças da cartilagem
CTEs, tecidos fetais (CTMs), CEAs, células do SCU (CTMs), CTMOs (CTMs), CTTMs, CTTAs	células musculares	Doenças musculares e defeitos esqueléticos
CTEs, CEAs, Células do SCU (CTMs e células CD133 ⁺), CTMOs (CTMs e células CD133 ⁺), CTTA , CTTMs, COHs	cardiomiócitos	insuficiência cardíaca
CTEs, tecidos fetais (CTNs), Células do SCU (CPMs), CEAs de adultos CTNs, pele (CTECNs), CTMOs (CTMs e CTHs), CTTAs	neurônios, neurônios dopaminérgicos, oligodendrócitos e astrócitos	doenças do sistema nervoso, doença de Parkinson, doenças da mielina
CTEs, células do pulmão fetal, CTBAs de adultos, CTMOs	células pulmonares	doenças pulmonares

CTEs, células do fígado fetal (CTMs), células do SCU, CEAs, COHs de adultos, CTMOs (CTHs), CTTAs	hepatócitos	doenças do fígado
CTEs, células do pâncreas fetal (ACIs), células do SCU, CEAs, CTMPs, CTPs de adultos, COHs, CTTAs, CTHs, CTMs	células β produtoras de insulina	diabetes mellitus tipo I e II
CTEs, tecidos fetais (CTNs), CTECRs do limbo das CTEC, CTMOs (CTMs)	neurônios da retina, células progenitoras da retina e células epiteliais da córnea	doenças da retina e doenças da córnea
CTEs, tecidos fetais, CEAs, CTQs de adultos, CTEbs, CTECNs	células da pele	doenças de pele e de cabelo

ACIs: Aglomerados de Células da Ilhota; CEAs: Células Epiteliais Aminióticas; COHs: Células Ovais Hepáticas; CPEs: Células Progenitoras Endoteliais; CPMs: Células Progenitoras Multipotentes; CTBAs: Células-Tronco Brônquio Alveolar; CTEs: Células-Tronco Embrionárias; CTECNs: Células-Tronco Epidérmicas da Crista Neural; CTEbs: Células-Tronco Epiteliais do bojo; CTECs: Células-Tronco Epiteliais da Córnea; CTECRs : Células-Tronco Epiteliais da Córnea e da Retina; CTHs: Células-Tronco Hematopoiéticas; CTMA: Células-Tronco Mesenquimais Aminióticas; CTMOs: Células-Tronco derivadas da Medula Óssea; CTMPs: Células-tronco Multipotentes derivadas da Placenta; CTNs: Células-Tronco Neurais; CTPs: Células-Tronco Pancreáticas; CTQs: Células-Tronco dos queratinócitos; CTTA: Células-Tronco derivadas do Tecido Adiposo; CTTMs: Células-Tronco derivadas do Tecido Muscular; SCU: Sangue do Cordão Umbilical;

2.1.2 Células-Tronco Embrionárias

As células-tronco embrionárias (CTEs) são definidas como células pluripotentes que podem ser mantidas em um estado indiferenciado *in vitro* e, teoricamente, podem ser direcionadas a se diferenciar em todos os tipos de células das três camadas embrionárias: ectoderme, mesoderme e endoderme (FERNANDES *et al.*, 2007). Isso abre possibilidades visionárias, tal como, o crescimento de tecidos em laboratório para o tratamento de uma variedade de doenças (RINGE *et al.*, 2002). No entanto, um dos obstáculos para a utilização eficaz e segura é a possibilidade de reações de rejeição imunológica e formação de tumores nos indivíduos receptores (MIMEAULT *et al.*, 2007).

As células derivadas de um embrião pertencem a outro indivíduo. Em termos imunológicos, a sua introdução em um organismo receptor pode causar rejeição, limitando o seu uso. Esse problema poderia ser contornado com a possibilidade de utilização da clonagem terapêutica. A proposta é substituir o núcleo

de uma célula embrionária estabelecida *in vitro* com um núcleo de célula somática do receptor. Como resultado, as CTEs assim obtidas poderiam combinar a capacidade de gerar todos os tecidos com as características imunológicas do receptor. Porém, os defeitos do genoma também seriam transferidos, impedindo o uso dessa opção em doenças genéticas. E ainda mais, as linhagens celulares extensivamente manipuladas, em geral, possuem defeitos cromossômicos aleatórios, que alteram o comportamento dessas células, de forma que o risco do uso médico não pode ser atualmente avaliado (da SILVA JUNIOR & BOROJEVIC, 2007).

Além disso, as CTEs têm sido um dos temas de maior controvérsia discutidos na comunidade científica e religiosa (RINGE *et al.*, 2002). Trabalhar com essas células *in vitro* traz a necessidade de desestruturar a massa celular interna do blastocisto, de 5-6 dias após a fecundação, o que inviabiliza o desenvolvimento do organismo, gerando questões éticas e religiosas quando se trata de embriões humanos (da SILVA JUNIOR & BOROJEVIC, 2007).

No Brasil, a Lei de Biossegurança n.º 11.105 de 24 de março de 2005 que autoriza o uso de células-tronco de embriões humanos para a pesquisa e para terapias, em 29 de maio de 2008 foi declarada constitucional pelo Supremo Tribunal Federal, desde que os embriões sejam inviáveis para a gestação ou estejam congelados a mais de três anos (Lei de Biossegurança nº 11.105, 2005).

2.1.3 Células-Tronco Adultas

Menos polêmicas, porém tanto quanto promissoras, são as células-tronco multipotentes derivadas de tecidos humanos adultos que, provavelmente, possuem um potencial de diferenciação mais amplo do que se suponha há poucos anos atrás quando se acreditava que essas células estavam restritas a se diferenciar somente naquelas do seu próprio tecido (GODARA *et al.*, 2008; RINGE *et al.*, 2002).

Os mecanismos biológicos responsáveis pelo amplo desenvolvimento de CTs derivadas de tecidos adultos não são conhecidos. A transdiferenciação tem sido proposta como uma possível explicação. Estudos de transdiferenciação são baseados na idéia de que um ambiente particular dita o desenvolvimento das CTs

de tecidos específicos. Outra característica marcante de células-tronco adultas é sua capacidade de migrar de seus nichos para sítios de diferentes tecidos, promovendo manutenção e regeneração (RINGE *et al.*, 2002). Muitos pesquisadores consideram a medula óssea como fonte geral dessas células (PAYUSHINA *et al.*, 2006). Na medula óssea, existem pelo menos três diferentes tipos de células-tronco adultas: as células-tronco hematopoiéticas, as células-tronco endoteliais e as células-tronco mesenquimais (da SILVA JUNIOR & BOROJEVIC, 2007).

2.1.4 Células-Tronco Mesenquimais

Friedenstein *et al.* (1976) foram os primeiros a identificar as células formadoras de colônias de fibroblastos capazes de se diferenciar em tecidos ósseo, cartilaginoso, adiposo, muscular e restaurar o microambiente hematopoiético após transplantes. Essas células foram designadas de unidades formadoras de colônia de fibroblastos. Mais tarde, elas foram chamadas de células-tronco do estroma da medula óssea ou células progenitoras mesenquimais (RINGE *et al.*, 2002). Atualmente, o termo células-tronco mesenquimais (CTMs) tornou-se o mais comum (PAYUSHINA *et al.*, 2006).

As CTMs apresentam um potencial de diferenciação em diversas linhagens celulares, tais como adipócitos (EIBES *et al.*, 2010; WEBER *et al.*, 2007), condrócitos (FRAUENSCHUH *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007), osteócitos (EIBES *et al.*, 2010; FRAUENSCHUH *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007) e miócitos. Apesar de um potencial menor de diferenciação em relação às CTEs, as CTMs apresentam certas vantagens. Elas não formam tumores, seu isolamento não é restringido por considerações de ordem moral ou legal e sua presença em tecidos adultos permite que o autotransplante dessas células retiradas do paciente e expandidas *in vitro* (PAYUSHINA *et al.*, 2006).

Um dos problemas que limitam a utilização de CTMs para abordagens terapêuticas decorre do fato de que sua expansão pode levar à perda de multipotencialidade e de senescência (perda da capacidade proliferativa após um determinado número de divisões celulares). No entanto, fatores de crescimento têm o potencial de melhorar a manutenção dessas células *in vitro* (YANG *et al.*, 2007).

A medula óssea é a principal fonte dessas células em diferentes espécies (RINGE *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2007). A busca por fontes de fácil acesso resultou no desenvolvimento de métodos para o isolamento dessas células da placenta, do sangue do cordão umbilical, da camada subendotelial da veia umbilical, do líquido amniótico e da gordura de lipoaspiração (BROOKE *et al.*, 2008; PANEPUCCI *et al.*, 2004; PAYUSHINA *et al.*, 2006). As CTMs isoladas de diferentes fontes demonstram algumas diferenças na expressão de certas moléculas de superfície, no potencial de proliferação e na diferenciação, embora suas propriedades, em geral, sejam semelhantes (PAYUSHINA *et al.*, 2006).

Com o avanço das técnicas de cultivo *in vitro* e com o desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais, foi possível caracterizar as CTMs por meio do conjunto de antígenos de superfície expressos nessas células, que combina marcadores de diferentes tipos celulares. A identificação de um marcador universal em uma população dessas células é quase impossível. Os principais marcadores usados para a imunofenotipagem das CTMs humanas são CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e CD166. Uma característica das CTMs é a ausência de marcadores de células-tronco hematopoiéticas, tais como CD14, CD31, CD34, CD45 e CD86 (PAYUSHINA *et al.*, 2006).

As CTMs já foram empregadas em ensaios clínicos. Por exemplo, na facilitação da reconstituição hematopoiética e imunológica após o transplante de células-tronco hematopoiéticas, na prevenção e no tratamento da doença de enxerto contra o hospedeiro (DECH), no tratamento de crianças com osteogênese imperfeita, na regeneração de ossos e de cartilagens utilizando técnicas de engenharia de tecidos, na doença de Crohn e no reparo de danos após um infarto agudo no miocárdio (BERNARDO *et al.*, 2007; BROOKE *et al.*, 2008).

2.2 Crescimento Celular

Para obter êxito no cultivo de células animais, após o isolamento ou estabelecimento de uma linhagem celular, se faz necessário conhecer o comportamento e as necessidades celulares durante o cultivo.

Basicamente, são dois os tipos de células animais que estão disponíveis para o cultivo e para a utilização na pesquisa e na produção. As células que não necessitam de uma superfície para ancoramento, tais como as células de inseto, e como consequência podem crescer livres em suspensão, e as células, como a maioria das células de mamíferos, que só podem crescer quando aderidas a um substrato e são chamadas células dependentes de ancoramento (MENDONÇA *et al.*, 1999).

O crescimento de células animais *in vitro* depende de diversos fatores que influenciam as condições ambientais durante o cultivo. O controle do pH e da temperatura são fundamentais. Para monitorar por simples observação visual o pH do meio de cultivo, é muito comum a adição do vermelho de fenol como indicador, porém esse composto pode interferir na interpretação de resultados que envolvam a medida de fluorescência e de absorvância. A temperatura afeta a solubilidade de vários componentes do meio, especialmente dos gases CO₂ e O₂. A osmolalidade do meio de cultivo também é um fator importante a verificar, principalmente, após alterações em sua formulação básica, pela evaporação da água ou por transformações metabólicas que ocorrem durante a incubação (LÉO *et al.*, 2007). A Tabela 3 apresenta uma faixa de valores, para alguns dos fatores ambientais, utilizada no cultivo da maioria das células de mamíferos e de insetos.

Tabela 3 – Faixa de valores de pH, temperatura e osmolalidade utilizada no cultivo das células animais (LÉO *et al.*, 2007).

Fatores	Células de Mamíferos	Células de Inseto
pH	7,4	de 6,2 a 6,5
Temperatura	de 35 a 37 °C	de 26 a 28 °C
Osmolalidade do meio	de 260 a 320 mOsm.kg ⁻¹	de 340 a 390 mOsm.kg ⁻¹

O 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 também fornecer todas as substâncias químicas requeridas pela célula, as quais esta não é capaz de sintetizar. Para a manutenção das condições do tecido original do qual a célula é oriunda, faz-se necessário um meio líquido que possua, entre outras substâncias específicas para

determinadas linhagens celulares, sais inorgânicos, açúcares, aminoácidos, vitaminas, lipídeos, ácidos orgânicos, proteínas, hormônios, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, micronutrientes (íons orgânicos e minerais) e água. Por vezes, também requer a adição de antibióticos e soro (MORAES *et al.*, 2007).

O soro, normalmente proveniente de bezerros e fetos bovinos, contém aminoácidos, fatores de crescimento, vitaminas, proteínas, hormônios, lipídeos e minerais, entre outros. Também pode se empregar soro de equinos e mesmo soro humano, mas são menos comuns. O soro fetal bovino (SFB) é o favorito por apresentar menores concentrações de imunoglobulinas e elevada proporção de fatores de crescimento. Algumas desvantagens do uso de SFB são: o alto custo do reagente, a falta de homogeneidade entre os lotes, a preocupação com possíveis agentes contaminantes como a presença de formas especiais de proteínas chamadas príon que são responsáveis pela encefalopatia espongiforme bovina (doença da vaca louca que provoca degeneração cerebral) e de Bovine Viral Diarrhea Vírus (BVDV), além da grande presença de proteínas que dificultam a purificação do produto desejado (MORAES *et al.*, 2007).

Nos últimos anos houve forte recomendação por parte das agências reguladoras, como a FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) de não se utilizar produtos de origem animal, como soro, na composição de meios de cultura celular para a produção de biofármacos e correlatos com aplicação terapêutica ou profilática em humanos. Os problemas com o uso de meio de cultura livre de SFB surgem do não conhecimento total das necessidades nutricionais das células e conseqüentemente é impossível providenciar todos os componentes necessários em um meio quimicamente definido, com o inconveniente de perder o efeito de proteção que o SFB exerce contra as forças de cisalhamento (MORAES *et al.*, 2007).

As células podem se comportar diferentemente, quando em cultura, nas diferentes fases do ciclo de crescimento em relação à proliferação, à atividade enzimática, à glicólise e respiração, à síntese de produtos e à muitas outras propriedades (LÉO *et al.*, 2007). As fases de crescimento celular, representadas na Figura 1, podem ser divididas em fase lag, fase exponencial ou logarítmica (log), fase estacionária e fase de declínio ou morte.



Figura 1 - Curva de crescimento padrão para células animais em cultura.

A fase lag inicia-se com a inoculação das células no novo ambiente. É um período de adaptação, onde as células não se dividem ou o fazem em baixas taxas específicas. A duração dessa fase depende das condições do inóculo e sua densidade inicial. As culturas iniciadas em baixas densidades celulares apresentam maior duração, o que é indesejável. A fase exponencial é um período onde as células estão plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e se duplicando. Durante essa fase, as células estão em seu melhor estado fisiológico e, portanto, ideais para os estudos de função celular. Na fase estacionária ocorre a escassez dos nutrientes e os produtos tóxicos estão tornando-se mais abundantes. Nessa etapa, não há um crescimento líquido da população, ou seja, o número de células que se divide é equivalente ao número de células que morrem. Pode haver aumento relativo na síntese de proteínas especializadas em vez de proteínas estruturais, além da modificação da constituição e da carga da superfície celular (LÉO *et al.*, 2007).

Após a fase estacionária, segue-se a fase de declínio ou morte, na qual a maioria das células está em processo de morte embora outras ainda estejam se dividindo. A morte celular pode ser desencadeada por dois mecanismos distintos: necrose e apoptose. A necrose é considerada um mecanismo de morte acidental, resultante da exposição a altos níveis de estresse. Quase sempre acomete um grupo de células vizinhas e, *in vivo*, envolve inflamação. Já a apoptose é conhecida como morte celular programada. É resultante de níveis intermediários de estresse e ocorre mediante a ativação de um programa bioquímico caracterizado por uma série

de alterações morfológicas, internamente controladas e não envolve inflamação *in vivo* (LÉO *et al.*, 2007).

A determinação da curva de crescimento é importante para a 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.*, 2007).

2.3 Metabolismo de Células em Cultura

O conhecimento do metabolismo da célula em cultura é essencial para a formulação de um novo meio de cultura, para o planejamento de estratégias de alimentação em cultivos e para se obter altas produtividades tanto de células quanto de produto.

Quando as células são cultivadas *in vitro*, alguns padrões gerais podem ser observados quanto ao seu metabolismo central. As principais fontes de carbono e energia para as células animais são glicose e glutamina (GÒDIA & CAIRÓ, 2002). A Figura 2 representa de forma geral o metabolismo da glicose e da glutamina de células animais em cultura.

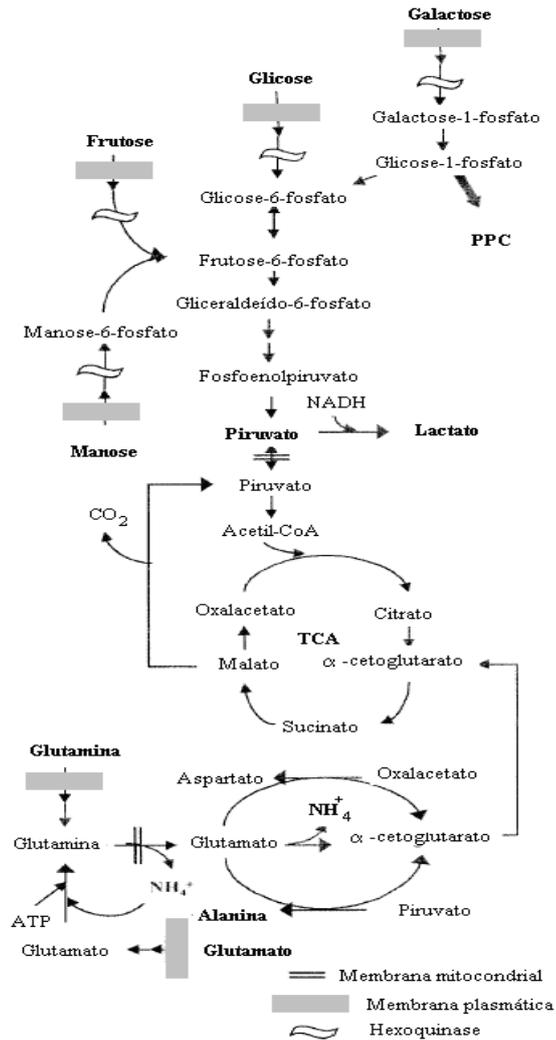


Figura 2 - Representação simplificada do metabolismo da glicose e da glutamina em uma célula animal (ALTAMIRANO *et al.*, 2000).

Na maioria das células de mamíferos, o mecanismo de transporte de glicose para o interior da célula é a difusão facilitada. 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.*,

2007). O NADH, por sua vez, atua como agente redutor do piruvato em lactato, catalisado pela enzima lactato desidrogenase presente no citosol.

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. 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, 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.*, 2007).

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). Assim, o crescimento e a viabilidade celular são prejudicados pelo progressivo esgotamento dos nutrientes e também pelo efeito negativo (inibitório ou tóxico) do acúmulo dos metabólitos, principalmente ácido láctico e amônio (ALTAMIRANO *et al.*, 2007).

A ação tóxica do acúmulo de ácido láctico é devida ao efeito da diminuição do pH e aumento da osmolalidade do meio de cultura. Em sistemas de cultivo requer-se o uso de metodologias para tentar controlar o pH. A maioria dos meios de cultura utilizados para células animais é tamponada. Em alguns casos, o tamponamento é feito pela adição de CO₂ gasoso em equilíbrio com o bicarbonato de sódio (NaHCO₃) presente no meio (ALTAMIRANO *et al.*, 2007).

Os efeitos do amônio no metabolismo celular são observados a níveis baixos de concentração. Também se deve considerar que outras substâncias possam também se acumular como resultado da atividade metabólica celular (ALTAMIRANO *et al.*, 2007). A Tabela 4 contém os valores de concentração de ácido láctico e de amônia que influenciam a expansão de células animais.

Tabela 4 – Influência das diferentes concentrações de ácido láctico e de amônia na expansão de células animais (adaptado de AMABLE & BUTLER, 2008).

Metabólito	Concentração (mM)	Expansão Celular	Referência
Ác. Láctico	<20	sem inibição	MILLER <i>et al.</i> , 1988
			WAGNER <i>et al.</i> , 1988
	20-40	sem inibição	GLACKEN <i>et al.</i> , 1988
	40-60	ligeira inibição	GLACKEN <i>et al.</i> , 1988
	60	com inibição	GLACKEN <i>et al.</i> , 1988
Amônia	<2	sem inibição	GLACKEN, 1988
	2-5	com inibição	GLACKEN <i>et al.</i> , 1988
			MCQUEEN & BAILEY, 1990
5	com inibição	GLACKEN <i>et al.</i> , 1988	

Quando as células animais são cultivadas *in vitro* exibem diversos perfis de consumo de aminoácidos que seguem algumas tendências gerais, embora se possam verificar variações para cada linhagem celular em particular (ALTAMIRANO *et al.*, 2007).

No metabolismo celular, o oxigênio é o último elemento a aceitar elétrons na cadeia respiratória, sendo reduzido à água, permitindo que ocorra a reoxidação das coenzimas que participam das reações de desidrogenação ao longo da glicólise e do ciclo de Krebs, e a estocagem de energia através da transformação das moléculas de ADP em moléculas de ATP, fundamentais para o funcionamento da máquina celular (manutenção, crescimento, síntese de produtos, transporte ativo, entre outros). Portanto, desde que se objetivem cultivos com elevadas velocidades de crescimento celular, o que significa altas velocidades de consumo de fontes de carbono, a fim de que ocorra a abundância de elétrons na cadeia respiratória e geração de ATP deverá haver também, necessariamente, quantidade suficiente de oxigênio dissolvido para que estes elétrons possam ser drenados ao final da cadeia (BAILEY & OLLIS, 1986).

2.4 Processos de Cultivo com Células Animais

Nos dias atuais, para assegurar a disponibilidade de células e a conservação das suas características, um banco celular da linhagem a ser cultivada é estabelecido. O método mais usado é a criopreservação em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. O descongelamento é um passo do processo que deve ser realizado com muito cuidado, pois pode provocar um alto grau de morte celular, se realizado de forma inadequada. Geralmente nessa etapa, as células são incubadas e propagadas em um sistema estático com frascos T ou garrafas de cultura descartáveis, uma vez que são desprovidos de qualquer sistema de monitoramento e controle. Placas de múltiplos poços com pequena capacidade também são utilizadas, porém o uso está mais restrito a atividades voltadas para a clonagem e seleção de células. Os sistemas em monocamadas têm várias limitações. A falta de mistura ocasiona gradientes de concentração de nutrientes e metabólitos, a transferência de oxigênio para o meio líquido é limitada pela pequena área de interface gás-líquido (CHICO *et al.*, 2007) e, em linhagens aderentes, como as CTMs, a falta de acompanhamento e controle das condições ambientais limita a produtividade do número de células (YU *et al.*, 2009).

Após a obtenção de uma massa celular maior ou confluência, a cultura celular deve ser dividida entre outros frascos equivalentes ou transferida para outros de capacidade maior. Para a transferência das células aderentes de um frasco para outro, elas são desprendidas mecanicamente e/ou utilizando enzimas, como a tripsina (CHICO *et al.*, 2007).

Durante a expansão em monocamadas, os procedimentos são laboriosos e requerem grande habilidade dos operadores, de maneira a manter a assepsia nos cultivos. Na tentativa de conseguir um ótimo crescimento celular e aumento de escala, intensificaram-se os estudos desde o início dos cultivos de células animais *in vitro* para obter um sistema fechado capaz de garantir a esterilidade, controle e monitoramento dos principais parâmetros de um processo (CHICO *et al.*, 2007). Como consequências práticas desses estudos, surgiram os biorreatores.

2.4.1 Tipos de Biorreatores

Um biorreator é definido como um dispositivo mecânico capaz de oferecer condições ambientais e fisiológicas favoráveis às necessidades da célula para o estudo da função celular ou para a produção em larga escala de células e, por consequência, de seus produtos provenientes do cultivo (GODARA *et al.*, 2008).

Os biorreatores devem assegurar o controle e o monitoramento de uma série de variáveis importantes na proliferação de linhagens celulares *in vitro*. Dentre elas, um ambiente físico-químico homogêneo para toda a população celular, o controle da temperatura, do equilíbrio ácido-base (pH) do meio de cultivo, da troca de gases (uma alimentação adequada de O₂, assim como a eliminação do excesso de CO₂), da manutenção da assepsia, do suprimento de nutrientes do meio de cultivo e de, quando for o caso, de um suporte para a adesão celular. Para obter muitas dessas condições em nível adequado, é necessário o emprego de sensores e malhas de controle para garantir uma proliferação celular eficiente e a obtenção do produto celular de interesse (CHICO *et al.*, 2007).

Uma das formas de classificar os tipos de biorreatores é de acordo com a homogeneidade do sistema. Os biorreatores, nos quais as células se encontram uniformemente suspensas na fase líquida são denominados homogêneos. Já aqueles onde as células não estão distribuídas uniformemente em todo o líquido, pois permanecem aderidas a uma superfície ou imobilizadas no interior de um leito biocompatível, são chamados de heterogêneos (CHICO *et al.*, 2007). A Tabela 5 lista diferentes tipos de biorreatores segundo a homogeneidade do sistema.

Tabela 5 – Classificação dos biorreatores segundo a homogeneidade do sistema (CHICO *et al.*, 2007).

Biorreatores	
Homogêneos	Heterogêneos
<ul style="list-style-type: none"> - biorreatores de tanque agitado - biorreatores air-lift - biorreatores de ondas (wave) - biorreator de vórtices de <i>Taylor-Couette</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - sistemas com microcarregadores - biorreatores de leito empacotado - biorreatores de leito fluidizado - biorreatores de fibras ocas - biorreatores com crescimento sobre superfície

Para o desenvolvimento de um sistema de cultivo com biorreator, é importante conhecer as demandas das células para obter um crescimento celular ótimo, que pode ser inibido pela escassez de nutrientes ou por excesso de metabólitos. (SCHOP *et al.*, 2008). A seguir, uma breve apresentação de alguns tipos de biorreatores será feita.

Biorreator de suspensão agitada

Também conhecido como biorreator de tanque agitado são equipamentos bastante utilizados na biotecnologia moderna para a produção em larga escala de vários bioprodutos. A maior parte dos produtos oriundos do cultivo de células animais em grande escala no mundo é produzida com esse biorreator. Em geral, são semelhantes aos fermentadores utilizados na fermentação submersa de microrganismos, sendo de projeto simples, em forma de tanque e, normalmente, providos de impelidores para efetuar a mistura do meio de cultura, juntamente com as células em suspensão (CHICO *et al.*, 2007).

