

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

MARLEI LEANDRO DE MENDONÇA

**EXPANSÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS EM
FRASCO SPINNER E AVALIAÇÃO DE ADITIVOS PARA DIMINUIR A
AGLOMERAÇÃO DE MICROCARREGADORES**

SÃO CARLOS

2013

**EXPANSÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS EM
FRASCO SPINNER E AVALIAÇÃO DE ADITIVOS PARA DIMINUIR A
AGLOMERAÇÃO DE MICROCARREGADORES**

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

MARLEI LEANDRO DE MENDONÇA

**EXPANSÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS EM
FRASCO SPINNER E AVALIAÇÃO DE ADITIVOS PARA DIMINUIR A
AGLOMERAÇÃO DE MICROCARREGADORES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Pesquisa e desenvolvimento de processos químicos.

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

Prof. Dr. Ronaldo Z. Mendonça

SÃO CARLOS

2013

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

M539ec

Mendonça, Marlei Leandro de.

Expansão de células mesenquimais estromais em frasco spinner e avaliação de aditivos para diminuir a aglomeração de microcarregadores / Marlei Leandro de Mendonça. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
182 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Biotecnologia. 2. Células-tronco. 3. Biorreatores. 4. Microcarregadores - aglomerados. 5. Microesferas de alginato. I. Título.

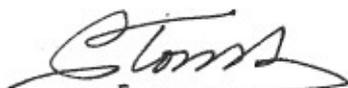
CDD: 660.6 (20^a)

Marlei Leandro de Mendonça

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: 29/04/2013

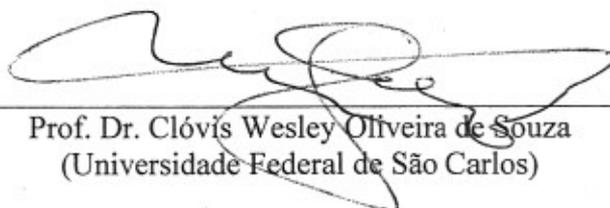
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo - Orientador
(Universidade Federal de São Carlos)



Prof. Dr. Renato Mancini Astray
(Instituto Butantan)



Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza
(Universidade Federal de São Carlos)

Dedico este trabalho aos meus amados pais, José e Raquel, que me educaram, me apoiaram e lutaram muito para que esse sonho se realizasse.

A maior necessidade do mundo é a de homens - homens que não se comprem nem se vendam; homens que no íntimo da alma sejam verdadeiros e honestos; homens que não temam chamar o erro pelo seu nome; homens cuja consciência seja tão fiel ao dever como a bússola o é ao pólo; homens que permaneçam firmes pelo que é reto, ainda que aconteça tudo errado.

(Ellen G. White)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus sobretudo, por ter me presenteado com essa experiência e por ter me sustentado em todos os sentidos a cada momento dessa jornada.

Aos professores Cláudio e Ronaldo, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela orientação, dedicação e a paciência durante a realização do mesmo.

À minha família pelo apoio constante. Principalmente, aos meus pais, José e Raquel, pela dedicação na formação do meu caráter, por terem provido material e emocionalmente as condições necessárias e essenciais para a conclusão dessa etapa, pelas preces, por entenderem a ausência e pelo amor incondicional. Ao meu irmão, Mateus, pelo incentivo e compreensão. Aos tios, primos e ao meu companheiro Guilherme pelo carinho, atenção e apoio.

Aos amigos de laboratório, Simone, Thaís, Camilo, Ana Claudia, Paula, Gizella e principalmente Amanda, Thaila, Diogo e Genoveva pela ajuda, sugestões e críticas, pelo companheirismo e pelo aprendizado.

Aos amigos, pelas conversas e risadas, pelo apoio nas horas difíceis, pela dedicação e disposição em me acompanhar durante as madrugadas ao laboratório. Especialmente à amiga Ana Paula Keller por ter me conduzido e acompanhado em muitas dessas madrugadas ao laboratório.

Aos funcionários Amadeus, Ademir e Edilson pelos subsídios na construção desse trabalho.

Aos funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto pela parceria e colaboração nesse projeto.

Ao CNPQ e CAPES pelo financiamento por meio da bolsa de estudos concedida.

E, agradeço a todos aqueles que compartilhei o cotidiano no decorrer desse trabalho.

RESUMO

O crescente interesse na utilização de células mesenquimais estromais multipotentes (CMMs) para aplicações na engenharia de tecidos e na terapia celular é atribuído principalmente à sua plasticidade e capacidade regenerativa. As CMMs representam uma revolução no tratamento de inúmeras doenças e no entendimento dos mecanismos de reparo tecidual. Sua baixa disponibilidade nos tecidos (de 0,00001 à 0,0002%) associada à necessidade de elevadas doses para as aplicações terapêuticas (aproximadamente 2×10^6 células/kg paciente) e à ineficiência dos cultivos tradicionais (em monocamada) *in vitro* para atender à alta demanda existente para essas aplicações, tornaram indispensável o desenvolvimento de novas tecnologias de expansão *ex vivo* em larga escala. A utilização de biorreatores tipo frascos spinner com microcarregadores em suspensão é um sistema alternativo eficaz para esta expansão. O relato bibliográfico de cultivos com esse sistema, no entanto, tem indicado a formação de grandes aglomerados de microcarregadores com células como um possível obstáculo na obtenção de maior produtividade celular. Tais aglomerados dificultam a difusão de nutrientes, gases (principalmente o oxigênio) e reagentes de quantificação celular indireta em seu interior; e prejudicam a recuperação das células no final do cultivo. Microesferas de alginato tornaram-se interessantes para diminuir a frequência de colisões entre os microcarregadores, pois não se aderem às células nem aos microcarregadores podendo evitar a união dos mesmos. O sulfato de dextrana foi descrito na literatura tanto como inibidor do contato célula-célula, quanto do encontro entre microcarregadores em cultivo, por isso também passou a ser uma opção promissora para evitar a formação de aglomerados de microcarregadores. Assim, os objetivos deste trabalho foram desenvolver uma metodologia de cultivo de CMMs em frasco spinner com microcarregadores Cultispher-S para aplicação em terapia celular e avaliar a influência de microesferas de alginato e do sulfato de dextrana nesse cultivo. Para isso, a linhagem hMSC-TERT e 3 g/L Cultispher-S foram mantidos em spinner de 100 mL contendo meio de cultura α -MEM (suplementado com 15% de soro fetal bovino, glicose e glutamina), a 37°C, com controle de pH. Os resultados mostraram que a adição de sulfato de dextrana (à 0,5% e 1%) e de 100% de microesferas de alginato (em relação ao número de partículas de Cultispher-S) ao cultivo provocaram morte celular considerável; e que o controle (sem aditivos), assim como a adição de 50% de microesferas de alginato promoveram crescimento celular. A formação de aglomerados foi observada nos cultivos, no entanto, ela foi atrasada com adição de 50% de microesferas de alginato. Esse fato permitiu a obtenção de um fator de expansão de 50,4 vezes (com a correção do fator de diluição) e de 13,1 vezes (sem a correção). As células recuperadas após a expansão mantiveram suas características imunofenotípicas.

Palavras-chave: células-tronco, biorreator, microcarregador, aglomerados, sulfato de dextrana, microesferas de alginato.

ABSTRACT

The increasing interest in the employment of multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) to applications in tissue engineering and cell therapy is mainly attributed to their plasticity and regenerative capacity. The MSCs represent a revolution in the treatment of countless diseases and in the understanding of tissue repair mechanisms. Due to their low availability in the tissues (0.00001% to 0.0002%) as well as to the need of high doses for therapeutic applications (approximately 2×10^6 cells/kg patient), and to the inefficiency of traditional *in vitro* cultures (in monolayer) to meet the existing high demand to these applications, development of new technologies of *ex vivo* expansion on a large scale became indispensable. The use of spinner flasks-like bioreactors with microcarriers in suspension is an effective alternative system for this expansion. However, bibliographic report of cultures with this system have indicated the formation of large clusters of microcarriers with cells as a possible obstacle to obtain a greater cellular productivity. These clusters hamper the diffusion of nutrients, gases (especially oxygen), and reagents of indirect cellular quantification within them; and they harm the cell recovery at the end of culture. Alginate microspheres have become interesting to reduce the frequency of collisions between microcarriers, due to the fact that the microspheres do not adhere to cells nor to microcarriers and can prevent the union of same. The dextran sulfate has been described in the literature as an inhibitor of cell-to-cell contact as well as of the encounter between microcarriers in culture, therefore, it too has become a promising option to avoid the formation of clusters of microcarriers. Thus, the aim of this work was to develop a methodology for the culture of MSCs in spinner flasks with microcarriers Cultispher-S for application in cell therapy and evaluate the influence of alginate microspheres and dextran sulfate on this culture. For this, the lineage hMSC-TERT and 3 g/L Cultispher-S were held in 100 mL spinner containing α -MEM culture medium (supplemented with 15% of bovine fetal serum, glucose and glutamine) at 37°C, with pH control. The results showed that the addition of dextran sulfate (at 0.5% and 1%) and of 100% of alginate microspheres (in relation to the number of Cultispher-S particles) to the culture caused considerable cell death; and the control (without additives) as well as the addition of 50% of alginate microspheres promoted cell growth. The formation of clusters was observed in cultures; however, it was delayed with the addition of 50% of alginate microspheres. This occurrence allowed a cellular expansion factor of 50.4 times (with dilution factor correction) and of 13.1 times (without correction). The recovered cells after expansion kept their immunophenotypic characteristics.

Keywords: stem cell, bioreactor, microcarrier, clusters, dextran sulfate, alginate microspheres.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACIs: Aglomerados de Células da Ilhota;

ATP: Adenosina Trifosfato;

BVDV: Bovine Viral Diarrhea Virus;

CEAs: Células Epiteliais Aminióticas;

CFU-F: Unidades Formadoras de Colônias de Fibroblastos;

CMMs: Células Mesenquimais Estromais Multipotentes;

COHs: Células Ovais Hepáticas;

CPEs: Células Progenitoras Endoteliais;

CMM-MO: Células Mesenquimais Estromais Multipotentes da Medula Óssea;

CMM-VCU: Células Mesenquimais Estromais Multipotentes da Veia Umbilical;

CPMs: Células Progenitoras Multipotentes;

CTs: Células-Tronco;

CTBAs: Células-Tronco Brônquio Alveolar;

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 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;

CTAs: Células-tronco adultas;

CTTAs: Células-Tronco derivadas do Tecido Adiposo;

CTTMs: Células-Tronco derivadas do Tecido Muscular;

DECH: Doença de Enxerto Contra o Hospedeiro;

DMSO: Dimetilsulfóxido;

EGF: Epidermal Growth Factor;

EIC: Espaço Intra-Capilar;

EEC: Espaço Extra-Capilar;

EMEM: Eagle Minimum Essential Medium;

FD: Fator de Diluição

FGF: Fibroblast Growth Factor;

G6P: Glicose 6 Fosfato;

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

LIF: *Leukemia Inibictory Factor*;

MA: Microsfemas de Alginato;

MEF: Mitotically Inactived Factor;

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

NAD⁺: Nicotina Adenina Dinucleotídeo;

NADH: Nicotina Adenina Dinucleotídeo;

NGF: Nervous Growth Factor;

PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor*;

PBS: *Phosphate Buffer Saline*;

PPC: Ciclo das Pentoses Fosfato;

SCU: Sangue do Cordão Umbilical;

SD: Sulfato de dextrana;

SFB: Soro Fetal Bovino;

TCAc: Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos;

TERT: Telomerase Reverse Transcriptase.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	7
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1	Células-tronco	8
3.1.1	Células-tronco embrionárias.....	10
3.1.2	Células-tronco adultas.....	13
3.1.2.1	Células mesenquimais estromais multipotentes.....	15
3.1.2.1.1	hMSC-TERT	17
3.2	Aplicações terapêuticas das células-tronco.....	18
3.3	Divisão e crescimento celular.....	23
3.4	Fatores importantes para o cultivo celular.....	26
3.5	Metabolismo de células de mamíferos em cultura	29
3.6	Processos de cultivo de células-tronco	32
3.6.1	Histórico do desenvolvimento da tecnologia de cultivo celular.....	32
3.6.2	Expansão de células mesenquimais estromais multipotentes.....	36
3.6.2.1	Expansão estática em garrafas	37
3.6.2.2	Expansão em biorreatores	38
3.6.2.2.1	Microcarregadores.....	42
3.6.2.2.2	Cultivos de CMMs utilizando microcarregadores em frasco spinner	45
3.7	Alginato: aplicações e relação com cultivos celulares.....	47
3.8	Utilização do sulfato de dextrana em cultivos celulares	50
3.9	Observações finais sobre a Revisão Bibliográfica.....	53
4	MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1	Material.....	54
4.1.1	Linhagem de célula mesenquimal estromal multipotente	54
4.1.2	Meios de cultura e de congelamento.....	55
4.1.3	Solução tampão de fosfato – PBS (<i>Phosphate Buffer Saline</i>).....	56
4.1.4	Corante.....	56
4.1.5	Enzimas de dissociação celular	57
4.1.6	Microcarregador	57
4.1.7	Solução antiaderente - Sigmacote®	57
4.1.8	Reagente MTT	58

4.1.9 Filtros.....	58
4.1.10 Frascos de cultura	59
4.1.11 Microesferas de alginato	59
4.1.12 Sulfato de dextrana	60
4.2 Métodos para cultivo celular.....	60
4.2.1 Preservação celular.....	60
4.2.2 Descongelamento e ativação celular.....	61
4.2.3 Cultivo estático em frascos T	61
4.2.4 Procedimento experimental para cultivo em frasco spinner	62
4.3 Métodos analíticos	65
4.3.1 Determinação da densidade e viabilidade celular em câmara de Neubauer....	65
4.3.2 Determinação da densidade celular pelo método baseado no MTT	66
4.3.3 Recuperação das células aderidas aos microcarregadores	67
4.3.4 Análise de glicose e ácido láctico.....	68
4.3.5 Análise de aminoácidos.....	68
4.3.6 Análise de amônio.....	69
4.3.7 Análise de citometria de fluxo.....	69
4.3.8 Análise dos diâmetros médios dos aglomerados de microcarregadores	70
4.3.9 Documentação de imagens.....	70
4.4 Organização geral dos experimentos	71
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	72
5.1 Experimento 1	73
5.2 Experimento 2	82
5.3 Experimento 3	88
5.4 Experimento 4	93
5.5 Experimento 5	100
5.6 Experimento 6	105
5.7 Análise geral dos experimentos realizados	110
6 CONCLUSÕES	115
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	117
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118
APÊNDICE A - Curvas padrão referente ao método do MTT para os experimentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6.	136

APÊNDICE B - Tabelas dos valores do pH do meio de cultivo, da porcentagem de CO₂ na incubadora e da agitação; das concentrações de aminoácidos, glicose, ácido láctico e amônia; dos fatores de diluição, dos números de células aderidas nos microcarregadores e em suspensão, dos números de células recuperadas com tryple 10X, e dos diâmetros médio dos aglomerados de microcarregadores para os experimentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6. 142

1 INTRODUÇÃO

O estudo sistemático de células-tronco (CT) tem se estabelecido de forma significativa nos últimos dez anos. O crescente interesse na utilização dessas células é atribuído principalmente à sua plasticidade e capacidade regenerativa. Elas representam uma revolução no tratamento de inúmeras doenças e no entendimento dos mecanismos de reparo tecidual.

As células-tronco mesenquimais (CTMs) ou células mesenquimais estromais multipotentes (CMMs) consistem em um subtipo de CT que tem o potencial para se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, fibroblastos e outros tecidos de origem mesenquimal (CAPLAN; BRUDER, 2001; EIBES et al., 2010; FRAUENSCHUH et al., 2007; PITTENGER et al., 2011; YANG; ROSSI; PUTNINS, 2007). Elas podem também originar células endoteliais, músculo sarcomérico (esquelético e cardíaco), e algumas células de origem não-mesodérmica, como células neurais e hepatócitos (DEANS; MOSELEY, 2000).

Esse potencial de diferenciação, juntamente com suas habilidades imunossupressoras, confere às CMMs a possibilidade de serem empregadas em terapia celular, que compreende a medicina regenerativa, os transplantes com CT hematopoéticas, a imunoterapia, a aférese, a criobiologia, a imunoseleção e a terapia gênica (BAKSH; SONG; TUAN, 2004; BARTOSH et al., 2010; CAPLAN, 2007; CARUSO, 2012 ; POUNTOS et al., 2007 ; SOTIROPOULOU; PEREZ; SALAGIANNI, 2006). A terapia celular têm sido uma das opções clínicas de utilização de CMMs mais difundidas. Ela consiste, principalmente, na restauração da função de um órgão ou tecido para tratar doenças e lesões através da substituição de tecidos doentes por células saudáveis (ZATZ, 2004).

As características citadas das CMMs tornaram-nas o primeiro tipo de CT utilizado na medicina regenerativa (RASTEGAR et al., 2010). Desde então, muitos estudos demonstraram que elas são uma alternativa clinicamente aceitável, segura e viável para o tratamento de doenças crônico-degenerativas, auto-imunes e inflamatórias (BARTOSH et al., 2010; OLIVEIRA; SPONCHIADO; ADAM, 2006). A literatura mostra que as CMMs estão sendo empregadas em inúmeros ensaios

clínicos, como por exemplo: na reconstituição hematopoética e regulação imunológica após transplante, prevenção e tratamento da doença de enxerto contra o hospedeiro (DECH), tratamento de crianças com osteogênese imperfeita, distúrbios metabólicos, na regeneração de ossos e cartilagens utilizando técnicas de engenharia de tecidos, na doença de Crohn e no reparo de danos após um infarto agudo no miocárdio, entre outras (BANFI et al., 2000; BARRY; MURPHY, 2004; BROOKE et al., 2008; BERNARDO et al., 2007; CAPLAN, 2007; CHEN et al., 2004; DENNIS et al., 2009; LEBLANC et al., 2008; MAROLT et al., 2006; MAUNEY; VOLLOCH; KAPLAN, 2005; PLEWKA et al., 2009; SEEBACH et al., 2007; WANG et al., 2005; ZHANG et al., 2011).

As CMMs foram inicialmente localizadas na medula óssea de adultos e esta é a sua fonte principal em diferentes espécies (RINGE et al., 2002; YANG; ROSSI; PUTNINS, 2007). No entanto, outras fontes acessíveis foram encontradas, como a placenta, o sangue do cordão umbilical, a camada subendotelial da veia umbilical, o líquido amniótico e a gordura de lipoaspiração (BAKSH; SONG; TUAN, 2004; BROOKE et al., 2008; PANEPUCCI et al., 2004, PAYUSHINA; DOMARATSKAYA; STAROSTIN, 2006). Apesar de estarem presentes em vários tecidos adultos, a quantidade encontrada de CMMs é muito baixa (média de 0,00001 à 0,0002%)(ZATZ, 2004). E sabe-se que a demanda para as aplicações terapêuticas é muito maior do que a capacidade de fornecimento devido às altas doses utilizadas nesses procedimentos. Na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (USP), por exemplo, são infundidas aproximadamente 2×10^6 células por quilograma do paciente. Essa problemática passou então, a propulsionar o desenvolvimento de estudos relacionados à sua expansão *ex vivo* e em larga escala preservando-se seu potencial de diferenciação (SCHOP et al., 2008).

Nos cultivos tradicionais *in vitro*, a expansão ocorre de forma estática em monocamadas (geralmente em garrafas ou placas de cultivo), ou seja, uma camada de células sobre uma superfície (YANG; ROSSI; PUTNINS, 2007). Isso ocorre porque as CMMs são dependentes de ancoramento (DAI et al., 2011), ou seja, necessitam de um substrato para que ocorra a adesão e o alongamento das mesmas de modo que a superfície de contato com o meio de cultura para a absorção de nutrientes e trocas gasosas seja maior. A fase proliferativa ocorre após a fase de adesão a esse substrato.

Essa técnica convencional, no entanto, é pouco eficaz, uma vez que não permite uma boa homogeneização, provocando a ocorrência de gradientes de concentração (pH, oxigênio, substratos e metabólitos) e a falta de condições para o monitoramento e controle das condições ambientais (YU et al., 2009). Outra limitação relaciona-se à razão superfície/volume que é reduzida (restrita somente à área da superfície das garrafas), assim, a produção de um grande número de células implica a utilização de uma grande quantidade de garrafas, acarretando o emprego de incubadoras de ampla capacidade (WEBER et al., 2007). O tratamento enzimático, realizado em cada uma das inúmeras passagens de uma garrafa para outras pode interferir nas propriedades funcionais das células (SCHOP et al., 2008). Esse excesso de garrafas também gera um alto custo, aumenta a mão-de-obra e o tempo de manipulação (para trocas de meio e monitoramento da cultura), que ocasiona um risco maior de contaminação (RODRIGUES et al., 2011). O emprego dessa técnica de expansão de CMMs para fins terapêuticos no Hemocentro de Ribeirão Preto evidencia essas limitações. Para se obter o número de células necessário para infusão em um paciente de aproximadamente 60 quilos, ou seja, no mínimo $1,2 \times 10^8$ células em terceira passagem, são necessários 7 dias e 2×10^7 CMMs em segunda passagem. Para produzir essa quantidade de células são necessárias 40 garrafas de 175 cm^2 de área e um volume total de 3,5L de meio de cultura, totalizando um custo de aproximadamente R\$ 1.500,00 (CARUSO, 2012).

Diante da necessidade de contornar os obstáculos apresentados pela técnica convencional, novas tecnologias de cultivo em larga escala passaram a ser estudadas nos últimos anos (BOO et al., 2011; CHEN et al., 2009; EIBES et al., 2010; DENNIS et al., 2009; FERNANDES et al., 2009; FRAUENSCHUH et al., 2007; FRITH; THOMSON; GENEVER, 2010; GODARA; MCFARLAND; NORDON, 2008; KEDONG et al., 2010; KING; MILLER, 2007; MARTIN; WENT; HEBERER, 2004; PHILLIPS et al., 2008; RODRIGUES et al., 2011; SINGH, 1999; STUTE et al., 2004; WU et al., 2003; YU et al., 2009; ZHAO et al., 2006; ZHANG et al., 2009). O sistema de cultivo em suspensão homogênea realizado com microcarregadores em biorreatores tem sido utilizado para a expansão de CMMs de diferentes fontes e de várias espécies (EIBES et al., 2010; FRAUENSCHUH et al., 2007; SCHOP et al. 2008, WEBER et al., 2007; YANG; ROSSI; PUTNINS, 2007; YU et al., 2009).

Microcarregadores são pequenas partículas, geralmente esféricas, que funcionam como suportes para a adesão e proliferação de células dependentes de ancoramento. Propiciam maior área efetiva para a expansão celular e podem ser utilizados em sistemas de cultivo agitados como carregadores de células. Eles se diferenciam com relação à composição (celulose, dextrana, vidro, poliestireno, colágeno ou gelatina), ao tamanho, carga elétrica, revestimento superficial e porosidade (SCHOP et al., 2008). Um exemplo de microcarregador utilizado no cultivo de CMMs é o Cultispher-S. Segundo Eibes e seus colaboradores (2010), ele contribui para a maximização do desempenho do cultivo dessas células. Trata-se de uma partícula com diâmetro de aproximadamente 125 a 212 μm , composta por uma matriz de gelatina eletricamente neutra e hidrofílica. Além de apresentar ampla área para o crescimento celular, ele pode ser dissolvido por enzimas como a Tryple, de forma a proporcionar uma taxa de recuperação celular maior no final do cultivo. Essa vantagem é de fundamental importância em um bioprocessos para produção de CMMs de grau clínico (CARUSO, 2012).

Biorreatores são equipamentos para cultivo que proporcionam o adequado monitoramento e controle de variáveis de cultivo como pH, temperatura, concentração de oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2), manutenção da assepsia e ambiente físico-químico homogêneo para toda a população celular de forma a possibilitar a manutenção de um ambiente propício para uma produtividade celular maior (CHICO; RODRIGREZ; FIGUEREDO, 2008; CARUSO, 2012).

Uma alternativa para a expansão em larga escala consiste na utilização de biorreatores tipo frascos spinner (recipientes de vidro ou plástico com um agitador magnético central e braços laterais para adição e remoção de meio e células) associados à microcarregadores em suspensão. Por proporcionar maior controle em cultura homogênea, simplicidade e facilidade no manuseamento e baixo risco de contaminação (MIZUKAMI, 2011), esse conjunto também tem motivado o desenvolvimento de pesquisas com CMMs (BOO et al.; 2011; CARUSO, 2012; EIBES et al., 2010; FERNANDES et al., 2007; FRAUENSCHUH et al., 2007; HEWITT et al., 2011; MIZUKAMI, 2011; SANCHES, 2010; SCHOP et al., 2008; WEBER et al.; 2007; YANG; ROSSI; PUTNINS, 2007).

Os dados da literatura referentes à expansão de CMMs em biorreatores mostram que os fatores de crescimento atingidos são ainda baixos

(MIZUKAMI, 2011). Assim, necessita-se de estudos que possam explorar possibilidades de cultivo mais eficientes. As vantagens apresentadas sobre o cultivo em frascos spinner e sobre os microcarregadores do tipo Cultispher-S mostram que a associação desses dois componentes seria uma alternativa bastante viável para ser investigada no cultivo de CMMs.

Há, no entanto, um obstáculo a ser superado no cultivo das CMMs associado aos microcarregadores em frasco spinner. Trata-se da formação de agregados de microcarregadores, relatada em alguns estudos que utilizaram esse sistema de cultivo (CARUSO, 2012; FRAUENSCHUH et al., 2007; MIZUKAMI, 2011; SANCHES, 2010). A priori, essa formação foi apontada como um fator que contribuiu para a proliferação celular (SANTOS et al., 2010). Contudo, há indagações importantes referentes a esse argumento. Grandes aglomerados de microcarregadores podem dificultar a difusão de nutrientes e gases (principalmente o oxigênio) indispensáveis para a sobrevivência das células no interior dessas estruturas e levar à morte, especialmente daquelas que se encontram mais ao centro dos agregados. Eles também podem prejudicar o contato das células que estão em seu interior com os reagentes de quantificação indireta, como o MTT, e consequentemente, subestimar a concentração celular alcançada em um cultivo. Mizukami (2011) e Sanches (2010) relataram a dificuldade na recuperação celular, ou seja, em desaderir as células dos microcarregadores em condições adequadas para a utilização terapêutica, principalmente quando há formação de aglomerados de microcarregadores. Segundo Caruso (2012), a garantia da recuperação do maior número de células possíveis pós-expansão com adequada qualidade terapêutica é um dos fatores mais importantes no desenvolvimento de um bioprocessos para produção de células mesenquimais de grau clínico. Uma investigação na literatura sobre o problema apresentado conduziu à necessidade de pesquisar a influência de alguns aditivos que poderiam evitar a formação desses agregados, como as microesferas de alginato e o sulfato de dextrana.

O alginato e as dextranas são polissacarídeos biodegradáveis em humanos, atóxicos e que não promovem alterações nas propriedades biológicas dos organismos (BREGNI et al., 2000; MOSCARDINI; TIERA; OLIVEIRA-TIERA, 2000; MOSCHAVERINIA et al., 2012; TAFFAGHODI et al., 2011). Estudos preliminares realizados no LATECC (Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares -

Departamento de Engenharia Química da UFSCar) demonstraram que as células hMSC-TERT não se aderem ao alginato e que este não interage com os microcarregadores Cultispher-S. Diante disso, sua participação como constituinte de microesferas não rígidas que pudessem se interpor entre os microcarregadores Cultispher-S em cultivos de CMMs e diminuir aglomeração dos mesmos, tornou-se bastante atrativa.

Dextranas de elevada massa molecular aumentam a viscosidade do meio e conseqüentemente diminuem a colisão entre microcarregadores em cultivo (DOYLE; GRIFFITHS, 1998). Porém seu uso tem sido limitado devido as dificuldades de oxigenação causadas por meios de cultura muito viscosos (DOYLE; GRIFFITHS, 1998). Já a dextrana sulfatada, ou sulfato de dextrana, consiste em um composto aniônico que atenua essa viscosidade e que tem sido empregado com sucesso como agente antiaglomerante por inibir a formação das ligações célula-célula (BARABINO et al., 1999; DEE et al., 1997) responsáveis pela aglomeração de microcarregadores altamente colonizados. Assim, o sulfato de dextrana também seria uma opção promissora em testes para evitar a formação de agregados de microcarregadores.

Neste trabalho procurou-se desenvolver uma metodologia de expansão de células mesenquimais estromais multipotentes (CMMs) em larga escala, utilizando biorreatores tipo frascos spinner contendo microcarregadores Cultispher-S em suspensão. Investigou-se também a influência de microesferas de alginato e do sulfato de dextrana na formação de aglomerados de microcarregadores e expansão dessas células.

2 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram:

- 1) Desenvolver uma metodologia de cultivo de células mesenquimais estromais multipotentes (CMMs) em frasco spinner com microcarregadores Cultispher S visando a produção dessas células em larga escala para aplicação em terapia celular;
- 2) Avaliar a influência de microesferas de alginato e do sulfato de dextrana na formação de aglomerados de microcarregadores e na produtividade celular do cultivo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Células-tronco

O termo célula-tronco (CT), do inglês *stem cell*, refere-se às células consideradas indiferenciadas, mas que possuem a capacidade de se diferenciar em células especializadas (MOTA; SOARES; SANTOS, 2005). Segundo Schwindt, Barnabé e Mello (2005), elas possuem três propriedades: auto-renovação (capacidade de originar outra CT com características idênticas); habilidade de se diferenciar em mais de uma linhagem celular; e capacidade de originar células funcionais nos tecidos derivados da mesma linhagem (SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005). As células-tronco podem ser obtidas de vários locais como: embriões, sangue de cordão umbilical, medula óssea, células mesenquimais, células de tecidos e órgãos, células do sangue periférico e células hematopoiéticas (OLIVEIRA; SPONCHIADO; ADAM, 2006).

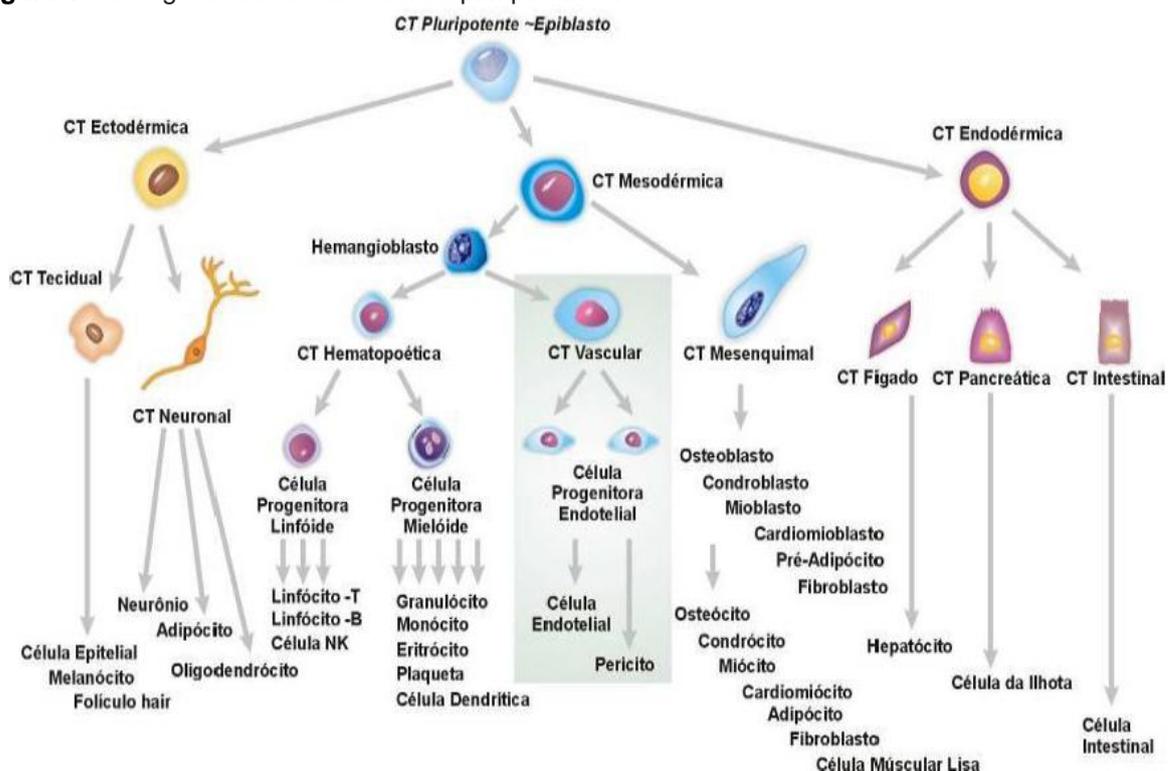
Considerando-se algumas distinções, como o nível de plasticidade que estas células possuem, quantas diferentes vias podem seguir, e para qual porção de um organismo funcional elas podem contribuir, as células-tronco classificam-se em totipotentes, pluripotentes e multipotentes (SOUZA et al., 2003). São consideradas células totipotentes aquelas com potencial de completa diferenciação, enquanto que as oligopotentes, que compreende as pluripotentes e as multipotentes, possuem capacidade de diferenciação parcial (RODRIGUES; FONSECA, 2004).

As células-tronco totipotentes podem originar tanto um organismo totalmente funcional, como qualquer tipo celular do corpo, inclusive todo o sistema nervoso central e periférico (GAGE, 2000). Correspondem às células do embrião recém-formado e têm potencial para originar até mesmo as células do folheto extraembrionário que formarão a placenta. Entretanto, estas células são efêmeras e desaparecem poucos dias após a fertilização (ROBEY, 2000). O exemplo de uma CT com essas características, e portanto, considerada totipotente, é o zigoto.

As pluripotentes são células capazes de originar qualquer tipo de tecido sem, no entanto, originar um organismo completo, visto que não podem gerar a

placenta e outros tecidos de apoio ao feto. Formam a massa celular interna do blastocisto depois dos quatro dias de vida e participam da formação de todos os tecidos do organismo (ROBEY, 2000). Em outras palavras, elas têm a habilidade de originar as células dos três folhetos embrionários (ectoderma, endoderma e mesoderma) conforme mostrado na Figura 1 (CARUSO, 2012). Estas células têm sido utilizadas na criação de animais transgênicos e possuem uma grande variedade de aplicações clínicas e comerciais. Apesar de existirem em menor número, as células-tronco pluripotentes estão presentes, também, em indivíduos adultos. Se oriundas da medula óssea, por exemplo, podem originar células de sangue, ossos, cartilagem, músculos, pele e tecido conjuntivo (GAGE, 2000).

Figura 1 - Ontogenia das células-tronco pluripotentes.



(CARUSO, 2012)

As células-tronco multipotentes são um pouco mais diferenciadas, presentes no indivíduo adulto, com capacidade de originar apenas um limitado número de tipos teciduais. Elas originam quatro ou mais linhagens celulares, mas também podem ser tri, bi ou unipotentes se originarem três, dois ou apenas um tipo celular, respectivamente (YOUNG; BLACK Jr., 2004). As multipotentes são

designadas de acordo com o folheto embrionário de que derivam e podem originar apenas células daquele folheto, possibilitando a regeneração tecidual (GAGE, 2000). Entretanto, com o avanço das pesquisas, a existência desta categoria de células-tronco tem sido cada vez mais questionada, visto que células antes consideradas multipotentes, a exemplo das células-tronco neurais, têm se revelado pluripotentes (SOUZA et al., 2003).

Quanto à origem, as células-tronco geralmente são divididas em células-tronco embrionárias (CTE) e células-tronco adultas (CTA).

3.1.1 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, possuem a capacidade ilimitada de replicação podendo ser direcionadas a se diferenciar em todos os tipos de células das três camadas embrionárias: ectoderme, mesoderme e endoderme (FERNANDES et al., 2007). Elas são caracterizadas por auto-renovação e imortalidade (BRIGNIER; GEWIRTZ, 2010) e podem ser isoladas de blastocistos doados, embriões descartados de baixa qualidade, embriões com defeitos genéticos seguido de pré-implantação de diagnóstico genético e zigotos aneuplóides (GERECHT-NIR; ITSKOVITZ-ELDOR, 2004).

Os estudos com células-tronco embrionárias têm sido realizados há mais de três décadas, com início em 1981 por Evans e Kaufman. Nestes estudos foram isoladas células-tronco embrionárias de ratos modificados, e estas foram impedidas de se diferenciar pela ação do *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF). Posteriormente, essas células foram induzidas à diferenciação *in vitro* por citocinas. Porém, a transferência destas células para os animais resultaram em teratomas. Com esses estudos, cresceu o interesse por essas células possíveis de diferenciação em tantos tipos celulares, e a extração e utilização das mesmas em humanos. O isolamento de células-tronco embrionárias humanas foi reportado pela

primeira vez em 1998, e, desde então, tem sido observado um crescimento exponencial no número de experimentos com estas células, envolvendo melhoria nas condições de cultura, manipulação genética e indução de diferenciação em diferentes tecidos. Um fator relevante para o sucesso da utilização das células-tronco embrionárias humanas foi a descoberta do fator inibidor de mitose para humanos, o MEF (*Mitotically Inactivated Factor*). Este fator impede a diferenciação das células-tronco embrionárias humanas, e, por esse motivo, para que ocorra a diferenciação celular é preciso retirar esse elemento (OLIVEIRA; SPONCHIADO; ADAM, 2006).

Segundo Serra e colaboradores (2010), as CTEs têm gerado especial interesse no setor biofarmacêutico para uso em descoberta de fármacos e desenvolvimento de células sadias para terapia. Elas abrem possibilidades visionárias como o crescimento de tecidos em laboratório para o tratamento de uma variedade de doenças, sendo uma poderosa fonte para obter um grande número de células para transplantes na medicina regenerativa (GERECHT-NIR; ITSKOVITZ-ELDOR, 2004). 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, como já mencionado (MIMEAULT et al., 2009). A rejeição imunológica deve-se ao fato de que células derivadas de um embrião pertencem a outro indivíduo. Esse problema poderia ser contornado com a possibilidade de utilização da clonagem terapêutica, ou seja, a substituição do núcleo de uma célula embrionária estabelecida *in vitro* com um núcleo de célula somática do receptor. Porém, os defeitos do genoma também seriam transferidos, impedindo o uso dessa opção em doenças genéticas (da SILVA JUNIOR; BOROJEVIC, 2007).

As CTEs têm gerado inúmeras discussões 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 morais, éticas e religiosas quando se trata de embriões humanos (da SILVA JUNIOR; BOROJEVIC, 2007).

Não existe uma legislação mundial que se refira às células-tronco, à clonagem terapêutica e à clonagem reprodutiva. Países isolados têm criado suas próprias leis para a manipulação, utilização e aplicação das células-tronco

(OLIVEIRA; SPONCHIADO; ADAM, 2006). No Brasil, o primeiro texto legal a regular o uso das técnicas de engenharia genética e a utilização das CTEs foi a Lei 8.974, de 05 de janeiro de 1995, revogada pela Lei 11.105, de 24 de março de 2005, esta criada no intuito de melhor normatizar o assunto. A Lei 11.105/05 mal entrou em vigor, quando em 16 de maio de 2005, o Procurador-Geral da República, Cláudio Fonteles, propôs junto ao Supremo Tribunal Federal a ADI 3510/600, também conhecida como “ADI das Células-Tronco”, alegando a inconstitucionalidade sob o argumento de que os dispositivos dela afrontariam os preceitos constitucionais do direito à vida e da dignidade humana. Durante aproximadamente três anos, ocorreram muitas discussões a esse respeito. A histórica e repercutida decisão do Supremo Tribunal somente foi proferida em 29 de maio de 2008, ocasião em que os ministros concluíram pela constitucionalidade. Foram liberadas, então, as pesquisas científicas com as células-tronco de embriões obtidos por fertilização *in vitro* ou que estejam congelados há três anos ou mais, exigindo também a autorização do casal. Assim, o Brasil conquistou sua independência em relação à importação de culturas primárias de CTE, facilitando o desenvolvimento de novas pesquisas no país (CARLO; MONTEIRO; NETO, 2009).

Nos últimos oito anos, a pesquisa com CT recebeu um grande investimento por parte do Governo Federal, o que resultou na criação da Rede Nacional de Terapia Celular (RNTC), formada por oito Centros de Tecnologia Celular localizados em cinco estados brasileiros e por 52 laboratórios selecionados pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e pelo Departamento de Ciência e Tecnologia (Decit) do Ministério da Saúde. A RNTC tem como principal objetivo aumentar a integração entre os pesquisadores de todo o Brasil e facilitar a troca de informações em relação às pesquisas com células-tronco que vêm sendo feitas no país, gerando conhecimento científico e competência tecnológica na área da medicina regenerativa (CARLO; MONTEIRO; NETO, 2009).

3.1.2 Células-tronco adultas

As células-tronco adultas (CTAs), ou somáticas, são células multipotentes que aparecem ainda na fase de formação do embrião e persistem por toda a vida em pequenas quantidades no organismo. Assim, estão presentes tanto em tecidos de fetos, quando de crianças, adolescentes e adultos (PESSOLATO et al., 2010). Elas são responsáveis por manter a homeostase dos tecidos, repondo células que foram perdidas na maturação, no envelhecimento ou lesões (ROSENSTRAUER et al., 2005). Encontram-se em estado quiescente ou em baixa proliferação, localizando-se em regiões específicas essenciais para o seu desenvolvimento e a manutenção de seus atributos, particularmente a capacidade de autorenovação. Algumas regiões estão claramente definidas dentro de seus respectivos tecidos e as CTAs ali localizadas podem ser facilmente identificadas pela sua morfologia e localização espacial. Já em outros tecidos, não é possível definir a exata localização de um nicho de CTAs (SOUZA et al., 2003).

As CTAs já foram localizadas em órgãos como medula óssea, fígado, vasos sanguíneos, sangue de cordão umbilical, músculo esquelético, pâncreas, sistema digestivo, epitélio da pele, córnea, polpa dentária, retina e cérebro (SOUZA et al., 2003). Uma característica marcante é sua capacidade de migrar de seus nichos para sítios de diferentes tecidos, a fim de promover manutenção e regeneração (RINGE et al., 2002). Sabe-se hoje que o potencial de diferenciação das CTAs é 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; MCFARLAND; NORDON, 2008; RINGE et al., 2002).

Devido às facilidades de obtenção, as CTAs foram rapidamente utilizadas clinicamente (OLIVEIRA; SPONCHIADO; ADAM, 2006). Na terapia celular, elas podem ser retiradas do organismo de um paciente e aplicadas no próprio indivíduo (transplante autólogo) ou em outros indivíduos (transplante heterólogo). Um exemplo disso é o transplante de CTA hematopoéticas (transplante de medula óssea), o qual representa a forma mais antiga de terapia celular e ainda hoje a mais amplamente realizada no mundo todo. Este transplante geralmente é empregado no

tratamento de doenças hematológicas, como leucemias, linfomas, talassemia, anemia falciforme, entre outras (PESSOLATO et al., 2010). Porém, um fator restritivo da utilização das CTAs é a baixa quantidade de telomerase. Este fator faz com que os telômeros nestas células estejam encurtados, limitando a capacidade de proliferação celular (OLIVEIRA; SPONCHIADO; ADAM, 2006).

As diferenças básicas entre CTAs e CTEs encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 - Principais diferenças entre célula-tronco adulta (CTA) e célula-tronco embrionária (CTE) (BONGSO; RICHARDS, 2004).

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

As CTAs são classificadas de acordo com suas características e tecidos dos quais são obtidas e apresentam em sua superfície proteínas peculiares. Até o momento, as CTAs que estão mais bem caracterizadas são as células-tronco hematopoéticas (CTHs), as células mensenquimais estromais multipotentes (CMMs) e as células progenitoras endoteliais (CPEs) (CARUSO, 2012).

As CTHs são bem caracterizadas pelo marcador de superfície CD34, sendo sua principal fonte a medula óssea. Elas são definidas funcionalmente por sua habilidade de repovoar a medula com células de todas as linhagens que compõem o sistema sanguíneo. Já as CPEs, encontradas no sangue de cordão umbilical, são tipicamente identificadas pela citometria de fluxo por expressarem os

antígenos de superfície CD34, CD133 e o VEGFR-2, também conhecido como KDR, e por não apresentarem o CD45, antígeno característico de células hematopoéticas maduras (CARUSO, 2012).

As CMMs destacam-se por possuírem aparentemente a mais ampla capacidade de diferenciação e foram essenciais no desenvolvimento desse trabalho. Por isso, serão descritas abaixo de forma mais detalhada.

3.1.2.1 Células mesenquimais estromais multipotentes

As células mesenquimais estromais multipotentes (CMMs) são capazes de se diferenciar em várias linhagens de origem mesodérmica e não-mesodérmica (OLIVEIRA; SPONCHIADO; ADAM, 2006). Friedenstein, Chailakhjan e Lalykina (1976) foram os primeiros a identifica-las e isolá-las da medula óssea de ratos. Primeiramente essas células foram chamadas de células aderentes ao plástico ou unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F). Mais tarde passaram a ser denominadas células estromais da medula ou células-tronco mesenquimais. O termo “células mesenquimais estromais multipotentes” foi estabelecido pela Sociedade Internacional de Terapia Celular somente em 2006, quando foram instituídos 3 critérios para defini-las: a capacidade de aderência ao plástico, a expressão positiva ($\geq 95\%$) de antígenos de superfície CD105, CD73 e CD90 e negativa ($\leq 2\%$) de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79alfa ou CD19 e HLA-DR, além da capacidade de diferenciação na linhagem osteogênica, adipogênica e condrogênica (DOMINICI et al., 2006).

Segundo Tagami e seus colaboradores (2003), as CMMs apresentam morfologia fibroblastóide alongadas, fusiformes e pontiagudas, com núcleo eucromático, oval, grande e central e citoplasma abundante à microscopia de luz ou contraste de fase. Podem ser observadas à microscopia eletrônica: as cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas, vacúolos lipídicos cheios ou vazios, corpos lisossomais e grande quantidade de ribossomos livres no citoplasma, além de filamentos de actina bem organizados em suas extremidades. Quando

senescentes, são grandes, largas, achatadas, proliferam lentamente e expressam uma β -galactosidase associada à senescência (FEHRER; LEPPERDINGER, 2005).

As CMMs também podem ser caracterizadas por um vasto painel de antígenos de superfície. Estas células se apresentam positivamente marcadas para moléculas de adesão e integrinas, tais como, CD29, CD44 e CD49 e, negativas para antígenos característicos de células endoteliais, dentre eles, CD31 e KDR e antígenos característicos de células hematopoéticas, tais com o CD34 e o CD45 (CARUSO, 2012).