Os biorreatores de suspensão agitada têm sido utilizados para cultivo de células com volumes variando de 2 a 10 000 L. (CHU & ROBINSON, 2001). Para uma escala menor, frascos spinner são amplamente utilizados na pesquisa em etapas iniciais do aumento de escala.

Nos biorreatores de suspensão agitada, os parâmetros básicos de um processo biotecnológico, como temperatura, pH, oxigênio dissolvido, dentre outros, são medidos e controlados utilizando dispositivos padrões disponíveis comercialmente (KRETZMER, 2002).

Biorreator de Ondas (Wave)

Consiste em duas partes principais: uma bolsa estéril de plástico flexível, na qual se cultivam as células e uma plataforma móvel controla a agitação, a temperatura e o pH do cultivo, sobre a qual a bolsa fica apoiada. A bolsa fornecida pelo fabricante já vem estéril e é descartável. Portanto, não é necessário limpar ou

esterilizar. Essas são características atrativas para fins produtivos, especialmente quando a escala de produção não é muito grande (CHICO *et al.*, 2007).

A plataforma agitada gera ondas que asseguram a transferência de oxigênio, e uma boa distribuição de nutrientes e suspensão de células. Esse método de agitação evita o surgimento de zonas mortas e favorecem condições de baixas tensões de cisalhamento (SINGH, 1999).

Biorreator Air-Lift:

É caracterizado pela elevada razão altura/diâmetro e pela geometria envolvendo dois cilindros concêntricos. Na região central inferior, há um borbulhador que injeta a corrente de ar para a oxigenação no biorreator. O gás sob pressão e gera bolhas que resultam em uma região de baixa densidade no interior do tubo central. Quando essas bolhas ascendem, fazem o líquido circular para cima pela região interna do cilindro e descer pela região anular entre os dois cilindros, fazendo a oxigenação de forma efetiva pelo contato da suspensão de células com as bolhas ascendentes. Pode funcionar a uma capacidade relativamente limitada de ampliação de escala, sendo descritos biorreatores deste tipo de até 5.000 L (CHICO *et al.*, 2007). Um problema que limita o uso do *air-lift* para o cultivo de células animais é o índice elevado de morte celular devido ao rompimento das bolhas de ar na superfície do líquido.

Biorreator de Fibra Oca (Hollow Fiber)

O biorreator de fibra oca é recomendado para escalas de pequeno porte. O núcleo consiste em um cilindro que contém centenas de membranas semipermeáveis na forma de capilares, conhecidas como fibras ocas. Fabricadas de diversos materiais, as fibras possuem um caráter poroso que permite a troca de nutrientes e metabólitos. As células são inoculadas no espaço exterior às fibras e crescem nessa região. O meio de cultivo é bombeado através do espaço interior das fibras transportando nutrientes, metabólitos e produtos de interesse. Antes de passar pelo interior das fibras, o meio é enriquecido em O₂ o que pode ser feito por tanques

de agitação/aeração posicionados em um circuito externo de recirculação (CHICO *et al.*, 2007).

A Figura 3 mostra alguns exemplos de biorreatores:



Figura 3 - Exemplos de alguns biorreatores para o cultivo de células animais.

Biorreator de vórtices de Taylor-Couette

O biorreator de vórtices de *Taylor-Couette* é um tipo de sistema de cultura rotatório. Ele consiste de dois cilindros axiais, onde o cilindro externo permanece parado e o fluido no espaço anular entre os dois cilindros é movimentado pela rotação do cilindro interno (WANG *et al.*, 2005).

Esse biorreator oferece uma diminuição considerável das forças de cisalhamento decorrentes da agitação do meio de cultivo. Além disso, essa força pode ser facilmente calculada devido a geometria do equipamento.

Sistemas com 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 e colágeno ou gelatina (CHICO *et al.*, 2007). Podem ser classificados como microporosos (diâmetro do poro menor que 1 μm), permitindo o crescimento celular apenas na superfície externa, ou macroporosos, permitindo a proliferação celular na superfície interna (diâmetro do poro de 10-50 μm) (FERNANDES *et al.*, 2007). A Figura 4 mostra um exemplo do microcarregador microporoso Cytodex 1 utilizado no cultivo de CTMs derivadas da medula óssea suína. Já a Figura 5 mostra uma imagem apenas do microcarregador macroporoso Cytopore.

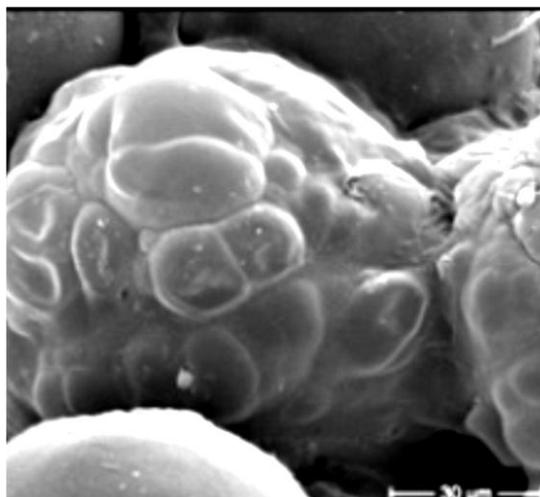


Figura 4 – Imagem de microscopia eletrônica (MEV) do cultivo de células-tronco mesenquimais da medula óssea suína com o microcarregador Cytodex 1 após 14 dias de expansão em frasco spinner (FRAUENSCHUH *et al.*, 2007).

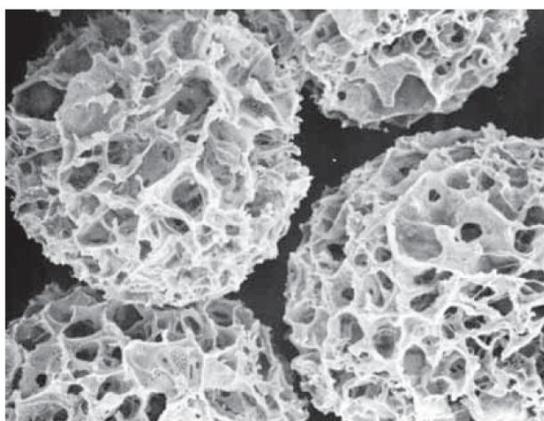


Figura 5 - Imagem de microscopia eletrônica (MEV) do microcarregador macroporoso Cytopore (GE HEALTHCARE, 2005).

Desde sua introdução em 1967 por van Wezel, os microcarregadores têm sido aplicados para a produção farmacêutica, principalmente de vacinas, pela expansão de populações de células dependentes de ancoramento. Uma grande variedade de microcarregadores comerciais está disponível diferenciando-se pela composição química, carga elétrica, revestimento superficial e porosidade (SCHOP *et al.*, 2008).

Os microcarregadores são utilizados em biorreatores de leito fluidizado e em biorreatores de suspensão agitada. Em leito fluidizado, uma dada quantidade de microcarregadores é fechada em um compartimento em decorrência da circulação do meio de cultivo. A oxigenação do meio se dá fora da região de fluidização, evitando danos às células aderidas decorrentes da explosão das bolhas (CHICO *et al.*, 2007). Em sistemas agitados, os microcarregadores já colonizados permanecem em suspensão e podem ser separados do meio de cultivo por simples sedimentação ou por filtração (GODARA *et al.*, 2008).

2.4.2 Modos de Operação dos Biorreatores

Dependendo de como os nutrientes são fornecidos para as células, os biorreatores podem ser operados de diferentes maneiras: cultivo descontínuo (batelada), cultivo descontínuo alimentado (batelada alimentada), cultivo contínuo e cultivo contínuo com retenção de células também conhecido como perfusão.

Descontínuo (Batelada)

O modo de operação descontínuo em batelada é o mais simples de ser executado. É utilizado nos frascos de cultivo estacionário, nos frascos agitados e em biorreatores de suspensão agitada de pequeno e médio volume para a propagação do inóculo. Em batelada não há suplemento adicional de substrato após a inoculação das células. O volume é mantido constante ao longo de todo o processo. Devido à baixa solubilidade do O₂, este deve ser suprido continuamente e não como os demais nutrientes. O controle do pH é feito por adição de base ou variando a concentração de dióxido de carbono na fase gasosa (CHICO *et al.*, 2007).

Batelada alimentada

A diferença desse modo para o de batelada reside no fato de administrar-se um ou mais nutrientes durante o cultivo, para repor aqueles consumidos pelas células.

A alimentação dos nutrientes pode ser executada utilizando diferentes estratégias: desde adições em pulsos, adições segundo perfis escalonados, adições a vazão constante, até estratégias mais sofisticadas que seguem um perfil de vazão exponencial na tentativa de altas densidades celulares (CHICO *et al.*, 2007).

Cultivos Contínuos

O cultivo contínuo caracteriza-se pela contínua adição do meio de cultura fresco e remoção do meio cultivado contendo células. Ambas as operações ocorrem a mesma vazão, de tal forma que se mantém o volume do biorreator constante (CHICO *et al.*, 2007).

Cultivos contínuos com retenção de biomassa

Também conhecido como perfusão, é o modo de cultivo mais produtivo e ao mesmo tempo o mais complexo. As células são retidas dentro do biorreator empregando-se um dispositivo de retenção celular. Assim é possível resolver a maior limitação do sistema contínuo que é a reduzida produtividade decorrente da perda de células na saída do biorreator (CHICO *et al.*, 2007).

Perfusão contínua com meio fresco ou reciclado aumenta a disponibilidade de oxigênio para as células. Também melhora o desempenho da cultura, aumentando os nutrientes e substituindo subprodutos metabólicos que são inibitórios (KING & MILLER, 2007).

2.4.3 Aeração e Agitação

Um dos maiores obstáculos no aumento de escala de biorreatores é satisfazer a alta demanda de oxigênio de culturas com altas densidades celulares.

O oxigênio é pouco solúvel em meio aquoso na temperatura do cultivo. Isso implica que o O₂ deve ser fornecido aos cultivos, de modo a garantir que os níveis de oxigênio dissolvido no meio permaneçam em uma faixa compatível com a manutenção da viabilidade celular. Diferentes métodos são empregados no cultivo de células animais: aeração superficial, aeração por membranas ou tubos gás-permeáveis e a aeração por borbulhamento (CHICO *et al.*, 2007).

A agitação tem outras funções em um biorreator: 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 O₂. A agitação mecânica pode causar morte celular ocasionada pelo impelidor, elemento de agitação (CHICO *et al.*, 2007).

As células isoladas em suspensão ou na superfície de microcarregadores estão expostas ao estresse hidrodinâmico causado pelo cisalhamento nos biorreatores agitados. O estresse hidrodinâmico aumenta com o aumento do diâmetro do impelidor e com a presença de sondas ou outros elementos internos que perturbam os padrões de fluxo radial do líquido. Também depende da geometria e da localização do impelidor. Diferentes tipos de células-tronco têm diferentes tolerâncias à tensão de cisalhamento quando cultivadas em biorreatores com movimentação ou agitação do líquido (KING & MILLER, 2007).

2.4.4 Cultivos com Células-Tronco

No cultivo convencional *in vitro*, as CTs são expandidas em monocamadas. Essas células não se diferenciam espontaneamente mesmo com sucessivas passagens, desde que cultivadas em condições adequadas. Com o rápido desenvolvimento tecnológico, sistemas de cultivo convencionais não puderam

acompanhar as crescentes demandas das novas aplicações em cultivo de células sendo necessário buscar alternativas que permitam uma melhor homogeneidade, um controle mais rigoroso e uma maior produtividade celular (YANG *et al.*, 2007).

As culturas em suspensão homogênea com microcarregadores em frasco spinner têm sido extensivamente utilizadas. A área superficial, o tamanho dos microcarregadores, a adesão celular e a propagação de células são todos os fatores críticos que podem modular a adesão celular e, finalmente, o seu potencial de expansão (YANG *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, o sistema de cultivo em suspensão homogênea com microcarregadores em frasco spinner agitado tem sido utilizado para a expansão de células-tronco embrionárias de camundongos (ABRANCHES *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2007) e, principalmente, de CTMs de diversas espécies e de diferentes fontes (EIBES *et al.*, 2010; FRAUENSCHUH *et al.*, 2007; SCHOP *et al.*, 2008; WEBER *et al.*, 2007, YANG *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2009). A Tabela 6 apresenta alguns cultivos com microcarregadores utilizados na expansão de CTMs em frasco spinner.

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

	WEBER <i>et al.</i> , 2007	SCHOP <i>et al.</i> , 2008	FRAUENSCHUH <i>et al.</i> , 2007	EIBES <i>et al.</i> , 2010
Tipo de célula	CTMs ^a	CTMs ^a	CTMs ^a	CTMs ^a
Origem	medula óssea	medula óssea	medula óssea	medula óssea
Espécie	humanos	cabras	suínos	humanos
Meio de cultura	EMEM 10% SFB ^b	α-MEM 10% SFB	DMEM 10% SFB	MesenPRO RS TM 2% SFB
Microcarregador	Cytodex 1	Cytodex 1	Cytodex 1	Cultispher S
Concentração de microcarregador (g/L)	7,36	2,3	4,2	2
T (°C) e %CO₂	37 e 5	37 e 5	37 e 5	37 e 5
Agitação	30 rpm	30 rpm	20 rpm	-
Fator de expansão	2	6	3,6	8,4

^a Células-Tronco Mesenquimais e ^b Soro Fetal Bovino

No cultivo de células-tronco em microcarregadores, dependendo da aplicação terapêutica das células, um dos fatores relevantes é o estudo da recuperação das células do suporte (WEBER *et al.*, 2007). Entretanto, estudos com o propósito de dispensar a separação das CTMs do microcarregador também foram realizados com o uso direto em transplante para corrigir lesões ósseas em ratos sendo observada uma indução da regeneração óssea (YANG *et al.*, 2007).

As pesquisas baseadas no cultivo de células-tronco buscam selecionar um ou mais tipos de microcarregadores e condições experimentais que possibilitem a expansão e posterior recuperação das células no final do cultivo, preservando o seu potencial de diferenciação. Os trabalhos científicos citados na Tabela 6 que utilizaram o Cytodex 1 nos cultivos revelaram algumas vantagens e desvantagens desse microcarregador. Sua matriz catiônica favorece, principalmente, a atração eletrostática com a membrana celular, o que implica diretamente na eficiência de adesão (FRAUENSCHUH *et al.*, 2007). Uma vez aderidas e com suprimento de nutrientes, as células têm condições de proliferar sendo possível a expansão celular nesse microcarregador (SCHOP *et al.*, 2008). No entanto, segundo Weber *et al.* (2007) a recuperação das CTMs do Cytodex 1 não ocorre após a utilização de métodos enzimáticos tradicionais, razão importante e suficiente para questionar a utilidade desse microcarregador no cultivo dessas células.

A utilização o soro fetal bovino (SFB) também é uma preocupação estudada no cultivo de células-tronco (BERNARDO *et al.* 2007; FERNANDES *et al.* 2007; NIMURA *et al.*, 2008). O SFB desempenha um papel fundamental no cultivo celular (FRAUENSCHUH *et al.*, 2007). As proteínas da matriz extracelular, como fibronectina, laminina e vitronectina são adsorvidas do soro e podem fornecer os requisitos necessários para a proliferação celular (GODARA *et al.*, 2008). As características do SFB são rotineiramente pré-selecionadas para garantir tanto o crescimento ótimo de células-tronco quanto a biossegurança do produto celular. Apesar disso, o uso do soro fetal bovino levanta algumas preocupações quando utilizado em preparações celulares de grau clínico. A administração de produtos de origem animal, teoricamente, poderia causar a transmissão de príões ou zoonoses ainda não identificadas. Além disso, proteínas ou peptídeos bovinos podem ser incorporados pelas células durante procedimentos de cultivo e causar reações imunológicas no hospedeiro (BERNARDO *et al.*, 2007).

Diversos países têm legislado advertências e restrições à utilização clínica de produtos de terapia celular preparados na presença de SFB. Produtos derivados de plaquetas ganharam o interesse clínico devido à sua eficácia no aumento da regeneração óssea e cicatrização de tecido. O Lisado de Plaquetas (LP) é um concentrado de fatores de crescimento de plaquetas humanas em um pequeno volume de plasma, obtidos por lise das plaquetas por meio de choque térmico e, portanto, LP contém todos os fatores de crescimento fundamentais que são secretados por plaquetas para iniciar a cicatrização de feridas (BERNARDO *et al.*, 2007).

Outro fator relevante é a utilização das boas práticas de manufatura (*Good Manufacture Practice*) como demandam os órgãos reguladores para garantir que o sistema de cultivo seja seguro, reprodutível e eficiente. No mínimo, o controle de qualidade das células deve incluir o fenótipo, o potencial funcional, a segurança microbiológica e a garantia de que a cultura celular permaneça indiferenciada (SENSEBÉ, 2002)

Os estudos bem sucedidos com células-tronco no tratamento de diversas doenças permitem dar continuidade ao aprimoramento das técnicas já utilizadas para obter com segurança o potencial terapêutico dessas células na imunoterapia e na medicina regenerativa (SENSEBÉ, 2008).

Desafios futuros incluem o desenvolvimento de condições ótimas de cultivo para diversos tipos de célula-tronco e o desenvolvimento de sistemas que tornem possível acompanhar, controlar, reproduzir e automatizar os processos de cultivo de forma rentável para gerar um grande número de células com elevada pureza (FRAUENSCHUH *et al.*, 2007; KING & MILLER, 2007; SCHOP *et. al*, 2008).

2.5 Considerações Gerais sobre a Revisão Bibliográfica

No cultivo de células-tronco, diferentemente da maioria dos cultivos de células animais onde o interesse envolve a recuperação de um produto de interesse no final do processo, a preocupação é obter maiores valores de número considerável de células saudáveis e, principalmente, não diferenciadas para aplicações na medicina regenerativa.

Atualmente, o projeto e a construção de biorreatores destinados ao cultivo de células-tronco são de grande interesse na Engenharia Química com o intuito de aperfeiçoar as condições de cultivo. Para tanto, será necessário aliar os conhecimentos já adquiridos nos cultivos de células animais em larga escala com as necessidades especialmente requeridas pelas células-tronco em cultura.

A análise da literatura mostrou que nos últimos cinco anos grandes progressos têm sido adquiridos no desenvolvimento de técnicas de cultivo e expansão de CTMs utilizando biorreatores com microcarregadores suspensos no meio de cultura por agitação. Apesar dos avanços, ainda há uma carência de conhecimentos para obtermos cultivos com alto rendimento celular e de qualidade terapêutica. Contudo, o presente trabalho pretende colaborar com a aquisição de mais conhecimentos para o desenvolvimento de uma tecnologia multidisciplinar adequada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, primeiramente, serão apresentados os materiais e os métodos e, em seguida, as metodologias utilizadas nesta pesquisa.

3.1 Materiais

3.1.1 Linhagem Celular

A linhagem utilizada foi de células-tronco mesenquimais derivada da medula óssea humana (*human Mesenchymal Stem Cells - hMSC*), imortalizada por expressão da transcriptase reversa da telomerase (*Telomerase Reverse Transcriptase - 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 (MIHARA et al., 2003). Essa linhagem é considerada uma célula modelo, no sentido de que uma pequena ou nenhuma alteração em seus atributos ocorre em um número crescente de passagens (WEBER et al., 2007). Isto permitiu uma comparação entre os resultados experimentais com as células expandidas de passagem diferentes o que seria difícil fazer com uma linhagem ainda não estabelecida.

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

3.1.2 Meios de Cultura

O meio de cultura utilizado na expansão das CTMs foi o α -MEM (*Minimum Essential Medium*). A Tabela 7 apresenta os componentes utilizados para a preparação do meio de cultura suplementado.

Tabela 7 – Meio de cultura e os suplementos utilizados no cultivo de CTMs no presente trabalho.

Componentes	Quantidade	Fabricante
α -MEM em pó	10,2 g	GIBCO, EUA
Soro fetal bovino caracterizado	150 mL	HyCLone, EUA
Hepes (1M)	11 mL	GIBCO, EUA
Bicarbonato de sódio	2,2 g	CULTILAB, Brasil
Penicilina e Streptomina	10 mL	GIBCO, EUA
Água ultrapura	1000 mL	MILLIPORE, Alemanha

Foi também utilizado o meio de cultura líquido α -MEM (CULTILAB, Brasil), sem o indicador vermelho de fenol, nas análises de densidade celular pelo método do MTT e durante os cultivos em frascos T de 25 cm² na presença da enzima tryple.

3.1.3 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 8 apresenta a composição do PBS.

Tabela 8 - Solução de PBS preparada no laboratório e utilizada nesta pesquisa.

Componente	Quantidade
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
Água purificada no sistema Mili-Q	1000 mL

3.1.4 Microcarregadores

Nos cultivos em frasco spinner, foram testados dois diferentes tipos de microcarregadores: Cytodex 1 e o Cultispher S.

O microcarregador Cytodex 1 (GE Healthcare, Reino Unido), não poroso, possui uma estrutura formada por ligações cruzadas de dextrana

preenchidas com grupos N-N-dietilaminoetil com cargas positivas (Figura 6) distribuídas por toda a superfície da microesfera, proporcionando uma boa adesão das células por atração eletroestática, já que a carga da superfície celular é predominantemente negativa.

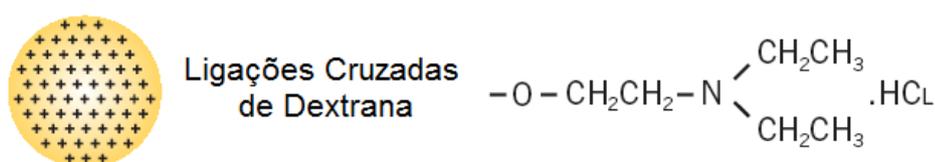


Figura 6 – Representação do microcarregador Cytodex 1 (GE HEALTHCARE, 2005)

As características físicas do microcarregador Cytodex 1 estão apresentadas na Tabela 9, com base nas informações fornecidas pelo fabricante.

Tabela 9 - Características do microcarregador Cytodex 1 (GE HEALTHCARE, 2005).

Características	Valor
Densidade (g/mL)	1,03
Diâmetro (µm)	131-220
Área aproximada (cm ² /g de massa seca)	4.400
Número aproximado de microcarregadores/g de massa seca	6,8x10 ⁶
Fator de hidratação em 0,9% de NaCl (mL/g de massa seca)	18

O Cultispher S (Percell Biolytica, Suécia) é um microcarregador macroporoso com matriz de gelatina que pode ser dissolvida com enzimas proteolíticas resultando na recuperação de células viáveis. As características físicas do microcarregador Cultispher S estão apresentadas na Tabela 10, com base nas informações fornecidas pelo fabricante.

Tabela 10 – Características do microcarregador Cultispher S.

Características	Valor
Densidade (g/mL)	1,04
Diâmetro (µm)	130-380
Número aproximado de microcarregadores/g de massa seca	8,0x10 ⁵
Média do diâmetro de poro (µm)	20

3.1.5 Enzimas de Dissociação Celular

As enzimas utilizadas para a dissociação celular foram a tripsina (Gibco, EUA), a tryple select (Gibco, EUA) e a hyalozima (APSEN, Brasil). A tripsina é uma protease de origem animal. A solução contém 5 g.L⁻¹ de tripsina, 2 g.L⁻¹ de EDTA e 8,5 g.L⁻¹ de NaCl. A tryple Select é uma enzima recombinante, com 1 mM de EDTA, obtida por fermentação microbiana. E a hyalozima é um medicamento de uso farmacêutico que contém 400 UTR.mL⁻¹ de hialuronidase, uma enzima de origem animal que despolimeriza o ácido hialurônico localizado no interstício celular.

3.1.6 Corante

A solução aquosa de azul de tripan 0,4% (v/v) (GIBCO, EUA) foi utilizada para determinar a densidade e a viabilidade celular na câmara de Neubauer.

3.1.7 Reagente MTT

O kit baseado no MTT ou Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (SIGMA-ALDRICH, EUA) e (GIBCO, EUA) foi utilizado para determinar indiretamente a densidade celular dos cultivos em frasco spinner, por espectrofotometria, em função da atividade mitocondrial das células vivas.

3.1.8 Reagente Lactato Desidrogenase (LDH)

O kit baseado na LDH (SIGMA-ALDRICH, EUA) foi utilizado para determinar indiretamente a densidade celular do cultivo em frasco T na presença da enzima Tryple (E4), por espectrofotometria, em função da quantidade de LDH citoplasmática liberada no meio de cultivo proveniente de células lisadas.

3.1.9 Silicone

O sigmacote (SIGMA-ALDRICH, EUA) é um composto a base de silicone que forma um filme neutro e hidrofóbico na superfície dos vidros. Por isso, foi utilizado para impedir a adesão dos microcarregadores nas paredes do frasco spinner.

3.1.10 Filtros

Tabela 11 - Filtros utilizados para a preparação do meio de cultura e de amostras para análises.

Análise	Descrição	Fabricante
aminoácidos	dispositivos de ultrafiltração Amicon com membrana branca em celulose regenerada	MILLIPORE, Alemanha
glicose e ácido láctico	membrana HA branca em éster de celulose com 0,45 µm de poro e 13 mm de diâmetro	MILLIPORE, Alemanha
filtração de células	Cell Strainers de polipropileno e nylon com 100 µm de poro	BD Biociences, EUA
filtração do meio de cultura	membrana GS branca em éster de celulose com 0,22 µm de poro e 142 mm de diâmetro	MILLIPORE, Alemanha
suplementação do meio de cultura	MILLEX-GP com membrana em polietersulfona assimétrica com 0,22 µm de poro, estéril e 33 mm de diâmetro	MILLIPORE, Alemanha

3.1.11 Frascos de Cultura

Foram utilizados frascos de cultura celular (frascos T) com área superficial de 25 cm² e de 75 cm² de poliestireno (TPP, EUA) para a expansão de células em cultura estática, e frasco spinner de 100 mL (BELLCO, EUA) para os cultivos com microcarregador.

3.2 Equipamentos

3.2.1 Câmara Asséptica

Foi utilizada a câmara asséptica Sterilgard III de fluxo laminar, classe II, da Baker Company (EUA), modelo SG403/SG603, provida de lâmpada germicida UV.

3.2.2 Incubadora de CO₂

A incubadora da Shellab (EUA) forneceu um ambiente controlado e umidificado, com controle de porcentagem de CO₂ na atmosfera e de temperatura para os cultivos nos frascos T e no frasco spinner.

3.2.3 Microscópios Óticos

Para utilização dos métodos de determinação da densidade celular na suspensão foi utilizado o microscópio modelo BX51. Para analisar o crescimento celular nos frascos T foi utilizado o microscópio invertido modelo CK30. Já as imagens dos microcarregadores foram obtidas no microscópio modelo BX50 com câmara acoplada da Sony CCD-IRIS e o software utilizado foi o *Image Pro Plus* versão 3.0.00.00 para Windows 95. Os três microscópios são da marca Olympus (Japão).

3.2.4 Câmara de Neubauer ou Hemacitômetro

A câmara de Neubauer (BOECO, Alemanha) foi utilizada para a determinação da densidade celular nos frascos T e na suspensão nos cultivos no frasco spinner.

3.2.5 Centrífugas

Para a centrifugação utilizando frascos tipo falcon de 15 mL, foi utilizada a centrífuga Excelsa Baby I, modelo 206, da FANEM (Brasil) e, para frascos tipo falcon de 50 mL, a centrífuga Spin VI da Incibrás (Brasil).

3.2.6 Medidor de pH

O medidor da Denver (EUA), modelo UB10, foi utilizado para medir o pH das soluções e do meio de cultivo.

3.2.7 Espectrofotômetros de Microplacas

Para obter o valor da absorbância das amostras obtidas pelo método do MTT, foi utilizada a leitora de microplacas MRX TC da Dynex Technologies (EUA), com filtro de 595 nm, nos cultivos com o microcarregador Cytodex 1. Já no cultivo com o Cultispher S e no método da LDH, foi utilizada a leitora de microplacas Multiskan FC da Thermo Scientific (EUA) com filtro de 570 nm e 492 nm, respectivamente. Todas as análises foram feitas em microplacas de 96 poços (CORNING, EUA).

3.3 Métodos

3.3.1 Determinação da Densidade Celular e da Viabilidade em Suspensão

A densidade celular e a viabilidade em suspensão foram determinadas através do método de exclusão do corante azul de tripan utilizando solução aquosa 0,4% (v/v) por contagem em duplicata na câmara de Neubauer (DOYLE & GRIFFITHS, 1998).

3.3.2 Recuperação das Células do Microcarregador Cultispher S

A recuperação das células do microcarregador Cultispher S durante o cultivo foi obtida depois do tratamento das amostras com solução contendo Tripsina e Tryple. Para cada enzima, 1 mL de amostra foi centrifugado a 1150 rpm por 4 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os microcarregadores foram lavados uma vez com 1 mL da solução de PBS. A amostra foi centrifugada, novamente, nas mesmas condições. Depois, a solução de PBS também foi descartada e os microcarregadores foram ressuspensos em solução com Tripsina ou Tryple. A matriz de gelatina do Cultispher S foi desintegrada após o tratamento por 30 minutos a 37°C no banho termostático. Ocasionalmente, uma agitação manual foi aplicada. Após esse período, as células em suspensão foram quantificadas através do método de exclusão pelo corante azul de tripan (0,4% v/v).

3.3.3 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 um dia antes de iniciar um experimento de expansão de CTM. As curvas de calibração utilizadas nos experimentos realizados são mostradas no Apêndice A.

Uma solução de MTT foi adicionada nas amostras que foram, em seguida, homogeneizadas e colocadas na incubadora de CO₂ 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. A Figura 7 apresenta a reação envolvida no método descrito.

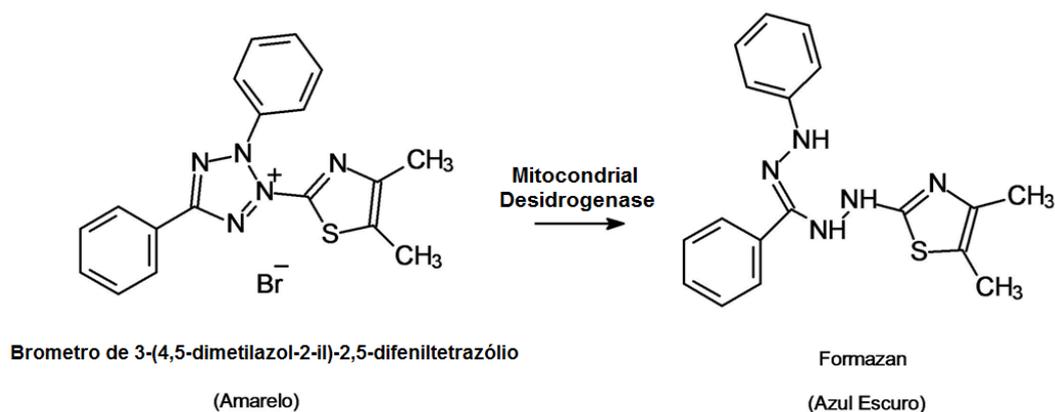


Figura 7 - Representação da reação enzimática em que se fundamenta o método do MTT.

3.3.4 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 dessas curvas estão apresentados no Apêndice A. Em amostras do sobrenadante, foram adicionados alíquotas iguais de solução de ácido láctico, de NAD^+ e de cloreto de tetrazólio provenientes do kit da Sigma. Nas reações, o NAD^+ 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 8 mostra as reações enzimáticas envolvidas no método descrito.

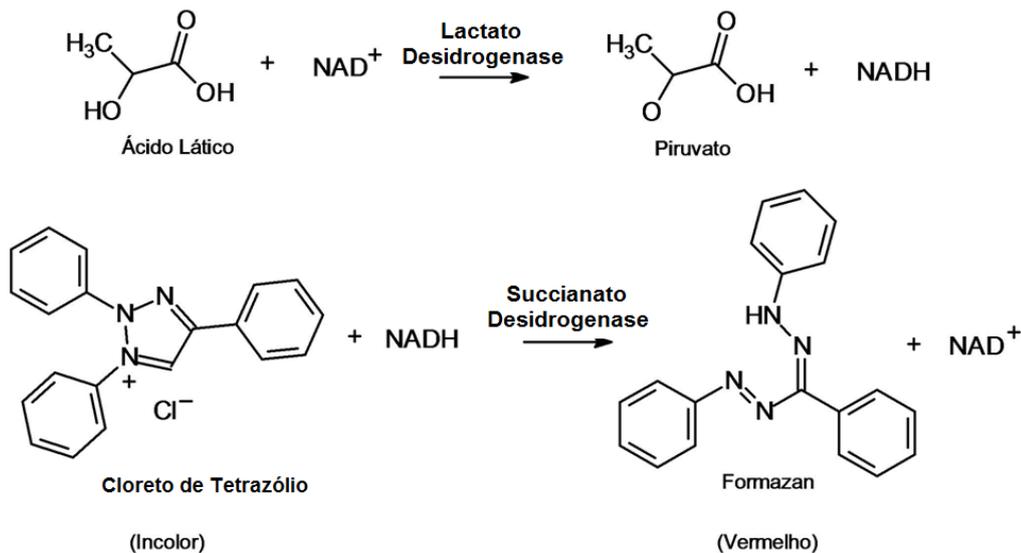


Figura 8 - Representação das reações enzimáticas envolvidas no método da LDH.

3.3.5 Determinação da Densidade de Células Aderidas

A expressão densidade de células aderidas refere-se apenas às análises de células aderidas nos microcarregadores.

Após a aplicação da metodologia do MTT, para determinar as células totais nas amostras, os microcarregadores, separados por centrifugação, foram ressuspensos em água destilada e a amostra foi filtrada. A membrana foi secada em estufa a 60 °C por aproximadamente 18 horas e, em seguida, colocada no dessecador por 40 minutos. Então, foi pesada para posteriormente ser feita a correção do valor da densidade celular total pelo método de massa seca (Apêndice B). No final, desse resultado, foi subtraído o valor da densidade celular obtido na suspensão para, então, obter o resultado apenas para as células aderidas.

3.3.6 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 & Meredith (1984). Uma coluna pico-tag (Waters, Irlanda) foi utilizada como fase estacionária e como eluente um gradiente

constituído por duas fases móveis A e B. A fase A continha acetato de sódio tri-hidratado, trietilamina, água deionizada e acetonitrila. A fase B apenas água ultrapura e acetonitrila. As condições de operação do CLAE 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 e diluição em tampão antes da injeção no equipamento. Uma curva padrão foi preparada para cada aminoácido a partir de uma solução padrão. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.3.7 Análise de Glicose e de Ácido Lático

Durante os cultivos em frasco spinner, também foram separadas amostras do sobrenadante para posteriores análises de glicose e de ácido lático.

As análises também foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando uma coluna Aminex HPX-87H da Bio-Rad e H₂SO₄ 0,005 M como eluente. O CLAE foi operado na temperatura de 65^oC e vazão de 0,6 mL.min⁻¹.

Uma curva de calibração foi preparada a partir de uma solução padrão contendo glicose e ácido lático. As amostras do sobrenadante dos cultivos foram diluídas em H₂SO₄ 0,005 M para ficarem na faixa de concentração da curva padrão. Depois, foram filtradas em membranas de éster de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro. As concentrações de ácido lático foram detectados em um comprimento de onda de 210 nm, e as de glicose em índice de refração.

3.3.8 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.

3.3.9 Análise de Citometria de Fluxo

As células recuperadas do microcarregador Cultispher S, após o cultivo em frasco spinner, foram descongeladas e cultivadas em frasco T até atingir 80% de confluência. Em seguida, foram desaderidas do frasco de cultura com Tryple e divididas em alíquotas de 100 μ L de PBS com 2×10^5 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 ressuspendidas em PBS para análise no citômetro de fluxo (FASCalibur BD, EUA) utilizando o software *CELLQuest™*.

3.3.10 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 4×10^4 células por poço com o meio de cultura α -MEM suplementado com 7,5% (v/v) de SFB e 1% (v/v) de solução contendo penicilina/streptomicina. Apenas 7 poços foram utilizados: 3 para a indução em osteócitos, 2 em adipócitos e 2 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 CO₂.

O cultivo foi dividido em 3 fases: adesão, pré-indução e diferenciação propriamente dita. Na Tabela 12 estão representadas as condições utilizadas em cada fase.

Tabela 12 – Etapas para avaliar a capacidade de diferenciação da linhagem hMSC-TERT em osteócitos e adipócitos após o cultivo em frasco spinner.

	adesão	pré-indução	diferenciação
duração	24 horas	10 dias	14 dias
suplementação do meio de cultura	-	osteócitos: 10^{-8} M de dexametasona e 50 mM de ácido ascórbico-2-fosfato; adipócitos: 10^{-8} M de dexametasona e 5 μ M de rosiglitazona;	osteócitos: 2 mM de β -glicerolfosfato; adipócitos: 2,5 mg.mL ⁻¹ de insulina;
troca de meio de cultivo	-	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.

3.3.11 Tratamento com Tryple de todos os Microcarregadores do Cultivo

No experimento E6, foram realizados dois tratamentos com Tryple em todos os microcarregadores colonizados do cultivo. Após 4 e 10 dias de cultivo, todo o volume de meio, contendo microcarregadores colonizados, foi retirado do frasco spinner e transferido para tubos tipo falcon de 50 mL. Em seguida, foi aplicada uma centrifugação de 1150 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a amostra foi ressuspensa em solução de PBS, no mesmo volume retirado. Novamente, uma centrifugação foi aplicada, nas mesmas condições que a anterior, o sobrenadante foi descartado e a amostra foi ressuspensa em Tryple, no mesmo volume retirado. Depois, a amostra foi colocada no banho termoestático a 37°C por 15 minutos. Ocasionalmente, uma agitação manual foi aplicada. Após esse período, a amostra foi centrifugada, nas mesmas condições anteriores, e ressuspensa em meio de cultura fresco contendo microcarregadores novos no volume desejado. Uma amostra foi retirada para a quantificação celular. Por fim, uma nova inoculação foi realizada no frasco spinner que foi colocado, novamente, na incubadora de CO₂ a 37°C e uma nova fase para a adesão foi aplicada durante 6 horas.

3.3.12 Procedimento Experimental

Para realização de um experimento visando expansão da hMSC-TERT, foi realizado o procedimento experimental representado na Figura 9.

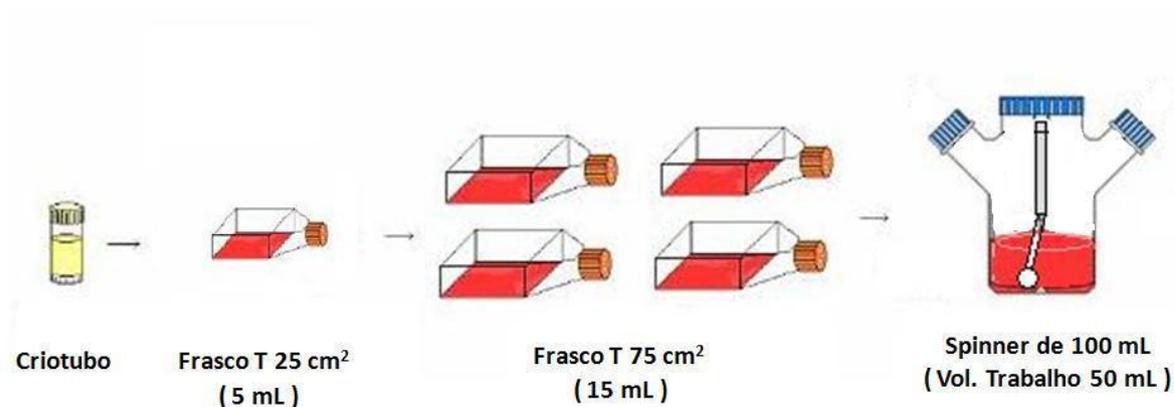


Figura 9 – Representação esquemática dos procedimentos utilizados nos cultivos com a linhagem hMSC-TERT para experimentos em frascos T e em frasco spinner.

As células, mantidas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e expandidas em frascos T de 25 cm² de área para o crescimento, mantidos em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂. Após atingir, aproximadamente, 80% de confluência, as células foram lavadas com solução de PBS e desaderidas da superfície do frasco T com solução de tripsina. Depois, foram inoculadas em frascos T maiores, com área de 75 cm². Conforme a confluência requerida era atingida, novos frascos T eram preparados até obter um número de células suficiente para a inoculação do frasco spinner. O crescimento celular nos frascos T foi acompanhado pela observação no microscópio ótico da confluência das células e a quantificação celular, obtida após a desadesão das células, foi obtida utilizando o método de exclusão do corante azul de tripan (descrito no item 3.3.1).

Depois de obtido um número suficiente, as células foram inoculadas no frasco spinner contendo o meio de cultura e o microcarregador devidamente preparado para o cultivo. As etapas de preparação dos dois tipos de microcarregadores, como hidratação, lavagem e esterilização, foram feitas de acordo com as instruções de cada fabricante. Além disso, antes da inoculação, o meio de cultura foi colocado na incubadora a 37°C, sob 50 rpm de agitação e com

12-14% de CO₂, dependendo do experimento, por aproximadamente 18 horas para estabilizar o pH entre 7,2 e 7,4.

Os cultivos em spinner foram divididos em duas fases: a fase para a adesão e a fase para a expansão celular. Na fase para a adesão, as condições experimentais foram peculiares a cada experimento e a agitação foi mantida intermitente para aumentar o tempo de contato entre as células e os microcarregadores, visando facilitar o processo de adesão. Já na fase para a expansão, a agitação foi mantida constante e foi realizada a troca de 50% do volume de trabalho, a partir de 48 horas, com o objetivo de evitar o esgotamento de nutrientes e de diluir os metabólitos considerados tóxicos (amônia e ác. láctico).

Para acompanhar o desenvolvimento do cultivo durante a fase para a expansão, foram retiradas amostras diariamente para verificar o pH, separar o sobrenadante para posteriores análises dos nutrientes e metabólitos e para a quantificação celular. As células livres em suspensão foram quantificadas utilizando o método de exclusão pelo corante azul de tripan (vide item 3.3.1). Já para as células aderidas a quantificação foi determinada de acordo com o tipo de microcarregador. Nos cultivos com Cytodex 1, foi aplicada a metodologia do MTT (vide item 3.3.3) e em um dos cultivos com o Cultispher S (vide item 4.5), além do MTT, foram aplicadas outras duas metodologias com as enzimas Tripsina e Tryple (vide item 3.3.2). Imagens de microscopia ótica foram feitas após a análise de amostras com microcarregadores dos cultivos. A Figura 10 apresenta um diagrama de fluxo do tratamento das amostras com os microcarregadores Cytodex 1 e Cultispher S.

Após o término de cada cultivo em spinner, análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em amostras do sobrenadante para quantificar os aminoácidos, a glicose e o ácido láctico (vide itens 3.3.6 e 3.3.7). Já a concentração de amônia foi obtida através de análises em um eletrodo íon seletivo (vide item 3.3.8).

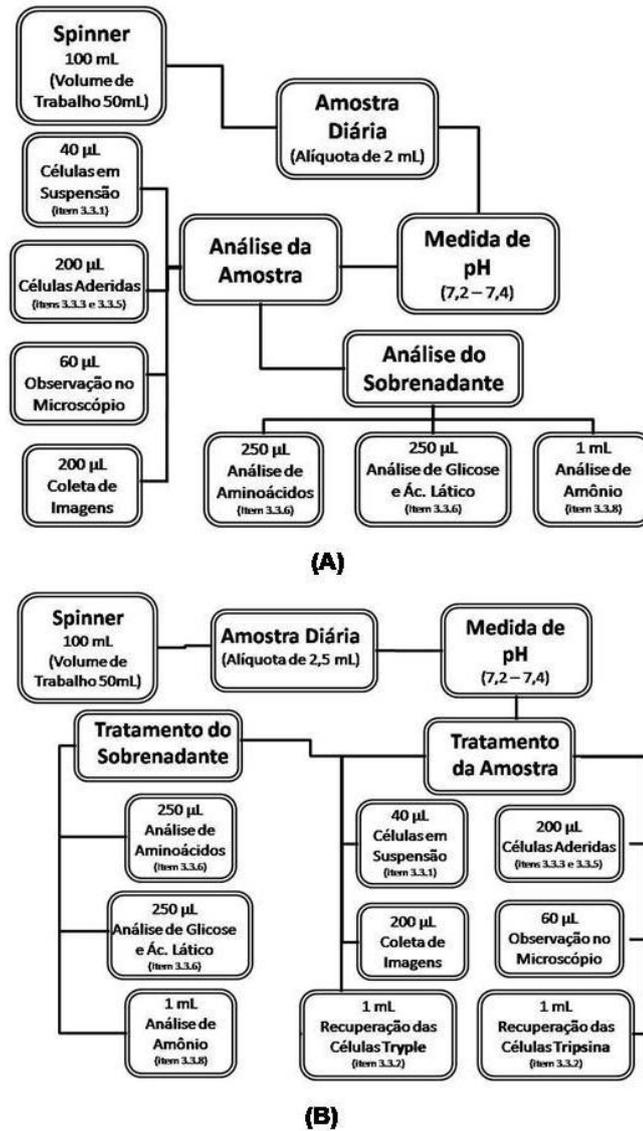


Figura 10 – Diagrama de fluxo do tratamento das amostras. Em (A), representa as amostras com o microcarregador Cytodex 1 e, em (B), as amostras com o Cultispher S.

Após o cultivo com o microcarregador *Cultispher S*, foi possível também fazer análises de citometria de fluxo e de diferenciação celular em adipócitos e osteócitos.

3.3.13 Tratamento dos Dados Experimentais

Nos experimentos realizados neste trabalho em frasco spinner desde o início, como já mencionado, uma amostra diária foi retirada para a quantificação das células na suspensão e no microcarregador, para verificar o pH e para separar alíquotas do sobrenadante para as análises posteriores dos nutrientes e dos metabólitos. Nos últimos experimentos, outras duas amostras diárias foram retiradas, apenas do sobrenadante do cultivo, para o monitorarmos do pH a cada 8 horas.

Para a quantificação das células na suspensão, quatro contagens foram realizadas no Hemacitômetro (vide item 3.3.1). Sendo assim, a média e o desvio padrão foram calculados para cada uma das amostras.

Para a quantificação das células totais pelo método do MTT, após realizada a metodologia indireta que utiliza a absorbância (vide item 3.3.3), três medidas foram feitas para cada amostra. Novamente, a média e o desvio padrão foram calculados para cada uma das amostras.

Para a quantificação das células recuperadas do microcarregador Cultispher S com as enzimas Tripsina e Tryple (vide item 3.3.2), apenas duas contagens no Hemacitômetro foram realizadas. Então, somente a média foi calculada para cada amostra.

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados discutidos a seguir foram obtidos através de seis cultivos realizados em frasco spinner. Os quatro primeiros com o microcarregador Cytodex 1 e os dois últimos com o Cultispher S. O primeiro experimento realizado teve um caráter exploratório, uma vez que havia pouca informação disponível sobre o comportamento da linhagem hMSC-TERT em cultura. Nesse experimento, foi possível identificar algumas características do cultivo que poderiam ser modificadas nos experimentos subsequentes com o intuito de obter melhores rendimentos celulares.

4.1 Experimento 1

O experimento 1 (E1) foi realizado com a linhagem hMSC-TERT, derivada da medula óssea humana, em frasco spinner a 37°C. O meio de cultura utilizado foi o α -MEM suplementado com 15% (v/v) de soro fetal bovino, 6,44 mM de glicose, 2 mM de glutamina e 0,38 mM de arginina. A necessidade de suplementação com essas quantidades de glicose e aminoácidos surgiu como consequência de análises do meio de cultivo feitas no final dos cultivos em frascos T durante as passagens para preparo do inóculo.

A fase para a adesão teve duração de 6 horas. Iniciou e com $7,72 \times 10^6$ células em 21 mL de meio de cultura, 1/3 do volume de meio previsto para o experimento, $8,82 \text{ g.L}^{-1}$ de Cytodex 1. A agitação foi feita de forma intermitente, sendo de 30 rpm por 30 segundos a cada 15 minutos. O objetivo de manter a agitação intermitente e a densidade de microcarregadores alta foi para aumentar o contato entre as células e os microcarregadores visando facilitar o processo de adesão. Geralmente, essa preocupação com a fase para a adesão está presente nos trabalhos científicos em que foram utilizados microcarregadores, pois a expansão celular depende do desempenho obtido nessa fase. Diversas combinações de agitação intermitente com o volume reduzido foram aplicadas

(ABRANCHES *et al*, 2007; FERNANDES *et al*, 2007; FRAUENSCHUH *et al*, 2007; SCHOP *et al*, 2008) ou, em outros casos, o sistema permaneceu em repouso durante as primeiras horas (WEBER *et. al*, 2007; YANG *et al.*, 2007; YU *et al*, 2009).

Após 6 horas de cultivo, foi feita a diluição com meio de cultura fresco, de 17 para 50 mL, e aumentou-se a agitação para 50 rpm, sendo mantida constante até o final do experimento. De 47 até 96 horas, foi feita a troca de 50% do volume de trabalho por meio de cultura fresco com o objetivo de evitar o esgotamento de nutrientes (glicose e aminoácidos) e para a diluição dos metabólitos considerados tóxicos (ácido lático e amônia). Antes e depois das trocas de meio, foram retiradas amostras. A porcentagem de CO₂ foi alterada de acordo com os resultados do pH para manter o valor na faixa de 7,2-7,4. Entretanto, após as trocas de meio, em 47 e 96 horas, os valores foram ligeiramente superiores ao limite superior dessa faixa. A variação de pH pode ser atribuída à retirada do spinner da incubadora para a câmara asséptica durante a retirada das amostras, o que contribuiu para aumentar o pH do meio de cultivo. Além disso, também houve contribuição da adição do meio fresco utilizado nas trocas, já que o mesmo tinha um valor de pH superior ao do cultivo.

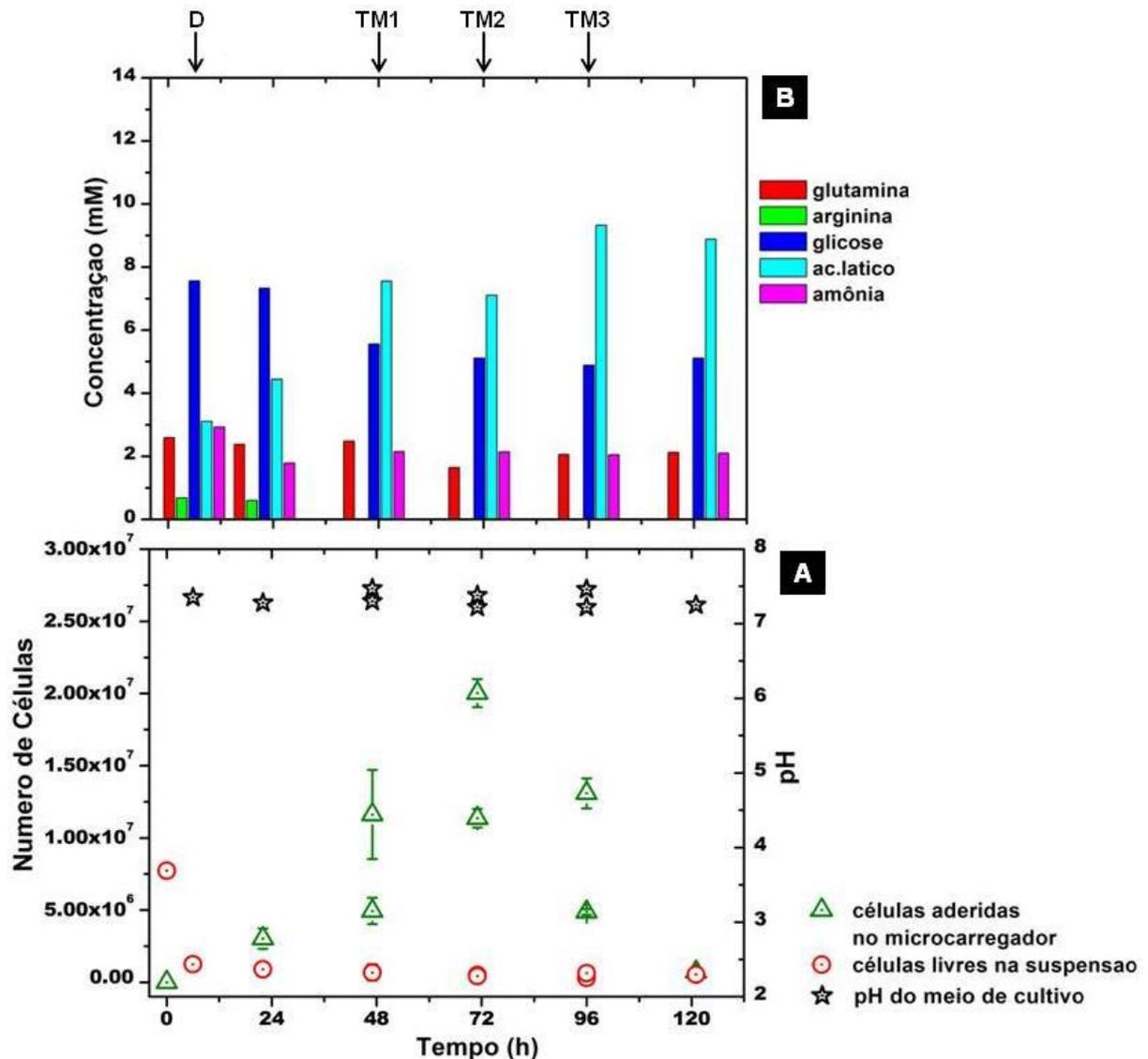


Figura 11 – Resultados obtidos no experimento E1 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner de 100 mL, com 50 mL de meio α -MEM suplementado com 15% (v/v) de SFB, 6,44 mM de glicose, 2 mM de glutamina e 0,38 mM de arginina. O sistema de cultivo foi colocado em incubadora de CO₂ a 37°C sob agitação de 50 rpm. Em (A), estão representados os valores do número de células na suspensão e no microcarregador Cytodex 1, assim como, os valores de pH do meio de cultivo. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas. Em (B), estão representados as concentração dos nutrientes chave e dos metabólitos. As setas indicam a diluição (D) e as trocas de meio (TM) feitas com meio fresco. As análises dos nutrientes e dos metabólitos foram feitas depois da diluição e antes das trocas de meio.