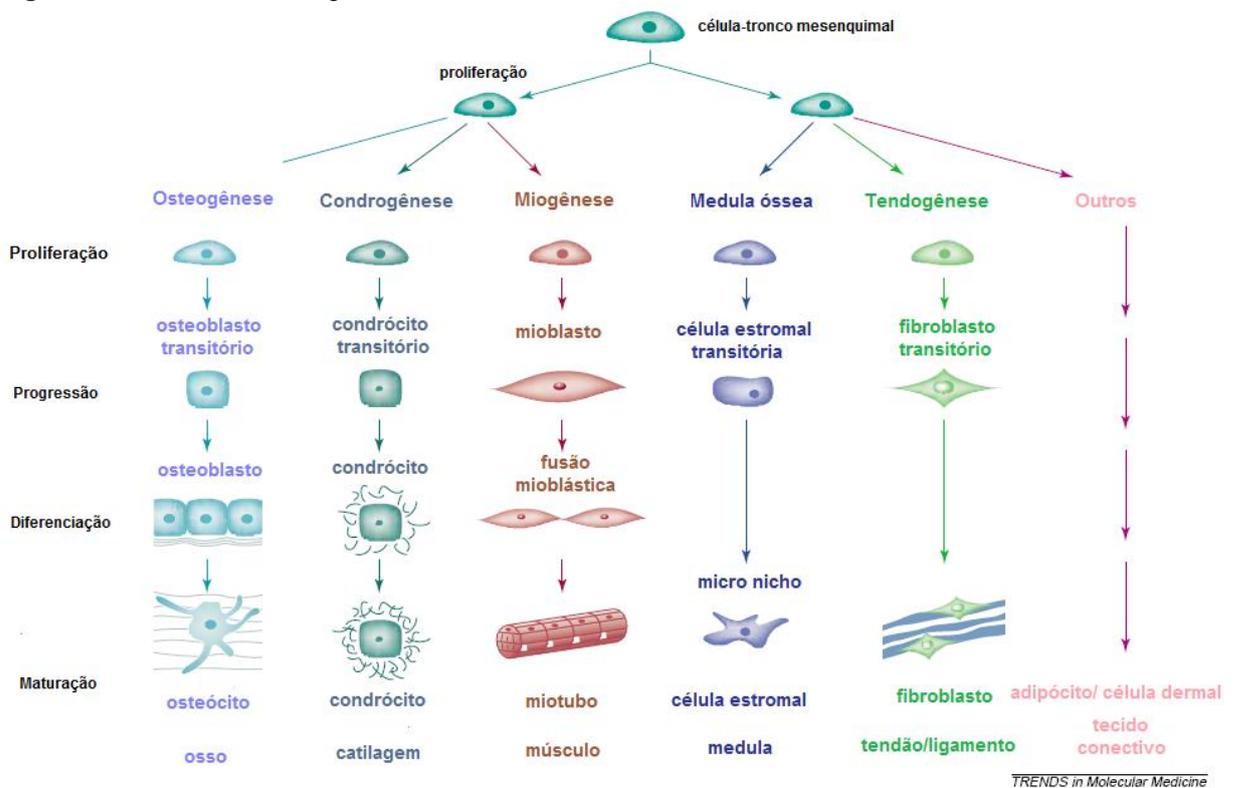
A fonte mais comum de CMMs é a medula óssea, considerando o seu fácil isolamento e a proporção celular lá encontrada (MIZUKAMI, 2011). Contudo elas também podem ser isoladas de outros órgãos e tecidos, tais como o tecido muscular esquelético, a derme, o tecido adiposo, a membrana sinovial, o endotélio e subendotélio da veia umbilical e da veia safena, o rim, o sangue de cordão umbilical e placentário, a medula óssea vertebral, a cartilagem articular, a vilosidade coriônica da placenta, o ligamento periodontal, e o pulmão (AHRENS et al., 2004; ALMEIDA-PORADA et al., 2002; ALSALAMEH et al., 2004; COVAS et al., 2003, 2005; DE BARI et al., 2001; IGURA et al., 2004; LEE et al., 2004a; LEE et al., 2004b; SABATINI et al., 2005; SEO et al., 2004; YOUNG et al., 2001; YU et al., 2004; ZUK et al., 2001), dentre outros. As células mesenquimais estromais multipotentes da veia umbilical (CMM-VCU) foram isoladas em 2003 (COVAS et al, 2003), e suas similaridades biológicas quando comparadas às CMMs isoladas da medula óssea (CARUSO, 2012) foram relatadas. Outro estudo identificou a presença das mesmas no nicho vascular de 11 diferentes tecidos: cordão umbilical, carótida, fáscia do músculo reto abdominal, gônadas, fígado e pele de fetos provenientes de aborto, pele, tecido adiposo, veia safena, retina e medula óssea de indivíduos adultos (COVAS et al, 2008). As CMMs 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; DOMARATSKAYA; STAROSTIN, 2006).

Embora seu potencial de diferenciação seja menor em relação às CTEs, as CMMs não foram demonstradas na literatura como formadoras de tumores, seu isolamento não é restringido por considerações de ordem moral ou legal e sua presença em tecidos adultos permite o auto-transplante dessas células

retiradas do paciente e expandidas *in vitro* (PAYUSHINA; DOMARATSKAYA; STAROSTIN, 2006).

Como está explícito em seu nome, as CMMs são multipotentes e podem se diferenciar em diversos tipos de tecidos, como adiposo, conjuntivo, muscular, cartilaginoso, ósseo, além de células do tendão e da medula, como pode ser visualizado na Figura 2 a seguir (CAPLAN; BRUDER, 2001).

Figura 2 - Processo mesengênico.



(CAPLAN; BRUDER, 2001)

3.1.2.1.1 hMSC-TERT

A célula hMSC-TERT é uma linhagem de célula mesenquimal estromal multipotente derivada da medula óssea humana e imortalizada por expressão da transcriptase reversa da telomerase – TERT (MIHARA et al., 2003). Durante os sucessivos ciclos de divisão celular, a célula perde um pedaço da porção final de

seus cromossomos – o telômero. Isso causa senescência, interrupção das divisões celulares e morte celular apoptótica (JARDIM; ASHTON-PROLLA; MALUF, 2009). A célula hMSC-TERT porém, é imortalizada pela expressão da TERT, uma proteína do complexo da telomerase que repõe o telômero perdido permitindo que: a célula se divida indefinidamente sem que perca um pedaço de seu DNA codificante, mantenha sua taxa de crescimento fisiológico e as suas características funcionais (JARDIM; ASHTON-PROLLA; MALUF, 2009). Ela é considerada um modelo, já que uma pequena ou nenhuma alteração em seus atributos ocorre em um número crescente de passagens (WEBER et al., 2007).

Simonsen et al. (2002) utilizou hMSC-TERT para implantar em camundongos imunodeficientes. As hMSC-TERT formaram mais tecido ósseo do que as células normais. Esses resultados corroboram a idéia de que a expressão da telomerase nas hMSCs evita a senescência, que está associada à diminuição das funções, neste caso, dos osteoblastos.

3.2 Aplicações terapêuticas das células-tronco

As CTs podem ser aplicadas em terapias para diversas doenças, incluindo algumas para as quais não há ainda outros tratamentos eficazes (SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005). A terapia celular compreende um conjunto de técnicas ou métodos que visam substituir as células doentes ou disfuncionais por células saudáveis. Compreende a medicina regenerativa, os transplantes com CTH, a imunoterapia, a aférese, a criobiologia, a imunoseleção e a terapia gênica (CARUSO, 2012). A Tabela 2 apresenta, de forma resumida, as potenciais aplicações de CTs para o tratamento de diversas doenças humanas de acordo com o tipo e a fonte das células.

Tabela 2 - Aplicações terapêuticas potenciais de células-tronco para o tratamento de diversas patologias humanas (MIMEAULT et al, 2009).

Célula-Tronco/Progenitora Tipo e Fonte	Células Diferenciadas	Patologias 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	Délulas 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

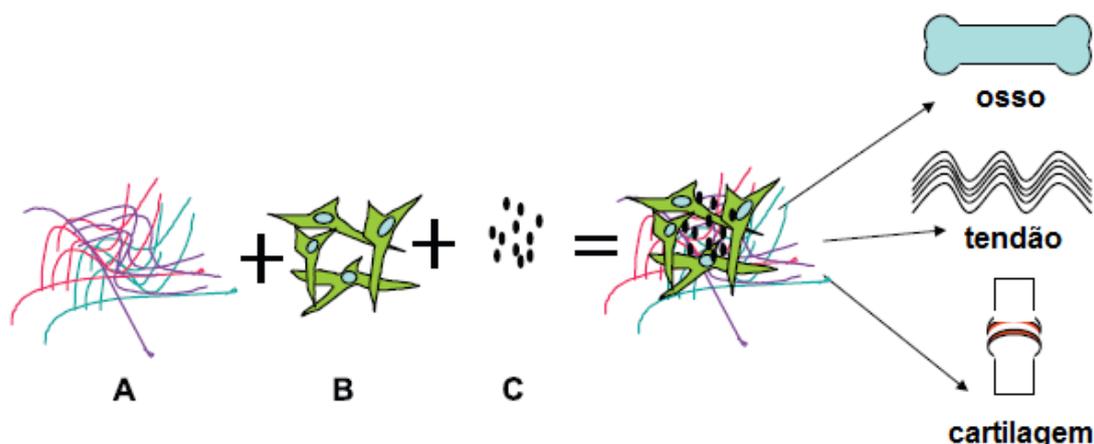
ACIs: Aglomerados de Células da Ilhota; CEAs: Células Epiteliais Aminióticas; COHs: Células Ovais Hepáticas; CPEs: Células Progenitoras Endoteliais; CPMs: Células Progenitoras Multipotentes; CTBAs: Células-Tronco BrônquioAlveolar; CTEs: Células-Tronco Embrionárias; CTECNs: Células-Tronco Epidérmicas 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; CTMAs: 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.

Devido à relevância das CMMs para esse trabalho, as aplicações discutidas serão mais direcionadas para esse tipo celular.

O fácil isolamento e cultivo das CMMs, seu potencial de diferenciação e produção de fatores de crescimento e citocinas, tornam-nas candidatas ideais para os protocolos da medicina regenerativa (ABDALLAH; KASSEM, 2007)

Protocolos da engenharia de tecidos consistem nas práticas mais exploradas para uso clínico das CTMs. Trata-se de um novo campo que promete a construção *in vitro* de tecidos para serem transplantados. Para isso são necessários: um suporte tridimensional adequado, células apropriadas capazes de se diferenciar e manter o perfil fenotípico da célula (célula-tronco) e a adição de substâncias bioativas ideais como fatores de crescimento, citocinas e hormônios como estímulo apropriado para diferenciação específica das células. Esses três componentes podem ser visualizados na Figura 3 (CSAKI; SCHNEIDER; SHAKIBAEI, 2008).

Figura 31 - Princípio da engenharia de tecidos. A) material biocompatível, B) células adequadas (célula-tronco) e C) substâncias bioativas para estimular a diferenciação específica.



(CSAKI; SCHNEIDER; SHAKIBAEI, 2008)

Os “scaffolds” ou suportes (representados por “A” na Figura 3) são de grande importância na engenharia de tecidos, pois consistem num local para a adesão e desenvolvimento das células. Eles devem ter estrutura e propriedades mecânicas ótimas, excelente biocompatibilidade e controle da razão de degradação (WANG et al., 2005). O uso de CMMs autólogas e suportes porosos tridimensionais tem demonstrado um poderoso potencial de reparo nos danos das cartilagens. Numerosas investigações *in vitro* e *in vivo* têm sido feitas com suportes biocompatíveis contendo agarose, ácido hialurônico e cola de fibrina autóloga também para esse fim (HEDRICK; DANIELS, 2003). Materiais naturais modificados como colágeno tipo I, dura-máter humana ou bovina e vários outros polímeros biossintéticos incluindo ácido poliglicólico, ácido polilático e polipropileno têm sido utilizados extensivamente para a diferenciação tendogênica (HUANG et al., 2006).

As CTMs têm sido utilizadas na engenharia de tecidos principalmente para o tratamento de defeitos ósseos, na cartilagem e tendão. As células injetadas são bem toleradas e bons resultados estão sendo obtidos nesses experimentos (ABDALLAH; KASSEM, 2007). A Tabela 3 mostra algumas aplicações de CMMs nesses defeitos.

Tabela 3 – Algumas aplicações terapêuticas de CMMs para o tratamento de patologias humanas (Acervo pessoal).

Autor	Patologia	Tratamento	Resultado
Srouji e Livne (2005)	Doença da perda mássica de osso da idade avançada	Enxerto de subpopulação osteogênica de células-tronco da medula óssea de ratos	Calcificação no local doente e nova formação de osso depois de 6 semanas do enxerto
Yoshikawa, Ohgushi e Tamai (1996)	Defeito ósseo	Implante subcutâneo de CMMs de ratos cultivados <i>in vitro</i> dentro de suporte ("scaffold") de hidroxiapatita porosa	Após uma semana de implantação subcutânea, já pôde ser observada formação e maturação do osso
Jorgensen, Gordeladze e Noel (2004)	Osteogênese imperfeita	Transplante alogênico da medula óssea - enxerto de osteoblastos	Aumento do conteúdo mineral de osso no corpo e crescimento do esqueleto
Krampera et al. (2006)	Defeitos ósseos	Compostos de cerâmica hidroxiapatita/fosfato tricálcio carregados com CMM autólogas expandidas <i>in vitro</i>	Reparo dos defeitos ósseos
Krampera et al. (2006)	Danos das cartilagens	CMMs derivadas da medula óssea de cabra injetadas com suportes hialurônicos nos joelhos das cabras depois de uma ressecção do ligamento	Regeneração do menisco quando comparado aos animais controle, significativo remodelamento do osso subcondral, formação de cartilagem e preservação do revestimento da junta
Wang et al. (2005)	Danos das cartilagens	Desenvolvimento de um suporte para CMMs através de um processo aquoso com fibroína com adição de dexametasona e TGF- β 3 para sobrevivência, proliferação e condrogênese de CMM	Depois de 3 semanas de cultivo, exibiu características nativas da cartilagem
Zhao et al. (2009)	Lesões dos tendões	CMMs colocadas em gel de colágeno e implantadas no tendão dilacerado do cão.	Após quatro semanas, o tendão reparado evoluiu em relação à força e rigidez e conclusão e que o transplante tem um grande potencial para cura do tendão
Dressler, Butler e Boivin (2005)	Defeito no terceiro tendão central	Implante de CMMs de coelhos expandidas em colágeno tipo I.	Efetivo reparo de injúrias leves no tendão
Ringe et al. (2002)	Ruptura no Tendão de Aquiles	Compósitos de colágeno e CMMs foram implantados	Melhora nas propriedades biomecânicas, na arquitetura do tecido e na funcionalidade do tendão após a injúria

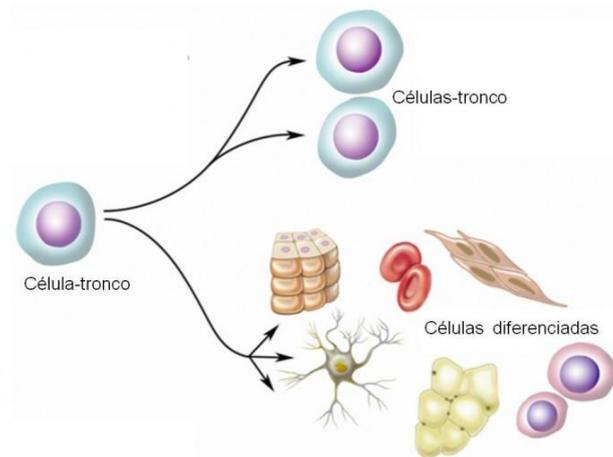
Outros tratamentos de patologias nas mais variadas áreas têm sido beneficiados com a utilização das CMMs. Elas já foram empregadas para reparar

danos após um infarto agudo no miocárdio (CHEN et al, 2004), para facilitar a reconstituição hematopoética e e têm sido alvo de inúmeras pesquisas devido às suas propriedades imunomodulatórias (NAUTA; FIBBE, 2007). São utilizadas de forma profilática para evitar que a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) se instale (TISATO et al., 2007), ou como tratamento, para amenizar e até tratar quadros clínicos graves oriundos desta síndrome (LEBLANC et al., 2004). Segundo Caruso (2012), no Hemocentro de Ribeirão Preto até agosto de 2011 foram infundidas 127 doses de CMM-MO para 34 pacientes portadores da doença do enxerto-contra-o-hospedeiro grave, da diabetes mellitus, da anemia aplástica, e outras condições clínicas (De Lima-Prata, 2011).

3.3 Divisão e crescimento celular

Para realizar as suas funções de autoregeneração e diferenciação, as células-tronco podem seguir dois modelos básicos de divisão celular. O primeiro, denominado determinístico, corresponde à divisão celular de uma célula-tronco que gera invariavelmente uma nova célula-tronco e uma célula que irá se diferenciar. Essa divisão, representada na Figura 4, é o mecanismo fisiológico necessário para manter a composição celular de tecidos e órgãos no corpo humano (BONGSO; RICHARDS, 2004). No segundo mecanismo, chamado aleatório ou eslocástico, algumas células-tronco ao se dividirem geram apenas novas células-tronco, enquanto outras geram apenas células com potencial para sofrer diferenciação. (OLIVEIRA; SPONCHIADO; ADAM, 2006).

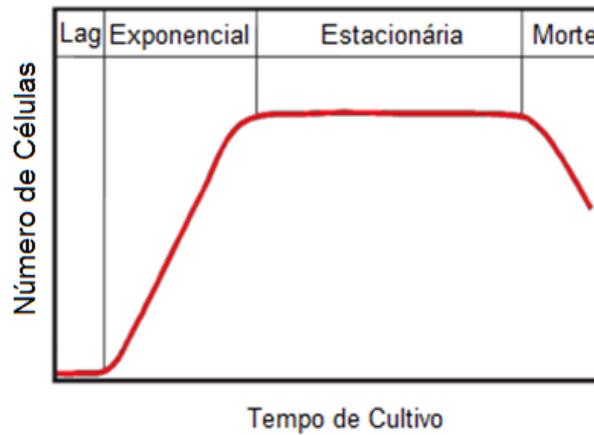
Figura 4 - Representação do resultado do modelo de divisão celular determinístico de células-tronco. Uma célula-tronco origina outra célula-tronco e uma célula que irá se diferenciar.



(BONGSO; RICHARDS, 2004)

O comportamento das CMMs em desenvolvimento ocorre de forma semelhante ao que acontece com outras células de mamíferos. Células em diferentes fases do ciclo de crescimento se comportam diferentemente em relação à proliferação, atividade enzimática, glicólise e respiração, síntese de produtos especializados e muitas outras propriedades (LÉO; GALESÍ; SUAZO, 2008). A curva de crescimento é importante para a avaliação das características específicas de um cultivo celular, como a determinação 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; GALESÍ; SUAZO, 2008). As fases de crescimento celular em cultura são conhecidas como: fase lag, fase exponencial ou logarítmica (log) de crescimento, fase estacionária ou platô e fase de declínio. Elas podem ser visualizadas na Figura 5.

Figura 5 - Curva de crescimento padrão para células animais em cultura.



(SANCHES, 2010)

A fase lag ocorre logo após à inoculação das células. Nessa fase, as células não se dividem ou o fazem em baixas taxas específicas. É um período de adaptação. A duração dessa fase depende tanto da fase de crescimento na qual estava a subcultura precedente quanto da concentração celular do inoculo (LÉO; GALESÍ; SUAZO, 2008). Geralmente ela ocorre em aproximadamente 24 horas (SHI et al., 2009). A fase exponencial ou logarítmica (log) é um período de proliferação ativa durante o qual a concentração de células aumenta exponencialmente. Nessa fase, as células estão em seu melhor estado fisiológico, e portanto, ideais para estudos de função celular. Encontram-se plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e se duplicando. Na fase estacionária, em razão das baixas concentrações de nutrientes e acúmulo de metabólitos inibitórios, a taxa de crescimento do cultivo é reduzida e, em alguns casos, a proliferação celular cessa por completo. Nessa fase, a taxa de morte é igual à de crescimento (BUTLER, 2004). A fase de morte é um período de declínio na concentração de células, ocasionado pela morte celular não compensada por células em proliferação. A morte pode ser ocasionada por apoptose ou agressão letal (LÉO; GALESÍ; SUAZO, 2008).

3.4 Fatores importantes para o cultivo celular

O crescimento *in vitro* de CMMs, assim como o de outras células animais, depende de condições ambientais específicas. Alguns fatores que influenciam sua proliferação são: pH, temperatura, osmolalidade, concentração de gases (oxigênio e gás carbônico), natureza do suporte de adesão, modo como as células são manipuladas, a composição do meio de cultura e a suscetibilidade às tensões hidrodinâmicas (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2007).

O controle do pH e da temperatura são fundamentais. A temperatura no cultivo afeta a solubilidade, especialmente de gases CO₂ e O₂ (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2007). Para monitorar por simples observação visual o pH do meio de cultivo, é muito comum a adição do vermelho de fenol como indicador de pH, porém esse composto pode interferir na interpretação de resultados que envolvam a medida de fluorescência e absorbância (SANCHES, 2010). Na maioria dos meios de cultura utilizados para células animais costuma-se usar soluções tampão. Em alguns casos, o tamponamento é feito pela adição de CO₂ gasoso em equilíbrio com o bicarbonato de sódio (NaHCO₃) presente no meio (ALTAMIRANO; GÒDIA; CAIRÓ, 2007). 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 transformações metabólicas que ocorrem durante a incubação (LÉO; GALESÍ; SUAZO, 2007). Foi demonstrado por Hewitt e colaboradores (2011) que após 9 dias de cultivo de CMMs de placenta humana expandidas em microcarregador Cytodex 3 elas se soltaram dos microcarregadores e morreram em resposta às alterações de pH, substratos e metabólitos presentes no meio de cultura. Isso evidencia a necessidade de controle dos parâmetros relatados. A Tabela 4 apresenta uma faixa de valores, para alguns dos fatores ambientais, utilizada no cultivo da maioria das células de mamíferos.

Tabela 4 – Faixa de valores de pH, temperatura e osmolalidade utilizada no cultivo de células de mamíferos (LÉO; GALESÍ; SUAZO, 2007).

Fatores	Células de Mamíferos
pH	7,4
Temperatura	de 35 a 37 °C
Osmolalidade do meio	de 260 a 320 mOsm.kg ⁻¹

O meio de cultura é um dos componentes mais importantes, uma vez que sua função é proporcionar pH e osmolalidade apropriados, assim como fornecer nutrientes e outras substâncias que a célula não é capaz de sintetizar, como sais inorgânicos, açúcares, aminoácidos, vitaminas, lipídeos, ácidos orgânicos, proteínas, hormônios, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, micronutrientes (íons orgânicos e minerais) e água (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2007). No caso das CMMs, o meio basal contém glicose, aminoácido e íons incluindo cálcio, magnésio, potássio, sódio e fosfato, e soro fetal na concentração de 10-20% (POUNTOS et al., 2007). Os meios de cultura comerciais mais utilizados para o cultivo dessas células são D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), α -MEM (*Alpha Modified Eagle's Medium*) (SENSEBÉ, 2002) e atualmente o MesenPro, específico para células-tronco mesenquimais (MIZUKAMI, 2011). Sotiropoulou, Perez e Salagianni (2006), compararam oito diferentes meios basais quanto à eficácia na aderência, índice de crescimento e número final de CMMs obtidos na cultura. Os resultados evidenciam que o *Alpha Modified Eagle's Medium* (α -MEM) contendo glutamax obteve o melhor resultado.

Costuma-se adicionar soro ao meio, normalmente proveniente de bezerros e fetos bovinos (soro fetal bovino - SFB), uma vez que apresentam baixas concentrações de imunoglobulinas e elevadas proporções de fatores de crescimento (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2007). Também pode se empregar soro de eqüinos e mesmo soro humano, mas são menos comuns (MIZUKAMI, 2011). O soro contém aminoácidos, fatores de crescimento, vitaminas, proteínas, hormônios, lipídeos e minerais, entre outros. O meio basal e o soro podem afetar significativamente no rendimento da expansão de CMMs (POUNTOS et al., 2007). Algumas desvantagens em se utilizar 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 Virus* (BVDV), além da grande presença de proteínas que dificultam a purificação do produto desejado (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2007). Por esses motivos, 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 (MIZUKAMI, 2011). Contudo, segundo Moraes, Mendonça e Suazo (2007), 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 improvável 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.

Diante dessa problemática, diversos estudos têm explorado a possibilidade de utilização de meio de cultura contendo substitutos para o SFB. Entre os candidatos para a substituição estão a trombina ativada de plaquetas do plasma, lisado de plaquetas humanas, plaquetas ricas em plasma, soro humano e plasma derivado no cordão umbilical (ALDAHMAH, 2011; KOLLER; MAHER; MANCHEL, 1998; LANGE et al., 2007). Contudo, até o momento, o meio livre de soro se mostrou ineficaz (MIZUKAMI, 2011).

Outro componente utilizado nos cultivos celulares são os fatores de crescimento. Trata-se de proteínas que se ligam aos receptores da superfície celular que resulta na ativação da proliferação celular e/ou diferenciação (SONG et al., 2008). São utilizados para melhorar o rendimento celular (MIZUKAMI, 2011). Alguns exemplos de fatores de crescimento são: o FGF (*Fibroblast Growth Factor*), um conhecido mitógeno para algumas células conectivas, incluindo osteoblastos e condrócitos; o EGF (*Epidermal Growth Factor*); o NGF (*Nervous Growth Factor*); o PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) e outros compostos semelhantes à insulina (*insulin-like growth factor*) IGF-1 e IGF-2 e as interleucinas, principalmente a IL3 (TSUTSUMI; SHIMAZU; MIYAZAKI, 2001).

Os antibióticos adicionados ao meio de cultivo podem ser relevantes no cultivo celular. Os mais comuns são: a penicilina, estreptomicina e a anfotericina B.

Entretanto, seu uso deve ser o mínimo possível, pois alguns antibióticos podem ter efeito citotóxico, mesmo quando elevadas concentrações de soro são empregadas (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2008).

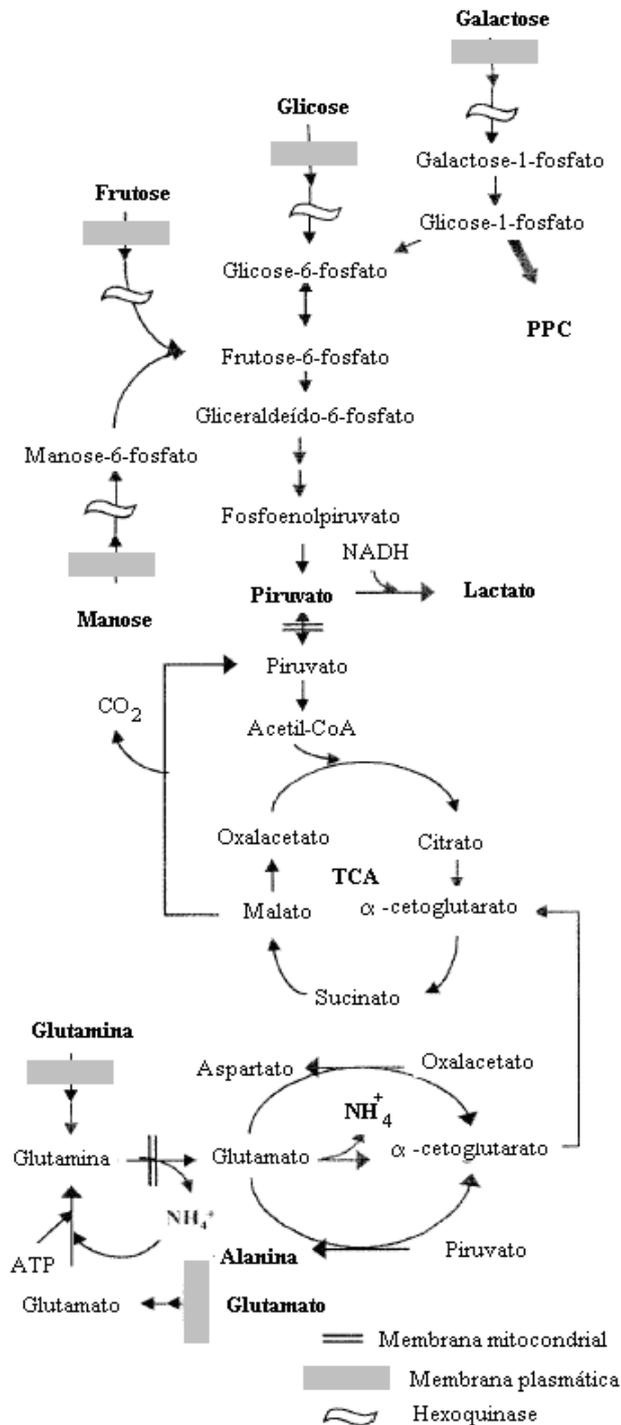
3.5 Metabolismo de células de mamíferos em cultura

Conhecer o metabolismo de células em cultura é essencial para a formulação do meio de cultura, para o planejamento de estratégias de alimentação, para se obter altas produtividades tanto de células quanto de produto e para a produção de células destinadas à terapia (SANCHES, 2010; CARUSO, 2012).

Em cultivos de células animais *in vitro*, o metabolismo central segue alguns padrões gerais. As duas principais fontes de energia, ATP (adenosina trifosfato), para as células animais são glicose e glutamina (GÒDIA; CAIRÓ, 2002). As CMMs têm demonstrado possuir um metabolismo semelhante às linhagens de células animais em cultura (CARUSO, 2012).

Nessas células, geralmente, a concentração de glicose livre no citosol é muito baixa, então, por difusão facilitada, seu transporte ocorre em direção ao interior da célula. Ao adentrar o 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 passa por algumas reações até ser transformada em piruvato. Essas reações geram outros intermediários biossintéticos, duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) e duas de nicotina adenina dinucleotídeo (NADH) (ALTAMIRANO; GÒDIA; CAIRÓ, 2008). O NADH produzido, atua como agente redutor do piruvato em lactato, catalisado pela enzima lactato desidrogenase presente no citosol. Esse conjunto de reações pode ser visualizado na Figura 6.

Figura 6 - Representação simplificada do metabolismo da glicose e da glutamina em uma célula animal.



(GÒDIA; CAIRÓ, 2002)

Quando um mol de glicose é metabolizado via glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa, produz, no final, 30-38 mols de ATP; porém quando

metabolizado pela via da glicólise anaeróbia apenas, gera 2 mols de ATP e 2 mols de lactato. Assim, tanto o consumo de glicose quanto a produção de lactato podem indicar qual a via metabólica as células estão utilizando para produzir energia a partir da glicose (SCHOP et al., 2009).

O segundo componente principal utilizado nos meios de cultura de células de mamíferos é a glutamina. Seu metabolismo é responsável pela 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, isso explica a alta concentração de glutamina que normalmente se utiliza na formulação do meio de cultivo (ALTAMIRANO; GÒDIA; CAIRÓ, 2007).

Em cultivos de CMMs, assim como nos de outras células de mamíferos, o decaimento rápido e/ou esgotamento da glicose e da glutamina, produz, respectivamente, grandes quantidades de ácido láctico e íon amônio, que são metabólitos tóxicos para as mesmas (ALTAMIRANO; GÒDIA; CAIRÓ, 2007). Essa geração de lactato requer o uso de métodos eficientes para o controle do pH para evitar o efeito negativo da acidificação do meio no crescimento celular (MIZUKAMI, 2011). Os valores de lactato considerados inibitórios são os maiores que 28 mM (SHOP et al., 2008) e os efeitos negativos de sua concentração no crescimento celular são observados claramente para valores iguais ou superiores a 40 mM (AMABLE; BUTLER, 2008). A amônia (NH₃) e o íon amônio (NH₄⁺) mesmo em baixos níveis de concentração (2mM) podem gerar efeitos negativos no metabolismo celular (ALTAMIRANO; GÒDIA; CAIRÓ, 2008).

Há ainda outros aminoácidos metabolizados em cultivos *in vitro*, porém, geralmente, de forma diferenciada para cada tipo celular. Para a maioria dos tipos celulares, eles podem ser separados em três grupos: aqueles que são rapidamente consumidos (valina, isoleucina, leucina, lisina e cisteína), aqueles consumidos em baixas proporções (treonina, arginina, fenilalanina, serina, histidina, metionina e

glicina) e os que são produzidos e secretados pela célula (alanina, prolina, aspartato, asparagina e glutamato) (ALTAMIRANO; GÒDIA; CAIRÓ, 2008).

3.6 Processos de cultivo de células-tronco

3.6.1 Histórico do desenvolvimento da tecnologia de cultivo celular

O termo “cultura celular” corresponde ao conjunto de técnicas que permitem cultivar ou manter células fora do organismo onde existem, mantendo as características próprias. Os estudos sobre cultivo de células animais iniciaram-se há mais de um século. Há relatos de que em 1885, na Alemanha, Roux manteve células embrionárias de pinto vivas em solução salina. Esse seria o primeiro dado de sobrevivência de células fora do corpo animal. Foi, no entanto, somente em 1907, como o norte americano Harrison, que o cultivo de células iniciou-se.

Ross Harrison utilizou um explante de um tecido neural de embrião de sapo e conseguiu quebrar a maior controvérsia da neurobiologia, mostrando claramente que cada fibra nervosa é consequência de um único nervo celular. Ele considerou as necessidades básicas de uma célula e, em seu experimento, mimetizou tais condições. Harrison registrou a manutenção e o crescimento de células nervosas por um período de até 30 dias tendo o cuidado de manter as condições assépticas. Suas considerações sobre a possibilidade de e manter in vitro células vivas por um longo tempo foram um marco para a cultura de células (WIGLEY, 2001). A partir de então, muitos outros cientistas passaram a se interessar por esse modelo de experimento, introduzindo o uso de cultura de células em suas pesquisas.

Em 1912 nos Estados Unidos, Alexis Carrel, conhecendo as observações de Harrison, desenvolveu um modelo a partir de células cardíacas de embrião de galinha para o cultivo. Seus experimentos foram importantes, uma vez

que, com eles, descobriu-se a necessidade da troca de fonte de nutrientes contidos nos frascos. Essa renovação constante de nutrientes em cultivo permitiu que as células pudessem ser cultivadas por períodos ainda maiores do que os utilizados por Harrison (WIGLEY, 2001).

Em meados de 1940, Earle e colaboradores desenvolveram uma técnica de estoque indefinido de células em nitrogênio líquido a - 196°C (WIGLEY, 2001). Em 1948 ele isolou uma única célula da linhagem das células L e mostrou que elas formam clones de células em cultura de tecidos.

As dificuldades enfrentadas nos primeiros experimentos 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 (SANCHES, 2010).

O grande impulso para aplicação de células animais em larga escala deu-se com a necessidade de produção de vacinas virais (MIZUKAMI, 2011). Em meados de 1940-50 houve uma grande epidemia de poliomelite e isso serviu como incentivo para o desenvolvimento de uma vacina eficiente. Nessa década, Enders conseguiu pela primeira vez isolar os vírus da vaccínia e da gripe em culturas de tecidos mantidas em tubos de ensaio. Com a colaboração dos pediatras Tom Weller e Fred Robbins, Enders semeou o vírus da poliomelite em tecidos fetais mantidos em tubo de ensaio, na presença de um corante que mudava de cor de acordo com a acidez ou alcalinidade do meio. Verificou que, enquanto as células não-infectadas liberavam ácidos no meio de cultura tornando o corante amarelo, as que continham o vírus não modificavam a cor do corante. Esse método demonstrou que era possível propagar o vírus da pólio em cultura de tecidos. Também verificou que, ao transferir o vírus de uma cultura para outra em sucessivas passagens, ocorria diminuição progressiva da virulência, passo essencial para o desenvolvimento da vacina que se tornou um dos primeiros produtos comerciais oriundos do cultivo de célula animal (BUTLER, 2004).

Em 1952, George Gey cultivou células de tecido tumoral cervical humano estabelecendo a linhagem HeLa, cujo nome derivou-se de sua doadora Henrietta Lacks. Essa linhagem é utilizada até hoje em todo o mundo (BUTLER,

2004). A descoberta de que tumores humanos poderiam dar origem a células contínuas em linhagem aumentou ainda mais o interesse pelo cultivo de tecidos.

Em 1955, Earle e Eagle procuraram desenvolver formulações de nutrientes para crescimento celular. Surgiu então, o primeiro meio amplamente utilizado em cultura celular. Ele seria capaz de substituir os fluidos biológicos e foi denominado EMEM (*Eagles Minimum Essential Medium*) (BUTLER, 2004).

Os experimentos de Hayflick e Moorhead, em 1961, mostraram que fibroblastos humanos morrem após um número finito de divisões em cultura. Eles verificaram que as células podiam crescer continuamente através de subculturas e condições estabelecidas por até 50 gerações (KRETZMER, 2002).

Em 1962, Capstick e seus colaboradores conseguiram cultivar células BHK (*Baby Hamster Ovary*) em suspensão. 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 (SANCHES, 2010).

Ainda em 1962, Nakamura e seus colaboradores, estabeleceram a linhagem VERO, oriunda de rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Essa célula foi aprovada para uso em produção de vacinas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o que a tornou um modelo de pesquisas para o desenvolvimento de novas vacinas. A utilização de outras linhagens de células humanas (WI-38 e MRC-5) infectadas com determinados vírus desenvolveu a produção de vacinas contra sarampo (1963), raiva (1964), caxumba (1969) e rubéola (1969) para uso humano (SANCHES, 2010).

Em 1967, van Wezel desenvolveu culturas de células aderentes em alta densidade e em larga escala. 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 1975, Köhler e Milstein fundiram linfócitos com células de mieloma, originando os primeiros hibridomas. Essa técnica propiciou às companhias a produção de anticorpos monoclonais contra antígenos conhecidos, por meio da fusão de linfócitos, produtores de anticorpo, com células originárias de tumor, os mielomas. A expressão de anticorpos monoclonais em hibridomas resultou em um

significativo aumento na produção de testes para diagnósticos médicos. Sua alta seletividade permite aos anticorpos monoclonais 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 (SANCHES, 2010).

Em meados de 1980, houve o desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante, que permite que o DNA seja isolado e inserido em qualquer célula. Primeiramente a técnica foi utilizada para expressão de genes de mamíferos em bactéria (particularmente a *E. coli*). A primeira proteína terapêutica humana licenciada por meio dessa tecnologia foi a insulina recombinante, em 1982. Desde 1996, os anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados tem dominado esse grupo de produtos como: Rituxan, Remicade, Synagis e Herceptin (BUTLER, 2005).

Na Tabela 5 constam, resumidamente, os principais marcos históricos no cultivo de células animais.

Tabela 5 - Principais eventos históricos no cultivo de célula animal (adaptada de MIZUKAMI, 2011).

ANO	EVENTO HISTÓRICO
1907	Ross Harrison publicou experimentos mostrando o explante de um tecido neural de embrião de sapo e mostrou a possibilidade de se manter <i>in vitro</i> células vivas.
1912	Alexis Carrel cultivou células de tecido conjuntivo por um extenso período. Descobriu a necessidade da troca de fonte de nutrientes contidos nos frascos
1940	Earle e colaboradores desenvolveram a técnica de estoque indefinido de células em nitrogênio líquido a -196°C . Isolou uma única e mostrou que elas formam clones de células em cultura de tecidos.
1949	Enders desenvolveu a vacina da poliomelite.
1952	George Gey descobriu que tumores humanos poderiam dar origem a células contínuas em linhagem. Estabeleceu a linhagem HeLa
1955	Earle e Eagle desenvolveram um meio quimicamente definido (<i>EMEM</i>).
1961	Hayflick e Moorhead estudaram o crescimento de fibroblastos humanos e verificaram que eles morrem após um número finito de divisões em cultura.
1962	Capstick <i>et al.</i> conseguiram cultivar células BHK (Baby Hamster Ovary) em suspensão. Nakamura <i>et al.</i> estabeleceram a linhagem VERO.
1967	Van Wezel desenvolveu culturas de células aderentes (em microcarregadores) em alta densidade e larga escala.
1975	Kohler e Milstein – produção de hibridomas.
1980	Tecnologia do DNA recombinante.
1982	Primeira proteína recombinante licenciada

O cultivo celular tem sido de grande importância para a biotecnologia moderna, especialmente no que se refere à produção de enzimas, hormônios, anticorpos, vacinas virais, proteínas (incluindo as glicoproteínas recombinantes). Esses produtos são amplamente utilizados nas áreas biomédicas (terapia celular), de alimentos, agropecuária e farmacológica, indústria de vacinas e em bioindústrias (BUTLER, 2005). Atualmente, o cultivo celular tem importante papel para a terapia celular. As pesquisas com células-tronco são um marco nessa área. Elas tornaram-se protagonistas do desenvolvimento tecnológico mundial.

3.6.2 Expansão de células mesenquimais estromais multipotentes

Como foram apresentadas, as aplicações de CMMs têm ganhado grande espaço tanto em número de pesquisas, quanto em sua aplicabilidade na medicina regenerativa. Há, no entanto, limitações para sua ampla utilização, uma vez que são necessárias elevadas doses de CMMs (aproximadamente 2×10^6 células/kg paciente) e, portanto, grandes quantidades dessas células para uma infusão. Na medula óssea, por exemplo, elas estão presentes em quantidades bem reduzidas 0,01%-0,0005% (CAPLAN, 2007) em relação ao que é preciso para a obtenção de bons resultados terapêuticos. Assim, o desenvolvimento de tecnologias de expansão *in vitro* que permitam a obtenção de células com adequada qualidade terapêutica e custo reduzido é de extrema importância (CARUSO, 2012). A seguir serão abordadas algumas das principais tecnologias utilizadas para a expansão das CMMs.

3.6.2.1 Expansão estática em garrafas

As células podem se desenvolver *in vitro* após dissecação e dispersão total ou parcial do tecido de origem, resultando em uma cultura primária e, posterior, em uma linhagem celular. Para assegurar a disponibilidade de células e a conservação das suas características tem-se estabelecido um banco celular da linhagem a ser cultivada. 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, após o descongelamento, as células são incubadas e propagadas em um sistema estático com frascos T ou garrafas de cultura descartáveis. Esse sistema consiste em um compartimento único não agitado onde as células são depositadas juntamente com o meio de cultura. Placas de múltiplos poços com pequena capacidade também são um exemplo de cultivo estático, porém sua utilização está mais voltada às atividades relacionadas à clonagem e seleção de células (SANCHES, 2010).

Quando a quantidade de células ocupa entre 70% e 80% da área superficial disponível (70-80% de confluência) em um frasco T, a cultura celular deve ser dividida entre outros frascos equivalentes ou transferida para outros de capacidade maior. Essa prática é comumente conhecida como “passagem”. Na transferência das células aderentes de um frasco para outro, elas são desprendidas mecanicamente e/ou utilizando enzimas, como a tripsina (CHICO; RODRIGREZ; FIGUEREDO, 2007) ou tryple, entre outras. O número de passagens é um parâmetro crítico para garantir uma boa razão de expansão e a manutenção do potencial de diferenciação celular (MIZUKAMI, 2011). Geralmente, a multipotencialidade e a alta razão de expansão são melhores quando se tem menos passagens e inóculos menores (1×10^3 cél/mL) (COLTER; SEKLIA; PROCKOP, 2001; SEKIYA, 2002). Porém, no contexto de aplicação terapêutica, a utilização de poucas passagens se torna muito difícil, uma vez que se faz necessário grandes quantidades de células viáveis (SENSEBÉ, 2002).

Há algumas limitações associadas à cultura celular estática em garrafas. A falta de agitação ocasiona gradientes de concentração de nutrientes e metabólitos e a transferência de oxigênio para o meio líquido é limitada pela pequena área de interface gás-líquido (CHICO; RODRIGREZ; FIGUEREDO, 2007). Em linhagens aderentes, como as CMMs, a falta de acompanhamento e controle das condições ambientais limita a produtividade do número de células (YU et al., 2009). O alto custo, o tempo prolongado de cultivo para a geração da quantidade adequada e não diferenciada de células (SCHOP et al., 2008), a necessidade de grande quantidade de pessoas especializadas para a realização das inúmeras passagens e a excessiva manipulação que aumenta o risco de contaminação, consistem em outras limitações. Além disso, o aumento de escala deste tipo de cultura é limitado em função da razão área superficial/ volume de cultivo ser reduzida, necessitando-se portanto, de um grande número de garrafas ou de bandejas contendo vários andares. Isso acarreta a necessidade de uma grande área disponível na incubadora (RODRIGUES et al., 2011).

3.6.2.2 Expansão em biorreatores

Diante das dificuldades apresentadas sobre os sistemas de cultivo estáticos, outras alternativas para expansão celular em larga escala passaram a ganhar espaço – os biorreatores. Biorreatores são dispositivos mecânicos capazes 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; MCFARLAND; NORDON, 2008). Biorreatores eficientes asseguram o controle do equilíbrio ácido-base (pH) do meio de cultivo, o controle de temperatura, a troca de gases que permita um suprimento adequado de oxigênio (O₂) e eliminação do excesso de dióxido de carbono (CO₂), o suprimento de nutrientes (meios de cultivo com formulação adequada), o controle de metabólitos tóxicos às células (lactato e

amônio), além do suporte para adesão celular (no caso de células aderentes) e a manutenção da assepsia (CHICO; RODRIGREZ; FIGUEREDO, 2008).

Os biorreatores têm sido utilizados em fermentação industrial, tratamento de água, processamento de alimentos e principalmente na produção de medicamentos, proteínas recombinantes e na engenharia de tecidos (MARTIN; WENT; HEBERER, 2004). Eles podem operar de quatro formas diferentes de acordo com seu regime de alimentação. São elas: cultivo descontínuo (batelada), cultivo descontínuo alimentado (batelada alimentada), cultivo contínuo e cultivo contínuo com retenção de células (perfusão) (CHICO; RODRIGREZ; FIGUEREDO, 2008).

O cultivo descontínuo ou em batelada é o mais simples de ser executado, pois nele não há suplemento adicional de substrato após a inoculação das células. Assim, o volume trabalho é mantido constante ao longo de todo o processo. Apenas a aeração deve ser suprida continuamente devido à baixa solubilidade do O₂. O controle do pH é feito por adição de base ou variando a concentração de dióxido de carbono na fase gasosa (CHICO; RODRIGREZ; FIGUEREDO, 2008).

Na batelada alimentada ou cultivo descontínuo alimentado, administra-se um ou mais nutrientes durante o cultivo, para repôr aqueles consumidos pelas células. A alimentação dos nutrientes pode ser executada utilizando diferentes estratégias: desde adições em pulsos, adições segundo perfis escalonados, adições à vazão constante, até estratégias mais sofisticadas que seguem um perfil de vazão exponencial na tentativa de altas densidades celulares (CHICO; RODRIGREZ; FIGUEREDO, 2007).

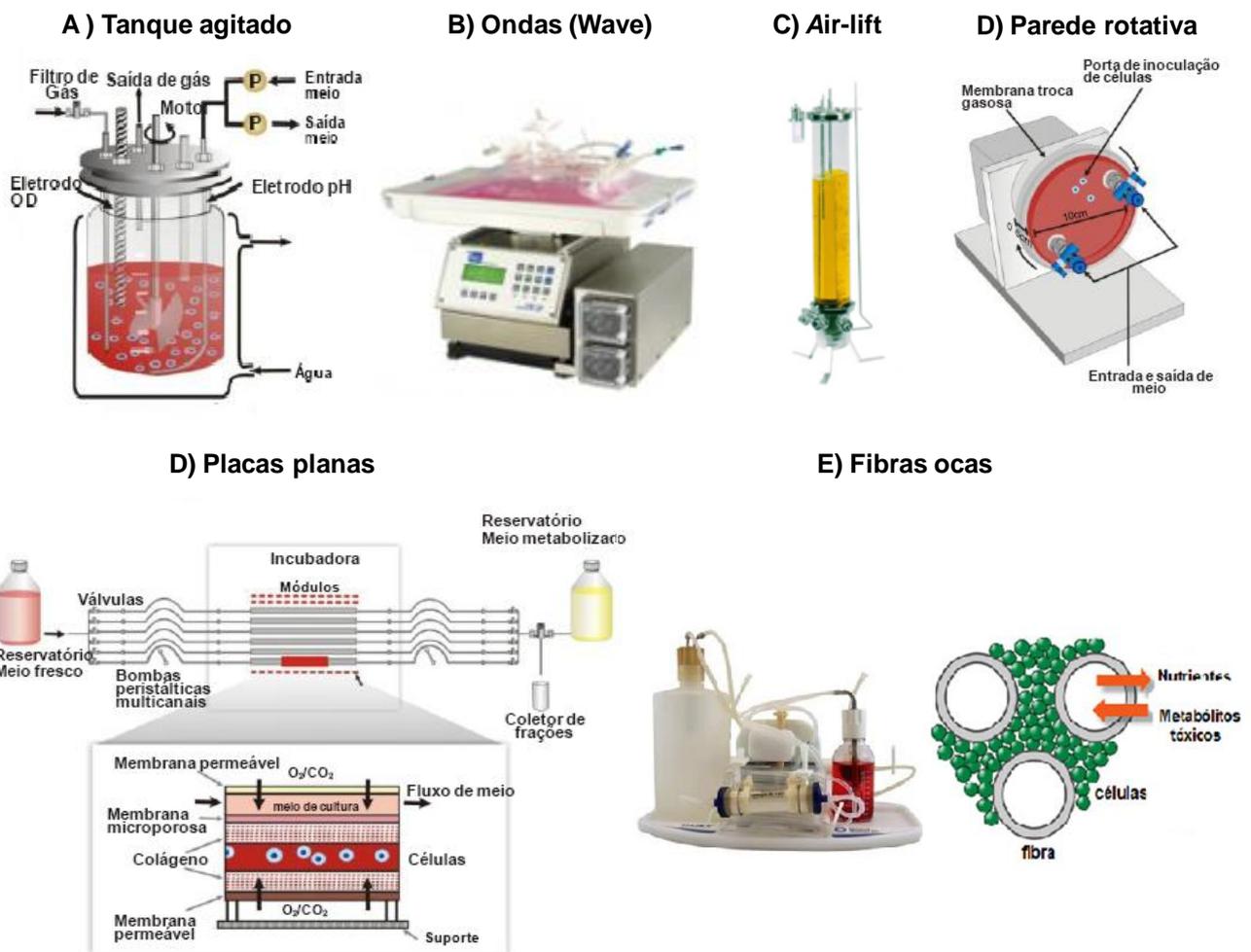
O cultivo contínuo caracteriza-se pela contínua adição de meio de cultura fresco e remoção de meio cultivado contendo células. Essas duas operações ocorrem à mesma vazão, de tal forma que se mantém o volume do biorreator constante (CHICO; RODRIGREZ; FIGUEREDO, 2008).

Na perfusão ou cultivo contínuo com retenção de biomassa, as células são retidas dentro do biorreator empregando-se um dispositivo de retenção celular. Dessa forma, não ocorre a perda de células na saída do biorreator, como acontece no sistema de cultivo contínuo (CHICO; RODRIGREZ; FIGUEREDO, 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). No que diz respeito à configuração dos biorreatores para expansão de células tronco, estratégias envolvendo agitação e perfusão são as mais utilizadas (RODRIGUES et al., 2011).

A escolha do biorreator mais adequado para cada situação depende das características de crescimento das células e dos objetivos do cultivo. Para tanto, é importante o conhecimento dos diferentes modelos de biorreatores. A Figura 7 mostra alguns dos mais utilizados.

Figura 7 – Representação de alguns dos tipos de biorreatores mais utilizados: (A) tanque agitado, (B) wave, air-lift, (C) parede rotativa, (D) placas planas, (E) fibras ocas.



(CARUSO, 2012; GE Healthcare; SANCHES, 2010; WHITFORD; CADWELL, 2009)

O biorreator de tanque agitado, ou de suspensão agitada, consiste basicamente em um tanque provido de um ou mais impelidores para efetuar a mistura do meio de cultura, juntamente com as células em suspensão (CHICO; RODRIGREZ; FIGUEREDO, 2007), ou aderidas em suportes especializados (microcarregadores, por exemplo). Esses impelidores, geralmente, são colocados em volta de um eixo central rotatório e distribuídos no centro e/ou no fundo do tanque. O tipo (turbinas, hélices e discos, entre outros), tamanho e número de agitadores, bem como a localização influenciam diretamente na mistura e transferência de massa no reator. A velocidade de rotação (rpm) dos agitadores é definida pelo usuário.

A primeira aplicação desse tipo de biorreator data dos anos 40, quando foi utilizado durante a Segunda Guerra Mundial no cultivo aeróbico para a produção do antibiótico penicilina. Atualmente é amplamente empregado na biotecnologia para a produção em larga escala de células e de vários bioprodutos. Geralmente utiliza-se um tanque agitado em cultivos celulares com volumes que variam de 2 a 10.000 litros (CHU; ROBINSON, 2001). Os frascos spinners fazem parte desse grupo de biorreatores, porém, são amplamente empregados para escalas menores, como pesquisas em etapas iniciais de aumento de escala (SANCHES, 2010). Trata-se de um recipiente de vidro ou plástico com um agitador magnético central e braços laterais para adição e remoção de meio e células, como mostrado na Figura 8. Sua utilização aumenta a eficiência e crescimento celular em comparação com cultura estática (KING; MILLER, 2007).

Figura 8 - Representação de um spinner.



Spinner

(CARUSO, 2012)

Dentre as vantagens apresentadas para a utilização desse tipo de biorreator estão: design simples, condições homogêneas, facilidade para a operação, retirada de amostras, monitoramento e controle de parâmetros de cultivo. No entanto, tensões de cisalhamento geradas pela agitação mecânica podem ser prejudiciais às células e pode ocorrer a formação de aglomerados de células e microcarregadores (RODRIGUES et al., 2011).

3.6.2.2.1 Microcarregadores

O fato das CMMs serem dependentes de ancoramento implica na necessidade de uma área específica para que possam aderir-se e proliferar dentro do biorreator. Os microcarregadores desempenham essa função de suporte, uma vez que são partículas geralmente esféricas, que propiciam maior área efetiva para adesão celular e permitem o cultivo em sistemas agitados. Segundo Malda e Frondoza (2006), um grama de microcarregador possui uma área disponível para crescimento celular semelhante a 15 frascos de cultura de 75 cm². Portanto, o cultivo das células em microcarregadores representa uma economia de tempo e custo de produção, principalmente em relação à utilização de meio de cultura e suplementos como fatores de crescimento e soro fetal bovino (MALDA; FRONDOZA, 2006). A cultura utilizando microcarregadores em suspensão também facilita a transferência de oxigênio e CO₂ e a manutenção de um ambiente homogêneo para crescimento celular (CARUSO, 2012).

Os microcarregadores podem ser produzidos em tamanhos variados e a partir de diversos materiais, como vidro, dextrana, agarose, colágeno, polímeros modificados (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2007; YANG; ROSSI; PUTNINS, 2007). Essas estruturas foram introduzidas em 1967 por Van Wezel e diferenciam-se umas das outras, além da composição química, pela carga elétrica, revestimento superficial e porosidade (SCHOP et al., 2008), como pode ser visto na Tabela 6. Eles podem ser classificados como microporosos, quando possuem os diâmetros dos poros menores que 1 µm, de forma a permitir o crescimento celular apenas na

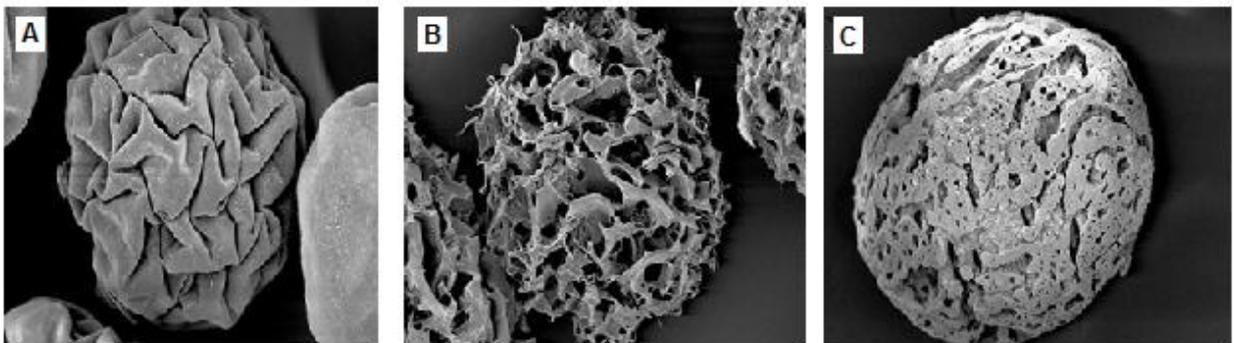
superfície externa; ou macroporosos, com diâmetros maiores que 10 μm , possibilitando a proliferação celular também em suas superfícies internas (FERNANDES et al., 2007). As Figuras 9 e 10 mostram imagens desses dois tipos de microcarregadores.

Tabela 6 - Alguns tipos de microcarregadores disponíveis comercialmente, suas composições e seus fabricantes (adaptado de MIZUKAMI, 2011).

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

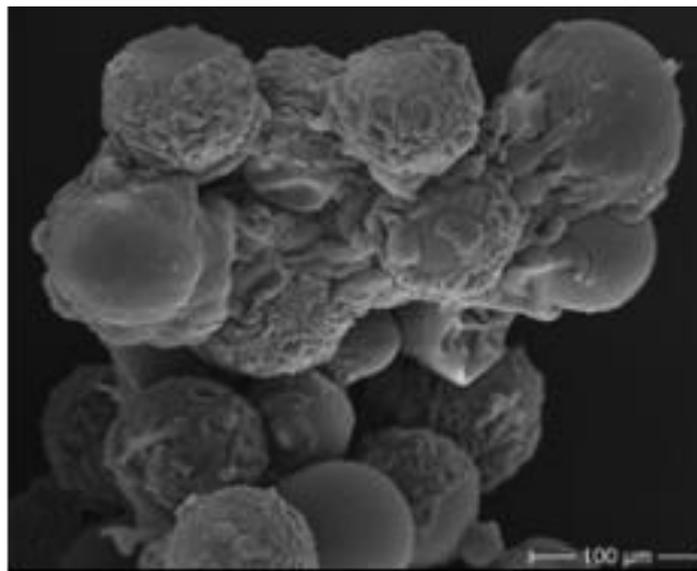
P 102-L	Poliestireno	----	Não	Hyclone/SoloHill
P Plus 102 - L	Poliestireno	+	Não	Hyclone/SoloHill

Figura 9 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de microcarregadores Cytodex-1 (A), Cytopore (B) e Cultispher-S (C). Os microcarregadores B e C são macroporosos e o A é microporoso.



(YANG; ROSSI; PUTNINS, 2007)

Figura 10 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura de microcarregadores Cytodex-1 colonizados por células mesenquimais estromais multipotentes da medula óssea suína após 28 dias de cultivo em frasco spinner.



(FRAUENSCHUH et al., 2007)

Os microcarregadores têm sido amplamente utilizados na produção farmacêutica, principalmente de vacinas, e para a expansão de populações de células (SCHOP et al., 2008). Segundo Eibes et al. (2010), a utilização do microcarregador macroporoso Cultispher-S para expansão de CMMs permitiu um fator de crescimento de 8,4 vezes ($\pm 0,8$). Trata-se de uma partícula esférica, com diâmetro de 125 a 212 μm , composta por uma matriz de gelatina eletricamente neutra e hidrofílica. Essa gelatina é derivada de colágeno, uma das substâncias da matriz extracelular responsável pela adesão. Além apresentar tanto a área interna como a externa para a adesão celular, o Cultispher-S pode ser dissolvido em enzimas como a Tryple, proporcionando uma taxa de recuperação celular maior no final do cultivo. Essa vantagem é de fundamental importância para a terapia celular e consiste no motivo pelo qual o Cultispher-S foi o microcarregador escolhido para a realização do presente trabalho.

3.6.2.2.2 Cultivos de CMMs utilizando microcarregadores em frasco spinner

O cultivo celular em frasco spinner com utilização de microcarregadores consiste em uma técnica que apresenta melhoria significativa quando comparada com sistemas estáticos. Trata-se de uma alternativa para expansão celular que apresenta vantagens como: elevada área de superfície por volume, maior controle em cultura homogênea, simplicidade e facilidade no manuseamento, menor risco de contaminação e redução de custos (FERNANDES et al., 2009; WEBER et al., 2007).

Muitos trabalhos de expansão de CMMs utilizando diversos tipos de microcarregadores têm sido descritos na literatura, como mostra a Tabela 7.

Tabela 7 - Cultivos de células mesenquimais estromais multipotentes com microcarregadores encontrados na literatura (adaptada de CARUSO,2012; MIZUKAMI, 2011).

	Microcarregador	Tipo de célula Origem	Duração do experimento (dias)	Concentração celular inicial	Concentração celular final	Fator de expansão (vezes)
FRAUENSCHUH et al., 2007	Cytodex-1	CMMs Medula óssea Suína	28	$1,0 \times 10^5$ células/mL	$3,6 \times 10^5$ células/mL	3,6
YANG; ROSSI; PUTNINS, 2007	Cultispher-S	CMMs Medula óssea Ratos	35	$1,5 \times 10^7$ células	$1,24 \times 10^8$ células	8,3
SCHOP et al., 2008	Cytodex-1	CMMs Medula óssea Cabra	15	4×10^4 células/mL	$1,2 \times 10^5$ células/mL	3,0
SART; SCHNEIDER; AGATHOS, 2009	Cytodex-3	CMMs Orelha Rato	6	4×10^4 células/mL	$4,5 \times 10^5$ células/mL	11,2
EIBES et al., 2010	Cultispher – S	CMMs Medula óssea Humana	8	5×10^4 células/mL	$4,2 \times 10^5$ células/mL	8,4
SANCHES, 2010	Cultispher-S	Linhagem de CMMs Medula óssea Humana	15	$1,25 \times 10^5$ células/mL	$1,212 \times 10^6$ células/mL	9,7
SUN et al., 2010	Cultispher-G	CMMs Medula óssea Humana	6	$1,0 \times 10^5$ células/mL	$2,69 \times 10^5$ células/mL	2,8
BOO et al., 2011	Cytodex-1	CMMs Medula óssea Coelho	14	$1,21 \times 10^5$ células/mL	$6,24 \times 10^5$ células/mL	5,2
HEWITT et al., 2011	Cytodex-3	CMMs Placenta Humana	13	5 células/microcarregador	101 células/microcarregador	20,0
MIZUKAMI, 2011	Pronectin - F	Linhagem de CMMs Medula óssea Humana	8	$6,25 \times 10^6$ células	7×10^7 células	11,2
CARUSO, 2012	Cytodex-3	CMMs Medula óssea e veia do cordão umbilical Humana	7	$1,25 \times 10^5$ células/mL	$4,9 \times 10^5$ células/mL	3,9

A maioria dos artigos publicados sobre cultivos com microcarregadores focam a expansão e o metabolismo celular (EIBES et al., 2010; HEWITT et al., 2011; SART; SCHNEIDER; AGATHOS, 2009; SCHOP et al., 2009; SERRA et al., 2009; SHI et al., 2009; YANG; ROSSI; PUTNINS, 2007); porém, apenas poucos mencionam a recuperação dessas células (BOO et al., 2011, CARUSO, 2012).

A formação de agregados de microcarregadores tem sido relatada em alguns estudos que utilizaram esse sistema de cultivo (CARUSO, 2012; FRAUENSCHUH et al., 2007; MIZUKAMI, 2011; SANCHES, 2010). Apesar de ter sido apontada como um fator que contribuí para a proliferação celular (SANTOS et al., 2010), a formação desses aglomerados dificulta a recuperação das células no final do experimento. Segundo Caruso (2012), a garantia da recuperação do maior número de células possíveis pós-expansão com adequada qualidade terapêutica é um dos fatores mais importantes no desenvolvimento de um bioprocesso para produção de células mesenquimais de grau clínico. A utilização de microesferas de alginato e de sulfato de dextrana nos cultivos de hMSC-TERT com microcarregadores em frasco spinner apresentadas nesse estudo consistem em alternativas a serem investigadas para conter a formação desses aglomerados e assim minimizar a problemática apresentada.

3.7 Alginato: aplicações e relação com cultivos celulares

O alginato é um polissacarídeo presente na parede celular de algas marrons e algumas bactérias. Ele pode atuar como estabilizante, espessante e/ou gelificante na confecção de vários produtos alimentícios. Também tem contribuído, entre outras aplicações, para a elaboração de *scaffolds* utilizados na engenharia de tecidos e para o desenvolvimento de microesferas encapsuladoras de células ou fármacos de liberação controlada.

O alginato foi utilizado em testes para criação de vacina contra a doença parasitária leishmaniose. Segundo Diwan, Tafaghodi e Samuel (2002), a

imunogenicidade de um antígeno, ou seja, a capacidade de induzir uma resposta imune, é aumentada quando este está encapsulado em partículas biodegradáveis (DIWAN; TAFAGHODI; SAMUEL, 2002). Taffaghodi (2011) e seus colaboradores encapsularam o parasita da leishmaniose em micropartículas biodegradáveis de alginato de sódio. O estudo demonstrou que o encapsulamento não afetou a integridade do antígeno e propiciou proteção parcial contra a infecção por *Leishmania major*. Também supôs que o grupo de camundongos imunizado com a vacina encapsulada teria apresentado menor carga parasitária em relação ao grupo controle, que recebeu a vacina com o parasita não encapsulado. É importante lembrar que essa vacina não está disponível para aplicações em humanos.

Há relatos do emprego de alginato de sódio também na microencapsulação de bactérias, como do *Bacillus subtilis* tanto na forma esporulada quanto na vegetativa (BREGNI et al., 2000). O estudo mostrou que esse encapsulamento garantiu a não ocorrência de alterações nas propriedades biológicas dos microorganismos e conferiu a proteção dos mesmos devido ao impedimento da comunicação direta com o ambiente externo (BREGNI et al., 2000).

Microesferas de alginato também foram empregadas para recobrir plasma rico em plaquetas e células-tronco derivadas do tecido adiposo a fim de verificar seu potencial osteogênico e angiogênico na recuperação óssea (MAN, et al. 2012). Nesse estudo foi demonstrado que as células encapsuladas têm o potencial para participarem direta e ativamente no processo regenerativo e que o sistema de microesferas aplicado promoveu o aumento da vascularização e mineralização do tecido (MAN, et al. 2012).

Outro estudo sobre a aplicação de alginato com células foi realizado por Moschaverinia e seus colaboradores (2012). Eles desenvolveram um *scaffold* injetável e biodegradável com base em microesferas de alginato oxidadas para encapsular células do ligamento periodontal e células-tronco mesenquimais da gengiva. Os resultados mostraram que o composto é um candidato atóxico e promissor como *scaffold* para essas células e para a engenharia de tecidos.

A utilização de alginato também tem ganhado espaço nos conhecidos sistemas de *drug delivery*. Microesferas desse composto contribuíram para a encapsulação de Aceclofenac para a liberação e absorção da droga na região intestinal com proteção de tecidos distintos no estômago (KHANDAI et al., 2012). Foi

demonstrado que uma quantidade menor da droga foi liberada em meio ácido e que a propriedade mucoadesiva era fortemente dependente do pH do meio e da concentração do polímero nas formulações. Foi proposto nesse estudo um mecanismo misto de liberação da droga, envolvendo parcialmente a desintegração da matriz da esfera e também a difusão da droga nas microsferas. O estudo *in vivo* também revelou que o efeito anti-inflamatório induzido pelo aceclofenac carregado nas microsferas de alginato foi significativamente mais elevado e prolongado do que o induzido pelo aceclofenac puro. Esse sistema também exibiu propriedades promissoras para o controle e prolongamento da absorção sistêmica do aceclofenac com proteção de tecidos distintos no estômago.

Torelli-Souza e seus colaboradores (2012) investigaram sistemas de distribuição controlada de beta-lapachona, um poderoso agente anticancerígeno, em fluidos gástricos. Eles utilizaram esferas compostas de hidrogel de alginato e quitosana para administração oral da medicação. As esferas apresentaram boa estabilidade e baixa porosidade. Esse sistema permitiu uma libertação prolongada de aproximadamente 72 horas (em pH 1,2 e 7,4). As capsulas foram resistentes ao meio ácido e apontadas como uma alternativa para a beta-colo terapia do cancro colo-rectal.

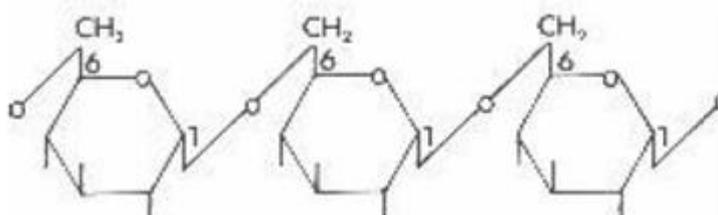
Como pode ser visto, as vantagens da utilização do alginato consistem no fato de ser um composto biodegradável, atóxico e que não promove alterações nas propriedades biológicas dos organismos. Além desses benefícios, estudos preliminares realizados no LATECC (Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares - Departamento de engenharia Química da UFSCar) demonstraram que as células hMSC-TERT não se aderem ao alginato e que este não interage com os microcarregadores Cultispher-S. Diante dessas propriedades, o composto tornou-se atrativo para ser aplicado em cultivos celulares, de modo que foi proposta no presente trabalho sua participação, porém não como encapsulador, mas como consituente de microsferas que pudessem se interpor entre os microcarregadores Cultispher-S e evitar a formação de aglomerados. Isso poderia amenizar os efeitos negativos causados pelos agregados, viabilizando maiores densidades celulares recuperadas.

3.8 Utilização do sulfato de dextrana em cultivos celulares

Polissacarídeos modificados solúveis em água tem encontrado um grande número de aplicações no campo biomédico e farmacêutico. Estudos recentes mostram que esses sistemas podem ser usados como modificadores de viscosidade, matrizes para a imobilização de enzimas e drogas, e como materiais que servem como suportes para cromatografia hidrofóbica. Entre esses polissacarídeos a dextrana tem sido um dos mais estudados (MOSCARDINI; TIERA; OLIVEIRA-TIERA, 2000).

Dextrana é o nome coletivo dado a uma larga classe de polissacarídeos bacterianos extracelulares compostos de unidades monoméricas de α -D-glicopiranoose ligadas majoritariamente por ligações glicosídicas do tipo α -1,6 na cadeia linear, como pode ser visto na Figura 11.

Figura 11 – Cadeia de dextrana linear mostrando as ligações α -1,6.

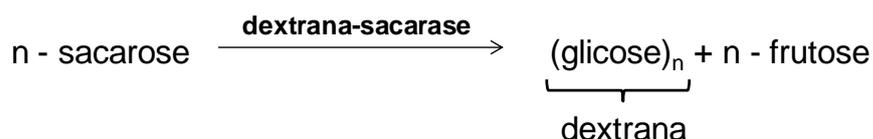


(AQUINO, 2006).

O termo dextrana foi introduzido pela primeira vez em 1874, quando Sheiber descobriu que o espessamento apresentado pelos caldos de cana-de-açúcar e de beterraba era ocasionado devido à presença de um carboidrato de fórmula empírica $C_6H_{10}O_5$, com rotação óptica positiva, ao qual determinou o nome dextrana (ALSOP, 1983). Já em 1861, Pauster demonstrara que a formação de películas em caldos ricos em sacarose era desencadeada por uma ação microbiana sem, no entanto, ter identificado o agente causador (ALSOP, 1983). O grau de ramificação e a massa molecular são dependentes do microorganismo usado para a obtenção da enzima responsável pela produção do biopolímero. A enzima é sintetizada por uma variedade de bactérias pertencentes à família *Lactobacillaceae*,

e em particular pelos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*. Ela também pode ser sintetizada pelo gênero *Acetobacter*. As principais espécies produtoras são *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc dextranicum*. Em 1948, a dextrana produzida pela linhagem *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F foi o primeiro biopolímero a ser produzido em escala industrial e continua sendo o principal atualmente na produção industrial (MONCHOIS; WILLWEMOT; MONSAN, 1999)

Durante a síntese enzimática de dextrana, a partir de sacarose, ocorre a liberação de frutose. A enzima catalisadora da reação é a dextrana-sacarase, como pode ser visto na reação abaixo. A dextrana clínica é obtida pela hidrólise ácida da dextrana bruta produzida na síntese, e posterior separação por fracionamento com etanol (HERNALSTEENSS, 2002).



A dextrana possui aplicações na indústria de alimentos, cosméticos e principalmente na indústria farmacêutica. Sua presença ocasiona aumento da viscosidade em xaropes e dificuldade na cristalização da sacarose. Algumas das vantagens de sua utilização é que ele é biodegradável em humanos, bem tolerado, não é tóxico e não provoca reações no organismo (MOSCARDINI; TIERA; OLIVEIRA-TIERA, 2000). A fração clínica da dextrana, com 75.000 Daltons, tem propriedades de expansor volumétrico de sangue e a de 40.000 Daltons melhora a fluidez do sangue evitando a coagulação (HERNALSTEENSS, 2002). Outra utilização dessa substância é o emprego na construção de géis transportadores de drogas (MOSCARDINI; TIERA; OLIVEIRA-TIERA, 2000).

O sulfato de dextrana, também conhecido como sulfato sódico de dextrana, é um polissacarídeo aniônico que contém de 17 à 20 por cento de enxofre. Ele tem sido utilizado como agente anticoagulante e como um antiaglomerante celular (BARABINO et al., 1999; DEE et al., 1997)

Em 1997, Dee e seus colaboradores investigaram a adição de poliânions sulfatados na prevenção da agregação de células de inseto da linhagem BTITN5B1-4 com o objetivo de melhorar a produção de proteínas recombinantes por

essas células. A eficácia na obtenção de células em suspensão separadas umas das outras foi associada diretamente ao aumento da sulfatação do poliânion. Poliânions não sulfatados, polímeros neutros, policátions, dissacarídeos e monossacarídeos foram ineficazes na desagregação celular. Foi concluído que a adição de sulfato de dextrana em cultivos de BTITN5B1-4 é de grande importância, uma vez que implica no aumento de escala de produção de proteínas recombinantes (DEE et al., 1997).

Barabino e colaboradores (1999) estudou a influência de polissacarídeos aniônicos na adesão de hemácias falciformes ao endotélio vascular. Sabe-se que há um aumento da exposição de glicolípídeos sulfatados na membrana celular de eritócitos falciformes quando comparado aos normais. Esse fato está diretamente associado à adesão excessiva dessas hemácias ao endotélio vascular devido à ligação das proteínas endoteliais trombospondina e laminina a esses glicolípídeos sulfatados. Essa conexão pode ser inibida por polissacarídeos aniônicos de forma a resultar em um comportamento hemodinâmico melhorado. Nesse estudo verificou-se que a aderência dos glóbulos vermelhos foi inibida de forma mais eficaz quando utilizou-se sulfato de dextrana de alto peso molecular (78% de inibição). O sulfato de dextrana de baixo peso molecular juntamente com o sulfato de condroitina A também tiveram efeitos inibitórios importantes na adesão (52% e 40% de inibição), enquanto a heparina foi ligeiramente eficaz (26% de inibição). Outros glicosaminoglicanos (sulfatos de condroitina B e C, sulfato de heparano, e fucoidan) foram testados, porém mostraram-se ineficazes (BARABINO et al., 1999).

Segundo Doyle e Griffiths (1998), evidências experimentais sugeriram que o aumento da viscosidade do meio de cultura reduz danos às células em microcarregadores porque reduz a intensidade e frequência de interações entre eles. Entre possíveis aditivos que podem aumentar a viscosidade do meio sem efeitos prejudiciais aparentes nas células, a dextrana (acima de 0,3% m/v) foi apontada como uma excelente opção para nesses cultivos. Para esse fim foi indicada a utilização de dextrana de alta massa molecular (entre 200000 e 300000) de 0,15% ou 0,2% (m/v) ou, se necessário, dextranas de baixa massa molecular de 0,3% (m/v) (DOYLE; GRIFFITHS, 1998).

Como pode ser visto, o sulfato de dextrana foi mencionado na literatura tanto como um agente que inibe o contato célula-célula (BARABINO et al., 1999;

DEE et al., 1997), quanto que evita o encontro entre microcarregadores em cultivo (DOYLE; GRIFFITHS, 1998). Assim, pode ser apontado como uma opção promissora em testes para evitar a formação de aglomerados de microcarregadores no cultivo de hMSC-TERT em spinner.

3.9 Observações finais sobre a Revisão Bibliográfica

A análise da literatura especializada sobre expansão de células- tronco nos permitiu perceber que:

- 1) Apesar de ser possível cultivar CMMs utilizando a tecnologia de microcarregadores e frasco spinner, ainda não se dispõe de uma metodologia de expansão/recuperação eficiente e de alta produtividade.
- 2) Um dos obstáculos mais preponderantes para conseguir esse objetivo é a formação de aglomerados de microcarregadores que ocorre quando estes entram em contato com as células liberadoras de matriz extracelular aderidas às superfícies de outros microcarregadores.

Portanto, o desenvolvimento de uma metodologia inovadora de expansão/recuperação de CMMs aderidas a microcarregadores em frasco spinner se torna extremamente necessária e oportuna.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Linhagem de célula mesenquimal estromal multipotente

A linhagem celular utilizada foi a *human Mesenchymal Stem Cells (hMSC)* proveniente da medula óssea humana, imortalizada por expressão da transcriptase reversa da telomerase (*Telomerase Reverse Transcriptase - TERT*) - hMSC-TERT. A TERT é 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). Trata-se de uma linhagem considerada modelo, uma vez que uma pequena ou nenhuma alteração em seus atributos ocorre em um número crescente de passagens (WEBER et al., 2007). Essa propriedade permite a comparação entre os resultados experimentais de células expandidas de passagens diferentes.

Essa linhagem foi concedida 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). As células foram conservadas em nitrogênio líquido a -196°C e posteriormente ativadas e multiplicadas a 37°C .

4.1.2 Meios de cultura e de congelamento

O meio de cultura utilizado para expansão da hMSC-TERT foi o α -MEM (*Minimum Essential Medium*) (Gibco) com adição de glicose e glutamina. A Tabela 8 abaixo mostra a composição desse meio de cultura:

Tabela 8 - Composição do meio de cultura α -MEM utilizado no cultivo das HMSC-TERT (Acervo pessoal).

Componentes	Quantidade	Fabricante
α -MEM em pó	10,2 g/L	GIBCO, EUA
Soro fetal bovino caracterizado	0,150 L	HyCLone, EUA
Hepes (1M)	4,2894 g/L	GIBCO, EUA
Bicarbonato de sódio	0,8401 g/L	CULTILAB, Brasil
Penicilina e Streptomina	0.01L	GIBCO, EUA
Água Mili-Q*	1L	MILLIPORE, Alemanha
Glicose	1,000 g/L	SIGMA-ALDRICH, EUA
Glutamina	0,3654 g/L	SIGMA-ALDRICH, EUA

*Filtrada em membranas de resina de 0,22 μ m (Millipore).

As concentrações dos tampões hepes e bicarbonato de sódio foram determinadas após experimentos preliminares para verificação do comportamento do pH ao longo do cultivo celular realizado com microcarregadores tipo Cultispher-S no biorreator Taylor-Couette.

Para as análises de densidade celular viável realizadas por meio do método do MTT, foi utilizado o meio de cultura líquido α -MEM (CULTILAB, Brasil), sem o indicador vermelho de fenol.

O meio de congelamento das células foi preparado em laboratório contendo 10% de DMSO (*Methyl sulfoxide* 99,85% extra puro, Across Organics, New Jersey, EUA) e 90% de SFB (Soro fetal bovino caracterizado, HyClone, EUA). Essa mistura foi filtrada em membranas de resina de 0,22 μ m (Millipore).

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

A solução de PBS foi utilizada para limpeza celular a cada passagem realizada nos frascos T. Ela foi preparada em laboratório de acordo com a composição descrita na Tabela 9.

Tabela 9 - Composição da 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 Mili-Q*	1L

*Filtrada em membranas de resina de 0,22 µm (Millipore)

O pH dessa solução foi ajustado entre 7,2 e 7,4 por meio das soluções de HCl 1M e de NaOH 1M.

4.1.4 Corante

A solução aquosa de azul de tripan 0,4% (v/v) (GIBCO, EUA) foi utilizada na determinação da densidade e a viabilidade celular no hemacitômetro. Trata-se de um corante diazo que é incorporado por células não-viáveis, possibilitando a distinção entre células vivas e mortas. Esse corante também foi utilizado nos microcarregadores Cultipher-S a fim de aumentar o contraste em relação ao fundo da lâmina e possibilitar uma leitura melhor para a análise da dimensão dos aglomerados.

4.1.5 Enzimas de dissociação celular

A Tryple™ Express (GIBCO) foi utilizada para desaderir as células das superfícies dos frascos T, enquanto a dissociação das células dos microcarregadores foi realizada pela enzima Tryple Select 10X (GIBCO, EUA). Ambas são enzimas recombinantes obtidas por meio de fermentação microbiana.

4.1.6 Microcarregador

O Cultispher-S (Percell Biolytica, Suécia) foi o microcarregador utilizado nos cultivos. Trata-se de um tipo macroporoso, composto por uma matriz de gelatina que pode ser dissolvida com enzimas proteolíticas, possibilitando assim, a recuperação das células viáveis. A Tabela 10 contém as características físicas desse microcarregador.

Tabela 10 - Características do microcarregador Cultispher S (Percell Biolytica, Suécia).

Características	Valores
Densidade (g/mL)	1,04
Diâmetro (µm)	130-380
Número aproximado de microcarregadores/g de massa seca	$8,0 \times 10^5$
Média do diâmetro de poro (µm)	20

4.1.7 Solução antiaderente - Sigmacote®

O Sigmacote® (SIGMA-ALDRICH, EUA) foi utilizado para impedir adesão das células e/ou microcarregadores às paredes do biorreator. É uma solução de heptano capaz de formar um filme neutro e hidrofóbico com o vidro. 1 ml dessa

solução foi espalhado por toda a superfície interna do spinner, esperou-se até a evaporação completa do produto para posterior esterilização do spinner.

4.1.8 Reagente MTT

O kit baseado no MTT ou brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (SIGMA-ALDRICH, EUA) foi utilizado para determinar indiretamente a densidade de células viáveis nos cultivos no biorreator. Em células metabolicamente ativas, a enzima mitocondrial desidrogenase reduz o MTT (amarelo) ao formazan (roxo). A solubilização dos cristais de formazan gera uma solução que, por meio de espectrofotometria ($\lambda = 570 \text{ nm}$) e uma curva padrão da absorbância obtida pela concentração celular, permite determinar a concentração de células vivas.

4.1.9 Filtros

A Tabela 11 contém os tipos de membranas de filtração utilizadas na preparação do meio de cultura e em cada análise realizada nos amostras do cultivo.

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

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
Massa seca	Filtro de acetato de celulose com 0,20 µm de poro	SARTORIUS AG, Alemanha

4.1.10 Frascos de cultura

Para a expansão das células em cultura estática, foram utilizados frascos (ou garrafas) de cultura celular (frascos T) de poliestireno com área superficial de 75 cm² (TPP, EUA). Frascos spinner de 100 mL (BELLCO, EUA) contendo um impelidor central de vidro foram empregados para o cultivo com os microcarregadores Cultispher-S.

4.1.11 Microesferas de alginato

Microesferas de alginato foram utilizadas nos experimentos 2 e 3 para a verificação de sua influência em diferentes concentrações na inibição da formação

dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S e na expansão de hMSC-TERT. Elas foram preparadas a partir de uma solução de alginato de sódio 1% (m/v) (Sigma- Aldrich) solubilizado em água destilada e desionizada. Para isso, foi utilizado o método de spray (borrifamento). A solução de alginato foi pulverizada em CaCl_2 (Sigma- Aldrich) à 2% (m/v) sob agitação constante, à temperatura ambiente.

As partículas formadas, com diâmetro entre 125 e 350 μm , aproximadamente, foram selecionadas por meio de peneiras de aço inoxidável, e posteriormente, lavadas em água destilada, esterilizadas em autoclave e armazenadas em geladeira até sua utilização nos experimentos.

4.1.12 Sulfato de dextrana

O sulfato de dextrana (*dextran sulfate sodium salt* – Sigma-Aldrich) de massa molecular 6,500-10,000 produzido por meio de bactérias do gênero *Leuconostoc ssp* foi utilizado nos experimentos 5 e 6 também a fim de verificar sua influência na inibição da formação de aglomerados de microcarregadores Cultispher-S e na expansão de hMSC-TERT.

4.2 Métodos para cultivo celular

4.2.1 Preservação celular

Para a preservação, as células foram depositadas em tubos criogênicos e mantidas em nitrogênio líquido a -196°C . No processo de congelamento, as células foram retiradas das culturas na fase de crescimento

exponencial e centrifugadas a 1600 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio de congelamento, e depositadas a uma densidade de 3.10^6 cel.mL⁻¹ em cada criotubo. Em seguida estes foram colocados em um recipiente contendo álcool isopropílico, específico para condicioná-los, e levados a um ultrafreezer durante 24 horas (h), de forma a proporcionar uma taxa de congelamento constante de -1°C por minuto. Após esse período, os vials contendo as células foram armazenados em nitrogênio líquido.

4.2.2 Descongelamento e ativação celular

No processo de descongelamento das células, cada tubo criogênico foi retirado do nitrogênio líquido e mantido à temperatura ambiente até o descongelamento. Logo após, a suspensão de células foi transferida para um tubo falcon de 15 mL contendo 9 mL de meio de cultura e centrifugada a 1600 rpm (centrífuga Excelsa Baby I, modelo 206, da FANEM - Brasil) por 5 minutos. O meio de cultura foi descartado para remoção do DMSO, o pellet de células ressuspensado em 1 mL de meio de cultura e transferido para frasco T de 75 cm² contendo 14 mL de meio de cultura. Todas as manipulações realizadas com as células ocorreram em uma câmara asséptica Sterilgard III de fluxo laminar, classe II, da Baker Company (EUA), modelo SG403/SG603, provida de lâmpada germicida de UV.

4.2.3 Cultivo estático em frascos T

Após o descongelamento e ativação, as células foram mantidas em frascos T de 75 cm² de área superficial em incubadora a 37°C e 5% de CO₂ até que a confluência de aproximadamente 80% foi atingida. Iniciou-se então o procedimento de passagem das células de uma garrafa para outras. O sobrenadante foi retirado e

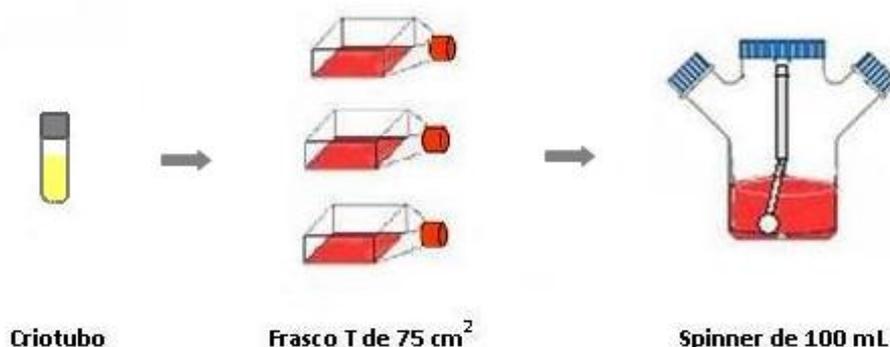
as células foram lavadas com 10 mL de solução de PBS. Em seguida, foram adicionados 4 mL de solução de Tryple™ e mantidos por 5 minutos em incubadora a 37°C para que as células fossem desaderidas da superfície do frasco T. A ação da enzima foi interrompida após a adição de 12 mL de meio de cultura. O conteúdo do frasco T (células, meio de cultura e Tryple™) foi transferido para um falcon e centrifugado a 1600 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio de cultura. Retirou-se uma alíquota de 60 µL para a contagem utilizando-se o método de exclusão do corante azul de tripan (descrito no item 4.3.1). Em seguida inoculou-se 1.10^6 células em cada nova garrafa de 75 cm² contendo 15 mL de meio de cultura.

Esse procedimento foi repetido até a obtenção da densidade celular necessária para o inóculo no frasco spinner. Durante a expansão, a morfologia celular foi observada com a utilização de um microscópio invertido modelo CK30 da marca Olympus (Japão).

4.2.4 Procedimento experimental para cultivo em frasco spinner

A expansão das hMSC-TERT em frasco spinner foi realizada posteriormente aos processos de descongelamento e cultivo estático em frascos T. A Figura 12 mostra a sequência dessas três etapas ao longo de todo o cultivo.

Figura 12 - Representação dos procedimentos realizados para a expansão de hMSC-TERT em frasco spinner com impelidor de vidro.



(Adaptada de SANCHES, 2010)

Aproximadamente entre 48 h e 24 h antes do início do experimento, o frasco Spinner foi preparado aplicando-se 1 mL de Sigmacote® em suas paredes internas a fim de impedir a adesão das células no frasco (como descrito no item 4.1.7) e em seguida foi esterilizado em autoclave. Os microcarregadores também foram preparados com antecedência. Foram pesados 0,150 g do microcarregador Cultispher (3,0 g/L) em um falcon, adicionou-se 7,5 mL de PBS (50mL/g), e esse conteúdo foi levado para a autoclavagem. Após a esterilização, na câmara de fluxo laminar, o PBS foi descartado, adicionou-se 10mL de meio de cultura α -MEM e os microcarregadores foram reservados na geladeira até o momento do inóculo no spinner.

Após a obtenção do número de células suficiente para o início do experimento ($6,25 \times 10^6$ células), as células foram transferidas para o frasco spinner. Primeiramente adicionou-se o meio de cultura, em seguida os microcarregadores e depois o inóculo filtrado (membrana de 100 μ m de poro, BD Biociences, EUA) contendo as células. O volume total de trabalho foi de 50 mL para todos os experimentos. O frasco spinner foi mantido ao longo do cultivo em incubadora a 37°C e 5% de CO₂, como pode ser visto na Figura 13.

Figura 13 – Imagem do spinner com impelidor de vidro dentro da incubadora durante o cultivo de hMSC-TERTs.



(Acervo pessoal)

O cultivo em frasco spinner foi dividido em duas fases: a fase para a adesão e a fase para a expansão celular ou de crescimento. Na fase de adesão, durante as 8 primeiras h, aplicou-se uma agitação de 50 rpm por 30 segundos a cada 15 minutos. Após esse período aumentou-se 10 rpm de agitação a cada 2 h a partir de 20 rpm até atingir 12 h de cultivo. Na fase de expansão, a agitação foi mantida constante a 40 rpm e foi feita a troca de 50% do volume de trabalho (25 mL), a partir de 24 h, com o objetivo de evitar o esgotamento de nutrientes, diluir os metabólitos considerados tóxicos (amônia e lactato) e evitar valores de pH nocivos às células.

A fim de acompanhar o desenvolvimento do cultivo, após 24 h foram retiradas amostras de 8 em 8 h para verificar o pH no medidor da Denver (EUA), modelo UB10. Foram retiradas diariamente amostras de 2 mL. O sobrenadante dessas amostras foi separado dos microcarregadores por meio de um filtro (membrana de 100 µm de poro, BD Biociences, EUA), que foi acoplado na ponta da pipeta. Os microcarregadores foram ressuspensos no mesmo volume (2 mL) de meio de cultura α -MEM (CULTILAB, Brasil) sem o indicador vermelho de fenol. Do sobrenadante separado, reservou-se 1 mL para a análise de amônia, 250 µL para análise de carboidratos, 250 µL para a análise de aminoácidos e 40 µL para a quantificação das células livres em suspensão (vide item 4.3.1). Esses volumes foram congelados para a posterior realização dessas análises descritas nos itens 4.3.4, 4.3.5 e 4.3.6, exceto o volume para quantificação celular da suspensão, que foi realizado imediatamente após a separação do sobrenadante. Foram reservados ainda 500 µL da amostra (microcarregadores com células ressuspensos em meio de cultura sem vermelho de fenol) para a aplicação da metodologia do MTT (vide item 4.3.2) e 500 µL para a quantificação das células recuperadas (desaderidas) dos microcarregadores por meio da enzima tryple 10X (vide item 4.3.3). O restante da amostra foi utilizado para obtenção das imagens de microscopia ótica (vide itens 4.3.8 e 4.3.9).

No final de cada cultivo, as células foram desaderidas por meio de Tryple 10X e congeladas para que posteriormente pudessem ser utilizadas na análise de citometria de fluxo (vide item 4.3.7).

4.3 Métodos analíticos

4.3.1 Determinação da densidade e viabilidade celular em câmara de Neubauer

As análises de densidade e viabilidade das células em suspensão foram realizadas por contagem em câmara de Neubauer utilizando-se o método de exclusão do corante azul de tripan (DOYLE; GRIFFITHS, 1998). Foram separados 20 μL de amostra em um eppendorf, onde se acrescentou 20 μL de uma solução etélica 0,4% (m/v) azul de Tripan preparada previamente. Após agitação, a mistura foi depositada no hemacitômetro para a contagem com auxílio de um microscópio modelo BX51 da marca Olympus (Japão). Esse processo foi repetido com mais 20 μL de amostra. A fim de obter uma estatística que representasse melhor a realidade, foram contados 16 quadrantes (8 quadrantes/câmara) para o cálculo da média aritmética das células vivas (não coradas) e mortas (coradas em azul).

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

$$(x + y) \cdot \text{FD} \cdot V_c = C \text{ (células} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)}$$

(4.1)

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

$$x \cdot \text{FD} \cdot V_c = C_v \text{ (células} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)}$$

(4.2)

A viabilidade celular foi calculada pela razão entre o número de células viáveis e o número de células total no meio (células viáveis e inviáveis), multiplicados por 100, como mostrado na equação 4.3.

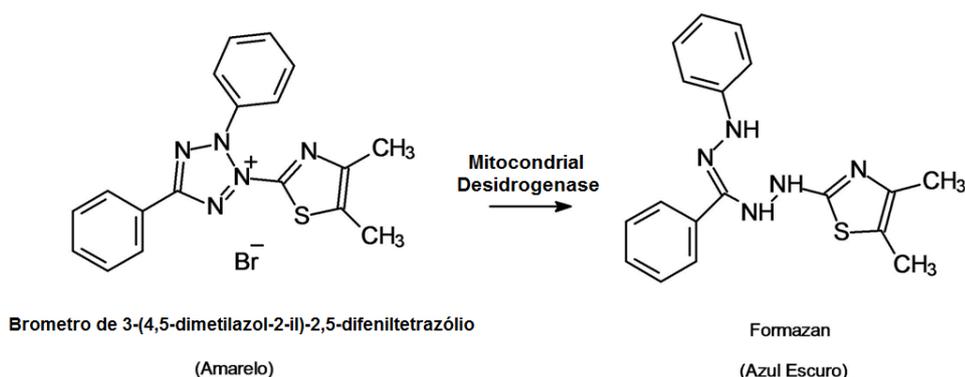
$$(x/x+y) \cdot 100 = \% \text{ de células viáveis} \tag{4.3}$$

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

4.3.2 Determinação da densidade celular pelo método baseado no MTT

Antes do início de cada experimento, foi retirada uma amostra de células ressuspensas em meio de cultura e aplicado o método baseado no MTT para a preparação de uma curva de calibração da densidade celular em função da absorbância. As curvas de calibração utilizadas nos experimentos realizados são mostradas no Apêndice A. Outras amostras contendo células aderidas aos microcarregadores suspensos em meio de cultura foram retiradas diariamente ao longo dos experimentos para a aplicação da metodologia descrita a seguir.

O método consistiu na adição de 50 μ L da solução MTT em 500 μ L de amostra (já ressuspensa em meio α -MEM sem vermelho de fenol). A mistura foi homogeneizada e colocada na incubadora de CO_2 a 37 °C por 4 h. Durante esse período, a cada hora a amostra foi agitada manualmente para garantir uma boa homogeneização da amostra em contato com a solução MTT. Em seguida, 500 μ L de uma solução ácida de isopropanol foram adicionados para a solubilização do cristal de formazan azul escuro. A amostra foi centrifugada para a sedimentação dos microcarregadores e dos restos celulares, e o sobrenadante foi analisado, em triplicata, no espectrofotômetro de placas de 96 poços (Multiskan FC, Thermo Scientific, EUA) com filtro de 570 nm. Abaixo está representada a reação envolvida no método descrito.



Com a absorbância obtida e a equação da reta conseguida por meio da curva padrão (absorbância x concentração celular), determinou-se a densidade celular viável. Como as medidas de absorbância dadas pelo espectrofotômetro foram realizadas em triplicata, a média aritmética e o desvio padrão foram calculados para cada uma das amostras diárias.

4.3.3 Recuperação das células aderidas aos microcarregadores

A enzima Tryple Select 10X (GIBCO, EUA) foi utilizada para a recuperação das células do microcarregador Cultispher S ao longo dos cultivos. 500 μ L de amostra do cultivo foram centrifugados a 1150 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os microcarregadores foram ressuspendidos em 500 μ L da enzima. A mistura foi mantida a 37°C em banho termoestático até a dissolução da matriz de gelatina do Cultispher S. Ocasionalmente a agitação manual foi aplicada. Após esse período, as células em suspensão foram quantificadas por meio do método de exclusão pelo corante azul de tripan em hemacitômetro (vide em 4.3.1). A média e o desvio padrão em relação a quatro medidas foram calculados para cada uma das amostras. A percentagem de células recuperadas foi obtida por meio de regra-de-três simples, tendo como base (100%) o número de células viáveis obtido pelo método do MTT em cada amostragem.

4.3.4 Análise de glicose e ácido láctico

Durante os experimentos no biorreator, amostras do sobrenadante foram separadas e congeladas a -20°C para posteriores análises de glicose e de ácido láctico. Utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com coluna de resina Aminex HPX-87H (Bio-rad), fase móvel H_2SO_4 5mM, temperatura de 65°C e fluxo de $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em cromatógrafo Waters com detecção através do índice de refração (W410, Waters) para carboidratos e UV 210 nm para ácido láctico. As análises foram realizadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da UFSCar.