Analisando a Figura 11A, o número de células na suspensão após a fase para a adesão permaneceu baixo numa faixa constante ao longo do tempo, o que significa que as características do Cytodex 1 podem ter favorecido a adesão das células. Frauenschuh *et al.* (2007) compararam o cultivo de CTMs, durante 6 horas, em três diferentes microcarregadores: Cytodex 1, Cytodex 2 e Cytodex 3. O melhor

resultado, em termos de adesão celular, contribuiu para a seleção do Cytodex 1 como microcarregador para um cultivo de 28 dias.

Durante o cultivo, não foi possível retirar as células aderidas no microcarregador. As amostras foram tratadas com a Tripsina na tentativa de quantificar a população de células através de contagem em hemacitômetro (dados não mostrados). Possivelmente, a forte carga superficial positiva do microcarregador seja responsável por uma adesão celular muito forte. Por essa razão, a metodologia do MTT foi utilizada para a quantificação indireta das células aderidas ou viáveis. Frauenschuh *et al.* (2007) também utilizaram essa metodologia para quantificação celular e Schop *et al.* (2008) um outro método indireto, baseado em fluorescência. Ambos os trabalhos foram realizados com o microcarregador Cytodex 1 e com CTMs de espécies diferentes.

Os resultados da quantificação por MTT para as células aderidas no E1 foram crescentes até 72 horas. Foi possível notar que, durante as trocas de meio houve uma diminuição no número de células quando analisadas as amostras antes e depois da troca. O motivo pode ter sido que, na retirada do sobrenadante, microcarregadores com células também foram retirados.

Além disso, ocorreu a formação de aglomerados de microcarregadores colonizados. Essa formação no cultivo de células-tronco foi relatada por Frauenschuh *et al.* (2007) e por Weber *et al.* (2007). Estes pesquisadores 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 parada do crescimento pelo fato de que as células que ficam presas no interior dos aglomerados não interagem completamente com os reagentes utilizados no método de quantificação celular, gerando resultados subestimados para o número de células.

A expansão celular também pode ter sido afetada pelo estresse mecânico após a fase de adesão. Essa relação foi citada por Yu *et al.* (2009), uma vez que observou uma queda na expansão de CTMs com microcarregadores, após o período de adesão, quando a agitação passou a ficar constante.

Contudo, o número de células máximo quantificado pelo MTT foi de $2,00 \times 10^7$ em 71 horas (Figura 11A). Após esse período, o número de células decresceu devido, possivelmente, à morte celular em consequência da falta de nutrientes e da dificuldade de acesso ao oxigênio pelas células que estavam no interior dos aglomerados.

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 2,60.

Também foi possível analisar o consumo dos nutrientes e a produção dos metabólitos. As Tabelas C3 e C4 (Apêndice C) apresentam as concentrações de todos os aminoácidos analisados no meio de cultivo, depois da diluição e antes das trocas de meio ao longo do tempo, sendo que os consumos de arginina e de glutamina foram maiores do que os demais aminoácidos. Por isso, os valores desses aminoácidos estão representados na Figura 11B. A menor concentração de glicose quantificada foi em 96 horas (4,89 mM) e a de glutamina em 71 horas (1,64 mM). Já a maior concentração de ácido lático foi também em 96 horas (9,32 mM) e a de amônia em 6 horas (2,92 mM). As concentrações desses metabólitos podem inibir a expansão celular (Tabela 4). Schop *et al.* (2008) obtiveram no cultivo de CTMs de cabras valores próximos a 8 mM de ácido lático e de 5 mM de amônia.

Em 47 horas toda a arginina já havia sido consumida e mesmo com a troca de meio não foi detectada a sua concentração nas amostragens posteriores. O esgotamento desse aminoácido, juntamente com a formação de aglomerados, podem ter sido as causas da queda na quantidade de células viáveis.

Na Figura 12 estão exibidas algumas das imagens de microscopia ótica obtidas do microcarregador Cytodex 1 no decorrer do E1. Foi possível observar com destaque, respectivamente, em 12C, 12B e 12E, o final da fase de adesão celular, um aglomerado de microcarregadores e a diminuição da confluência celular sobre os microcarregadores num aglomerado devido à morte celular.

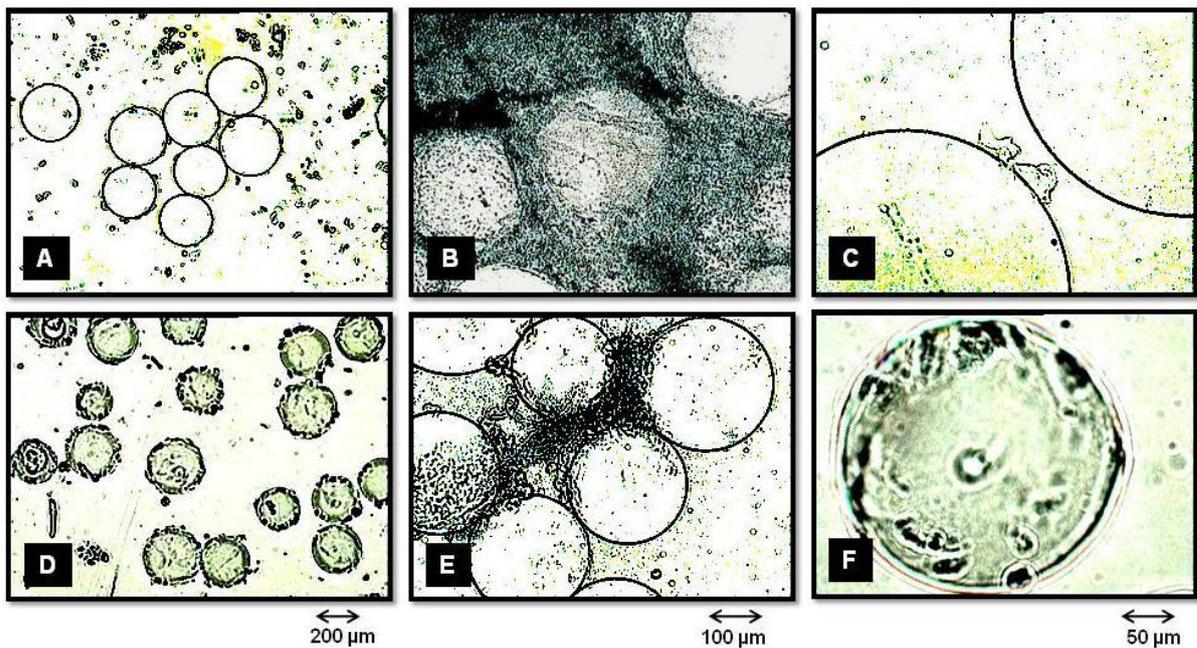


Figura 12 – Imagens de microscopia ótica do microcarregador Cytodex 1 com células no decorrer do experimento E1. O tempo de cultivo em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) foi de 71, 96, 6, 121 121 e de 121 horas, respectivamente. A magnificação foi de 40x para (A) e (D), de 100x para (B) e (E) e de 200x para (C) e (F).

Apesar da formação dos aglomerados de microcarregadores, foi possível perceber crescimento celular, segundo os resultados obtidos pelo MTT.

4.2 Experimento 2

O experimento 2 (E2) foi realizado em condições experimentais similares ao E1. Entretanto, a porcentagem de CO₂ na fase para a adesão foi de 14% e o meio de cultura foi suplementado com 0,89 mM de arginina, devido ao alto consumo observado no E1. Houve mudanças na condução do cultivo em outros procedimentos:

(a) antes da inoculação do frasco spinner, o inóculo foi filtrado em filtro de 100 μm 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;

(b) a velocidade de rotação foi aumentada para 50 rpm na fase para a adesão, com o objetivo de analisar a sua influência na adesão celular. Além disso, essa fase iniciou com $6,98 \times 10^6$ células em 19 mL;

(c) no final da fase para a adesão celular, após a diluição, a agitação foi aumentada gradualmente assim: foi mantida em 20 rpm por 2 horas, aumentada para 30 rpm por mais 2 horas, mantida até 24 horas em 40 rpm e, finalmente, elevada para 50 rpm até o final do cultivo.

(d) nas trocas de meio, durante o cultivo, o sobrenadante foi retirado com uma pipeta modificada pela colocação de vidro sinterizado fundido e soldado no orifício de sucção do líquido para impedir a perda de células, na troca do meio de cultura, devido à entrada de microcarregadores colonizados;

(e) as trocas de meio foram realizadas de forma gradual, em duas etapas: logo após a retirada do sobrenadante, 12 mL de meio de cultura fresco foram adicionados, uma amostra foi retirada e o spinner foi, imediatamente, colocado na incubadora. Depois de 2 horas, mais 13 mL de meio fresco foram adicionados, retirando, a seguir, outra amostra. Este procedimento adotado foi devido ao aumento do pH durante as trocas de meio, observado no experimento anterior;

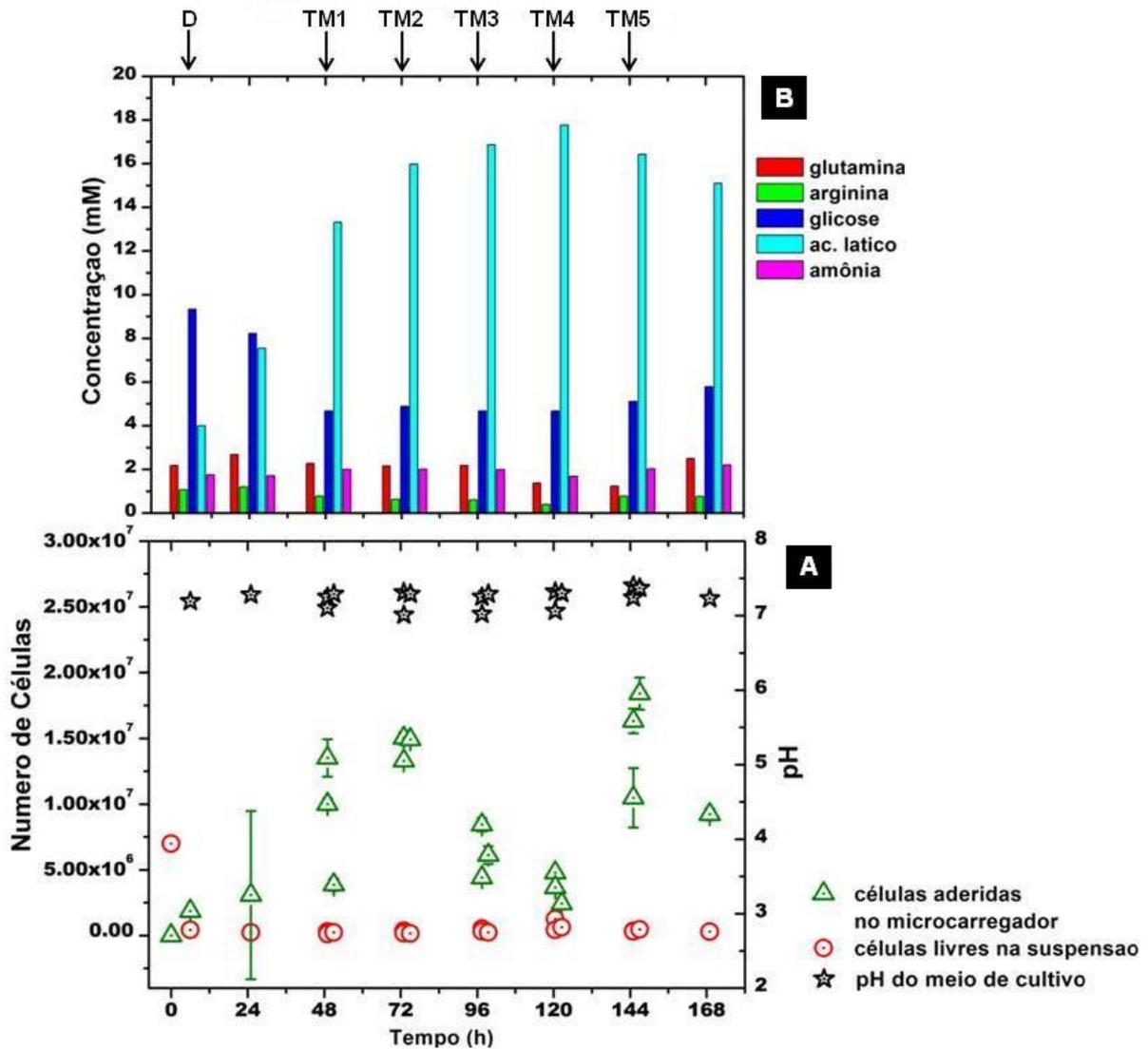


Figura 13 - Resultados obtidos no experimento E2 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner de 100 mL, com 50 mL de meio α -MEM suplementado com 15% (v/v) de SFB, 6,44 mM de glicose, 2 mM de glutamina e 0,89 mM de arginina. O sistema de cultivo foi colocado em incubadora de CO₂ a 37°C sob agitação de 50 rpm. Em (A), estão representados os valores do número de células na suspensão e no microcarregador Cytodex 1, assim como, os valores de pH do meio. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas. Em (B), estão representadas as concentrações dos nutrientes chave e dos metabólitos. As setas indicam a diluição (D) e as trocas de meio (TM) com meio fresco. As análises dos nutrientes e dos metabólitos foram feitas depois da diluição e antes das trocas de meio.

Analisando a Figura 13A, novamente, o número de células na suspensão após a fase para a adesão permaneceu baixo e constante ao longo do tempo. Novamente, a formação de aglomerados de microcarregadores foi observada. Os resultados da quantificação para as células aderidas mostraram dois pontos de máximo. O primeiro em 73 horas com $1,50 \times 10^7$ e o segundo em 147 horas com $1,84 \times 10^7$ células. Sendo, os fatores de expansão celular, respectivamente, de

2,15 e de 2,64. Este comportamento deixou mais evidente o efeito da formação de aglomerados na expansão e na quantificação celular por apresentar uma oscilação dos resultados.

As Tabelas C7 e C8 (Apêndice C) mostram os resultados de todos os aminoácidos analisados no E2. Na Figura 13B, é possível observar que, as menores concentrações de glicose e de glutamina quantificadas foram em 49, 97,5 e 120,5 horas (4,67 mM) e em 145 horas (1,23 mM), respectivamente. Já as concentrações de ácido láctico, maior que no E1, e de amônia foram maiores em 120,5 horas (17,76 mM) e em 169 horas (2,20 mM), respectivamente. O consumo de arginina, como no experimento anterior, continuou alto sendo maior em 120,5 horas quando atingiu uma concentração de 0,40 mM.

Na Figura 14, é possível observar algumas das imagens de microscopia ótica desde a formação dos aglomerados de microcarregadores, imagens (B), (C) e (D), até a alta confluência nos ainda colonizados no final do cultivo, mostrados nas imagens (E) e (F).

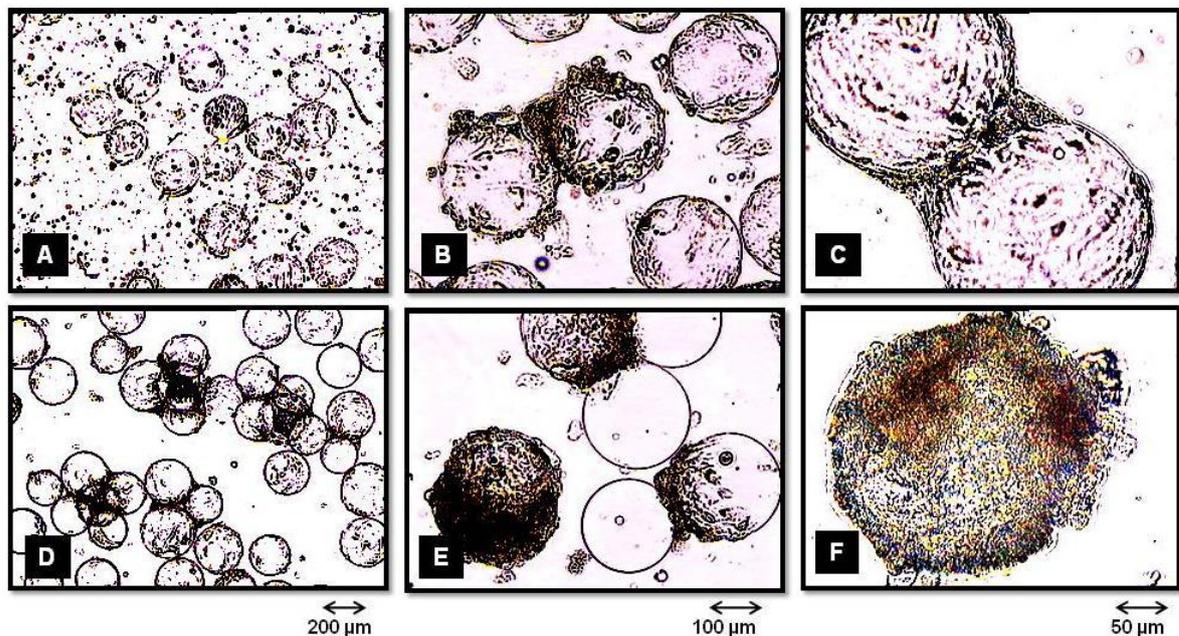


Figura 14. - Imagens de microscopia ótica do microcarregador Cytodex 1 com células no decorrer do experimento E2. O tempo de cultivo em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) foi de 48, 73, 73, 97,5, 145 e de 169 horas, respectivamente. A magnificação foi de 40x para (A) e (D), de 100x para (B) e (E) e de 200x para (C) e (F).

Foi possível observar que as mudanças em alguns dos procedimentos experimentais geraram resultados positivos. Por exemplo, não foi detectado o esgotamento de arginina porque a suplementação foi maior do que a do experimento anterior. Na fase para a adesão, o aumento da velocidade de rotação para 50 rpm contribuiu para a quantificação de menos de 7% das células inoculadas após 6 horas. Além disso, devido ao aumento gradativo da velocidade de rotação após esse período, não houve queda no número de células aderidas entre 6 e 24 horas. A diferença do número de células aderidas quantificadas no mesmo tempo diminuiu com a utilização da pipeta com filtro de vidro sinterizado, para a retirada do sobrenadante antes das trocas de meio. Por fim, nas trocas de meio em duas etapas os valores de pH permaneceram na faixa entre 7,2 e 7,4.

4.3 Experimento 3

O experimento 3 (E3) foi realizado em condições experimentais similares ao do E2. O meio de cultura, apenas por precaução, foi ainda mais suplementado com 1,39 mM de arginina e 2,5 mM de glutamina. Os procedimentos modificados em relação ao E2 foram os seguintes:

- (a) a fase para a adesão teve duração de apenas 4 horas e iniciou com $6,25 \times 10^5$ células, 3 g.L^{-1} de Cytodex 1 e com 50 mL de volume. O objetivo foi diminuir a concentração de microcarregadores utilizados nessa fase, nos experimentos anteriores;
- (b) o pH do meio de cultivo foi monitorado a cada 8 horas para assegurar um melhor controle desse parâmetro e mantê-lo na faixa de 7,2-7,4;
- (c) as trocas de meio, assim como em E1, foram feitas em uma única etapa, evitando o aumento na concentração temporária de microcarregadores, utilizada no E2. Além disso, as trocas de meio foram feitas seguidas de diluições com 10 mL de meio de cultura fresco contendo 3 g.L^{-1} de microcarregadores. A agitação foi aumentada na mesma proporção do aumento do volume. As diluições iniciaram em 24 horas e foram até 168 horas.

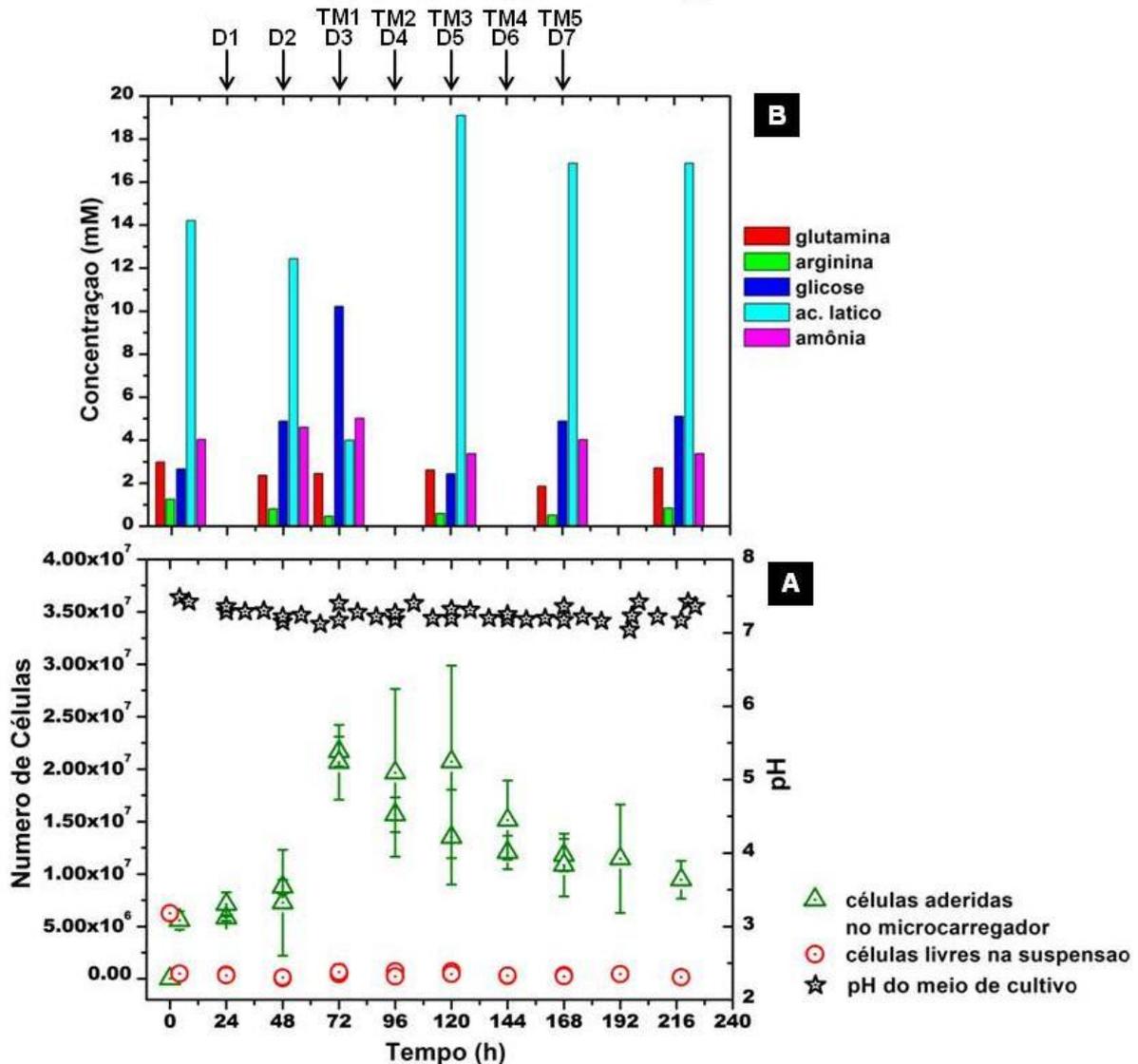


Figura 15 - Resultados obtidos no experimento E3 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner de 100 mL, com 50 mL de meio α -MEM suplementado com 15% (v/v) de SFB, 6,44 mM de glicose, 2,5 mM de glutamina e 1,39 mM de arginina. O sistema de cultivo foi colocado em incubadora de CO₂ a 37°C. Em (A), estão representados os valores do número de células na suspensão e no microcarregador Cytodex 1, assim como, os valores de pH do meio. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas. Em (B), estão representadas as concentrações dos nutrientes chave e dos metabólitos. As setas indicam as trocas de meio (TM) feitas com meio fresco e as diluições (D) com 10 mL de meio contendo 3 g.L⁻¹ de Cytodex 1. As análises dos nutrientes e dos metabólitos foram feitas antes das trocas de meio.

Analisando a Figura 15A, o número de células na suspensão permaneceu baixo e aproximadamente constante ao longo do tempo. Após o período de 4 horas, apenas 8% das células foram quantificadas na suspensão. O maior valor quantificado do número de células aderidas foi de $2,17 \times 10^7$ células em 72 horas, antes da diluição sendo o fator de expansão celular de 3,47.

As Tabelas C11 e C12 (Apêndice C) mostram os resultados de todos os aminoácidos analisados no E3. Na Figura 15B é possível observar que, as menores concentrações de glicose e de glutamina quantificadas foram em 120 h (2,44 mM) e 168 horas (1,86 mM), respectivamente. Já as concentrações de ácido láctico, maior que os experimentos anteriores, e de amônia foram maiores em 120 horas (19,06 mM) e em 72 horas (5,01 mM), respectivamente. O consumo de arginina, como nos experimentos anteriores, continuou alto, tendo atingido um valor mínimo de concentração em 72 horas (3,63 mM).

Novamente, foi detectada a formação dos aglomerados de microcarregadores. As imagens de microscopia ótica mostraram que tanto a colonização quanto a aglomeração estão melhores distribuídas do que nos experimentos anteriores (Figura 16). Segundo Frauenschuh *et al.* (2007), a carga elétrica superficial positiva dos microcarregadores já colonizados é neutralizada pela carga negativa das células aderidas. Os novos microcarregadores adicionados ainda apresentam suas cargas positivas, atraindo por essa razão mais fortemente as células.