4.3.5 Análise de aminoácidos

Também foram separadas e congeladas amostras de sobrenadante ao longo dos cultivos para posteriores análises de aminoácidos.

As análises foram realizadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), baseada no método proposto por Henrikson e Meredith (1984). Uma coluna pico-tag (Waters, Ireland) foi utilizada como fase estacionária e como eluente, um gradiente constituído por duas fases móveis A e B. A fase A é composta de acetato de sódio tri-hidratado, trietilamina, água milli-Q e acetonitrila. A fase B apenas água e acetonitrila. As condições de operação do cromatógrafo da Waters foram: temperatura de 36°C , tempo de corrida de 45 minutos e gradiente com vazão pré-determinada. Os picos foram detectados no comprimento de onda 254 nm.

As amostras do sobrenadante do cultivo foram preparadas segundo as etapas de filtração, secagem, reidratação, derivatização até sua diluição em tampão antes da injeção no equipamento. As análises foram realizadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da UFSCar.

4.3.6 Análise de amônio

Para posterior análise, novamente foram separadas e congeladas amostras do sobrenadante durante os cultivos. Após descongelar, elas foram analisadas por meio de eletrodo íon seletivo. O medidor da Thermo Scientific (EUA), modelo ORION 720A+, foi utilizado para obter as medidas.

4.3.7 Análise de citometria de fluxo

As células recuperadas do microcarregador Cultispher S, após o cultivo em biorreator Taylor-Couette, passaram pelo processo de congelamento. Para a análise de citometria de fluxo, foram descongeladas e cultivadas em frasco T até atingir 80% de confluência. Em seguida, foram desaderidas do frasco T com Tryple™ Express (GIBCO) e divididas em alíquotas de 100 µL de PBS com 2×10^5 células. Uma imunomarcção com os seguintes anticorpos monoclonais foi realizada por 15 minutos à temperatura ambiente, com a ausência de luz: Anti-CD73-PE, Anti-CD105-PerCP, Anti-CD90-PE. Anti-HLA-ABC-PE, Anti-CD31-PE ou Anti-CD34-PE, Anti-CD45-APC, Anti-CD14-PE e Anti-HLA-DR (PerCP). Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS para análise no citômetro de fluxo (FASCalibur BD, EUA) utilizando o software *CELLQuest™*. As análises foram realizadas no Laboratório de Citometria de Fluxo do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto.

4.3.8 Análise dos diâmetros médios dos aglomerados de microcarregadores

Para essa análise, adicionou-se 20 µL de solução aquosa de azul de tripan 0,4% (v/v) (GIBCO, EUA) às amostras retiradas durante o cultivo para que os microcarregadores fossem corados. Utilizou-se o microscópio invertido modelo CK30 (Olympus, Japão) e a câmera modelo DMC – LS 80 (Panasonic, Japão).

As imagens foram transferidas para o software Image Pro Plus, empregado para selecionar os aglomerados e calcular o diâmetro médio de cada um. Foram analisados 40 aglomerados por amostra, por isso foi calculada a média aritmética e o desvio padrão dos diâmetros médios obtidos.

4.3.9 Documentação de imagens

A documentação das imagens dos microcarregadores com células foi realizada por meio de microscopia ótica utilizando-se a câmera modelo DMC – LS 80 (Panasonic, Japão).

As imagens sem fluorescência foram obtidas após o tratamento da amostra com aplicação da solução MTT, depois de 4 h incubada a 37°C. O microscópio utilizado foi o invertido, modelo CK30 (Olympus, Japão).

A obtenção das imagens com fluorescência foi possível uma vez que as hMSC-TERT possuem a proteína GFP (abreviatura do inglês *green fluorescent protein*), que emite fluorescência na zona verde do espectro visível. O microscópio utilizado foi o BX51 (Olympus, Japão).

4.4 Organização geral dos experimentos

Nesse trabalho, os experimentos foram organizados em duas etapas. A primeira etapa contém um experimento controle (experimento 1) e outros dois em condições similares ao controle, porém com a adição de 50% e 100% de microesferas de alginato em relação à concentração de microcarregadores, após 8 horas de cultivo (experimentos 2 e 3, respectivamente). A segunda inclui outro experimento controle (experimento 4) e mais dois experimentos também em condições similares ao controle, não obstante com adição de 1% e 0,5% de sulfato de dextrana ao meio após 24 horas de cultivo (experimentos 5 e 6, respectivamente). A opção de realizar dois controles (experimentos 1 e 4) nas mesmas condições foi devido ao espaço de tempo entre a primeira e a segunda etapa. Apesar da hMSC-TERT ser uma linhagem e por isso manter por muitas passagens suas características, as células na segunda fase estavam congeladas por um tempo maior (4 meses aproximadamente) em relação às da primeira. E apenas para garantir que o estado fisiológico das células não estivesse muito alterado (do controle para os dois outros experimentos nas duas etapas) e assim permitisse uma comparação mais fidedigna, optou-se por repetir o controle.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados a seguir foram obtidos de seis cultivos de hMSC-TERT em frasco spinner. Todos eles foram realizados com inóculo inicial de $1,25 \times 10^5$ células/mL; 3 g/L de microcarregador Cultispher-S e com volume de trabalho de 50 mL de meio α -MEM suplementado com 15% (v/v) de soro fetal bovino, 1 g/L de glicose e 0,36 g/L de glutamina. A determinação da concentração do inóculo, bem como a suplementação de glicose e glutamina tiveram como base os estudos realizados por Sanches (2010) e Mizukami (2011).

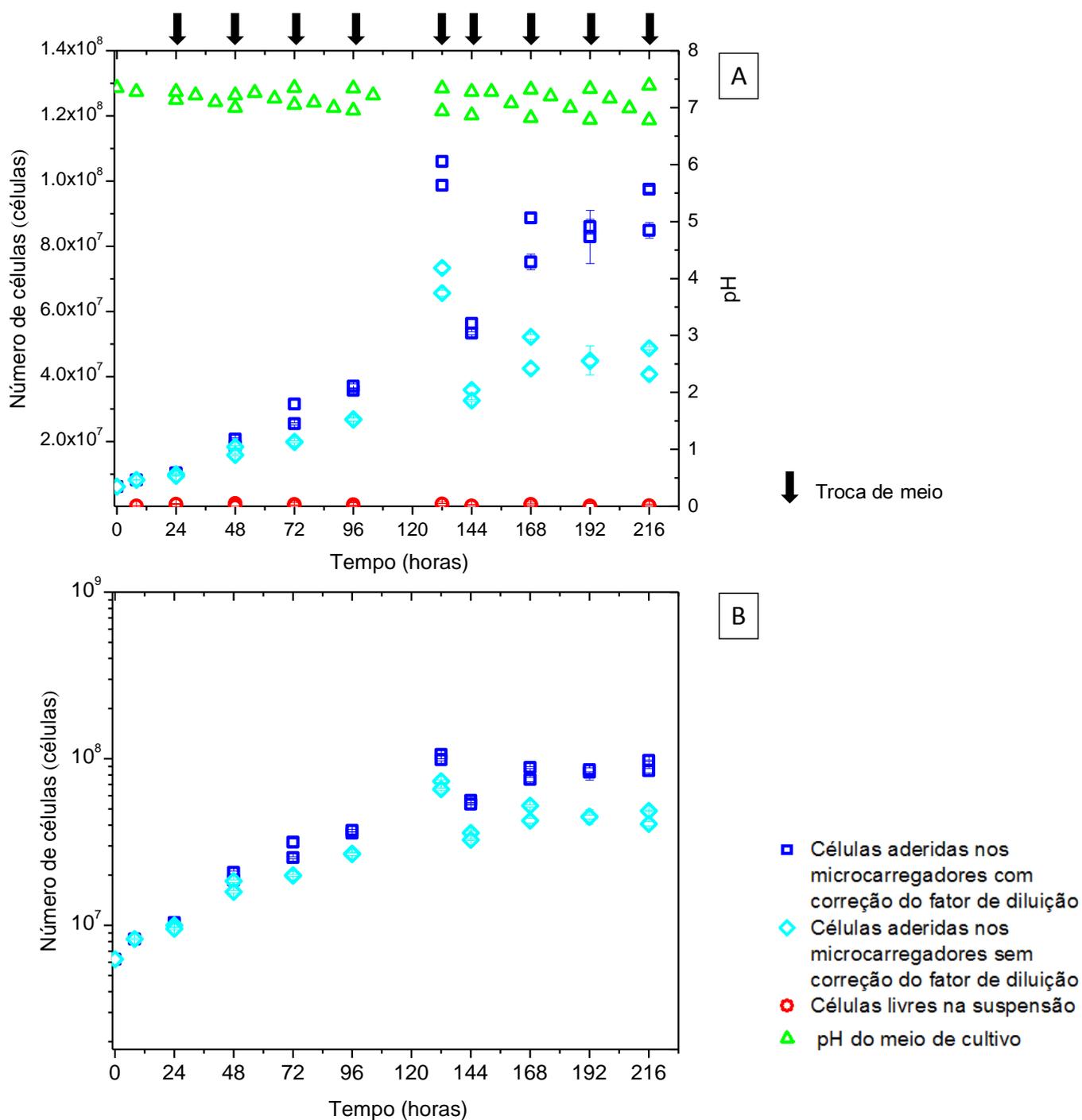
Todos os experimentos foram mantidos a 37°C e tanto a fase de adesão celular (com agitação por 8 horas, de 15 em 15 minutos por 30 segundos a 50 rpm) quanto a de crescimento (com agitação constante a 40 rpm) foram realizadas mantendo-se as mesmas condições. O objetivo da agitação intermitente na fase de adesão foi aumentar o contato entre as células e os microcarregadores visando facilitar o processo de adesão. Geralmente, a preocupação com a adesão está presente nos trabalhos científicos em que foram utilizados microcarregadores, pois o crescimento 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; ROSSI; PUTNINS, 2007; YU et al, 2009).

A troca de meio de cultura diária (após as 24 horas) realizada desde o primeiro experimento foi determinada com base nos estudos de Schop e colaboradores (2008). Os autores demonstraram que a adição de meio de cultura fresco adia a fase de declínio do crescimento celular devido à disponibilidade de nutrientes essenciais como glicose e glutamina, ao mesmo tempo em que dilui a concentração dos subprodutos. Além disso, Sanches (2010) e Mizukami (2011), que realizaram experimentos com a linhagem hMSC-TERT em spinner com microcarregadores, também mostraram a necessidade de trocas de meio ao longo do cultivo.

5.1 Experimento 1

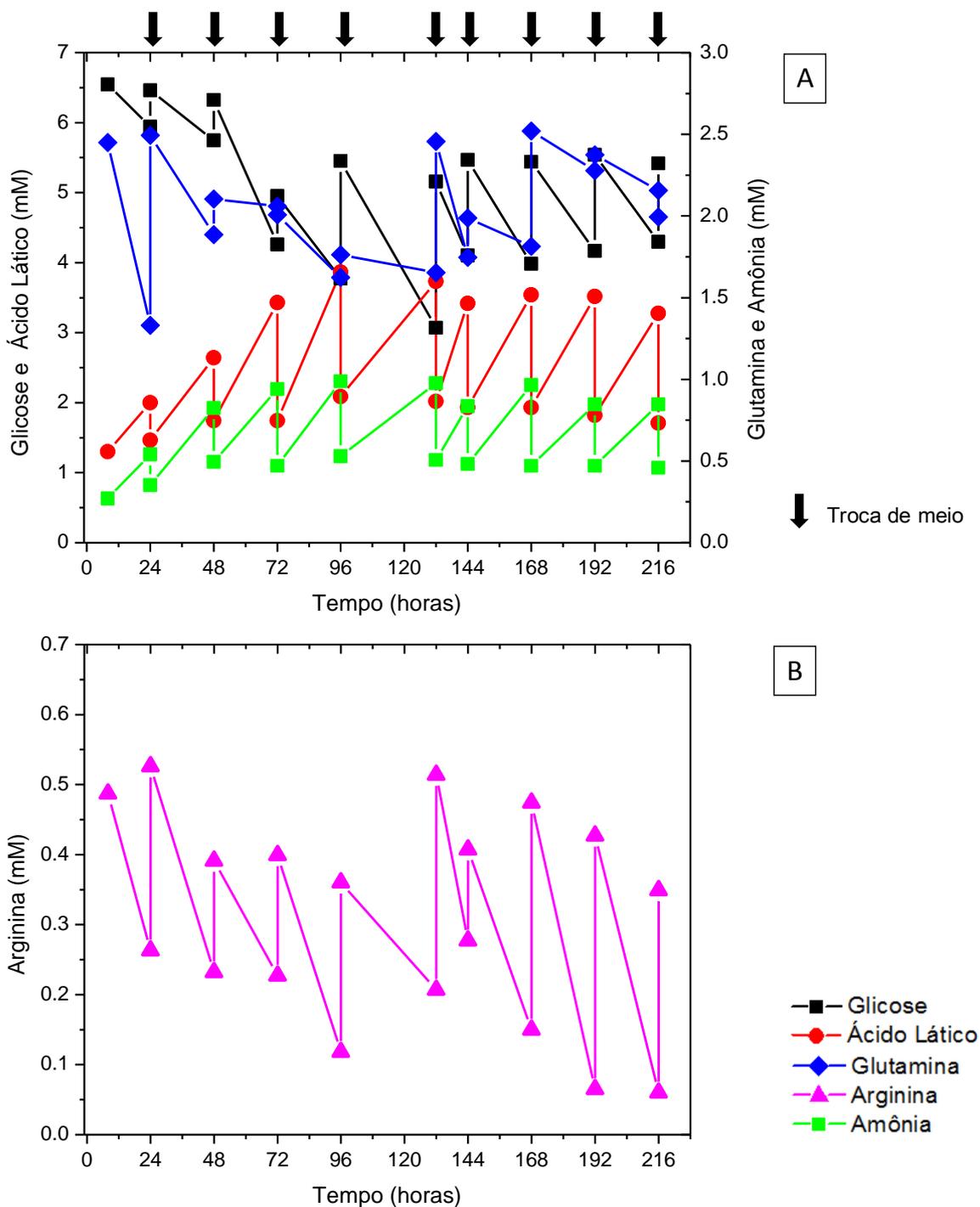
O experimento 1 (E1) foi realizado como controle a fim de explorar o comportamento da célula cultivada com Cultispher-S em spinner nas condições apresentadas acima. Os resultados obtidos estão mostrados nas Figuras 14, 15, 16, 17, 18 e 19.

Figura 14 - Resultados obtidos no experimento 1 (primeiro controle) com a linhagem hMSC-TERT cultivada em 1 spinner com 3 g/L de microcarregadores Cultispher-S. Em (A) e (B) estão representados os valores do número de células na suspensão e nos microcarregadores Cultispher-S, bem como os valores de pH do meio de cultivo. Em (A) os valores da ordenada estão em escala linear e em (B) estão em escala log 10.



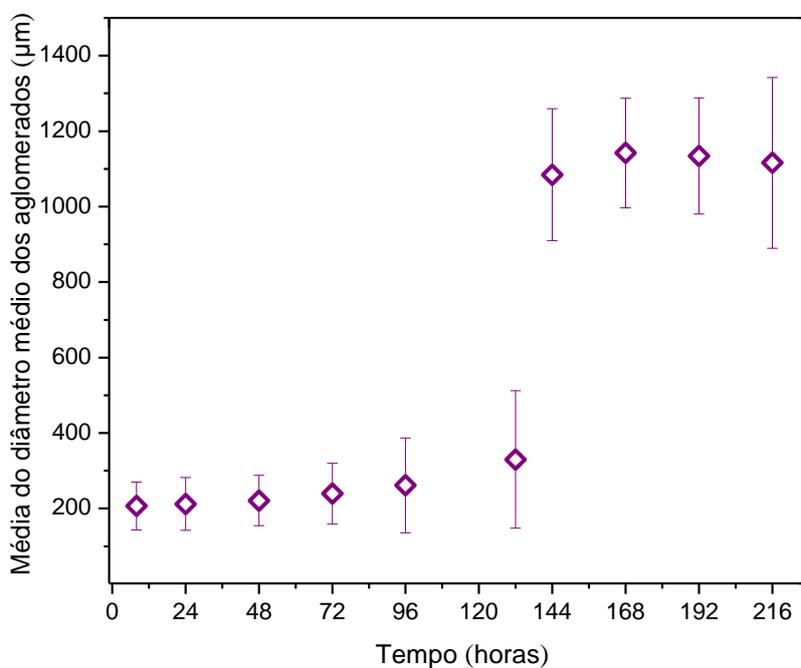
(Acervo pessoal)

Figura 15 – Resultados das concentrações de nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e metabólitos (ácido láctico e amônia) obtidos no experimento1.



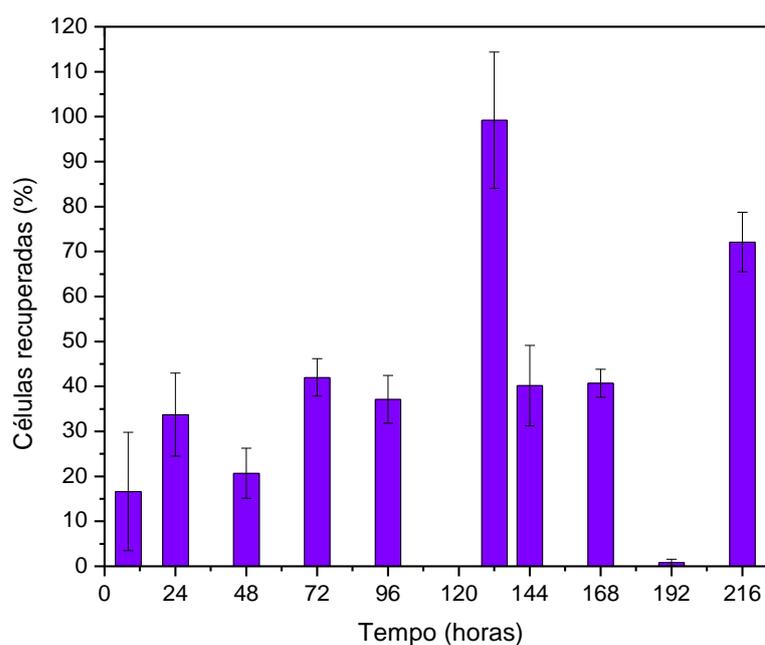
(Acervo pessoal)

Figura 16 – Resultado das médias aritmética dos diâmetros médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S obtidos durante o experimento 1.



(Acervo pessoal)

Figura 17 – Resultados das células recuperadas durante o cultivo referentes ao experimento 1. Os valores representam a porcentagem de células viáveis que foram desaderidas dos microcarregadores Cultispher-S por meio da enzima Tryple 10X.



(Acervo pessoal)

Os resultados obtidos pelo método do MTT mostraram que houve crescimento celular até às 132 h do cultivo. Após esse período, o número de células quantificadas reduziu. A explicação para esse declínio encontra-se na formação de imensos aglomerados de microcarregadores, que chegaram a uma média de mais de 1 mm de diâmetro médio após as 132 h (Figura 16). Em 12 horas (de 132 para 144 h) o diâmetro médio praticamente triplicou, isso indica que durante esse período houve a união entre aglomerados. Depois da queda no número de células, houve um novo crescimento, porém sem atingir o valor obtido às 132 h. Como pode ser visto, os números de células encontrados antes e depois da troca de meio passaram a ficar mais distantes após a formação desses grandes aglomerados, uma vez que eles dificultaram a quantificação mais precisa. Isso acontece, provavelmente, pela dificuldade do reagente do MTT se difundir até as células que se encontram mais internamente nos grandes aglomerados. Assim como o reagente de quantificação celular, nutrientes e gases (principalmente o oxigênio) também encontram uma barreira maior para chegar a essas células, o que pode ter provocado a morte celular e redução nos valores encontrados. Os agregados também foram relatados por outros pesquisadores (CARUSO, 2012; FRAUENSCHUH et al., 2007; MIZUKAMI, 2011; SANCHES, 2010; WEBER et al., 2007). Eles 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.

Como pode ser verificado na Figura 14, foram apresentados dois gráficos com os mesmos valores, porém em escalas diferentes (escala linear em A e escala log 10 em B). Optou-se por apresentar também o gráfico B, pois nele é possível verificar com maior nitidez os pontos que se encontram em exponencial, e portanto, indicam a fase de crescimento; e aqueles que indicam que as células entraram em fase estacionária, como aconteceu a partir de 144 h. Optou-se também por apresentar os valores de números de células aderidas aos microcarregadores com e sem a correção do fator de diluição (FD). Os valores com a correção do FD referem-se àqueles estimados caso as amostras de 2 mL (meio + microcarregadores com células) não fossem retiradas diariamente e, portanto, o cultivo não fosse diluído (já que as reposições dos 2 mL foram feitas apenas com meio de cultura, sem os microcarregadores). A escolha da apresentação do valor com correção é de

grande importância, uma vez que essas amostras não seriam retiradas diariamente na prática de cultivos para aplicação em terapia celular, portanto esses seriam os números de células obtidos.

Analisando-se ainda a Figura 14, observa-se que o número de células em suspensão permaneceu baixo após a fase de adesão (principalmente considerando-se as barras dos desvios-padrão) evidenciando que o tempo estimado (8 horas) para adesão das células no microcarregador Cultispher-S foi suficiente para adesão da maioria das células. O pH manteve-se na faixa ótima, de 7,2-7,4, apenas antes de 24 h. A partir daí, as trocas de meio e/ou as modificações na percentagem de CO₂ na incubadora (Tabela B1 do apêndice B) foram essenciais para garantir a manutenção do pH de modo que as células não fossem muito afetadas por seus baixos valores. Ainda com essas precauções, o pH chegou a valores menores que 7,0 a partir das 96 h (considerando os valores antes das trocas de meio).

Também foi possível analisar o consumo dos nutrientes e a produção dos metabólitos. As Tabelas B1 e B2 (Apêndice B) 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. De acordo com a Figura 15A, a glicose atingiu seu menor valor (3,069 mM) em 132 h e a glutamina atingiu o mínimo de 1,330 mM em 24 h; portanto, não houve esgotamento desses nutrientes. Já a produção de metabólitos tóxicos atingiu seu valor máximo em 96 h, com 3,863 mM de ácido láctico e 0,988 mM de amônia. Na literatura, o valor de ácido láctico considerado inibitório para células-tronco mesenquimais é acima de 28 mM (SCHOP, 2008.), o que não foi observado nesse experimento. Já a amônia, um subproduto da glutamina, tem efeitos mais danosos para célula animal do que o ácido láctico, sendo que valores acima de 3 mM já são considerados tóxicos (FERNANDES et al., 2007). No cultivo, esse valor máximo permaneceu abaixo do considerado inibitório.

A análise do consumo de arginina (Figura 15B) mostrou que a partir de 192 h seus valores praticamente zeraram, o que seria um indício da necessidade de suplementação desse aminoácido. Esse esgotamento pode também ter influenciado a morte das células no final do cultivo. O alto consumo de arginina já foi observado em outros cultivos com essa mesma célula (MIZUKAMI, 2011; SANCHES, 2010). Segundo Durante et al. (2001) o aminoácido arginina é um dos precursores da

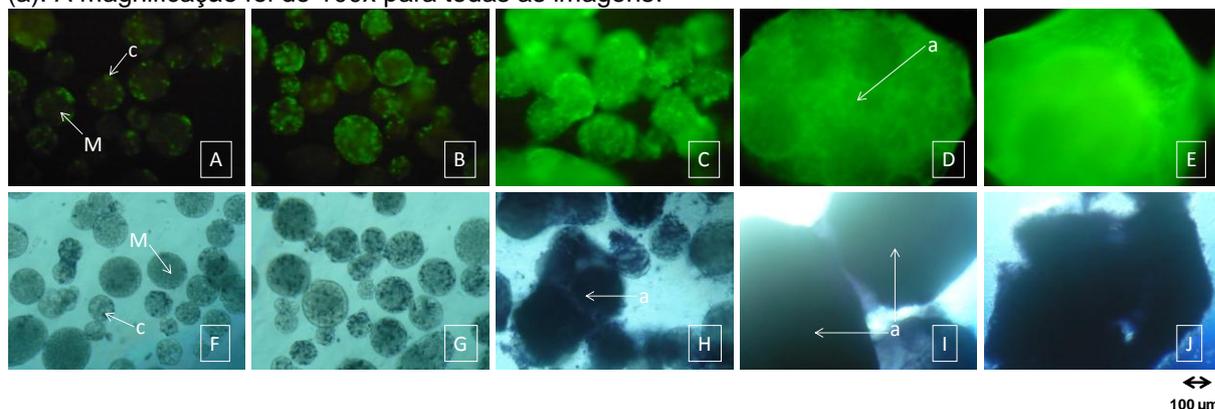
síntese do colágeno tipo-I (através da enzima ornitina aminotransferase), componente essencial da matriz extracelular. Assim, o alto consumo de arginina pode estar relacionado à elevada produção de matriz extracelular, que contribui para gerar os aglomerados de microcarregadores.

A Figura 16 mostra que a média dos diâmetros médios dos aglomerados manteve-se praticamente a mesma até as 72 h, apresentando um leve crescimento até as 132 h e um crescimento brusco entre 132 e 144 h, sendo este o principal fator do declínio no número de células nesse período. Os valores a partir das 144 h mantiveram-se aproximadamente os mesmos.

Outros resultados obtidos (Figura 17) referem-se às células recuperadas por meio da Tryple 10X durante o cultivo. Eles mostram que a maior percentagem de recuperação ocorreu em 132 h (99,21%) e a menor em 192 h (0,83 %). O declínio dos valores recuperados após as 132 h também parece estar associado à formação dos grandes aglomerados; portanto, segundo esse experimento, esse seria o tempo de duração recomendável de um cultivo de CMMs para a aplicação em terapia celular.

As imagens de microscopia ótica obtidas no decorrer do cultivo mostram claramente os agregados de microcarregadores (Figura 18). É possível verificar nitidamente a enorme alteração do tamanho dos aglomerados entre 132 e 168 h (C,H e D, I respectivamente). Outra observação importante ao se analisar a imagem I é a união entre dois aglomerados por meio de matriz extracelular, que corrobora a explicação da formação de agregados mencionada por Durante *et al.* (2001); Frauenschuh *et al.* (2007) ; Mizukami (2011); Sanches (2010) e Weber *et al.* (2007).

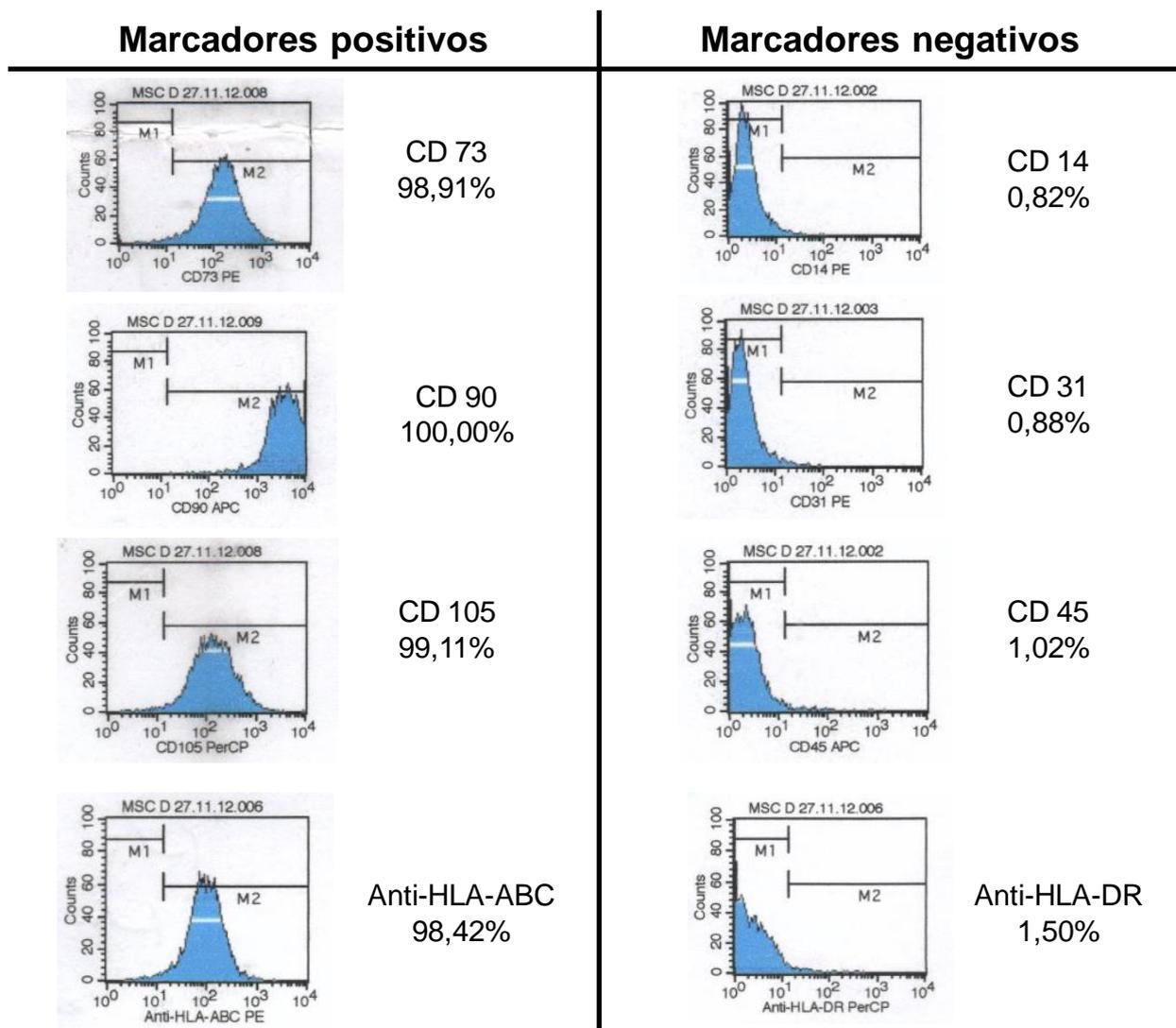
Figura 18 – Imagens de microscopia ótica dos microcarregadores Cultispher-S com células no decorrer do experimento 1. O tempo de cultivo em (A) e (F) foi de 8 h, em (B) e (G) de 48 h, em (C) e (H) de 132 h, em (D) e (I) de 168 h e em (E) e (J) de 216 h. Nas imagens de (A) à (E), as células ativas (c), que expressam GFP, podem ser evidenciadas por meio de pontos verdes. Nas imagens de (F) à (J) as células viáveis (c) consistem nos pontos escuros que resultam da aplicação do método do MTT. Os microcarregadores estão representados por (M) e os aglomerados de microcarregadores por (a). A magnificação foi de 100x para todas as imagens.



(Acervo pessoal)

A fim de avaliar a conservação do perfil fenotípico de CTMs, realizou-se uma análise de citometria de fluxo com a recuperação parcial das células aderidas no microcarregador Cultispher-S no final do experimento. As células foram analisadas no citômetro de fluxo com relação aos seus antígenos de superfície, por meio de uma marcação com anticorpos monoclonais específicos. Para a realização do controle negativo, foram utilizados os anticorpos Anti-Mouse IgG1-FITC, Anti-Mouse IgG2a-PE, Anti-Mouse IgG-APC e Anti-Mouse IgG1-PerCP (BD Pharmingen, EUA). Foram estabelecidos 8 anticorpos monoclonais para a imunomarcação da linhagem: Anti-CD14-PE, Anti-CD31-PE, Anti-CD45-APC, Anti-CD73-PE, Anti-CD90-PE, Anti-CD105-PerCP, Anti-HLA-ABC-PE e Anti-HLA-DR-PerCP. Os resultados da imunofenotipagem constam na Figura 19.

Figura 19 – Resultados das análises de citometria de fluxo para a linhagem hMSC-TERT recuperada do microcarregador Cultispher-S após o cultivo em spinner no experimento 1. 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.



(Acervo pessoal)

Os resultados revelaram que a população de células foi positiva para os marcadores comuns às células-tronco derivadas da medula óssea: CD73, CD90, CD105 com expressão de mais de 95%; e negativa para os marcadores de superfície: CD14, CD31, CD45 e HLA-DR. Portanto, as características fenotípicas das CMMs utilizadas nesse experimento foram conservadas.

Caruso (2012), Mizukami (2011) e Sanches (2010) realizaram experimentos semelhantes a esse (em spinner e com diferentes microcarregadores

para a expansão de hMSC-TERT) e no final dos experimentos fizeram a diferenciação das células recuperadas em osteócitos e adipócitos. Elas concluíram que essas células conservaram seu potencial de diferenciação após os cultivos.

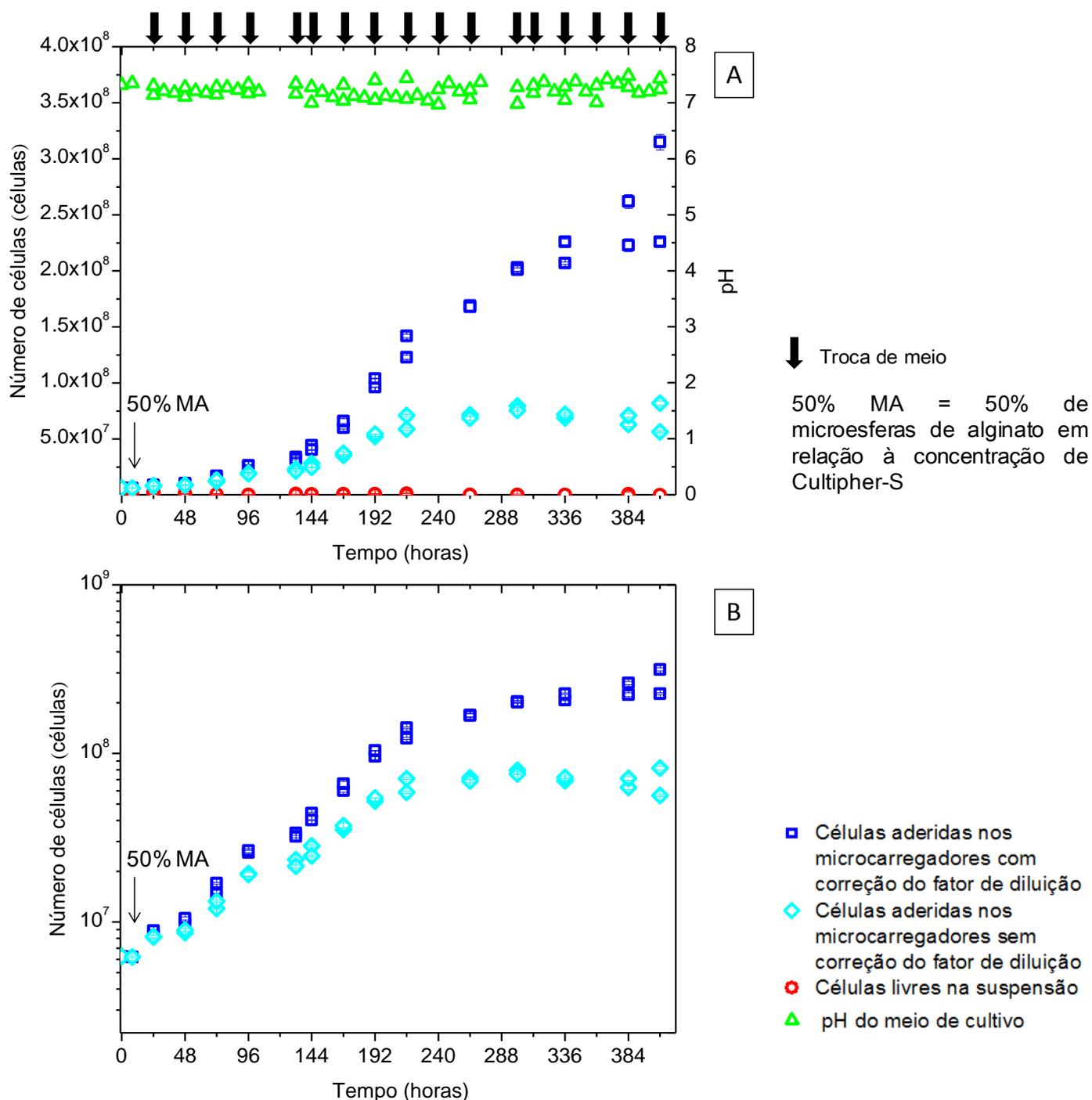
No E1, pelo método do MTT, foi possível alcançar um número máximo de células e um fator de expansão (ou de crescimento) de $1,06 \times 10^8$ e 16,9 vezes com a correção do FD; e de $7,33 \times 10^7$ e 11,7 vezes sem a correção do FD. Concluiu-se a partir dos dados obtidos que os aglomerados podem ter influenciado de forma significativa a continuação do crescimento celular. Assim, nos experimentos a seguir (E2, E3, E5 e E6) investigou-se algumas formas de minimizar a formação dessas estruturas.

5.2 Experimento 2

O experimento 2 (E2) foi realizado em condições experimentais similares ao E1, porém com uma única diferença: a adição de 50% do número de partículas de Cultispher-S utilizadas no cultivo em microesferas de alginato após 8 h de cultivo. Essa mudança ocorreu na tentativa de diminuir a formação de aglomerados de microcarregadores com a interposição dessas microesferas, que poderiam diminuir a frequência de colisão entre microcarregadores contendo células, e com isso contribuir na obtenção de valores mais elevados de número de células viáveis.

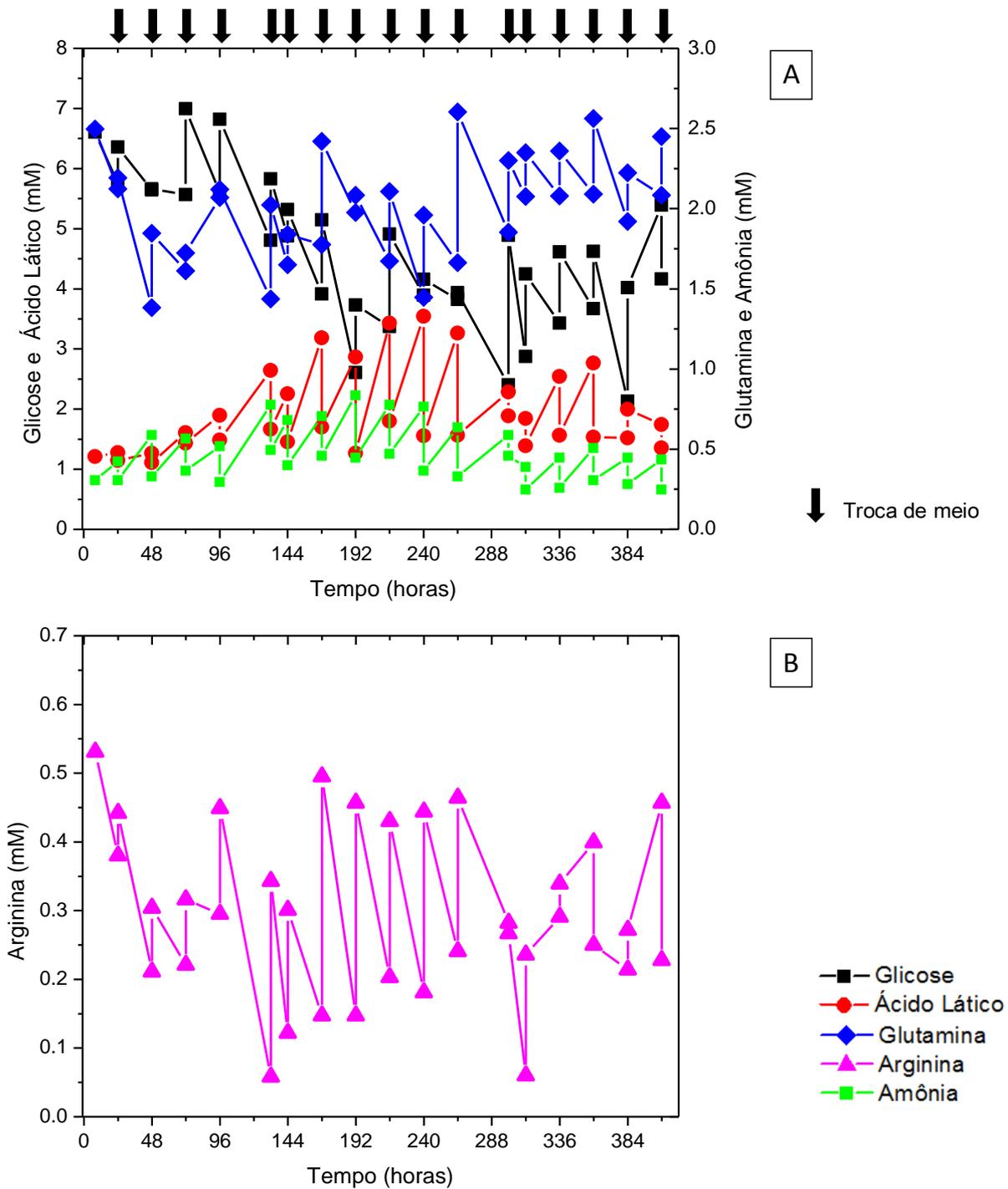
Os resultados obtidos constam nas Figuras 20, 21, 22, 23 e 24.

Figura 20 - Resultados obtidos no experimento 2 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em 1 spinner com 3 g/L de microcarregadores Cultispher-S. Em (A) e (B) estão representados os valores do número de células na suspensão e nos microcarregadores Cultispher-S, bem como os valores de pH do meio de cultivo. Em (A) os valores da ordenada estão em escala linear e em (B) estão em escala log 10. Após 8 h foram adicionadas microesferas de alginato a 50% da concentração de microcarregadores Cultispher-S.



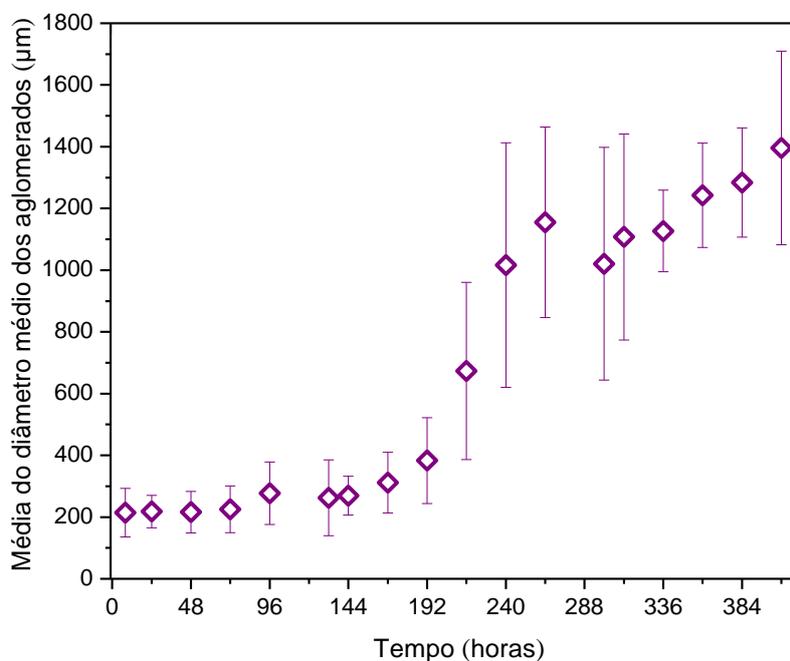
(Acervo pessoal)

Figura 21 - Resultados das concentrações de nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e metabólitos (ácido láctico e amônia) obtidos no experimento 2.



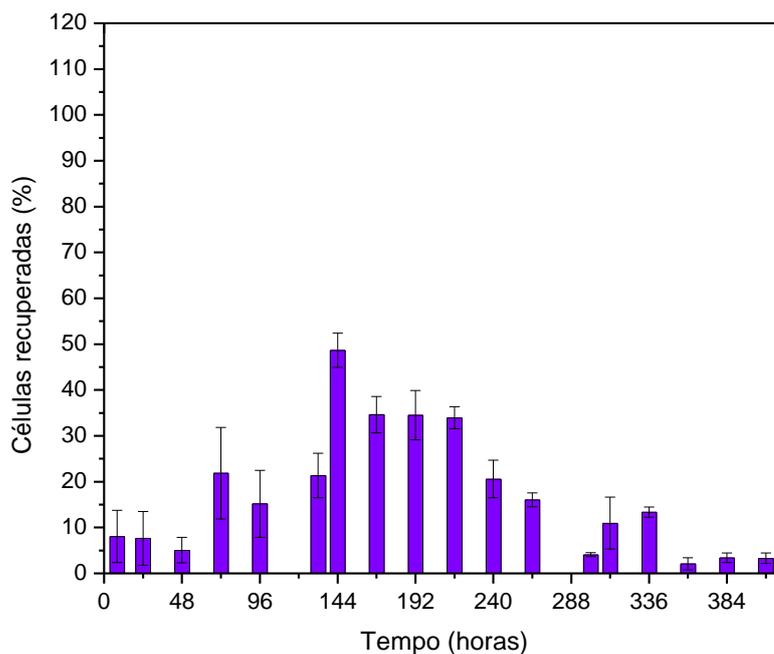
(Acervo pessoal)

Figura 22 - Resultados das médias aritmética dos diâmetros médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S obtidos durante o experimento 2.



(Acervo pessoal)

Figura 23 - Resultados das células recuperadas durante o cultivo referentes ao experimento 2. Os valores representam a percentagem de células viáveis que foram desaderidas dos microcarregadores Cultispher-S por meio da enzima Tryple 10X.



(Acervo pessoal)

As microesferas foram adicionadas após 8 horas de cultivo. Os dados obtidos mostraram novamente que os números de células livres na suspensão permaneceram baixos após as 8 h (principalmente considerando-se os desvios-padrão), evidenciando que houve um bom índice de adesão das células aos microcarregadores. Os valores de pH mostraram um comportamento parecido com o observado no E1, sendo que até antes de 24h h mantiveram-se na faixa ótima e a partir daí as troca de meio e/ou mudanças da percentagem de CO₂ na incubadora foram indispensáveis para mantê-los em uma faixa tolerável. O valor mínimo de pH atingido (6,97) foi em 240 h e ele foi maior do que o mínimo atingido no experimento anterior (6,78 em 216 h).

Os valores dos nutrientes e metabólitos encontrados estão nas Tabelas B10 e B11 (Apêndice B). Na Figura 21A é possível verificar que os menores valores de glicose e glutamina encontrados foram de 2,131 mM (em 384 h) e 1,383 (em 48 h), portanto não houve esgotamento desses nutrientes. A concentração de arginina praticamente zerou (em 132 e 312 h), confirmando, novamente, a necessidade de sua suplementação no meio de cultura (Figura 21B). Com relação aos metabólitos, tanto o ácido láctico (com no máximo 3,541 mM em 240 h), quanto o amônio, que apresentou em 192 h 0,835 mM, não atingiram os níveis críticos ou prejudiciais para as células (Figura 21A).