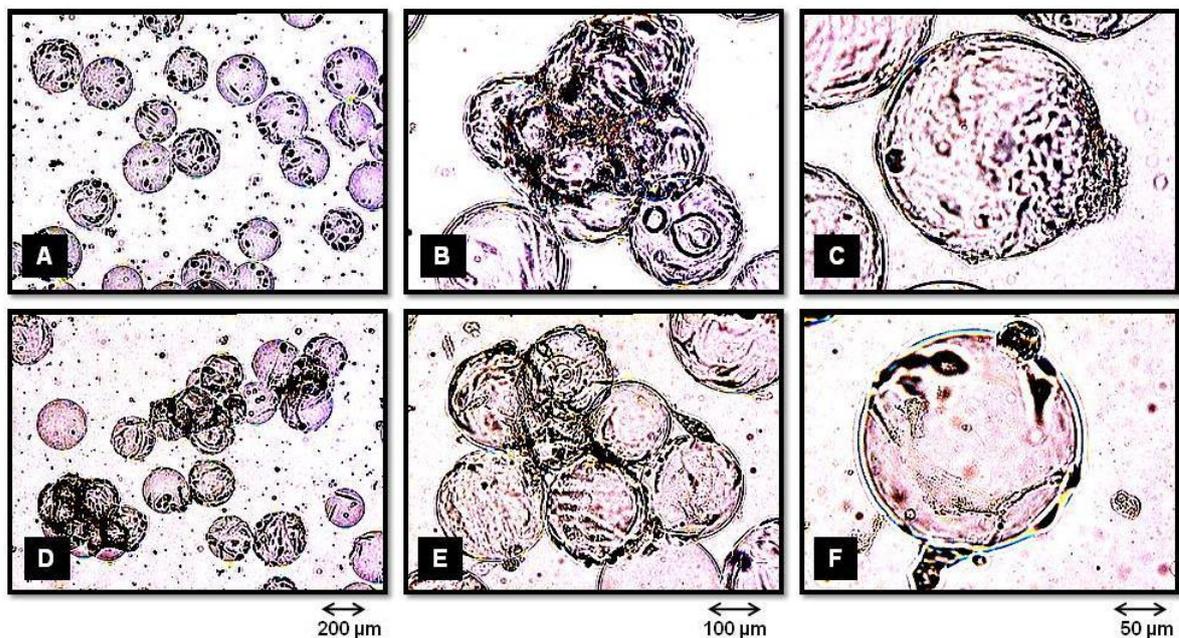


Figura 16 - Imagens de microscopia ótica do microcarregador Cytodex 1 com células no decorrer do experimento E3. O tempo de cultivo em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) foi de 4, 24, 72, 218, 120 e 218 horas, respectivamente. A magnificação foi de 40x para (A) e (D), de 100x para (B) e (E) e de 200x para (C) e (F).

Mais uma vez, as mudanças em alguns dos procedimentos experimentais geraram resultados positivos. Por exemplo, na fase de adesão, o aumento do volume de meio de cultura que fez com que os microcarregadores ficassem mais diluídos e, portanto, com menos contato entre eles. A diminuição do tempo de adesão em duas horas também pode ter contribuído para ter menos aglomeração que nos experimentos E1 e E2 no final desse período. Com o monitoramento do pH, foi possível manter esse parâmetro na faixa 7,2-7,4. Por fim, as diluições realizadas após as trocas de meio podem ter contribuído para minimizar a aglomeração e, conseqüentemente, favorecer a expansão celular, visto que o fator de expansão celular foi maior do que nos experimentos anteriores. Schop *et al.* (2008) avaliaram a expansão celular de CTMs em três condições: (1) adicionando 30% do volume de trabalho de meio de cultura fresco; (2) adicionando o mesmo volume de meio fresco contendo microcarregadores e (3) sem adição de meio. A condição (2) apresentou melhores resultados além de proporcionar uma distribuição mais homogênea das células entre os microcarregadores.

4.4 Experimento 4

No experimento 4 (E4) foi testada a adição das enzimas tryple e hialuronidase no meio de cultivo com o objetivo de diminuir a formação dos aglomerados de microcaregadores e melhorar as condições para a proliferação celular. A idéia central dessa estratégia foi de utilizar enzimas que promovem o rompimento atenuado de polímeros componentes da matriz extracelular. A ação proteolítica da enzima tryple romperia as ligações peptídicas célula-célula e célula-matriz, tal como faz quando utilizada na dissociação de tecidos ou na desadesão da superfície de material plástico, como frascos T. A enzima hialuronidase teria ação lítica sobre o ácido hialurônico, outro polímero muito importante para dar a consistência gelatinosa à matriz extracelular.

Antes de iniciar o E4, foram realizados testes com a enzima Tryple para avaliar os efeitos nocivos que poderiam ter para as células-tronco. Para tal, foram realizados cultivos na incubadora com 5% de CO₂ a 37°C com três grupos de frascos T de 25 cm², inoculados com 1,25x10⁵ células.mL⁻¹ em meio de cultura α-

MEM, sem o indicador vermelho de fenol e com a mesma suplementação do meio utilizada no E3. A utilização de meio de cultura, isento de vermelho de fenol, foi com o propósito de eliminar sua interferência nas medidas de absorvância necessárias para aplicar o método da LDH. Depois da fase para a adesão de 4 horas, a solução de tryple foi adicionada no meio de cultura diluída 5 e 10 vezes, separadamente em dois frascos T, um para cada diluição. O terceiro frasco T, com meio de cultura sem adição de tryple, foi utilizado como “controle” do experimento.

O crescimento celular nos três frascos T foi observado qualitativamente no microscópio ótico invertido e amostras do sobrenadante foram analisadas pelo método da LDH para a quantificação de células que poderiam ser lisadas por ação proteolítica da tryple. Depois de retiradas as amostras, o mesmo volume de meio de cultura fresco foi adicionado ao frasco T. Após 59 horas de cultivo, as células foram retiradas das garrafas, utilizando o procedimento padronizado de desadesão das células hMSC-TERT ao fazer as passagens em frasco T. Na Tabela 13, estão representados, os resultados obtidos dos três frascos T para a densidade e viabilidade celular através do método de exclusão do corante azul de tripan.

Tabela 13 - Resultados finais de densidade e de viabilidade celular dos cultivos em frascos T de 25 cm² para analisar o efeito da enzima Tryple na integridade das células hMSC-TERT. No cultivo utilizou-se o meio α -MEM sem vermelho de fenol suplementado como no E3. O cultivo foi realizado numa incubadora com 5% de CO₂ à 37°C com uma duração de 59 horas.

Concentração de Enzima	Densidade Celular	Viabilidade
	(células.mL ⁻¹) ± Desvio Padrão	(%) ± Desvio Padrão
Controle	2,60x10 ⁵ ± 2,74x10 ⁴	100 ± 0
Diluída 5x	2,28x10 ⁵ ± 1,84x10 ⁴	100 ± 0
Diluída 10x	2,42x10 ⁵ ± 2,10x10 ⁴	100 ± 0

Na Figura 17, estão representados os resultados da análise da lise celular, pelo método da LDH, representada em termos da densidade relativa (número de células no tempo t com relação ao número de células em t = 4 horas).

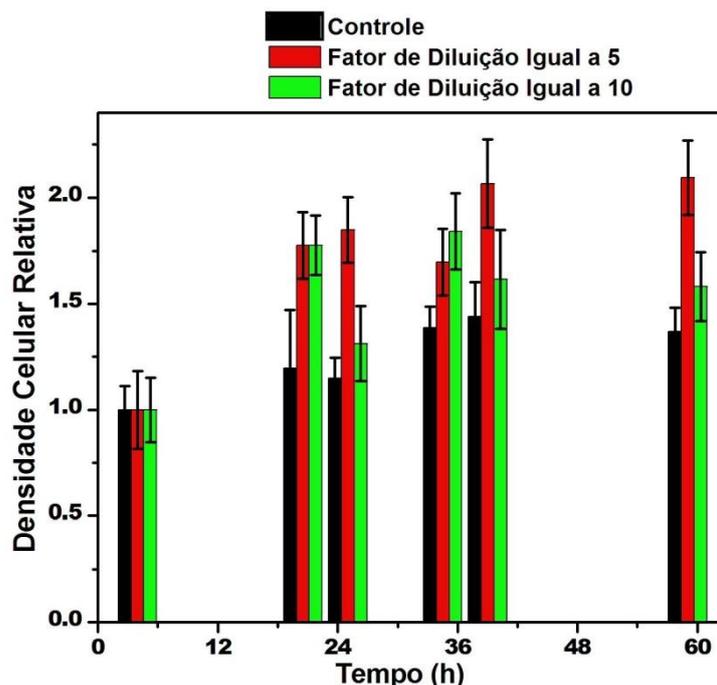


Figura 17 - Resultados de densidade celular relativa obtidos pelo método da LDH do sobrenadante de cultivos em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C de três frascos T de 25 cm² com a linhagem hMSC-TERT cultivada com o meio α -MEM, sem vermelho de fenol, suplementado com 15% (v/v) de SFB, 6,44 mM de glicose, 2,50 mM de glutamina e 1,39 mM de arginina. Depois da fase de adesão de 4 horas, a solução de Tryple foi diluída 5 e 10 vezes separadamente em dois frascos T. O terceiro frasco T foi deixado como controle do experimento. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.

A observação visual do crescimento celular dos três frascos T no microscópio óptico invertido não apresentou diferenças entre o controle e aqueles que continham a solução de tryple diluída no meio de cultivo. Pelos resultados da Tabela 13 é possível verificar que as densidades celulares no final dos três cultivos foram parecidas. A análise do sobrenadante para células lisadas (Figura 17) mostrou que a presença da enzima Tryple diluída 5 vezes causou mais morte celular no cultivo em comparação com os outros dois cultivos.

Levando em consideração os resultados obtidos com a tryple, o experimento 4 (E4) foi realizado após a seleção de algumas das condições experimentais utilizadas em E1, E2 e em E3, assim:

(a) a suplementação do meio de cultura foi a mesma utilizada no E3, assim como as condições da fase de adesão celular e de monitoramento do pH.

(b) as trocas de meio, assim como em E1, foram feitas em uma única etapa. O meio de cultura fresco continha soluções das enzimas tryple e hialuronidase diluídas em concentrações diferentes e adicionadas em tempos diferentes do cultivo. Foram retiradas amostras imediatamente após a adição de meio com a tryple. Já para o caso da hialuronidase, a primeira amostragem foi realizada depois de meia hora e, a segunda, após 1 hora. Na Tabela 14, estão apresentados os tempos em que foram adicionadas essas enzimas, bem como, as diluições feitas com meio de cultura.

Tabela 14 - Tempos de cultivo e fatores de diluição das enzimas Tryple e hialuronidase no meio de cultura fresco utilizado no E4.

Enzima	Tempo de Cultivo (horas)	Fator de diluição
Tryple	48	5
	72	4,5
	96	4
	120	3,5
Hialuronidase	145	10
	168	5

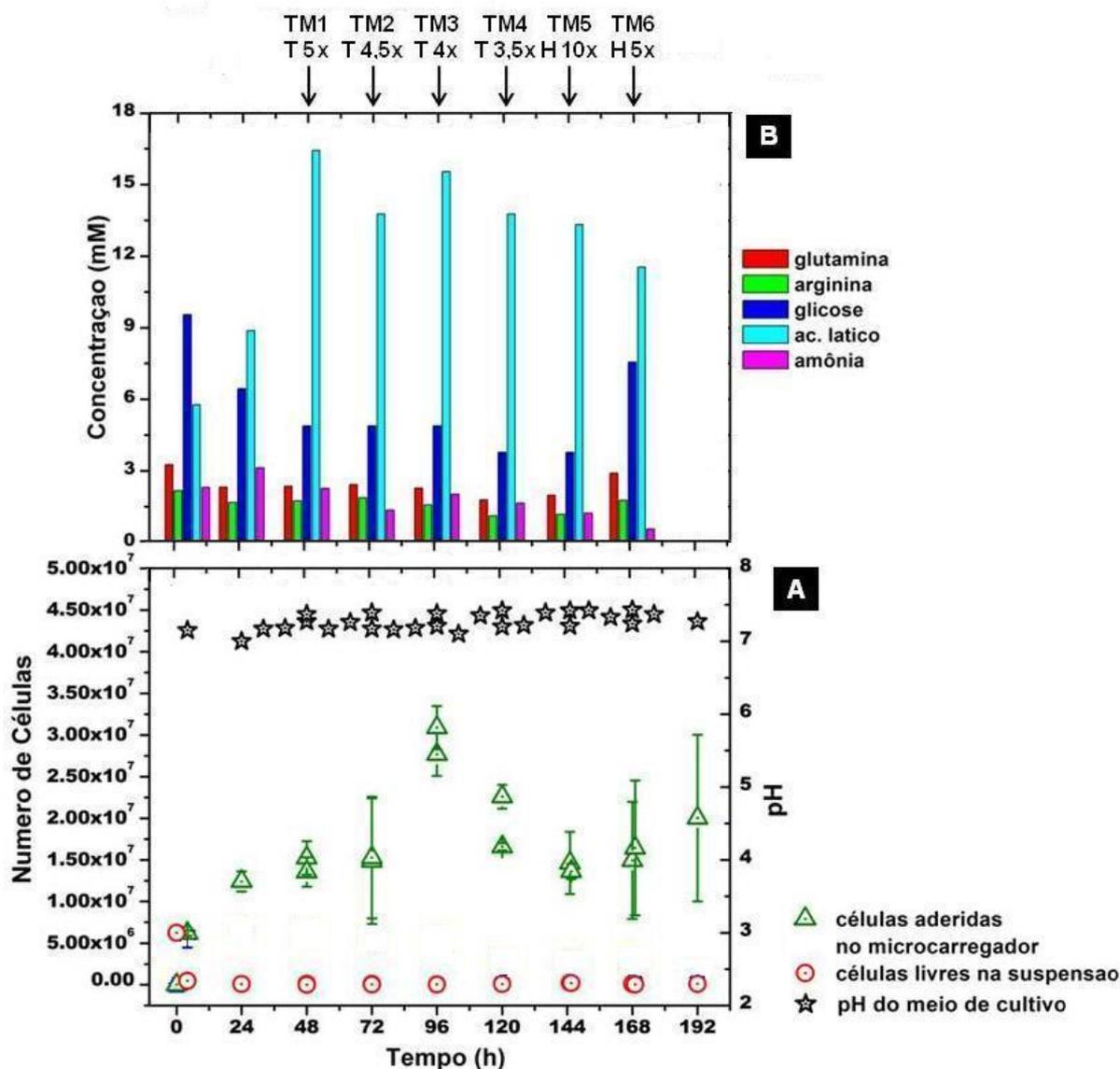


Figura 18 - Resultados obtidos no experimento E4 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner de 100 mL, com 50 mL de meio α -MEM suplementado com 15% (v/v) de SFB, 6,44 mM de glicose, 2,52 mM de glutamina e 1,39 mM de arginina. O sistema de cultivo foi colocado em incubadora de CO₂ a 37°C sob agitação de 50 rpm. Em (A), estão representados os valores do número de células na suspensão e no microcarregador Cytodex 1, assim como, os valores de pH do meio. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas. Em (B), estão representadas as concentrações dos nutrientes chave e dos metabólitos. As setas indicam as trocas de meio (TM) feitas com meio fresco, contendo as enzimas Tryple e Hyalozima diluídas. As análises dos nutrientes e dos metabólitos foram feitas antes das trocas de meio.

Analisando a Figura 18A, o número de células na suspensão permaneceu baixo e aproximadamente constante ao longo do tempo. Após o período de 4 horas, menos de 8% das células foram quantificadas na suspensão. Novamente, a formação de aglomerados de microcarregadores foi observada. A evidência disso pode ser confirmada pelo alto valor de células aderidas obtido que

foi de $3,09 \times 10^7$ em 96 horas, antes da troca de meio, sendo o fator de expansão celular de 4,98.

As Tabelas C16 e C17 (Apêndice C) mostram os resultados de todos os aminoácidos analisados no E4. Na Figura 18B é possível observar que, as menores concentrações de glicose e de glutamina quantificadas foram em 120 e 145 horas (3,78 mM) e em 120 horas (1,79 mM), respectivamente. Já as concentrações de ácido láctico e amônia foram maiores em 48 horas (16,43 mM) e em 24 horas (3,14 mM), respectivamente. A menor concentração quantificada de arginina foi em 120 horas (1,12 mM).

Na Figura 19, é possível analisar algumas das imagens de microscopia ótica obtidas no E4. A formação dos aglomerados aparentemente foi pouco afetada. Como justificativa desse resultado pode-se argumentar que:

- (a) A enzima tryple, além de estar muito diluída, pode ter sido inibida pela alta concentração de SFB utilizada no meio de cultura.
- (b) A enzima hialuronidase tem um pH ótimo de 5,6 e o cultivo foi realizado mantendo o pH na faixa de 7,2 à 7,4. Nesta situação, a enzima além de estar bastante diluída, pode ter apresentado uma atividade baixa.

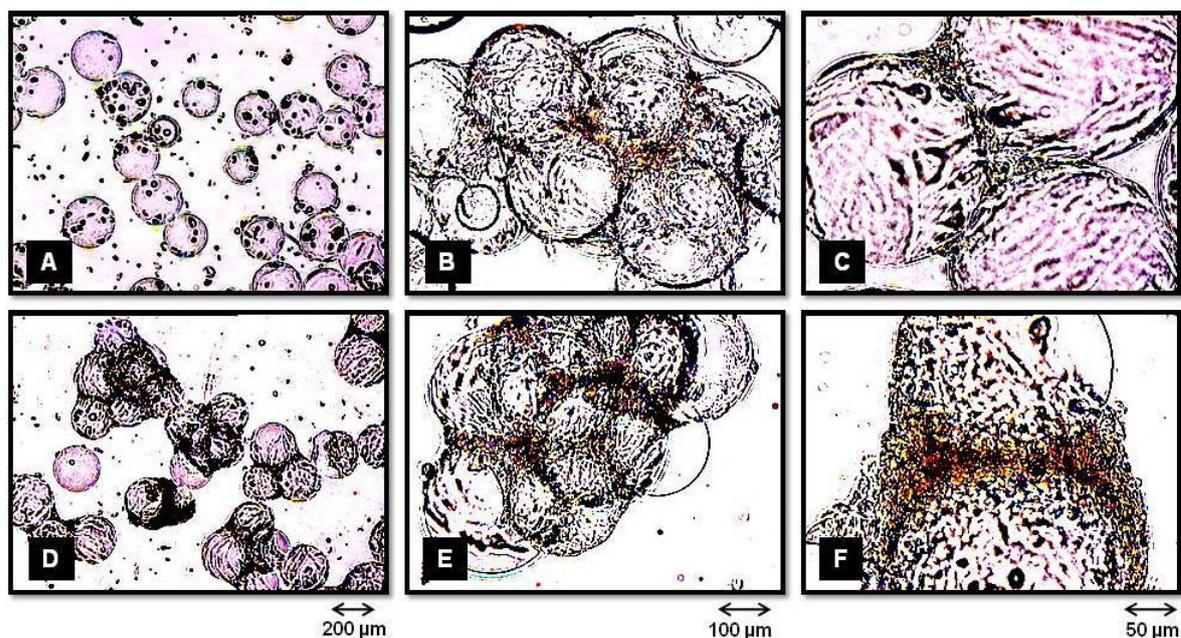


Figura 19 - Imagens de microscopia ótica do microcarregador Cytodex 1 com células no decorrer do experimento E4. O tempo de cultivo em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) foi de 4, 48, 72, 120, 145 e 192 horas, respectivamente. A magnificação foi de 40x para (A) e (D), de 100x para (B) e (E) e de 200x para (C) e (F).

Apesar de não ter diminuído, significativamente, a formação de aglomerados, a utilização das enzimas no cultivo com microcarregadores, pode ter contribuído, de alguma forma, com o crescimento celular já que foi obtido o maior fator de expansão dos experimentos realizados. Os resultados do E4 sugerem como nova hipótese que o aumento da concentração de Tryple possa trazer um efeito benéfico maior para a expansão celular.

.

4.5 Experimento 5

O experimento 5 (E5) foi realizado em condições experimentais similares ao E4, com exceção de alguns procedimentos:

- (a) o microcarregador utilizado foi o Culthispher S. A utilização desse microcarregador de gelatina se baseou na possibilidade concreta de poder utilizar as enzimas Tryple e Tripsina para fazer a recuperação das células depois do cultivo em spinner;
- (b) o intervalo de tempo da agitação, na fase de adesão celular foi de 30 minutos. Diferentemente dos experimentos anteriores onde o intervalo foi de 15 minutos;
- (c) nenhum tipo de enzima foi adicionado ao meio de cultura fresco utilizado nas trocas de meio;

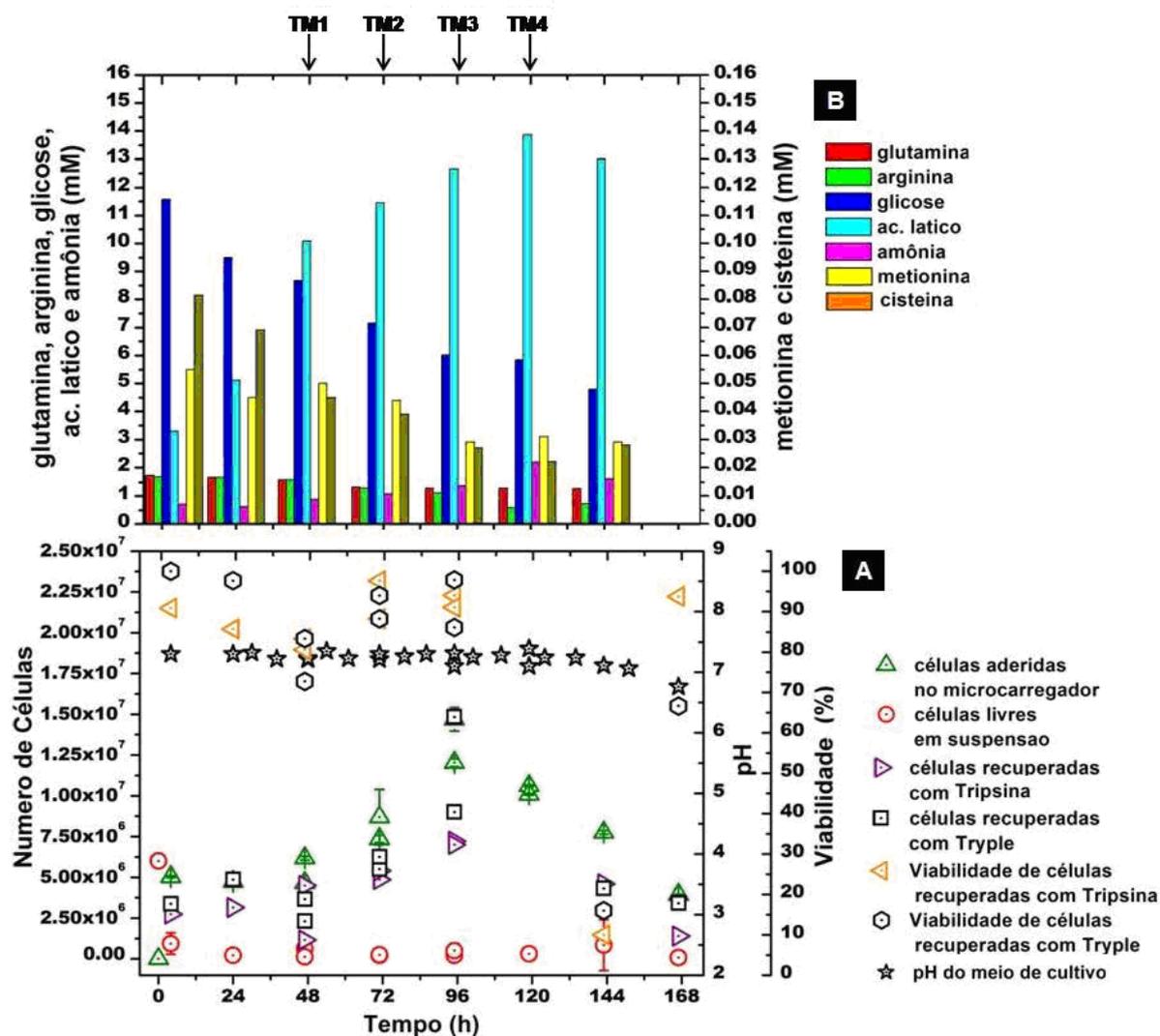


Figura 20 - Resultados obtidos no experimento E5 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner de 100 mL, com volume de 50 mL de meio α -MEM suplementado com 15% (v/v) de SFB, 6.44 mM de glicose, 2.50 mM de glutamina e 1.39 mM de arginina. O sistema de cultivo foi colocado em incubadora de CO₂ a 37°C sob agitação de 50 rpm. Em (A), estão representados os valores do número de células na suspensão, no microcarregador Cultispher S e na recuperação celular, com as enzimas Tripsina e Tryple, assim como, valores do pH do meio de cultivo. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas. Em (B), estão representadas as concentrações dos nutrientes chave e dos metabólitos. As setas indicam as trocas de meio (TM) feitas com meio fresco. As análises dos nutrientes e dos metabólitos foram feitas antes das trocas de meio.,

Analisando a Figura 20A, depois da fase para a adesão, os resultados do número de células na suspensão permaneceram baixos e, aproximadamente, constantes ao longo do tempo. Depois da fase para a adesão, no período de 4 horas, aproximadamente, 15% das células foram quantificadas na suspensão. Esta porcentagem foi maior do que a observada nos experimentos anteriores. Esse resultado pode ser atribuído ao aumento do intervalo de agitação intermitente e/ou

às características de superfície do microcarregador Culthispher S que são distintas as do Cytodex 1.

A formação de aglomerados de microcarregadores, novamente, foi observada neste experimento. Contudo, foi possível recuperar as células aderidas no microcarregador após o tratamento enzimático com Tripsina e Tryple. Além disso, o método do MTT foi aplicado da mesma forma dos experimentos anteriores, com as células aderidas ao microcarregador. 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. O tratamento das amostras com Tripsina permitiu a obtenção de resultados coerentes.

Analisando ainda a Figura 20A, em 95 horas, os valores quantificados do número de células com o MTT, depois da troca de meio, com a Tripsina e com a Tryple, antes da troca de meio, foram respectivamente de $1,47 \times 10^7$, $7,22 \times 10^6$, $1,48 \times 10^7$. Os fatores de expansão celular foram, respectivamente, de 2,45, 1,20 e 2,46. Contudo, em 119 horas não foi possível a quantificação das células recuperadas do Cultispher S com os dois tipos de enzima. Provavelmente, o tratamento enzimático de 30 minutos foi longo para recuperar as células, sendo que houve a queda da expansão nesse período. Por isso, em 143 e 167 horas, os tratamentos enzimáticos foram aplicados por 20 minutos.

Neste experimento foi possível comparar o desempenho das duas enzimas Tryple e Tripsina. Com a Tryple, foram obtidos maiores resultados do número de células e da viabilidade com relação à Tripsina, possivelmente devido à morte celular provocada por esta enzima. Provavelmente, por ser um produto recombinante, fabricado “sob medida” para rompimento de ligações célula-célula e célula-substrato de adesão, a Tryple seja menos prejudicial às células. Contudo, os resultados do número de células quantificados com a tryple estiveram mais próximos daqueles obtidos pelo método do MTT, comprovado pela análise da Figura 21 que apresenta as correlações entre o número de células quantificadas pelos métodos enzimáticos (Tryple/Tripsina) com relação ao método do MTT.