Os diâmetros médios dos aglomerados nesse experimento aumentaram de forma mais gradual (Figura 22), sendo que o tempo de formação dos agregados foi atrasado quando comparado ao E1. Enquanto, por exemplo, em E1 os valores próximos de 1 mm foram atingidos em 144 h, em E2 os mesmos valores foram alcançados em 240 h de cultivo. Esse fato pode explicar a obtenção de números de células pelo método MTT maiores que os obtidos anteriormente, apesar desse crescimento também ter ocorrido de forma mais gradual e atrasada comparado a E1. Enquanto em E1 alcançou-se 1×10^8 células em 132 h, em E2 valores aproximados a esse foram encontrados em 192 h (Figuras 14 e 20A). Outra possibilidade que explicaria o atraso do crescimento celular seria o atrito das microesferas de alginato com as células na superfície dos microcarregadores, levando à desadesão e morte. Observou-se também que, assim como em E1, a diferença dos números de células obtidos antes e depois da troca de meio nos últimos dias foi bastante discrepante, o que evidenciou, mais uma vez, a dificuldade

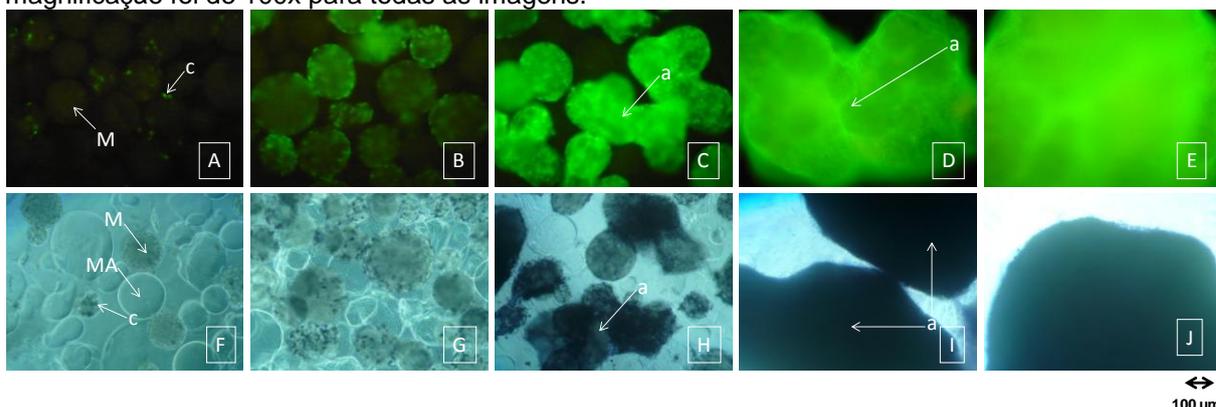
de quantificação mais precisa nesse período devido ao tamanho dos agregados de microcarregadores.

O valor máximo de células obtido com a correção do FD no experimento 2 foi de $3,15 \times 10^8$ em 408 h e o fator de expansão alcançado foi de 50,4 vezes. Já esses valores sem a correção do FD foram de $8,19 \times 10^7$ células e 13,1 vezes no mesmo tempo. Apesar do número de células não ter entrado em declínio, como pode ser observado na Figura 20 (A), foi necessário finalizar o experimento. Isso pode ser explicado devido ao fato que depois de 17 dias com diluições sucessivas, a quantidade de microcarregadores (aglomerados) contida no spinner passou a ser insuficiente para que fossem garantidos valores confiáveis de células. Apenas um aglomerado a mais ou a menos retirado da amostra passou a gerar uma diferença considerável nessa medida. Além disso, ao analisar-se a Figura 20 (B) é possível perceber que, já a partir de 216 h, os valores de células obtidos passaram a caracterizar a fase estacionária do cultivo.

A Figura 23 mostra que a maior percentagem de recuperação de células (48,68%) ocorreu em 144 h, ou seja, em um tempo bem próximo ao encontrado em E1 (de 132 h). No entanto, a recuperação foi menos eficaz do que a obtida no experimento anterior. Segundo Frisch e Francis (1994), células que são desaderidas da matriz extracelular circundante (ou seja, quando há uma perda das interações normais célula- matriz) podem sofrer uma morte celular programada especial conhecida como *anoikis*. Sanches (2010) mencionou que a ação proteolítica da enzima Tryple romperia as ligações peptídicas célula-célula e célula-matriz. Assim, a baixa recuperação celular obtida pode ser explicada pela dissociação da célula tanto do microcarregador quanto da matriz extracelular (após a Tryple 10X ser adicionada), seguida da ocorrência de *anoikis*. Esse tipo de morte celular desencadeia uma série de reações que levam as enzimas lisossomais a desintegrar a célula, por isso, provavelmente, elas não puderam ser mensuradas na suspensão.

As imagens abaixo (Figura 24) mostram as células aderidas aos microcarregadores e os agregados formados ao longo do tempo de cultivo.

Figura 24 - Imagens de microscopia ótica dos microcarregadores Cultispher-S com células no decorrer do experimento 2. O tempo de cultivo em (A) e (F) foi de 8 h, em (B) e (G) de 96 h, em (C) e (H) de 192 h, em (D) e (I) de 300 h e em (E) e (J) de 408 h. Nas imagens de (A) à (E), as células ativas (c), que expressam GFP, podem ser evidenciadas por meio de pontos verdes. Nas imagens de (F) à (J) as células viáveis (c) consistem nos pontos escuros que resultam da aplicação do método do MTT e as microesferas de alginato (MA) correspondem às estruturas transparentes. Os microcarregadores estão representados por (M) e os aglomerados de microcarregadores por (a). A magnificação foi de 100x para todas as imagens.



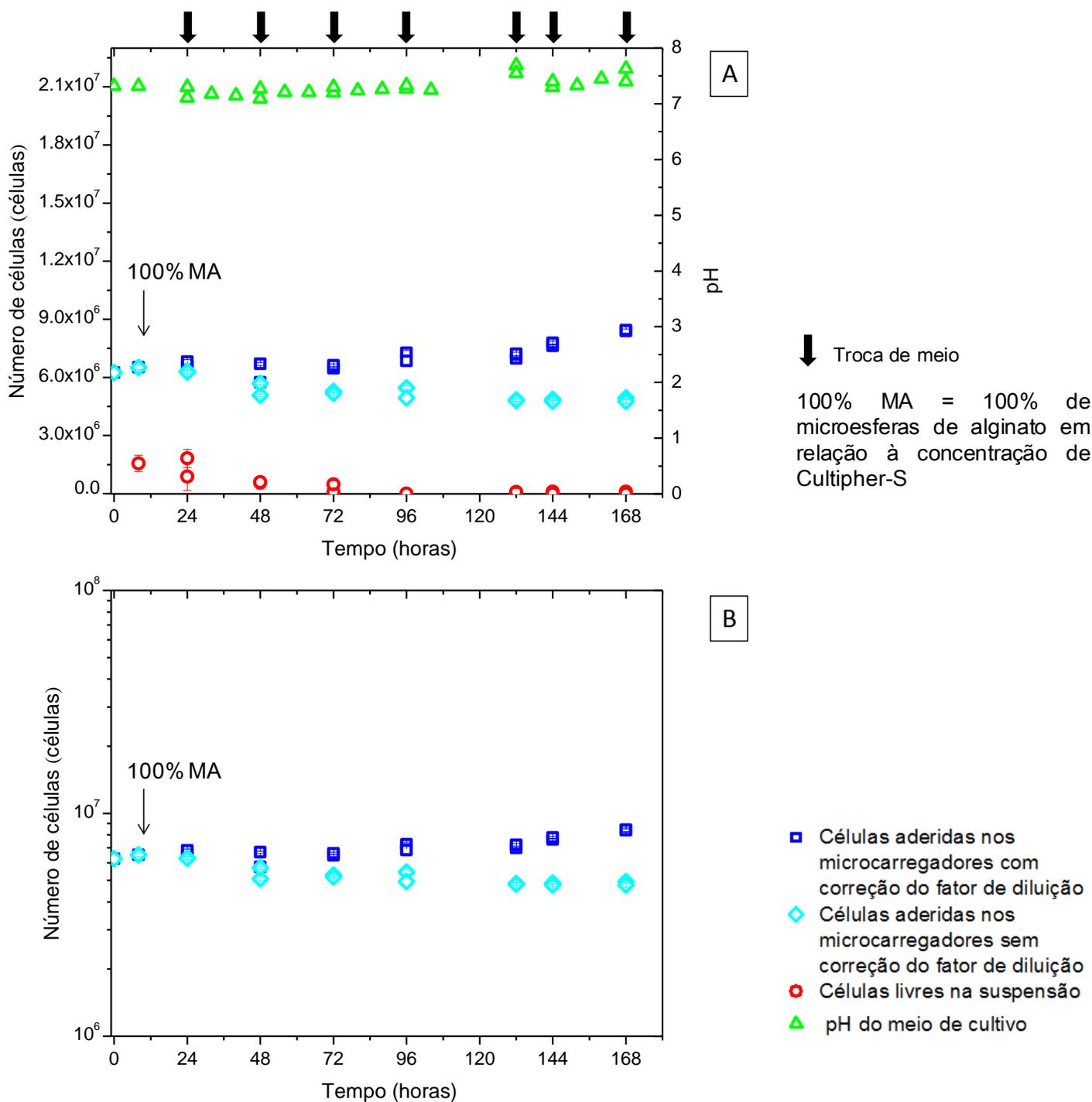
(Acervo pessoal)

5.3 Experimento 3

O experimento 3 (E3) foi realizado em condições experimentais similares aos experimentos E1 e E2, porém com uma única diferença: adicionando-se 100% do número de partículas de Cultispher-S utilizadas no cultivo em microesferas de alginato após a fase de adesão. Essa mudança também ocorreu com objetivo de diminuir a formação de aglomerados e com isso alcançar valores ainda mais elevados de número de células viáveis. Em outras palavras, suspeitou-se que o aumento da concentração de esferas de alginato pudesse melhorar ainda mais os resultados obtidos em E2.

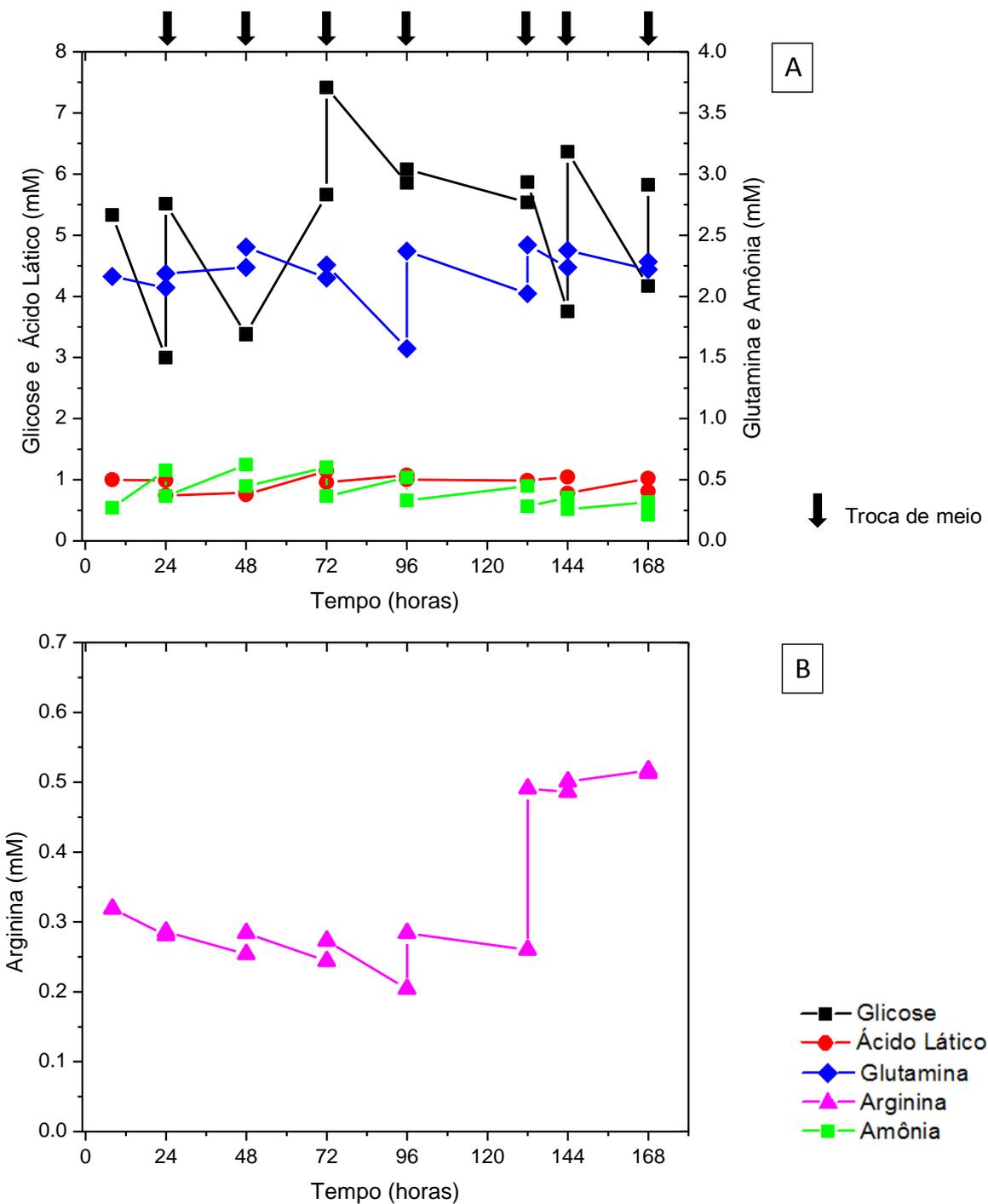
Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 25, 26, 27, 28 e 29.

Figura 25 - Resultados obtidos no experimento 3 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em 1 spinner com 3 g/L de microcarregadores Cultispher-S. Em (A) e (B) estão representados os valores do número de células na suspensão e nos microcarregadores Cultispher-S, bem como os valores de pH do meio de cultivo. Em (A) os valores da ordenada estão em escala linear e em (B) estão em escala log 10. Após 8 h foram adicionadas microesferas de alginato a 100% da concentração de microcarregadores Cultispher-S.



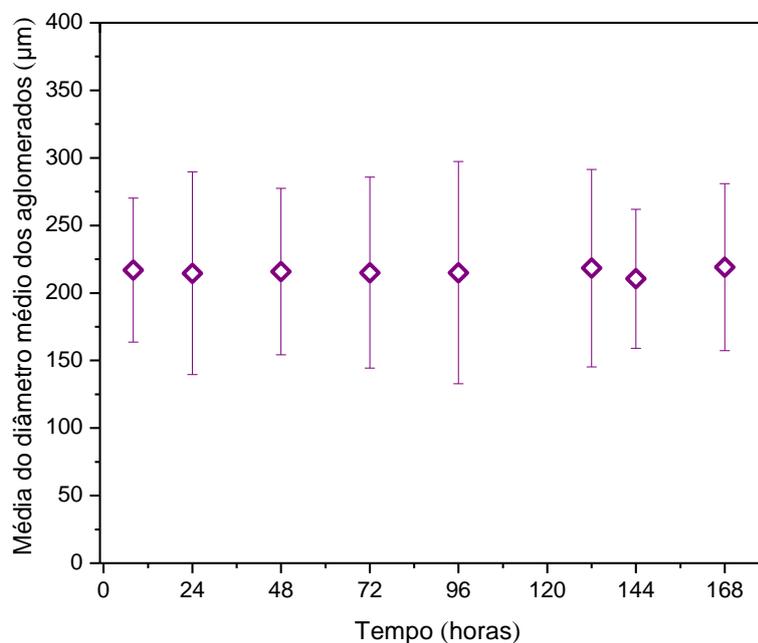
(Acervo pessoal)

Figura 26 - Resultados das concentrações de nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e metabólitos (ácido láctico e amônia) obtidos no experimento 3.



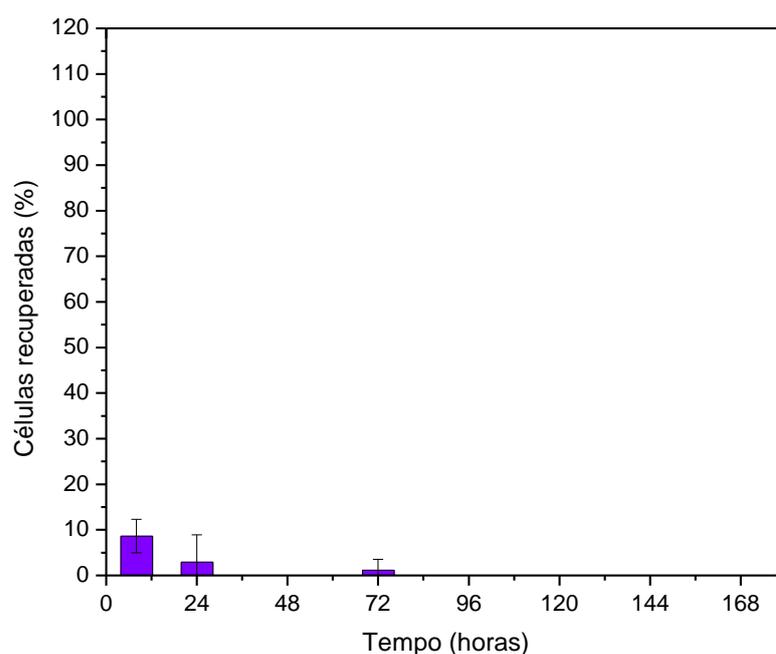
(Acervo pessoal)

Figura 27 Resultados das médias aritméticas dos diâmetros médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S obtidos durante o experimento 3.



(Acervo pessoal)

Figura 28 - Resultados das células recuperadas durante o cultivo referentes ao experimento 3. Os valores representam a porcentagem de células viáveis que foram desaderidas dos microcarregadores Cultispher-S por meio da enzima Tryple 10X.



(Acervo pessoal)

A observação da Figura 25 permite constatar que o número de células (pelo método do MTT) manteve-se muito próximo ao longo de todo o cultivo. A medida obtida após o término da fase de adesão (8 h), de $6,52 \times 10^6$, foi coerente com o esperado para esse período, porém as demais, não. A saturação do espaço com as microesferas de alginato provavelmente promoveu a ocorrência de elevado número de colisões entre microesferas e microcarregadores. Isso, possivelmente, provocou o atrito com as células, o destacamento das mesmas e, por conseguinte, a morte celular. Contudo, não é possível afirmar que não houve crescimento, pois ele pode ter ocorrido com a mesma taxa de morte celular. Ou seja, na medida em que as células se multiplicavam, elas eram desaderidas, ocasionando morte. O valor máximo atingido foi de $8,44 \times 10^6$ células (com a correção do FD) em 168 h e de $6,52 \times 10^6$ células (sem a correção do FD) em 8 h. Dessa forma, os fatores de expansão com e sem a correção do FD foram de 1,3 e 1,0, respectivamente.

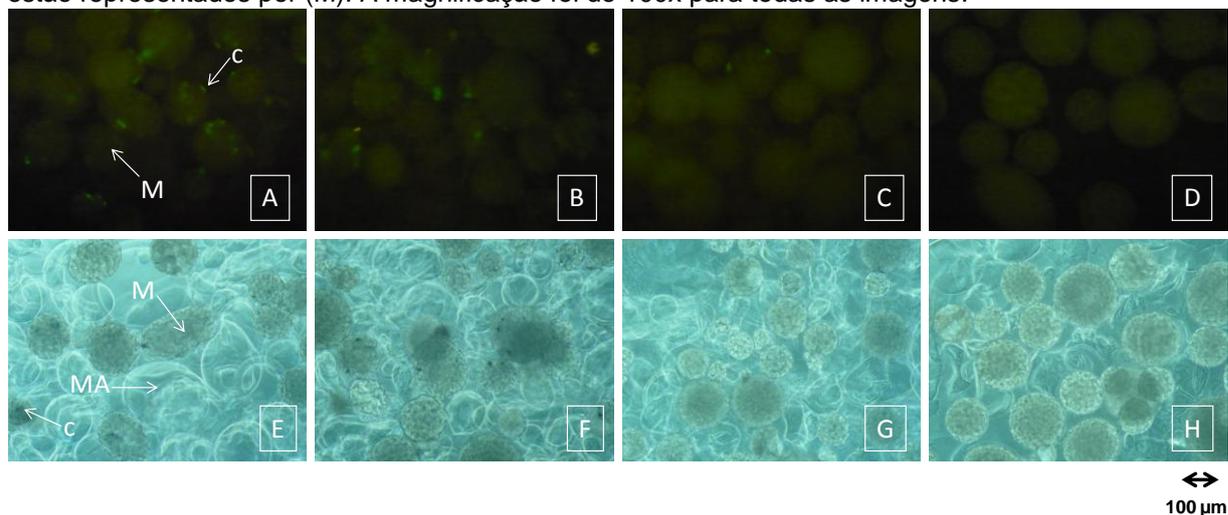
Os valores de células na suspensão praticamente decresceram até as 72 h e mantiveram-se baixos ao longo de todo o período. O pH atingiu seu ponto máximo em 132 h (7,69), sendo esse um valor crítico para o desenvolvimento celular. Ela pode ser explicada devido ao baixo consumo de glicose, que gerou valores de ácido lático abaixo do esperado e por consequência, ocorreu o aumento do pH.

Como os valores do número de células obtidos praticamente não aumentaram, a média dos diâmetros médios dos aglomerados também foi mantida na mesma faixa ao longo do tempo, ou seja, representando a média do valor do diâmetro médio de um microcarregador (Figura 27).

Pelo motivo já apresentado, não houve grande consumo, nem esgotamento dos nutrientes (Figuras 26A e 26B). As concentrações dos metabólitos mantiveram-se baixas durante todo o tempo, não alcançando seus valores críticos (Figura 26A). A percentagem de células recuperadas no E3 caiu consideravelmente após as 8 h, chegando a zero em quase todos os demais tempos (Figura 28).

Na Figura 29 é possível constatar a diminuição do número de células durante o E3 e a ausência de aglomerados em relação às Figuras 18 e 24.

Figura 29 - Imagens de microscopia ótica dos microcarregadores Cultispher-S com células no decorrer do experimento 3. O tempo de cultivo em (A) e (E) foi de 8 h, em (B) e (F) de 24 h, em (C) e (G) de 48 h e em (D) e (H) de 168 h. Nas imagens de (A) à (D), as células ativas (c), que expressam GFP, podem ser evidenciadas por meio de pontos verdes. Nas imagens de (E) à (H) as células viáveis (c) consistem nos pontos escuros que resultam da aplicação do método do MTT e as microesferas de alginato (MA) correspondem às estruturas transparentes. Os microcarregadores estão representados por (M). A magnificação foi de 100x para todas as imagens.

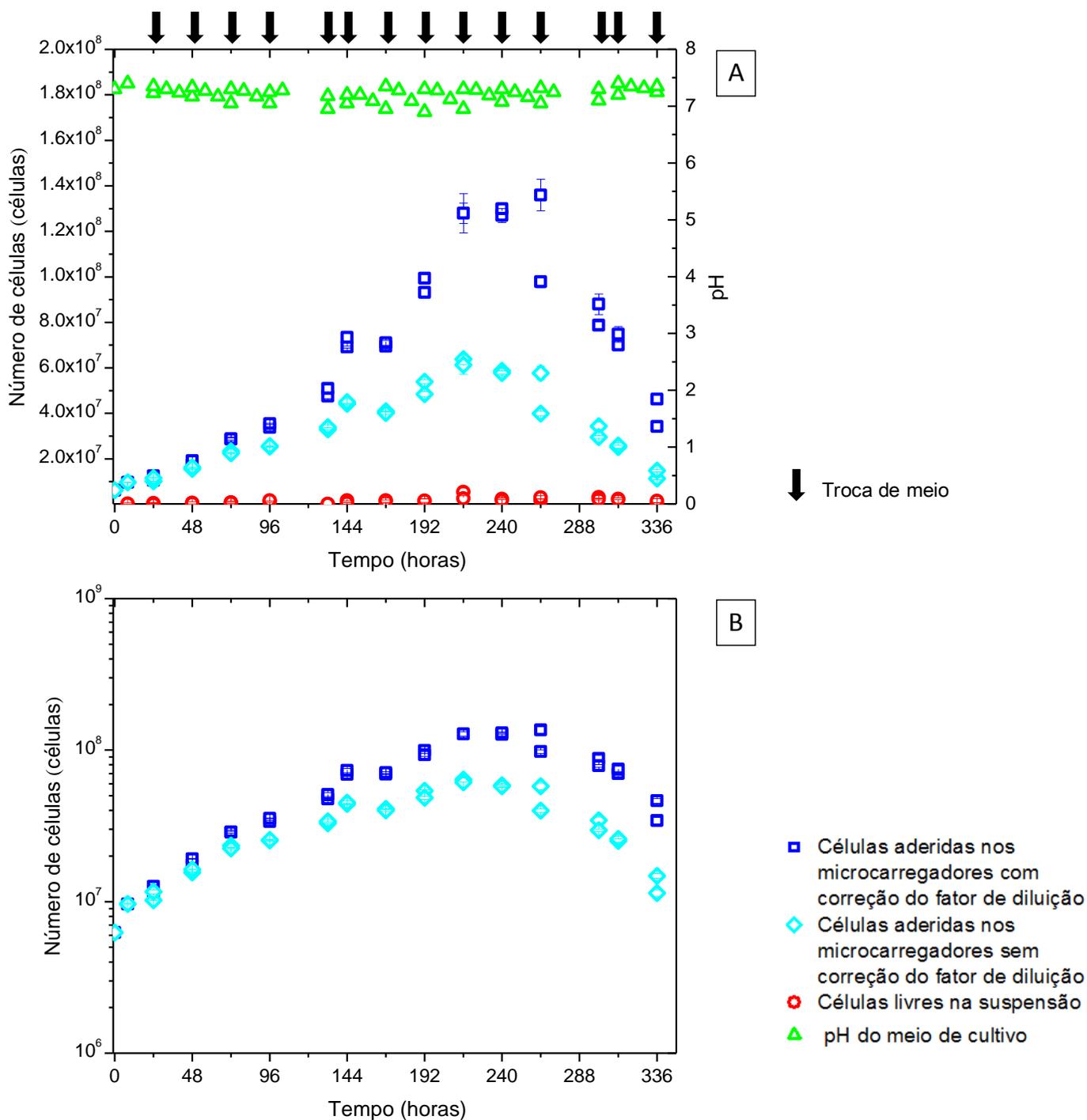


(Acervo pessoal)

5.4 Experimento 4

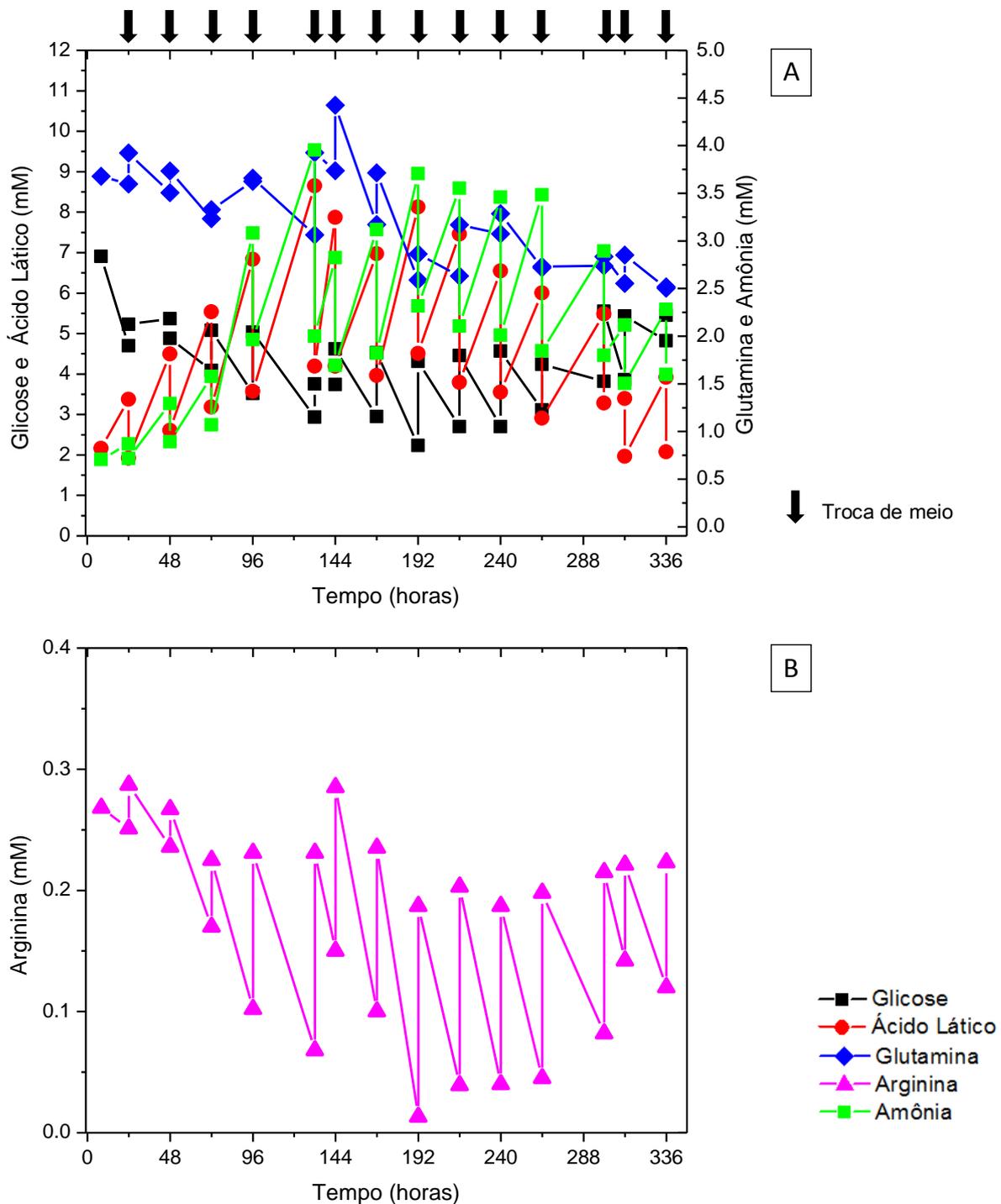
Como explicado inicialmente, o experimento 4 (E4) foi realizado exatamente nas mesmas condições do E1. Os resultados relacionados a esse cultivo encontram-se nas Figuras 30, 31, 32, 33, 34 e 35.

Figura 30 - Resultados obtidos no experimento 4 (segundo controle) com a linhagem hMSC-TERT cultivada em 1 spinner com 3 g/L de microcarregadores Cultispher-S. Em (A) e (B) estão representados os valores do número de células na suspensão e nos microcarregadores Cultispher-S, bem como os valores de pH do meio de cultivo. Em (A) os valores da ordenada estão em escala linear e em (B) estão em escala log 10.



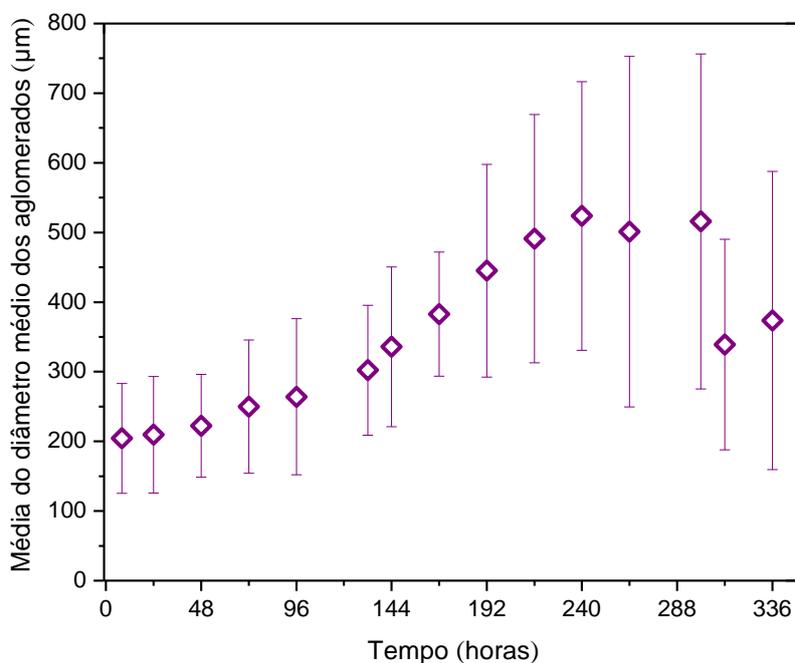
(Acervo pessoal)

Figura 31 - Resultados das concentrações de nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e metabólitos (ácido láctico e amônia) obtidos no experimento 4.



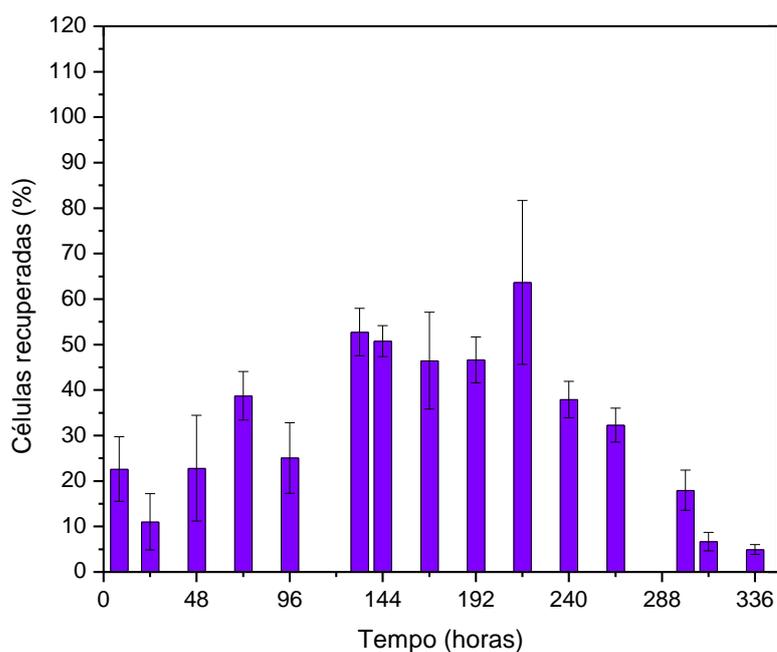
(Acervo pessoal)

Figura 32 - Resultados das médias aritmética dos diâmetros médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S obtidos durante o experimento 4.



(Acervo pessoal)

Figura 33 - Resultados das células recuperadas durante o cultivo referentes ao experimento 4. Os valores representam a porcentagem de células viáveis que foram desaderidas dos microcarregadores Cultispher-S por meio da enzima Tryple 10X.



(Acervo pessoal)

De acordo com a Figura 30, o comportamento das medidas de pH foi semelhante aos encontrados nos experimentos E1 e E2. Ou seja, chegaram a atingir valores abaixo de 7,00 (6,90 em 192 h), porém, com a troca de meio e as mudanças na percentagem de CO₂ da incubadora foi possível aumentar esse valor. As células livres na suspensão diminuíram consideravelmente após a fase de adesão, como esperado. Esse número aumentou até 216 h e depois reduziu, acompanhando os valores de células aderidas, porém em valores menores.

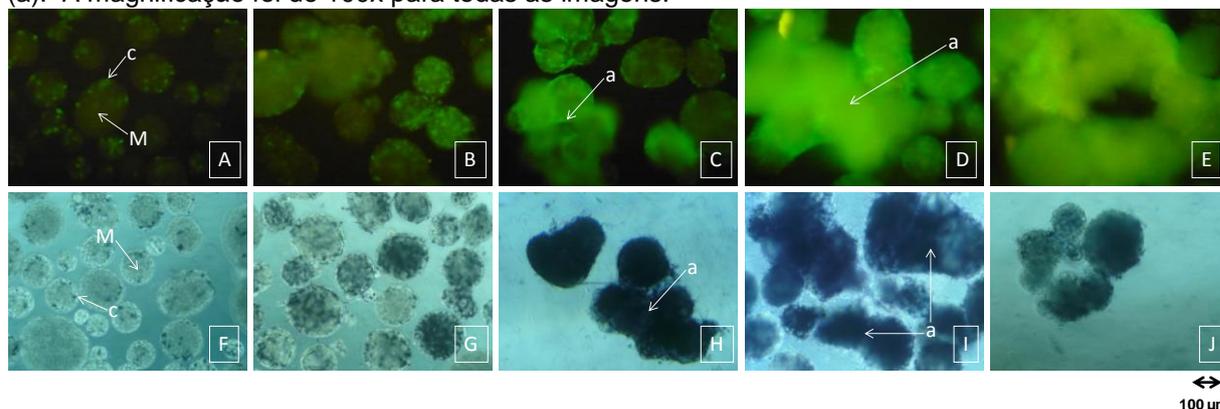
O número de células obtido pelo método do MTT (Figura 30) alcançou, em 264 h seu valor máximo de $1,36 \times 10^8$ (com a correção do FD), resultando em um fator de expansão de 21,7. E em 216, foi possível obter $6,38 \times 10^7$ células (sem a correção do FD), gerando um fator de expansão de 10,2 vezes. O declínio do crescimento celular ocorreu após 264 h, no entanto, como os valores de antes e depois da troca de meio nesse momento foram bastante discrepantes, há a possibilidade de que a queda tenha tido início entre 240 e 216 h (segundo os valores com correção do FD). Esse declínio pode ser explicado tanto pelo tamanho dos agregados, que atingiu o ponto máximo em 240 h (523 μm) (Figura 37); quanto pelos valores inibitórios de amônio, que de 96 à 264 h ultrapassaram o limite tolerável pelas células (de 3mM); e também por ter praticamente zerado a concentração de arginina de 192 à 264 h (com o mínimo de 0,013 mM), indicando mais uma vez a necessidade de suplementação do meio com esse aminoácido (Figura 31B).

O outro metabólito (ácido láctico) chegou à 8,648 mM em 132 h, não obstante, o valor crítico (28 mM) não foi alcançado. A glutamina chegou ao valor mínimo de 2,504 mM em 336 h e a glicose, de 2,237mM em 192 h, constando assim, que elas não esgotaram (Figura 31A). Os valores dos demais nutrientes podem ser verificados nas Tabelas B26 e B27 (Apêndice B).

A maior percentagem de células recuperadas (63,67%) ocorreu em 216 h, seguida de 50,78% em 144 h (Figura 33).

A Figura 34 mostra as imagens obtidas no E4.

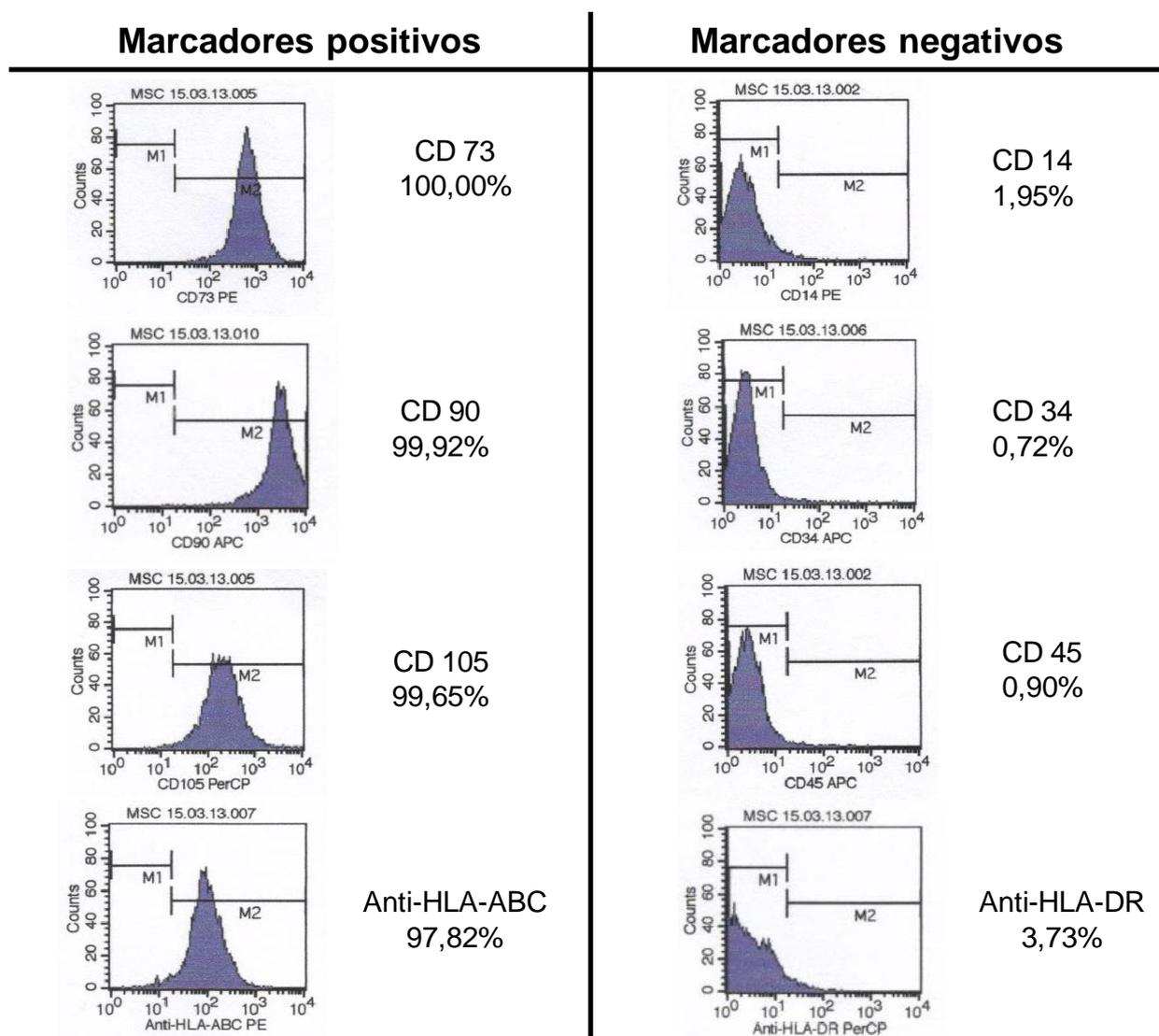
Figura 34— Imagens de microscopia ótica dos microcarregadores Cultispher-S com células no decorrer do experimento 4. O tempo de cultivo em (A) e (F) foi de 8 h, em (B) e (G) de 72 h, em (C) e (H) de 144 h, em (D) e (I) de 264 h e em (E) e (J) de 336 h. Nas imagens de (A) à (E), as células ativas (c), que expressam GFP, podem ser evidenciadas por meio de pontos verdes. Nas imagens de (F) à (J) as células viáveis (c) consistem nos pontos escuros que resultam da aplicação do método do MTT. Os microcarregadores estão representados por (M) e os aglomerados de microcarregadores por (a). A magnificação foi de 100x para todas as imagens.



(Acervo pessoal)

Da mesma forma que no E1, no E4 foi realizada uma análise de citometria de fluxo (figura 35). Os resultados mostraram que as características fenotípicas das CMMs utilizadas nesse experimento também foram conservadas, pois a população de células foi positiva para os marcadores comuns às células-tronco derivadas da medula óssea: CD73, CD90, CD105 com expressão de mais de 95%; e negativa para os marcadores de superfície: CD14, CD34, CD45 e HLA-DR.

Figura 35 - Resultados das análises de citometria de fluxo para a linhagem hMSC-TERT recuperada do microcarregador Cultipher-S após o cultivo em spinner no experimento 4. As análises mostraram que a reatividade foi positiva para marcadores de superfície CD73, CD90, CD105 e HLA-ABC e negativa para marcadores CD14, CD34, CD45 e HLA-DR.

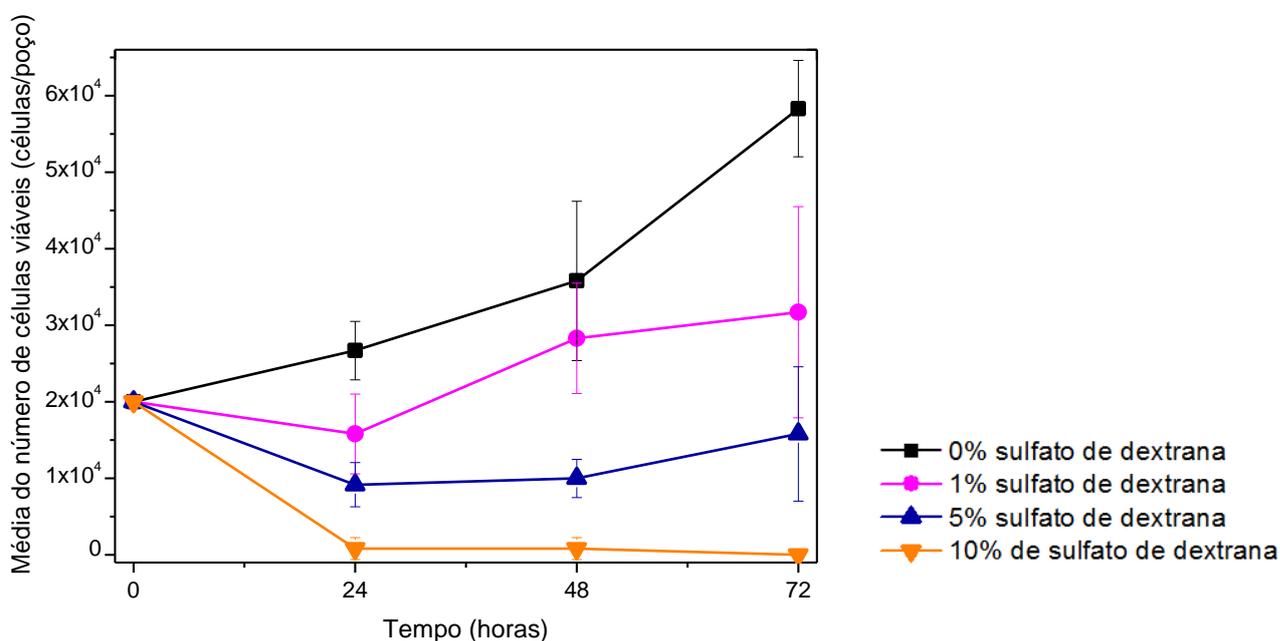


(Acervo pessoal)

5.5 Experimento 5

O experimento 5 (E5) foi realizado em condições semelhantes às do experimento E4. A única modificação realizada foi a adição de sulfato de dextrana ao meio de cultivo a 1% após 24 h com o objetivo de evitar a formação de aglomerados. Essa percentagem foi definida com base em um experimento preliminar realizado em triplicata em placa de 12 poços, como mostra a Figura 36. Ele mostrou que, apesar de inicialmente 1% dessa substância ter causado morte celular, em seguida as células voltaram a crescer. Entretanto, com 5% e 10% de sulfato de dextrana o efeito negativo no crescimento celular foi maior.

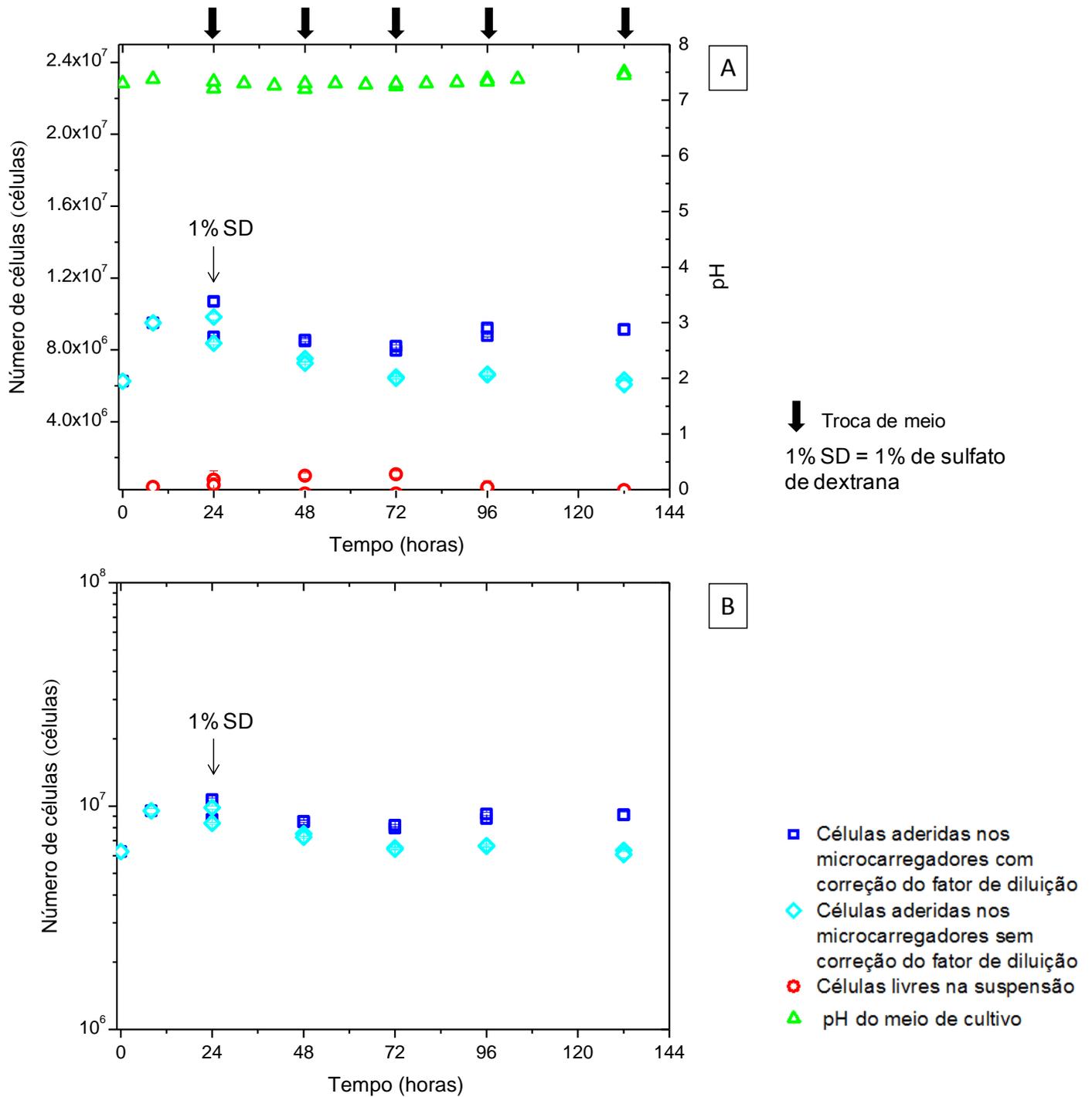
Figura 36 – Resultados obtidos no experimento prévio realizado em placa de 24 poços sem microcarregadores para definir a concentração de sulfato de dextrana a ser utilizada no experimento 5. Os valores representam a média do número de células viáveis por poço ao longo de 3 dias de cultivo.