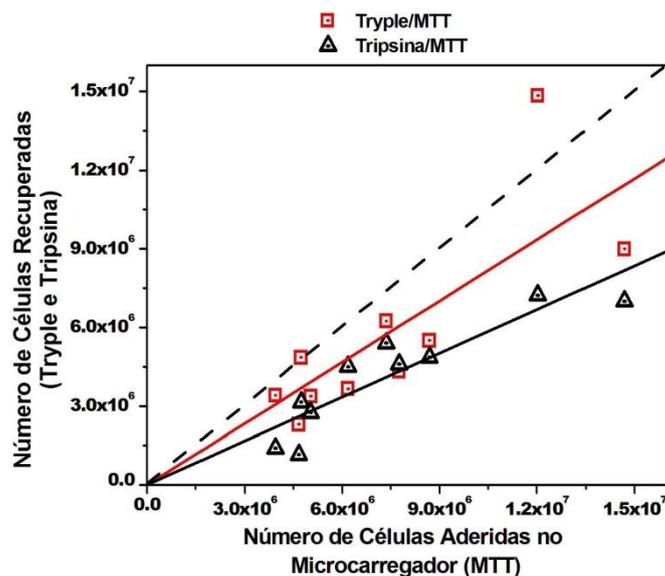


Figura 21 – Correlação entre o número de células recuperadas (Tryple/Tripsina) com o número de células aderidas no microcarregador Cultispher S (MTT). A curva em vermelho representa a regressão linear Tryple/MTT ($y=0,7794x$ e $R^2=0,7975$). A curva em preto representa a regressão linear Tripsina/MTT ($y=0,5566x$ e $R^2=0,8999$). A curva tracejada representa a regressão linear ideal ($y=x$).

As Tabelas C21 e C22 (Apêndice C) mostram os resultados de todos os aminoácidos analisados no E5. Na Figura 20B, é possível observar que em 143 horas as menores concentrações de glicose e de glutamina quantificadas foram de 4,80 mM e 1,27 mM, respectivamente. A menor concentração quantificada de arginina foi de 0,58 mM, também em 119 horas. Já as maiores concentrações quantificadas de ácido láctico e amônia foram de 13,85 mM e 2,19 mM em 119 horas, respectivamente. Diferentemente dos cultivos com Cytodex 1, as concentrações de metionina e de cisteína foram baixas a partir de 95 horas. Este comportamento no consumo de aminoácidos leva a crer que o metabolismo celular pode ter se modificado com a mudança de microcarregador.

Na Figura 22, é possível analisar algumas das imagens de microscopia ótica do microcarregador Cultispher S após 4 horas de cultivo com o MTT. As regiões mais escuras, melhores observadas nas imagens de 100x e 200x, são os cristais de formazan (azul escuro) provenientes da reação do MTT com as desidrogenases mitocondriais das células.

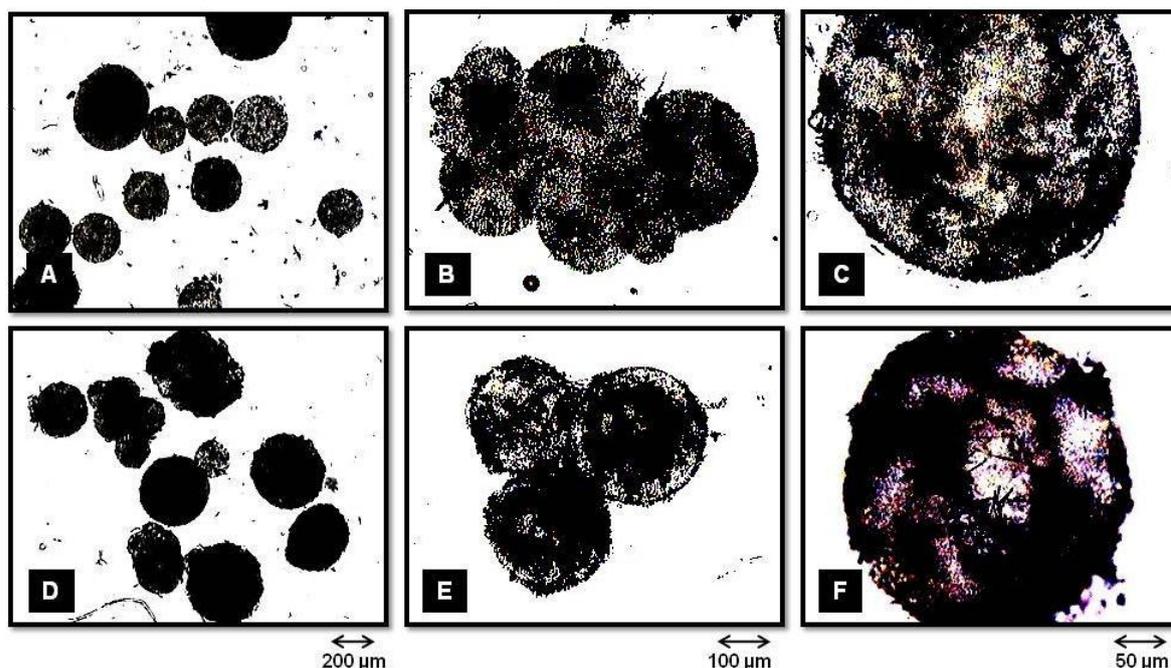


Figura 22 - Imagens de microscopia ótica do microcarregador *Cultispher S* com células em amostras do experimento E5 após 4 horas com MTT. O tempo de cultivo em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) foi de 4, 24, 24, 71, 95 e de 95 horas, respectivamente. A magnificação foi de 40x para (A) e (D), de 100x para (B) e (E) e de 200x para (C) e (F).

Como foi possível recuperar as células aderidas no microcarregador *Cultispher S*, depois de 119 horas uma amostra foi retirada do cultivo e tratada com Tryple. As células foram congeladas para posteriores análises de citometria de fluxo e de diferenciação celular em adipócitos e osteócitos.

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 IgGG-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 23, revelaram que a população de células foi positiva para os marcadores comuns às células-tronco derivadas da medula óssea: CD73, CD90, CD105 e HLA-ABC; e negativa para os marcadores de superfície de células hematopoiéticas: CD14, CD31, CD45 e HLA-DR (PAYUSHINA *et al.*, 2006).

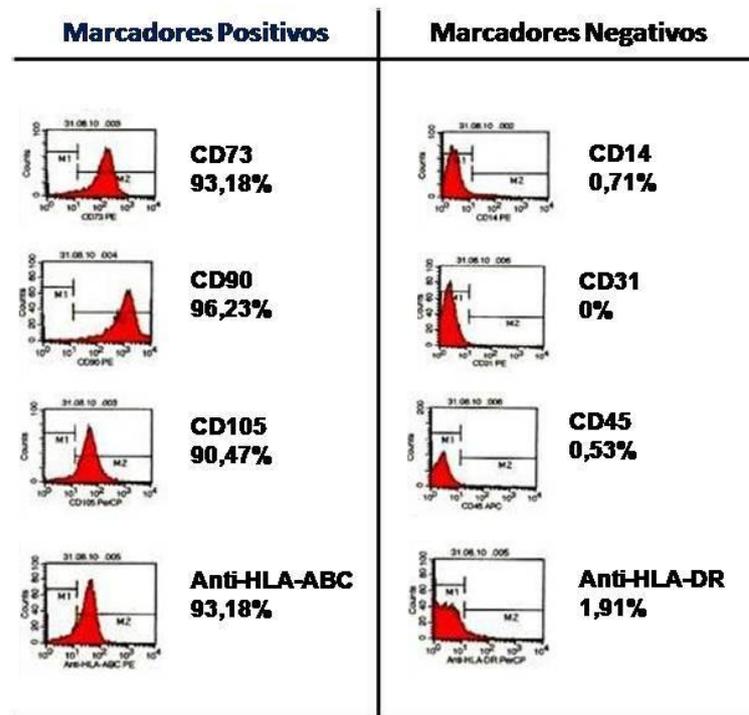


Figura 23 – Resultados das análises de citometria de fluxo para a linhagem hMSC-TERT recuperada do microcarregador Cultispher S após o cultivo em frasco spinner no E5. As análises mostraram que a reatividade foi positiva para marcadores de superfície CD73, CD90, CD105 e HLA-ABC e negativa para marcadores CD14, CD31, CD45 e HLA-DR.

A diferenciação celular foi obtida conforme as imagens mostradas na Figura 24. Em (A), os depósitos negros na camada celular que caracterizam os osteócitos aparecem depois que a coloração citoquímica é realizada com solução de nitrato de prata. Já em (B) a diferenciação menos intensa em adipócitos foi confirmada a partir da coloração com Sudan escarlat, um corante solúvel em gorduras, formando cristais castanho-avermelhados.

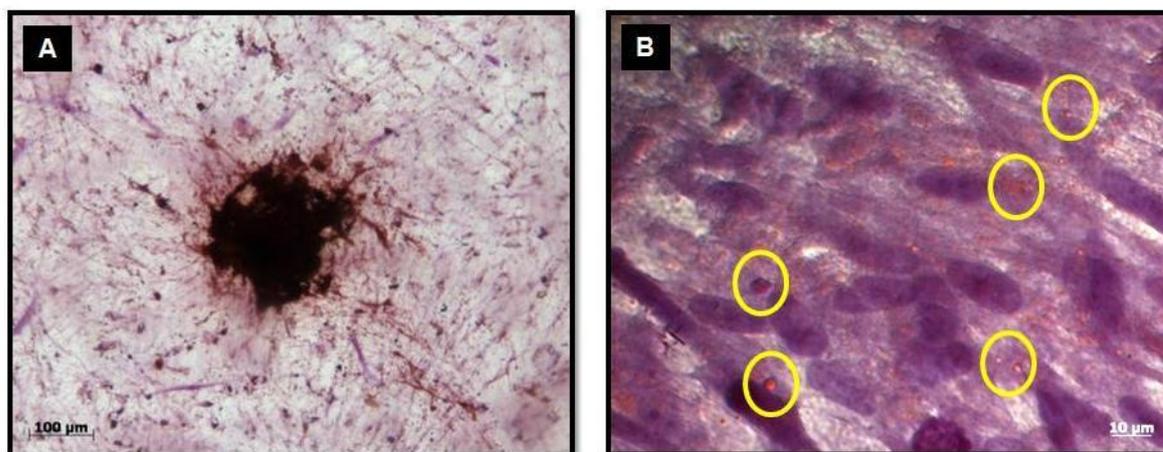


Figura 24 - Imagens de microscopia ótica da diferenciação celular em osteócitos (A) e em adipócitos, destacados em (B).

4.6 Experimento 6

O experimento 6 (E6) foi realizado em condições experimentais iniciais similares ao E5, com exceção de alguns procedimentos:

- (a) A fase para a adesão teve duração de 6 horas e o intervalo de tempo da agitação intermitente foi de 15 minutos;
- (b) Além das trocas de meio, foram realizadas adições de meio de cultura fresco contendo microcarregadores na mesma concentração do cultivo (2 g.L^{-1}) para completar o volume até o valor desejado;
- (c) Em 4 e em 10 dias de cultivo, um tratamento de 15 minutos com Tryple foi realizado em todos os microcarregadores do cultivo (vide item 3.3.11) com o propósito de avaliar a influência sobre os aglomerados de microcarregadores colonizados e, conseqüentemente, sobre a expansão celular.
- (d) Apesar de ter sido verificada, novamente, a recuperação das células do Cultispher S, o E6 não contém resultados do número de células ao longo do tempo através de métodos enzimáticos;

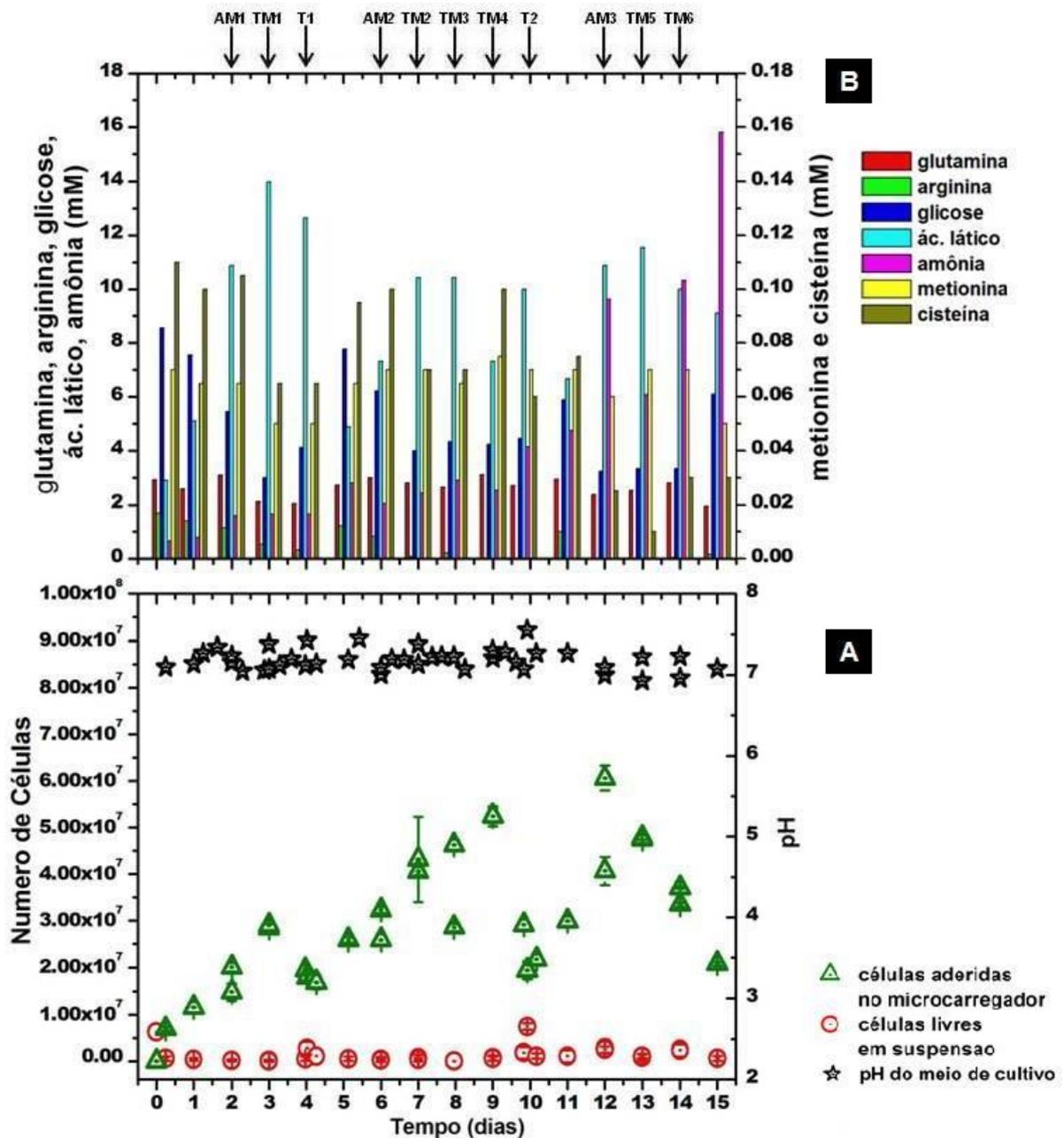


Figura 25 - Resultados obtidos no experimento E6 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em spinner com meio α -MEM suplementado com 15% (v/v) de SFB, 6,44 mM de glicose, 2,50 mM de glutamina e 1,39 mM de arginina. O sistema de cultivo foi colocado em incubadora de CO₂ a 37°C e sob agitação. Em (A), estão representados os valores do número de células na suspensão, no microcarregador Cultispher S, assim como, os valores do pH do meio de cultivo. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas. Em (B), estão representadas as concentrações dos nutrientes chave e dos metabólitos. As setas indicam as adições de meio (AM), as trocas de meio (TM) feitas com meio fresco e o tratamento com Tryple (T). As análises dos nutrientes e dos metabólitos foram feitas antes das adições e trocas de meio e dos tratamentos com Tryple.

Analisando a Figura 25A, depois da fase para a adesão, os resultados do número de células na suspensão permaneceram baixos e, aproximadamente,

constante ao longo do tempo. Depois de 6 horas de cultivo, apenas 9% das células foram quantificadas na suspensão. Este resultado foi melhor do que o obtido no E5 onde o Cultispher S também foi utilizado.

Os resultados obtidos para células aderidas através do método do MTT, também estão representados na Figura 25A. Em 4 dias, houve a primeira queda no número de células. Entretanto, nesse período foi realizado o tratamento enzimático com a tryple (T1) de todos os microcarregadores do cultivo. De 5 a 9 dias, o número de células teve um aumento crescente sofrendo uma outra queda em 10 dias. Novamente, foi realizado outro tratamento com a tryple (T2) e o número de células voltou a aumentar. Em 12 dias, foi quantificado o maior valor do número de células com o MTT, antes da troca de meio, sendo de $6,06 \times 10^7$. Nesse caso, o fator de expansão celular foi de 9,70.

As Tabelas C26 e C27 (Apêndice C) mostram os resultados de todos os aminoácidos analisados no E6. Na Figura 25B, é possível observar que as menores concentrações de glicose e de glutamina quantificadas foram de 3,00 mM, em 3 dias, e de 2,04 mM, em 4 dias, respectivamente. A menor concentração quantificada de arginina foi de 0,025 mM, em 10, 12 e 13 dias. Já as maiores concentrações quantificadas de ácido láctico e amônia foram de 14,00 mM, em 4 dias, e de 15,81 mM, em 15 dias, respectivamente. As menores concentrações de metionina e de cisteína quantificadas foram de 0,05 mM, em 3, 4 e 15 dias, e de 0,01 mM, em 15 dias, respectivamente.

Na Figura 26, é possível analisar algumas das imagens de microscopia ótica do microcarregador Cultispher S após 4 horas de cultivo com o MTT. Novamente, houve a formação de aglomerados de microcarregadores colonizados.

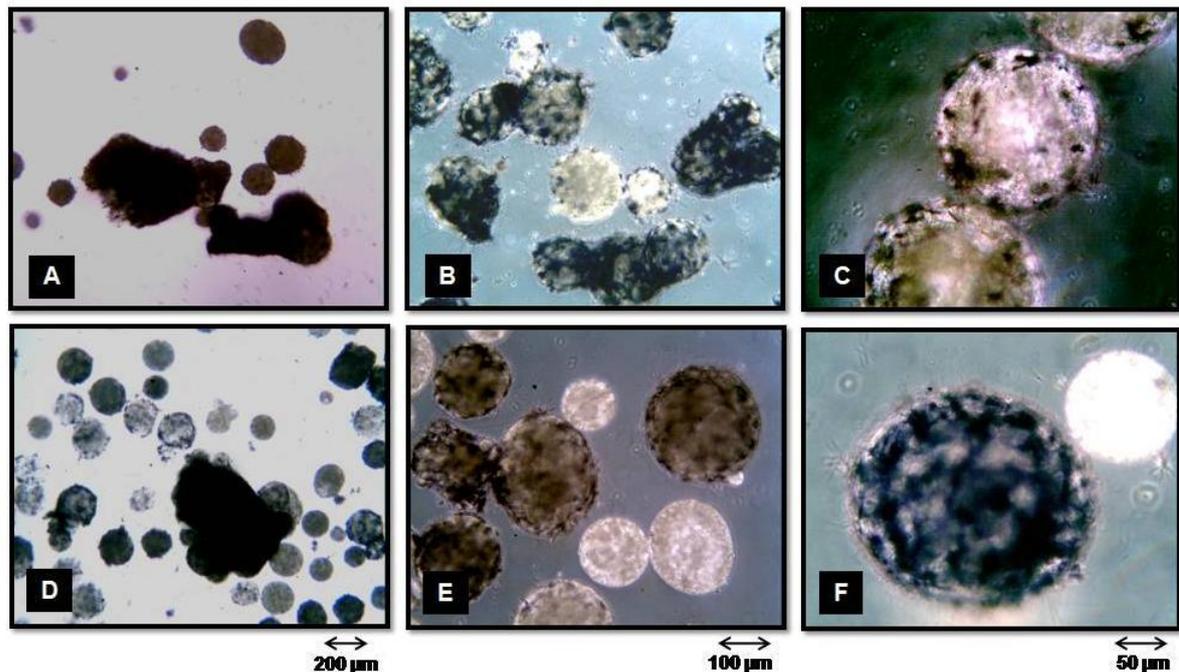


Figura 26 - Imagens de microscopia ótica do microcarregador Cultispher S com células em amostras do experimento E6 após 4 horas com MTT. O tempo de cultivo em (A), (B), (D), (E) e (F) foi de 6, 3, 14, 9 e de 7 dias, respectivamente. Em (C) o tempo foi de 6 horas. A magnificação foi de 40x para (A) e (D), de 100x para (B) e (E) e de 200x para (C) e (F).

Foi possível fazer algumas observações a respeito das mudanças realizadas nos procedimentos experimentais. O aumento de 2 horas na fase para a adesão e o tempo de repouso de 15 minutos proporcionaram uma quantificação menor de células na suspensão, depois de 6 horas, quando comparado com o E5. A substituição das trocas de meio por apenas adições, em 2, 6 e 12 dias, pode ter acarretado a baixa concentração dos nutrientes. O tratamento de todos os microcarregadores do cultivo com a tryple possibilitou cultivar a linhagem hBMSC-TERT no Cultispher S por um período de 15 dias e obter um fator de expansão celular de 9,70. A aglomeração de microcarregadores colonizados não foi evitada. Entretanto, ficou evidente que após os tratamentos com a tryple, o número de células aumentou devido à diminuição do tamanho dos aglomerados de microcarregadores. Por fim, a quantificação do número de células aderidas apenas pelo método do MTT foi suficiente para avaliar a metodologia estudada neste experimento.

4.7 Análise Geral dos Experimentos Realizados

Com o intuito de compreender a metodologia experimental desenvolvida neste trabalho durante o cultivo da linhagem hMSC-TERT em frasco spinner, o conjunto de experimentos pode ser dividido em três etapas: (a) três cultivos com o microcarregador Cytodex 1; (b) um cultivo com o microcarregador Cytodex 1 na presença de enzimas no meio de cultivo e (c) dois cultivos com o microcarregador Cultispher S;

Em (a), estão os cultivos E1, E2 e E3 com o microcarregador Cytodex 1. Progressivamente, mudanças nas condições experimentais foram feitas na tentativa de melhorar o fator de expansão celular, que foi maior em E3 (3,47). Entretanto, dois problemas dificultaram o andamento dos experimentos e o rendimento celular. Inicialmente, a não recuperação das células do microcarregador Cytodex 1, após o tratamento enzimático, restringiu as opções de metodologias para a quantificação do número de células durante o cultivo. Em seguida, a formação dos aglomerados de microcarregadores influenciou as condições ambientais para as células e dificultou a quantificação celular pelo método do MTT. Por isso, foi realizado o E4, etapa (b), com enzimas dissociativas de matriz extracelular no meio de cultivo para observarmos a influência da presença enzimática nos aglomerados de microcarregadores. Embora com um fator de expansão celular de 4,98, o maior obtido com o Cytodex 1, não foi possível minimizar a formação dos aglomerados.

Na etapa (c), com condições experimentais similares, foi realizado o E5 com o Cultispher S onde foi também observada a aglomeração de microcarregadores, porém foi possível a dissociação enzimática da matriz de gelatina desse microcarregador, recuperar as células com boa viabilidade, fazer análises de citometria de fluxo e de diferenciação celular. Nesse caso, o fator de expansão celular foi igual a 2,46. Para finalizar, o E6 foi realizado também com o Cultispher S e encerrou o conjunto de experimentos. Com os dois tratamentos de todos os microcarregadores do cultivo com a Tryple foi possível cultivar a linhagem hBMSC-TERT por 15 dias e obter o fator de expansão de 9,70, o maior deste trabalho.

Quanto aos nutrientes e aos metabólitos, a suplementação do meio de cultura feita até o E3 foi utilizada também nos experimentos posteriores. No geral, os nutrientes mais consumidos durante os cultivos foram a glicose, a glutamina e a arginina. E os metabólitos monitorados foram o ácido láctico e a amônia. As concentrações de ácido láctico em todos os experimentos foram menores que 20 mM. Já as concentrações de amônia foram menores que 5 mM até o E5. Apenas no E6, até 10 dias de cultivo, a concentração de amônia foi menor que 5 mM. Depois desse período a concentração aumentou bruscamente até, aproximadamente, 16 mM. Estudos de inibição da expansão celular no cultivo de células animais (Tabela 4) mostraram que com valores da concentração de ácido láctico menores de 20 mM não ocorre inibição. Já com 2-5 mM de amônia pode ocorrer inibição.

5. CONCLUSÕES

A seguir são apresentadas as conclusões mais importantes deste trabalho:

- (a) Foi possível cultivar a linhagem hMSC-TERT em frasco spinner com o microcarregador Cytodex 1. Esta técnica, após aprimoramentos, permitiu a obtenção de um fator de expansão celular de até 4,98, porém, apresentando como limitações relevantes para aplicações práticas duas dificuldades: quantificação celular durante o cultivo e recuperação adequada das células no final da expansão.
- (b) Também foi possível cultivar essa linhagem em condições semelhantes utilizando o microcarregador Cultispher S. Esta metodologia possibilitou obter um fator de expansão de 9,70 e a recuperação das células para o acompanhamento da quantificação celular durante o cultivo e para as análises de citometria de fluxo e de diferenciação celular.
- (c) O meio de cultura precisou ser reformulado para ser considerado apropriado para o cultivo eficiente das células hMSC-TERT utilizadas neste trabalho. A adição de glicose, glutamina e arginina é imprescindível para se dispor de um meio de cultura balanceado para o escalonamento (scale up) confiável e econômico da expansão dessas células.
- (d) A técnica de cultivo de CTMs em microcarregadores com biorreator tipo spinner enfrenta como principal obstáculo a formação de aglomerados de microcarregadores com células. A natureza desses aglomerados e o controle de sua formação exigem estudos mais específicos para poder assegurar melhores rendimentos na expansão celular.

6 Sugestões para os Próximos Trabalho

Para os próximos trabalhos nesta linha de pesquisa será importante desenvolver técnicas que diminuam a formação de aglomerados de microcarregadores com células já que esse problema é um fator limitante na expansão de células-tronco mesenquimais em microcarregadores.

REFERÊNCIAS

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.

ALTAMIRANO, C.; GÒDIA, F.; CAIRÓ, J. J.; Metabolismo de Células de Mamíferos Cultivadas *In Vitro*. 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, 2007.