(Acervo pessoal)

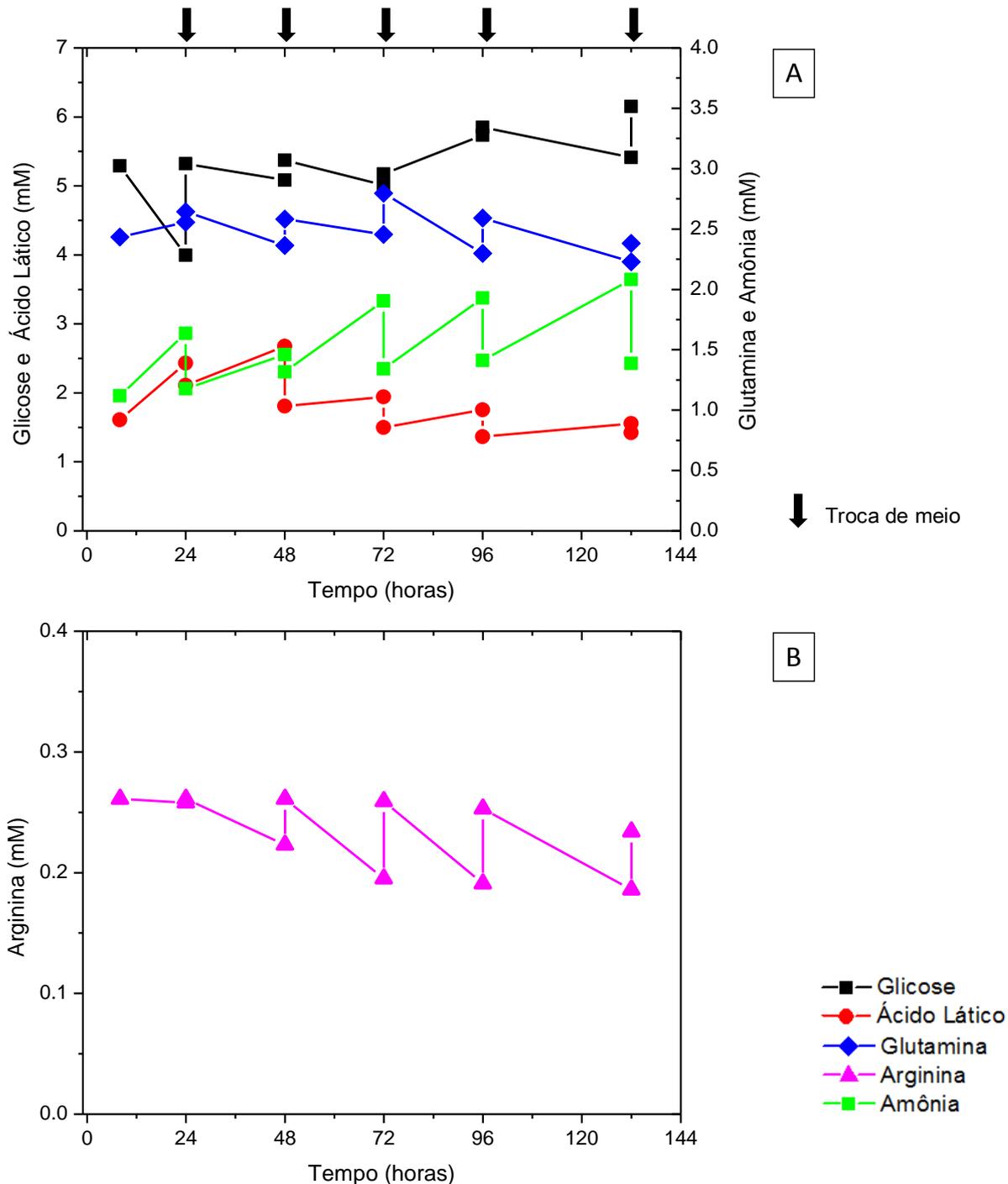
Como no experimento em placa de poços houve morte no início, foi determinado que o sulfato de dextrana (1%) seria adicionado ao meio de cultura somente após 24 horas para garantir a adesão das células aos microcarregadores. Os resultados podem ser verificados a seguir nas Figuras 37, 38, 39, 40 e 41.

Figura 37 - Resultados obtidos no experimento 5 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em 1 spinner com 3 g/L de microcarregadores Cultispher-S. Em (A) e (B) estão representados os valores do número de células na suspensão e nos microcarregadores Cultispher-S, bem como os valores de pH do meio de cultivo. Em (A) os valores da ordenada estão em escala linear e em (B) estão em escala log 10. Após 24 h adicionou-se sulfato de dextrana (1%).



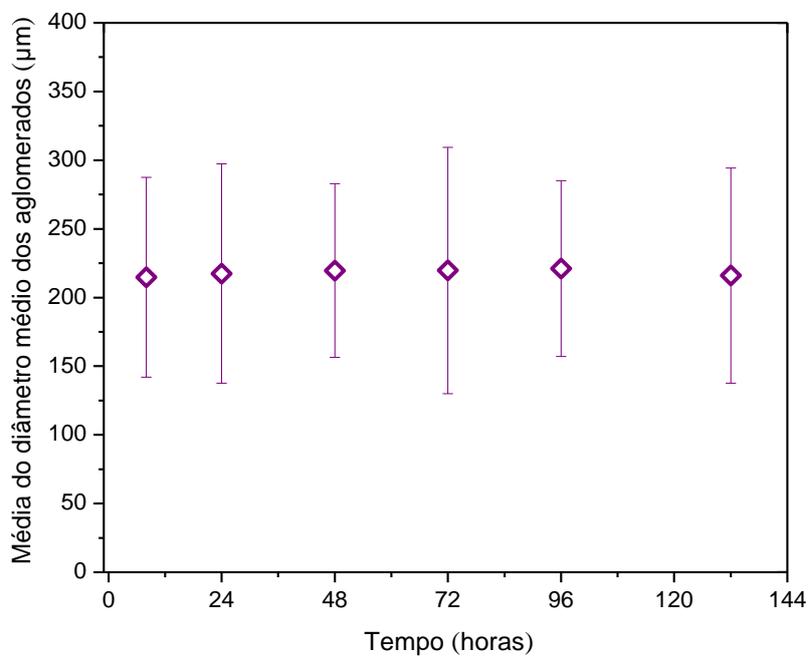
(Acervo pessoal)

Figura 38 - Resultados das concentrações de nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e metabólitos (ácido láctico e amônia) obtidos no experimento 5.



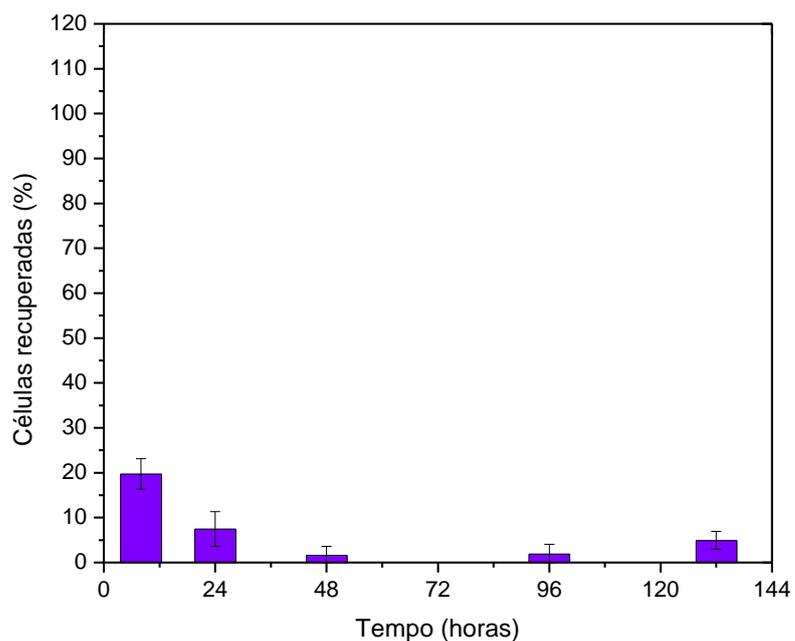
(Acervo pessoal)

Figura 39 - Resultados das médias aritmética dos diâmetros médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S obtidos durante o experimento 5.



(Acervo pessoal)

Figura 40 - Resultados das células recuperadas durante o cultivo referentes ao experimento 5. Os valores representam a porcentagem de células viáveis que foram desaderidas dos microcarregadores Cultispher-S por meio da enzima Tryple 10X.



(Acervo pessoal)

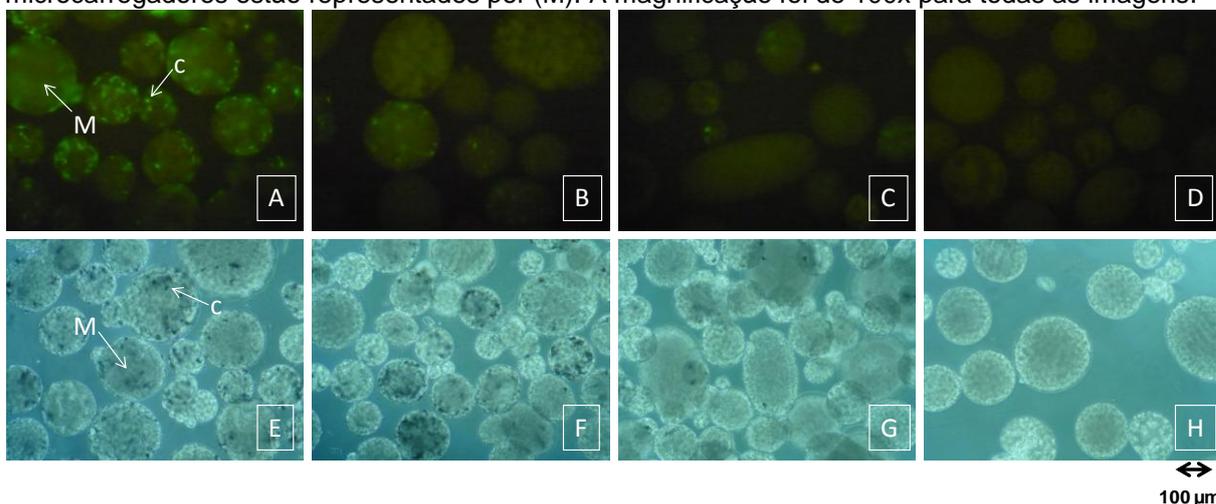
Como pode ser notado na Figura 37, os valores de células aderidas aos microcarregadores aumentaram até 24 h, porém depois da adição de sulfato de dextrana (1%), houve um decréscimo. Isso ocorreu, provavelmente, porque esse composto provocou a desadesão das células dos microcarregadores e, como consequência, levou à morte celular. Assim, esse resultado corroborou com a demonstração de Barabino e colaboradores (1999) de que a aderência celular pode ser inibida utilizando-se sulfato de dextrana. O valor máximo de células atingido foi de $1,07 \times 10^7$ com a correção do FD e de $9,83 \times 10^6$ sem a correção. Os fatores de expansão obtidos foram de 1,71 vezes com a correção do FD e de 1,57 vezes sem a correção.

Ao contrastar os resultados da Figura 37 com os resultados de 1% de sulfato de dextrana obtidos em placa de poços, nota-se uma mudança inesperada no comportamento celular, devida, provavelmente, à diferença do material em que a célula aderiu-se (poliestireno na placa de poços e gelatina nos microcarregadores).

Os valores do número de células da suspensão sofreram um aumento de acordo com o aumento da morte celular como era esperado, porém ainda assim foram baixos. O pH manteve-se dentro da faixa ótima até as 104 h e chegou a 7,5 em 132 h (Figura 37) pelo mesmo motivo de alta do pH apresentado no E3. Não ocorreu esgotamento de nutrientes (apesar dos níveis de arginina parecerem baixos) e os valores dos metabólitos mantiveram-se abaixo dos limites máximos recomendáveis (Figuras 38A e 38B).

As Figuras 39 e 41 mostram que não houve formação de aglomerados em virtude da morte celular e a Figura 40 mostra que a percentagem de células recuperadas decresceu juntamente com a diminuição do número de células aderidas.

Figura 41 - Imagens de microscopia ótica dos microcarregadores Cultispher-S com células no decorrer do experimento 5. O tempo de cultivo em (A) e (E) foi de 8 h, em (B) e (F) de 24 h, em (C) e (G) de 48 h e em (D) e (H) de 132 h. Nas imagens de (A) à (D), as células ativas (c), que expressam GFP, podem ser evidenciadas por meio de pontos verdes. Nas imagens de (E) à (H) as células viáveis (c) consistem nos pontos escuros que resultam da aplicação do método do MTT. Os microcarregadores estão representados por (M). A magnificação foi de 100x para todas as imagens.



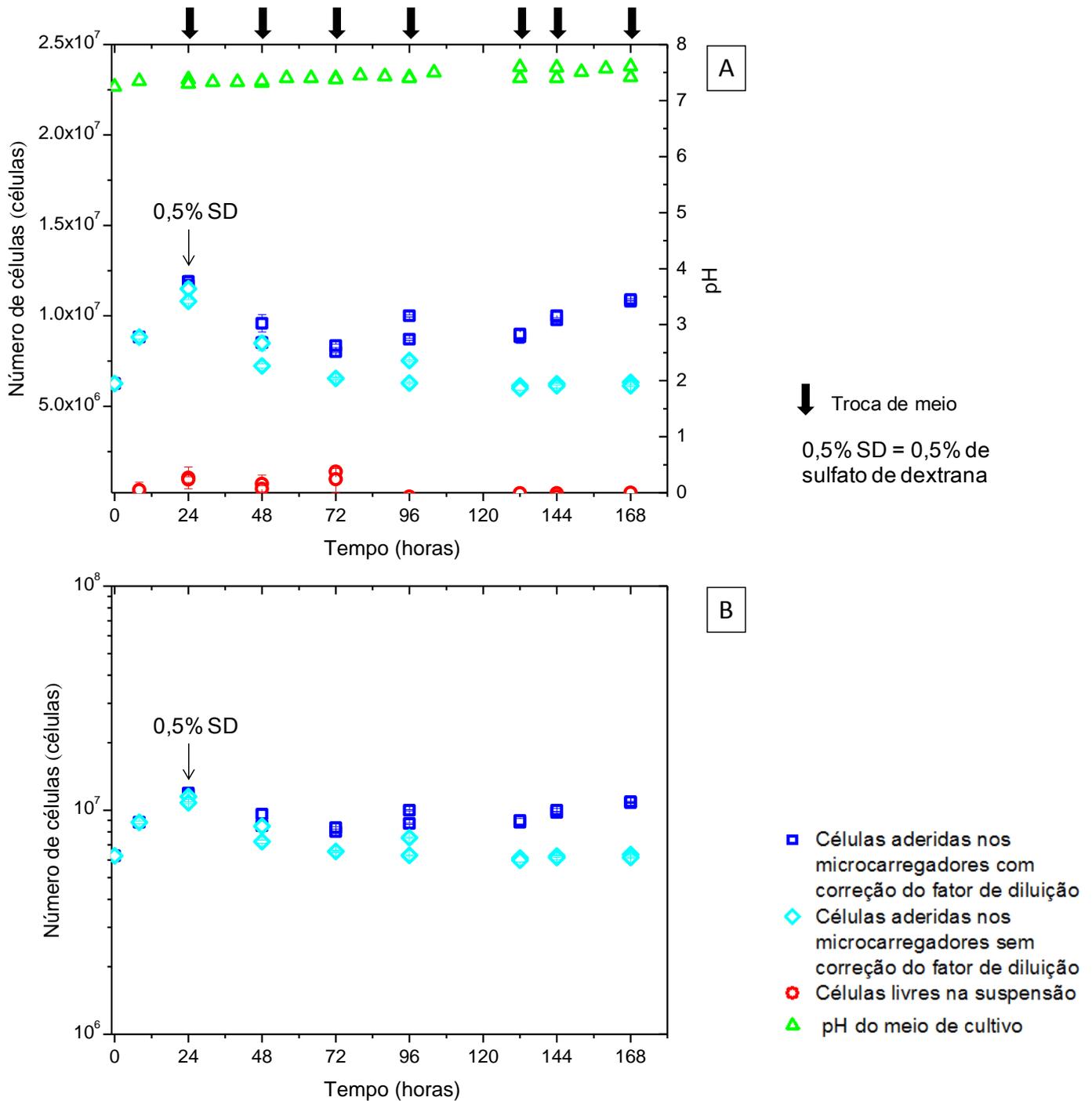
(Acervo pessoal)

5.6 Experimento 6

No experimento 6 (E6) também foram mantidas as mesmas condições do cultivo E4, porém com a adição de 0,5% de sulfato de dextrana ao meio de cultura após 24 horas. Os resultados obtidos no E5 evidenciaram que 1% de sulfato de dextrana não permitiu a expansão celular após 24 h. Assim, em E6 a concentração dessa substância foi reduzida com o objetivo de evitar os aglomerados de microcarregadores mantendo-se as células aderidas e vivas.

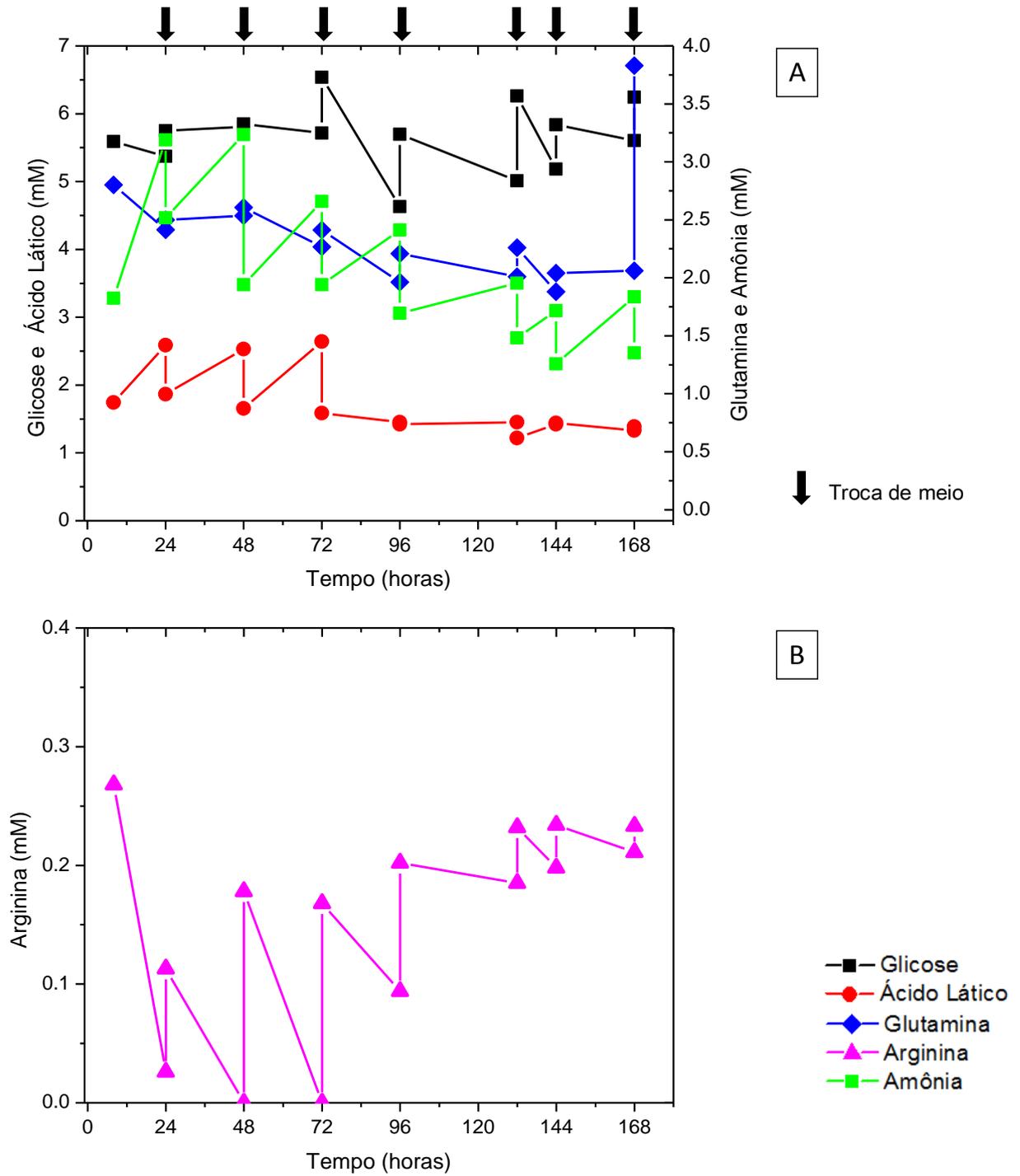
A seguir estão apresentados os resultados obtidos no E6 (Figuras 42, 43, 44, 45, 46).

Figura 42 - Resultados obtidos no experimento 6 com a linhagem hMSC-TERT cultivada em 1 spinner com 3 g/L de microcarregadores Cultispher-S. Em (A) e (B) estão representados os valores do número de células na suspensão e nos microcarregadores Cultispher-S, bem como os valores de pH do meio de cultivo. Em (A) os valores da ordenada estão em escala linear e em (B) estão em escala log 10. Após 24 h adicionou-se sulfato de dextrana (0,5%).



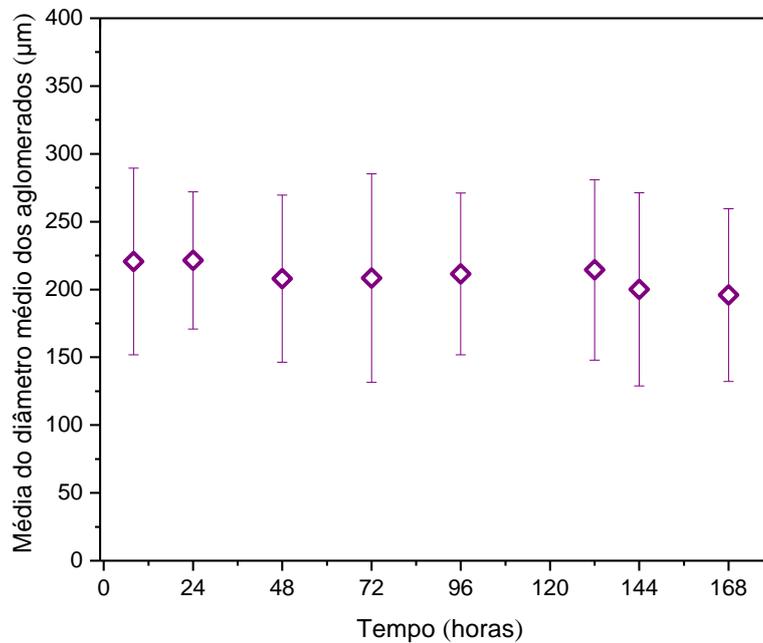
(Acervo pessoal)

Figura 43 - Resultados das concentrações de nutrientes (glutamina, arginina e glicose) e metabólitos (ácido láctico e amônia) obtidos no experimento 6.



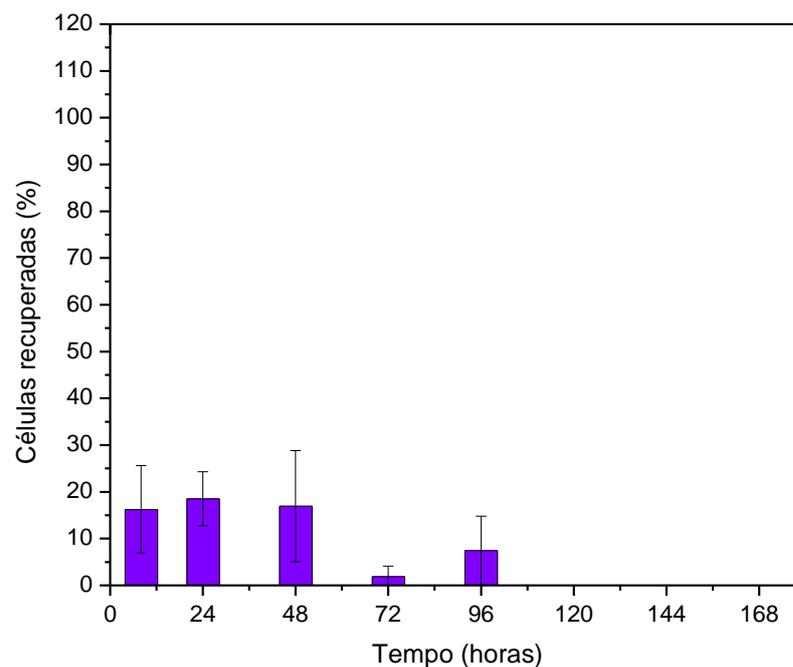
(Acervo pessoal)

Figura 44 - Resultados das médias aritmética dos diâmetros médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S obtidos durante o experimento 6.



(Acervo pessoal)

Figura 45 - Resultados das células recuperadas durante o cultivo referentes ao experimento 6. Os valores representam a porcentagem de células viáveis que foram desaderidas dos microcarregadores Cultispher-S por meio da enzima Tryple 10X.



(Acervo pessoal)

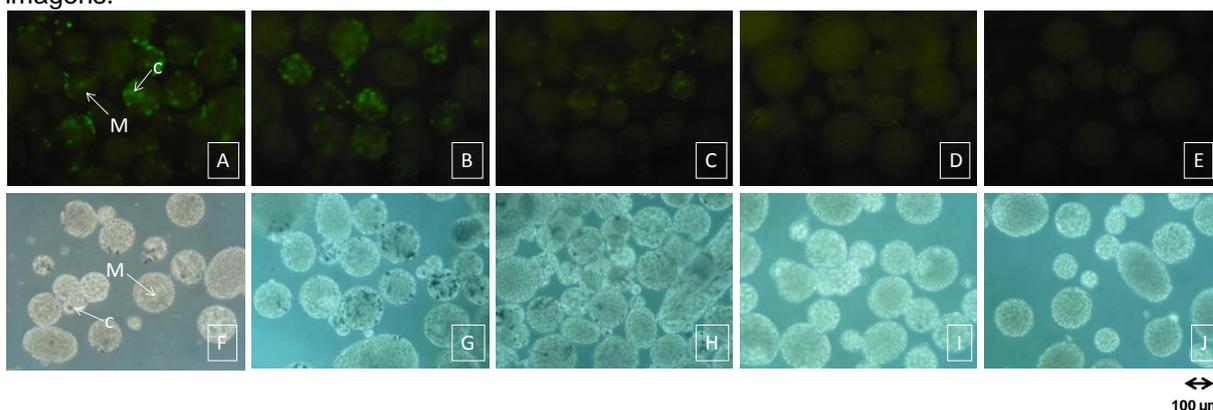
Os resultados obtidos no E6 permitem que as colocações discutidas em E5 também sejam aplicadas a ele levando-se em conta apenas algumas considerações expostas a seguir.

A Figura 42 mostra que após o aumento dos valores de células quantificadas pelo método do MTT até 24 h e sua diminuição após a adição de sulfato de dextrana (0,5%), houve um pequeno aumento novamente no final do cultivo que não ocorreu de forma mais efetiva em E5. Isso pode indicar que a concentração de sulfato de dextrana utilizada em E6 ainda foi alta, porém mostra que sua diminuição fez com que os dados obtidos estivessem mais próximos daqueles encontrados no experimento em placa de poços. Esse experimento atingiu um número máximo de células de $1,19 \times 10^7$ (com correção do FD) e $1,15 \times 10^7$ (sem correção do FD). Os fatores de expansão foram de 1,9 vezes e 1,8 vezes (com e sem a correção, respectivamente).

Na Figura 42 os valores da suspensão mantiveram-se baixos e o pH esteve constante dentro da faixa ótima até as 72 h e após esse tempo passou a atingir valores mais altos (a partir de 7,4). Não ocorreu esgotamento de glicose e de glutamina, porém os valores da arginina zeraram completamente em 48 e 72 h (Figuras 43A e 43B). Como nesse espaço de tempo houve declínio no número de células aderidas, pode ter ocorrido algum erro na preparação da amostra para a análise de aminoácidos, de forma que esses resultados deixaram de ser confiáveis. A mesma explicação pode ser dada às concentrações de amônia (acima de 3mM) em 24h e 48 h e à de glutamina em 168 h.

O máximo de células recuperadas foi de 18,55% em 24 h (Figura 45). A seguir as imagens mostram o declínio do número de células no E6.

Figura 46 - Imagens de microscopia ótica dos microcarregadores Cultispher-S com células no decorrer do experimento 6. O tempo de cultivo em (A) e (F) foi de 8 h, em (B) e (G) de 24 h, em (C) e (H) de 48 h, em (D) e (I) de 72 h e em (E) e (J) de 168 h. Nas imagens de (A) à (E), as células ativas (c), que expressam GFP, podem ser evidenciadas por meio de pontos verdes. Nas imagens de (F) à (J) as células viáveis (c) consistem nos pontos escuros que resultam da aplicação do método do MTT. Os microcarregadores estão representados por (M). A magnificação foi de 100x para todas as imagens.



(Acervo pessoal)

5.7 Análise geral dos experimentos realizados

Constatou-se nesse estudo que além da troca de meio proporcionar disponibilidade de nutrientes essenciais para o crescimento celular, ela é indispensável para a manutenção do pH do meio de cultura na faixa tolerável pelas hMSC-TERT.

De forma geral, os nutrientes mais consumidos durante os cultivos foram a glicose, a glutamina e a arginina. Os demais aminoácidos também foram quantificados (apêndice B), porém não constaram como resultados. Os metabólitos monitorados foram o ácido lático e a amônia.

O primeiro e o segundo controles realizados nesse estudo (E1 e E4) apresentaram diferenças importantes nos resultados. Provavelmente isso ocorreu devido ao tempo de congelamento entre as células utilizadas ter sido diferente e, portanto, por estarem em estados fisiológicos distintos.

Sanches (2010) já havia realizado um experimento como os controles apresentados nesse trabalho (E1 e E4), porém obteve um fator de crescimento baixo

(de 2,4 vezes). Como praticamente a única diferença daquele para estes (E1 e E4) foi a mudança de concentração de Cultispher-S de 2g/L para 3g/L, esse aumento pode ter sido o responsável pela obtenção de fatores de expansão maiores em E1 e E4.

A observação da recuperação celular nos experimentos em que as taxas de crescimento celular foram maiores que as de morte (E1, E2 e E4) evidencia que as percentagens de recuperação foram menores nas primeiras horas de cultivo, aumentaram até aproximadamente de 5,5 a 8 dias, e depois desse período voltaram a diminuir (Figuras 22, 28 e 38). Isso pode explicado, possivelmente, pelo fato de que a Tryple 10X causa a diminuição da viabilidade celular quanto maior o tempo de contato com as células. Assim, nas horas iniciais do cultivo, quando as células encontravam-se mais na superfície dos microcarregadores, elas interagiram mais rapidamente com a Tryple 10X de forma que, até a dissolução completa dos microcarregadores, elas morreram por *anoikis*. Entre 5,5 e 8 dias aproximadamente, apesar de ter ocorrido o mesmo que nos primeiros dias com as células que estavam na superfície dos microcarregadores, havia ainda muitas células viáveis no interior dos microcarregadores e dos pequenos aglomerados de microcarregadores, por isso as taxas de recuperação foram maiores nesse período. Já após 8 dias aproximadamente, quando os aglomerados de microcarregadores ficaram muito maiores, foi preciso um tempo maior (de mais 10 minutos aproximadamente) para a completa dissolução dos mesmos e isso levou à morte, por ação da Tryple 10X, daquelas células que se encontravam tanto na superfície quanto na região intermediária, enquanto aquelas que se encontravam mais internamente já haviam morrido provavelmente por falta de nutrientes e/ou oxigênio. No entanto, são necessários ainda mais estudos dirigidos especificamente para investigar melhor a razão dessa grande oscilação na recuperação celular.

A Tabela 12 mostra a comparação dos trabalhos encontrados na literatura que realizaram cultivos de CMMs com microcarregadores com os resultados obtidos em alguns experimentos deste estudo.

Tabela 12 – Comparação dos cultivos encontrados na literatura de CMMs com microcarregadores com os resultados obtidos em alguns experimentos desse estudo (adaptada de CARUSO,2012; MIZUKAMI, 2011).

	Microcarregador	Tipo de célula Origem	Duração do experimento (dias)	Concentração celular inicial	Concentração celular final	Fator de expansão (vezes)
FRAUENSCHUH et al., 2007	Cytodex-1	CMMs Medula óssea Suína	28	$1,0 \times 10^5$ células/mL	$3,6 \times 10^5$ células/mL	3,6
YANG; ROSSI; PUTNINS, 2007	Cultispher-S	CMMs Medula óssea Ratos	35	$1,5 \times 10^7$ células	$1,24 \times 10^8$ células	8,3
SCHOP et al., 2008	Cytodex-1	CMMs Medula óssea Cabra	15	4×10^4 células/mL	$1,2 \times 10^5$ células/mL	3,0
SART; SCHNEIDER; AGATHOS, 2009	Cytodex-3	CMMs Orelha Rato	6	4×10^4 células/mL	$4,5 \times 10^5$ células/mL	11,2
EIBES et al., 2010	Cultispher – S	CMMs Medula Óssea Humana	8	5×10^4 células/mL	$4,2 \times 10^5$ células/mL	8,4
SANCHES, 2010	Cultispher-S	Linhagem de CMMs Medula óssea Humana	15	$1,25 \times 10^5$ células/mL	$1,212 \times 10^6$ células/mL	9,7
SUN et al., 2010	Cultispher-G	CMMs Medula óssea Humana	6	$1,0 \times 10^5$ células/mL	$2,69 \times 10^5$ células/mL	2,8
BOO et al., 2011	Cytodex-1	CMMs Medula óssea Coelho	14	$1,21 \times 10^5$ células/mL	$6,24 \times 10^5$ células/mL	5,2
HEWITT et al., 2011	Cytodex-3	CMMs Placenta Humana	13	5 células/ microcarregador	101 células/ microcarregador	20,0

MIZUKAMI, 2011	Pronectin - F	Linhagem de CMMs Medula óssea Humana	8	$6,25 \times 10^6$ células	7×10^7 células	11,2
CARUSO, 2012	Cytodex-3	CMMs Medula óssea e veia do cordão umbilical Humana	7	$1,25 \times 10^5$ células/mL	$4,9 \times 10^5$ células/mL	3,9
Experimento 1	Cultispher – S	Linhagem de CMMs Medula óssea Humana	9	$1,25 \times 10^5$ células/mL	$2,12 \times 10^6$ $1,46 \times 10^{6*}$ células/mL	16,9 11,7*
Experimento 2	Cultispher – S + MA	Linhagem de CMMs Medula óssea Humana	17	$1,25 \times 10^5$ células/mL	$6,3 \times 10^6$ $1,63 \times 10^{6*}$ células/mL	50,4 13,0*
Experimento 4	Cultispher – S	Linhagem de CMMs Medula óssea Humana	14	$1,25 \times 10^5$ células/mL	$2,72 \times 10^6$ $1,27 \times 10^{6*}$ células/mL	21,7 10,2*

*Valores sem a correção do fator de diluição

MA= microesferas de alginato (50% da concentração de Cultispher-S)

A comparação dos dados apresentados na tabela acima permitiu verificar que o fator de expansão alcançado no E2 com a correção do fator de diluição foi o maior obtido entre os encontrados na literatura até o momento da conclusão deste estudo.

A produção obtida em E2, de $3,15 \times 10^8$ células ($6,3 \times 10^6$ células/mL), seria suficiente para tratar um paciente com aproximadamente 160 kg ou dois pacientes de aproximadamente 80kg na dose de 2×10^6 células/kg. Para a expansão da mesma quantidade de células na forma tradicional seriam necessárias 63 garrafas de 75 cm², que acarretaria elevado risco de contaminação durante as manipulações, necessidade de uma quantidade maior de trabalhadores qualificados, utilização de várias incubadoras e um custo total (considerando-se apenas o material utilizado no cultivo) aproximadamente 6 vezes maior do que em um cultivo nas condições de E2.

Como o sistema utilizado neste estudo permite o escalonamento, se fosse utilizado um biorreator de 1L, seria possível produzir $6,3 \times 10^9$ células e atender a 39 pacientes de 80 kg na dose de 2×10^6 células/kg. Já para atingir esse

número de células no cultivo tradicional, seriam necessárias 1260 garrafas de 75 cm². Caruso (2012) também fez a estimativa para produção em um biorreator de 1L e concluiu que, com o sistema utilizado em seu trabalho, seria possível produzir aproximadamente 5×10^8 células, e portanto, tratar mais de 3 pacientes de até 80 kg na dose mencionada e com a metade do custo total de expansão necessário para atingir esse mesmo número de células em cultivos tradicionais.

Apesar dos resultados apresentados em E2 serem promissores para aplicações em terapia celular, é importante lembrar a necessidade do desenvolvimento de técnicas de recuperação celular mais eficazes a fim de evitar a perda de grandes quantidades dessas células produzidas.

6 CONCLUSÕES

Este estudo permitiu as seguintes conclusões:

- 1) Foi possível desenvolver uma metodologia de cultivo de células mesenquimais estromais multipotentes em frasco spinner com microcarregadores Cultispher S. A análise de citometria de fluxo comprovou a conservação das características fenotípicas das hMSC-TERTs após o cultivo.
- 2) Foi possível avaliar a influência das microesferas de alginato no cultivo de CMMs em duas concentrações: 100% e 50% do número de partículas Cultispher-S em microesferas de alginato. A primeira concentração foi ineficaz para cultivos com CMMs, pois inibiu o crescimento celular. A segunda permitiu a obtenção do maior fator de crescimento encontrado até o momento da conclusão deste estudo quando comparado aos dados da literatura de pesquisas realizadas para a expansão de CMMs em spinner com microcarregadores.
- 3) Os cultivos realizados com 1% e 0,5% de sulfato de dextrana demonstraram que ele foi ineficiente nessas concentrações para a expansão de hMSC-TERT.
- 4) Os aglomerados de microcarregadores ocorreram em todos os cultivos que apresentaram taxa de crescimento celular maior que a de morte ao longo do tempo. Porém foi possível postergar sua formação, e com isso obter melhores resultados em termos de números de células, utilizando-se a concentração de 50% de microesferas de alginato (em relação ao número de partículas de Cultispher-S).

- 5) A técnica utilizada para a recuperação celular (com tryple 10X) ainda foi ineficiente, pois a percentagem de recuperação celular oscilou muito ao longo dos experimentos realizados.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados apresentados e da experiência adquirida ao longo desse estudo, algumas sugestões foram propostas para trabalhos futuros que intencionem continuar explorando a expansão de CMMs no sistema de cultivo apresentado (em spinner com microcarregadores Cultispher-S). São elas:

- 1) Acrescentar arginina ao meio de cultivo.
- 2) Aumentar a concentração de microcarregadores Cultispher-S.
- 3) Diminuir a concentração de microesferas de alginato e/ou adicioná-las pouco antes de começar a formação mais efetiva dos aglomerados.
- 4) Diminuir a concentração de sulfato de dextrana e testar adicioná-lo pouco antes de começar a formação mais efetiva dos aglomerados.
- 5) Adicionar outras substâncias (dextranas ou não) que possam evitar a formação dos agregados.
- 6) Repetir a técnica apresentada em E2 (com adição de 50% de microesferas de alginato) com replicatas a fim de obter uma confiabilidade estatística maior com relação aos resultados.
- 7) Aplicar a técnica apresentada em E2 (com adição de 50% de microesferas de alginato) para a expansão de CMMs primárias.
- 8) Buscar técnicas de recuperação celular mais eficazes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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.

AHRENS, N.; TORMIN, A.; PAULUS, M.; ROOSTERMAN, D.; SALAMA, A.; KRENN, V. et al. Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. **Transplantation**, v. 78, n. 6, p. 925-929, 2004.

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

ALMEIDA-PORADA, G.; EL SHABRAWY D.; PORADA, C.; ZANJANI, E. D. Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. **Exp.Hematol.**, v. 30, p. 1454-1462, 2002.

ALSALAMEH, S.; AMIN, R.; GEMBA, T.; LOTZ, M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. **Arthritis Rheum.**, v. 50, p. 1522-1532, 2004.

ALSOP, R. M. 1983. Industrial production of dextrans. Progress in Industrial Microbiology, New York, v.18, p. 1-44, 1983.

ALTAMIRANO, C.; GÒDIA, F.; CAIRÓ, J. J. Metabolismo de células de mamíferos cultivada *in vitro*. In: MORAES, A. M.; MENDONÇA, R. Z.; SUAZO, C. A. T. Meios de cultura para Células-Animais. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. São Paulo: Editora Roca, 2007.

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

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

AQUINO, D. Produção de dextrana por novas linhagens de bactérias isoladas da cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **Journal of cellular and molecular medicine**, v.8, p. 301-316, 2004. Review.

BANFI, A.; MURAGLIA, A.; DOZIN, B.; MASTROGIACOMO, M.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. **Experimental Hematology**, v. 28, p. 707-715, 2000.

BARABINO, G. A.; LIU, X. D.; EWENSTEIN, B. M.; KAUL, D. K. Anionic polysaccharides inhibit adhesion of sickle erythrocytes to He vascular endothelium and result in improved hemodynamic behavior. *Blood*, v. 93, n.4, p.1422-1429, 1999.

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

BARTOSH, T.J.; YLOSTALO, J.H.; MOHAMMADIPOOR, A.; BAZHANOV, N.; COBLE, K.; CLAYPOOL, K.; LEE, R.H.; CHOI, H.; PROCKOP, D.J. Aggregation on human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. **PNAS**, v.107, p.13724-13729, 2010.

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.

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

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

BRASIL. **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: 21/12/2010.

BREGNI, C.; DEGROSSI, J.; GARCÍA, R.; LAMAS, M. C.; FIRENSTEIN, R. Alginate microspheres of *Bacillus subtilis*. **Ars Pharmaceutica**, Espanha, v. 41, nº 3, 2000. Riview.

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

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.

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

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

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

CAPLAN, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **Journal of Cellular Physiology**, v.213, p.341-347, 2007.

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

CARUSO, S. R. Desenvolvimento de um bioprocesso para expansão de células mesenquimais estromais multipotentes em microcarregados. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2012.

CHEN, S.; FANG, W.; YE, F.; LIU, Y.; QIAN, J.; SHAN, S.; ZHANG, J.; CHUNHUA, R.Z.; LIAO, L.; LIN, S.; SUN, J. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. **American Journal of Cardiology**, v. 94, p.92-95, 2004.

CHEN, X.; XU, H.; WAN, C.; MCCAIGUE, M.; LI, G. Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, p.2052-2060, 2009.

CHICO, E.; RODRIGUEZ, G.; FIGUEREDO, A.; Biorreatores para Células Animais. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R.; **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. São Paulo, Editora Roca, p. 216-254, 2007.

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

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.

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

COVAS, D. T.; SIUFI, J. L.; SILVA, A. R.; ORELLANA, M. D. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v. 36, p. 1179-1183, 2003.

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

COVAS, D.T., PANEPUCCI, R.A., FONTES, A.M., SILVA, W.A. JR., ORELLANA, M.D., FREITAS, M.C. *ET AL.* Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146(+) perivascular cells and fibroblasts. **Exp. Hematol.**, v. 36, p. 642-654, 2008.

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

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.

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

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

DE BARI, C.; DELL'ACCIO, F.; TYLZANOWSKI, P.; LUYTEN, F. P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis Rheum.**, v. 44, n. 8, p. 1928-1942, 2001.

DEE, K.U.; SHULER, M. L.; WOOD, H. A. Inducing single-cell suspension of BTITN5B1-4 insect cells: I. the use of sulfated polyanions to prevent cell aggregation and enhance recombinant protein production. **Biotechnology and Bioengineering**, v.54, n. 3, p. 191- 205, 1997.

DE LIMA PRATA, K. Análise comparativa das células mesenquimais obtidas de diferentes tecidos dos anexos fetais, 2011. Tese apresentada à faculdade de medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, departamento de Clínica Médica, Ribeirão Preto, 2011.

DENNIS, J.E.; ESTERLY, K.; AWADALLAH, A.; PARRISH, C. R.; POYNTER, G. M.; GOLTRY, K. L. Clinical-scale expansion of a mixed population of bone marrow-derived stem and progenitor cells for potential use in bone tissue regeneration. **Stem cells**, v. 29, p. 2575-2583, 2009.

DIWAN, M.; TAFAGHODI, M.; SAMUEL, J. Enhancement of immune responses by co-delivery of a CpG oligodeoxynucleotide and tetanus toxoid in biodegradable nanospheres. **J Control Release**, v. 85, p. 247-262, 2002.

DOMINICI, M.; LE, B. K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D. ET AL. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315-317, 2006.

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

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

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

EIBES, G.; 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.

FEHRER, C.; LEPPERDINGER, G. Mesenchymal stem cell aging. **Exp. Gerontol.**, 2005.

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.

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

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

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet.**, v. 3, p. 393-403, 1976.

FRISCH, S. M.; FRANCIS, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 124, p. 619-26, 1994.

FRITH, J.E.; THOMSON, B.; GENEVER, P. G. Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potencial. **Tissue Engineering**, v. 16,p. 735-749, 2010.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, Washington (USA), v. 287, p. 1433-1438, 2000.

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

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.

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

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

HERNALSTEENSS, S. Obtenção de dextrana clínica, oligossacarídeos e frutose por via enzimática. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

HEWITT, C.J.; LEE, K.; NIENOW, A.W.; THOMAS, R.J.; SMITH, M.; THOMAS, C.R. Expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers. **Biotechnol Lett**, 2011.

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

IGURA, K.; ZHANG, X.; TAKAHASHI, K.; MITSURU, A.; YAMAGUCHI, S.; TAKASHI, T. A. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. **Cytotherapy.**, v. 6, p. 543-553, 2004.

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

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

KEDONG, S.; XIUBO, F.; TIANQING, L.; MACEDO, H.M.; LILI, J.; MEIYUN, F.; FANGXIN, S.; XUEHU, M.; ZHANFENG, C. Simultaneous expansion and harvest of hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cell derived from umbilical cord blood. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.21, p. 3183-3193, 2010.

KHANDAI, M.; CHAKRABORTY, S.; NAYAK, P.; KRISHNA, N. B. M.; CHAKRAVARTHI, G.; ACHARJYA, B.; GHOSH, A.K. Preparation and in vitro in vivo evaluation of aceclofenac loaded alginate microspheres: An investigation of effects of polymer using multiple comparison analysis. **Current drug delivery**, n.5, v. 9, p. 495-505, 2012.

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.

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

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

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

LEBLANC, K.; RASMUSSEN, I.; SUNDBERG, B.; GOTHERSTROM, C.; HASSAN, M.; UZUNEL, M. et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. **Lancet**, v. 363, n. 9419, p. 1439-1441, 2004.

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

LEE, M. W.; CHOI, J.; YANG, M. S.; MOON, Y. J.; PARK, J. S.; KIM, H. C. et al. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. **Biochem.Biophys.Res.Commun.**, v. 320, n. 1, p. 273-278, 2004a.

LEE, O. K.; KUO, T. K.; CHEN, W. M.; LEE, K. D.; HSIEH, S. L.; CHEN, T. H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Blood**, v. 103, n. 5, p. 1669-1675, 2004b.

LÉO, P.; GALESÍ, 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, 2007.

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

MALDA, J.; FRONDOZA, C.G. Microcarriers in the engineering of cartilage and bone. **Trends Biotechnology**, v.24, n. 7, p.299-304, 2006.

MAN, Y.; WANG, P.; GUO, Y.; XIANG, L.; YANG, Y.; QU, Y.; GONG, P.; DENG, L. Angiogenic and osteogenic potential of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cell laden alginate microspheres. **Biomaterials**, v.33, p.8802-8811, 2012.

MAROLT, D.; AUGST.; FREED, L.E.; VEPARI, C.; FAJARDO, R.; PATEL, N.; GRAY, M.; FARLEY, M.; KAPLAN, D.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors. **Biomaterials**, v. 27, p.6138-6149, 2006.

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

MAUNEY, J. R.; VOLLOCH, V.; KAPLAN, D. L. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue-engineering applications: current status and future prospects. **Tissue engineering**, USA, v. 11, p. 787-802, 2005.

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.

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.

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.

MIZUKAMI, A. Expansão *in vitro* de células-tronco mesenquimais cultivadas em biorreator de fibra oca. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2011.

MONCHOIS, V.; WILLWEMOT, R.; MONSAN, P. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. **FEMS Microbiology**, v. 23, p. 131-151, 1999. Review.

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.

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

MOSCARDINI, M. S.; TIERA, M. J.; OLIVEIRA-TIERA, V. A. Síntese e estudo fotofísicos em solução de dextrana modificada hidrofóticamente.; Livro de Resumos da 23ª Reunião Anual da SBQ, 2000.

MOSHAVERINIA, A.; CHEN, C.; AKIYAMA, K.; ANSARI, S.; XU, X.; CHEE, W.W.; SCHRICKER, S.R. SHI, S.T. Alginate hydrogel as a promising scaffold for dental-derived stem cells: an in vitro study. **Journal of materials science-materials in medicine**, n.12, v.23, p.3041-3051, 2012.

MOTA, A. C. A.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Uso de terapia regenerativa com células-tronco d medula óssea em doenças cardiovasculares: perspectiva do hematologista. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.2, p. 126-132, 2005.

NAUTA, A.J.; FIBBE, W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v. 110, p. 3499-3506, 2007.

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

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.

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

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

PITTINGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S. C; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143-147, 2011.

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

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

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

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

ROBEY, P. G. Stem cells near the century mark. **Journal of Clinical Investigation**. Thorofare, v. 105, p. 1489-1491, 2000.

RODRIGUES, F.; FONSECA, D. Células-tronco. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2004.

RODRIGUES, C. A. V.; FERNANDES, T. G.; DIOGO, M. M.; SILVA, C. L.; CABRAL, J. M. S. Stem cell cultivation in bioreactors. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 815-829, 2011.

ROSENSTRAUER, D.; Paglayan, G.; Zidar, N.; Gregoric, I. Stem cell therapy for ischemic heart failure. **Texas Heart Institute Journal**, v. 32, p. 339, 2005.

SABATINI, F.; PETECCHIA, L.; TAVIAN, M.; JODON de VILLEROUCHE, V.; ROSSI, G. A.; BROUTY-BOYE, D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Lab Invest**, v. 85, p. 962-971, 2005.

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

SANTOS, F.D.; ANDRADE, P. Z.; BOURA, J.S.; ABECASIS, M. M.; SILVA, S.L.D.; CABRAL, J. M. S. *Ex vivo* expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. **Journal of Cellular Physiology**, v.223, p.27-35, 2010.

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

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

SCHOP, D; DIJKHUIZEN-RADERSMA R. V.; BORGART, E.; JANSSEN, F. W. Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: growth and metabolism. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, Holanda, 2009.

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

SEEBACH, C.; HENRICH, D.; TEWKSBURY, R.; WILHELM, K.; MARZI, I. Number of proliferative capacity of human mesenchymal stem cells are modulated positively in multiple trauma patients and negatively in atrophic nonunions. **Calcified Tissue Internacional**, v. 80, p. 294-300, 2007.

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

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

SEO, B. M.; MIURA, M.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P. M.; BATOULI, S.; BRAHIM, J. et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, v. 364, p. 149-155, 2004.

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

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

SHI, X.; SUN, L.; JIANG, J.;ZHANG, X. ; DING, W.;GAN, Z. Biodegradable polymeric microcarriers with controllable porous structure for tissue engineering. **Journals Macromolecular Bioscience**, v.9, p.1211-1218, 2009.

SIMONSEN, J.L.; ROSADA, C.; SERAKINCI, N.; JUSTESEN, J.; STENDERUP, K.; RATTAN, S.I.S.; JENSEN, T. G.; KASSEM, M. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. **Nature Publishing Group**, v. 20, p. 592-596, 2002.

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

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

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

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

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

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

SUN, L.Y.; HSIEH, D.K.; SYU, W.S.; LI, Y.S.; CHIU, H.T.; CHIOU, T.W.; Cell proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells on biodegradable microcarriers enhances in vitro differentiation potential. **Cell Proliferation**, v. 43, p. 445-456, 2010.

TAFAGHODI, M.; ESKANDARI, M.; KHAMESIPOUR, A.; JAAFARI, M. R. Alginate microspheres encapsulated with autoclaved *Leishmania major* (ALM) and CpG-ODN induced partial protection and enhanced immune response against murine model of leishmaniasis. **Experimental parasitology**, v. 129, p. 107-14, 2011.

TAGAMI, M.; ICHINOSE, S.; YAMAGATA, K.; FUJINO, H.; SHOJI, S.; HIRAOKA, M. et al. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. **Cell Tissue Res.**, v. 312, p. 31-40, 2003.

TISATO, V.; NARESH, K.; GIRDLESTONE, J.; NAVARRETE, C.; DAZZI, F. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. **Leukemia.**, v.9, p.1992-1999, 2007.

TORELLI-SOUZA, R.R.; BASTOS, L. A. C.; NUNES, H. G. L.; CAMARA, C.A.; AMORIM R.V.S. Sustained release of an antitumoral drug from alginate-chitosan hydrogel beads and its potential use as colonic drug delivery. **Journal of applied polymer science**, v. 126, p. E408-E417, 2012.

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

WANG, Y.; KIM, U.; BLASIOLI, D. J.; KIM, H.; KAPLAN, D.L. *In vitro* cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v.6, p. 7082-7094, 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**, v. 1, p. 38-46, 2007.

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

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

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

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

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

YOUNG, H. E.; STEELE, T. A.; BRAY, R. A.; HUDSON, J.; FLOYD, J. A.; HAWKINS, K. et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **Anat.Rec.**, v. 264, p. 51-62, 2001.

YOUNG, H. E.; BLACK, A. C., Jr. Adult stem cells. **Anat.Rec.A Discov.Mol.Cell Evol.Biol.**, v. 276, p. 75-102, 2004.

YU, M.; XIAO, Z.; SHEN, L.; LI, L. Mid-trimester fetal blood-derived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full-term umbilical cord blood does not. **Br.J.Haematol.**, v. 124, n. 5, p. 666-675, 2004.

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.

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

ZHANG, Z.Y.; TEOH, S. H.; CHONG, W.S.; FOO, T. T.; CHNG, Y.C; CHOOOLANI, M.; CHAN, J.**Biomaterials**, v.30, p.2694-2704, 2009.

ZHANG, B.; YANG, M. D.; SUN, Z.; ZHANG, Y.; XIA, T.; XU, W.; YE, S. Human mesenchymal stem cells induced by growth differentiation factor 5: an improved self-assembly tissue engineering method for cartilage repair. **Tissue Engineering**, v. 17, p. 1189-1199, 2011.

ZHAO, F., CHELLA, R; MA, T. Effects of shear stress on 3-D human mesenchymal stem cell construct development in perfusion bioreactor system: experiments and hydrodynamic modeling. **Biotechnology and Bioengineering**, USA, v. 96, p. 584-595, 2006.

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

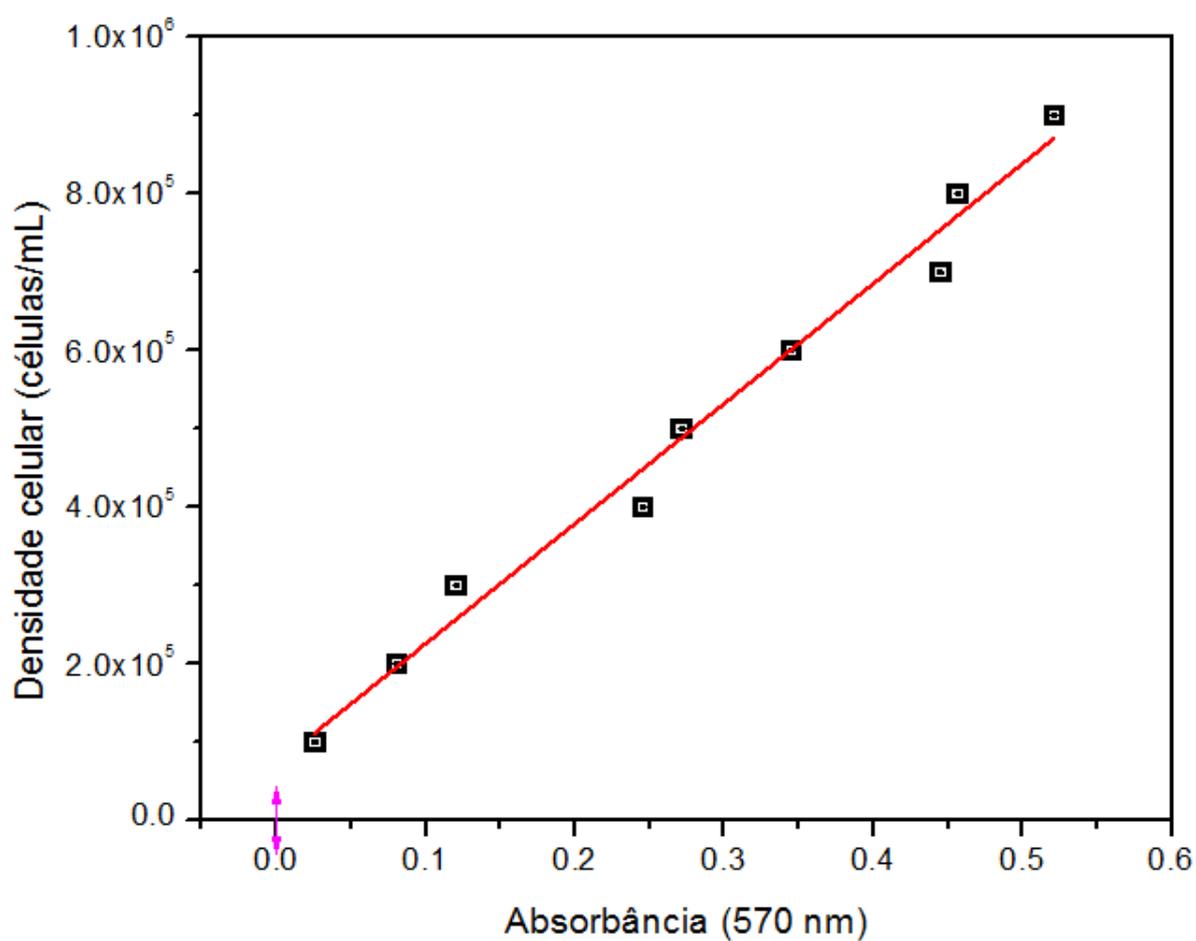
ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, v. 7, p. 211-228, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Curvas padrão referente ao método do MTT para os experimentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Experimento 1

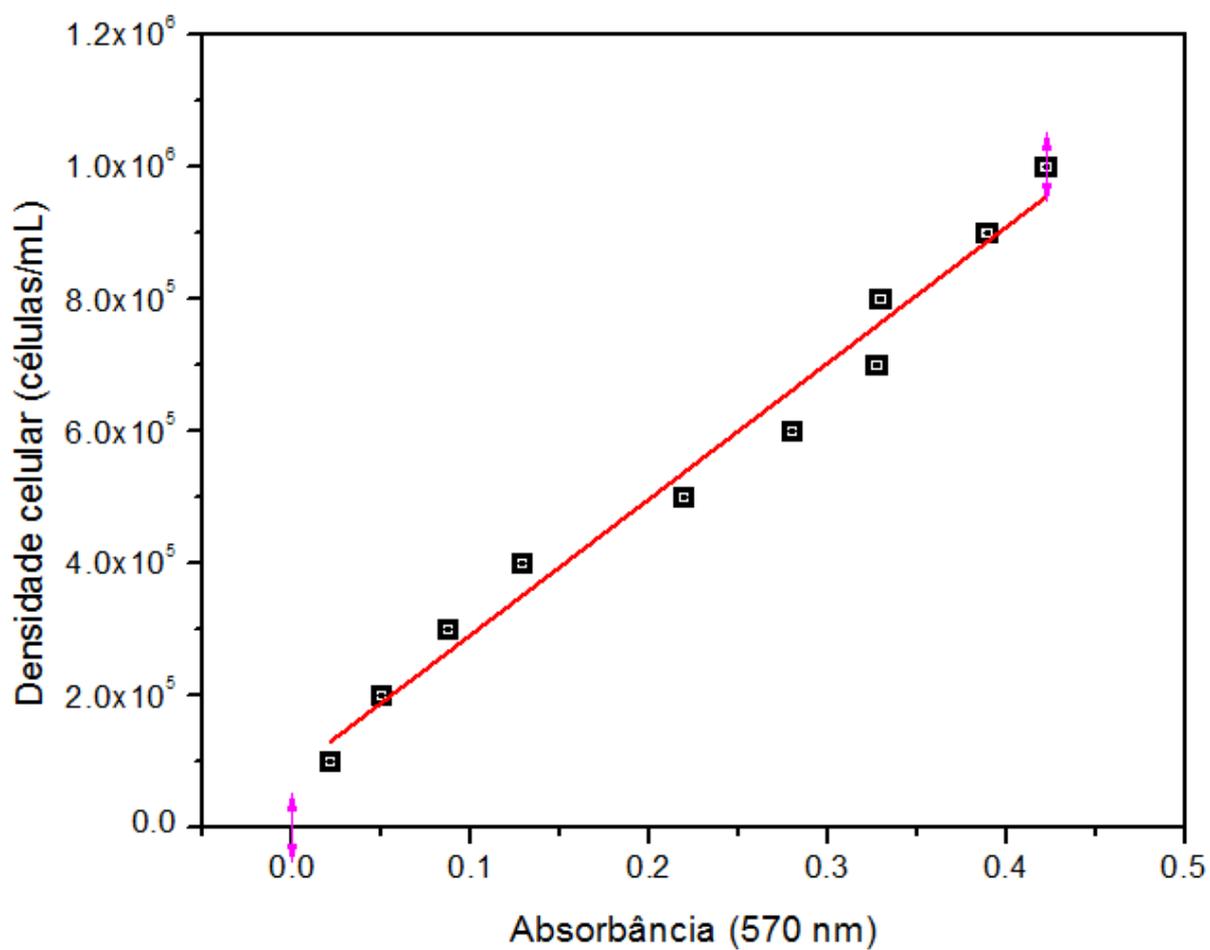
Figura A1 - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento1. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 1,532 \times 10^6$ e $b = 7,251 \times 10^4$), com coeficiente de correlação de 0,9827.



(Acervo pessoal)

Experimento 2

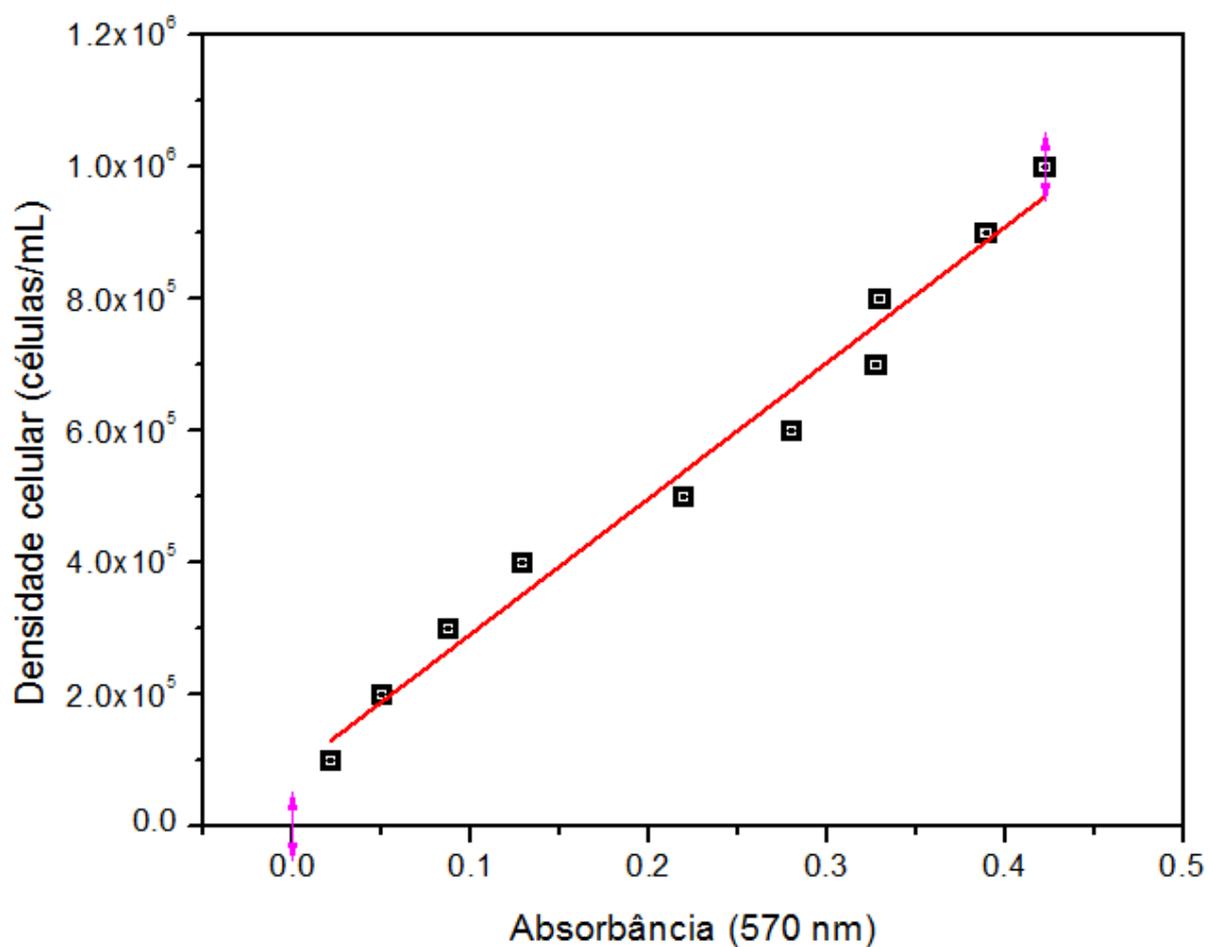
Figura A2 - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento 2. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 2,056 \times 10^6$ e $b = 8,643 \times 10^4$), com coeficiente de correlação de 0,9768.



(Acervo pessoal)

Experimento 3

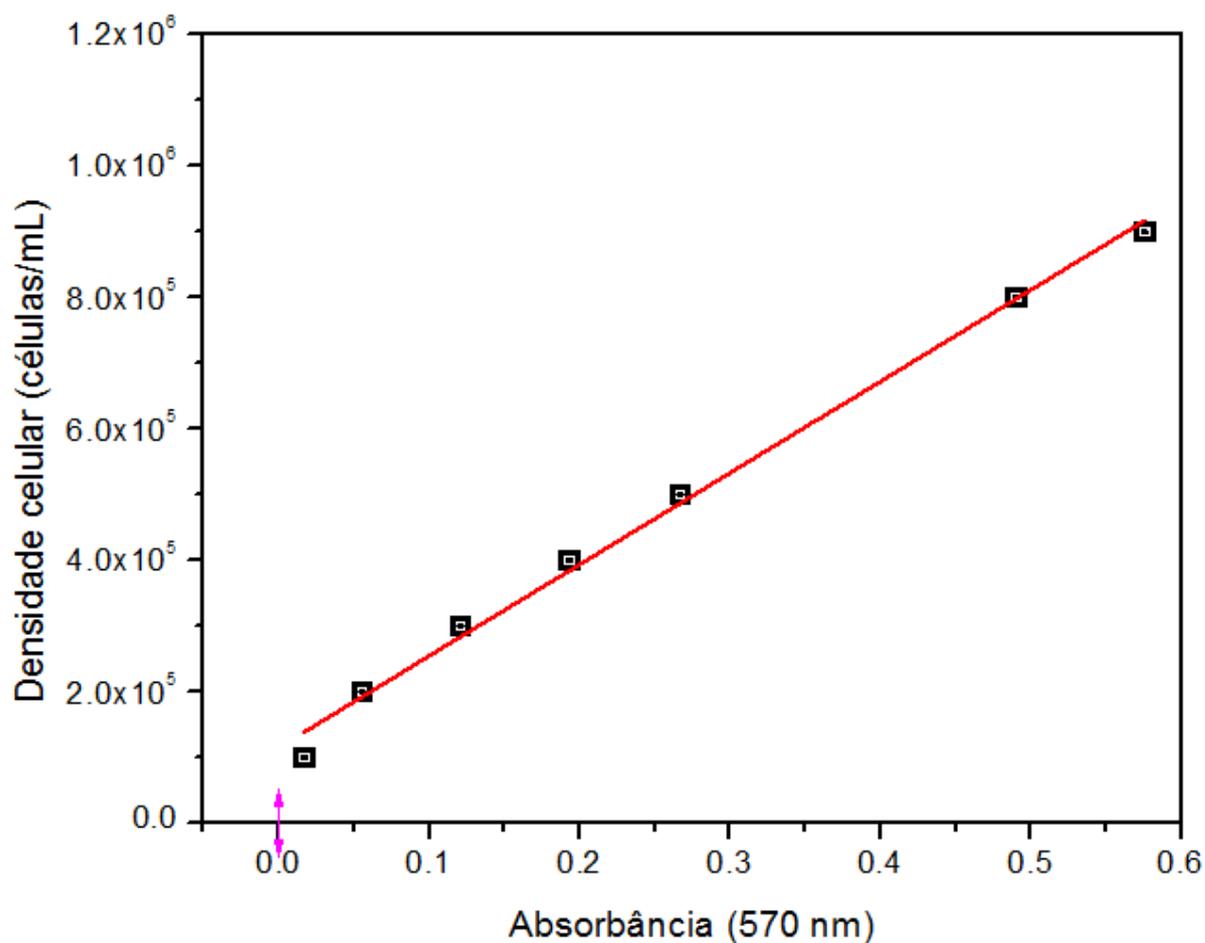
Figura A3 - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento 3. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 2,056 \times 10^6$ e $b = 8,643 \times 10^4$), com coeficiente de correlação de 0,9768.



(Acervo pessoal)

Experimento 4

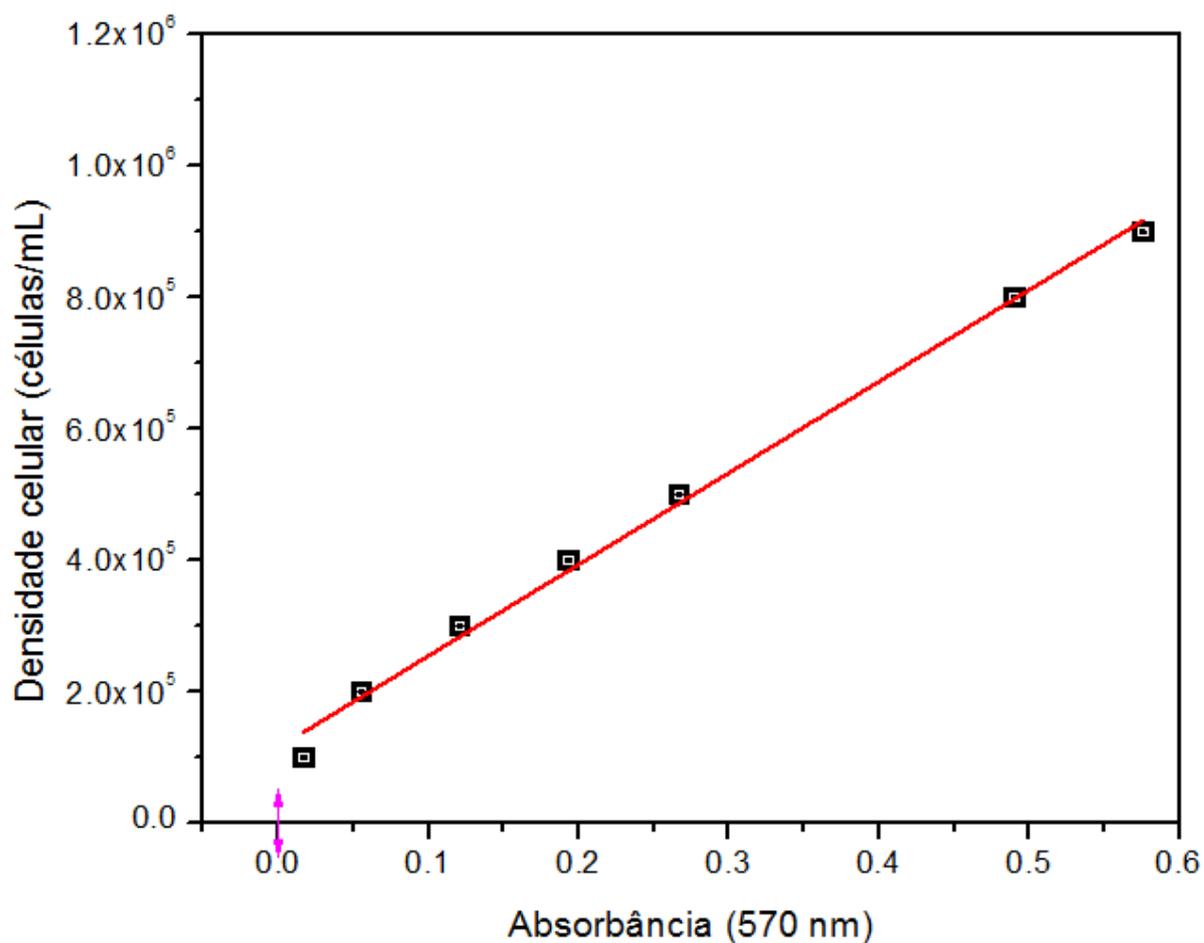
Figura A4 - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento 4. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 1,391 \times 10^6$ e $b = 1,154 \times 10^5$), com coeficiente de correlação de 0,9942.



(Acervo pessoal)

Experimento 5

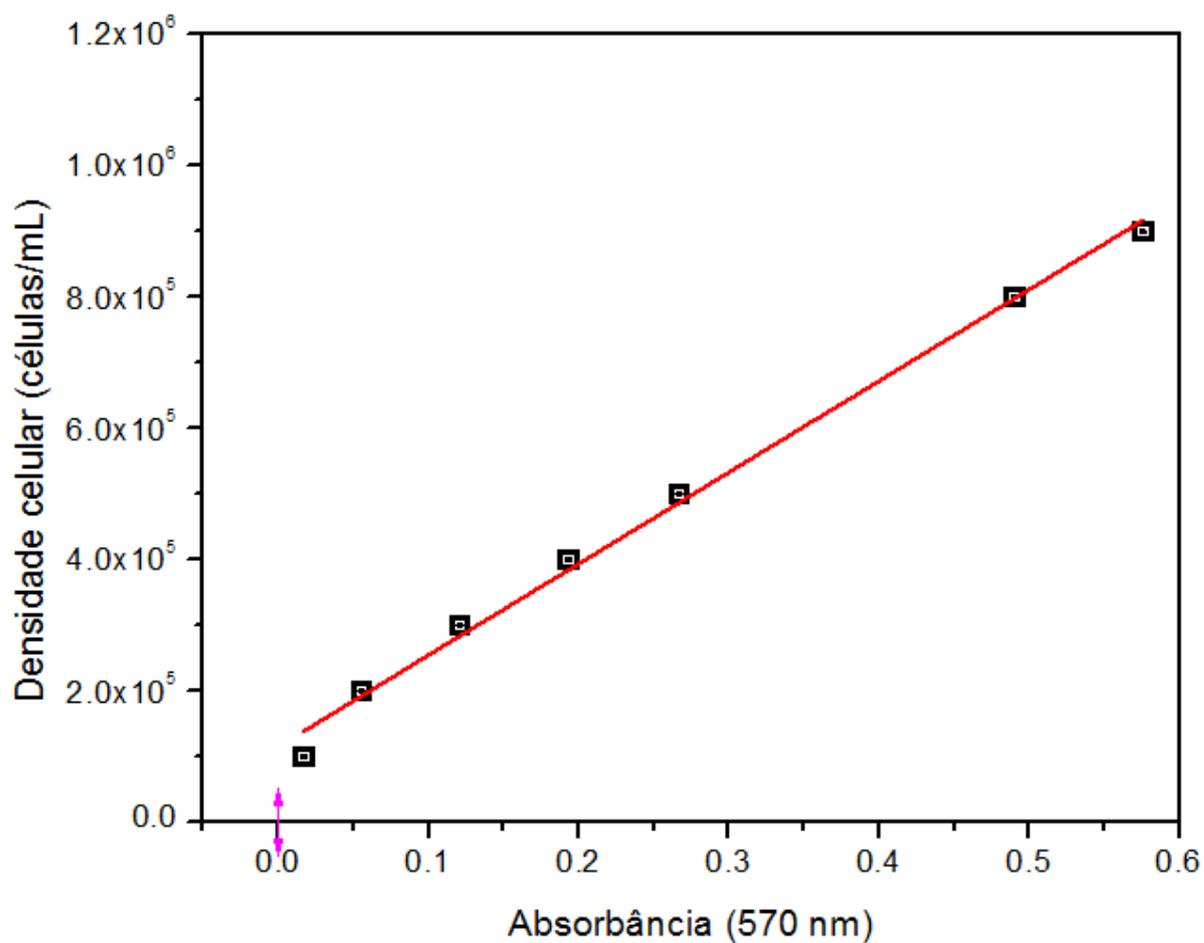
Figura A5 - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento 5. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 1,391 \times 10^6$ e $b = 1,154 \times 10^5$), com coeficiente de correlação de 0,9942.



(Acervo pessoal)

Experimento 6

Figura A6 - Curva padrão do método do MTT (kit Sigma) para o experimento 6. Equação da reta $y = ax + b$, ($a = 1,391 \times 10^6$ e $b = 1,154 \times 10^5$), com coeficiente de correlação de 0,9942



(Acervo pessoal)

APÊNDICE B - Tabelas dos valores do pH do meio de cultivo, da porcentagem de CO₂ na incubadora e da agitação; das concentrações de aminoácidos, glicose, ácido láctico e amônia; dos fatores de diluição, dos números de células aderidas nos microcarregadores e em suspensão, dos números de células recuperadas com tryple 10X, e dos diâmetros médio dos aglomerados de microcarregadores para os experimentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Experimento 1

Tabela B1 - Valores de pH, porcentagem de CO₂ na incubadora e agitação referentes ao experimento 1. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	pH	CO ₂ na incubadora (%)	Agitação rpm
0	7.35	5	Intermitente
8	7.28	5	20
10	Não foi medido	5	30
12	Não foi medido	5	40
24A	7.14	5	40
24D	7.28	5	40
32	7.22	5	40
40	7.1	5	40
48A	7	5	40
48D	7.22	0	40
56	7.26	0	40
64	7.16	0	40
72A	7.05	0	40
72D	7.35	5	40
80	7.09	0	40
88	7	0	40
96A	6.95	0	40
96D	7.34	0	40
104	7.22	0	40
132A	6.94	0	40
132D	7.34	0	40
144A	6.87	0	40
144D	7.28	0	40
152	7.28	0	40
160	7.08	0	40

168A	6.82	0	40
168D	7.32	0	40
176	7.2	0	40
184	7	0	40
192A	6.79	0	40
192D	7.33	0	40
200	7.16	0	40
208	6.99	0	40
216A	6.78	0	40
216D	7.39	0	40

Tabela B2 - Valores de aminoácidos referentes ao experimento 1. “A” representa os valores antes da troca de meio de cultura e “D” os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Ácido aspártico (mM)	Ácido glutâmico (mM)	Asparagina (mM)	Serina (mM)	Glutamina (mM)	Glicina (mM)	Histidina (mM)	Arginina (mM)	Treonina (mM)	Alanina (mM)
8	0.095	0.290	0.180	0.000	2.450	0.687	0.160	0.487	0.309	0.395
24A	0.095	0.390	0.140	0.000	1.330	0.550	0.100	0.263	0.223	0.339
24D	0.106	0.440	0.203	0.000	2.493	0.780	0.180	0.526	0.381	0.484
48A	0.111	0.580	0.173	0.000	1.887	0.672	0.150	0.232	0.326	0.521
48D	0.118	0.520	0.193	0.000	2.103	0.657	0.150	0.391	0.326	0.428
72A	0.142	0.850	0.250	0.000	2.060	0.928	0.210	0.227	0.481	0.374
72D	0.110	0.480	0.180	0.000	2.007	0.710	0.150	0.399	0.316	0.481
96A	0.138	0.770	0.157	0.000	1.623	0.657	0.140	0.118	0.262	0.656
96D	0.114	0.510	0.167	0.000	1.763	0.661	0.150	0.360	0.278	0.463
132A	0.130	0.720	0.177	0.000	1.653	0.720	0.160	0.207	0.293	0.794
132D	0.129	0.600	0.223	0.000	2.457	0.882	0.210	0.514	0.381	0.676
144A	0.151	0.800	0.190	0.000	1.747	0.781	0.170	0.277	0.315	0.757
144D	0.115	0.490	0.173	0.000	1.987	0.695	0.160	0.407	0.304	0.519
168A	0.121	0.630	0.170	0.000	1.813	0.795	0.160	0.150	0.295	0.728
168D	0.118	0.540	0.223	0.000	2.520	0.914	0.190	0.474	0.387	0.623
192A	0.148	0.830	0.207	0.000	2.277	0.929	0.180	0.065	0.386	0.790
192D	0.119	0.530	0.213	0.000	2.373	0.860	0.190	0.427	0.381	0.569
216A	0.138	0.710	0.187	0.000	2.157	0.836	0.170	0.060	0.325	0.631
216D	0.098	0.360	0.167	0.000	1.993	0.692	0.150	0.349	0.324	0.447

Tabela B3 - Valores de aminoácidos, glicose, ácido láctico e amônia referentes ao experimento 1. “A” representa os valores antes da troca de meio de cultura e “D” os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Prolina (mM)	Tirosina (mM)	Valina (mM)	Metionina (mM)	Cisteína (mM)	Isoleucina (mM)	Leucina (mM)	Fenilalanina (mM)	Lisina (mM)	Glicose (mM)	Ácido láctico (mM)	Amônia (mM)
8	0.353	0.372	0.470	0.699	0.052	0.233	0.314	0.190	0.340	6.544	1.299	0.271
24A	0.378	0.381	0.390	0.688	0.080	0.152	0.233	0.210	0.240	5.939	1.998	0.541
24D	0.426	0.438	0.540	0.707	0.085	0.289	0.378	0.230	0.410	6.461	1.465	0.353
48A	0.388	0.486	0.460	0.697	0.073	0.206	0.304	0.210	0.330	5.745	2.642	0.824
48D	0.360	0.425	0.470	0.699	0.067	0.237	0.334	0.250	0.370	6.322	1.743	0.494
72A	0.320	0.415	0.510	0.681	0.067	0.217	0.332	0.210	0.340	4.257	3.430	0.941
72D	0.380	0.421	0.480	0.699	0.082	0.232	0.298	0.200	0.380	4.951	1.743	0.471
96A	0.390	0.397	0.440	0.694	0.065	0.182	0.287	0.170	0.340	3.774	3.863	0.988
96D	0.382	0.426	0.470	0.698	0.092	0.223	0.288	0.210	0.330	5.451	2.087	0.529
132A	0.462	0.384	0.460	0.694	0.061	0.207	0.312	0.180	0.360	3.069	3.730	0.976
132D	0.491	0.430	0.560	0.711	0.109	0.312	0.410	0.260	0.460	5.157	2.020	0.506
144A	0.460	0.339	0.480	0.700	0.088	0.252	0.294	0.240	0.400	4.102	3.419	0.835
144D	0.404	0.386	0.470	0.697	0.084	0.227	0.292	0.210	0.370	5.467	1.932	0.482
168A	0.483	0.390	0.470	0.649	0.062	0.218	0.316	0.190	0.370	3.985	3.541	0.965
168D	0.506	0.429	0.560	0.716	0.116	0.328	0.417	0.210	0.440	5.440	1.932	0.471
192A	0.544	0.419	0.540	0.708	0.073	0.292	0.392	0.220	0.440	4.169	3.519	0.847
192D	0.451	0.411	0.530	0.709	0.100	0.289	0.402	0.240	0.430	5.540	1.821	0.471
216A	0.486	0.407	0.510	0.708	0.081	0.241	0.290	0.260	0.410	4.296	3.275	0.847
216D	0.386	0.389	0.470	0.699	0.059	0.227	0.294	0.200	0.360	5.417	1.710	0.459

Tabela B4 - Valores dos fatores de diluição referentes ao experimento 1. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Fator de diluição
8	
24A	0.96000
24D	0.92160
48A	0.88474
48D	0.84935
72A	0.81537
72D	0.78276
96A	0.75145
96D	0.72139
132A	0.69253
132D	0.66483
144A	0.63824
144D	0.61271
168A	0.58820
168D	0.56467
192A	0.54209
192D	0.52040
216A	0.49959
216D	0.47960

Tabela B5 - Valores do número de células aderidas nos microcarregadores referentes ao experimento 1 obtidos pelo método no MTT. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Número de células com correção do fator de diluição (células)	Devio padrão (células)	Número de células sem correção do fator de diluição (células)	Devio padrão (células)
0				
8	8.27E+06	8.85E+04	8.27E+06	8.85E+04
24A	1.04E+07	1.84E+05	1.00E+07	1.77E+05
24D	1.03E+07	1.44E+05	9.52E+06	1.33E+05
48A	2.08E+07	4.00E+05	1.84E+07	3.54E+05
48D	1.87E+07	3.25E+05	1.59E+07	2.76E+05
72A	3.16E+07	1.47E+06	2.57E+07	1.20E+06
72D	2.55E+07	3.70E+05	1.99E+07	2.90E+05
96A	3.58E+07	8.24E+05	2.69E+07	6.19E+05
96D	3.71E+07	7.07E+05	2.67E+07	5.10E+05

132A	1.06E+08	1.84E+06	7.33E+07	1.28E+06
132D	9.87E+07	1.35E+06	6.56E+07	8.98E+05
144A	5.63E+07	1.61E+06	3.59E+07	1.03E+06
144D	5.33E+07	4.51E+05	3.26E+07	2.76E+05
168A	8.87E+07	1.32E+06	5.22E+07	7.75E+05
168D	7.52E+07	2.41E+06	4.25E+07	1.36E+06
192A	8.29E+07	8.18E+06	4.50E+07	4.43E+06
192D	8.60E+07	2.29E+06	4.47E+07	1.19E+06
216A	9.75E+07	8.98E+05	4.87E+07	4.49E+05
216D	8.49E+07	2.40E+06	4.07E+07	1.15E+06

Tabela B6 - Valores do número de células em suspensão referentes ao experimento 1. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Número de células em suspensão (células)	Desvio padrão (células)
0	6.25E+06	0.00E+00
8	3.13E+05	1.25E+05
24A	4.56E+05	4.45E+05
24D	8.82E+05	1.36E+05
48A	1.06E+06	7.78E+05
48D	1.47E+05	1.70E+05
72A	7.67E+05	5.31E+05
72D	4.79E+05	1.84E+05
96A	7.49E+05	4.99E+05
96D	2.60E+05	3.32E+05
132A	7.22E+05	2.95E+05
132D	9.40E+05	6.51E+05
144A	1.96E+05	3.92E+05
144D	3.06E+05	3.91E+05
168A	7.44E+05	2.13E+05
168D	7.75E+05	7.56E+05
192A	3.46E+05	6.92E+05
192D	0.00E+00	0.00E+00
216A	2.50E+05	2.89E+05
216D	3.91E+05	4.99E+05

Tabela B7 - Valores do número de células recuperadas com Tryple 10X referentes ao experimento 1.

Tempo (horas)	Células recuperadas %	Desvio padrão %
0		
8	16.62	13.17
24	33.72	9.23
48	20.71	5.59
72	42.01	4.15
96	37.12	5.30
132	99.21	15.15
144	40.19	8.94
168	40.72	3.10
192	0.83	0.72
216	72.14	6.61

Tabela B8 - Valores do diâmetro médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S referentes ao experimento 1.

Tempo (horas)	Diâmetro médio (mm)	Desvio padrão (mm)
8	0.206641	0.063310
24	0.212030	0.069929
48	0.221048	0.066552
72	0.239575	0.080563
96	0.261397	0.125829
132	0.329998	0.181870
144	1.084521	0.174472
168	1.142018	0.145333
192	1.135481	0.155350
216	1.115967	0.226089

Experimento 2

Tabela B9 - Valores de pH, porcentagem de CO₂ na incubadora e agitação referentes ao experimento 2. “A” representa os valores antes da troca de meio de cultura e “D” os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	pH	CO ₂ na incubadora (%)	Agitação rpm
0	7.32	5	Intermitente
8	7.35	5	20
10	Não foi medido	5	30
12	Não foi medido	5	40
24A	7.14	5	40
24D	7.3	5	40
32	7.21	5	40
40	7.18	5	40
48A	7.11	5	40
48D	7.27	5	40
56	7.21	5	40
64	7.18	5	40
72A	7.15	5	40
72D	7.28	5	40
80	7.27	5	40
88	7.23	5	40
96A	7.17	5	40
96D	7.33	5	40
104	7.2	0	40
132A	7.16	5	40
132D	7.34	5	40
144A	7	5	40
144D	7.28	5	40
152	7.19	0	40
160	7.1	0	40
168A	7.04	5	40
168D	7.32	5	40
176	7.12	0	40
184	7.09	0	40
192A	7.05	5	40
192D	7.4	5	40
200	7.12	0	40
208	7.1	0	40
216A	7.07	5	40

216D	7.44	5	40
224	7.13	0	40
232	7.04	0	40
240A	6.97	0	40
240D	7.24	0	40
248	7.35	0	40
256	7.2	0	40
264A	7.06	0	40
264D	7.23	0	40
272	7.37	0	40
300A	6.98	0	40
300D	7.28	0	40
312A	7.18	0	40
312D	7.31	0	40
320	7.37	0	40
328	7.2	0	40
336A	7.05	0	40
336D	7.29	0	40
344	7.38	0	40
352	7.2	0	40
360A	7.01	0	40
360D	7.31	0	40
368	7.42	0	40
376	7.34	0	40
384A	7.28	5	40
384D	7.48	5	40
392	7.18	0	40
400	7.2	0	40
408A	7.24	0	40
408D	7.43	0	40

Tabela B10 - Valores de aminoácidos referentes ao experimento 2. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Ácido aspártico (mM)	Ácido glutâmico (mM)	Asparagina (mM)	Serina (mM)	Glutamina (mM)	Glicina (mM)	Histidina (mM)	Arginina (mM)	Treonina (mM)	Alanina (mM)
8	0.147	0.560	0.203	0.000	2.497	0.876	0.160	0.531	0.316	0.446
24A	0.129	0.540	0.190	0.000	2.123	0.842	0.090	0.380	0.281	0.433
24D	0.129	0.500	0.170	0.000	2.193	0.787	0.130	0.442	0.264	0.394
48A	0.139	0.550	0.150	0.000	1.383	0.729	0.150	0.211	0.234	0.406
48D	0.093	0.250	0.127	0.000	1.847	0.573	0.120	0.304	0.199	0.291
72A	0.108	0.390	0.157	0.000	1.613	0.730	0.130	0.221	0.225	0.370
72D	0.102	0.300	0.147	0.000	1.723	0.659	0.110	0.316	0.222	0.330
96A	0.129	0.440	0.173	0.000	2.070	0.770	0.160	0.295	0.259	0.475
96D	0.107	0.340	0.157	0.000	2.120	0.771	0.170	0.449	0.268	0.419
132A	0.118	0.500	0.150	0.000	1.437	0.689	0.170	0.058	0.154	0.400
132D	0.103	0.330	0.163	0.000	2.023	0.788	0.150	0.343	0.242	0.451
144A	0.108	0.390	0.143	0.000	1.650	0.753	0.130	0.122	0.220	0.522
144D	0.098	0.270	0.127	0.000	1.840	0.661	0.150	0.301	0.224	0.371
168A	0.121	0.510	0.160	0.000	1.777	0.782	0.210	0.147	0.224	0.574
168D	0.173	0.740	0.230	0.000	2.420	0.967	0.150	0.495	0.321	0.554
192A	0.182	0.940	0.190	0.000	1.977	0.925	0.160	0.147	0.304	0.725
192D	0.112	0.380	0.187	0.000	2.083	0.896	0.160	0.457	0.320	0.529
216A	0.133	0.590	0.160	0.000	1.673	0.812	0.180	0.203	0.230	0.652
216D	0.135	0.540	0.193	0.000	2.107	0.855	0.100	0.430	0.275	0.518
240A	0.137	0.610	0.133	0.000	1.447	0.692	0.170	0.181	0.211	0.555
240D	0.124	0.440	0.190	0.000	1.960	0.841	0.130	0.444	0.275	0.451
264A	0.134	0.580	0.163	0.000	1.663	0.758	0.110	0.241	0.219	0.529
264D	0.257	0.570	0.220	0.000	2.603	0.834	0.160	0.464	0.258	0.518
300A	0.069	0.620	0.207	0.000	1.853	0.824	0.170	0.282	0.600	0.520
300D	0.071	0.520	0.227	0.000	2.300	0.870	0.160	0.267	0.472	0.505

312A	0.061	0.660	0.210	0.000	2.077	0.892	0.180	0.060	0.504	0.573
312D	0.061	0.500	0.213	0.000	2.350	0.785	0.380	0.236	0.431	0.480
336A	0.062	0.660	0.270	0.000	2.080	1.023	0.130	0.291	0.596	0.593
336D	0.057	0.530	0.363	0.000	2.360	1.109	0.160	0.339	0.534	0.620
360A	0.069	0.820	0.297	0.000	2.090	1.212	0.130	0.399	0.672	0.577
360D	0.062	0.590	0.257	0.000	2.563	0.914	0.170	0.250	0.478	0.591
384A	0.061	0.570	0.180	0.000	1.920	0.753	0.160	0.214	0.409	0.502
384D	0.055	0.870	0.210	0.000	2.223	0.826	0.150	0.272	0.458	0.536
408A	0.112	0.380	0.187	0.000	2.083	0.896	0.160	0.457	0.320	0.529
408D	0.068	0.660	0.240	0.000	2.450	0.855	0.140	0.228	0.450	0.621

Tabela B11 - Valores de aminoácidos, glicose, ácido láctico e amônia referentes ao experimento 2. “A” representa os valores antes da troca de meio de cultura e “D” os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Prolina (mM)	Tirosina (mM)	Valina (mM)	Metionina (mM)	Cisteína (mM)	Isoleucina (mM)	Leucina (mM)	Fenilalanina (mM)	Lisina (mM)	Glicose (mM)	Ácido láctico (mM)	Amônia (mM)
8	0.402	0.396	0.500	0.691	0.069	0.286	0.422	0.210	0.350	6.605	1.210	0.306
24A	0.433	0.389	0.480	0.690	0.071	0.240	0.386	0.190	0.320	5.745	1.277	0.424
24D	0.399	0.380	0.470	0.687	0.081	0.237	0.382	0.180	0.320	6.355	1.143	0.306
48A	0.378	0.345	0.450	0.687	0.037	0.197	0.344	0.160	0.300	5.645	1.266	0.588
48D	0.367	0.329	0.410	0.675	0.033	0.156	0.301	0.140	0.240	5.662	1.110	0.329
72A	0.397	0.356	0.440	0.674	0.031	0.183	0.340	0.180	0.270	5.567	1.610	0.565
72D	0.409	0.360	0.440	0.677	0.034	0.182	0.340	0.170	0.260	6.994	1.432	0.365
96A	0.346	0.350	0.440	0.678	0.071	0.183	0.340	0.190	0.300	5.595	1.898	0.518
96D	0.443	0.360	0.490	0.680	0.052	0.236	0.390	0.180	0.310	6.822	1.488	0.294
132A	0.435	0.380	0.410	0.682	0.021	0.136	0.300	0.170	0.230	4.807	2.642	0.776
132D	0.417	0.350	0.470	0.676	0.034	0.206	0.370	0.180	0.310	5.828	1.665	0.494
144A	0.371	0.370	0.440	0.680	0.037	0.165	0.340	0.180	0.290	4.879	2.254	0.682
144D	0.344	0.360	0.420	0.680	0.034	0.148	0.320	0.150	0.270	5.317	1.454	0.400