ALTAMIRANO, C.; PAREDES, C.; CAIRÓ, J. J.; GÒDIA, F.; Improvement of CHO Cell Culture Medium Formulation: Simultaneous Substitution of Glucose and Glutamine. **Biotechnology Progress**, Spain, v.16, p. 69-75, 2000.

AMABLE, A.; BUTLER, M.; Cell Metabolism and its Control in Culture. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R.; **Animal Cell Technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy**. USA: Taylor & Francis Group, p. 75-110, 2008.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F.; **Biochemical Engineering Fundamentals**. New York: Mc-Graw-Hill International Editions, 1986.

BERNARDO, M. E.; AVANZINI, M. A.; PEROTTI, C.; COMETA, A. M.; MORETTA, A.; LENTA, E.; DEL FANTE, C.; NOVARA, F.; DE SILVESTRI, A.; AMENDOLA, G.; ZUFFARDI, O.; MACCARIO, R.; LOCATELLI, F.; Optimization of In Vitro Expansion of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for Cell-Therapy Approaches: Further Insights in the Search for a Fetal Calf Serum Substitute. **Journal of Cellular Physiology**, Italy, v. 211, p. 121–130, 2007.

BROOKE, G.; ROSSETI, T.; ILIC, N.; MURRAY, P.; HANCOCK, S.; PELEKANOS, R.; ATKINSON, K.; Points to Consider in the Designing Mesenchymal Stem Cell-Based Clinical Trials. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, Australia, v. 35, p. 279-285, 2008. Riview.

CHICO, E.; RODRIGREZ, G.; FIGUEREDO, A.; Biorreatores 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. 216-254, 2007.

CHU, L.; ROBINSON, D. K.; Industrial choices for protein production by large scale cell culture. **Current Opinion in Biotechnology**, v.12, p.180-187, 2001.

da SILVA JUNIOR, H.; BOROJEVIC, R.; Terapias Celulares e Células-Tronco. 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. 465-479, 2007.

EIBES, G.; dos 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**, Portugal, v. 146, p. 194-197, 2010. Short communication.

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**, Portugal, v. 132, p. 227-236, 2007.

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.

GE HEALTHCARE, Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods, 2005. Handbook.

GLACKEN, MW; Catabolic control of mammalian cell culture. **Biotechnology**, v. 6, p. 1941-1950, 1988.

GLACKEN, MW; ADEMA, E.; SINSKEY, A. J.; Mathematical descriptions of hybridomaculture kinetics I. Initial metabolic rates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p. 1376-1389, 1988.

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

GODARA, P.; NORDON, R. E.; MCFARLAND, C. D.; Mesenchymal stem cells in tissue engineering. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Australia, v. 83, p. 397-407, 2008. Mini-review.

GÓDIA, F.; CAIRÓ, J. J.; Metabolic Engineering of Animal Cells. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 24, p. 289-298, 2002.

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

KRETZMER, G; Industrial processes with animal cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Germany, v. 59, p. 135-142, 2002. Mini-review

Lei de Biossegurança nº 11.105 de 24 de março de 2005. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm. Acesso em 10/04/2010.

LÉO, P.; GALESI, 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: de Biofármacos a Terapia Gênica**. São Paulo: Editora Roca, p. 15-41, 2007.

MCQUEEN, A., BAILEY, E.,; Effect of ammonium ion and extracellular pH hybridoma cell metabolism and antibody production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 897-907, 1990.

MENDONÇA, R. Z.; PRADO, J. C. M.; PEREIRA, C. A.; Attachment, spreading and growth of VERO cells on microcarriers for the optimization of large scale cultures, **Bioprocess Engineering**, Brazil, v. 20, p 565-571, 1999.

MIHARA, K.; IMAI, C.; SMITH, E. C.; DOME, J. S.; DOMINICI, M.; VANIN, E.; CAMPANA, D.; Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cells immortalized by enforced expression of telomerase. **British Journal of Haematology**, USA, v. 120, p. 846-849, 2003. Short report.

MILLER, W. M.; WILKE, C. R.; BLANCH, H. W.; transient response of hibridoma cells to lactate and ammonia pulse and step changes in continues culture. **Bioprocess Engineering**, v.3, p. 113-122, 1988.

MIMEAULT, M.; HAUKE, R.; BATRA, S. K.; Stem Cells: A Revolution in Therapeutics - Recent Advances in Stem Cell Biology and Their Therapeutic Applications in Regenerative Medicine and Cancer Therapies. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, USA, v. 82, p. 252-264, 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: de Biofármacos a Terapia Gênica**. São Paulo: Editora Roca, 2007.

MELLO, I. M. V. G. C.; CONCEIÇÃO, M. M.; JORGE, S. A. C.; CRUZ, P. E.; ALVES, P.M. M.; CARRONDO, M. J. T.; PEREIRA, C. A.; Vacinas Virais: Conceitos, Princípios e Bioprocessos. 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, 2007.

NIMURA, A.; MUNETA, T.; KOGA, H.; MOCHIZUKI, T.; SUZUKI, K.; MAKINO, H.; UMEZAWA, A.; SEKIYA, I.; Increased Proliferation of Human Synovial Mesenchymal Stem Cells with Autologous Human Serum. **Arthritis & Rheumatism**, Japan, v. 58, p. 501–510, 2008.

PANEPUCCI, R. A.; SIUFI, J. L. C.; SILVA Jr., W. A.; SIQUIERA, R. P.; NEDER, L.; ORELLANA, M.; ROCHA, V.; COVAS, D. T.; ZAGO, M. A.; Comparison of Gene Expression of Umbilical Cord Vein and Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, Brazil, v. 22, p. 1263–1278, 2004.

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

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

SENSEBÉ, L.; Clinical grade production of mesenchymal stem cells. **Bio-Medical Materials and Engineering**, France, v. 18, p. 3-10, 2008. Supplement.

SINGH, V. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. **Cytotechnology**, v. 30, p.149-158, 1999.

SCHOP, D.; JANSSEN, F. W.;BORGART, E.;BRUIJN, J. D.; RADERSMA, R. v. D.; Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: growth and metabolism. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, Netherlands, v. 2, p. 126-135, 2008.

TOUBAI, T.; SUN, Y.; REDDY, P.; GVHD pathophysiology: is acute different from chronic? **Best Practice & Research Clinical Haematology**, USA, v. 21, p. 101-117, 2008.

WAGNER, R.; RYLL, T.; KRAFFT, H.; LEHMANN, J.; Variation of amino acids concentration in the medium of HU β -IFN and HU IL-2 producing cell lines. **Cytotechnology**, v.1, p, 145-150, 1988,

WANG, D. L; LIU, W. S.; HAN, B. Q.;XU, R. A.; The bioreactor: A powerful tool for large-scale cultivation of animal cells. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, p 397-403, 2005.

WEBER, C.; POHL, S.; PÖRTNER, 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.

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**, Canada, v. 28, p. 3110-3120, 2007.

YU, Y.; LI, K.; BAO, C.; LIU, T.; JIN, Y.; REN, H.; YUN, W.; Ex Vitro Expansion of Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells in Stirred Bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, China, v. 159, p. 110-118, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Curva padrão para o método do MTT para o E1, E2, E3, E4, E5 e E6 e curva padrão para o método do LDH para o E4.

Experimento 1

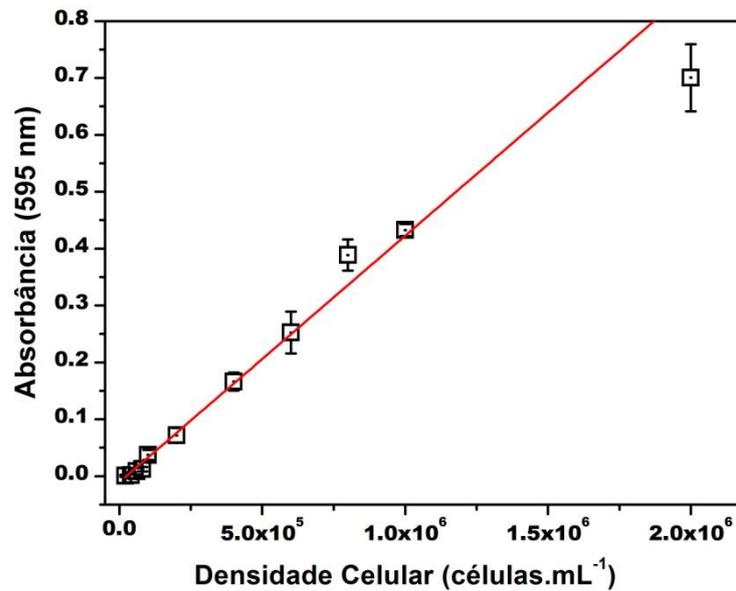


Figura A1 - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o E1. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 4,33 \times 10^{-7}$ e $b = -0,01$), com coeficiente de correlação de 0,9961. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.

Experimento 2

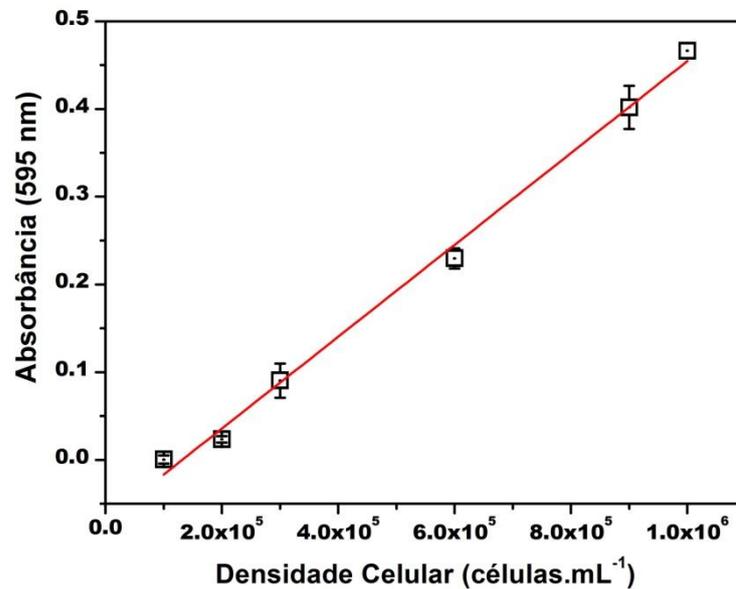


Figura A2 - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o E2. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 5,24 \times 10^{-7}$ e $b = -0,06$), com coeficiente de correlação de 0,9947. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.

Experimento 3

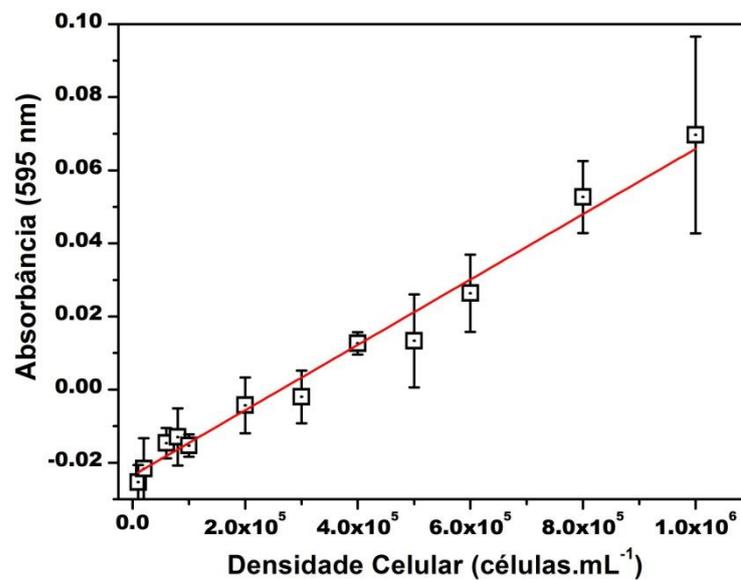


Figura A3 - Curva padrão do método do MTT (kit Invitrogen) para o E3. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 8,94 \times 10^{-8}$ e $b = -0,02$), com coeficiente de correlação de 0,9772. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.

Experimento 4

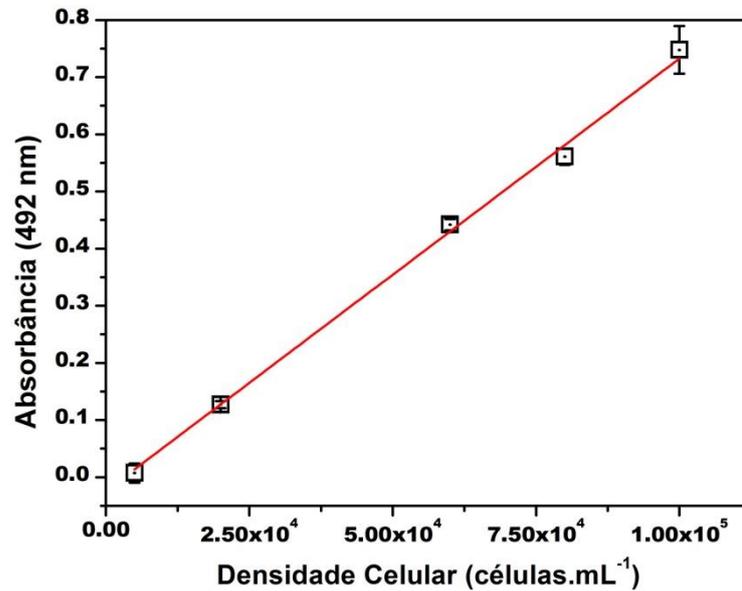


Figura A4 - Curva padrão do método da LDH (kit Sigma) para o E4. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 7,56 \times 10^{-6}$ e $b = -0,02$), com coeficiente de correlação de 0,9968. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas

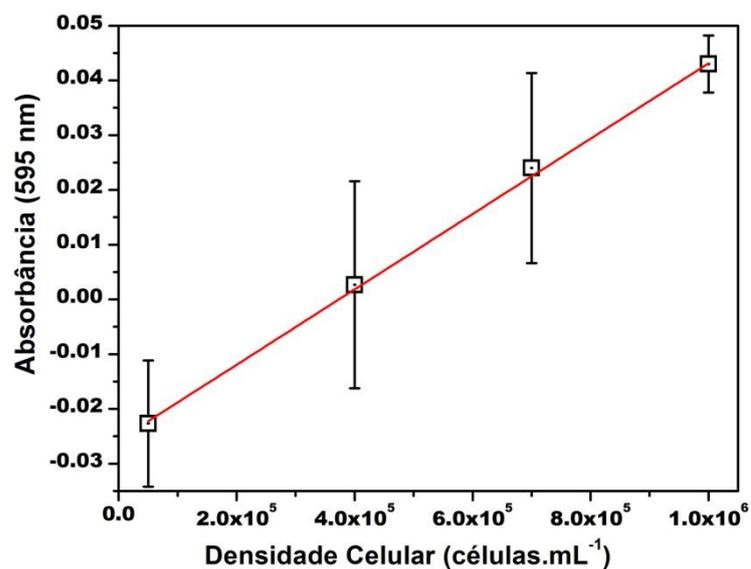


Figura A5 - Curva padrão do método do MTT (kit Invitrogen) para o E4. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 6,88 \times 10^{-8}$ e $b = -0,02$), com coeficiente de correlação de 0,9994. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.

Experimento 5

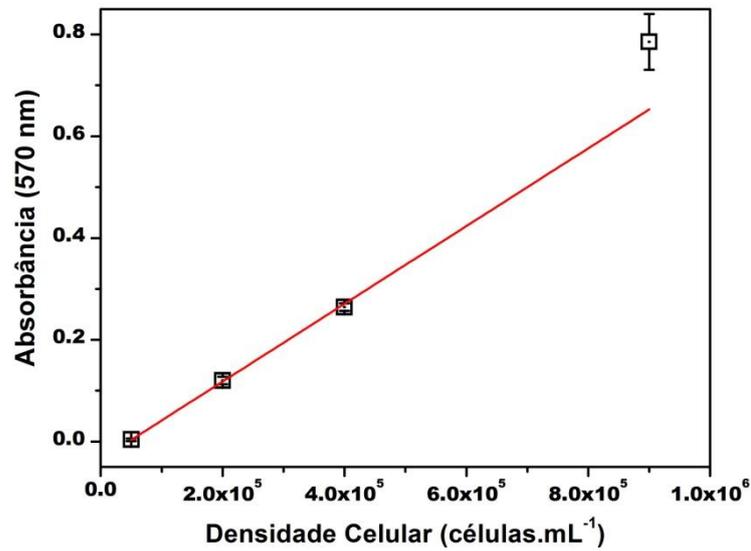


Figura A6 - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o E5. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 7,64 \times 10^{-7}$ e $b = -0,04$), com coeficiente de correlação de 0,9930. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.

Experimento 6

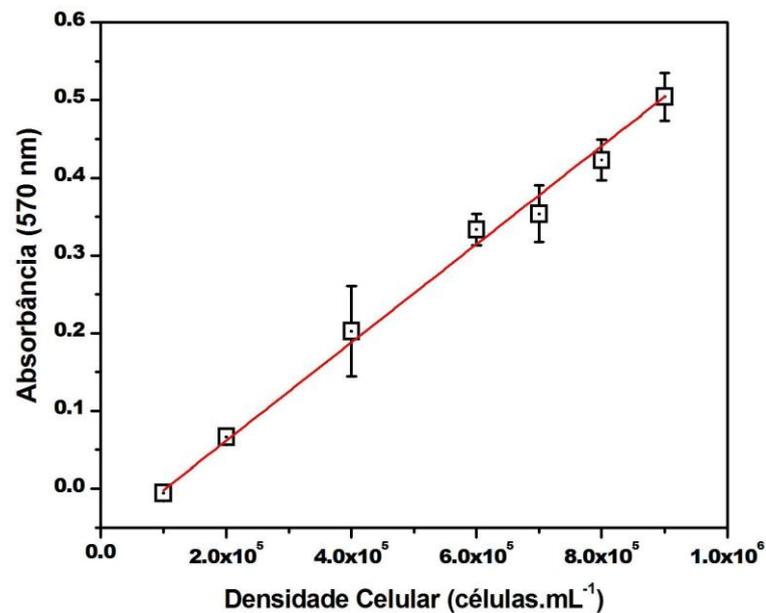


Figura A7 - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o E6. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 6,33 \times 10^{-7}$ e $b = -0,04$), com coeficiente de correlação de 0,9960. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.

APÊNDICE B – Correção do número de células totais pelo método da massa seca

O método de massa seca foi realizado para corrigir a massa de Cytodex 1 obtida experimentalmente com a sua massa teórica em todos os resultados obtidos pelo método do MTT, considerando desprezível a massa de células.

Por exemplo, no E3 em 4 horas, o volume no frasco spinner foi de 50 mL e a densidade de Cytodex 1 de 3 g.L⁻¹. O volume de amostra para a análise do MTT foi de 200 µL. Então, a massa teórica de microcarregador (m_T) dessa amostra foi de 0,0006 g. Ao aplicar a metodologia do MTT, uma das três densidades celulares experimentais (D_E) foi de 3,55x10⁵ células.mL⁻¹. A massa de microcarregadores (m_E) obtida após a secagem da amostra foi de 0,0017 g. Portanto, a densidade celular total (D_{ms}), após a correção com a massa seca, foi de 1,25x10⁵ células.mL⁻¹.

$$D_{ms} = D_E * \frac{m_T}{m_E} = 3,55 \times 10^5 \frac{\text{células}}{\text{mL}} * \frac{0,0006 \text{ g}}{0,0017 \text{ g}} = 1,25 \times 10^5 \frac{\text{células}}{\text{mL}}$$

APÊNDICE C – Tabelas dos valores de números de células em suspensão, células aderidas no microcarregador, pH do meio de cultivo, porcentagem de CO₂ na incubadora, volume do cultivo, concentração de aminoácidos, de glicose, de ácido láctico e de amônia para os experimentos E1, E2, E3, E4, E5 e E6.

Experimento 1

Tabela C1 - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Cytodex 1 no E1. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.

Tempo (horas)	Número de Células em Suspensão ± Desvio Padrão	Número de Células MTT ± Desvio Padrão
0	7,72E+06 -	0 0
6	1,25E+06 ± 2,89E+05	- -
22	9,00E+05 ± 4,10E+05	3,03E+06 ± 6,97E+05
47	6,90E+05 ± 5,63E+05	4,94E+06 ± 9,07E+05
47	6,67E+05 ± 8,19E+04	1,16E+07 ± 3,09E+06
71	5,13E+05 ± 2,65E+05	2,00E+07 ± 9,76E+05
71	4,17E+05 ± 1,44E+05	1,14E+07 ± 6,40E+05
96	2,94E+05 ± 1,18E+05	1,31E+07 ± 1,03E+06
96	6,25E+05 ± 3,23E+05	4,87E+06 ± 1,97E+05
121	5,29E+05 ± 2,25E+05	7,07E+06 ± 1,32E+05

Tabela C2 - Valores da porcentagem de CO₂ na incubadora, do pH no meio de cultivo e do volume no E1.

Tempo (horas)	% CO ₂	pH	Volume (mL)
0	12	-	21
6	-	7,35	50
22	10,0	7,28	48
47	7,0	7,30	46
47	-	7,47	50
71	7,0	7,22	48
71	-	7,38	50
96	6,0	7,22	47
96	-	7,46	50
121	5,0	7,25	47

Tabela C3 – Valores de aminoácidos referentes ao E1.

Tempo (horas)	Ác.Ascórbico asp (mM)	Ác.Glutâmico glu (mM)	Asparagina asn (mM)	Serina ser (mM)	Glutamina gln (mM)	Glicina gly (mM)	Histidina his (mM)	Arginina arg (mM)	Treonina thr (mM)	Alanina ala (mM)	Prolina pro (mM)	Tirosina tyr (mM)
6	0,10	0,37	0,25	0,26	2,58	0,57	0,11	0,68	0,26	0,39	0,27	0,17
22	0,10	0,41	0,23	0,26	2,38	0,57	0,08	0,6	0,26	0,45	0,29	0,18
47	0,14	0,60	0,26	0,27	2,48	0,65	0,12	0,00	0,28	0,59	0,34	0,19
71	0,10	0,44	0,18	0,22	1,64	0,52	0,10	0,00	0,17	0,49	0,29	0,15
96	0,14	0,66	0,23	0,26	2,06	0,58	0,11	0,00	0,23	0,62	0,29	0,17
121	0,13	0,65	0,24	0,25	2,12	0,61	0,12	0,00	0,26	0,67	0,32	0,18

Tabela C4 – Valores de aminoácidos, de glicose, de ácido láctico e de amônia no E1

Tempo (horas)	Valina val (mM)	Metionina met (mM)	Cisteína cys (mM)	Isoleucina ile (mM)	Leucina leu (mM)	Fenilalanina phe (mM)	Lisina lys (mM)	Glicose (mM)	Ác.Lático (mM)	Amônia (mM)
6	0,30	0,06	0,10	0,26	0,3	0,14	0,27	7,56	3,11	2,92
22	0,31	0,08	0,10	0,26	0,29	0,15	0,27	7,33	4,44	1,78
47	0,34	0,08	0,12	0,28	0,34	0,26	0,32	5,56	7,55	2,15
71	0,26	0,05	0,07	0,21	0,26	0,15	0,23	5,11	7,11	2,14
96	0,30	0,06	0,08	0,22	0,28	0,15	0,28	4,89	9,32	2,05
121	0,31	0,07	0,09	0,24	0,30	0,16	0,29	5,11	8,88	2,10

Experimento 2

Tabela C5 - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Cytodex 1 no E2. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.

Tempo (horas)	Número de Células em Suspensão ± Desvio Padrão	Número de Células MTT ± Desvio Padrão
0	6,98E+06 -	0 0
6	4,40E+05 ± 5,15E+05	1,86E+06 ± 1,67E+05
25	2,40E+05 0	3,08E+06 ± 6,40E+06
49	3,08E+05 ± 1,33E+05	9,99E+06 ± 4,46E+05
49	1,22E+05 ± 1,07E+05	1,35E+07 ± 1,42E+06
51	2,40E+05 0	3,86E+06 ± 4,57E+05
73	3,82E+05 ± 2,67E+05	1,50E+07 ± 4,12E+05
73	1,85E+05 ± 1,85E+05	1,33E+07 ± 1,77E+05
75	1,58E+05 ± 1,39E+05	1,49E+07 ± 2,49E+05
97,5	5,38E+05 ± 1,33E+05	8,43E+06 ± 5,03E+05
97,5	3,07E+05 ± 1,07E+05	4,40E+06 ± 2,13E+05
99,5	2,40E+05 0	6,12E+06 ± 6,76E+05
120,5	1,27E+06 ± 5,47E+05	4,78E+06 ± 3,64E+04
120,5	4,33E+05 ± 3,85E+05	3,65E+06 ± 2,64E+04
122,5	6,38E+05 ± 3,65E+05	2,43E+06 ± 4,21E+05
145	3,45E+05 ± 2,30E+05	1,05E+07 ± 2,25E+06
145	3,07E+05 ± 2,15E+05	1,63E+07 ± 9,45E+05
147	4,80E+05 0	1,84E+07 ± 1,22E+06
169	2,90E+05 ± 1,15E+05	9,21E+06 ± 4,40E+05

Tabela C6 - Valores da porcentagem de CO₂ na incubadora, do pH no meio de cultivo e do volume no E2.

Tempo (horas)	% CO₂	pH	Volume (mL)
0	14		19
6	-	7.19	50
25	10	7.28	48
49	8	7.10	46
49	-	7.25	37
51	10	7.29	48
73	8	7.01	46
73	-	7.31	37
75	10	7.29	48
97,5	6.5	7.02	46
97,5	-	7.25	37
99,5	10	7.29	48
120,5	6	7.06	46
120,5	-	7.32	37
122,5	12	7.30	48
145	6	7.24	46
145	-	7.4	37
147	12	7.37	48
169	7	7.23	46

Tabela C7 - Valores de aminoácidos referentes ao E2.

Tempo (horas)	Ác.Ascórbico asp (mM)	Ác.Glutâmico glu (mM)	Asparagina asn (mM)	Serina ser (mM)	Glutamina gln (mM)	Glicina gly (mM)	Histidina his (mM)	Arginina arg (mM)	Treonina thr (mM)	Alanina ala (mM)	Prolina pro (mM)	Tirosina tyr (mM)
6	0,07	0,24	0,23	0,23	2,18	0,53	0,06	1,07	0,21	0,38	0,31	0,13
25	0,12	0,46	0,29	0,28	2,67	0,68	0,06	1,20	0,22	0,58	0,35	0,17
49	0,12	0,59	0,27	0,24	2,28	0,54	0,06	0,77	0,18	0,72	0,36	0,16
73	0,10	0,52	0,25	0,24	2,15	0,62	0,06	0,63	0,18	0,68	0,35	0,15
97,5	0,10	0,51	0,23	0,23	2,18	0,62	0,06	0,61	0,19	0,70	0,34	0,15
120,5	0,06	0,32	0,16	0,19	1,38	0,39	0,04	0,40	0,13	0,45	0,21	0,09
145	0,10	0,54	0,25	0,24	1,23	0,66	0,06	0,77	0,20	0,74	0,35	0,16
169	0,10	0,51	0,24	0,29	2,50	0,55	0,05	0,76	0,19	0,69	0,34	0,16

Tabela C8 - Valores de aminoácidos, de glicose, de ácido láctico e de amônia no E2.

Tempo (horas)	Valina val (mM)	Metionina met (mM)	Cisteína cys (mM)	Isoleucina ile (mM)	Leucina leu (mM)	Fenilalanina phe (mM)	Lisina lys (mM)	Glicose (mM)	Ac.Lático (mM)	Amônia (mM)
6	0,30	0,07	0,07	0,27	0,29	0,15	0,24	9.33	4,00	1.75
25	0,36	0,08	0,10	0,31	0,35	0,17	0,32	8.22	7,55	1.71
49	0,34	0,08	0,09	0,27	0,32	0,16	0,30	4.67	13,32	2.00
73	0,32	0,08	0,09	0,26	0,30	0,16	0,28	4.89	15,98	2.01
97,5	0,29	0,07	0,10	0,25	0,29	0,15	0,28	4.67	16,87	1.99
120,5	0,19	0,04	0,06	0,16	0,19	0,10	0,18	4.67	17,76	1.68
145	0,31	0,08	0,11	0,27	0,31	0,16	0,31	5.11	16,43	2.02
169	0,32	0,07	0,10	0,27	0,30	0,16	0,29	5.78	15,10	2.20

Experimento 3

Tabela C9 - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Cytodex 1 no E3. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.

Tempo (horas)	Número de Células em Suspensão		Número de Células MTT	
	± Desvio Padrão		± Desvio Padrão	
0	6,25E+06	-	0	0
4	5,00E+05	± 3,54E+05	5,58E+06	± 8,75E+05
24	4,03E+05	± 3,93E+05	7,10E+06	± 1,16E+06
24	3,38E+05	± 5,11E+05	5,81E+06	± 2,60E+05
48	6,00E+04	± 1,20E+05	8,77E+06	± 6,61E+05
48	1,40E+05	± 1,62E+05	7,26E+06	± 5,05E+06
72	4,38E+05	± 2,39E+05	2,17E+07	± 1,42E+06
72	6,53E+05	± 7,63E+05	2,06E+07	± 3,57E+06
96	7,15E+05	± 1,30E+05	1,96E+07	± 8,00E+06
96	2,25E+05	± 4,50E+05	1,57E+07	± 1,65E+06
120	7,29E+05	± 2,55E+05	2,07E+07	± 9,17E+06
120	4,65E+05	± 5,37E+05	1,35E+07	± 4,53E+06
144	2,80E+05	± 2,29E+05	1,51E+07	± 3,78E+06
144	3,20E+05	0	1,21E+07	± 1,59E+06
168	3,63E+05	± 2,78E+05	1,18E+07	± 1,54E+06
168	2,48E+05	± 3,16E+05	1,09E+07	± 2,98E+06
192	4,50E+05	± 3,87E+05	1,15E+07	± 5,16E+06
218	1,55E+05	± 1,79E+05	9,46E+06	± 1,81E+06

Tabela C10 - Valores da porcentagem de CO₂ na incubadora, do pH no meio de cultivo, do volume no e da agitação no E3.

Tempo (horas)	% CO₂	pH	Volume (mL)	Agitação (rpm)
4	14,0	7,48	50	40
8	10,0	7,42	48	40
24	10,0	7,29	46	40
24	-	7,36	54	-
32	8,0	7,29	52	50
40	8,0	7,30	50	50
48	8,0	7,15	48	50
48	-	7,22	56	-
56	6,0	7,24	54	52
64	4,0	7,12	52	52
72	2,0	7,17	50	52
72	-	7,40	58	-
80	6,0	7,28	56	54
88	6,0	7,22	54	54
96	4,0	7,18	52	54
96	-	7,27	60	-
104	4,0	7,40	58	56
112	5,0	7,20	56	56
120	3,0	7,20	54	56
120	-	7,32	62	-
128	5,0	7,31	60	58
136	5,0	7,20	58	58
144	2,5	7,19	56	58
144	-	7,25	64	
152	5,0	7,18	62	60
160	3,0	7,20	60	60
168	1,5	7,17	58	60
168	-	7,36	66	-
176	5,0	7,22	64	62
184	3,0	7,16	62	62
196	1,0	7,04	60	62
197	-	7,23	68	-
200	5,0	7,42	66	62
208	5,0	7,22	64	62
218	2,5	7,17	62	62

Tabela C11 - Valores de aminoácidos referentes ao E3.

Tempo (horas)	Ác. Ascórbico asp (mM)	Ác. Glutâmico glu (mM)	Asparagina asn (mM)	Serina ser (mM)	Glutamina gln (mM)	Glicina gly (mM)	Histidina his (mM)	Arginina arg (mM)	Treonina thr (mM)	Alanina ala (mM)	Prolina pro (mM)	Tirosina tyr (mM)
4	0,13	0,42	0,19	0,17	2,98	0,63	0,05	1,25	0,18	0,37	0,33	0,14
48	0,12	0,49	0,19	0,13	2,37	0,57	0,06	0,81	0,10	0,51	0,38	0,14
72	0,12	0,59	0,20	0,14	2,45	0,60	0,07	0,46	0,09	0,67	0,39	0,15
120	0,14	0,58	0,20	0,16	2,62	0,63	0,08	0,59	0,11	0,66	0,38	0,15
168	0,10	0,39	0,17	0,11	1,86	0,50	0,07	0,53	0,09	0,44	0,39	0,14
218	0,14	0,53	0,22	0,14	2,71	0,66	0,08	0,84	0,13	0,56	0,40	0,15

Tabela C12 - Valores de aminoácidos, de glicose, de ácido láctico e de amônia no E3.

Tempo (horas)	Valina val (mM)	Metionina met (mM)	Cisteína cys (mM)	Isoleucina ile (mM)	Leucina leu (mM)	Fenilalanina phe (mM)	Lisina lys (mM)	Glicose (mM)	Ác. Láctico (mM)	Amônia (mM)
4	0,28	0,06	0,10	0,26	0,28	0,15	0,23	2,66	14,21	4,04
48	0,27	0,06	0,05	0,27	0,23	0,15	0,23	4,88	12,43	4,60
72	0,30	0,05	0,05	0,25	0,28	0,16	0,25	10,21	4,00	5,01
120	0,30	0,06	0,07	0,25	0,28	0,16	0,27	2,44	19,09	3,37
168	0,22	0,04	0,05	0,2	0,22	0,15	0,16	4,88	16,87	4,02
218	0,29	0,06	0,07	0,25	0,28	0,17	0,25	5,10	16,87	3,37

Experimento 4

Tabela C13 - Valores das análises de células mortas no sobrenadante dos cultivos em frasco T obtidos pelo método da LDH.

Tempo (horas)	Densidade Celular (células.mL ⁻¹)	Densidade Celular (células.mL ⁻¹)	Densidade Celular (células.mL ⁻¹)
	Controle ± Desvio padrão	5x ± Desvio padrão	10x ± Desvio padrão
4	5,71E+04 ± 6,39E+03	3,71E+04 ± 6,83E+03	3,86E+04 ± 5,88E+03
20,5	6,83E+04 ± 1,57E+04	6,59E+04 ± 5,83E+03	6,86E+04 ± 5,42E+03
25	6,56E+04 ± 5,51E+03	6,86E+04 ± 5,75E+03	5,07E+04 ± 6,85E+03
34,5	7,92E+04 ± 5,70E+03	6,30E+04 ± 5,86E+03	7,11E+04 ± 6,95E+03
39	8,22E+04 ± 9,33E+03	7,67E+04 ± 7,70E+03	6,24E+04 ± 8,99E+03
59	7,82E+04 ± 6,44E+03	7,78E+04 ± 6,44E+03	6,11E+04 ± 6,28E+03

Tabela C14 - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Cytodex 1 no E4. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.

Tempo (horas)	Número de Células em Suspensão		Número de Células MTT	
	± Desvio Padrão		± Desvio Padrão	
0	6,25E+06	-	0	0
4	4,69E+05	3,13E+05	6,19E+06	3,09E+05
24	9,00E+04	6,00E+04	1,24E+07	1,21E+06
48	1,15E+05	9,39E+04	1,52E+07	2,01E+06
48	0,00E+00	0,00E+00	1,36E+07	1,76E+06
72	1,11E+05	1,38E+05	1,49E+07	7,56E+06
72	3,13E+04	6,25E+04	1,53E+07	7,31E+06
96	6,24E+04	1,02E+05	3,09E+07	2,59E+06
96	3,13E+04	6,25E+04	2,77E+07	2,59E+06
120	1,65E+05	1,42E+05	2,26E+07	1,43E+06
120	9,38E+04	6,25E+04	1,66E+07	4,32E+05
145	2,48E+05	1,05E+05	1,46E+07	3,75E+06
145,5	2,10E+05	1,15E+05	1,36E+07	9,22E+05
168	9,75E+04	6,50E+04	1,49E+07	7,03E+06
169	3,13E+04	6,25E+04	1,64E+07	8,09E+06

Tabela C15 - Valores da porcentagem de CO₂ na incubadora, do pH no meio de cultivo e o do volume no E4.

Tempo (horas)	% CO₂	pH	Volume (mL)
4	13	7,15	50
24	8	7,00	48
32	4	7,17	50
40	2	7,18	48
48	0	7,27	46
48	-	7,37	44
56	5	7,17	48
64	2	7,26	46
72	2	7,17	44
72	-	7,39	50
80	4	7,16	48
88	1	7,18	46
96	1	7,21	49
96	-	7,38	50
104	3	7,10	48
112	0	7,35	46
120	0	7,20	44
120	-	7,42	50
128	4	7,22	48
136	0	7,39	46
145	0	7,21	44
145	-	7,42	48
152	5	7,42	56
160	5	7,33	54
168	5	7,24	52
168	-	7,43	50
176	5	7,37	58
192	5	7,27	56

Tabela C16 - Valores de aminoácidos referentes ao E4.

Tempo (horas)	Ác.Ascórbico asp (mM)	Ác.Glutâmico glu (mM)	Asparagina asn (mM)	Serina ser (mM)	Glutamina gln (mM)	Glicina gly (mM)	Histidina his (mM)	Arginina arg (mM)	Treonina thr (mM)	Alanina ala (mM)	Prolina pro (mM)	Tirosina tyr (mM)
4	0,16	0,50	0,16	0,14	3,26	0,48	0,10	2,18	0,24	0,42	0,32	0,16
24	0,12	0,44	0,12	0,10	2,32	0,27	0,06	1,68	0,20	0,41	0,26	0,12
48	0,13	0,57	0,12	0,11	2,36	0,36	0,09	1,7	0,22	0,60	0,30	0,14
72	0,12	0,56	0,12	0,12	2,43	0,37	0,10	1,88	0,22	0,58	0,32	0,14
96	0,12	0,53	0,12	0,10	2,28	0,36	0,10	1,58	0,23	0,56	0,30	0,14
120	0,10	0,44	0,10	0,08	1,79	0,30	0,06	1,12	0,18	0,46	0,24	0,10
145	0,10	0,49	0,10	0,10	1,98	0,31	0,07	1,18	0,20	0,50	0,26	0,12
168	0,20	0,60	0,12	0,14	2,92	0,40	0,10	1,78	0,24	0,51	0,34	0,16

Tabela C17 - Valores de aminoácidos, de glicose, de ácido láctico e de amônia no E4.

Tempo (horas)	Valina val (mM)	Metionina met (mM)	Cisteína cys (mM)	Isoleucina ile (mM)	Leucina leu (mM)	Fenilalanina phe (mM)	Lisina lys (mM)	Glicose (mM)	Ac.Lático (mM)	Amônia (mM)
4	0,35	0,08	0,13	0,33	0,34	0,16	0,31	9,56	5,77	2,32
24	0,27	0,06	0,10	0,24	0,26	0,13	0,24	6,44	8,88	3,14
48	0,29	0,06	0,10	0,26	0,28	0,14	0,26	4,89	16,43	2,28
72	0,31	0,06	0,10	0,28	0,29	0,15	0,28	4,89	13,77	1,37
96	0,30	0,06	0,10	0,26	0,28	0,14	0,26	4,89	15,54	2,03
120	0,22	0,04	0,08	0,20	0,22	0,10	0,20	3,78	13,77	1,65
145	0,26	0,06	0,08	0,23	0,25	0,12	0,24	3,78	13,32	1,24
168	0,34	0,08	0,11	0,31	0,33	0,17	0,31	7,56	11,55	0,56

Experimento 5

Tabela C18 - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Cultispher S no E5. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.

Tempo (horas)	Número de Células em Suspensão		Número de Células MTT	
	± Desvio Padrão		± Desvio Padrão	
0	6.00E+06	-	0	0
4	9.38E+05	± 6.57E+05	5.03E+06	± 6,18E+04
24	2,25E+05	± 0,00E+00	4,74E+06	± 1,00E+05
47	6,26E+05	± 1,84E+05	4,66E+06	± 7,14E+04
47	1,25E+05	± 1,44E+05	6,18E+06	± 1,11E+05
71	2,15E+05	± 0,00E+00	8,69E+06	± 1,70E+06
71	2,50E+05	± 0,00E+00	7,36E+06	± 2,16E+05
95	2,15E+05	± 1,75E+05	1,20E+07	± 2,32E+05
95	5,00E+05	± 4,56E+05	1,47E+07	± 7,24E+05
119	3,23E+05	± 2,15E+05	1,06E+07	± 5,31E+04
119	3,13E+05	± 3,15E+05	1,01E+07	± 6,18E+04
143	8,50E+05	± 1,57E+06	7,76E+06	± 1,08E+05
167	8,87E+04	± 1,75E+03	3,94E+06	± 2,16E+04

Tabela C19 - Valores do número de células recuperadas do Cultispher S e da viabilidade no E5, após o tratamento com as enzimas tripsina e tryple.

Tempo (horas)	Número de Células Tripsina	Viabilidade (%) Tripsina	Número de Células Tryple	Viabilidade (%) Tryple
	4	2,75E+06	90,90	3,38E+06
24	3,15E+06	85,71	4,86E+06	97,67
47	1,16E+06	83,33	2,31E+06	83,33
47	4,50E+06	80,56	3,67E+06	72,73
71	4,86E+06	88,24	5,50E+06	88,24
71	5,40E+06	97,67	6,25E+06	94
95	7,22E+06	94,02	1,48E+07	97,83
95	7,00E+06	91,07	9,00E+06	86,11
143	4,60E+06	10	4,32E+06	16
167	1,40E+06	93,75	3,41E+06	66,66

Tabela C20 - Valores da porcentagem de CO₂ na incubadora, do pH no meio de cultivo e do volume no E5.

Tempo (horas)	% CO₂	pH	Volume (mL)
4	12	7,30	50
24	6	7,30	45
30	6	7,32	42,5
38	6	7,22	40,5
48	4	7,21	38,5
48	-	7,23	50
54	3	7,35	47
61	4	7,23	45
71	2	7,21	43
71	-	7,30	50
79	5	7,26	47
86	2	7,30	45
95	2	7,10	43
95	-	7,31	50
101	4	7,25	47
110	1	7,28	45
119	1	7,10	43
119	-	7,39	50
124	4	7,24	47
134	1	7,24	42
143	1	7,11	40
151	0	7,06	37
167	0	6,76	35

Tabela C21 - Valores de aminoácidos referentes ao E5.

Tempo (horas)	Ác. Ascórbico asp (mM)	Ác. Glutâmico glu (mM)	Asparagina asn (mM)	Serina ser (mM)	Glutamina gln (mM)	Glicina gly (mM)	Histidina his (mM)	Arginina arg (mM)	Treonina thr (mM)	Alanina ala (mM)	Prolina pro (mM)	Tirosina tyr (mM)
4	0,08	0,32	0,21	0,12	1,73	0,43	0,10	1,68	0,16	0,35	0,26	0,12
24	0,07	0,38	0,22	0,13	1,6	0,44	0,10	1,66	0,16	0,40	0,29	0,12
47	0,08	0,46	0,24	0,12	1,58	0,46	0,10	1,58	0,13	0,46	0,30	0,12
71	0,06	0,38	0,21	0,12	1,32	0,39	0,08	1,28	0,13	0,42	0,28	0,10
95	0,06	0,38	0,21	0,10	1,28	0,40	0,09	1,12	0,14	0,44	0,30	0,10
119	0,06	0,36	0,20	0,10	1,28	0,41	0,10	0,58	0,14	0,48	0,30	0,10
143	0,06	0,39	0,22	0,10	1,27	0,40	0,10	0,72	0,14	0,52	0,30	0,10

Tabela C22 - Valores de aminoácidos, de glicose, de ácido láctico e de amônia no E5.

Tempo (horas)	Valina val (mM)	Metionina met (mM)	Cisteína cys (mM)	Isoleucina ile (mM)	Leucina leu (mM)	Fenilalanina phe (mM)	Lisina lys (mM)	Glicose (mM)	Ác. Láctico (mM)	Amônia (mM)
4	0,29	0,06	0,08	0,30	0,31	0,16	0,29	11,57	3,29	0,70
24	0,30	0,04	0,06	0,28	0,29	0,16	0,30	9,50	5,11	0,62
47	0,28	0,05	0,04	0,26	0,27	0,16	0,25	8,68	10,08	0,88
71	0,24	0,04	0,04	0,24	0,32	0,12	0,20	7,15	11,46	1,07
95	0,22	0,02	0,02	0,21	0,22	0,14	0,18	6,02	12,66	1,36
119	0,22	0,03	0,02	0,20	0,20	0,12	0,19	5,84	13,85	2,19
143	0,24	0,02	0,02	0,22	0,22	0,14	0,21	4,80	13,01	1,62

Experimento 6

Tabela C23 - Valores do número de células em suspensão e aderidas no Cultispher S no E6. Os resultados para células aderidas estão corrigidos com massa seca e foram obtidos pelo método do MTT.

Tempo (dias)	Número de Células em Suspensão ± Desvio Padrão		Número de Células MTT ± Desvio Padrão	
0,00	6,25E+06	-	0	0
0,25	5,63E+05	± 4,73E+05	6,94E+06	± 3,64E+05
1,00	4,20E+05	± 3,02E+05	1,16E+07	± 1,13E+06
2,00	1,05E+05	± 1,21E+05	2,01E+07	± 9,16E+05
2,00	1,88E+05	± 2,39E+05	1,48E+07	± 1,87E+06
3,00	1,10E+05	± 2,20E+05	2,85E+07	± 8,94E+05
3,00	6,25E+04	± 1,25E+05	2,90E+07	± 1,02E+06
3,98	4,95E+05	± 4,54E+05	1,95E+07	± 1,07E+06
4,02	2,78E+06	± 1,36E+06	1,80E+07	± 6,29E+05
4,27	1,09E+06	± 0,00E+00	1,69E+07	± 1,50E+06
5,13	5,35E+05	± 4,37E+05	2,59E+07	± 6,54E+05
6,00	3,94E+05	± 5,03E+05	3,23E+07	± 6,72E+05
6,00	2,78E+05	± 3,20E+05	2,59E+07	± 1,18E+06
7,00	6,81E+05	± 6,86E+05	4,32E+07	± 9,14E+06
7,00	4,16E+05	± 2,78E+05	4,06E+07	± 8,47E+05
7,96	0,00E+00	± 0,00E+00	4,63E+07	± 1,08E+06
7,96	0,00E+00	± 0,00E+00	2,86E+07	± 7,81E+05
9,00	6,69E+05	± 5,12E+05	5,25E+07	± 1,57E+06
9,00	5,55E+05	± 4,53E+05	5,24E+07	± 2,15E+06
9,83	1,82E+06	± 1,24E+06	2,91E+07	± 1,18E+06
9,92	7,44E+06	± 6,82E+05	1,94E+07	± 1,87E+06
10,17	1,09E+06	± 5,45E+05	2,17E+07	± 1,06E+06
11,00	1,07E+06	± 1,31E+06	2,99E+07	± 1,05E+06
12,00	2,89E+06	± 1,74E+06	6,06E+07	± 2,66E+06
12,00	2,50E+06	± 7,17E+05	4,07E+07	± 3,01E+06
13,00	8,18E+05	± 7,04E+05	4,79E+07	± 5,38E+05
13,00	1,06E+06	± 3,80E+05	4,75E+07	± 8,47E+05
14,00	2,59E+06	± 1,63E+06	3,71E+07	± 2,69E+05
14,00	2,32E+06	± 1,33E+06	3,35E+07	± 4,51E+05
15,00	6,50E+05	± 4,98E+05	2,08E+07	± 3,50E+05

Tabela C24 - Valores da porcentagem de CO₂ na incubadora, do pH no meio de cultivo e do volume no E6,

Tempo (dias)	% CO₂	pH	Volume (mL)
0,25	12	7,10	50
1,00	6	7,14	48
1,25	3	7,27	46
1,63	2	7,34	44
2,00	2	7,16	42
2,00		7,24	50
2,29	5	7,05	48
2,88	2,5	7,06	46
3,00	0	7,07	44
3,00		7,38	50
3,29	5	7,12	48
3,60	2,5	7,20	46
3,98	1	7,12	44
4,02		7,43	111
4,27	10	7,14	109
5,13	4	7,19	107
5,42	0	7,45	105
6,00	5	7,01	103
6,00		7,09	111
6,29	0	7,20	109
6,63	0	7,19	107

Tabela C25 – Continuação da Tabela 24.

Tempo (dias)	% CO₂	pH	Volume (mL)
7,00	0	7,13	109
7,00		7,38	111
7,38	2	7,22	109
7,63	0	7,23	107
7,96	0	7,23	109
7,96		7,22	111
8,25	2	7,07	109
9,00	0	7,21	107
9,00		7,30	111
9,33	2	7,28	109
9,63	0	7,16	106
9,83	0	7,07	104
9,92		7,55	111
10,17	10	7,27	109
11,00	4	7,27	107
12,00	2	7,00	105
12,00		7,09	111
13,00	0	6,93	109
13,00		7,22	111
14,00	0	6,96	109
14,00		7,23	111
15,00	0	7,08	104

Tabela C26 - Valores de aminoácidos referentes ao E6.

Tempo (horas)	Ác.Ascórbico asp (mM)	Ác.Glutâmico glu (mM)	Asparagina asn (mM)	Serina ser (mM)	Glutamina gln (mM)	Glicina gly (mM)	Histidina his (mM)	Arginina arg (mM)	Treonina thr (mM)	Alanina ala (mM)	Prolina pro (mM)	Tirosina tyr (mM)
0,25	0,13	0,41	0,22	0,41	2,92	0,70	0,13	1,69	0,21	0,25	0,13	0,41
1,00	0,12	0,44	0,19	0,40	2,59	0,64	0,12	1,41	0,20	1,00	0,12	0,44
2,00	0,13	0,58	0,23	0,39	3,09	0,90	0,15	1,15	0,18	2,00	0,13	0,58
3,00	0,10	0,48	0,17	0,53	2,11	0,60	0,12	0,55	0,13	3,00	0,10	0,48
3,98	0,10	0,44	0,16	0,52	2,04	0,57	0,11	0,33	0,13	3,98	0,10	0,44
5,13	0,13	0,44	0,17	0,47	2,72	0,71	0,12	1,22	0,18	5,13	0,13	0,44
6,00	0,15	0,58	0,23	0,59	3,00	0,82	0,16	0,84	0,18	6,00	0,15	0,58
7,00	0,14	0,60	0,23	0,45	2,79	0,85	0,18	0,08	0,16	7,00	0,14	0,60
7,96	0,13	0,55	0,20	0,52	2,65	0,87	0,15	0,23	0,15	7,96	0,13	0,55
9,00	0,16	0,65	0,23	0,42	3,11	0,83	0,17	0,03	0,19	9,00	0,16	0,65
9,83	0,14	0,58	0,21	0,33	2,70	0,75	0,16	0,03	0,18	9,83	0,14	0,58
11,00	0,15	0,57	0,24	0,41	2,94	0,92	0,15	1,02	0,17	11,00	0,15	0,57
12,00	0,12	0,56	0,20	0,31	2,37	0,78	0,15	0,03	0,15	12,00	0,12	0,56
13,00	0,13	0,65	0,22	0,55	2,52	0,83	0,16	0,03	0,14	13,00	0,13	0,65
14,00	0,14	0,64	0,23	0,41	2,80	0,86	0,17	0,04	0,16	14,00	0,14	0,64
15,00	0,10	0,42	0,17	0,46	1,96	0,57	0,11	0,16	0,11	15,00	0,10	0,42

Tabela C27 - Valores de aminoácidos, de glicose, de ácido láctico e de amônia no E6.

Tempo (horas)	Valina val (mM)	Metionina met (mM)	Cisteína cys (mM)	Isoleucina ile (mM)	Leucina leu (mM)	Fenilalanina phe (mM)	Lisina lys (mM)	Glicose (mM)	Ac.Lático (mM)	Amônia (mM)
0,25	0,28	0,07	0,11	0,28	0,28	0,14	0,26	8,56	2,89	0,66
1,00	0,25	0,07	0,10	0,24	0,26	0,13	0,25	7,56	5,11	0,79
2,00	0,28	0,07	0,11	0,26	0,28	0,15	0,28	5,44	10,88	1,59
3,00	0,22	0,05	0,07	0,20	0,22	0,11	0,21	3,00	13,99	1,66
3,98	0,22	0,05	0,07	0,20	0,21	0,11	0,21	4,11	12,66	1,65
5,13	0,26	0,07	0,10	0,25	0,26	0,13	0,25	7,78	4,88	2,80
6,00	0,30	0,07	0,10	0,28	0,29	0,15	0,28	6,22	7,33	2,04
7,00	0,30	0,07	0,07	0,28	0,29	0,16	0,28	4,00	10,44	2,43
7,96	0,27	0,07	0,07	0,25	0,27	0,14	0,26	4,33	10,44	2,90
9,00	0,32	0,08	0,10	0,26	0,25	0,15	0,31	4,22	7,33	2,52
9,83	0,28	0,07	0,06	0,26	0,28	0,15	0,27	4,44	9,99	4,13
11,00	0,29	0,07	0,08	0,29	0,27	0,23	0,26	5,89	6,66	4,75
12,00	0,25	0,06	0,03	0,22	0,24	0,13	0,25	3,22	10,88	9,62
13,00	0,30	0,07	0,01	0,26	0,29	0,16	0,28	3,33	11,55	6,08
14,00	0,31	0,07	0,03	0,28	0,30	0,16	0,30	3,33	9,99	10,32
15,00	0,21	0,05	0,03	0,20	0,21	0,11	0,19	6,11	9,10	15,81