168A	0.434	0.350	0.450	0.678	0.044	0.173	0.340	0.180	0.300	3.913	3.186	0.706
168D	0.460	0.370	0.530	0.711	0.049	0.294	0.430	0.210	0.390	5.145	1.698	0.459
192A	0.444	0.430	0.490	0.740	0.062	0.251	0.390	0.210	0.350	2.609	2.864	0.835
192D	0.418	0.390	0.500	0.734	0.044	0.243	0.410	0.190	0.340	3.730	1.266	0.447
216A	0.432	0.390	0.450	0.728	0.036	0.189	0.350	0.180	0.310	3.375	3.430	0.776
216D	0.435	0.370	0.480	0.717	0.106	0.231	0.380	0.180	0.330	4.912	1.798	0.471
240A	0.371	0.380	0.410	0.731	0.071	0.138	0.310	0.150	0.270	3.891	3.541	0.765
240D	0.408	0.350	0.470	0.707	0.043	0.219	0.380	0.190	0.320	4.157	1.554	0.365
264A	0.445	0.380	0.440	0.720	0.063	0.168	0.330	0.170	0.280	3.824	3.264	0.635
264D	0.388	0.360	0.460	0.710	0.090	0.252	0.350	0.190	0.310	3.935	1.565	0.329
300A	0.456	0.380	0.490	0.728	0.067	0.176	0.380	0.190	0.310	2.403	2.287	0.588
300D	0.582	0.380	0.550	0.700	0.082	0.244	0.430	0.200	0.360	4.890	1.887	0.459
312A	0.453	0.390	0.510	0.709	0.067	0.197	0.390	0.200	0.310	2.875	1.843	0.388
312D	0.432	0.390	0.510	0.703	0.058	0.211	0.390	0.200	0.320	4.246	1.388	0.247
336A	0.389	0.370	0.600	0.706	0.038	0.273	0.490	0.220	0.400	3.430	2.542	0.447
336D	0.432	0.410	0.630	0.719	0.041	0.315	0.500	0.200	0.410	4.613	1.565	0.259
360A	0.387	0.450	0.670	0.721	0.061	0.325	0.540	0.280	0.450	3.669	2.764	0.506
360D	0.432	0.430	0.560	0.729	0.101	0.259	0.440	0.230	0.370	4.624	1.532	0.306
384A	0.398	0.400	0.480	0.717	0.063	0.174	0.370	0.200	0.280	2.131	1.521	0.447
384D	0.432	0.400	0.520	0.725	0.057	0.213	0.410	0.220	0.330	4.019	1.998	0.282
408A	0.418	0.390	0.500	0.734	0.044	0.243	0.410	0.190	0.340	5.390	1.743	0.435
408D	0.387	0.380	0.540	0.711	0.069	0.239	0.420	0.220	0.340	4.163	1.354	0.247

Tabela B12 - Valores dos fatores de diluição referentes ao experimento 2. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Fator de diluição
8	
24A	0.96000
24D	0.92160
48A	0.88474
48D	0.84935
72A	0.81537
72D	0.78276
96A	0.75145
96D	0.72139
132A	0.69253
132D	0.66483
144A	0.63824
144D	0.61271
168A	0.58820
168D	0.56467
192A	0.54209
192D	0.52040
216A	0.49959
216D	0.47960
240A	0.46042
240D	0.44200
264A	0.42432
264D	0.40735
288A	0.39106
288D	0.37541
312A	0.36040
312D	0.34598
336A	0.33214
336D	0.31886
360A	0.30610
360D	0.29386
384A	0.28210
384D	0.27082
408A	0.25999
408D	0.24959

Tabela B13 - Valores do número de células aderidas nos microcarregadores referentes ao experimento 2 obtidos pelo método no MTT. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Número de células com correção do fator de diluição (células)	Desvio padrão (células)	Número de células sem correção do fator de diluição (células)	Desvio padrão (células)
0				
8	6.21E+06	5.94E+04	6.21E+06	5.94E+04
24A	8.50E+06	1.64E+05	8.16E+06	1.57E+05
24D	8.89E+06	1.29E+05	8.20E+06	1.19E+05
48A	9.77E+06	2.01E+05	8.64E+06	1.78E+05
48D	1.05E+07	2.42E+05	8.95E+06	2.06E+05
72A	1.47E+07	1.26E+05	1.20E+07	1.03E+05
72D	1.70E+07	2.01E+05	1.33E+07	1.57E+05
96A	2.58E+07	9.31E+05	1.94E+07	7.00E+05
96D	2.65E+07	7.85E+05	1.91E+07	5.66E+05
132A	3.38E+07	1.71E+05	2.34E+07	1.19E+05
132D	3.22E+07	5.58E+05	2.14E+07	3.71E+05
144A	4.43E+07	4.83E+05	2.82E+07	3.08E+05
144D	4.03E+07	2.56E+05	2.47E+07	1.57E+05
168A	6.01E+07	1.14E+06	3.54E+07	6.69E+05
168D	6.60E+07	2.20E+06	3.73E+07	1.24E+06
192A	9.62E+07	1.83E-08	5.21E+07	9.13E-09
192D	1.04E+08	1.14E+05	5.44E+07	5.94E+04
216A	1.42E+08	1.66E+06	7.09E+07	8.31E+05
216D	1.23E+08	1.79E+06	5.88E+07	8.56E+05
240A	1.25E+08	1.87E+06	5.74E+07	8.62E+05
240D	1.20E+08	1.19E+06	5.29E+07	5.28E+05
264A	1.69E+08	3.92E+06	7.16E+07	1.66E+06
264D	1.68E+08	3.88E+06	6.85E+07	1.58E+06
300A	2.03E+08	3.21E+06	7.95E+07	1.26E+06
300D	2.01E+08	1.90E+06	7.55E+07	7.12E+05
312A	1.50E+08	4.67E+06	5.42E+07	1.68E+06
312D	1.38E+08	1.98E+06	4.78E+07	6.85E+05
336A	2.07E+08	1.07E+06	6.88E+07	3.56E+05
336D	2.26E+08	2.61E+06	7.20E+07	8.31E+05
360A	1.55E+08	5.72E+06	4.75E+07	1.75E+06
360D	1.55E+08	2.42E+06	4.55E+07	7.12E+05
384A	2.23E+08	5.83E+06	6.29E+07	1.65E+06
384D	2.62E+08	6.09E+06	7.10E+07	1.65E+06
408A	3.15E+08	7.12E+06	8.19E+07	1.85E+06
408D	2.26E+08	2.88E+06	5.63E+07	7.20E+05

Tabela B14 - Valores do número de células em suspensão referentes ao experimento 2. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Número de células em suspensão (células)	Desvio padrão (células)
0	6.25E+06	0.00E+00
8	1.19E+06	8.26E+05
24A	2.28E+06	7.17E+05
24D	1.90E+06	1.17E+06
48A	1.34E+06	2.71E+05
48D	9.57E+05	4.42E+05
72A	6.90E+05	4.60E+05
72D	5.59E+05	4.79E+05
96A	2.50E+05	1.66E+05
96D	8.66E+04	1.73E+05
132A	1.08E+06	0.00E+00
132D	3.76E+05	3.07E+05
144A	5.88E+05	2.26E+05
144D	5.10E+05	3.91E+05
168A	9.56E+05	4.07E+05
168D	3.32E+05	4.24E+05
192A	8.07E+05	4.42E+05
192D	6.00E+05	6.04E+05
216A	1.25E+06	1.19E+06
216D	5.21E+05	7.37E+05
240A	1.09E+06	4.43E+05
240D	0.00E+00	0.00E+00
264A	1.47E+05	2.95E+05
264D	0.00E+00	0.00E+00
300A	3.20E+05	6.39E+05
300D	0.00E+00	0.00E+00
312A	0.00E+00	0.00E+00
312D	3.61E+05	4.17E+05
336A	0.00E+00	0.00E+00
336D	1.96E+05	3.92E+05
360A	2.04E+05	4.08E+05
360D	0.00E+00	0.00E+00
384A	8.86E+05	1.77E+06
384D	0.00E+00	0.00E+00
408A	0.00E+00	0.00E+00
408D	0.00E+00	0.00E+00

Tabela B15 - Valores do número de células recuperadas com Tryple 10X referentes ao experimento 2.

Tempo (h)	Células recuperadas %	Desvio padrão %
0		
8	8.06	5.70
24	7.66	5.87
48	5.06	2.77
72	21.88	9.99
96	15.17	7.33
132	21.35	4.85
144	48.68	3.75
168	34.63	3.96
192	34.52	5.35
216	33.94	2.40
240	20.59	4.09
264	16.05	1.48
300	4.09	0.44
312	10.96	5.65
336	13.35	1.12
360	2.10	1.29
384	3.38	1.05
408	3.28	1.15

Tabela B16 - Valores do diâmetro médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S referentes ao experimento 2.

Tempo (horas)	Diâmetro médio (mm)	Desvio padrão (mm)
8	0.214365	0.078973
24	0.217790	0.052474
48	0.216188	0.067336
72	0.225079	0.075975
96	0.277194	0.101076
132	0.262459	0.122577
144	0.269530	0.062937
168	0.311625	0.097898
192	0.383370	0.139025
216	0.673440	0.287259
240	1.016752	0.396244
264	1.154840	0.308832
300	1.020752	0.376707

312	1.107566	0.333620
336	1.126950	0.132176
360	1.242426	0.169384
384	1.283868	0.176784
408	1.396152	0.313673

Experimento 3

Tabela B17 - Valores de pH, porcentagem de CO₂ na incubadora e agitação referentes ao experimento 3. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	pH	CO ₂ na incubadora (%)	Agitação rpm
0	7.32	5	Intermitente
8	7.32	5	20
10	Não foi medido	5	30
12	Não foi medido	5	40
24A	7.11	5	40
24D	7.3	5	40
32	7.18	5	40
40	7.15	5	40
48A	7.09	5	40
48D	7.27	5	40
56	7.21	5	40
64	7.21	5	40
72A	7.2	5	40
72D	7.3	5	40
80	7.24	5	40
88	7.26	5	40
96A	7.27	5	40
96D	7.33	5	40
104	7.25	0	40
132A	7.69	5	40
132D	7.55	5	40
144A	7.3	5	40
144D	7.4	5	40
152	7.33	0	40
160	7.45	0	40
168A	7.63	5	40
168D	7.4	5	40
176	7.5	0	40

Tabela B18 - Valores de aminoácidos referentes ao experimento 3. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Ácido aspártico (mM)	Ácido glutâmico (mM)	Asparagina (mM)	Serina (mM)	Glutamina (mM)	Glicina (mM)	Histidina (mM)	Arginina (mM)	Treonina (mM)	Alanina (mM)
8	0.060	0.860	0.233	0.000	2.163	0.833	0.180	0.319	0.449	0.481
24A	0.080	0.390	0.210	0.000	2.070	0.798	0.170	0.281	0.418	0.395
24D	0.066	0.500	0.213	0.000	2.187	0.802	0.190	0.286	0.405	0.410
48A	0.080	0.490	0.187	0.000	2.237	0.727	0.180	0.254	0.387	0.418
48D	0.065	0.470	0.193	0.000	2.403	0.776	0.130	0.284	0.369	0.360
72A	0.070	0.470	0.210	0.000	2.150	0.781	0.140	0.244	0.418	0.412
72D	0.060	0.420	0.203	0.000	2.257	0.783	0.140	0.273	0.400	0.431
96A	0.060	0.490	0.213	0.000	1.573	0.835	0.150	0.204	0.439	0.456
96D	0.070	0.310	0.150	0.000	2.370	0.569	0.170	0.284	0.295	0.322
132A	0.076	0.390	0.197	0.000	2.023	0.729	0.170	0.260	0.414	0.445
132D	0.074	0.340	0.210	0.000	2.420	0.832	0.170	0.491	0.438	0.428
144A	0.065	0.350	0.203	0.000	2.237	0.831	0.140	0.486	0.442	0.432
144D	0.076	0.310	0.197	0.000	2.377	0.811	0.140	0.501	0.434	0.418
168A	0.056	0.300	0.200	0.000	2.220	0.897	0.180	0.517	0.448	0.437
168D	0.067	0.270	0.193	0.000	2.283	0.804	0.150	0.513	0.406	0.399

Tabela B19 - Valores de aminoácidos, glicose, ácido láctico e amônia referentes ao experimento 3. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Prolina (mM)	Tirosina (mM)	Valina (mM)	Metionina (mM)	Cisteína (mM)	Isoleucina (mM)	Leucina (mM)	Fenilalanina (mM)	Lisina (mM)	Glicose (mM)	Ácido láctico (mM)	Amônia (mM)
8	0.267	0.390	0.550	0.716	0.079	0.239	0.410	0.220	0.340	5.329	0.999	0.271
24A	0.138	0.390	0.520	0.712	0.056	0.204	0.390	0.200	0.330	2.997	0.988	0.576
24D	0.126	0.380	0.600	0.706	0.052	0.274	0.450	0.190	0.340	5.512	0.744	0.365
48A	0.130	0.380	0.490	0.695	0.049	0.191	0.380	0.200	0.310	3.375	0.788	0.624
48D	0.128	0.370	0.500	0.707	0.043	0.200	0.380	0.200	0.320	3.386	0.755	0.447
72A	0.089	0.370	0.510	0.724	0.065	0.219	0.410	0.200	0.345	5.662	1.143	0.600
72D	0.093	0.380	0.510	0.701	0.070	0.228	0.400	0.200	0.343	7.416	0.955	0.365
96A	0.097	0.370	0.520	0.736	0.068	0.225	0.420	0.200	0.350	5.856	1.077	0.518
96D	0.103	0.340	0.410	0.701	0.032	0.128	0.300	0.160	0.240	6.078	0.999	0.329
132A	0.094	0.370	0.410	0.708	0.050	0.217	0.410	0.200	0.330	5.534	0.988	0.447
132D	0.440	0.390	0.510	0.737	0.030	0.246	0.420	0.210	0.370	5.867	0.988	0.282
144A	0.430	0.390	0.530	0.738	0.029	0.238	0.420	0.210	0.510	3.752	1.044	0.353
144D	0.436	0.390	0.540	0.741	0.034	0.247	0.430	0.210	0.350	6.367	0.777	0.259
168A	0.446	0.380	0.530	0.741	0.048	0.240	0.420	0.260	0.320	4.169	1.021	0.318
168D	0.414	0.370	0.520	0.737	0.039	0.219	0.400	0.230	0.220	5.823	0.810	0.212

Tabela B20 - Valores dos fatores de diluição referentes ao experimento 3. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Fator de diluição
8	
24A	0.96000
24D	0.92160
48A	0.88474
48D	0.84935
72A	0.81537
72D	0.78276
96A	0.75145
96D	0.72139
132A	0.69253
132D	0.66483
144A	0.63824
144D	0.61271
168A	0.58820
168D	0.56467

Tabela B21 - Valores do número de células aderidas nos microcarregadores referentes ao experimento 3 obtidos pelo método no MTT. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Número de células com correção do fator de diluição (células)	Desvio padrão (células)	Número de células sem correção do fator de diluição (células)	Desvio padrão (células)
0				
8	6.52E+06	1.19E+05	6.52E+06	1.19E+05
24A	6.57E+06	6.18E+04	6.31E+06	5.94E+04
24D	6.81E+06	1.12E+05	6.28E+06	1.03E+05
48A	5.74E+06	6.71E+04	5.08E+06	5.94E+04
48D	6.70E+06	6.99E+04	5.69E+06	5.94E+04
72A	6.48E+06	7.28E+04	5.28E+06	5.94E+04
72D	6.62E+06	7.58E+04	5.18E+06	5.94E+04
96A	7.26E+06	1.37E+05	5.45E+06	1.03E+05
96D	6.85E+06	0.00E+00	4.94E+06	0.00E+00
132A	6.98E+06	8.57E+04	4.84E+06	5.94E+04
132D	7.22E+06	8.93E+04	4.80E+06	5.94E+04
144A	7.63E+06	9.30E+04	4.87E+06	5.94E+04
144D	7.78E+06	9.69E+04	4.77E+06	5.94E+04

168A	8.40E+06	1.01E+05	4.94E+06	5.94E+04
168D	8.44E+06	1.82E+05	4.77E+06	1.03E+05

Tabela B22 - Valores do número de células em suspensão referentes ao experimento 3. “A” representa os valores antes da troca de meio de cultura e “D” os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Número de células em suspensão (células)	Desvio padrão (células)
0	6.25E+06	0.00E+00
8	1.56E+06	4.27E+05
24A	1.82E+06	4.75E+05
24D	8.82E+05	7.13E+05
48A	5.65E+05	3.26E+05
48D	5.89E+05	2.40E+05
72A	7.67E+04	1.53E+05
72D	4.79E+05	1.84E+05
96A	0.00E+00	0.00E+00
96D	0.00E+00	0.00E+00
132A	9.02E+04	1.80E+05
132D	9.40E+04	1.88E+05
144A	9.79E+04	1.96E+05
144D	0.00E+00	0.00E+00
168A	1.06E+05	2.13E+05
168D	0.00E+00	0.00E+00

Tabela B23 - Valores do número de células recuperadas com Tryple 10X referentes ao experimento 3.

Tempo (horas)	Células recuperadas %	Desvio padrão %
0		
8	8.63	3.67
24	2.97	5.94
48	0.00	0.00
72	1.18	2.37
96	0.00	0.00
132	0.00	0.00
144	0.00	0.00
168	0.00	0.00

Tabela B24 - Valores do diâmetro médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S referentes ao experimento 3.

Tempo (horas)	Diâmetro médio (mm)	Desvio padrão (mm)
8	0.216874	0.053357
24	0.214615	0.075112
48	0.215795	0.061615
72	0.215044	0.070602
96	0.215067	0.082256
132	0.218443	0.073080
144	0.210522	0.051503
168	0.219123	0.061833

Experimento 4

Tabela B25 - Valores de pH, porcentagem de CO₂ na incubadora e agitação referentes ao experimento 4. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	pH	CO₂ na incubadora (%)	Agitação rpm
0	7.3	5	Intermitente
8	7.4	5	20
10	Não foi medido	5	30
12	Não foi medido	5	40
24A	7.23	5	40
24D	7.35	5	40
32	7.3	5	40
40	7.24	5	40
48A	7.17	5	40
48D	7.33	5	40
56	7.27	5	40
64	7.17	5	40
72A	7.05	5	40
72D	7.3	0	40
80	7.27	0	40
88	7.17	0	40
96A	7.05	0	40
96D	7.25	0	40

104	7.28	0	40
132A	6.95	0	40
132D	7.18	0	40
144A	7.05	0	40
144D	7.2	0	40
152	7.2	0	40
160	7.09	0	40
168A	6.95	5	40
168D	7.35	5	40
176	7.28	0	40
184	7.09	0	40
192A	6.9	5	40
192D	7.3	5	40
200	7.28	0	40
208	7.12	0	40
216A	6.95	5	40
216D	7.3	5	40
224	7.29	0	40
232	7.19	0	40
240A	7.08	0	40
240D	7.3	0	40
248	7.25	0	40
256	7.16	0	40
264A	7.05	0	40
264D	7.32	0	40
272	7.25	0	40
300A	7.1	0	40
300D	7.3	0	40
312A	7.2	0	40
312D	7.4	0	40
320	7.35	0	40
328	7.32	0	40
336A	7.25	0	40
336D	7.35	0	40

Tabela B26 - Valores de aminoácidos referentes ao experimento 4. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (h)	Ácido aspártico (mM)	Ácido glutâmico (mM)	Asparagina (mM)	Serina (mM)	Glutamina (mM)	Glicina (mM)	Histidina (mM)	Arginina (mM)	Treonina (mM)	Alanina (mM)
8	0.054	0.266	0.256	0.000	3.678	0.376	0.081	0.268	0.147	0.457
24A	0.061	0.366	0.261	0.000	3.598	0.396	0.083	0.251	0.144	0.57
24D	0.056	0.298	0.263	0.000	3.924	0.434	0.093	0.287	0.157	0.492
48A	0.069	0.387	0.256	0.000	3.506	0.423	0.089	0.236	0.157	0.641
48D	0.061	0.312	0.272	0.000	3.734	0.403	0.087	0.267	0.16	0.513
72A	0.086	0.44	0.266	0.000	3.233	0.426	0.092	0.17	0.157	0.709
72D	0.095	0.294	0.254	0.000	3.327	0.393	0.082	0.225	0.157	0.534
96A	0.092	0.497	0.292	0.000	3.625	0.458	0.1	0.102	0.153	0.862
96D	0.06	0.315	0.275	0.000	3.66	0.419	0.093	0.231	0.165	0.568
132A	0.091	0.471	0.243	0.000	3.064	0.409	0.08	0.068	0.13	0.808
132D	0.101	0.473	0.318	0.000	3.926	0.504	0.094	0.231	0.168	0.716
144A	0.096	0.511	0.297	0.000	3.738	0.488	0.102	0.15	0.154	0.899
144D	0.073	0.392	0.319	0.000	4.423	0.516	0.112	0.285	0.174	0.735
168A	0.096	0.506	0.283	0.000	3.173	0.454	0.096	0.1	0.154	0.846
168D	0.073	0.383	0.307	0.000	3.714	0.475	0.101	0.235	0.175	0.678
192A	0.094	0.516	0.242	0.000	2.59	0.433	0.092	0.013	0.144	0.871
192D	0.065	0.353	0.269	0.000	2.863	0.446	0.092	0.187	0.153	0.669
216A	0.092	0.522	0.212	0.000	2.633	0.453	0.098	0.039	0.151	0.893
216D	0.074	0.391	0.294	0.000	3.168	0.481	0.098	0.203	0.165	0.677
240A	0.117	0.658	0.339	0.000	3.074	0.577	0.126	0.04	0.189	1.102
240D	0.068	0.393	0.272	0.000	3.287	0.471	0.096	0.187	0.162	0.648
264A	0.082	0.471	0.215	0.000	2.719	0.462	0.093	0.045	0.151	0.772
264D	0.06	0.319	0.262	0.000	2.733	0.452	0.088	0.198	0.166	0.515
300A	0.081	0.469	0.272	0.000	2.737	0.486	0.098	0.082	0.18	0.718
300D	0.053	0.289	0.242	0.000	2.836	0.443	0.093	0.215	0.167	0.503

312A	0.093	0.438	0.258	0.000	2.553	0.472	0.1	0.142	0.165	0.55
312D	0.048	0.242	0.219	0.000	2.851	0.41	0.094	0.221	0.157	0.426
336A	0.06	0.334	0.22	0.000	2.504	0.427	0.086	0.12	0.163	0.473
336D	0.05	0.257	0.234	0.000	2.517	0.434	0.097	0.223	0.18	0.433

Tabela B27 - Valores de aminoácidos, glicose, ácido láctico e amônia referentes ao experimento 4. “A” representa os valores antes da troca de meio de cultura e “D” os valores depois da troca de meio.

Tempo (h)	Prolina (mM)	Tirosina (mM)	Valina (mM)	Metionina (mM)	Cisteína (mM)	Isoleucina (mM)	Leucina (mM)	Fenilalanina (mM)	Lisina (mM)	Glicose (mM)	Ácido láctico (mM)	Amônia (mM)
8	0.372	0.128	0.21	0.046	0.088	0.183	0.184	0.11	0.241	6.905	2.165	0.706
24A	0.403	0.136	0.214	0.046	0.082	0.178	0.184	0.112	0.258	4.696	3.375	0.871
24D	0.387	0.108	0.234	0.05	0.088	0.198	0.203	0.123	0.268	5.229	1.921	0.718
48A	0.417	0.126	0.221	0.047	0.073	0.183	0.19	0.125	0.271	5.367	4.496	1.294
48D	0.405	0.136	0.217	0.047	0.089	0.192	0.193	0.116	0.269	4.885	2.609	0.894
72A	0.432	0.141	0.22	0.05	0.083	0.185	0.192	0.128	0.274	4.091	5.540	1.576
72D	0.387	0.127	0.211	0.046	0.077	0.183	0.186	0.114	0.259	5.079	3.186	1.071
96A	0.491	0.143	0.256	0.046	0.057	0.195	0.203	0.13	0.286	3.519	6.838	3.082
96D	0.378	0.146	0.227	0.049	0.093	0.195	0.199	0.122	0.273	5.034	3.575	1.965
132A	0.431	0.113	0.193	0.022	0.048	0.165	0.171	0.107	0.254	2.936	8.648	3.953
132D	0.518	0.153	0.241	0	0.102	0.21	0.234	0.134	0.31	3.752	4.196	2.000
144A	0.544	0.749	0.241	0	0.082	0.197	0.218	0.13	0.297	3.741	7.871	2.824
144D	0.547	0.17	0.277	0	0.115	0.235	0.259	0.148	0.319	4.618	4.196	1.694
168A	0.514	0.138	0.222	0.021	0.069	0.189	0.198	0.109	0.217	2.947	6.972	3.118
168D	0.486	0.155	0.244	0.014	0.101	0.213	0.22	0.131	0.293	4.529	3.963	1.824
192A	0.529	0.14	0.211	0.044	0.04	0.171	0.188	0.123	0.254	2.237	8.126	3.706
192D	0.471	0.156	0.227	0.049	0.082	0.201	0.208	0.124	0.277	4.313	4.507	2.318
216A	0.549	0.156	0.225	0.047	0.028	0.18	0.2	0.132	0.288	2.703	7.460	3.553
216D	0.492	0.171	0.249	0.054	0.09	0.212	0.226	0.131	0.287	4.457	3.797	2.106

240A	0.652	0.188	0.287	0.06	0.05	0.226	0.256	0.167	0.332	2.698	6.550	3.459
240D	0.505	0.165	0.243	0.052	0.078	0.201	0.225	0.129	0.287	4.568	3.552	2.012
264A	0.518	0.157	0.232	0.049	0.042	0.183	0.208	0.13	0.284	3.114	6.006	3.482
264D	0.413	0.162	0.248	0.058	0.073	0.211	0.226	0.127	0.274	4.241	2.909	1.847
300A	0.571	0.166	0.266	0.05	0.043	0.205	0.236	0.147	0.31	3.819	5.484	2.894
300D	0.449	0.16	0.244	0.049	0.074	0.193	0.219	0.124	0.282	5.551	3.286	1.800
312A	0.424	0.148	0.241	0.043	0.076	0.182	0.213	0.122	0.289	3.863	3.397	2.118
312D	0.409	0.151	0.232	0.043	0.074	0.179	0.207	0.112	0.265	5.434	1.965	1.506
336A	0.428	0.149	0.233	0.041	0.056	0.17	0.205	0.118	0.266	4.823	3.919	2.282
336D	0.402	0.152	0.24	0.041	0.073	0.185	0.212	0.114	0.266	5.451	2.076	1.600

Tabela B28 - Valores dos fatores de diluição referentes ao experimento 4. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Fator de diluição
8	
24A	0.96000
24D	0.92160
48A	0.88474
48D	0.84935
72A	0.81537
72D	0.78276
96A	0.75145
96D	0.72139
132A	0.69253
132D	0.66483
144A	0.63824
144D	0.61271
168A	0.58820
168D	0.56467
192A	0.54209
192D	0.52040
216A	0.49959
216D	0.47960
240A	0.46042
240D	0.44200
264A	0.42432
264D	0.40735
288A	0.39106
288D	0.37541
312A	0.36040
312D	0.34598
336A	0.33214
336D	0.31886

Tabela B29 - Valores do número de células aderidas nos microcarregadores referentes ao experimento 4 obtidos pelo método no MTT. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (h)	Número de células com correção do fator de diluição (células)	Desvio padrão (células)	Número de células sem correção do fator de diluição (células)	Desvio padrão (células)
0				
8	9.67E+06	8.04E+04	9.67E+06	8.04E+04
24A	1.06E+07	4.19E+04	1.02E+07	4.02E+04
24D	1.26E+07	3.78E+05	1.16E+07	3.48E+05
48A	1.76E+07	1.57E+05	1.56E+07	1.39E+05
48D	1.92E+07	9.46E+04	1.63E+07	8.04E+04
72A	2.87E+07	1.02E+06	2.34E+07	8.35E+05
72D	2.88E+07	4.11E+05	2.25E+07	3.21E+05
96A	3.38E+07	4.63E+05	2.54E+07	3.48E+05
96D	3.55E+07	2.23E+05	2.56E+07	1.61E+05
132A	4.76E+07	1.16E+06	3.29E+07	8.04E+05
132D	5.10E+07	1.57E+06	3.39E+07	1.04E+06
144A	6.92E+07	4.41E+05	4.42E+07	2.81E+05
144D	7.34E+07	2.28E+06	4.50E+07	1.39E+06
168A	6.95E+07	3.61E+05	4.09E+07	2.13E+05
168D	7.10E+07	1.11E+06	4.01E+07	6.28E+05
192A	9.94E+07	1.67E+06	5.39E+07	9.05E+05
192D	9.32E+07	2.14E+06	4.85E+07	1.11E+06
216A	1.28E+08	4.46E+06	6.38E+07	2.23E+06
216D	1.28E+08	8.59E+06	6.13E+07	4.12E+06
240A	1.27E+08	3.02E+06	5.87E+07	1.39E+06
240D	1.30E+08	2.36E+06	5.77E+07	1.04E+06
264A	1.36E+08	6.94E+06	5.77E+07	2.95E+06
264D	9.79E+07	2.56E+06	3.99E+07	1.04E+06
300A	8.80E+07	4.51E+06	3.44E+07	1.76E+06
300D	7.88E+07	1.54E+06	2.96E+07	5.79E+05
312A	7.00E+07	2.26E+06	2.52E+07	8.16E+05
312D	7.48E+07	3.42E+06	2.59E+07	1.18E+06
336A	3.43E+07	1.74E+06	1.14E+07	5.79E+05
336D	4.63E+07	1.67E+06	1.48E+07	5.31E+05

Tabela B30 - Valores do número de células em suspensão referentes ao experimento 4. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Número de células em suspensão (células)	Desvio padrão (células)
0	6.25E+06	0.00E+00
8	3.75E+05	3.23E+05
24A	5.86E+05	1.30E+05
24D	2.71E+05	3.13E+05
48A	7.06E+05	4.89E+05
48D	5.89E+05	0.00E+00
72A	9.20E+05	3.54E+05
72D	7.98E+05	5.53E+05
96A	1.16E+06	3.33E+05
96D	1.73E+06	0.00E+00
132A	1.80E+06	8.34E+05
132D	7.52E+05	0.00E+00
144A	1.76E+06	1.04E+06
144D	8.16E+05	7.45E+05
168A	1.70E+06	1.10E+06
168D	1.44E+06	5.57E+05
192A	1.38E+06	1.07E+06
192D	1.68E+06	8.32E+05
216A	5.50E+06	1.73E+06
216D	2.61E+06	1.81E+06
240A	2.44E+06	3.13E+05
240D	1.70E+06	1.31E+06
264A	1.77E+06	6.80E+05
264D	3.07E+06	7.09E+05
300A	3.20E+06	7.38E+05
300D	2.33E+06	3.84E+05
312A	2.43E+06	4.00E+05
312D	2.17E+06	1.67E+06
336A	3.76E+05	4.35E+05
336D	1.57E+06	9.05E+05

Tabela B31 - Valores do número de células recuperadas com Tryple 10X referentes ao experimento 4.

Tempo (h)	Células recuperadas %	Desvio padrão %
0		
8	22.63	7.12
24	11.03	6.17
48	22.83	11.65
72	38.73	5.33
96	25.08	7.77
132	52.76	5.20
144	50.78	3.41
168	46.47	10.64
192	46.65	5.05

216	63.67	17.99
240	37.92	4.01
264	32.29	3.72
300	17.98	4.41
312	6.69	2.04
336	4.93	1.10

Tabela B32 - Valores do diâmetro médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S referentes ao experimento 4.

Tempo (horas)	Diâmetro médio (mm)	Desvio padrão (mm)
8	0.204356	0.078836
24	0.209591	0.083699
48	0.222551	0.073847
72	0.249990	0.095709
96	0.263994	0.112161
132	0.302216	0.093151
144	0.335881	0.114589
168	0.382621	0.089192
192	0.445015	0.152886
216	0.491163	0.178320
240	0.523722	0.192915
264	0.501151	0.251865
300	0.515792	0.240729
312	0.339021	0.151175
336	0.373605	0.214195

Experimento 5

Tabela B33 - Valores de pH, porcentagem de CO₂ na incubadora e agitação referentes ao experimento 5. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	pH	CO₂ na incubadora (%)	Agitação rpm
0	7.3	5	Intermitente
8	7.38	5	20
10	Não foi medido	5	30
12	Não foi medido	5	40
24A	7.21	5	40
24D	7.33	5	40
32	7.3	5	40
40	7.26	5	40
48A	7.2	5	40
48D	7.3	5	40
56	7.3	5	40
64	7.28	5	40
72A	7.25	5	40
72D	7.3	0	40
80	7.3	0	40
88	7.32	0	40
96A	7.38	0	40
96D	7.33	0	40
104	7.38	0	40
132A	7.5	0	40
132D	7.45	0	40

Tabela B34 - Valores de aminoácidos referentes ao experimento 5. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Ácido aspártico (mM)	Ácido glutâmico (mM)	Asparagina (mM)	Serina (mM)	Glutamina (mM)	Glicina (mM)	Histidina (mM)	Arginina (mM)	Treonina (mM)	Alanina (mM)
8	0.042	0.221	0.227	0.000	2.434	0.393	0.110	0.261	0.157	0.377
24A	0.050	0.326	0.240	0.000	2.557	0.459	0.095	0.258	0.162	0.411
24D	0.028	0.204	0.214	0.000	2.643	0.435	0.099	0.261	0.150	0.388
48A	0.037	0.240	0.219	0.000	2.363	0.479	0.106	0.223	0.178	0.453
48D	0.031	0.215	0.225	0.000	2.582	0.485	0.113	0.261	0.171	0.402
72A	0.029	0.189	0.225	0.000	2.455	0.535	0.117	0.195	0.188	0.296
72D	0.035	0.215	0.229	0.000	2.796	0.491	0.110	0.259	0.180	0.402
96A	0.023	0.186	0.207	0.000	2.298	0.475	0.105	0.191	0.166	0.364
96D	0.027	0.184	0.225	0.000	2.591	0.538	0.117	0.253	0.184	0.347
132A	0.019	0.174	0.203	0.000	2.228	0.501	0.113	0.186	0.175	0.383
132D	0.028	0.163	0.207	0.000	2.381	0.526	0.119	0.234	0.168	0.326

Tabela B35 - Valores de aminoácidos, glicose, ácido láctico e amônia referentes ao experimento 5. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (h)	Prolina (mM)	Tirosina (mM)	Valina (mM)	Metionina (mM)	Cisteína (mM)	Isoleucina (mM)	Leucina (mM)	Fenilalanina (mM)	Lisina (mM)	Glicose (mM)	Ácido láctico (mM)	Amônia (mM)
8	0.357	0.151	0.208	0.036	0.062	0.164	0.190	0.102	0.240	5.290	1.610	1.118
24A	0.265	0.151	0.239	0.043	0.086	0.172	0.199	0.108	0.256	3.996	2.431	1.635
24D	0.331	0.164	0.228	0.042	0.068	0.170	0.202	0.111	0.250	5.323	2.109	1.176
48A	0.378	0.162	0.244	0.049	0.068	0.176	0.211	0.122	0.264	5.084	2.675	1.459
48D	0.387	0.167	0.247	0.046	0.077	0.186	0.222	0.119	0.269	5.373	1.810	1.318
72A	0.157	0.184	0.260	0.048	0.072	0.199	0.235	0.125	0.273	5.012	1.943	1.906
72D	0.360	0.168	0.251	0.044	0.066	0.202	0.237	0.163	0.215	5.173	1.499	1.341
96A	0.314	0.165	0.238	0.044	0.062	0.175	0.213	0.113	0.258	5.734	1.754	1.929
96D	0.324	0.180	0.282	0.046	0.068	0.190	0.234	0.121	0.275	5.850	1.365	1.412
132A	0.329	0.169	0.244	0.044	0.063	0.183	0.229	0.118	0.266	5.412	1.554	2.082
132D	0.286	0.170	0.239	0.044	0.071	0.184	0.219	0.113	0.283	6.150	1.421	1.388

Tabela B36 - Valores dos fatores de diluição referentes ao experimento 5. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Fator de diluição
8	
24A	0.96000
24D	0.92160
48A	0.88474
48D	0.84935
72A	0.81537
72D	0.78276
96A	0.75145
96D	0.72139
132A	0.69253
132D	0.66483

Tabela B37 - Valores do número de células aderidas nos microcarregadores referentes ao experimento 5 obtidos pelo método no MTT. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Número de células com correção do fator de diluição (células)	Desvio padrão (células)	Número de células sem correção do fator de diluição (células)	Desvio padrão (células)
0				
8	9.51E+06	2.44E+05	9.51E+06	2.44E+05
24A	8.72E+06	8.37E+04	8.37E+06	8.04E+04
24D	1.07E+07	1.74E+05	9.83E+06	1.61E+05
48A	8.49E+06	1.98E+05	7.51E+06	1.75E+05
48D	8.54E+06	8.19E+04	7.26E+06	6.96E+04
72A	7.96E+06	8.53E+04	6.49E+06	6.96E+04
72D	8.20E+06	8.89E+04	6.42E+06	6.96E+04
96A	8.79E+06	5.35E+04	6.61E+06	4.02E+04
96D	9.22E+06	1.47E+05	6.65E+06	1.06E+05
132A	9.14E+06	0.00E+00	6.33E+06	1.14E-09
132D	9.13E+06	3.02E+05	6.07E+06	2.01E+05

Tabela B38 - Valores do número de células em suspensão referentes ao experimento 5. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Número de células em suspensão (células)	Desvio padrão (células)
0	6.25E+06	0.00E+00
8	3.75E+05	2.50E+05
24A	7.81E+05	4.75E+05
24D	4.75E+05	4.07E+05
48A	9.89E+05	1.63E+05
48D	0.00E+00	0.00E+00
72A	1.07E+06	1.77E+05
72D	0.00E+00	0.00E+00
96A	3.33E+05	3.84E+05
96D	3.47E+05	0.00E+00
132A	0.00E+00	0.00E+00
132D	1.88E+05	2.17E+05

Tabela B39 - Valores do número de células recuperadas com Tryple 10X referentes ao experimento 5.

Tempo (horas)	Células recuperadas %	Desvio padrão %
0		
8	19.72	3.40
24	7.47	3.86
48	1.66	1.92
72	0.00	0.00
96	1.89	2.18
132	4.94	1.98

Tabela B40 - Valores do diâmetro médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S referentes ao experimento 5.

Tempo (horas)	Diâmetro médio (mm)	Desvio padrão (mm)
8	0.214668	0.072735
24	0.217455	0.079843
48	0.219565	0.063237
72	0.219666	0.089669
96	0.221070	0.064087
132	0.215996	0.078328

Experimento 6

Tabela B41 - Valores de pH, porcentagem de CO₂ na incubadora e agitação referentes ao experimento 6. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	pH	CO ₂ na incubadora (%)	Agitação rpm
0	7.25	5	Intermitente
8	7.35	5	20
10	Não foi medido	5	30
12	Não foi medido	5	40
24A	7.38	5	40
24D	7.3	5	40
32	7.33	5	40
40	7.33	5	40
48A	7.32	5	40
48D	7.35	5	40
56	7.4	5	40
64	7.4	5	40
72A	7.4	5	40
72D	7.38	0	40
80	7.45	0	40
88	7.43	0	40
96A	7.42	0	40
96D	7.4	0	40
104	7.5	0	40
132A	7.6	0	40
132D	7.4	0	40
144A	7.59	0	40
144D	7.4	0	40
152	7.51	0	40
160	7.57	0	40
168A	7.61	5	40
168D	7.42	5	40

Tabela B42 - Valores de aminoácidos referentes ao experimento 6. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Ácido aspártico (mM)	Ácido glutâmico (mM)	Asparagina (mM)	Serina (mM)	Glutamina (mM)	Glicina (mM)	Histidina (mM)	Arginina (mM)	Treonina (mM)	Alanina (mM)
8	0.068	0.328	0.244	0.000	2.802	0.548	0.112	0.268	0.154	0.314
24A	0.054	0.332	0.264	0.000	2.415	0.569	0.114	0.026	0.163	0.389
24D	0.041	0.247	0.231	0.000	2.500	0.560	0.110	0.113	0.155	0.305
48A	0.049	0.287	0.245	0.000	2.536	0.602	0.121	0.000	0.178	0.297
48D	0.041	0.247	0.249	0.000	2.606	0.571	0.120	0.178	0.183	0.311
72A	0.045	0.294	0.220	0.000	2.267	0.556	0.114	0.000	0.173	0.286
72D	0.042	0.258	0.224	0.000	2.413	0.549	0.113	0.168	0.172	0.285
96A	0.028	0.222	0.187	0.000	1.963	0.496	0.103	0.094	0.164	0.275
96D	0.039	0.230	0.207	0.000	2.208	0.599	0.131	0.202	0.180	0.278
132A	0.026	0.187	0.182	0.000	2.010	0.649	0.125	0.185	0.170	0.195
132D	0.029	0.181	0.158	0.000	2.260	0.677	0.108	0.232	0.175	0.216
144A	0.026	0.173	0.171	0.000	1.880	0.594	0.116	0.198	0.163	0.228
144D	0.027	0.170	0.164	0.000	2.040	0.649	0.127	0.234	0.168	0.201
168A	0.030	0.188	0.181	0.000	3.830	0.505	0.129	0.211	0.177	0.232
168D	0.025	0.155	0.180	0.000	2.060	0.611	0.128	0.233	0.174	0.181

Tabela B43 - Valores de aminoácidos, glicose, ácido láctico e amônia referentes ao experimento 6. “A” representa os valores antes da troca de meio de cultura e “D” os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Prolina (mM)	Tirosina (mM)	Valina (mM)	Metionina (mM)	Cisteína (mM)	Isoleucina (mM)	Leucina (mM)	Fenilalanina (mM)	Lisina (mM)	Glicose (mM)	Ácido láctico (mM)	Amônia (mM)
8	0.262	0.138	0.217	0.041	0.110	0.172	0.211	0.104	0.272	5.589	1.743	1.824
24A	0.305	0.176	0.241	0.042	0.094	0.175	0.221	0.120	0.284	5.373	2.587	3.188
24D	0.288	0.164	0.234	0.042	0.084	0.173	0.210	0.110	0.261	5.750	1.865	2.518
48A	0.105	0.163	0.250	0.043	0.083	0.179	0.226	0.114	0.218	5.806	2.531	3.235
48D	0.244	0.177	0.247	0.043	0.082	0.185	0.228	0.117	0.277	5.850	1.654	1.941
72A	0.117	0.159	0.240	0.041	0.069	0.168	0.210	0.118	0.258	5.717	2.642	2.659
72D	0.187	0.159	0.236	0.040	0.076	0.171	0.212	0.110	0.263	6.539	1.587	1.941
96A	0.163	0.180	0.218	0.035	0.054	0.152	0.192	0.101	0.243	4.629	1.454	2.412
96D	0.202	0.156	0.246	0.042	0.064	0.177	0.215	0.108	0.264	5.695	1.421	1.694
132A	0.263	0.157	0.248	0.040	0.054	0.171	0.218	0.105	0.255	5.012	1.454	1.953
132D	0.228	0.163	0.245	0.046	0.052	0.177	0.220	0.108	0.259	6.261	1.221	1.482
144A	0.230	0.153	0.226	0.038	0.056	0.162	0.198	0.096	0.236	5.184	1.421	1.718
144D	0.168	0.158	0.236	0.040	0.057	0.170	0.218	0.104	0.251	5.839	1.443	1.259
168A	0.164	0.170	0.241	0.040	0.057	0.173	0.224	0.106	0.261	5.606	1.332	1.835
168D	0.199	0.160	0.237	0.040	0.061	0.170	0.219	0.102	0.263	6.244	1.388	1.353

Tabela B44 - Valores dos fatores de diluição referentes ao experimento 6. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Fator de diluição
8	
24A	0.96000
24D	0.92160
48A	0.88474
48D	0.84935
72A	0.81537
72D	0.78276
96A	0.75145
96D	0.72139
132A	0.69253
132D	0.66483
144A	0.63824
144D	0.61271
168A	0.58820
168D	0.56467

Tabela B45 - Valores do número de células aderidas nos microcarregadores referentes ao experimento 6 obtidos pelo método no MTT. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Número de células com correção do fator de diluição (células)	Desvio padrão (células)	Número de células sem correção do fator de diluição (células)	Desvio padrão (células)
0				
8	8.83E+06	1.06E+05	8.83E+06	1.06E+05
24A	1.19E+07	3.58E+05	1.15E+07	3.43E+05
24D	1.17E+07	1.15E+05	1.08E+07	1.06E+05
48A	9.59E+06	4.78E+05	8.49E+06	4.23E+05
48D	8.52E+06	1.42E+05	7.23E+06	1.21E+05
72A	8.02E+06	4.93E+04	6.54E+06	4.02E+04
72D	8.35E+06	1.03E+05	6.54E+06	8.04E+04
96A	1.00E+07	5.35E+04	7.53E+06	4.02E+04
96D	8.71E+06	5.57E+04	6.28E+06	4.02E+04
132A	8.84E+06	3.48E+05	6.12E+06	2.41E+05
132D	8.99E+06	0.00E+00	5.98E+06	0.00E+00
144A	9.77E+06	1.26E+05	6.24E+06	8.04E+04
144D	1.00E+07	1.97E+05	6.14E+06	1.21E+05

168A	1.08E+07	6.83E+04	6.33E+06	4.02E+04
168D	1.09E+07	7.12E+04	6.14E+06	4.02E+04

Tabela B46 - Valores do número de células em suspensão referentes ao experimento 6. "A" representa os valores antes da troca de meio de cultura e "D" os valores depois da troca de meio.

Tempo (horas)	Número de células em suspensão (células)	Desvio padrão (células)
0	6.25E+06	0.00E+00
8	3.75E+05	4.33E+05
24A	1.04E+06	6.01E+05
24D	9.49E+05	1.57E+05
48A	7.06E+05	4.89E+05
48D	4.42E+05	1.70E+05
72A	1.38E+06	1.77E+05
72D	9.58E+05	7.38E+05
96A	3.33E+05	0.00E+00
96D	0.00E+00	0.00E+00
132A	0.00E+00	0.00E+00
132D	1.88E+05	2.17E+05
144A	1.96E+05	2.26E+05
144D	0.00E+00	0.00E+00
168A	0.00E+00	0.00E+00
168D	2.21E+05	2.56E+05

Tabela B47 - Valores do número de células recuperadas com Tryple 10X referentes ao experimento 6.

Tempo (horas)	Células recuperadas %	Desvio padrão %
0		
8	16.27	9.35
24	18.55	5.77
48	16.94	11.88
72	1.91	2.21
96	7.47	7.36
132	0.00	0.00
144	0.00	0.00
168	0.00	0.00

Tabela B48 - Valores do diâmetro médio dos aglomerados de microcarregadores Cultispher-S referentes ao experimento 6.

Tempo (horas)	Diâmetro médio (mm)	Desvio padrão (mm)
8	0.220688	0.068857
24	0.221443	0.050512
48	0.207946	0.061674
72	0.208423	0.076873
96	0.211488	0.059731
132	0.214470	0.066539
144	0.200154	0.071242
168	0.195878	0.063666